

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590500

研究課題名(和文) アフリカ睡眠病の治療に直結した新規キナーゼAKB14-3-3-1分子の解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel kinase, AKB14-3-3-1, which is a possible target of sleeping sickness.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tb14-3-3結合タンパク質のプロテオミクスアプローチにより新規リン酸化酵素AKB1を同定した。AKB1はTb14-3-3中の両親媒溝構造を介して、直接且つ特異的にTb14-3-3と結合する。またAKB1の基質認識に重要なアミノ酸モチーフを同定し、細胞内AKB1の酵素活性をリン酸化モチーフ抗体を用いて測定した。AKB1の大部分は細胞骨格に分布しており、またAKB1の基質も同様に界面活性剤不溶性画分に存在した。AKB1の蛋白リン酸化酵素活性は細胞分裂に重要であった。以上の結果はTb14-3-3-AKB1複合体が細胞骨格結合タンパク質のリン酸化を介して細胞分裂を制御する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Proteomics approach of searching Tb14-3-3 binding proteins identified a novel associated kinase of Tb14-3-3 (AKB1). Tb14-3-3 directly and specifically binds to AKB1 utilizing an amphipathic groove structure of Tb14-3-3. Critical amino acid motif for AKB1 substrate recognition was identified and in vivo AKB1 kinase activity was successfully monitored with phosphorylated substrate-specific antibody. Majority of AKB1 is associated with cytoskeleton and most of AKB1 substrates are also identified in the detergent-insoluble fraction of cell lysate. AKB1 knockdown or overexpression of wild type AKB1 but not kinase-dead AKB1, deregulated cytokinesis and cell division, suggesting that kinase activity of AKB1 is crucial for growth. The results from this study suggest that AKB1 associated with Tb14-3-3 modulates cytokinesis and cell cycle progression in *Trypanosoma brucei* by phosphorylating cytoskeleton-associated proteins.

研究分野：医歯薬学

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：Tb14-3-3 蛋白リン酸化酵素 細胞分裂 細胞骨格 リン酸化モチーフ

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, mode3)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)

これまでの我々の研究で、T. brucei 14-3-3 分子は、mode1 あるいは mode2 の motif には、ほとんど結合を示さず、mode3 には、ヒト 14-3-3 よりも弱いながらも結合を示すことを明らかにし、さらに affinity の高い新規 mode3 peptide を世界に先駆けて同定した。

2. 研究の目的

私は、世界に先駆けて精製した *T. brucei* 14-3-3 (Tb14-3-3) に結合する蛋白キナーゼを **AKB14-3-3-1**(Associated kinase of *Trypanosoma brucei* 14-3-3 type 1)と命名した。このキナーゼ遺伝子を knockdown および overexpression すると多核、多鞭毛、多キネトプラストあるいは無核などの原虫が生じる。これらの結果は、このキナーゼが細胞の正常な分裂に非常に重要な働きを持ち、14-3-3 分子と類似の機能を持つことを意味する。

1) このキナーゼの生理的基質の同定

2) 治療のターゲットとして、このキナーゼのインヒビターのスクリーニング

3) Tb14-3-3 と AKB14-3-3-1 の結合の生理的意義の解明、を軸としてトリパノソーマ症の制圧を目指す。

3. 研究の方法

23 年度 AKB14-3-3-1 の基質の同定

1)まず AKB14-3-3-1 がリン酸化することが、判明している PepTag C1 peptide :

PLSRTLVSAAK (Promega) のどの部位の アミノ酸残基がリン酸化されるか検討する。
C1: PLSRTLVSAAK (AKB14-3-3-1 によりリン酸化される peptide)

C1-3A: PLARTLSVAAK (3 番目の S が A)

C1-5A: PLARALSVAAK (5 番目の T が A)

を合成し、ADP-kinase Glo assay kit にて、どの peptide がリン酸化を受けるかを検討し、リン酸化モチーフの seed とする。この peptide をもとにさらに変異体 peptide を合成あるいは、リン酸化基質 peptide として市販されている類似の peptide substrate を購入し、ADP-kinase Glo assay kit にて screening する。

2)AKB14-3-3-1 の基質となるアミノ酸配列の motif が決定すると、それをもとに、genome database を search し、特に、この AKB14-3-3-1 が細胞骨格結合蛋白であることより、細胞骨格蛋白を中心に 基質となりうる蛋白を、小麦胚芽を利用した in vitro 合成系 (Cell free system) で合成し、実際に in vitro でリン酸化反応を行う事により、生理的基質を同定する。

3)AKB14-3-3-1 が ATP analogue ATP γ -S を基質とするような mutant を作成し、*T. brucei* より分画した蛋白を基質に用い、チオリン酸化されたタンパク基質をアルキル化し、パラニトロベンジルチオリン酸とアルキル化し、これを、チオリン酸エステル特異的なモノクローナル抗体で検出することにより基質を同定する。

基質が同定されれば、それらの基質に対するリン酸化特異的抗体を作成し、*T. brucei* 細胞を staining し、細胞周期の進行によるリン酸化状態をモニターすることにより、AKB14-3-3-1 の生理的機能を探索する。

24 年度 Tb14-3-3 と AKB14-3-3-1 の結合の生理的意義の解明

- 1) AKB14-3-3-1 overexpression organella (核、キネトプラスト、鞭毛など) の数の異常
- 2) AKB14-3-3-1 knockdown organella の数の異常
- 3) Tb14-3-3 overexpression organella の数の異常 (論文投稿中)
- 4) Tb14-3-3 knockdown organella の数の異常: J.Biol.Chem. Inoue M., et al (2005)

1)-4) が判明している。そこで以下の組み合わせの Tetracycline 依存性 overexpression あるいは knockdown vector をゲノムに integrate させた *T. brucei* 昆虫型細胞株を樹立する。細胞の形態を抗 α -tubulin, β -tubulin あるいは抗 flagella 抗体を用い検出する。AKB14-3-3-1 の Tb14-3-3 に結合しない mutant を作成する: NAKB14-3-3-1 と命名する (Non-associated kinase of *T. brucei* 14-3-3-1) (具体的には、PCR にて、AKB14-3-3-1 の C-terminal deletion mutants を作成し昆虫型細胞に導入し、tag 抗体を用いた免疫沈降法にて結合部位を狭め、最後は結合に関与するアミノ酸残基に point mutation を導入する)。この NAKB14-3-3-1 overexpression vector も組み合わせに入れる。

1	Tb14-3-3 overexpression	AKB14-3-3-1 overexpression
2	Tb14-3-3 knockdown	AKB14-3-3-1 overexpression
3	Tb14-3-3 overexpression	AKB14-3-3-1 knockdown
4	Tb14-3-3 knockdown	AKB14-3-3-1 knockdown
5	Tb14-3-3 overexpression	NAKB14-3-3-1 overexpression
6	Tb14-3-3 knockdown	NAKB14-3-3-1 overexpression

1)-6)の組み合わせ細胞株の Tet- or Tet+の形態 (細胞の形態を抗 α -tubulin, β -tubulin あるいは抗 flagella 抗体、DAPI:DNA stain を用い検出する)、AKB14-3-3-1 の細胞内基質のリン酸化状態を調べる事により、AKB14-3-3-1 が Tb14-3-3 の下流あるいは上流で働いているか? あるいは、両者の結合が AKB14-3-3-1 のキナーゼ活性にどのような影響をあたえているか? の 2 点が判明する。

25 年度

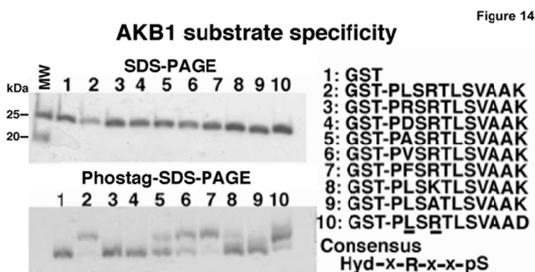
研究協力者: 米国 Mount Sinai 医科大学 E. Premkumar Reddy 教授の協力により、この AKB14-3-3-1 の inhibitor を Cancer kinase inhibitor library; 2000 種類の human kinase inhibitor の中から探索する。 彼の lab. では、すでに、この中から抗ガン剤の seed の screening に成功している。大腸菌発現 vector pGEX4T2 (GST-tag), あるいは pET47b (His-tag) に AKB14-3-3-1 の全長あるいは truncated cDNA を subcloning し、低温 18°C にて IPTG-induction をかけ、その後、affinity 精製を試みる。V5-tag 付き AKB14-3-3-1 の Tet-inducible overexpressing 細胞株からも tag 抗体で

affinity 精製を試みる。さらに、Gel 濾過法にて蛋白の純度を上げた AKB14-3-3-1 を Mount sinai 医科大学(New York)まで空輸し、E. Premkumar Reddy 教授の mass screening 装置にて、inhibitor の seed を screening する。Candidate inhibitor が得られたら、それらを用い、in vitro で、昆虫型、あるいは血流型 *T. brucei* の growth, 形態にどのような変化をもたらすかを、私が調べる。

4. 研究成果

23年度

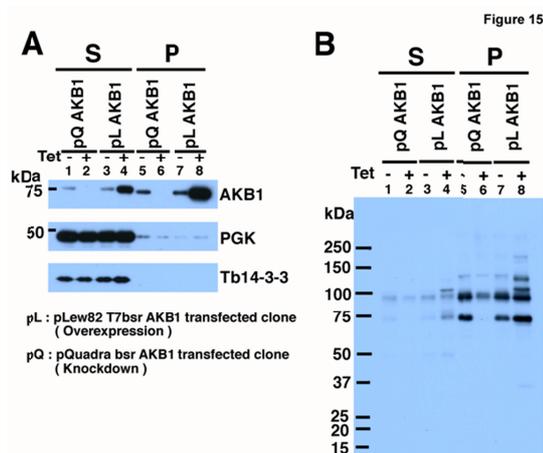
方法 1) に関しては、His-AKB14-3-3-1 (AKB1)を大腸菌に発現させたものを精製し酵素反応に用いた。以下の GST-融合ペプチドを作成、in vitro kinase assay に用いた。リン酸化タンパクは SDS-PAGE 移動度があくれる Phos-Tag SDS-PAGE を行い AKB1 の基質となりうるペプチド配列を同定した。結果を以下に示す。



この結果 リン酸化される Ser の上流 5 番目が疎水性アミノ酸、上流 3 番目が Arg であることが AKB1 の基質となるには重要なことが判明した。

方法 2) に関しては、方法を変更し上記の決定したモチーフをもとに AKB1 のリン酸化基質を認識するリン酸化モチーフ抗体を検索した。その結果、AMPK リン酸化モチーフ抗体が非常に特異的に AKB1 によりリン酸化された *T. brucei* の基質を認識することが判明した。以下に AKB1 ノックダウン、過剰発現したときの AMPK リン酸化モチーフ抗

体を用いたウエスタンブロット(WB)の結果を示す。



蛋白は 10 mM digitonin 可溶性 S と不溶性分画に分けて WB を行った。Tet (+) の pQ はノックダウン、pL は過剰発現細胞、Tet(-) は正常量の AKB1 の発現量である。この結果より AKB1 の発現量と AMPK モチーフ抗体による WB のバンドの濃さには正の相関があることが示唆される。よって、AMPK モチーフ抗体を用いた WB は *T. brucei* の in vivo で活性を反映することが明らかとなった。また、分画法により AKB1 の基質は detergent 不溶性の膜、あるいは細胞骨格におもに局在していることが判明した。

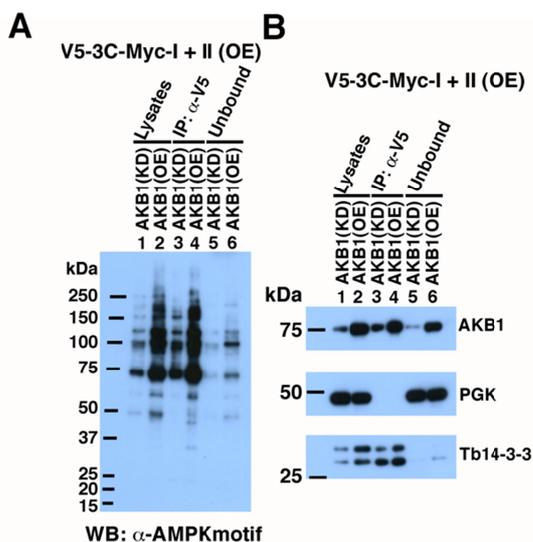
方法 3) に関しては、mammalian の蛋白リン酸化酵素と異なり、mammalian では蛋白リン酸化酵素の基質となり得ない ATP analogue も多くのトリパノソーマの蛋白リン酸化酵素では基質となりうることが判明し、analogue specific kinase を作成して基質を同定するアプローチは不可能であることが判明した。

24年度

Tb14-3-3 と AKB1 の結合を同定するに至らず、方法: 表の NAKB14-3-3-1 を作成することができなかった。

表のような組み合わせで Tet 依存性の Tb14-3-3 および AKB1 過剰発現細胞(OE)、ノックダウン(KD)細胞を樹立した。Tb14-3-3 にペプチド tag を付加したものを過剰発現し

且つ AKB1 を過剰発現、あるいは、ノックダウンさせた昆虫型 *T. brucei* 細胞を用い Tet 誘導 2 日後にセルライゼートを作成し、抗ペプチド V5-tag 抗体にて免疫沈降し、AMPK リン酸化モチーフを認識する抗体 (AKB1 によりリン酸化された基質を認識)、抗 AKB1 抗体、抗 PGK 抗体、抗 Tb14-3-3 抗体で WB を行った。結果を以下に示す。



A の図で免疫沈降に用いたセルライゼート (Lysates), IP: 免疫沈降、免疫沈降されなかった AKB1 によりリン酸化された基質のバンドの濃さを比較すると、AKB1 によりリン酸化された基質のほとんどが Tb14-3-3 に結合した状態で細胞質中存在することが判明した。B の図では IP は Lysates 中の Tb14-3-3 のほとんどすべてを沈降させ、AKB1 も共沈降させたことを示す。また PGK は Tb14-3-3 に結合しないことを示す。このことは、AKB1、Tb14-3-3 および AKB1 によりリン酸化された基質が特異的複合体を形成して細胞質中存在することを示す。Tb14-3-3、AKB1 およびその基質の複合体形成の意味は、AKB1 の基質は大部分が膜および細胞骨格に結合して存在するが、Tb14-3-3 がその結合によりそれらの蛋白を複合体蛋白として細胞質に局在させることかもしれない。

25年度

AKB1 のリコンビナント蛋白の発現精製はすでに成功している。このリコンビナント蛋白を米 Mount Sinai 医学部 Oncological Sciences の E. Prem. Reddy 教授に送付しインヒビターのスクリーニングを行うも nanomolar level で抑制するインヒビターは得られなかった。偶然、我々は 100 mM HEPES, PIPES buffer で AKB1 のキナーゼ活性が完全に失われることを発見し、Piperazine ring にその抑制活性が存在することを見いだした。今後 piperazine ring を多数持つ化合物をアフリカトリパノソーマ症の治療薬候補としてスクリーニングする予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2件)

Inoue M, Yasuda K, Uemura H, Yasaka N, Schnauffer A, Yano M, Kido H, Kohda D, Doi H, Fukuma T, Tsuji A, Horikoshi N.

Trypanosoma brucei 14-3-3I and II proteins predominantly form a heterodimer structure that acts as a potent cell cycle regulator in vivo. *J Biochem.* 2013, Vol.153(5):431-9. doi: 10.1093/jb/mvt016. 査読有

Fukumoto J, Ismail NI, Kubo M, Kinoshita K, Inoue M, Yuasa K, Nishimoto M, Matsuki H, Tsuji A.

Possible role of inter-domain salt bridges in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*: critical role of Glu172 of non-catalytic β -propeller domain in catalytic activity and Glu490 of catalytic domain in stability of OPB. *J Biochem.* 2013, Vol. 154(5):465-73. doi: 10.1093/jb/mvt077. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

発表者：井上雅広、安田幸一、上村春樹
発表表題：AKB1(associated kinase of Tb14-3-3-1)の in vitro 酵素活性

学会名：第 83 回日本寄生虫学会大会
発表年月日：2014 年 3 月 28 日
発表場所：愛媛大学 城北キャンパス (愛媛県松山市)

発表者：太田玲奈、松田真弥、井上雅広、辻 明彦、湯浅恵造
発表表題：14-3-3 タンパク質による DAPK2 活性制御機構の解析

学会名：第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会
発表年月日：2013 年 6 月 1 日
発表場所：徳島大学 大塚講堂(徳島市)

発表者：井上雅広
発表表題：Tb14-3-3 による AKB14-3-3-1 の蛋白リン酸化制御

学会名：第 82 回日本寄生虫学会大会
発表年月日：2013 年 3 月 29 日
発表場所：東京医科歯科大学 湯島キャンパス(東京都)

発表者：井上雅広
発表表題：Associated kinase of *Trypanosoma brucei* 14-3-3(AKB1)の分子生物学

学会名：第 72 回日本寄生虫学会大会 東日本支部会・第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム 合同大会

発表年月日：2012 年 10 月 13 日
発表場所：群馬大学医学部 刀城会館(前橋市)

発表者：井上雅広
発表表題：AKB14-3-3 (Associated kinase of *Trypanosoma brucei* 14-3-3)

学会名：第 81 回日本寄生虫学会大会
発表年月日：2012 年 3 月 24 日
発表場所：兵庫医科大学 西宮キャンパス(西宮市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

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

(2)研究分担者 なし
()
研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()
研究者番号：