

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560417

研究課題名(和文) 創薬研究を指向したバクテリア2成分情報伝達系に関する動的定量解析手法の樹立

研究課題名(英文) Establishment of a quantitative method for the dynamical analysis of bacterial two-component systems toward studies on an innovative drug development

研究代表者

木下 英司(Kinoshita, Eiji)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号：80304418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の細胞内情報伝達的手段にタンパク質のHis残基とAsp残基のリン酸化を介した2成分システムがある。しかし、これらの残基に結合したリン酸基は化学的に不安定であるため、2成分システムにおけるリン酸化研究の手法は限られていた。本研究では、申請者が独自に開発したリン酸親和性電気泳動法を、2成分情報伝達系の研究に応用し、分子内および分子間のリン酸基転移反応や自己リン酸化反応に関わる酵素や基質の速度論的性質について明らかにした。さらには、ヒスチジinkinase阻害剤の開発のための動的定量解析手法として確立させた。

研究成果の概要(英文)：One mode of bacterial intracellular signal transduction involves two-component regulatory systems mediated by phosphorylation of His and Asp residues. The chemical instability of phosphate groups on these residues hampers research on protein phosphorylation in such regulatory systems. In this study, Phos-tag SDS-PAGE originally developed as a novel method to research on protein phosphorylation has been applied to the dynamical analysis of two-component systems. As a result, this method permitted to identify aspects relevant to signaling molecules, including kinetic properties of enzymes and substrates in intramolecular and intermolecular phosphotransfer and autophosphorylation reactions. Furthermore, Phos-tag SDS-PAGE has been demonstrated as a useful quantitative method for the development of inhibitors of histidine kinases.

研究分野：物理系薬学

キーワード：フォスタグ 2成分伝達系 ヒスチジinkinase レスポンスレギュレーター 生体分子計測

1. 研究開始当初の背景

細菌はヒト等の高等生物には存在しない情報伝達機構、2成分情報伝達系を利用することで、自己の増殖や病原性の制御等の生体制御活動を営む。よって、これらの情報伝達系の阻害剤が薬剤耐性菌に対する新たな抗菌薬になると期待される。しかし、ヒスチジンやアスパラギン酸残基に結合したリン酸基は化学的に不安定であるため、その不安定なリン酸化蛋白質の動的な定量解析を行うことは難しいとされている。2006年、申請者は、リン酸化蛋白質をゲルシフトした電気泳動バンドとして定量解析する画期的なリン酸親和性電気泳動法(Phos-tag SDS-PAGE)を開発した(*Mol. Cell. Proteomics*, 5: 749, 2006)。2008年にはその手法を用いて、リン酸化ヒスチジンを有する蛋白質とリン酸化アスパラギン酸を有する蛋白質の動的定量解析に世界で初めて成功した(*Proteomics*, 8: 2994, 2008)。しかし、この手法はアルカリ性ゲル緩衝液を用いるため、2成分情報伝達系を標的とした場合、泳動途中でリン酸基が外れてしまう可能性があり、データの正確性という点で課題を残していた。ごく最近、中性ゲル緩衝液を用いて電気泳動システムの改良を行うことで、より高い分解能を持つ Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGEを開発することに成功した(*Proteomics*, 11: 319, 2011)。この研究成果が、2成分情報伝達系のダイナミクスをより高精度に定量分析できるという着想に導いた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発・改良したリン酸親和性電気泳動法を、この不安定なリン酸化蛋白質を介する2成分情報伝達系の研究に応用し、①分子内および分子間のリン酸基転移反応や自己リン酸化(または脱リン酸化)反応に関わる酵素や基質の速度論的性質、②グナル伝達系のクロストークや生理機能との関連性について明らかにすることで本法の有用性を実証する。さらには、③ヒスチジinkinase阻害剤の開発のための動的定量解析手法として確立させ、得られた成果を創薬研究に発展させる。

3. 研究の方法

3.1. 大腸菌由来の組み換えタンパク質作成

大腸菌(W3110株)のDNA配列を鋳型として、*envZ*, *evgS*, *barA*, *arcB*をクローニングし、大腸菌における発現ベクター-PET21aに挿入した。リン酸化部位への変異導入はQuick-Change Site-Directed Mutagenesis Kitを用いて行った。調整したそれぞれのプラスミドは大腸菌BL21(DE3)株またはBL21(DE3)pLys株を宿主とし、LB培地で培養しIPTGの添加によりHis-tag融合タンパク質として発現させた。タンパク質の精製はNi-NTA agarose(キアゲン社)を用いた。精製したタンパク質は10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50% v/v glycerolバッファー中で $-20^{\circ}C$ で保存した。

3.2. ヒスチジinkinaseの *in vitro* リン酸化反応

EnvZおよびEnvZ変異体のリン酸化反応は、0.50 M Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM KCl, 5.0 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP 溶液中、 $25^{\circ}C$ で行った。EvgSおよびEvgS変異体のリン酸化反応は、0.30 M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1~40 mM ATP 溶液中、 $25^{\circ}C$ で行った。BarA, ArcBおよびそれらの変異体のリン酸化反応は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM KCl, 5.0 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol, 10 mM ATP 溶液中、 $25^{\circ}C$ で進行させた。反応停止は195 mM Tris-HCl (pH 6.8), 9% w/v SDS, 30% glycerol, 1% v/v 2-mercaptoethanol, 0.01% w/v BPB からなるバッファーを反応液の半量添加することで行った。

3.3. Phos-tag SDS-PAGE と定量解析

Phos-tag SDS-PAGEの分離ゲル(6.3 mL)の組成は、6.0~7.0% w/v ポリアクリルアミド、375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 25 μ M アクリルアミド化Phos-tag, 50 μ M 塩化マンガン、濃縮ゲル(1.8 mL)の組成は、4.0% w/v ポリアクリルアミド、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)とした。TEMEDと過硫酸アンモニウムの添加によって共重合させた。泳動緩衝液は25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% w/v SDSを用いた。30 mA/ゲルの定電流で70分電気泳動を行った後、CBB染色を行った。定量解析は、

アトー社製の画像解析ソフトを用いて行った。1 レーン中の非リン酸化体バンドとリン酸化体バンド濃度の合計値を 100%とし、リン酸化型と非リン酸化型のバンドの割合を求めた。

3.4. *In vivo* における EvgS のリン酸化

pBAD プラスミドに全長 *evgS* および、恒常的な活性をもつ *evgSI*, さらにそれぞれの 3 つのリン酸化部位 Ala 置換体 (H721A, D1009A, H1137A) をクローニングした。このプラスミドをそれぞれ、大腸菌 MG1655 *evgS ydeP-lacZ* を宿主とし、37°C, 0.1 mg/mL ampicillin を含む LB 培地で培養して、L-arabinose の添加でタンパク質を発現させた。さらに 2 時間培養してから集菌し、0.1M KCl, 0.02 % w/v L-arabinose, 0.1 mg/mL ampicillin を含む M9 培地 (pH 7.0 または 5.5) 10 mL を加えて 1 時間培養した。β-ガラクトシダーゼ活性を測定する際はこの培地 20 μL と 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM 2-sulfanylethanol, 0.001% w/v SDS, 0.005% v/v trichloromethan 180 μL を混合した。反応は 40 μL の 4 mg/mL 2-nitropehiny D-galactopyranoside を加えて開始とし、5 分後に 1 M NaCO₃ を 1 mL 加えて反応停止とした。

4. 研究成果

4.1. ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応の制御機構

大腸菌由来ハイブリッドセンサーキナーゼの EvgS における *in vitro* リン酸基リレー反応を行い、Phos-tag SDS-PAGE を用いて、各ドメインのリン酸化を経時的、定量的に解析した。レシーバードメインの Asp を Ala 置換した場合、HK ドメインの His のリン酸化量が顕著に増加することがわかった。この現象は、他の大腸菌ハイブリッドセンサーキナーゼである ArcB と BarA でも同様に観察された。十分量の ATP 存在下では、それらの Ala 置換変異体における HK ドメインの His は、擬一次反応によってリン酸化され、60 分以内に 95% がリン酸化され定常状態に達した。一方、HPt ドメインの His を Ala 置換した変異体においては、野生型と同様に、HK ドメインの

His とレシーバードメインの Asp のリン酸化の合計が 25% で定常状態に達し、10 分以降は、その割合が減少した。これらの結果から、レシーバードメインがリン酸基リレー反応における分子全体のリン酸化量を制御していると考えられた。さらに、*in vivo* においても、レシーバードメインの Asp を Ala 置換した EvgS 変異体では HK ドメインの過剰なリン酸化量が観察されたことから、*in vitro* における反応機構の解析結果の正当性が裏付けられた。以上より、2 成分伝達系におけるハイブリッドセンサーキナーゼの複雑なリン酸基転移反応の必要性を考察するうえで、Phos-tag SDS-PAGE を用いた定量解析は、重要な示唆を与えた。

4.2. ハイブリッドセンサーキナーゼにおけるリン酸基転移反応様式の検証

大腸菌由来の 3 種のハイブリッドセンサーキナーゼ (ArcB, EvgS, BarA) について、2 量体で機能するそれらキナーゼのリン酸基転移反応が分子間 (trans) で起こるのか、それとも分子内 (cis) で起こるのかを、Phos-tag SDS-PAGE を用いて検証した。各ドメインのリン酸化部位をアラニン置換した変異体を作成し、それらのヘテロダイマーにおいてリン酸基転移反応が相補されるかを検討した。その結果、ArcB, EvgS, BarA のリン酸基転移反応の様式はそれぞれ、cis-trans-trans, cis-cis-cis, trans-trans-trans であり、3 種 3 様の反応様式であるという興味深い結果を得た。以上のように、Phos-tag SDS-PAGE を用いることでセンサーキナーゼのリン酸基転移反応の様式を簡便に解析できることを示すことに成功した。

4.3. ヒスチジンキナーゼの自己リン酸化阻害物質の探索

EnvZ のリン酸化阻害活性をもつ植物エキスのスクリーニング試験の結果、ハマセンナ (*Ormocarpum cochinchinense*) の抽出エキスに活性が見出された。続いて、溶媒分配、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー等を用い、その活性成分を探索したところ、新規化合物 Compound A の単離に成功した。Compound A の平面構造は NMR, MS 等のデータを解析することにより導出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Eguchi, Y., Koike, T. Validation of *cis* and *trans* modes in multistep phosphotransfer signaling of bacterial tripartite sensor kinases by using Phos-tag SDS-PAGE. *PLoS One* **11**, e0148294 (2016). 査読有
2. Sugiyama, Y., Katayama, S., Kameshita, I., Morisawa, K., Higuchi, T., Todaka, H., Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Taniguchi, T., Sakamoto, S. Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK antibody and Phos-tag SDS-PAGE. *MethodsX*, **2**, 469–474 (2015). 査読有
3. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Eguchi, Y., Yanagihara, S., Edahiro, K., Inoue, Y., Taniguchi, M., Yoshida, M., Yamamoto, K., Takahashi, H., Sawasaki, T., Utsumi, R., Koike, T. Functional characterization of the receiver domain for phosphorelay control in hybrid sensor kinases. *PLoS One* **10**, e0132598 (2015). 査読有
4. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 601–618 (2015). 査読有
5. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. The cutting edge of affinity electrophoresis technology. *Proteomes* **3**, 42–55 (2015). 査読有
6. 木下英司, 木下恵美子, 小池透, Phos-tag SDS-PAGE ゲルからの標的リン酸化タンパク質の転写効率改善. *分析化学*, **64**, 年間特集「生」(日本分析化学会), 501–509 (2015). 査読有
7. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, Matsuda, A., and Koike, T. Tips on improving the efficiency of electrotransfer of target proteins from Phos-tag SDS-PAGE gel. *Proteomics* **14**, 2437–2442 (2014). 査読有
8. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Identification of two phosphorylated species of β -catenin involved in the ubiquitin-proteasome pathway by using two-dimensional Phos-tag affinity electrophoresis. *J. Electrophoresis* **58**, 1–4 (2014). 査読有
9. Kinoshita-Kikuta, E., Kurosaki, H., Kunisada, N., Eiji Kinoshita, and Koike, T. A Phos-tag-based fluorescence quenching system for activity assay and inhibitor screening for alkaline phosphatase. *Am. J. Anal. Chem.* **5**, 796–804 (2014). 査読有
10. Sogame, Y., Kojima, K., Takeshita, T., Eiji Kinoshita, and Matsuoka, T. Identification of cAMP-dependent phosphorylated proteins involved in the formation of environment-resistant resting cysts by the terrestrial ciliate *Colpoda cucullus*. *Invert. Surviv. J.* **11**, 213–218 (2014). 査読有
11. Fujioka, H., Tsunehiro, M., Kawaguchi, M., Kuramoto, Y., Kurosaki, H., Hieda, Y., Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Simple enrichment of thiol-containing biomolecules by using zinc(II)-cyclen-functionalized magnetic beads. *J. Sep. Sci.* **37**, 1601–1609 (2014). 査読有
12. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., Shiba, A., Edahiro, K., Inoue, Y., Yamamoto, K., Yoshida, M., and Koike, T. Profiling of protein thiophosphorylation by Phos-tag affinity electrophoresis: evaluation of adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) as a phosphoryl donor in protein kinase reactions. *Proteomics* **14**, 668–679 (2014). 査読有
13. 木下英司, 木下恵美子, 小池透, アフィニティー電気泳動技術の最前線. *ぶんせき*, **7**, (日本分析化学会), 365–371 (2014). 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 木下英司, フォスタグ (Phos-tag) 技術のノート & チップ. アステラス製薬株式会社バイオサイエンス研究所研修セミナー

- 一, 2015年7月10日, つくば市(招待講演)
2. 木下英司, リン酸化プロテオーム研究のための Phos-tag テクノロジー: サンプル前処理技術としての貢献. 宮崎大学プロテオミクス教育セミナー, 2015年6月19日, 宮崎市(招待講演)
 3. 木下英司, 亜鉛の特性を利用したタンパク質翻訳後修飾の解析. 第12回北里疾患プロテオーム研究会, 2015年3月18日, 相模原市(招待講演)
 4. 木下英司, 亜鉛の特性を利用したライフィノベーション. 第8回レドックス・ライフィノベーション第170委員会&第3回JHUPPO サテライトジョイントシンポジウム「先端プロテオーム解析技術とライフィノベーションへの展開」, 2014年8月22日, 宮崎市(招待講演)
 5. 木下英司, リン酸化プロテオミスのための Phos-tag テクノロジー: サンプル前処理技術としての貢献. 第41回BMSコンファレンス, 2014年7月8日, 石川県羽咋郡(招待講演)

[図書] (計 4件)

1. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Phosphopeptide detection with biotin-labeled Phos-tag. *in Phospho-proteomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1355** (ed. by Stechow, L); Springer, New York, 17–29 (2016).
2. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Phos-tag technology for kinomics. *in Kinomics: Approaches and Applications*. (eds. by Kraatz, H.-B. and Martic, S); Wiley-VCH, Weinheim, 195–210 (2015).
3. Eiji Kinoshita, Kinoshita-Kikuta, E., and Koike, T. Phos-tag-based affinity chromatography techniques for enrichment of the phosphoproteome. *in Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*. (eds. by Inoue, J and Takekawa, M); Springer, New York, 17–30 (2015).

4. Kinoshita-Kikuta, E., Eiji Kinoshita, and Koike, T. Neutral phosphate affinity SDS-PAGE system for profiling of protein phosphorylation. *in Proteomic Profiling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1295** (ed. by Posch A); Springer, New York, 323–354 (2015).

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/tkoike/index.html>

<http://shushoku-signal.com/soshiki/kobo/18kinoshita.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 英司 (KINOSHITA EIJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号: 80304418