

機関番号：37104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590434

研究課題名 (和文) リン酸化非依存性トリパノソーマ 14-3-3 分子の新規脂質代謝調節機構の解明と応用

研究課題名 (英文) Analyses and applications of novel mechanism of phospho - independent regulation of lipid metabolism by *Trypanosoma brucei* 14-3-3

研究代表者

井上 雅広 (INOUE MASAHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：00232562

研究成果の概要 (和文) : ブルーストリパノソーマ (*T. brucei*) はアフリカ睡眠病を起す原虫で、年間 3 万人が感染により死亡している。当初の目的は、ブルーストリパノソーマ Tb14-3-3 が脂質代謝を調節しているという新発見を利用し、Tb14-3-3 がブルーストリパノソーマの運動性、サイトキネシス、細胞周期にあたる分子メカニズムを探索することであった。その解析過程で、糖代謝、脂質代謝酵素、蛋白リン酸化酵素などと Tb14-3-3 が結合することを発見した。そのうちの 1 つの蛋白リン酸化酵素が *T. brucei* の運動性、サイトキネシス、細胞周期の重要な調節因子であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : *Trypanosoma brucei* is a causative agent of sleeping sickness. More than 30,000 infected patients died of this devastating disease. One of the aims for this research is to identify the molecular mechanisms by which *T. brucei* 14-3-3s control the motility, cytokinesis, and cell cycle focusing on the lipid metabolism controlled by Tb14-3-3s as we discovered. We found that Tb14-3-3s interact with the enzymes involved in sugar or lipid metabolism, and protein kinases. One of the protein kinases among them is found out to be critical for the regulation of the motility, cytokinesis and cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：真核寄生体細胞工学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：脂質代謝、蛋白リン酸化酵素、結合蛋白、ブルーストリパノソーマ、14-3-3

1. 研究開始当初の背景

14-3-3 分子は、すべての真核生物(酵母、植物、哺乳類等)において分子構造的、機能的に非常によく保存された分子である。また、特徴的なホスホセリン・スレオニンモチーフ (Mode1, Mode2)に結合し、細胞周期、シグナル伝達、アポトーシス、転写、細胞骨格、細胞輸送など様々な生物現象に必須の分子である。

我々は、ブルーストリパノソーマ(以下トリパノソーマと略す)の 14-3-3 分子 I および II をクローニングし、これが細胞周期および細胞骨格のレギュレーションに関わっており、両者とも細胞分裂に必須であることを証明した。(J. Biol. Chem. Inoue M., et al 2005)

次にトリパノソーマの 14-3-3 分子は、他の種の 14-3-3 と同じ機能をもっているのか?を、検証した。

1)トリパノソーマ 14-3-3 I および II が、酵母から哺乳類まで保存されている 14-3-3 結合リン酸化ペプチドモチーフ (Mode1, Mode2)に結合しない。

2)トリパノソーマ 14-3-3I および他の種の 14-3-3 に強力に結合するペプチドを大量発現させても、トリパノソーマの増殖速度、細胞分裂、および形態になにも変化が得られなかった。

これら 2つの事実により、トリパノソーマの 14-3-3 は “14-3-3 分子の機能は、生物種に関わらずリン酸化依存性結合を示す分子シャペロンである” というドグマに反する分子であるという予想が確立した。

タンパクのリン酸化と関係がないとすると、なにをトリパノソーマ 14-3-3 分子は調節しているのか?

トリパノソーマのプロサイクリック型の 14-3-3I あるいは II をノックダウンした細胞、および過剰発現させた細胞にて様々な細胞内脂質の含有量を TLC にて分析した結果、初期 Day3

には、TG、遊離脂肪酸(FFA)の量的変化が主に現れることが判明した (脂質量/総タンパク量で判定)。(Day3 では著名な形態変化はみとめられない)

詳細に調べると、II の overexpression (過剰発現) の細胞では、トリパノソーマの脂質の主成分であるフォスファチジルコリンおよびフォスファチジルイノシトールも顕著に増加していることが判明した。また特に II の knockdown (ノックダウン) 細胞では、Day7 にて TG および FFA が顕著に減少することが判明した。

2. 研究の目的

このような状況のもとでは私は、以下の3つの柱を今回の申請の目的とする。

(1) 初期にみられる FFA, TG の量変化は最終的には膜を構成している脂質成分の量的質的变化をきたすことが予想されるが、これらの変化を詳細に検討する。

(2) (1) の結果を参照に 14-3-3 分子による FFA および TG の量的変化が、どのような脂質代謝の経路 (分解、合成、分泌) の調節によりなされているのかを同定する (14-3-3 分子ターゲット代謝酵素の同定を含む)。

(3) これら FFA, TG および膜の構成成分であるフォスホリピッドの変化が、14-3-3 knockdown 細胞にみられる運動能の低下、細胞周期の異常、形態の異常に直接関連するか否かを 2) で同定したターゲット代謝酵素を knockdown あるいは overexpression することで判定する。

3. 研究の方法

(1) 薄相クロマトグラフィーによる脂質の同定。

Lipid extraction は Bligh & Dyer 法にて

昆虫型原虫より抽出

HTLC plate silica 60 Merck 社を用い展開
溶媒は

1st-Chloroform-methanol-acetic acid-formic
acid-water

(35:15:6:1:2)

2nd N-hexane-diisopropylether-acetic acid

(65:35:2)

を用いた。

発色は、3% Copper acetate を 8% Phosphoric
acid に溶かしたものを plate に噴霧し、180°C
処理。

(2) 14-3-3II の発現量と正の相関のある脂質
代謝酵素のクローニングおよび 14-3-3II との結
合を免疫沈降法にて確かめた。まず、FFA, TG
合成に重要である 3 つの酵素について
Tb14-3-3II との結合を調べた。具体的には、
acetyl-CoA carboxylase (Tb927.8.7100),
biotin-acetyl-CoA ligase (Tb11.01.1820),
acetyl-CoA synthetase (Tb08.26A17.430) を
Sanger Insitute の Gene Data base を参考に、
PCR にて、これらの遺伝子を哺乳類発現 vector
にクローニングした。問題なのは、これらの遺
伝子が、機能的に働いているか否か不明である
点であるが、TG 合成の律速酵素である
acetyl-CoA carboxylase に関しては、*S.pombe*
(酵母) と 45% の相同性があり、機能的にも働
いている可能性が高い。ヒト HEK293 細胞を用
い、これらの遺伝子がコードする蛋白と、
Tb14-3-3 の結合を調べた。

(3) 予期せぬアプローチの変更—14-3-3I およ
び II が植物、酵母、ほ乳類で保存されている結
合モチーフに結合しないことをこれまで報告し
てきたが、mode3 モチーフという近年同定され
たモチーフに結合することが、実験結果より明
らかになり、この結合する新規モチーフペプチ
ドを用い Tb14-3-3 結合タンパクの proteomics

から *T. brucei* の 14-3-3II の脂質代謝に及
ぼす影響を検討する方法に変更した。

4. 研究成果

結果

(1) これまでの研究で、アフリカトリパノ
ソーマ原虫の 14-3-3 (Tb14-3-3) 分子
の研究で、Tb14-3-3 の I および II は、酵
母、植物、哺乳類まで、よく保存されてい
るリン酸化ペプチドに結合しない点で、薬
剤のターゲットとなり得る可能性がでて
きた。ところが、リン酸化依存性の結合が
Tb14-3-3 にほとんど認められないため、結
合蛋白を探すのに困難を極めた。この様な
状況のなかで、私は、Tb14-3-3II 分子が脂
質代謝に影響をあたえることを発見した。
すなわち、Free Fatty Acid (FFA) と
Triglyceride (TG) の蓄積が、Tb14-3-3II の
過剰発現で、またノックダウンの際、逆に
減少がおこることである (実験にはすべ
て昆虫型細胞株を用いた)。図 1, 2 参照

(2) この脂質代謝の劇的な変化をマーカ
ーとして、Tb14-3-3 の機能を明らかにする
ため、まず、FFA, TG 合成に重要である 3
つの酵素について Tb14-3-3II との結合を
調べた。具体的には、acetyl-CoA
carboxylase
(Tb927.8.7100), biotin-acetyl-CoA
ligase (Tb11.01.1820), acetyl-CoA
synthetase (Tb08.26A17.430) を Sanger
Insitute の Gene Data base を参考に、
PCR にて、これらの遺伝子を哺乳類発現
vector にクローニングした。問題なのは、
これらの遺伝子が、機能的に働いているか
否か不明である点であるが、TG 合成の律速
酵素である acetyl-CoA carboxylase に関
しては、*S.pombe* (酵母) と 45% の相同
性があり、機能的にも働いている可能性が

高い。ヒト HEK293 細胞を用い、これらの遺伝子がコードする蛋白と、Tb14-3-3 の結合を調べた。これらすべての蛋白と Tb14-3-3II は、NP-40 を用いた免疫沈降法で示される強い結合を示さないことが判明した。そこで、私は、次に、Tb14-3-3I あるいは II ノックダウン細胞及びノックダウンしていない細胞を用い、acetyl-CoA carboxylase の biotin 化を streptavidine - HRP を用いた western blot 法にて検討した。その結果として、Tb14-3-3I でなく II ノックダウンの時のみ若干の acetyl-CoA carboxylase の biotin 化の低下が認められた。すなわち、これは、acetyl-CoA carboxylase の活性の低下、TG 合成の低下を意味する。

(3) 世界初の Tb14-3-3 結合タンパクのプロテオミックス

14-3-3 分子に結合するリン酸化ペプチドは、mode1, mode2, mode3 とそれ以外のモチーフに分類される。これまでの研究でアフリカトリパノソーマ原虫の 14-3-3 (Tb14-3-3) 分子は酵母からヒトまで保存されている mode1 および mode2 モチーフには結合を示さないことを明らかにしてきた。mode3 モチーフすなわち、C-末端のリン酸化モチーフ、pSer/Thr-X, pSer/Th-X-X モチーフについては、近年明らかになったモチーフであるため、Tb14-3-3 と mode3 モチーフについては、検討を加えていなかった。そこで Tb14-3-3 分子に結合が予想されるリン酸化ペプチドを持つタンパクを、*T. brucei* ゲノム データーベースを用い、mode3 モチーフを持つタンパクをタグ付きタンパクとして、ヒト 293T 細胞に発現させ、タグ抗体で免疫沈降後、Far-western blot 法にて、Tb14-3-3 との結合を指標にスクリーニングした。その結果、Protein phosphatase 2C (PP2C) が Tb14-3-3 と結合することが判明した。次に

PP2C と他の 9 種類の mode3 モチーフを持つ C-末端のキメラ蛋白を発現させ、同様に、免疫沈降後 Far-western blot 法にて、Tb14-3-3 との結合を指標にスクリーニングした。それにより、PP2C より、SAP-domain を持つ分子量 31kDa の機能不明タンパク p31-SAP の方が、Tb14-3-3 により強固に結合する事が判明した。次に p31SAP をタグ付きタンパクとして *T. brucei* に発現させ、mode3 モチーフ依存的に *in vivo* で Tb14-3-3 と結合することを、免疫沈降法にて証明した。これは、世界で初めて同定した Tb14-3-3 結合タンパクである。さらにこの p31SAP 由来のリン酸化ペプチドは、Tb14-3-3 と結合するタンパクをスクリーニングする上で有用であることを証明した (PLoS ONE 2010 発表)。この発見により、生物間で保存されていないリン酸化ペプチド依存的に、Tb14-3-3 が分子シャペロンとして結合タンパクに働きかけるという新展開が生まれた。植物、ヒトでは、150 種、200 種類以上のタンパクが報告されているにも関わらず我々以外に Tb14-3-3 に結合するタンパクを同定したものはいない。理由の一つは、種を超え普遍的なモチーフに結合する 14-3-3 結合タンパクのプロテオミックスが 14-3-3 に特異的に結合するリン酸化ペプチドによる結合タンパクの競合溶出法を利用することにあるようだ。もう一つの理由は、結合が弱すぎて Tb14-3-3 特異的に結合するタンパクを結合させたままの状態を保持させた状態で結合しないものと分離することが困難なことであろう。最後の理由はペプチド tag をつけることによりヘテロ 2 量体の Tb14-3-3 の形成が阻害されるためであろう。これらの状況に打破するため、まず Tb14-3-3I の N-末端にペプチド tag を付け、

Tb14-3-3II とともにヘテロ 2 量体の Tb14-3-3 タンパクが過剰発現する *T. brucei* 細胞クローンを樹立した(数種類のペプチド Tag を N-末端、C-末端につけて 2 量体形成が阻害されないものを選択した)。 *T. brucei* の細胞抽出液を低濃度の digitonin で作成し、抗 tag 抗体にて免疫沈降後、我々が同定したリン酸化ペプチド HVSGLKRRR p SV を用い溶出するという方法を確立した。コントロールには、このペプチドに結合しない変異 Tb14-3-3 を発現させて用いた。溶出されてくるタンパクを carboxymethylation 後、トリプシンで消化し、nanoLC-MS/MS を用い分析後、Mascot search にて Tb14-3-3 結合タンパクを同定。その結果、約 100 種類の Tb14-3-3 結合タンパクを同定することに成功した(投稿準備中)。

新規タンパクリン酸化酵素 3 種および、6-フォスフォー 2 フルクトキナーゼおよびアセチル CoA カルボキシラーゼを得ることができた。6-フォスフォー 2 フルクトキナーゼは解糖系の重要な酵素であり、2,6 -フルクトース 2 リン酸の分解、合成を司る重要な酵素である。よって、解糖系と密にリンクする脂質代謝に非常に大きな役割を示す可能性が高い。さらにアセチル CoA カルボキシラーゼは、アセチル CoA からマロニル CoA を合成する酵素で、パルミチン酸およびトリアシルグリセロールの合成に多大な影響を与えることが予想される。

結論

Tb14-3-3I および II の脂質代謝制御の制御を研究する過程において、世界に先駆けて Tb14-3-3 に結合するリン酸化ペプチドを同定した。酵母、植物、ほ乳類でよく保存されているリン酸化ペプチドモチーフとは結合しないので、このペプチドの同定には誰も成功していなかった。このペプチドを利用し、Tb14-3-3 と結合を示す 100 種類のタンパクを同定した。その中に、

糖代謝、FFA(遊離脂肪酸)、TG(トリグリセリド)代謝に影響をあたえる 6-フォスフォー 2 フルクトキナーゼ、アセチル CoA カルボキシラーゼが含まれていた。さらに、そのなかの 3 種類のタンパクリン酸化酵素についても検討を加えた。その結果、その中の一つ AKB14-3-3-1 (associated kinase of 14-3-3 1) は、遺伝子をノックダウンしても過剰発現しても *T. brucei* 細胞は多核の大きい細胞となった (organelle の数の異常)。このことは、ここ 10 年謎であった Tb14-3-3 がどのようなメカニズムで、細胞運動性、サイトキネーシス、細胞周期を調節しているかという命題に答える Key 分子の同定に成功を意味する。AKB14-3-3-1 が、トリパノソーマ原虫の薬剤標的になる可能性を現在模索中である。トリパノソーマ原虫、リーシュマニア原虫が引き起こすキネトプラスト病には、現在安全かつ有効な治療薬が存在せず、この分子の発見は、科学的にみても、医学上でも重要な発見である。温暖化、グローバリゼーションを見据えると熱帯、亜熱帯疾患が日本に上陸する可能性もありこれらの疾患は国民生活にも今後関係するようになる可能性が存在すると思われる。

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 5 件)

- ① Inoue, M., et al. (8 人中 1 番目)
Phosphorylation- Dependent Protein Interaction with *Trypanosoma brucei* 14-3-3 Proteins that Display Atypical Target Recognition. PLoS One 5(12): e15566, 2010. 査読有

- ② Sei, Y., et al., (13人中7番目)
Epistatic and Functional Interactions of Catecho-O-Methyltransferase(COMT) and AKT1 on Neuregulin 1-ErbB Signaling in Cell Models. PLoS One 5(5) : e10789, 2010. 査読有
- ③ Fukuyo, Y., Kitamura, T., Inoue, M., Horikoshi NT, Higashikubo R, Hunt CR, Usheva A, Horikoshi N.
Phosphorylation-dependent Lys63-linked polyubiquitination of Daxx is essential for sustained TNF- α -induced ASK1 activation. Cancer Res. 69(19): 7512-7517, 2009. 査読有
- ④ Kitamura, T., Fukuyo, Y., Inoue, M., Horikoshi, NT., Shindoh, M., Rogers, BE., Usheva, A., Horikoshi, N. Mutant p53 disrupts the stress MAPK activation circuit induced by ASK1-dependent stabilization of Daxx. Cancer Res. 69 (19):7681-7688, 2009. 査読有
- ⑤ Ismail, NI., Yuasa, T., Yuasa, K., Nambu, Y, Nisimoto, M., Goto, M., Matsuki, H., Inoue, M., Nagahama, M., Tsuji, A. A Critical Role for highly Conserved GLU610 Residue of Oligopeptidase B from *Trypanosoma Brucei* in Thermal Stability. J. Biochem., 147(2):201-211, 2009. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 井上雅広
普遍的でない分子認識機構をもつトリパノソーマ 14-3-3 に結合するキナーゼの発見
第9回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (長崎)、平成22年10月9日
- ② 井上雅広、安田幸一、上村春樹、杉本佳織、井上大志、福岡利英
Biological significance of heterodimeric form of *Trypanosoma*

brucei 14-3-3I and II.
第78回日本寄生虫学会大会(東京)、
2009年3月27日

- ③ Masahiro Inoue
Biological significance of heterodimeric form of *Trypanosoma brucei* 14-3-3I and II.
日米医学協力研究会 寄生虫疾患専門部会 第43回日米合同会議(東京)
2009年1月8日

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：原虫の増殖阻害剤を検出する方法
発明者：井上雅広
権利者：井上雅広、上村春樹
種類：特許
番号：3922710X08
出願年月日：平成22年10月8日
国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 雅広 (INOUE MASAHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：00232562