

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870990

研究課題名(和文)リン酸化を介してHMGB1の分泌を制御する因子の探索と制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of phosphorylation mechanism participate in nucleocytoplasmic shuttling and secretion of HMGB1

研究代表者

平 順一(Taira, Junichi)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教

研究者番号：20549612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：High mobility group box 1 (HMGB1)には2つの核移行シグナル(NLS1およびNLS2)が存在し、その中のセリン残基のリン酸化はHMGB1の核から細胞質への移行と分泌に関わると考えられている。本研究で、これらセリンの脱リン酸化を行うホスファターゼとしてPP2Aに着目した検討を行ったところ、PP2AはNLS1中の複数のリン酸化セリンの脱リン酸化に関わることが示唆された。次に、NLS1内部のリン酸化を行うキナーゼを探索したところ、プロテインキナーゼC (PKC) がHMGB1の核から細胞質への移行に関わるSer46をリン酸化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phosphorylation of high mobility group box 1 (HMGB1) is involved in the subcellular translocation of the protein and subsequent secretion. Phosphorylation of serine residues in the two nuclear localization signals (NLS1 and NLS2) promotes nucleocytoplasmic relocation of HMGB1. In this study, it was suggested that protein phosphatase 2A (PP2A) correlates in the nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 through dephosphorylation of specific phosphoserines within NLS1. Next, kinases that phosphorylate serine residues within NLS1 were predicted, and an in vitro kinase assay was performed. Among the predicted kinases, protein kinase C phosphorylated Ser46 of HMGB1-derived peptides, and a mutagenesis experiment implied that the phosphorylation could induce translocation of HMGB1 to the cytosol.

研究分野：生化学

キーワード：HMGB1 PP2A 核移行シグナル PKC GSK-3 CK2

1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とした High mobility group box-1 (HMGB1) と呼ばれる非ヒストン性核内タンパク質は、1999年に炎症性サイトカイン様の機能が報告されて以来、炎症メディエータとして再定義されている。HMGB1は細胞がネクロシスをおこすことによって核内から放出されるほか、単球やマクロファージ、樹状細胞などの自然免疫細胞が、リポ多糖、腫瘍壊死因子、インターフェロン- $\gamma$ などの刺激を受けると、核内から細胞質へと移行した後に細胞外に能動的に分泌される系が知られている。

炎症後期で血中に放出された HMGB1 は単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球等の自然免疫細胞の Toll 様受容体や終末糖化産物受容体 (RAGE) にパラクライン・オートクライン様に作用し、NF- $\kappa$ B 等を介して炎症性サイトカインの産生を亢進する。このサイトカイン増幅イベントは炎症の拡大・転移を促進して致死となるほか、硬化した動脈のアテローム巣の泡沫細胞や血管平滑筋細胞は多くの HMGB1 と RAGE を共発現しており、炎症の悪性ループが形成されていると考えられる (図 1)。

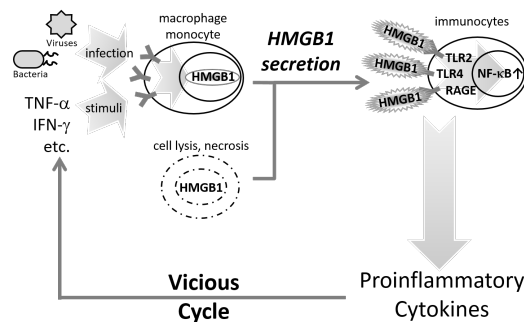


図 1: 単球, およびマクロファージからの HMGB1 の分泌とこれらが炎症を増幅する機構の模式図.

ここ数年の研究で、自然免疫細胞において核内の HMGB1 が刺激に应答して細胞質へ移行し、その後細胞外へと放出される一連の移動には、HMGB1 の翻訳後修飾が関与していることが明らかとなりつつあり、HMGB1 の核外へのリロケーションおよびこれに続く細胞外への分泌が翻訳後修飾によってどのように制御されるかという点について説明が試みられている。この翻訳後修飾にはリン酸化、アセチル化、メチル化の3つがあり、アセチル化とメチル化に関しては修飾に関与する因子は完全に特定されていないものの、修飾を受ける部位に関しては概ね明らかとなっている。一方、リン酸化による調節では、修飾を受けるアミノ酸残基に加え、リン酸化を行うキナーゼおよび脱リン酸化を行うホスファターゼは完全に明らかとなっていない。2006年に Youn らの

グループにより HMGB1 内のセリン残基のリン酸化が分泌に関与することが示唆され (Youn *et al.*, *J. Immunol.*, **177**, 7889 (2006)) また、2009年には同グループによって、プロテインキナーゼ C (PKC) が HMGB1 を直接的にリン酸化することが報告されるにとどまる (Oh *et al.*, *J. Immunol.*, **182**, 5800 (2009))。

核内タンパク質の HMGB1 に炎症メディエータとしての機能が報告された当初は、これがどのように炎症に関わるかという点に興味もたれてきたが、最近では放出された HMGB1 をいかにコントロール、あるいは中和するかという点についての研究も盛んに行われるようになっており、臨床に近い分野では、中和抗体の開発や、これらを用いた対処療法に関する報告数の増加が著しい。一方で、HMGB1 の分泌機構の解明は、HMGB1 の生理的機能に迫るものであり、より根本的な治療を目指すうえでも HMGB1 の分泌に関する基礎的知見の蓄積が対処療法の確立と並行して求められる。

2. 研究の目的

本来であれば核内に存在する HMGB1 が、どのようにして分泌されるのか? その機構の解明は、HMGB1 が関わる疾患の根本を理解する上で重要であり、HMGB1 の核内外の移動と分泌のスイッチングの全容解明は、HMGB1 研究のパラダイムシフトにつながるものと期待される。リン酸化はタンパク質の主要な翻訳後修飾であるが、HMGB1 のリン酸化に関わる因子はほぼ未解明である。HMGB1 の分泌に関わるリン酸化には複数のキナーゼが関与する可能性が考えられるにもかかわらず、この点に関する検討が少ないことが、解明を遅らせている原因の一つと考えられる。HMGB1 は A box、B box、および C 末端の acidic tail の3つのドメインから形成され、A box 内部、B box と acidic tail の間にはそれぞれ核移行シグナル (NLS1 と NLS2) の存在が推定されている (図 2 上)。

本研究での詳細な検討に先立ち、これまでにプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) 選択的な阻害剤でマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を処理することによって HMGB1 が核 細胞質 細胞外へと移動することを確認した。この一連の観察から、HMGB1 の核移行シグナル内のセリン残基のうち、PP2A による脱リン酸化をうけるものは、リン酸化を介した HMGB1 の核内外へのリロケーションや分泌を制御するスイッチとして機能するという作業仮説を立て、この検証のための検討を行った。また、当該セリン残基のリン酸化に関わるキナーゼの探索を併せて検討した (図 2 下)。

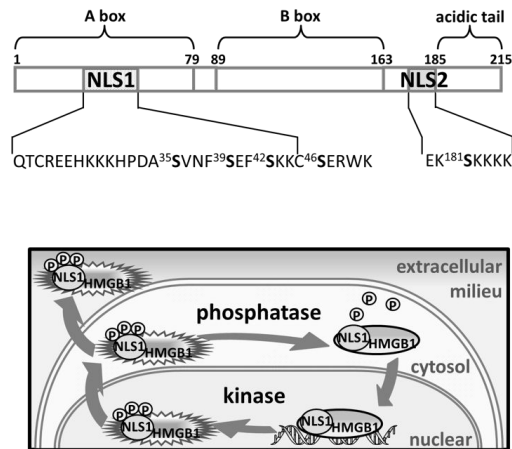


図2:(上)HMGB1の一次構造マップと核移行シグナル(NLS)のアミノ酸配列。(下)HMGB1の細胞内外の移動はNLS1のリン酸化で制御されていると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) HMGB1は核移行シグナル内の特定のリン酸化セリンはプロテインホスファターゼ2A (PP2A)による脱リン酸化を受け、核への局在が亢進するものと考えられる。この検証のために緑色蛍光タンパク質 (GFP)を融合したHMGB1 (GFP-HMGB1)をRAW264.7中に発現し、PP2A選択的阻害剤で処理した際の細胞内局在の変化を、蛍光顕微鏡を用いて追跡した。なお、HMGB1には2つの核移行シグナルが存在すると考えられるため、これらのうちどちらがPP2Aの影響を受けるのかという点についても併せて検討を行った。

(2) 抗HMGB1抗体と抗リン酸化抗体を用いた共免疫沈降およびProximity Ligation Assay (PLA)によってPP2A阻害時のHMGB1のリン酸化状態を評価するとともに、共免疫沈降実験によってPP2Aが核内でHMGB1と直接相互作用しているかどうかを検討した。

(3) HMGB1に対するPP2Aの脱リン酸化活性及びその特異性の評価のため、ヒトHMGB1中の11個のセリン残基に対して、*in vitro*ホスファターゼアッセイを行った。具体的には当該セリンを中心とした前後の配列からなるリン酸化ペプチドを化学合成し、リコンビナントPP2Aの触媒サブユニットを作用させた際の遊離リン酸基をマラカイトグリーン・モリブデートアッセイにより定量した。

(4) ホスファターゼは一般的に、細胞内の阻害タンパク質によりその活性が制御されることが知られているため、PP2Aの阻害タンパク質はHMGB1の分泌を引き起こすものと考えられた。そこでPP2Aの代表的な阻害タンパク質として知られるC1P2Aの強発現がGFP-HMGB1の細胞質への移行や分泌に与える影響を評価し、HMGB1の放出にPP2A

の活性がタンパク質レベルで関与しているかという点について検討した。

(5) HMGB1の分泌は、HMGB1のリン酸化を行うキナーゼによっても調節されると考えられるため、自然免疫細胞内でHMGB1と直接的に結合するキナーゼの探索を行った。エンドトキシンで刺激したRAW264.7のライセートを抗体アレイで解析し、数百種類のシグナル伝達関連タンパク質の中から炎症時にHMGB1と結合するタンパク質を探索した。また、この方法によりキナーゼを同定できなかった場合、リン酸化モチーフをもとにしたキナーゼの推定を行った。

### 4. 研究成果

(1) マウスマクロファージ株RAW264.7をPP2Aの低分子量選択的阻害剤であるendothallにより処理したところ、HMGB1の細胞外への分泌が認められた観察から、PP2Aはマクロファージ核内から細胞質へのHMGB1のリロケーションと細胞外への分泌の抑制に関わると考え、まず、HMGB1の細胞内局在におけるPP2Aの酵素活性の影響について検討を行った。RAW264.7細胞中の内在性PP2Aの発現を確認した後、GFP-HMGB1をRAW264.7中に強発現させ、PP2Aendothallにて処理を行ったところ、GFP-HMGB1の核から細胞質への移行が認められた。

(2) RAW264.7細胞中には、PP2A同様に内在性のHMGB1の発現が認められたため、PP2AとHMGB1間の相互作用を共免疫沈降実験にて検討したところ、両タンパク質間の相互作用が認められた。次に、PP2Aの阻害により、HMGB1のリン酸化状態の変化を検討した。免疫沈降したHMGB1を、抗リン酸化セリン抗体を用いてイムノプロットしたところ、endothall処理によるHMGB1のリン酸化の亢進が認められた。これと併せて、抗HMGB1抗体と抗リン酸化抗体を用いたPLAにより、endothall処理したRAW264.7核内でのHMGB1のリン酸化の亢進を確認した。

(3) ヒトHMGB1中のすべてのセリン残基(11か所)について、*in vitro*ホスファターゼアッセイによるPP2Aの脱リン酸化特性の評価を行った。その結果、RAW264.7ライセートにより、HMGB1のNLS1中のSer35、Ser39およびSer42の有意な脱リン酸化が認められ、また、endothall存在下ではこの脱リン酸化が抑制された。このことから、RAW264.7中のPP2Aがこれらのセリン残基に対し選択的な脱リン酸化をおこなうことが示唆された。NLS1中のSer35、Ser39およびSer42のリン酸化がHMGB1の核外へのリロケーションに関わっているかを、GFP-HMGB1の変異体を用いて解析した。上記のセリン残基を全てアラニンに置換した変異体の細胞内局在を観察すると、PP2Aの阻害に対しても変異体は影響を受けず核内

にとどまった。これに併せ、HMGB1 中の核移行シグナルである NLS1 と NLS2 はそれぞれ独立して機能し、NLS1 においては当該シグナル配列中の Ser46 のリン酸化も HMGB1 の細胞質への移行に關与することを示唆する結果を得た。

(4) PP2A の阻害タンパク質の発現・活性化、及び PP2A の発現量の低下は HMGB1 の分泌を引き起こすものと考えられたため、PP2A の阻害タンパク質として知られる CIP2A の強発現による PP2A の阻害が HMGB1 の細胞質への移行に影響を与えるかどうかを評価した。CIP2A と HMGB1 を細胞内に共発現させたところ、HMGB1 の核から細胞質への移行が認められ、PP2A の阻害が HMGB1 の分泌を亢進する上記の結果を支持した。

(5) LPS 処理前および処理後の RAW264.7 のライセートを抗体アレイで解析し、HMGB1 に直接的に結合するキナーゼの探索を行った。しかしこの検討では HMGB1 に結合するキナーゼの同定には至らなかった。そこで、PP2A に脱リン酸化を受ける可能性が高い Ser35、Ser39、Ser42 に加え、リン酸化が HMGB1 の細胞質移行への關与が示唆された Ser46 について、モチーフ検索よりこれらのリン酸化に関わるキナーゼを推定したところ、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK-3)、カゼインキナーゼ 2 (CK2)、プロテインキナーゼ C (PKC) の 3 種類が当該セリン残基のリン酸化に関わるキナーゼの候補として推定された。そこで、当該領域の HMGB1 由来のペプチドにこれらのキナーゼを作用させ、質量分析計を用いてリン酸化特性を解析した。その結果、PKC が Ser46 のリン酸化に関わることが示唆された。この Ser46 のグルタミン酸置換体 (リン酸化セリンミミック) は、GFP 融合タンパク質を用いた蛍光顕微鏡観察において、HMGB1 の細胞質へのリロケーションを誘導した。これまでに PKC が HMGB1 のリン酸化に関わることが報告されているが、リン酸化を受けるセリン残基は詳細には特定されておらず、本研究によって Ser46 がその有力な候補となりうることを示唆された。

#### 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 1 1 件)

Y. Kida, J. Taira, K. Kuwano, EprS, an autotransporter serine protease, plays an important role in various pathogenic phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 査読有, 162, 2016, 318-329.

DOI:10.1099/mic.0.000228

J. Taira, Y. Nakashima, S. Yoshihara, S. Koga, S. Sueda, H. Komatsu, Y. Higashimoto, T. Takahashi, N. Tanioka, H. Shimizu, H. Morimatsu, H. Sakamoto, Improvement of heme oxygenase-1-based heme sensor for quantifying free heme in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 査読有, 489, 2015, 50-52.

DOI:10.1016/j.ab.2015.08.004

T. Matsui, A. Ojima, Y. Higashimoto, J. Taira, K. Fukami, S. Yamagishi, Pigment epithelium-derived factor inhibits caveolin-induced interleukin-8 gene expression and proliferation of human prostate cancer cells, *Oncol. Lett.*, 査読有, 10, 2015, 2644-2648.

H. Kanetaka, Y. Koseki, J. Taira 他 7 名, Discovery of InhA inhibitors with anti-mycobacterial activity through a matched molecular pair approach, *Eur. J. Med. Chem.*, 査読有, 94, 2015, 378-385.

DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.02.062

J. Taira, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, Effect of glycogen synthase kinase 3 on the complex forming between growth factor receptor bound protein 14 and insulin receptor, *Peptide Science 2014*, 査読有, 2015, 187-190.

J. Taira, Y. Higashimoto, Evaluation of *in vitro* phosphorylation properties of predicted kinase which phosphorylate serines in nuclear localization signal 1 in high mobility group box 1, *J. Pept. Sci.*, 査読有, 20, 2014, 613-617.

DOI: 10.1002/psc.2630

R. Tanaka, Y. Seki, Y. Saito, S. Kamiya, M. Fujita, H. Okutsu, T. Iyoda, T. Takai, T. Owaki, H. Yajima, J. Taira, 他 4 名, Tenascin-C-derived peptide TNIIIA2 highly enhances cell survival and PDGF-dependent cell proliferation through potentiated and sustained activation of integrin  $\alpha 5 \beta 1$ , *J. Biol. Chem.*, 査読有, 289, 2014,

17699-17708.

DOI: 10.1074/jbc.M113.546622

J. Taira, Y. Higashimoto, Phosphorylation of Grb14 BPS domain by GSK-3 correlates with complex forming of Grb14 and insulin receptor. (2014) *J. Biochem.*, 査読有, 155, 2014, 353-360.

DOI: 10.1093/jb/mvu011

T. Matsui, Y. Higashimoto, J. Taira, S. Yamagishi, Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to caveolin-1 and inhibits the pro-inflammatory effects of caveolin-1 in endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 441, 2013, 405-410.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.074

Y. Higashimoto, T. Matsui, Y. Nishino, J. Taira, H. Inoue, M. Takeuchi, S. Yamagishi, Blockade by phosphorothioate aptamers of advanced glycation end products-induced damage in cultured pericytes and endothelial cells, *Microvasc. Res.*, 査読有, 90, 2013, 64-70.

DOI: 10.1016/j.mvr.2013.08.010

J. Taira, Y. Kida, K. Kuwano, Y. Higashimoto, Protein phosphatase 2A dephosphorylates phosphoserines in nucleocytoplasmic shuttling and secretion of high mobility group box 1, *J. Biochem.*, 査読有, 154, 2013, 299-308.

DOI: 10.1093/jb/mvt056

[学会発表](計19件)

Yukinori Nakashima, Junichi Taira, Yuichiro Higashimoto, Sinji Sueda, Hideyuki Komatsu, Hiroshi Sakamoto, Quantification of free heme by using a sensor based on fluorescently labeled heme oxygenase-1, *Pacificchem 2015*, Honolulu, Hawaii, U.S.A., 平成27年12月15-20日

Junichi Taira, Yuichiro Higashimoto, Hiroshi Sakamoto, Phosphorylations of Grb14 BPS domain by GSK-3 are correlated with complex forming between Grb14 and insulin receptor, *Pacificchem 2015*, Honolulu, Hawaii, U.S.A., 平成27年12月15-20日

平 順一, 和田翔太, 福嶋祐也, 末田慎二, 小松英幸, 杉島正一, 東元祐一郎, 坂本 寛, 表面プラズモン共鳴法によるヘムオキシゲナーゼ2のN末端領域とNADPHチトクロムP450レダクターゼ間の相互作用解析, 第52回ペプチド討論会, 平塚中央公民館, 神奈川県平塚市, 平成27年11月16-18日

杉島正一, 平 順一, 佐藤秀明, 野口正人, 山本 健, 坂本 寛, 変異NADPH-シトクロムP450還元酵素(CPR)を用いたCPRからヘムオキシゲナーゼへの電子伝達機構の解明, 第39回タンパク質の構造と機能に関する九州シンポジウム, 豊泉荘, 大分県別府市, 平成27年9月10-12日

平 順一, 中島幸徳, 義原 俊, 古賀真也, 末田慎二, 小松英幸, 東元祐一郎, 坂本 寛, ヘムオキシゲナーゼ-1を基盤としたヘムセンサーによる生体試料中の遊離ヘムの定量, 平成27年度日本生化学会九州支部例会, 九州大学箱崎キャンパス, 福岡県福岡市, 平成27年5月16-17日

平 順一, 東元祐一郎, 坂本 寛, Grb14 BPSドメイン内部のリン酸化はインスリン受容体との複合体形成に影響する, 平成27年度日本生化学会九州支部例会, 九州大学箱崎キャンパス, 福岡県福岡市, 平成27年5月16-17日

平 順一, インスリンシグナル抑制因子Grb14のインスリン受容体へのリクルートに関するキナーゼの研究, 立体視プロジェクションシステムを使った分子科学研究講演会(3DCMS2014), 九州工業大学飯塚キャンパス, 福岡県飯塚市, 平成26年12月5-6日

中島幸徳, 古賀真也, 東元祐一郎, 末田慎二, 小松秀幸, 平 順一, 坂本 寛, 蛍光ラベル化ヘムオキシゲナーゼ-1を利用したヘムセンサーの開発, 立体視プロジェクションシステムを使った分子科学研究講演会(3DCMS2014), 九州工業大学飯塚キャンパス, 福岡県飯塚市, 平成26年12月5-6日

杉島正一, 佐藤秀明, 東元祐一郎, 原田二郎, 平 順一, 坂本 寛, 安永卓生, 和田 啓, 福山恵一, 山本 健, 野口正人, X線結晶構造解析によるヘム代謝酵素複合体の立体構造解明, 立体視プロジェクションシステムを使った分子科学研究講演会(3DCMS2014), 九州工業大学飯塚キャンパス, 福岡県飯塚市, 平成26年12月5-6日

平 順一, 坂本 寛, 東元祐一郎, Grb14とインスリン受容体の複合体形成にお

ける GSK-3 の影響 (Effect of glycogen synthase kinase 3 on the complex forming between growth factor receptor bound protein 14 and insulin receptor), 第 51 回ペプチド討論会, 徳島大学大塚講堂, 徳島県徳島市, 平成 26 年 10 月 22 - 24 日

川節あかね, 林 良, 平 順一, 東元祐一郎, 長田聡史, 兒玉浩明, Pro 残基をもつ Aib モデルペプチドの合成とイオンチャンネル活性, 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都, 京都府京都市, 平成 26 年 10 月 15 - 18 日

松井孝憲, 東元祐一郎, 平 順一, 山岸昌一, PEDF は内皮細胞のカベオリン-1 による炎症誘発作用を阻害する, 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都, 京都府京都市, 平成 26 年 10 月 15 - 18 日

Sinya Koga, Yukinori Nakashima, Yuichiro Higashimoto, Sinji Sueda, Hideyuki Komatsu, Junichi Taira, Hiroshi Sakamoto, Development of a heme sensor using fluorescent-labeled heme oxygenase-1, 8<sup>th</sup> International Conference on Heme Oxygenases, Biolron and Oxydative Stress, Garvan Institute of Medical Research, Sydney, Australia, 平成 26 年 10 月 8-11 日

平 順一, 東元祐一郎, Grb14 とインスリン受容体の複合体形成におけるリン酸化の影響評価, 第 38 回タンパク質の構造と機能に関する九州シンポジウム, レイクサイドホテル久山, 福岡県久山町, 平成 26 年 9 月 11-13 日

平 順一, 東元祐一郎, Grb14 によるインスリンシグナル抑制への GSK-3 の関与, 平成 26 年度日本生化学会九州支部例会, 九州大学病院キャンパス, 福岡県福岡市, 平成 26 年 5 月 17 - 18 日

東元祐一郎, 平 順一, カベオリン 1 との相互作用によるプロテインホスファターゼ 5 の酵素活性の亢進, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋大学東山キャンパス, 愛知県名古屋市, 平成 26 年 3 月 27 - 30 日

平 順一, 東元祐一郎, Grb14 によるインスリン受容体の阻害への GSK-3 の関与, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋大学東山キャンパス, 愛知県名古屋市, 平成 26 年 3 月 27 - 30 日

東元祐一郎, 平 順一, カベオリン 1 は PC-3 細胞中でプロテインホスファターゼ 5 と相互作用し内在性の活性化因子として作用する, 第 86 回日本生化学会大

会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 平成 25 年 9 月 11 - 13 日

平 順一, 上田敏久, 宗 伸明, 関 清彦, 光富 勝, Tyr 誘導体の細胞毒性, 2013 年度日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部合同大会, 県立広島大学広島キャンパス, 広島県広島市, 平成 25 年 9 月 5 - 6 日

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称: 抗腫瘍活性を有するチロシン誘導体  
発明者: 上田敏久, 宗 伸明, 光富 勝, 関 清彦, 平 順一  
権利者: 国立大学法人佐賀大学、学校法人久留米大学  
種類: 特許  
番号: 特許願 2014-040941  
出願年月日: 平成 26 年 3 月 3 日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平 順一 (TAIRA, Junichi)  
九州工業大学・大学院情報工学研究院・助教  
研究者番号: 2054961