

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440060

研究課題名(和文)新規アダプタータンパク質GAREMの生理機能の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel adaptor protein, GAREM

研究代表者

小西 博昭 (Konishi, Hiroaki)

県立広島大学・生命環境学部・教授

研究者番号：40252811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖因子シグナル伝達経路における新規アダプタータンパク質のGAREM (Grb2-associated regulator of Erk/MAPK) には2つの分子種が存在する。GAREMは、両分子種に共通した数種の機能ドメインを持ち、細胞増殖因子刺激を受けた細胞内でチロシンリン酸化された後、増殖因子受容体結合因子のGrb2と結合し、タンパク質リン酸化酵素Erkの活性化を制御する。本研究では核局在配列(NLS)を持つGAREM1の、分子内結合による新たな細胞内局在制御機構を見出した。また、より詳細な生理的役割を解析するために、それぞれのGAREMのノックアウトマウスを作製した。

研究成果の概要(英文)：GAREM1 (Grb2-associated regulator of Erk/MAPK1) is an adaptor protein that is involved in the EGF pathway. The nuclear localization of GAREM1 depends on the nuclear localization sequence (NLS), which is located at the N-terminal CABIT (cysteine-containing, all in Themis) domain. Here, we identified 14-3-3 as a GAREM-binding protein, and its binding site is closely located to the NLS. Moreover, the binding of 14-3-3 had an effect on the nuclear localization of GAREM1. We suggest that the interplay between 14-3-3, the C-terminal SAM (sterile alpha motif) domain and CABIT domain might be responsible for the distribution of GAREM1 in mammalian cells.

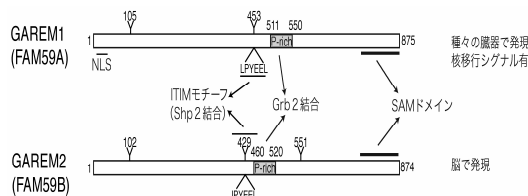
In contrast to GAREM1 that is expressed ubiquitously in human organs and cultured cells, GAREM2 is specifically expressed in the mouse, rat, and human brain. Moreover, GAREM2 does not possess the NLS sequence. To analyze the physiological functions of each GAREM subtype, we established and characterized a GAREM knockout (KO) mouse.

研究分野：生物化学

キーワード：細胞情報伝達

1. 研究開始当初の背景

当研究室では研究開始時までに EGF 受容体下流タンパク質のチロシンリン酸化を指標とした網羅的解析 (プロテオミクス) により見出した新規タンパク質の解析を行ってきた。その中の一つである GAREM (Grb2-associated regulator for Erk/MAPK) は 2009 年に報告した新規アダプタータンパク質である。その後、遺伝子データベース中には GAREM と相同性を有する分子種が存在したため、先に見出した分子種を GAREM1、新たに見出した方を GAREM2 とした。そして、GAREM2 の培養細胞における機能についても 2013 年に報告した。しかし、それまでの解析はすべて培養細胞レベルであり、生体内の実際の役割を調べるためには、それぞれの GAREM 分子を欠失したノックアウト (KO) マウスを作製する必要性があった。以下にそれぞれの GAREM 分子種の一次構造ならびに、類似点と相違点を示す (Y はリン酸化されるチロシンを表す)。



2. 研究の目的

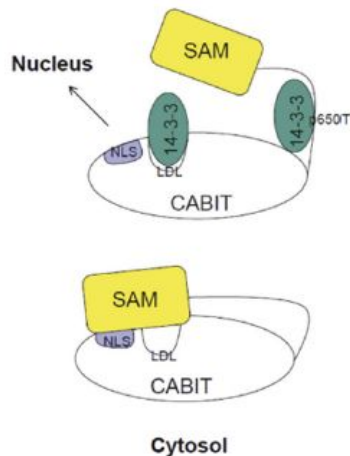
本研究は当研究室で独自に見出した細胞増殖因子刺激のシグナル伝達分子である GAREM の生理機能を明らかにするために行う。GAREM には 2 つの分子種 GAREM1 と GAREM2 が存在し、前者は広範な臓器で、後者は脳で発現する。培養細胞レベルではいずれの分子種も EGF や IGF-1 などの細胞増殖因子からのシグナルを制御し、細胞のがん化や神経様突起の伸長に参与する。しかし、生体内での詳細な役割は不明であり、それを明らかにするために両分子種のノックアウトマウスを作製する。両 GAREM 分子種は細胞増殖因子刺激でチロシンリン酸化を受け、分子内のプロリンリッチ領域を介して Grb2 と結合するなど、機能的な共通点は多い。しかし、細胞内局在など、それぞれの分子種で異なる点もいくつかある。また、両分子内に存在する SAM ドメインの機能も不明であるので、機能領域に着目して、それぞれの GAREM 分子種の細胞内における役割も明らかにする。

3. 研究の方法

- ・ GAREM1 の核内局在に参与するタンパク質の検索や核内での機能についての解析
- ・ GAREM2 の脳内での結合タンパク質の検索
上記の実験については、それぞれの GAREM を免疫沈降により精製し、その免疫複合体中に含まれるタンパク質を質量分析装置で同定する。その後、イムノプロットにより結合を確認する。
- ・ GAREM 分子の SAM ドメインの役割
別々のタグ配列を付加した GAREM 分子種のダイマー形成を確認する。また、GST 融合 SAM ドメインタンパク質を用いたプルダウンアッセイなどにより、SAM ドメイン結合タンパク質の同定を行う。
- ・ それぞれの GAREM 分子のノックアウトマウスの樹立
理化学研究所との共同研究により、それぞれのコンディショナルノックアウトマウスを作製する。

4. 研究成果

GAREM1 はアミノ末端側に NLS (Nuclear localization signal) を持つため細胞質のみならず核にも局在できる。しかし、GAREM2 は NLS を持たないため、核には局在できない。その他の構造的な特徴として、両 GAREM 分子種のカルボキシル末端には SAM (sterile motif) ドメインと呼ばれる種々のタンパク質に共通して存在する機能領域がある。また、GAREM1 とほぼ同時期に見出された T 細胞受容体シグナル下流で作用する THEMIS (thymocyte-expressed molecule involved in selection) は GAREM と同様にチロシンリン酸化され、Grb2 及び Shp タンパク質と結合し、NLS を持つ分子種も存在する。さらに THEMIS 分子種全てに保存され、新しく機能領域として提唱された CABIT (cysteine containing - all in THEMIS) 領域は GAREM にも存在する。CABIT 領域は THEMIS の T 細胞分化制御機能に必須であることが示されているが、GAREM における役割は不明であった。本研究では GAREM の CABIT 領域と SAM ドメインが分子内で結合することを見出し、GAREM1 結合タンパク質の 14-3-3 が CABIT 領域内に結合し、CABIT-SAM 両ドメインの分子内相互作用を阻害することで、NLS の機能を制御していることを明らかにした (BBRC (2015) 下図参照)。



ところで、前述の通り、現在までに GAREM1、2 とともに結合するタンパク質の一つとして 14-3-3 を同定している。GAREM1 においてはアミノ末端側にリン酸化セリンを介さない 14-3-3 結合部位が存在し、それが GAREM1 の核移行を制御していることを明らかにしている。一方、GAREM2 はヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞で GAREM2 の発現を減少させると、IGF-1 刺激依存的に誘導される神経様突起伸長が抑制される。現在、FLAG タグを付加した GAREM2 を SH-SY5Y 細胞に恒常的発現をさせると、IGF-1 無刺激でも神経様突起伸長を促すことを見出している。今後、この細胞から FLAG 抗体による免疫沈降法で精製した GAREM2 に結合するタンパク質について質量分析機を用いて同定し、GAREM2 機能との関連について明らかにする。

さて、それぞれのコンディショナル KO マウス作製は理化学研究所・多細胞システム形成研究センターとの共同研究により作製した。マウス GAREM1、GAREM2 ゲノム遺伝子は、それぞれ第 18 番、第 5 番染色体に存在し、GAREM1 は 5 個のエクソンから、GAREM2 は 6 個のエクソンからなる。loxP 配列はそれぞれエクソン中で最も長い部分を挟む形で挿入されており、Cre リコンビナーゼにより GAREM1 のエクソン 3 及び GAREM2 のエクソン 4 が欠失するように構築されている。これまでにフリッパーゼ発現トランスジェニック (TG) マウスとの交配による薬剤耐性マーカー遺伝子除去及び全身で Cre リコンビナーゼを発現する TG マウスとの交配により loxP 間の遺伝子を除去し、ヘテロ KO マウスを作製後、ヘテロ同士の交配によりそれぞれのホモ KO マウスを作製した。現在 GAREM1 及び 2 の

それぞれの KO マウスは基本的に正常に発生し、生殖能力もある。しかし、野生型マウスに比較して、GAREM1 の KO マウスは若干の体重減少、GAREM2 の KO マウスはおそらく育児拒否による産仔数減少や神経質な傾向が観察された。現在、それぞれの KO マウスの詳細な解析を進めている。もし、野生型とそれぞれの KO マウスで科学的根拠のある表現型の違いが何も認められない場合は、現在作製中であるダブル KO マウスについての解析に移行する。

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4件)

1. Antagonizing effect of CLPABP on the function of HuR as a regulator of ARE-containing leptin mRNA stability and the effect of its depletion on obesity in old male mouse.
Nishino, T., Matsunaga, R., Jikihara, H., Uchida, M., Maeda, A., Qi, G., Abe, T., Kiyonari, H., Tashiro, S., Inagaki-Ohara, K., Shimamoto, F., Konishi, H.
Biochim. Biophys. Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids 1861, 1816-1827 (2016).
2. Versatile function of the circadian protein CIPC as a regulator of Erk activation.
Matsunaga, R., Nishino, T., Yokoyama, A., Nakashima, A., Kikkawa, U., and Konishi, H.
Biochem Biophys Res Commun. 469,377-383 (2016)
3. Functional relationship between CABIT, SAM and 14-3-3 binding domains of GAREM1 that play a role in its subcellular localization.
Nishino, T., Matsunaga, R., and Konishi, H.
Biochem Biophys Res Commun. 464,616-621 (2015)
4. tRNA modifying enzymes, NSUN2 and METTL1, determine sensitivity to

5-fluorouracil in HeLa cells.

Okamoto, M., Fujiwara, M., Hori, M.,
Okada, K., Yazama, F., Konishi, H.,
Xiao, Y., Qi, G., Shimamoto, F., Ota,
T., Temme, A., and Tatsuka, M.

PLoS Genet. 10(9):e1004639 (2014)

[学会発表](計1件)

第89回日本生化学会大会

2016年9月26日 仙台国際センター / 東北大学
川内北キャンパス

13:30 ~ 14:45

[2P-013] ノックアウトマウスを用いた
CLPABP (PLEKHN1) 生理機能の解析

西野扶, 松永涼汰, 内田萌, 前田朱音, 小
西博昭 (県立広島大学・生命環境学部・生命
科学科)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 博昭(Hiroaki KONISHI)

県立広島大学・生命環境学部・生命科学
科・教授

研究者番号: 40252811

(3) 連携研究者

内匠 透 (Toru TAKUMI)

国立研究開発法人理化学研究所, ・脳科学
総合研究センター, ・シニアチームリーダ
ー

研究者番号: 00222092