

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290077

研究課題名(和文) 無細胞蛋白質アレイによる炎症カスパーゼ基質シグナル伝達分子の網羅的同定と解析

研究課題名(英文) Discovery of a novel caspase-1 substrate using a cell-free based protein array

研究代表者

澤崎 達也 (SAWASAKI, TATSUYA)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：50314969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：約1000種類のシグナル伝達タンパク質cDNAクローン[300種類のプロテインキナーゼ(PK)および700種類の1回膜貫通領域タンパク質(sTMP)]を用いて、N末端にFlagタグ、C末端にビオチン化した組換えタンパク質アレイ(NCタグタンパク質アレイ)を合成することに成功し、カスパーゼ1(CASP1)で切断される基質を探索した。その結果、1種類のタンパク質がCASP1で切断される基質として見出された。それらの切断部位を同定し、*in vitro*および細胞内で切断されることを明らかとした。さらに、C末側の切断断片が核内で安定に存在することが確認された。

研究成果の概要(英文)：We were successful to make a NC-tagged protein array consisting of about 1,000 kinds of signal transduction proteins from 300 protein kinases and 700 single transmembrane proteins, which these proteins were fused to N-terminally FLAG tag and C-terminally biotin ligation site to detect protein cleavage by AlphaScreen technology. We screened and found a protein cleaved by caspase-1 (CASP1) in the protein array. A single cleavage site in a protein was identified by alanine mutagenesis. The new protein was also cleaved in the cells that CASP1 was activated and the C-terminally cleaved fragment was located in the nucleus although the N-terminal fragment seemed to be degraded. These results suggest that this protein is a novel substrate protein for CASP1.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：カスパーゼ1 無細胞 タンパク質アレイ 基質探索 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

炎症は様々な疾患に関わる非常に重要な生物学的事象として知られ、そのステップは inflammasome (NALP, ASC, プロカスペイン 1) の形成に続き、システインプロテアーゼであるカスパーゼ 1 (CASP1) の活性化と、CASP1 によるインターロイキン 1 β (IL-1 β) や IL-18 の切断 (成熟化) である。CASP1 は炎症の中心的役割を担い、同種のプロテアーゼであるカスパーゼ 4 や 5 (CASP4, CASP5) をも活性化し、炎症誘導機構を惹起していると考えられている。CASP1 が IL-1 β や IL-18 以外にも、他の細胞内タンパク質、特に IL-1 β の様なシグナル伝達タンパク質分子を切断し、炎症を誘導している可能性は非常に高いと考えられているが、その全体像は未解明のままである。近年、そのような状況を打破するために、細胞内カスパーゼ基質の網羅的な同定に向けて、質量分析装置を用いたプロテオーム解析が精力的に行われているが、シグナル伝達経路に関するタンパク質は細胞内で微量であるため解析が容易ではなく、実際、精力的な試みにも関わらず、数種類のシグナル伝達分子が同定されたのみである。そのため、シグナル伝達経路関連タンパク質分子を対象とした新たな方法論が必要である。

2. 研究の目的

炎症は様々な疾患に関わる生物学的事象として知られ、その最初のステップはシステインプロテアーゼであるカスパーゼ 1 (CASP1) の活性化と、CASP1 によるインターロイキン 1 β (IL-1 β) の切断 (成熟化) である。CASP1 は、細胞内の基質タンパク質分子を切断することにより、炎症誘導機構を惹起していると考えられているが、上記の基質以外の基質タンパク質は不明のままである。本研究では、申請者が構築してきたプロテインキナーゼや 1 回膜貫通タンパク質を中心とした 1,000 種類からなるシグナル伝達経路プロテインアレイを用いて、CASP1 により切断される基質分子の網羅的な同定を行い、CASP1 により惹起される炎症誘導機構のシステムを明らかにする。同時に、本研究を通じて、プロテアーゼの基質同定に適したプロテインアレイの技術開発を行う。

3. 研究の方法

(1) CASP1 により切断されるシグナル伝達タンパク質 (sTMP および PK) の探索

申請者が 3 年間費やして構築した約 1000 種類のシグナル伝達タンパク質 cDNA クローンを用いて、組換えプロテインアレイを構築し、CASP1 で切断される分子のスクリーニングを行った。

(2) 見いだされた分子の切断部位同定

上記 I で合成したタンパク質分子は C 末端がビオチン化されている。また N 末端は Flag

タグが付加されている。そのため、切断断片を区別することができる。SDS-PAGE ゲル上の移動度により、切断断片のおおよそのサイズを予測した。また予測切断部位の変異体により最終的に切断部位を同定した。

(3) 細胞における新規シグナル伝達基質分子の切断解析

細胞レベルの解析は、HEK293T 細胞および老化モデル細胞を用いて行った。通常細胞の CASP1 の活性化にはリポ多糖添加により行った。発現確認は、定量的 PCR および抗体を用いて転写・タンパク質レベルで行った。

(4) 新規基質分子および切断断片の細胞内での安定性および局在の解析

同定されたシグナル伝達分子および切断断片の安定性および細胞内局在を確認した。これら解析により、切断断片の生理的意義を予測することができた。

4. 研究成果

(1)-1. sTMP および PK プロテインアレイの構築

申請者が 3 年間費やして構築した約 1000 種類のシグナル伝達タンパク質 cDNA クローン [300 種類のプロテインキナーゼ (PK) および 700 種類の 1 回膜貫通領域タンパク質 (sTMP)] を用いて、N 末端に Flag タグ、C 末端にビオチン化した組換えプロテインアレイ (NC タグプロテインアレイ) を合成することに成功し、超低温フリーザーに保存し常時利用可能な状態とした。

(1)-2. CASP1 により切断されるシグナル伝達タンパク質の検出

上記で作成した NC タグシグナル伝達プロテインアレイを用いて、コムギ無細胞系で合成・精製・活性化させた CASP1 で切断される分子のスクリーニングを行った。アルファスクリーン法により切断検出を行った。その結果、1 種類のタンパク質が CASP1 で切断される基質として見出された。

(2) 切断部位の同定

合成したタンパク質分子は N 末端が Flag、C 末端がビオチン化されている。そこでイムノブロットングにより切断断片を確認したところ、切断箇所が C 末側に位置し、1 箇所の可能性が示唆された。また、CASP1 はアスパラギン酸 (D) のカルボキシ基側を切断するため、D を探索したところ、切断断片のサイズから判断して、切断される可能性のあるアミノ酸配列を予測する事ができた。そこで、その D をアラニンに置換させた変異体を用いたところ、CASP1 による切断が確認されなかった。以上のことから、その部位を切断部位と判断した。

(3)-1. 炎症誘導細胞における新規分子の細胞内切断確認

上記で同定されたシグナル伝達基質分子

の cDNA を動物細胞発現用ベクターに組み込み、HEK293T に **CASP1** と共に遺伝子導入し、それぞれのタンパク質の発現を確認した。それらの細胞に、リポ多糖添加処理により、**CASP1** の活性化を誘導したところ、シグナル伝達基質分子の切断が確認された。これらの切断は、リポ多糖添加しない場合や、**CASP1** の活性化に必要なシステインをセリンに置換した変異体では確認できなかった。さらに、**CASP1** の阻害剤でも確認できなかった。そして、シグナル伝達基質分子の切断部位変異体においても切断が確認できなかった。以上から、新規に見出したシグナル伝達基質分子は細胞内においても **CASP1** により切断されることが確認された。

(3) -2. 老化により **CASP1** 恒常的に活性化される細胞における内在新規シグナル伝達基質分子の切断確認

老化細胞の中には、**CASP1** が活性化している細部株種が存在する。その老化細胞株を使い、内在の新規シグナル伝達基質分子が切断されるかどうか調べた。内在のタンパク質が市販抗体で検出されることを確認した。培養時間を長くすることにより **CASP1** の活性化が観察されるため、**CASP1** の既知基質である **IL-1 β** の切断を指標に **CASP1** の活性化の条件で解析したところ、内在の新規基質分子も切断されることがわかった。これらの切断は、**CASP1** の阻害剤では確認できなかった。以上のことから、過剰発現系ではなく、生理的条件下において、新規分子は **CASP1** により切断されることが分かった。

(4) 炎症誘導細胞における新規分子切断断片の細胞内局在の確認

上記で同定されたシグナル伝達分子の N 末端もしくは C 末側をそれぞれ区別できる抗体を市販抗体の中から選抜した。上記の老化細胞株を用いて切断断片を調べた結果、C 末側断片のみを確認することができた。このことは、N 末側の断片は切断後すぐ分解されるが、C 末側断片は安定に存在することが明らかとなった。また、その局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析したところ、切断後の C 末側断片は核内に存在することがわかった。このことは、C 末側断片が核内に何らかの生物学役割を担っている可能性を示唆している。現在、レンチウイルス系を用いて、新規分子の **CASP1** 切断 C 末側断片もしくは **CASP1** で切断できない変異体を恒常的に発現する安定細胞株の樹立を行い、細胞の分化等への影響を解析している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A, Jih PJ, Morishita R, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T,

Iwasaki T, Endo Y, Sawasaki T. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. **Sci Rep.** 5:11333 (2015) [査読有] doi: 10.1038/srep11333.

2. Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H, Fukazawa Y, Kii I, Nishiyama T, Kakita A, Takeda H, Takeuchi A, Arai Y, Ito A, Komura H, Hirao H, Satomura K, Inoue M, Muramatsu S, Matsui K, Tada M, Sato M, Saijo E, Shigemitsu Y, Sakai S, Umetsu Y, Goda N, Takino N, Takahashi H, Hagiwara M, Sawasaki T, Iwasaki G, Nakamura Y, Nabeshima Y, Teplow DB, Hoshi M. Na, K-ATPase $\alpha 3$ is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly. **Proc Natl Acad Sci USA** 112:E4465-74 (2015) [査読有] doi: 10.1073/pnas.1421182112.
3. Nemoto K, Takemori N, Seki M, Shinozaki K, Sawasaki T. Members of the Plant CRK-superfamily are Capable of trans-/auto-Phosphorylation of Tyrosine Residues. **J Biol Chem.** 290:16665-16677 (2015) [査読有] doi: 10.1074/jbc.M114.617274.
4. James SJ, Jiao H, Teh HY, Takahashi H, Png CW, Phoon MC, Suzuki Y, Sawasaki T, Xiao H, Chow VT, Yamamoto N, Reynolds JM, Flavell RA, Dong C, Zhang Y. MAPK Phosphatase 5 Expression Induced by Influenza and Other RNA Virus Infection Negatively Regulates IRF3 Activation and Type I Interferon Response. **Cell Rep.** 10:1722-1734 (2015) [査読有] doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.030.
5. Shimizu K, Uematsu A, Imai Y, Sawasaki T. Pctaire1/Cdk16 promotes skeletal myogenesis by inducing myoblast migration and fusion. **FEBS Lett.** 588:3030-3037 (2014) [査読有] doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.060.
6. Fu SC, Imai K, Sawasaki T, Tomii K. ScreenCap3: improving prediction of caspase-3 cleavage sites using experimentally verified non-cleavage sites. **Proteomics.** 14:2042-2046 (2014) [査読有] doi: 10.1002/pmic.201400002.
7. Shimizu K, Sawasaki T. Nek5, a novel substrate for caspase-3, promotes skeletal muscle differentiation by up-regulating caspase activity. **FEBS Lett.** 587:2219-2225 (2013) [査読有] doi: 10.1371/journal.pone.0042721.

[学会発表] (計 110 件)

- ① 澤崎達也、宮城 洋平、ヒト無細胞プロテインアレイを用いた乳がん特異的自己抗体バイオマーカーの探索、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場

- ② 澤崎達也、コムギ無細胞系を用いたキナーゼ基質の探索技術、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24日～26日、あわぎんホール（徳島県徳島市）
- ③ 澤崎 達也、無細胞ヒトプロテインアレイを用いたタンパク質ワイド相互作用解析技術、2015年6月8日、公益財団法人がん研究会臨床研究セミナー、吉田富三記念講堂（東京都江東区）
- ④ 澤崎達也、Wheat cell-free system for drug discovery platform、神戸大学WINTech2015、2015年3月12日、神戸大学連携創造本部・応用構造科学産学連携推進センター（兵庫県神戸市）
- ⑤ 澤崎達也、タンパク質合成技術開発の現状と展望、第74回産研テクノサロン、2015年2月6日、大阪大学産業科学研究所（大阪府吹田市）
- ⑥ 澤崎達也、コムギ無細胞系を基盤としたタンパク質修飾解析技術、平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム開催”新学術領域研究がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動”、2015年1月27日～28日、一橋講堂（東京都千代田区）澤崎 達也、コムギ無細胞 HTS を用いた創薬基盤技術、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日～18日、京都国際会議場（京都府京都市）
- ⑦ 澤崎 達也、無細胞技術を基盤とした自己抗体探索によるアンチエイジング医学のブレークスルーをめざして、第14回 日本抗加齢医学会総会、2014年6月6日～8日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
- ⑧ 澤崎 達也、GPCR 研究のためのコムギ無細胞系プロテオリポソーム技術、第11回 GPCR 研究会、2014年5月9日～10日、日本科学未来館 みらいCANホール（東京都江東区）
- ⑨ 澤崎 達也、竹田 浩之、創薬等プラットフォームにおけるコムギ無細胞基盤膜蛋白質生産と高親和膜蛋白質抗体作成技術、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日～14日、とりぎん文化会館（鳥取県鳥取市）
- ⑩ 澤崎 達也、コムギ無細胞蛋白質合成技術と乳がんバイオマーカー探索、日本プロテオーム学会サテライトジョイントシンポジウム、2013年6月7日、愛媛大学総合情報メディアセンター・メディアホール（愛媛県松山市）

○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://http://www.pros.ehime-u.ac.jp/ce11-free/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤崎 達也 (SAWASAKI, Tatsuya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：50314969

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕