

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26440101

研究課題名（和文）多層リン酸化プロテオミクスによる疾患原因キナーゼの標的基質の同定と生理機能の解明

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of substrates of disease-associated protein kinases using multiple phosphoproteomic technologies

研究代表者

小迫 英尊（KOSAKO, Hidetaka）

徳島大学・先端酵素学研究所（オープンイノベ）・教授

研究者番号：10291171

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質キナーゼの遺伝子異常は種々の疾患を引き起こすため、個々のキナーゼの基質を同定してそのリン酸化制御を明らかにすることは、基礎研究のみならず臨床応用の見地からも重要である。本研究では、IMAC/2D-DIGE法やPhos-tagウェスタンブロット法、及び最新の質量分析計を駆使することにより、パーキンソン病の原因となるPINK1やがん化などに関与するERK、及び自己免疫疾患に関わるPKDの新規基質を同定した。そしてそれぞれのキナーゼがこれらの新規基質を介して細胞機能を制御する仕組みを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Many diseases are associated with mutations in protein kinases. To fully and therapeutically understand the complex signaling networks, it is essential to develop analytical strategies for the global identification and functional characterization of in vivo substrates of individual protein kinases. In this study, we have identified novel substrates of three disease-associated protein kinases including PINK1, ERK and PKD by using the IMAC/2D-DIGE method, Phos-tag Western blotting and mass spectrometry. Furthermore, we uncovered molecular mechanisms by which each kinase regulates cellular functions through these substrates.

研究分野：生物学

キーワード：シグナル伝達 プロテオーム リン酸化 キナーゼ PINK1 ERK PKD ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は、その酵素活性、相互作用、安定性、細胞内局在などを可逆的に制御することが可能であり、真核生物において最も広く認められる翻訳後修飾である。このためヒトにはタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）が500種類以上も存在し、様々な細胞内シグナル伝達系で中心的な役割を果たしている。タンパク質キナーゼをコードする遺伝子の異常はがんや糖尿病、神経変性疾患、循環器疾患などの種々の疾患の原因となることが知られている。従って個々のキナーゼが標的とする基質タンパク質を大規模に同定し、下流シグナルネットワークの全体像を明らかにすることは、基礎研究のみならず診断・創薬などの応用研究の見地からも重要である。近年の各種プロテオミクス技術の著しい進歩により、キナーゼ基質を効率的に同定してそのリン酸化による機能制御を詳細に明らかにすることが可能になっている。本研究では、PINK1、ERK/MAPキナーゼ、及びPKDの3つの疾患原因キナーゼに焦点を当て、それぞれのキナーゼの新規基質を同定してその生理機能を明らかにする予定である。

## 2. 研究の目的

本研究では主に以下の3種類のセリン/スレオニンキナーゼを基質探索の対象とする。

(1) 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1。パーキンソン病は中脳黒質のドーパミン産生神経細胞が変性・脱落することを主因とする難治性の神経変性疾患である。パーキンソン病は孤発性と家族性に大別されるが、家族性では特定の遺伝子の異常に起因することから、病態発症の分子機序を明らかにする上で重要な手掛かりとなる。これまでに約20種類の家族性パーキンソン病の原因遺伝子が同定されており、中でも PINK1 とユビキチンリガーゼ Parkin の2つの遺伝子産物によるミトコンドリアの品質管理に関する研究が進んでいる。2010年に複数のグループにより、PINK1 はミトコンドリアの膜電位が低下すると安定化し、そのキナーゼ活性によって Parkin を異常ミトコンドリアに移行させ、ミトコンドリア特異的なオートファジー（マイトファジーと呼ばれる）を誘導することが報告された。この PINK1 と Parkin の連携によるミトコンドリアの品質管理が破綻すると、異常ミトコンドリアが蓄積して細胞障害が起こり、パーキンソン病の発症に至ると考えられるようになった。

(2) がん化、増殖、分化など真核生物で多彩な役割を果たす ERK1/2。ERK/MAPキナーゼは進化的に高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞の増殖・生存・がん

化・分化などの多彩な細胞運命の決定に深く関与している。Ras-Raf-MEK-ERK 経路の恒常的な活性化は多くのがん細胞で認められており、本シグナル伝達経路はがん治療、特にメラノーマの治療において重要な分子標的となっている。ERK の標的基質として、これまでに転写因子など数百種類のタンパク質が同定されているが、現在も新たな ERK 基質の報告が相次いでいるため、未知の ERK 基質の存在が推測される。

(3) 自己免疫疾患に関与し、T細胞の分化を制御する PKD2/3。T細胞受容体 (TCR) を介したシグナル経路は胸腺における T細胞の分化を制御しており、TCR シグナルの異常はアレルギーや自己免疫疾患の原因となることが知られている。プロテインキナーゼ D (PKD) は TCR 刺激によって活性化することは知られていたが、PKD の T細胞分化における役割は不明であった。

## 3. 研究の方法

研究代表者らが独自に開発した IMAC/2D-DIGE 法に加え、細胞抽出液などの複雑な試料中における特定のタンパク質のリン酸化状態を調べる上で極めて有効な Phos-tag ウェスタンブロット法、及び最新の質量分析計 (LC-MS/MS) を用いたリン酸化部位の高感度同定法などを駆使することにより、それぞれのキナーゼの新規基質を同定する。そして種々の生化学・細胞生物学的な解析により、これらの新規基質のリン酸化を介して疾患原因キナーゼが細胞機能を制御する仕組みを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) ミトコンドリアの膜電位が低下すると、PINK1 に依存して Parkin とユビキチンの両方の Ser65 がリン酸化されることを Phos-tag ウェスタンブロット法と LC-MS/MS 解析で明らかにした。そして精製 PINK1 がユビキチンの Ser65 を *in vitro* で直接リン酸化できたことから、PINK1 は翻訳後修飾因子であるユビキチンをリン酸化修飾するという、驚くべき知見が得られた。

細胞内において Parkin のユビキチンリガーゼ活性は正常時は抑制されており、膜電位が低下してはじめて活性化される。本研究において、PINK1 によって Parkin とユビキチンの両方がリン酸化されることが、Parkin の活性化に必要な十分であることを示した。活性化した Parkin はユビキチン鎖の形成を促すため、PINK1 は新たに形成されたユビキチン鎖をリン酸化する可能性が考えられた。実際に PINK1 は様々なタイプのユビキチン鎖を *in vitro* 及び *in vivo* でリン酸化することを Phos-tag ウェスタンブロット法や LC-MS/MS 解析、及び *in vitro* キナーゼアッセイによ

って明らかにした。さらにミトコンドリア移行シグナルを付加したユビキチン鎖と Parkin の両方にリン酸化模倣変異を導入したところ、膜電位が正常でも PINK1 非依存的に Parkin がミトコンドリアに移行できたことから、リン酸化されたユビキチン鎖が Parkin の受容体として機能することが示唆された。以上をまとめると、膜電位が低下した異常ミトコンドリアに PINK1 が蓄積して自己リン酸化・活性化し、ミトコンドリア上のユビキチン（鎖）と付近の Parkin をリン酸化することによって Parkin が活性化する。そして Parkin はリン酸化ユビキチン鎖に結合することで異常ミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア上の基質をユビキチン化する。新たに形成されたユビキチン鎖を PINK1 がさらにリン酸化することにより、異常ミトコンドリア上で Parkin とリン酸化ユビキチン鎖が連鎖的に集積するというポジティブフィードバックが起こると考えられる(図1)。

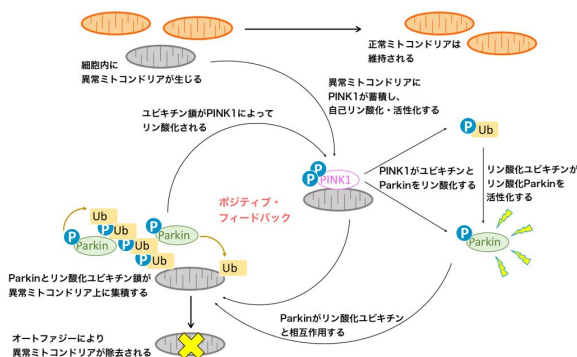


図1. PINK1とParkinによるミトコンドリアの品質管理機構

さらに PKA がミトコンドリアのクリステ構造の維持に参与する MIC60 をリン酸化することにより、PINK1 の安定化を阻害することを Phos-tag ウェスタンブロット法や質量分析計などを用いて明らかにした。従って PKA シグナルは PINK1-Parkin 経路を負に制御することが判明した。

(2) 我々は以前に、ERK が核膜孔複合体の構成因子（ヌクレオポリン）をリン酸化することにより、輸送運搬体の核膜孔の通過を抑制することを明らかにしていた。一方、ERK がリン酸化されて活性化すると細胞質から核内に移行することは古くから知られており、ERK の核内移行は様々な細胞応答に必須の過程である。本研究において、ERK がヌクレオポリンのリン酸化を介して ERK 自身の核内移行を正に制御することを見出した。この自己制御機構により、細胞外刺激の強度に対して ERK のリン酸化はアナログに応答するが、ERK の核内移行のステップでデジタルな応答に変換されることを数理モデルと RNAi 実験によって明らかにした(図2)。ERK のデジタルな核内移行応答は、ERK が制御する様々な細胞運命決定がデジタルな現象であることを考慮すると合理的と思われるが、この応答特

性が生理的に本当に重要かどうかは今後の課題である。

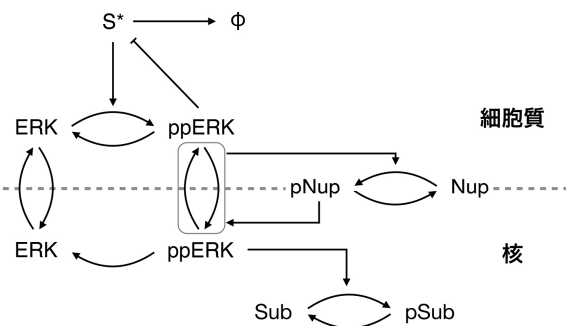


図2. リン酸化NupによるERKの核内移行制御の数理モデル

(3) 胸腺特異的 PKD2/3 遺伝子欠損マウスを作製したところ、将来ヘルパーT細胞になる CD4 陽性細胞が胸腺で激滅することを見出した。即ち、TCR シグナルの活性化による T 細胞の分化・成熟に PKD が重要な役割を果たしていることが明らかになった。そこで IMAC/2D-DIGE 法により、T 細胞において PKD がリン酸化する標的基質を大規模に探索した。TCR 刺激を行った野生型と PKD 欠損型の T 細胞を比較することにより、チロシンホスファターゼの一つである SHP-1 を含む複数の PKD 基質を見出した(図3)。T 細胞抽出液の消化物からリン酸化ペプチドを精製して LC-MS/MS 解析したところ、PKD の活性に依存して SHP-1 の Ser557 がリン酸化されることが判明した。Ser557 をアラニンに置換した (S557A) ノックインマウスを作製し、T 細胞抽出液の Phos-tag ウェスタンブロットを行うことにより、内在性 SHP-1 の Ser557 が TCR 刺激によってリン酸化されることを確認した。さらに S557A マウス由来の胸腺細胞では、CD4 陽性細胞への分化が抑制されていたことから、PKD-SHP-1 シグナル経路がヘルパーT細胞への分化に重要な役割を果たしていることが示された。

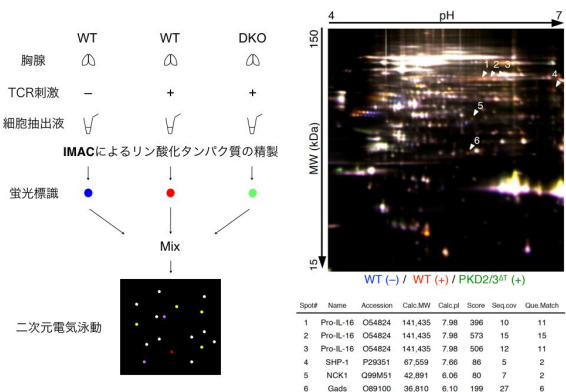


図3. IMAC/2D-DIGE法によるPKDの基質候補の同定

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Kosako, H. and Motani, K. (2017) Global identification of ERK substrates by

phosphoproteomics based on IMAC and 2D-DIGE. *Methods Mol. Biol.*, 査読無, **1487**, 137-149, DOI:10.1007/978-1-4939-6424-6\_10.

Ishikawa, E., Kosako, H., Yasuda, T., Ohmuraya, M., Araki, K., Kurosaki, T., Saito, T. and Yamasaki, S. (2016) Protein kinase D regulates positive selection of CD4<sup>+</sup> thymocytes through phosphorylation of SHP-1. *Nature Commun.*, 査読有, **7**, 12756, DOI:10.1038/ncomms12756.

Akabane, S., Uno, M., Tani, N., Shimazaki, S., Ebara, N., Kato, H., Kosako, H. and Oka, T. (2016) PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60. *Mol. Cell*, 査読有, **62**(3), 371-384, DOI:10.1016/j.molcel.2016.03.037.

Shindo, Y., Iwamoto, K., Mouri, K., Hibino, K., Tomita, M., Kosako, H., Sako, Y. and Takahashi, K. (2016) Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling. *Nature Commun.*, 査読有, **7**, 10485, DOI:10.1038/ncomms10485.

新土 優樹, 小迫 英尊, 佐甲 靖志, 高橋 恒一. (2016) 細胞内シグナルのアナログ・デジタル変換. *生物物理*, 査読無, **56**, 334-336, DOI:10.2142/biophys.56.334.

Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J. Cell Biol.*, 査読有, **209**(1), 111-128, DOI:10.1083/jcb.201410050.

小迫 英尊. (2015) プロテオミクスで明らかになった核膜孔複合体の翻訳後修飾による機能制御. *生化学*, 査読無, **87**(1), 49-55, DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870049.

Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin. *Nature*, 査読有, **510**(7503), 162-166, DOI:10.1038/nature13392.

Tsurumi, H., Harita, Y., Kurihara, H., Kosako, H., Hayashi, K., Matsunaga, A., Kajiho, Y., Kanda, S., Miura, K., Sekine, T., Oka, A., Ishizuka, K., Horita, S., Hattori, M., Hattori, S. and Igarashi, T. (2014) Epithelial protein lost in neoplasm modulates platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney Int.*, 査読有, **86**(3), 548-557, DOI:10.1038/ki.2014.85.

[学会発表](計5件)

Hidetaka Kosako, Eri Ishikawa, Sho Yamasaki. Dissection of protein kinase D signaling during thymocyte development using various phosphoproteomic strategies. HUP0 2016, 2016年9月19日, 台北(台湾)

小迫 英尊. Phos-tag などのリン酸化プロテオミクス技術の結集によるキナーゼ基質の同定と機能解析. BMB2015, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

小迫 英尊. 先端プロテオミクス技術によるタンパク質キナーゼ基質の同定と機能解析. 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月26日, あわぎんホール(徳島県徳島市)

Hidetaka Kosako. Identification and functional analysis of protein kinase substrates using various proteomic technologies. Keystone Symposia "The Biological Code of Cell Signaling: A Tribute to Tony Pawson", 2015年1月13日, スチームポートスプリングス(米国)

小迫 英尊. リン酸化プロテオミクスによるキナーゼ基質の同定と機能解析. 日本プロテオーム学会2014年会, 2014年7月17日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/cell\\_signaling/](http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/cell_signaling/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小迫 英尊 (KOSAKO, Hidetaka)  
徳島大学・先端酵素学研究所・教授  
研究者番号: 10291171

(2)研究分担者

(3)連携研究者

松田 憲之 (MATSUDA, Noriyuki)  
東京都医学総合研究所・生体分子先端研究  
分野・プロジェクトリーダー  
研究者番号：10332272

仲矢 道雄 (NAKAYA, Michio)  
九州大学・薬学研究院・准教授  
研究者番号：80464387

石崎 敏理 (ISHIZAKI, Toshimasa)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：70293876

(4)研究協力者