

平成22年 5月14日現在

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19208011
 研究課題名(和文) トウトマイセチンを鍵としたリン酸化タンパク質の意義選択的プロテオミクスとその応用
 研究課題名(英文) Focused proteomics of phosphorylated proteins using tautomycetin and its application
 研究代表者
 生方 信 (UBUKATA MAKOTO)
 北海道大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：60168739

研究成果の概要(和文): トウトマイセチンを鍵とした意義選択的プロテオミクスを行ってきた。プロテインホスファターゼ1型(PP1)は、細胞内に於いて限定的な調節酵素としての役割を演じていることが分かってきた。例えば、Raf を正に制御するだけでなく、TNF α /NF- κ B を正に制御している。また、PP1 の基質かつ ATM/ATR キナーゼの基質と考えられる ATM30 を発見した。精製後、MALDI-TOF/MS により ATM30 はリボソーマルタンパク質 RPS3A(a)であることが判明した。

研究成果の概要(英文): We have conducted focused proteomics of phosphorylated proteins by using tautomycetin. Protein phosphatase 1 (PP1) was found to act as a kind of regulatory enzyme for signal transduction in mammalian cells. For example, it positively regulates TNF α /NF- κ B pathway as well as Raf. In addition, we isolated ATM30, a substrate of both PP1 and ATM/ATR kinase. ATM30 was found to be a ribosomal protein RPS3A(a) by MALDI-TOF/MS analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	21,400,000	6,420,000	27,820,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：PP1, TNF α , NF- κ B, IKK, RPS3a

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化を触媒するプロテインキナーゼ、およびタンパク質の脱リン酸化を触媒するプロテインホスファターゼの遺伝子数は、凡そ2000個および500個と推定されている。タンパク質のリン酸化が関わる

細胞内情報伝達において、プロテインキナーゼ並びにプロテインホスファターゼは重要な標的となっている。ところが、プロテインキナーゼの機能解析と比較して、プロテインホスファターゼの研究は大きく遅れていた。そのような中で、我々はトウトマイセチン

(TC)が唯一のプロテインホスファターゼ1型(PP1)特異的阻害剤であることを見いだした。さらに TC 及び PP2A 特異的阻害剤オカダ酸(OA)を用いて、細胞内の PP1 および PP2A をそれぞれ選択的に阻害して、両酵素の役割を明確に区別して調べていけること、また PP1 が Raf-1 を正に調節している事を明らかにしていた。

2. 研究の目的

そこで、TC を用いて、主要なセリン・スレオニンプロテインホスファターゼである PP1 の関与する細胞内リン酸化基質の意義選択的な同定と網羅的解析を行い、癌および免疫系をはじめとする生命科学分野に画期的な展開をもたらす、さらには TC 誘導体の臨床薬剤としての応用も視野に入れた研究を行う事を企画した。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、従来の生化学的手法に加え、TC 及び OA、二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE 法)、LC-MS/MS 等の新技術を組み合わせて細胞レベルでのタンパク質のリン酸化を網羅的にしらべる。

(2) 有力と思われるタンパク質を絞って免疫沈降、イムノブロットング、超遠心法、各種クロマトグラフィーなどを用いて分離・精製していくことで Focus した後の基質を確実に同定する。

(3) TC 存在化、非存在化で増殖因子などの刺激応答により、活性化あるいは不活性化したタンパク質を同定することで生理的意義を明らかにする。

(4) さらに時間や細胞種を変えながら PP1 の基質を同定、生理的意義を明らかにする。

(5) 得られた結果から TC の制癌剤としての可能性が示されたなら、誘導体を含めた合成研究を開始する。

4. 研究成果

(1) まず、TC (又は OA) 処理なし、及び TC (又は OA) 処理した HeLa 細胞よりそれぞれ調製したタンパク質を蛍光色素(Cy3: 緑色蛍光, Cy5: 赤色蛍光)で各々標識し、重ね合わせた 2D-DIGE ゲルイメージのマップを 2D Typhoon イメージアナライザーで解析した。結果、TC 処理により 655 スポット、OA 処理により 1072 スポットのタンパク質が検出された。TC 処理では、12 個のタンパク質スポットが増加し、3 個のスポットが減少した。中でも、同一の分子量を持つスポット番号 785 のタンパク質量が減少し、PI 値の低

いスポット番号 701 のタンパク質量が増加し、一対のスポットとして現れおり、有力な PP1 の基質と考えられた。しかしながら、OA 処理では、閾値を上げて 30 個のタンパク質量が増加、22 個のタンパク質量が減少し、増減がはっきりしたスポットが数多く観測された。リン酸化タンパク質アフィニティークラムにより部分精製した、TC 処理のリン酸化タンパク質では、15 個のスポットが増加し、7 個のスポットが減少した。増加した 15 個のスポットは PP1 の基質候補と関連があると考えられた。しかしながら、上記スポット番号 785, 781 を初めとした、これらのスポットは銀染色では検出できず、同定には至らなかったが、一連の実験から PP2A の基質と比べて PP1 の基質は限定されていることが示唆された。

(2) そこで、キナーゼの基質に絞って TC 処理により増加するタンパク質を追求することとした。各種キナーゼの基質と考えられるタンパク質のうち、DNA 二重鎖切断に伴う細胞周期チェックポイントやアポトーシスを制御する核タンパク質キナーゼである ATM/ATR キナーゼに着目し、TC 処理した HEK 293T 細胞の細胞抽出液に、TC 処理により顕著に増加し、ATM/ATR リン酸化基質抗体に反応する約 30 kDa のタンパク質 ATMP30 を見いだした。イオン交換クロマトグラフィー次いでゲルから精製されたバンドを切り離し、トリプシン消化し MALDI-TOF/MS で分析した。その結果、ATM30 は RPS3A(a)であることが判明した。Flag タグとの RPS3a 融合タンパク質の動物細胞での過剰発現を試みたが、可溶性タンパク質としての過剰発現は検出できなかった。現在、リン酸化部位の同定を行っている。

(3) 既に我々は、TC を用いることで、PP1 が Raf を介して、上皮成長因子(EGF)刺激によるマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(Ras/Raf/MAPK)経路を正に調節していることを初めて明らかにしていた。TC による阻害作用は選択的であり、細胞増殖抑制効果として現れる。腫瘍プロモーターとして知られる PP2A 特異的阻害剤 OA とは対照的な応答が見られた。そこで、もう一つの主要な細胞内シグナル伝達系である TNF α /NF- κ B 経路に対する TC の効果を調べた。

293-T 細胞を用いたレポーターアッセイに於いて、TC は 5 μ M の濃度で、TNF α で誘導される NF- κ B の活性化を完全に阻害することが分かった。しかしながら、TNF α で誘導されるカスパーゼの活性化に対しては何ら影響を与えなかった。

次に、TC は TNF α で誘導される I κ B α のリン酸化を抑制するが、JNK の活性化を抑制

しないことが判明した。対照的に OA は、I κ B の分解と JNK の過剰リン酸化を誘導し、PP2A が NF- κ B と JNK の負の制御因子であることを確認した。

I κ B α は、IKK よりリン酸化されるので、TNF α 刺激による IKK の活性化に与える影響を、TC を用いて調べた。その結果、TNF α 刺激後 5-10 分で IKK の活性はピークに達するが、TC により、この活性化は完全に抑制された。

293-T 細胞を TNF α で刺激すると、10 分後に IKK α 及び IKK β の T-ループに於けるリン酸化部位がリン酸化されるが、TC は、このリン酸化をほぼ完全に阻害する。しかしながら、IKK α の T-ループ以外のリン酸化部位 Thr-23 のリン酸化レベルには影響を与えなかった。これらの結果は、TC が IKK α 及び IKK β の T-ループのリン酸化を阻害することにより IKK の活性化を負に制御することを示唆している。

以上の実験により、PP1 が IKK を正に制御していることが明らかになった。この正の制御がどのようなものであるかを知るため、Flag-IKK α 又は Flag-IKK β を Myc-PP1C と共に 293-T 細胞にトランスフェクションさせ、抗 Flag 抗体、あるいは抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を試みた。その結果、過剰発現した Myc-PP1C は Flag-IKK α 又は Flag-IKK β と相互作用することを見いだした。さらに抗 IKK α 抗体を用いて内因性の PP1C が IKK β および IKK γ と共沈することを見いだした。これらの結果は、PP1C が細胞で IKK 複合体と物理的に相互作用することを示唆している。

(4) 上記の事実は、細胞種を変えても観察され普遍性があることが示唆された。

次に、時間軸を考慮した、PP1 の細胞内挙動に関して、興味深い事実が明らかになった。TNF α が受容体に結合すると、その受容体コンプレックスに RIP, TAK1, IKK 複合体などのシグナルタンパク質が短時間のうちに動員されてくることが分かっている。PP1C もまた受容体コンプレックスに動員されるかどうかを確かめるため、293-T 細胞を GST-TNF α で刺激し、グルタチオンセファロースを用いて TNFR1 複合体を単離した。その結果、他のシグナルタンパク質と同調して PP1C も動員されることが明らかになった。興味深いことに、刺激後 IKK の活性がピークとなる 10 分が、PP1C を含むシグナルタンパク質動員のピークとなることも判明した。そして 60 分ほどかけてこれらのシグナルタンパク質が脱離していく様子も捉えることに成功した。

一方、TC 処理により、1 時間以内に RPS3A(a)はリン酸化されミトコンドリア、

ポリリボソーム、リボソームサブユニット、そして選択的に核に移行することが示唆された。我々の見いだしたもう一つの PP1 の基質である PP1 そのものの細胞内挙動も類似しているが、核への移行に選択性はないようである。

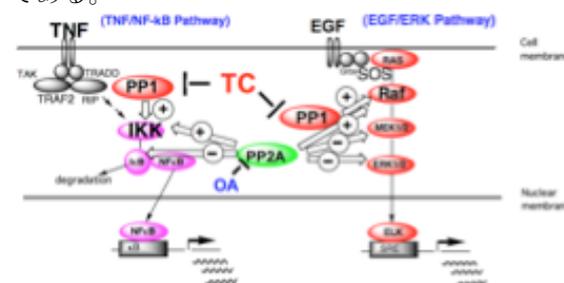


図. TC による増殖シグナル遮断機構

(5) 以上、TC は増殖シグナルを重層的に遮断できる可能性を持った優れた制癌剤になる可能性がでてきた。

そこで、本化合物の合成研究を開始した。本研究では、C1-10、C11-18、C1'-7' の大きく三つのセグメントに分割して合成することとし、各セグメントの合成におおむね成功した。

C1'-7' セグメントは、dimethyl acetylenedicarboxylate を出発物質とし、5 段階の反応を行うことでその前駆体を合成した。C11-18 セグメントは、さらに C12-15 及び C16-18 セグメントに分割し、それぞれ methyl (S)-(+)-3-hydroxy- isobutylate 並びに methyl angelate を出発物質として合成を行った。16 位、17 位の不斉点の導入には香月-Sharpless 不斉エポキシ化を用い、その後は DIPEA 存在下、TBSOTf などのルイス酸を用いた分子内水素転位反応を行うことにより目的物質を合成した。C1-10 セグメントも、さらに二つのセグメント (C1-5, C6-10) に分割し、C1-5 セグメントは既知法により、C6-10 セグメントは、より短段階での合成を行った。

現在、収率の改善を含み、より実際的な合成を検討中である。

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 17 件) 全て査読有

- ① K. Shigetomi, M. Ubukata 他 2 名 (4 番目), The antibacterial properties of 6-tuliposide B. synthesis of 6-tuliposide B analogues and structure-activity relationship, *Photochemistry*, 71, 2010, 312-324.
- ② Y. Kato, M. Ubukata 他 5 名 (3 番目), Purification and characterization of

- tuliposide-converting enzyme from the bulbs of *Tulipa generiana*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2009, 1895-1897.
- ③ K. Shigetomi, M. Ubukata 他 2 名 (4 番目), First total synthesis of tuliposide B, *Tetrahedron Asymmetry*, **19**, 2008, 1444-1449.
- ④ D. I. Batovska, M. Ubukata 他 4 名 (6 番目), Hydroxamic acid derivatives of mycophenolic acid inhibit histone deacetylase in cellular level, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2008, 2623-2631.
- ⑤ S. Mitsuhashi, M. Ubukata 他 5 名 (7 番目), Tautomycetin suppresses the TNF α /NF- κ B pathway via inhibition of IKK activation, *Int. J. Oncol.*, **33**, 2008, 1027-1035.
- ⑥ S. Mitsuhashi, M. Ubukata 他 3 名 (5 番目), Pyrogallol structure in polyphenol is involved in apoptosis-induction on HEK293T and K562 cells, *Molecules*, **13**, 2008, 2998-3006.
- ⑦ M. Ubukata, 他 9 名 (1 番目), Mycophenolic acid as a latent agonist of PPAR γ , *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2007, 4746-4770.
- ⑧ S. Mitsuhashi, M. Ubukata 他 3 名 (5 番目), Low molecular lignin suppresses activation of NF- κ B and HIV-1 promoter, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 2007, 2645-2650.

[学会発表] (計 4 1 件)

- ① 重富 顕吾、佐藤 文彦、生方 信、Tautomycetin の合成研究 (2)、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010. 3. 29 (東京)
- ② Y. Li, S. Mitsuhashi, M. Ubukata, Study on the novel substrate of protein phosphatase type 1 using tautomycetin, 日本農芸化学会 2010 年度大会、2010. 3. 29 (東京)
- ③ 佐藤 文彦、大本 笑子、生方 信、トウトマイセチンの合成研究、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009. 3. 28 (福岡)
- ④ 三橋 進也、岡田 只士、島 礼、菊池 九二三、生方 信、生理活性物質トウトマイセチンを使った PP1 の役割と機能解析 1. 日本農芸化学会 2009 年度大会、2009. 3. 28 (福岡)
- ⑤ M. Ubukata, Tautomycetin, a specific PP1 inhibitor suppresses the TNF α /NF- κ B pathway via inhibition of IKK activation, BIT Life Sciences' 2nd Annual Cancer World Cancer Congress 2009, 2009. 6. 22., Beijing, China.

- ⑥ Y. Li, S. Mitsuhashi, M. Ubukata, Usage of tautomycetin reveals that protein serine/threonine phosphatase 1 positively regulates NF- κ B signaling. 日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年度大会、2008. 3. 27 (名古屋)
- ⑦ Y. Li, S. Mitsuhashi, M. Ubukata, Analysis of the role of protein phosphatase type 1 in TNF α /NF- κ B pathway by using tautomycetin, 平成 19 年度第一回学術講演会、2007. 7. 28 (札幌)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: メイラード反応抑制剤
 発明者: 生方 信、永松 龍一郎、三橋 進也
 権利者: 国立大学法人北海道大学
 種類: 特願
 番号: 2010-038455
 出願年月日: 平成 22 年 2 月 24 日
 国内外の別: 国内

○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:

[その他]

ホームページ
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/bioorg/woodchem/>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 生方 信 (UBUKATA MAKOTO)
 北海道大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号: 60168739
- (2) 研究分担者
 なし ()
 研究者番号:
- (3) 連携研究者
 三橋 進也 (MITSUHASHI SHINYA)
 北海道大学・大学院農学研究院・学術研究員
 研究者番号: 60526672
- (4) 研究協力者
 重富 顕吾 (SHIGETOMI KENNGO)
 北海道大学・大学院農学研究院・学術研究員
 研究者番号: 20547202