ミオシンホスファターゼ阻害タンパク質 CPI-17の構造と機能

北陸先端科学技術大学院大学¹ 大木進野¹

バージニア大学² 江藤真澄²

セレスター・レキシコ・サイエンス³ 松澤史子³

東京都立大学⁴, JST⁵ 甲斐荘正恒^{4,5}

Cell motility, including smooth muscle contraction and cell migration, is regulated by reversible phosphorylation of myosin. Recent studies have shown that myosin phosphatase (MP), along with kinases, contributes dynamically to the regulation of myosin-II phosphorylation. An MP specific inhibitor named CPI-17, which is expressed in smooth muscle and neuronal cells, mediates receptor signaling leading to myosin-II phosphorylation. In this review, we discuss structure/function relationships of CPI-17 stemming from our recent NMR studies and computer modeling results. The combination of biophysical approaches with biochemical techniques has revealed the inhibitory mechanism of CPI-17.

CPI-17 / NMR structure / PP1 / smooth muscle contraction / cerebellar memory

1. はじめに

セリン／トレオニン残基のリン酸化／脱リン酸化^{*}は真核生物の細胞内情報伝達において主要な役割を果たしている。一般に、休止中の細胞内ではセリン／トレオニンホスファターゼ（脱リン酸化酵素）の活性が高く、細胞内リン酸化レベルは低く抑えられている。そして、細胞が刺激を受けると、キナーゼ（リン酸化酵素）活性が上昇するとともに標的タンパク質のリン酸化レベルが増加する。しかしながら最近の研究結果から、刺激時にはキナーゼの活性化と同時にホスファターゼ活性の阻害も起こっていることが明らかになってきた。この結果として、相対的にリン酸化レベルが速やかに上昇するものと考えられる。例えば、血管平滑筋収縮においては、モータータンパク質であるミオシンがカルモジュリン（CaM）依存性のキナーゼ（MLCK）によってリン酸化される。ところが、ホルモンなどのアゴニスト刺激により細胞内の protein kinase C (PKC) や RhoA 依存キナーゼ（ROK）が活性化されるとミオ

シンホスファターゼ（MP）活性が低下し、それに伴い Ca^{2+} イオンに依存しない収縮が引き起こされる。つまり、ミオシンのリン酸化量はキナーゼとホスファターゼの両方によって調節されている。

江藤らはブタ大動脈平滑筋抽出液中にミオシンホスファターゼ活性を阻害する新規因子を見いだし、豚60頭分の大動脈（1 kg）から0.7 mgのタンパク質を精製した¹⁾。このタンパク質は、PKCによってリン酸化されること、リン酸化されるとプロテインホスファターゼ1（PP1）を阻害すること、分子質量が17 kDaであることから（PKC-potentiated PP1 inhibitor ($M_r = 17$ kDa））CPI-17と名付けられた²⁾。PKCでリン酸化したリン酸化CPI-17がスキンド平滑筋の収縮を引き起こすこと³⁾、アゴニスト収縮に伴い平滑筋内のCPI-17がリン酸化を受け⁴⁾、一酸化窒素による弛緩と連動してそのリン酸化量が減少すること⁵⁾、家畜化の過程でCPI-17を欠損したニワトリの血管平滑筋ではPKCを介した収縮がおこらないこと⁶⁾ などより、CPI-17がPKCを介したMP阻害に必須な因子であることが明らかになってきた

Structural Basis of a Myosin Phosphatase Inhibitory Protein, CPI-17

Shin-ya OHKI¹, Masumi ETO², Fumiko MATSUZAWA³ and Masatsune KAINOSHO^{4,5}

¹JAIST

²Univ. of Virginia

³Cerester Lexico Sciences

⁴Tokyo Metropolitan Univ.

⁵CREST/JST

Fig. 1 Signaling mediated by CPI-17. (Left) Regulation of vascular smooth muscle contractility. Agonist stimuli induces release of cytosolic Ca²⁺ concentration as well as diacylglycerol (DAG). Ca²⁺ activates Ca/CaM dependent myosin kinase (MLCK), which phosphorylates Ser19 on 20 kDa light chain (LC20) of Myosin. In parallel, DAG activates PKC that enhances phosphorylation of CPI-17. Phospho-CPI-17 reduces myosin phosphatase activity that causes myosin phosphorylation (MLCP). (Right) Regulation of long-term depression of Purkinje cells. PKC activation responding to Glu stimuli induces phosphorylation of AMPA receptor GluR2 subunit. The phosphorylation induces internalization of the channel. Parallel phosphorylation of CPI-17 by PKC inhibits dephosphorylation of GluR2 and sustains internalized AMPA-R. Abbreviations: AMPA, 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionate; AMPA-R, AMPA receptor; GluR2, Glu receptor 2; mGluR1, metabotropic glutamate receptor 1.

(Fig. 1左). 最近ではCPI-17がROKを介したMP制御に働いている証拠も得られている。

発見の経緯から、CPI-17の研究は血管平滑筋での機能を中心に進められてきた。ところが、CPI-17は平滑筋のみならず神経細胞内にも発現している²⁾。運動記憶を司る小脳プルキンエ細胞ではPKCの活性化に伴いシナプス伝達が抑制される現象 (LTD: 長期抑制) が知られている。特異的抗体やsiRNAを使ってこの細胞内でCPI-17の機能を遮断すると長期抑制現象がおこらないことから、CPI-17によるホスファターゼ阻害が運動記憶に関与している可能性が示された⁷⁾ (Fig. 1右)。この実験事実から、CPI-17は複数の生命現象を調節する多機能性をもつと考えられる。実際にPP1は多彩な信号伝達に関連しているので、CPI-17がそのうちのいくつかに関与していても不思議ではないが、平滑筋制御と運動記憶という全く別の生命現象に同一の小タンパク質が働いているという事実は大変興味深い。

CPI-17はいかにして特定の細胞機能だけを制御するのであろうか? PP1の触媒サブユニットであるPP1Cは50種類以上のPP1調節サブユニットと結合し、PP1ホロ酵素という複合体を形成する。細胞内に存在するこれらPP1ホロ酵素は、多様な細胞内機能の調節を行っている。MPはPP1C/MYPT1/M21で構成されるヘテロ3量体であるが、CPI-17はMPのみならず遊離した単体PP1Cをも同様に阻害する¹⁾。一方で、同じセリン/トレオニンホスファターゼファミリーに属するPP2Aや

PP2Bに対しては、CPI-17は全く阻害活性を示さない²⁾。最近、CPI-17がPP1ホロ酵素のうちMPを特異的に認識していることが明らかとなった。すなわち、同じ触媒サブユニットPP1Cを有する別のタイプのPP1ホロ酵素、例えばグリコーゲン結合型PP1は、CPI-17を速やかに脱リン酸化するためにそれ自体阻害を受けない。つまり、MP調節サブユニットMYPT1が結合したPP1Cはアロステリックな調節を受け、CPI-17を脱リン酸化できず、安定な不活性複合体を形成するものと考えられる⁸⁾。以上の結果より、CPI-17の構造生物学的研究は、ホスファターゼを介した細胞機能の調節機構に光を当てるだけでなく、リン酸化に伴う分子スイッチ機構、さらには“基質か阻害分子か?”という分子認識における基本的命題の解明にもつながる重要な課題となってきた。

2. 立体構造解析

PP1は生命現象の随所で重要な働きをしている脱リン酸化酵素であるが、その触媒サブユニット (PP1C) の立体構造は1996年になってX線結晶構造解析によってはじめて解明された⁹⁾。我が国においては、京都大学の三木らが2002年にリン酸基を有する低分子物質カリクリンAとPP1Cの複合体構造の解析から基質リン酸基の位置を明らかにしている¹⁰⁾。しかしながら、生体内で実際に起こっている機能調節反応を原子分解能で詳細に議論するには、PP1そのものだけでなく結合タ

Fig. 2 Amino acid sequence of CPI-17 (a), and inhibitory activity of its deletion mutants (b).

ンパク質の原子座標情報がぜひとも必要であった。われわれがCPI-17の構造機能相関の研究を開始した2000年の段階では、50種類以上知られていたPP1結合タンパク質の立体構造はひとつも明らかにされていなかった。CPI-17はPP1結合タンパク質の中では分子量が比較的小さく、また安定性も高いことから立体構造解析に適しているのではないかと考えられた。後から知ったことであるが、われわれが立体構造研究を始めた前後にノーベル賞学者Greengardを擁する研究グループが別のPP1結合タンパク質のひとつであるinhibitor2のNMR構造解析に着手しており¹¹⁾、われわれがPP1結合タンパク質の最初の立体構造としてCPI-17の座標を報告¹²⁾できたのは幸いであった。

立体構造解析を行うにあたり、まずthe protein predict server (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) を利用してCPI-17のアミノ酸配列から2次構造を予測した。その結果、N、C両末端それぞれ20残基ほどの領域には安定な2次構造が存在しないことが推定され、このことが立体構造解析に好ましくないと予想された。そこでわれわれは、CPI-17の各種欠損変異体を作製し、それらの生理活性を測定した¹³⁾。Fig. 2に示したように、全長タンパク質と同等の機能を有する最短のフラグメントはアミノ酸残基番号で35から120までの86残基であることが判明した。この結果

はわれわれにとって非常に幸いであった。つまり、立体構造解析の障害となりそうな両末端部分を取り除いたフラグメントを用いてもCPI-17は生理機能を保持しており、このコア部分のみでも、決定した立体構造をもとに機能に関する議論ができることが明らかになったのである。われわれはさっそくこのコア部分に関してNMRを用いて立体構造解析を行った¹²⁾。

CPI-17にはチロシンやフェニルアラニンなどのいわゆる芳香族アミノ酸残基が少なく、ロイシン、イソロイシン、バリン等のメチル基をもつ疎水性残基が多く存在している。バリン、ロイシンに含まれる2つの(プロキラル)メチル基に起因するNMRシグナルをすべて立体特異的に帰属するために特殊な¹³C-標識パターン(立体化学的に区別できる2つのメチル基のうち片方だけをNMR観測可能な¹³Cで標識)をもつバリン、ロイシンを導入したタンパク質試料を調製した。これらの試料から得た情報に加え、通常の安定同位体標識試料を利用した多核多次元NMR法を用いて構造解析を行い、CPI-17(35-120)の溶液内立体構造の決定に成功した。

Fig. 3aに示すとおり、CPI-17(35-120)は、N末端側に長いループが存在し、その後4本のヘリックス(AからD)が続く比較的単純な構造から成っていることが明らかになった。この4本のヘリックスバンドル構造は、ヘリックスAとD、BとCがそれぞれ逆平行のヘリックスのペアを形成し、それらがV字型に寄り添った新規フォールドを形成している。4本のヘリックスバンドルは、図に示すようにTrp55、Phe107、Leu110などを含む疎水性残基が形成する疎水性のコアによって安定化されていると考えられた。リン酸化部位(Thr38)を含むループ(Pループ)はヘリックスAに寄り添うように存在し、Thr38の側鎖は分子内部にほとんど埋もれていた。この立体構造においては、N末端付近と35-38番付近の残基が分子の内部にはまるようにして存在していたため、V字型構造自体も不要部分を切り取りすぎた結果のアーティフィシャルな立体構造なのではないかという疑問をぬぐい去ることができなかった。

この問題に決着をつけるために、N末端側をもう少し長くしたCPI-17(22-120)(以降T38と記述する)の立体構造を改めて決定することにした¹⁴⁾。また、この立体構造と比較するためにThr38をアスパラギン酸に置換した変異体(D38)の立体構造も同時に解析することにした。アスパラギン酸はリン酸化トレオニンと同様に側鎖に負電荷をもっているため、リン酸化を模倣する変異としてリン酸化タンパク質の研究によく用いられている。そこでわれわれはリン酸化CPI-17(22-120)(以降P-38と記述する)の構造決定の前に、NMR測定

Fig. 3 Solution NMR structures of CPI-17 (PDB code; 1K50, 1J2M, and 1J2N). (a) (35-120) fragment, (b) (22-120) fragment, and (c) (22-120) fragment with a mutation T38D. All structures are represented by ribbon model. Some side chains are depicted with ball-and-stick model. Helices are labeled with capital letter in (a). Some of the residues are labeled with residue number.

に必要な量（通常、1 mM 前後の濃度の試料溶液が250-500 μ l 程度）の均一な試料が比較的容易に得られたD38の構造決定を行った。 ^1H - ^{15}N HSQC（2次元NMR法の1つ、タンパク質の主鎖のN-Hの相関が各残基ごとに観測できる）を測定したところ、D38のスペクトルと部分的にリン酸化されたCPI-17のスペクトルは類似しており、両者はT38のスペクトルとは異なっていることが判明した。したがって、残基38番の側鎖に負電荷を導入したことによる構造変化は、トレオニンがリン酸化されたときの構造変化に類似していると予想された。つまり、D38の立体構造はリン酸化型CPI-17の立体構造のモデルとして扱うことができ、リン酸化における構造変化やリン酸化状態の立体構造に関して議論できるであろうという仮説が裏付けられた。

興味あることに、E38変異体（グルタミン酸）の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルはT38、D38、P-38のいずれのNMRスペクトルとも大きくかけ離れており、グルタミン酸残基の導入により、タンパク質構造が大きく影響されることが示唆された。

NMR解析の結果決定されたT38とD38の立体構造をFig. 3b, cに示した。この立体構造解析には残余双極子相互作用^{*}も利用した。予想通り、T38とD38の構造は異なっていた。まず、T38の立体構造はCPI-17(35-120)のそれとほぼ同一であった。懸念されたN末端35-38番付近はやはり分子本体に寄り添うようになっており、それよりもさらにN末端側の10数残基は分子の外側に出て予測通りもはや構造をとっておらず、ランダムになっていることが判明した。長距離のNOE（核オーバーハウザー効果）が観測されなかったことや ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ NOEの値からもこの結果が支持された。

D38の立体構造は、T38の2次構造領域をよく保存し、分子全体の折れたたみも同一であった。しかしながら、Pループは溶媒に十分触れる位置へ移動し、その結果できた空隙をヘリックスBが埋めていた。見方を変えようとヘリックスBがPループを押し出しているとも表現できる。このように、D38では残基38番の側鎖への負電荷導入というたった1カ所の変異にもかかわらず、結果として、タンパク質分子全体の立体構造変化が誘起されることが明らかになった。ヘリックスCとヘリックスDの相対位置はT38とD38でよく重なり、両ヘリックスは分子の立体構造における土台形成の役割を担っていることが示唆された。

阻害活性に重要であると考えられる38番の側鎖は溶媒方向を向いており、PP1Cの触媒部位に直接結合するのに都合のよい位置に存在していることが示された。ここで非常に興味深いことは、Pループは全く分子本体から離れて自由に運動している状態ではなく、Phe41などの側鎖によってある程度分子本体に寄り添うように固定されているという事実であった。このことは、PループのみならずPループ周辺まで含めた広範囲の立体構造がPP1との結合に重要な意味をもっている可能性を示唆している。次のステップとして、われわれはD38の構造をもとにCPI-17とPP1Cの複合体構造の検討を行った¹⁵⁾。

3. 複合体の構造

大腸菌利用の大量発現系から調製したリコンビナントPP1Cはウサギ筋から調製した天然の酵素とは大きく異なり、活性に Mn^{2+} イオンを必要とする。また、リコンビナントPP1Cは阻害タンパク質リン酸化CPI-17や

Fig. 4 A binding scheme of CPI-17 with PP1C. Some residues, which are expected to be responsible for the binding, are depicted with side chains. To show the binding surface, two molecules in the complex are depicted separately.

リン酸化DARPP32によって阻害を受けず、逆にこれらを脱リン酸化することが知られている。したがって、安定なリコンビナントPP1C・CPI-17複合体が得られないので、われわれはD38の結果を利用して複合体形成のモデリングを行った。モデリングにはリン酸化タンパク質とその受容体の相互作用予測を行うために新規に開発した手法（phospho-pivot modeling法）を用いた¹⁶⁾。まず初めにD38の38番の側鎖をphospho-Thrにコンピュータ上で置き換えた。このリン酸基をPP1Cの触媒部位に固定し、ある種の距離制限を導入した。その後、このリン酸基を中心（ピボット）としてCPI-17分子を回転させ、186,624通りのバーチャル複合体構造を発生させた。各複合体内の原子間距離を測定し、立体障害が最も少なくエネルギー的に最も有利な静電的相互作用の生じうる複合体を選び出した。最も立体障害の少ないグループの複合体は1つの複合体構造に収束した。その後MD（分子動力学計算）によるエネルギー最小化を行い、良好な複合体モデルを得ることができた。複合体形成におけるそれぞれのタンパク質の結合面をFig. 4に示す。

このモデル構造において、CPI-17とPP1Cのいくつかの残基が複合体の形成に重要な役割を担っていることが示唆された。例えば、PP1CのGlu274はCPI-17 Pループ上のArg33、Arg36と静電的相互作用しうる距離内に位置している。このGlu274は、PP1 isoformの中では保存されているが、PP2AやPP4ではアルギニンに置換されている。実際にPP1CのGlu274をアルギニンに置換した変異体を作製してその結合特性を調べたところ、CPI-17との親和性が著しく低下した。すなわち、PP1CのGlu274はCPI-17の特異性を決定する要因となっていることが示唆された¹⁶⁾。このようなCPI-17とPP1

の相互作用に関する知見を集積していけば、CPI-17によるホスファターゼ阻害機構の本質に迫れるものと思われる。また、これらの知見をもとに、阻害タンパク質間での特異性やホスファターゼの基質特異性についてより一般的な議論ができる可能性もあるだろう。

4. おわりに

以上、CPI-17の発見から最近の構造と機能の研究までを概説した。10年ほど前に発見された小タンパク質は、当初は筋肉関連の研究者から注目されているだけであった。その立体構造が解析されたことで、PP1調節タンパク質の立体構造予測に取り組んでいるグループからも注目されるようになった。さらに、機能に関する研究が進み新しい機能が見つかったことで、このタンパク質に着目する生化学者や分子生物学者は確実に増加している。

ごく最近、筆者らはリン酸化状態のCPI-17を大量に調製する方法を確立することに成功し、NMRによるその立体構造解析をほぼ終了した。また、CPI-17のさらなる新機能にも迫りつつあることをここに付記しておく。

他分野と比較すると、ホスファターゼ研究の世界には構造生物学的な手法が応用されていなかった。しかしながら、つい最近PP1とMYPT1のN末端34 kドメインの複合体構造が報告された¹⁷⁾ことからわかるとおり、今後は構造生物学的視点からの積極的なアプローチによって、リン酸化や脱リン酸化に関連した生命現象の解明が進んでいくことはまちがいない。

謝 辞

本研究の一部は、以下の研究費によって行われた。ここに記して感謝の意を表する。北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンター国際共同研究費(大木), AHA National Center grant(江藤), CRESTならびにタンパク 3000 (甲斐荘)。

また、複合体のモデリングに関して研究の初期段階で大阪大学の中村春木教授に有益なご助言を頂いたことを感謝いたします。最後に、CPI-17を発見するにあたり豚大動脈の採集を無償で手伝って下さった札幌食肉センターの職員諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K. and Morita, F. (1995) *J. Biochem.* **118**, 1104-1107.
- 2) Eto, M., Senba, S., Morita, F. and Yazawa, M. (1997) *FEBS Lett.* **493**, 91-94.
- 3) Li, L., Eto, M., Lee, M. R., Morita, F., Yazawa, M. and Kitazawa, T. (1998) *J. Physiol. (London)* **508**, 871-881.
- 4) Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P. and Brautigan, D. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9897-9900.
- 5) Etter, E. F., Eto, M., Wardle, R. L., Brautigan, D. L. and Murphy, R. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34681-34685.
- 6) Kitazawa, T., Polzin, A. and Eto, M. (2004) *J. Physiol.* **557**, 515-528.
- 7) Eto, M., Bock, R., Brautigan, D. L. and Linden, D. J. (2002) *Neuron* **36**, 1145-1158.
- 8) Eto, M., Kitazawa, T. and Brautigan, D. L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8888-8893.
- 9) Goldberg, J., Huang, H., Kwon, Y., Greengard, P., Nairn, A. C. and Kuriyan, J. (1996) *Nature* **376**, 745-753.
- 10) Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M. and Miki, K. (2002) *Structure* **10**, 715-724.
- 11) Hung, H. B., Chen, Y. C., Tsai, L. H., Wang, H., Lin, F. M., Horiuchi, A., Greengard, P., Nairn, A. C., Siao, M. S. and Lin, T. H. (2000) *J. Biomol. NMR* **17**, 359-360.
- 12) Ohki, S., Eto, M., Kariya, E., Hayano, T., Hayashi, Y., Yazawa, M., Brautigan, D. L. and Kainosho, M. (2001) *J. Mol. Biol.* **314**, 839-849.
- 13) Hayashi, Y., Senba, S., Yazawa, M., Brautigan, D. L. and Eto, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 39858-39863.
- 14) Ohki, S., Eto, M., Shimizu, M., Takada, R., Brautigan, D. L. and Kainosho, M. (2003) *J. Mol. Biol.* **326**, 1539-1547.
- 15) Ohki, S., Eto, M., Shimizu, M., Takada, R., Brautigan, D. L. and Kainosho, M. (2004) *Sci. Tech. Adv. Mater.* **5**, 383-386.
- 16) Matsuzawa, F., Ohki, S. and Eto, M. *J. Biochem. (Tokyo)* (on revision).
- 17) Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. and Dominguez, R. (2004) *Nature* **429**, 780-784.

大木進野（おおき しんや）

北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンター助教授

93年北海道大学大学院理学研究科高分子学専攻博士課程中退，同大学理学部NMR研究室教務職員，95年助手，96年香港科技大学リサーチアソシエート，97年科学技術振興事業団研究員，02年より現職。博士（理学）。研究テーマ：情報伝達タンパク質の構造生物学。

最近の関心事：細長い蕎麦。

連絡先：〒923-1292 石川県能美郡辰口町旭台1-1

E-mail: shinya-o@jaist.ac.jp

江藤真澄

江藤真澄（えとう ますみ）

バージニア大学医学部準教授（細胞情報センター／分子生理・生物物理学科／心臓血管研究センター所属）

91年北海道大学大学院理学研究科化学専攻修士課程修了，同年北海道大学理学部助手，98年バージニア大学細胞情報センター博士研究員，主任研究員を経て01年より現職。博士（理学）。

研究テーマ：セリン／トレオニンホスファターゼによる細胞調節機構の解明。

座右の銘：豊とタンパクは新しいほど良い。すべての道はローマに通ず。

連絡先：MSB Room 7225, 1400 JPA, PO Box 800577, Charlottesville, VA22908, USA

E-mail: me2h@virginia.edu

URL: <http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/cellsignaling/>

松澤史子（まつざわ ふみこ）

セレスター・レキシコ・サイエンス（株）シニアリサーチャー

90年北海道大学大学院理学研究科化学専攻修士課程修了，（株）富士通研究所入社，00年より現職。

連絡先：〒261-8501 千葉市美浜区中瀬 1-3 MTG-D17

E-mail: fumiko@cl-sciences.co.jp

甲斐荘正恒（かいのしょう まさつね）

東京都立大学大学院理学研究科教授

1964年都立大学理学部卒業，カリフォルニア工科大学博士研究員（73-75年），味の素（株）中央研究所主任研究員を経て80年より都立大学助教授，92年より現職。2004年より日本核磁気共鳴学会会長

研究内容：生体物質のNMR。特に安定同位体利用NMR技術の開発。

連絡先：〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1

E-mail: kainosho@nmr.chem.metro-u.ac.jp