

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840031

研究課題名(和文) カゼインをゴルジ体でリン酸化する真のカゼインキナーゼの探索

研究課題名(英文) Exploration of Golgi casein kinases

研究代表者

石川 裕之 (Ishikawa, Hiroyuki)

千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00398819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミルクに含まれる分泌性のリン酸化タンパク質であるカゼインをゴルジ体でリン酸化するキナーゼ分子(ゴルジ体キナーゼ)の同定を試みた。その結果、新規ゴルジ体キナーゼと予測される遺伝子を同定し、ショウジョウバエ突然変異体の作出に成功した。さらに、カゼインをリン酸化すると予測されるゴルジ体キナーゼFAM20Cの強制発現はショウジョウバエの正常発生に影響を与えるが、発生完了後の個体には影響を与えないことを明らかにした。

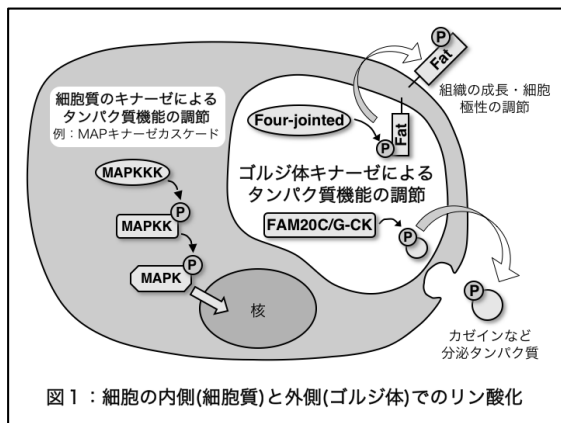
研究成果の概要(英文)：Casein is a secretory phosphorylated protein containing in milk. We attempted to identify the kinase molecule to phosphorylate casein in the Golgi. As a result, we identified candidate genes for novel Golgi kinases in the Drosophila genome. We also succeeded in producing Drosophila mutants of these genes. Further, we found that overexpression of a Golgi kinase FAM20C affected the normal development of Drosophila.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ゴルジ体キナーゼ リン酸化

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上のタンパク質や分泌性のタンパク質など、細胞の外側ではたらくタンパク質の多くは、小胞体・ゴルジ体に存在する糖転移酵素による糖鎖修飾によりその機能が調節されることが良く知られている。これに対して本研究者は、ゴルジ体に存在するリン酸化酵素(ゴルジ体キナーゼ)によるタンパク質の細胞外領域のリン酸化の機能に着目し研究を行っている。これまでに本研究者は、組織の成長と平面細胞極性を制御する細胞膜上のタンパク質である非定型カドヘリン Fat と Dachous の機能が、ゴルジ体キナーゼ Four-jointed (Fj) による Fat と Dachous の細胞外カドヘリンドメインのリン酸化により調節されることを明らかにした。細胞質内において、タンパク質の機能がリン酸化により調節されることはよく知られているが、この研究により、タンパク質の細胞外領域のリン酸化もまた、タンパク質の機能調節に重要な役割をはたしていることを明らかにした。Fj と細胞質に存在する既知のキナーゼ分子のアミノ酸配列の相同性は低い。そこで Fj のアミノ酸配列を足がかりにした相同性検索により、新たなゴルジ体キナーゼの同定を試みた。その結果、新規ゴルジ体キナーゼの候補として機能未知遺伝子 FAM20C を同定した。FAM20C はゴルジ体に局在し、キナーゼのモデル基質としてよく用いられるカゼインをリン酸化した。すなわち FAM20C はゴルジ体キナーゼである。



### 2. 研究の目的

カゼインはミルク中の分泌性タンパク質であり、リン酸化タンパク質であることが古くから指摘されてきた。カゼインは多数のリン酸化部位を有し、そのリン酸化は、ミルク中でカゼインがミセル化するために必要であるため、カゼインのリン酸化を担うキナーゼの探索は古くから行われてきた。その結果、カゼインはゴルジ体において3種類の異なる認識配列のキナーゼ(CK1, CK2, Golgi-Casein Kinase)によりリン酸化されることが明らかにされている。しかし、これらカゼインのリン酸化を担うゴルジ体キナーゼ分子の同定はされていなかった。これま

で本研究者は、合成ペプチド基質を用いたキナーゼ活性測定により、FAM20C が Golgi-Casein Kinase に特異的なペプチド基質をリン酸化することを明らかにした。そこで本研究では、カゼインのCK1およびCK2認識配列をリン酸化するゴルジ体キナーゼ分子の同定を目的とした。

### 3. 研究の方法

カゼイン中のCK1とCK2配列をリン酸化するゴルジ体キナーゼとして、4つの可能性を考えた。1)FAM20Cとファミリーを形成する遺伝子群のいずれかがリン酸化する、2)FAM20Cがリン酸化する、3)細胞質キナーゼとして知られるCasein Kinase1と2がリン酸化する、4)未知のキナーゼ分子がリン酸化する。これらの可能性を考慮しつつ、CK1およびCK2の認識配列のリン酸化を担うゴルジ体キナーゼの同定を試みることにした。

1)については、FAM20Cとの配列の類似性からゴルジ体キナーゼと予測される分子のキナーゼ活性を測定し、キナーゼ候補分子がCK1あるいはCK2に特異的なペプチド基質をリン酸化するか調べる。2)については、FAM20CとCK1配列のみあるいはCK2配列のみを有する変異型カゼインを培養細胞に発現させて変異型カゼインのリン酸化状態を二次元電気泳動により調べる。3)については、Casein Kinase1およびCasein Kinase2を変異型カゼインと培養細胞に共発現し、変異型カゼインがリン酸化されるか調べる。4)については、大腸菌を用いた発現スクリーニングにより、CK1およびCK2配列をリン酸化するゴルジ体キナーゼを同定する。

### 4. 研究成果

FAM20Cとの配列の類似性からゴルジ体キナーゼと予測される候補遺伝子群を哺乳類培養細胞用の発現ベクターにC末端側にタグ配列を付加した状態でクローニングした。これらタグ付きの候補分子を培養細胞に発現させたところ、ゴルジ体あるいは小胞体に局在した。そこで、培養細胞からタグ配列に対する抗体ビーズを用いてタンパク質を精製した。得られた精製タンパク質が、CK1あるいはCK2に特異的なペプチド基質をリン酸化するか調べる予定であったが、別グループにより、FAM20CがCK1およびCK2の認識配列のリン酸化を担うことが報告された(Tagliabracci et al, Cell 2015)。さらに、予備的知見として、本研究者もデータベース上のマイクロアレイデータの解析により、授乳期のマウスの乳腺においてFAM20Cの発現が上昇することを明らかにしていた。これらの結果により、カゼインの3種類の異なる認識配列(CK1, CK2, Golgi-Casein Kinase)は、すべてFAM20Cによりリン酸化される可能性が高いと結論した。

そこで、ゴルジ体キナーゼのさらなる生理機能の一端を明らかにするために、FAM20Cを

ショウジョウバエに強制発現することにした。その結果、FAM20Cの強制発現はショウジョウバエに致死性を誘発することが分かった。一方で、成虫まで発生したFAM20C強制発現個体において、寿命の短縮はみられなかった。したがって、FAM20Cの強制発現によるタンパク質細胞外領域の過剰なリン酸化は、ショウジョウバエの正常な発生に影響を与えるが、発生完了後の個体には影響を与えないことが示唆された。

さらに、FAM20Cとの相同性検索により、ゴルジ体キナーゼ候補遺伝子を新たに2種類(GolgiK1とGolgiK2)同定した。そこでショウジョウバエにおけるGolgiK1とGolgiK2の機能を調べるために、GolgiK1とGolgiK2のRNAiを行った。その結果、成虫の背中が脱落する表現型を示した。この結果は、GolgiK1とGolgiK2は細胞外基質をリン酸化することにより外骨格の形成に重要な役割をはたす可能性を示唆している。次に、CRISPR/Cas9システムを用いてGolgiK1とGolgiK2の突然変異体を作成した。今後は、作成したGolgiK1およびGolgiK2突然変異体の表現型の解析を行う必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Ishio A, Sasamura T, Ayukawa T, Kuroda J, Ishikawa H0, Aoyama N, Matsumoto K, Gushiken T, Okajima T, Yamakawa T, Matsuno K. O-fucose monosaccharide of Drosophila Notch has a temperature-sensitive function and cooperates with O-glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation. J Biol Chem. 2015 Jan 2;290(1):505-19. doi: 10.1074/jbc.M114.616847

Sawamura K, Maehara K, Keira Y, Ishikawa H0, Sasamura T, Yamakawa T, Matsuno K. A test of double interspecific introgression of nucleoporin genes in Drosophila. G3 (Bethesda). 2014 Aug 28;4(11):2101-6. doi: 10.1534/g3.114.014027

Nakayama M, Ishibashi T, Ishikawa H0, Sato H, Usui T, Okuda T, Yashiro H, Ishikawa H, Taikou Y, Minami A, Kato K, Taki M, Aigaki T, Gunji W, Ohtsu M, Murakami Y, Tanuma S, Tsuboi A, Adachi M, Kuroda J, Sasamura T, Yamakawa T, Matsuno K. A gain-of-function screen to identify genes that reduce lifespan in the adult of

Drosophila melanogaster. BMC Genet. 2014 Apr 16;15:46. doi: 10.1186/1471-2156-15-46

[学会発表](計11件)

松本仙太郎, 白石穂高, 計良陽子, 石川裕之. ゴルジ体キナーゼ Four-jointed の発現・局在パターン形成機構. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会)(招待講演). 2015年12月03日. 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

田中友子, 和田萌, 計良陽子, 石川裕之. ショウジョウバエの強制発現系を用いた平面細胞極性を制御する遺伝子の探索. 日本動物学会第67回関東支部大会. 2015年03月14日. 早稲田大学(東京都・新宿区)

Hodaka Shiraishi, Hirofumi Nonoyama, Yoko Keira, Hiroyuki O. Ishikawa. Subcellular localization of the Golgi kinase Four-jointed. 56th Annual Drosophila Research Conference. 2015年03月05日~2015年03月07日. Chicago(USA)

松本仙太郎, 荒井星矢, 計良陽子, 石川裕之. ショウジョウバエ成虫原基における four-jointed のエンハンサー解析. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月27日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

白石穂高, 野々山裕文, 佐々木飛鳥, 土井由香, 野上識, 計良陽子, 石川裕之. ゴルジ体キナーゼ Four-jointed の細胞内局在化機構の解析. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月27日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hodaka Shiraishi, Yoko Keira, Hiroyuki O. Ishikawa. Subcellular localization and domain analysis of the Golgi kinase Four-jointed. The 62nd NIBB Conference, Force in Development. 2014年11月18日. 岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

Sentaro Matsumoto, Seiya Arai, Yoko Keira, Hiroyuki O. Ishikawa. Identification of enhancers of four-jointed in Drosophila imaginal discs. 11th Japanese Drosophila Research Conference. 2014年06月05日~2014年06月06日. 金沢歌劇座(石川県・金沢市)

Hodaka Shiraishi, Hirofumi Nonoyama, Asuka Sasaki, Yoko Keira, Hiroyuki O. Ishikawa. Subcellular localization and domain analysis of the Golgi kinase Four-jointed. 11th Japanese Drosophila

Research Conference. 2014年06月05日～2014年06月06日. 金沢歌劇座(石川県・金沢市)

石川裕之, 野々山裕文, 田中友子, 計良陽子. タンパク質細胞外領域のリン酸化: 古くて新しい翻訳後修飾. 第36回日本分子生物学会年会(招待講演). 2013年12月04日. 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

野々山裕文, 中山綾子, 佐々木飛鳥, 計良陽子, 石川裕之. ゴルジ体キナーゼ Four-jointed の細胞内局在制御機構の解析. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月04日. 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

田中友子, 中山綾子, 石川裕之. ゴルジ体キナーゼ Four-jointed の自己リン酸化の機能解析. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月04日. 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://life.s.chiba-u.jp/ishikawa/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 裕之 (ISHIKAWA, Hiroyuki)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 00398819

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし