

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05560

研究課題名(和文) 酵素-基質複合体誘導によるSer/Thrホスファターゼ基質同定法の開発

研究課題名(英文) Substrate identification method for protein phosphatases through the induction of enzyme-substrate intermediate

研究代表者

中馬 吉郎 (Chuman, Yoshiro)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40372263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のリン酸化は、キナーゼとホスファターゼにより厳密に制御されており、これらの制御破綻はがんを含む様々な疾患を引き起こすことが知られている。タンパク質のリン酸化制御に重要なSer/Thrホスファターゼの基質を同定することは、細胞内シグナル伝達を解明するうえで極めて重要であるが、これまで有用な手法は確立されていない。本研究では、Ser/Thrホスファターゼの触媒機構、ならびにリン酸化ミミック分子に着目し、Ser/Thrホスファターゼに対する2つの新規基質同定法の開発を行った。これらの手法は、他のSer/thrホスファターゼにも展開可能であり、幅広い応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein phosphorylation is strictly regulated by protein kinases and protein phosphatases, and disordered regulation of protein phosphorylation often causes serious disease, such as cancer. It is important to identify substrates for Ser/Thr phosphatases to clarify the signal transduction and disease mechanisms, however, there are still no their reliable methods. Here, we developed two novel substrate-identification methods for Ser/Thr phosphatases, one is method termed Phosphorylation Mimic Phage Display (PMPD), to identify substrate for SCP1 phosphatase using peptide phage display libraries with Mg²⁺ and AlF₄⁻ and another is development of substrate trapping mutants for PPM1D phosphatase. These methods can be useful and applicable for other Ser/Thr phosphatases.

研究分野：生体関連化学、酵素化学

キーワード：ホスファターゼ リン酸化 シグナル伝達 酵素

1. 研究開始当初の背景

生命の最小単位である細胞は、様々な外部刺激情報を厳密に制御された細胞内情報伝達システムにより伝達し、最終的に細胞応答としてアウトプットする。この一連の流れにおいて中心的役割を担っているのが、タンパク質のリン酸化であり、タンパク質のリン酸化は、リン酸化反応を触媒する「キナーゼ」と脱リン酸化反応を触媒する「ホスファターゼ」により制御されている。一方、これらリン酸化制御に関与する酵素に異常が生じると、癌を含む様々な疾患が引き起こされることが知られている。

Ser/Thr 残基を脱リン酸化する Ser/Thr ホスファターゼは、PPP、PPM、FCP/SCP タイプの3種に分類される。生体内リン酸化アミノ酸におけるリン酸化 Ser/Thr が占める割合は約 98%を越えていることから、リン酸化の制御破綻による疾患メカニズムの解明には、生体内リン酸化制御の中心的役割を担う Ser/Thr ホスファターゼの基質同定が必須である。しかしながら、リン酸化基質は Ser/Thr ホスファターゼと結合し反応後、素早く解離してしまうため、これまで Ser/Thr ホスファターゼに対する有効な基質同定法が確立されていないことが問題点となっている。

合成ペプチドライブラリーやファージライブラリーを用いた基質同定法や質量分析による結合タンパク質の同定法は、タンパク質の標的分子探索に広く用いられている。一方、Ser/Thr ホスファターゼに対する標的分子探索においては、親和性・選択性が低いこと、脱リン酸化後、基質が速やかに解離すること、リン酸化基質ライブラリーの調製が困難であることなどから、未だに有用な基質同定法が確立されておらず、新たな着想に基づいた新手法の開発が強く望まれている。

表1. Ser/Thr ホスファターゼ

サブファミリー	PPP, PPM, FCP/SCPタイプ
標的アミノ酸	Ser, Thr
全アミノ酸におけるリン酸化の割合	~98.2% pSer (~86.4%), pThr (~11.8%)
有用な基質同定法	未確立

2. 研究の目的

酵素の基質同定法には、安定な「酵素-基質複合体」の形成が必須である。そこで我々は、Ser/Thr ホスファターゼの触媒機構に着目し、基質側(方法 I)と酵素側(方法 II)の両方向からのアプローチにより、Ser/Thr ホスファターゼに対する新規基質同定法の開発を試みた。すなわち、本研究では、「Ser/Thr ホスファターゼに対し、立体制約型ファージライブラリーを用いた in vitro 法(方法 I)、ならびに Ser/Thr ホスファターゼの触媒機構に基づいた基質トラップ型変異体を用いた ex vivo 法

(方法 II)の両手法を展開することにより、新規 Ser/Thr ホスファターゼ基質同定法を確立し、Ser/Thr ホスファターゼの生体内機能を解明すること」を目的とした(図1)。

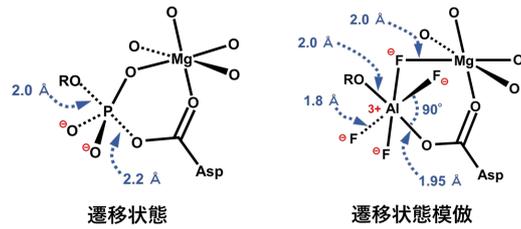


図1. FCP/SCP ホスファターゼの AIF₄⁻ による遷移状態誘導

3. 研究の方法

(1) 組み換えタンパク質の精製: 各種 Ser/Thr ホスファターゼ、ならびに立体制約型ファージライブラリーの母体構造となるヒトフィブロネクチン III 型ドメイン由来のアドネクチン(以下 Adn)の組み換えタンパク質は、低温誘導発現ベクターである pCold を用いてサブクローニングし、His タグ結合タンパク質として発現・精製を行った。アフィニティ精製、ならびにイオン交換クロマトグラフィーを実施することにより、高純度・高活性のタンパク質として調整した。

(2) ペプチドの合成: リン酸化ペプチド、ならびにビオチン化ペプチドは、Fmoc 固相合成法により化学合成した。HPLC でシングルピークであることを確認後、質量分析により目的ペプチドであることを確認した。

(3) 立体制約型ファージライブラリーの構築
立体制約型ファージライブラリー構築するため、Adn の FG ループにランダム配列を導入した組み換えタンパク質をコードした DNA をファージミドベクター-pkSTV05 に挿入した。得られたプラスミド DNA を大腸菌 TG-1 に導入し、M13K07 ヘルパーファージを感染させることにより、立体制約型 Adn タンパク質を発現するファージを作製した。

(4) in vitro ホスファターゼ基質トラップスクリーニング法の確立 (in vitro 法)

がん抑制性の Ser/Thr ホスファターゼとして知られている FCP/SCP タイプホスファターゼは、リン酸模倣分子 AIF₄⁻が遷移状態を誘起することが知られている。ELISA プレートに SCP1 ホスファターゼを固定し、BSA によりブロッキングを行った後、立体制約型ペプチドを提示したファージライブラリーと AIF₄⁻を混合した状態でバイオパニングを実施した。3回のバイオパニング後、AIF₄⁻存在下でのみ SCP1 に結合するファージを単離した。得られたファージの塩基配列を解析することにより、SCP1 基質候補の配列を解析した。

(5) Ser/Thr ホスファターゼ基質トラップ型

変異体を用いた酵素—基質複合体形成 (ex vivo 法)

発がんタンパク質として知られる PPM1D ホスファターゼについて、正常型、ならびに基質トラップ変異体をマイクロタイプレートに固定後、ビオチン標識した既知のリン酸化基質ペプチドを結合させ、アビジン HRP により PPM1D に対する結合能を評価した。また、正常型と基質トラップ変異型の PPM1D を既知基質である p53 タンパク質とともにヒト肺がん由来の H1299 細胞に共発現させた。遺伝毒性ストレス刺激後、PPM1D を免疫沈降し、共沈してきた p53 の結合量をウェスタンブロット解析で定量解析し、基質トラップ変異体の細胞内基質に対する結合能を評価した。

4. 研究成果

(1) 立体制約型 Adn 提示ファージライブラリの有用性確認

立体制約型 Adn 提示ファージの有用性を確認するため、Adn の FG ループに Ser/Thr ホスファターゼである PPM1D ならびに SCP1 に結合するペプチドを導入した組み換えタンパク質を発現精製し、それぞれのホスファターゼに対する結合能を解析した (図 2)。

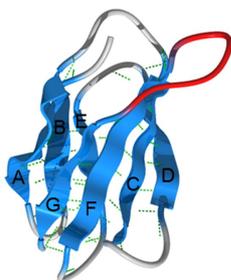


図 2. Adn の立体構造と FG ループ

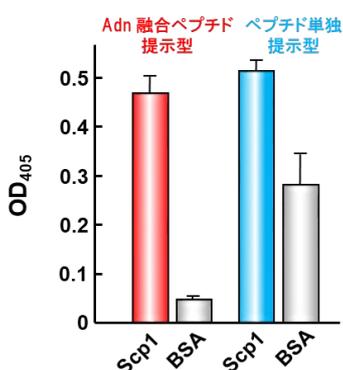


図 3. ファージ提示ペプチドの結合能

その結果、ホスファターゼ結合ペプチドを導入した Adn 組み換えタンパク質はそれぞれのホスファターゼに特異的に結合することが明らかとなった。さらに、SCP1 ホスファターゼ結合ペプチドを Adn 融合型、ならびにペプチド単独で提示したファージを用いて SCP1 に対する結合試験を実施したところ、

Adn 融合型ファージの非特異的結合能が減少することが明らかとなり、Adn を母体構造としたファージライブラリーの有用性が確認された (図 3)。次に、Adn の FG ループをランダム化した Adn 提示ファージライブラリの構築を行った。得られたファージライブラリの FG ループの塩基配列を解析したところ、FG ループのランダム化を確認し、 3×10^8 の多様性を有する Adn ファージライブラリの構築に成功した (図 4)。

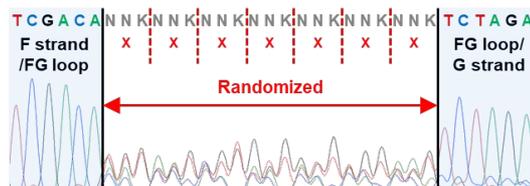


図 4. Adn 提示ファージライブラリの FG ループ配列解析

(2) in vitro ホスファターゼ基質トラップスクリーニング法の確立 (in vitro 法)

Ser/Thr ホスファターゼである SCP1 に対して、 AlF_4 存在下でファージライブラリと混合し、ホスファターゼ基質候補の探索を実施した。ライブラリーには直鎖型ペプチド提示ファージ、立体制型ファージとしてジスルフィド結合型のファージライブラリを用いた。 10^{10} 個からなるファージライブラリと混合し、結合ファージを単離することにより、複数の基質候補ペプチドの同定に成功した。得られた Scp1 結合配列には、Scp1 既知基質との類似配列も得られたことから、本手法の Ser/Thr ホスファターゼ基質同定法としての有用性が強く示唆された (表 2)。得られた基質候補ペプチドのリン酸化ペプチドを化学合成し、SCP1 による脱リン酸化活性を評価したところ、SCP1 により有意に脱リン酸化されたことから、本手法が Ser/Thr ホスファターゼ基質同定法として有用であることが示唆された。さらに、同定したペプチド配列に対してプロテインデータベースを用いたホモロジー検索を実施したところ、発がん関連キナーゼ PEAK1 と高い相同性を有する基質モチーフも得られたことから、Scp1 による PEAK1 を介した新規発がんメカニズムの存在が示唆された。

表 2. SCP1 基質候補のペプチド配列

Name	Sequence	Frequency
M12-1	DYHDPSLPTLRK	14/60
M12-6a	TNGSITWIFEPRS	2/60
BP-14	CPFESTIYSC	5/46
Dep-3	CRGATPMS C	3/46
CTD	(YSPISPS) _n	

(3) Ser/Thr ホスファターゼ基質トラップ型変異体を用いた酵素—基質複合体形成 (ex vivo 法)

発がんホスファターゼ PPM1D の触媒機構において酸として機能する His 残基の変異体を作製し、脱リン酸化活性を示さず基質と安定な複合体を形成する独自の新規基質トラップ法の開発を試みた(図5)。基質トラップ変異体として、His 残基を Phe, Trp, Ala に置換した変異体を作製し、既知リン酸化基質ペプチドとの結合試験を実施したところ、作製した変異体は正常型と比べて高い結合能を示した。さらに興味深いことには、本変異体はタンパク質レベルでも既知基質をトラップすることが確認された。これらのことから、作製した変異体が、Ser/Thr ホスファターゼ基質トラップ変異体として機能することが示唆された。

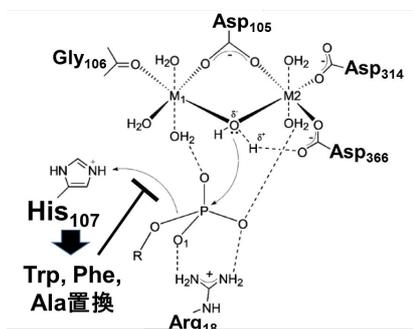


図5 . Exo vivo 基質トラップモデル

本研究で開発した2種のSer/Thr ホスファターゼ基質同定法は、今回用いた特定のホスファターゼのみならず、他のSer/Thr ホスファターゼにも展開可能であることから、幅広い応用が期待されるとともに、Ser/Thr ホスファターゼの機能制御破綻に伴う疾患メカニズムの解明に貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- (1) Otsubo, K., Yoneda, T., Kaneko, A., Yagi, S., Furukawa, K., and Chuman, Y. Development of a Substrate Identification Method for Human Scp1 Phosphatase Using Phosphorylation Mimic Phage Display. *Protein Pept. Lett.* 25(1), 76-83. (2018) DOI:10.2174/0929866525666171206114913 査読有
- (2) Yagi, S., Yoneda, T., Otsubo, K., Furukawa, K., and Chuman, Y. Characterization of Enzymatic Activity of FCP/SCP Type Ser/Thr Phosphatase Family. *Peptide Sci.* 2016, 225-226, (2017) DOI:10.1007/s00412-016-0581-x 査読有
- (3) Kozakai, K., Kamada, R., Furuta, J., Kiyota, Y., Chuman, Y., and Sakaguchi, K. PPM1D

controls nucleolar formation by up-regulating phosphorylation of nucleophosmin. *Sci Rep.* 6, 33272, (2016) DOI:10.1038/srep33272 査読有

- (4) Otsubo, K., Furukawa, K., Chuman, Y. Development of the Novel Substrate Identification Methodology for Ser/Thr Phosphatases Using Phosphorylation Mimic Phage Display Library. *Peptide Sci.* 2015, 271-272, (2016) 査読有
- (5) Ogasawara, S., Kiyota, Y., Chuman, Y., Kowata, A., Yoshimura, F., Tanino, K., Kamada, R., and Sakaguchi, K. Novel Inhibitors Targeting PPM1D Phosphatase Potently Suppress Cancer Cell Proliferation. *Bioorg. Med. Chem.*, 23(19), 6246-6249, (2015) DOI:10.1016/j.bmc.2015.08.042 査読有
- (6) Namba, K., Osawa, A., Nakayama, A., Mera, A., Tano, F., Chuman, Y., Sakuda, E., Taketsugu, T., Sakaguchi, K., Kitamura, N., and Tanino, K. Synthesis of Yellow and Red Fluorescent 1,3a,6a-Triazapentalene and Theoretical Investigation of Optical Properties. *Chem. Sci.*, 6, 1083-1093, (2015) DOI:10.1039/C4SC02780A 査読有

〔学会発表〕(計21件)

- (1) 中馬吉郎, 発がん関連脱リン酸化酵素を標的とした阻害剤と新規基質同定法の開発、N-Hybrid conference, 2018/1/20, 新潟グランドホテル(新潟市) 招待講演
- (2) 八木誠也, 古川和広, 中馬吉郎, 発がんホスファターゼ PPM1D を標的とした新規基質トラップ変異体の開発、N-Hybrid conference, 2018/1/20, 新潟グランドホテル(新潟市)
- (3) 吉田拓弥, 米田崇史, 大坪広大, 古川和広, 中馬吉郎, 金属錯体を用いた疾患関連脱リン酸化酵素に対する新規基質の探索、「ユビキタスグリーンケミカルエネルギー連携教育研究センター」第8回研究シンポジウム、2017/12/1、新潟大学(新潟市)
- (4) 山崎一樹, 馬場勁典, 古川和広, 中馬吉郎, 抗体模倣低分子タンパク質を用いたファージライブラリの構築、「ユビキタスグリーンケミカルエネルギー連携教育研究センター」第8回研究シンポジウム、2017/12/1、新潟大学(新潟市)
- (5) 石動駿樹, 八木誠也, 古川和広, 中馬吉郎, 脱リン酸化酵素 SCP アイソフォームの酵素特性解析、「ユビキタスグリーンケミカルエネルギー連携教育研究センタ

- ー」第8回研究シンポジウム、2017/12/1、新潟大学（新潟市）
- (6) Kaneko, K., Yamazaki, K., Yagi, S., Furukawa, K., Chuman, Y. Development of Specific Inhibitors for Oncogenic PPM1D Phosphatase Using Rigid-scaffold Structural Libraries. The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, 2017/11/19, Tohoku University (Sendai)
- (7) Yamazaki, K., Otsubo, K., Yoneda, T., Furukawa, K., Chuman, Y. Development of the Novel Substrate Identification Method for Scp1 Phosphatase Using Peptide Phage Library with AlF_4^- . The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, 2017/11/19, Tohoku University (Sendai)
- (8) Yagi, S., Furukawa, K., Chuman, Y. Development of Novel Substrate-trapping Mutants for Oncogenic Ser/Thr Protein Phosphatase PPM1D. The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, 2017/11/19, Tohoku University (Sendai)
- (9) Suzuki, F., Ogasawara, S., Furukawa, K., Sakaguchi, K., and Chuman, Y. Role of Ser/Thr Phosphatase PPM1D through the Down-regulation of TOP2A on Genome Instability, The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase. 2017/11/19, Tohoku University (Sendai)
- (10) 山崎一樹, 馬場勁典, 古川和広, 中馬吉郎, 立体制約型抗体模倣分子を用いたファージライブラリーの構築と応用、第58回新潟生化学懇話会、2017/6/24、新潟大学（新潟市）
- (11) 八木誠也, 古川和広, 中馬吉郎, 基質トラップ変異体を用いたがん関連ホスファターゼ PPM1D に対する新規基質同定法の開発、第58回新潟生化学懇話会、2017/6/24、新潟大学（新潟市）
- (12) 山崎一樹, 馬場勁典, 古川和広, 中馬吉郎, 立体制約型抗体模倣分子を用いたファージライブラリーの構築と応用、第58回新潟生化学懇話会、2017/6/24、新潟大学（新潟市）
- (13) Yagi, S., Furukawa, K., and Chuman, Y. Development of substrate-trapping mutant to identify the novel substrates of oncogenic protein phosphatase PPM1D. ユビキタスグリーンケミカルエネルギー連携教育研究センター第7回研究シンポジウム、2017/3/14、新潟大学（新潟市）
- (14) Otsubo, K., Kaneko, A., Yoneda, T., Furukawa, K., and Chuman, Y. Screening of binding molecules for Ser/Thr phosphatases from rigid structural libraries、The 12th International Conference on Protein Phosphatase, 2017/10/27, Kinki University (Osaka)
- (15) Yagi, S., Yoneda, T., Otsubo, K., Furukawa, K., and Chuman, Y. Characterization of enzymatic activity of FCP/SCP type ser/thr phosphatase family、第53回ペプチド討論会、2016/10/26、京都テルサ（京都）
- (16) 中馬吉郎, 酵素-基質複合体誘導による Ser/Thr ホスファターゼ基質同定法の開発と応用、第89回日本生化学会、2016/9/25-27、仙台国際センター（仙台）招待講演
- (17) 小笠原紗里, 中馬吉郎, 鎌田瑠偉, 坂口和靖, 精巢由来ヒト胚性癌細胞株の分化に対する Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D 阻害の効果、第89回日本生化学会、2016/9/25-27、仙台国際センター（仙台）
- (18) 大坪広大, 米田崇史, 古川和広, 中馬吉郎, リン酸化模倣ファージディスプレイによる Ser/Thr ホスファターゼ基質同定法の開発、第6回グリーンケミストリー研究会、2016/3/15、新潟大学（新潟市）
- (19) 中馬吉郎, 発癌関連ホスファターゼに対する新規基質同定法と阻害剤の開発、第22回ペプチドフォーラム、2016/3/5、金沢大学サテライトプラザ（金沢）招待講演
- (20) 大坪広大, 古川和広, 中馬吉郎, リン酸化ミミック分子による Ser/Thr プロテインホスファターゼ基質同定法の開発、第7回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2016/1/30、自然科学研究機構（岡崎市）
- (21) Otsubo, K., Furukawa, Y., Chuman, Y. Development of the novel substrate identification methodology for ser/thr phosphatases using phosphorylation mimic phage display library. 第52回ペプチド討論会、2015/11/16、平塚中央公民館（平塚市）
- 〔図書〕（計2件）
- (1) 八木 誠也, 金子 敦巳, 山崎 一樹, 吉田 拓弥, 中馬 吉郎, 発がん関連 Ser/Thr ホスファターゼに対する新規阻害剤と基質同定法の開発、*BIO Clinica*, 33(6), 90-92, (2018) ISBN: 17601-06
- (2) 金子 敦巳, 中馬 吉郎, 発がん関連 Ser/Thr ホスファターゼに対する新規阻害剤の開発、*BIO Clinica*, 33(1), 51-53, (2017) ISBN: 17601-01

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://chem.sc.niigata-u.ac.jp/~chuman/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中馬 吉郎 (CHUMAN Yoshiro)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40372263

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

東元 祐一郎 (Higashimoto Yuichiro)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40352124

(4)研究協力者

なし