

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510191

研究課題名（和文）放射性 ATP および LC-Maldi-MS/MS を用いた簡便なキナーゼ基質の同定

研究課題名（英文）Identification of kinase substrates by using radioactive ATP and LC-Maldi-MS/MS

研究代表者

入江 厚（IRIE ATSUSHI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：30250343

研究成果の概要（和文）：PKD ファミリーキナーゼのうち、T 細胞に発現する主要なサブタイプである PKD2 の基質の 1 つは、PP2A の阻害剤として知られる SET タンパク質であり、その PKD2 によるリン酸化部位の 1 つは 171 番めのセリン残基（Ser171）を同定した。Ser171 がリン酸化されることにより、PP2A に対する SET の阻害効果が低下した。Jurkat 細胞にて PKD2 の発現をノックダウンすると、TCR 刺激による PP2A の活性上昇が抑制された。

研究成果の概要（英文）：PKD2 is a major subtype of the PKD family kinases expressed in T cells. We found that one of the substrates of PKD2 is SET protein, a natural inhibitor of PP2A phosphatase. One of the phosphorylation site in SET protein by PKD2 is revealed to be Ser171 and the phosphorylation compromised the inhibitory effect of SET protein to PP2A. In addition, knockdown of PKD2 expression in Jurkat cells suppressed up-regulation of PP2A activity after TCR stimulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：応用ゲノム科学

キーワード：プロテオーム、シグナル伝達、質量分析、放射性同位元素、免疫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

代表者らは、その認識する抗原が明らかなヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞クローンを用いて、種々のアナログ抗原ペプチド-MHC 複合体分子の刺激による T 細胞応答を細かく調べたところ、この T 細胞の抗原ペプチドのたった 1 つのアミノ酸残基を他に置換したアナログペプチドを、

抗原提示細胞の細胞表面に過剰に発現させて T 細胞と反応させると、抗原ペプチドに対するのと同程度の強い増殖応答が誘導されるにも関わらず、チロシンリン酸化のカスケードがほとんど見られないユニークな T 細胞応答が誘導されることを初めて見出した。このような T 細胞のアナログ抗原に対する交差反応

は、本来免疫寛容が成立しているはずの自己成分に対して免疫応答が惹起され、自己免疫疾患などの原因となると考えられている。

このアナログペプチドの刺激により活性化分子を探索したところ、現在までにタンパク質セリン・スレオニンリン酸化酵素である PKD2 と B-Raf が活性化されることを見出した。PKD2 や B-Raf は、これまで T 細胞にはその存在が知られておらず、またその基質もまだ決定されていない。また、アナログ抗原の刺激で活性化される T 細胞の、細胞内情報伝達経路の解析もほとんどなされていないものであった。そこで代表者は、PKD2 の基質分子を同定し、その T 細胞活性化における役割を同定し、自己免疫疾患の予防・治療法の開発に貢献しようと考えた。

## 2. 研究の目的

放射性アデノシン三リン酸 (ATP) とプロテオミクス的手法を併用して、PKD2 の基質を簡便に同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) PKD2 を放射性 ATP を含む反応液中で、細胞の可溶化物と反応させて、二次元ゲル電気泳動を行ない、(2) 全タンパク質を染色した後、ゲルを X 線フィルムにあてて、放射能の持つタンパク質スポットを切り出し、酵素消化・脱塩後、高感度質量分析計を用いて当該タンパク質を同定する。さらに同定した基質タンパク質を、大腸菌による発現システムを用いて調製し、これを、当該キナーゼと放射性 ATP により標識して酵素消化する。これを、(3) Maldi プレートスポットターを接続したナノ LC にかけて、各ペプチド断片を分離するとともに Maldi プレートにスポットする。(4) この Maldi プレートは、X 線フィルムにあてて、どのスポットに放射能があるかを特定する。(5) Maldi-TOF/TOF 型質量分析計にかけて、放射能の認められたスポットを特に重点

的に解析し、ペプチドのリン酸化部位の同定を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) PKD2 の基質の同定

Jurkat 細胞 (ヒト白血病 T 細胞株) への遺伝子導入により、常時活性化型 PKD2 (CA-PKD2) を発現する細胞を作製し、この細胞を可溶化して抗 PKD2 抗体にて免疫沈降して、活性化型 PKD2 を得た。これを用いて、放射性  $^{32}\text{P}$ -ATP 存在下で Jurkat 細胞の核抽出物を処理して二次元電気泳動を行ったところ、PKD2 の活性に特異的な放射能を示すタンパク質スポットが観察された (図 1)。並行して行った、活性化型 PKD2 と非放射性 ATP で処理した Jurkat 細胞核抽出物の二次元電気泳動ゲルから、当該タンパク質スポットを切り出し、常法に従って質量分析を行ったところ、SET タンパク質、nucleophosmin、hnRNP などが同定された。

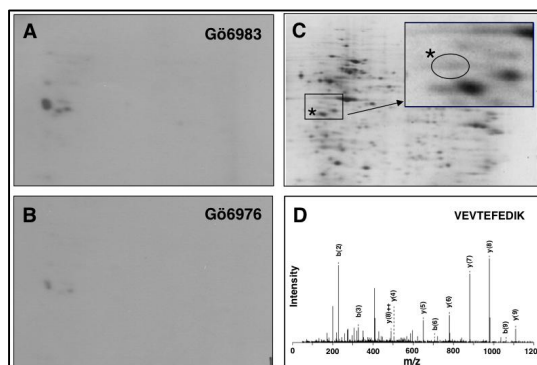
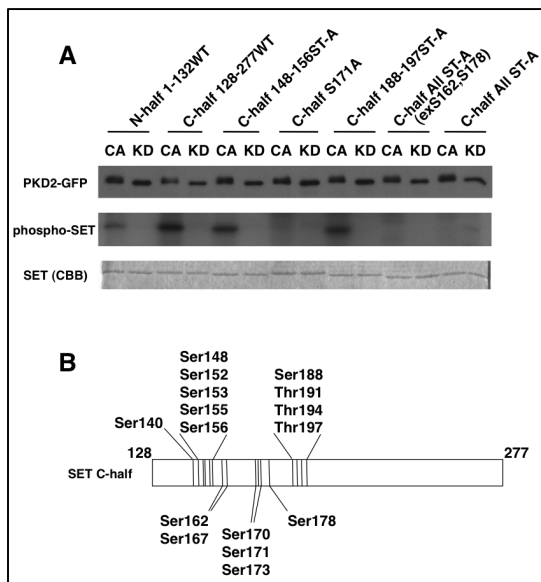


図 1 Jurkat 細胞核抽出物の PKD2 により特異的にリン酸化されるタンパク質。(A) 活性化型 PKD2 を Jurkat 核抽出物、 $^{32}\text{P}$ -ATP、G66983 (PKC 阻害で PKD2 は阻害しない) 存在下インキュベート後二次元電気泳動し、X 線フィルムにて放射能を検出した。(B) 活性化型 PKD2 を核抽出物、 $^{32}\text{P}$ -ATP、G66976 (PKD2 阻害剤) 存在下インキュベート後 (A) と同様に放射能を検出した。(C) 活性化 PKD2 を核抽出物、非放射性 ATP 存在下インキュベート後、二次元電気泳動後 syproruby にて染色した。(A) の放射能位置と一致する (C) のスポットを質量分析した。(D) (C) の \* 印部分は質量分析により SET タンパク質と同定された。

### (2) PKD2 による SET タンパク質のリン酸化

## 部位の同定

SETタンパク質のPKD2によるリン酸化部位を調べるため、N末端SETタンパク質(アミノ酸残基1-132)とC末端SETタンパク質(アミノ酸残基128-277)のリコンビナントタンパク質を作成し、 $^{32}\text{P}$ -ATPを用いたPKD2キナーゼアッセイを行ったところ、図2に示すようにC末端部に強いリン酸化が起こることが分かった。PKD2はキナーゼであることから、次に、C末端SETタンパク質のセリン/スレオニン残基をアラニンに置換した種々のリコンビナント変異型SETタンパク質を作製した(図2)。これら変異型SETを基質としてPKD2によるキナーゼアッセイを行ったところ、SETの171番目のセリン残基(Ser171)がPKD2



のリン酸化部位の1つであることが判明した(図2A)。

図2 SETタンパク質のPKD2によるリン酸化部位の同定 (A)示したSET変異タンパク質は免疫沈降した常時活性型PKD2-GFP(CA)または不活性型PKD2-GFP(KD)存在下 $^{32}\text{P}$ -ATPと処理した。上段パネルはanti-GFP抗体で検出した免疫沈降PKD2-GFPを示す。中段パネルはリン酸化されたSETを放射能で検出した。下段パネルはCBBで染色したSETタンパク質を示す。(B)C末端SETタンパク質(128-277)に存在するSer/Thr残基の位置を示す。

## (3) SETのSer171のリン酸化のPP2Aに体する効果の検討

SETはPP2Aホスファターゼ阻害剤である。SETタンパク質のSer171のリン酸化がこの活性阻害に及ぼす効果を調べるため、Ser171をグルタミンに置換したSET-S171E(疑似リン酸化体)とアラニンに置換したSET-S171A(非リン酸化体)、および野生型SETの3種のリコンビナントタンパク質を調製し、それらのPP2A活性の阻害能を比較した(図3)。その結果、SET-S171EはSET-S171Aおよび野生型SETに比べ、阻害能が低下することが明らかとなった。このことは、SETのリン酸化を介してPKD2がPP2Aの活性を調節している可能性を示唆するものと考えられた。

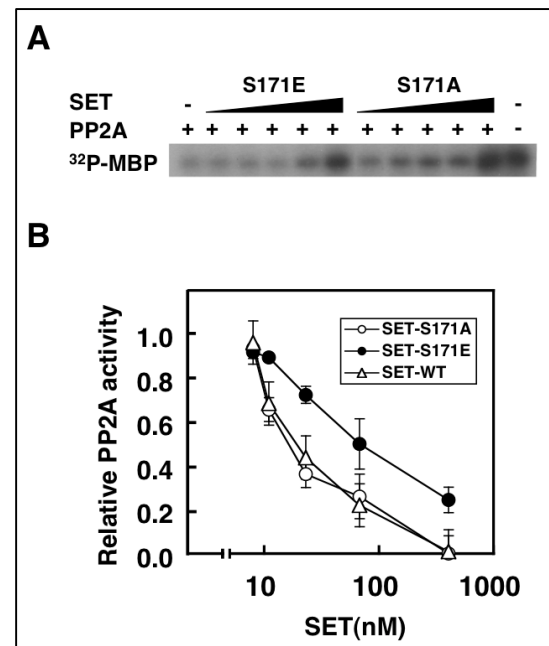


図3疑似リン酸化SET(S171E)は、野生型SETや非リン酸化体(S171A)と比較して、PP2A阻害能が低下する。

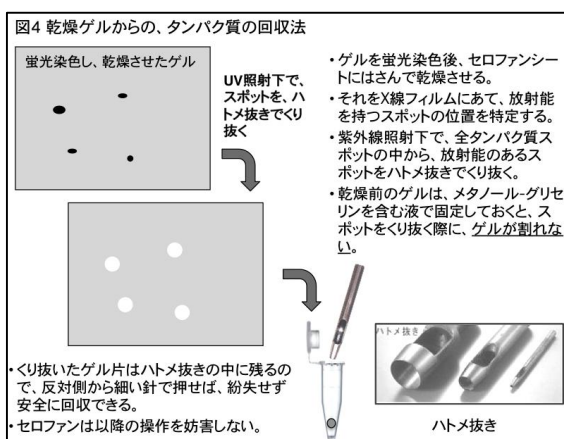
PP2Aによる $^{32}\text{P}$ -MBPの脱リン酸化反応に体するSET-S171EとSET-S171Aリコンビナントタンパク質の阻害効果を、(A)ゲル電気泳動、および(B)MBPの残存放射能比で比較した。

## (4) 乾燥ゲルからの放射性タンパク質スポットの回収法の検討

放射性スポットの位置を正確にX線フィルム上にトレースするためには、ゲルを乾燥

させる必要がある。しかし乾いたゲルの切断により、ひび割れやゲル片の飛散などの問題が生じる場合が多くみられた。そこで二次元電気泳動ゲルを蛍光染色後、メタノール/グリセリンを含む液でゲルを固定して、セロファン紙に挟んで乾かし、スポットはハトメ抜きでくり抜くことにより、簡便、正確、安全にゲル片を切り出せ、残存するセロファン片は以下の操作を妨害しないことを確認した。

図4 安全で正確なゲル片の回収法の検討



以上、放射性 ATP と二次元電気泳動法/質量分析を用いた、簡便な PKD2 の基質同定法の手技が樹立できた。今後は、従来法を用いて同定できた基質 (SET タンパク質) や、そのリン酸化部位の同定を、本手技で可能かどうか検証する予定である。新たに生じた問題として、下限数量以下とはいえ、放射性物質が質量分析計に導入された後、排気ポンプを経て確実に屋外の大気中に放出されるように留意する必要性が指摘された。今後、真空ポンプの排気系について検討を要するところである。

##### 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 15 件)

① Ohbayashi T, Irie A, Murakami Y, Nowak M, Potempa J, Nishimura Y, Shinohara M, Imamura T: Degradation of

fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, 157, 786-792, 2011 (査読有り)

② Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tomita Y, Tsunoda T, Nakagawa H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y: Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumor-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. **Brit. J. Cancer**, 104, 300-307, 2011 (査読有り)

③ Tomita Y, Harao M, Senju S, Imai K, Hirata S, Irie A, Inoue M, Hayashida Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Mori T, Nomori H, Kohroggi H, and Nishimura Y: Peptides derived from human insulin-like growth factor (IGF)-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. **Cancer Science**, 102, 71-78, 2011 (査読有り)

④ Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, Harao M, Imai K, Tomita Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Ito T, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y: Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. **Int. J. Cancer**, 127, 1393-1403, 2010 (査読有り)

⑤ Chen YZ, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y: Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. **Int J Immunopathol Pharmacol.**, 23: 165-177, 2010 (査読有り)

⑥ Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi

- K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y: The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *Int. J. Cancer*, 126: 2153-2163, 2010 (査読有り)
- ⑦ Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H, Nishimura Y: An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2rg<sup>nu11</sup> (NOG) mice. *Immunol. Lett.*, 126: 67-72, 2010 (査読有り)
- ⑧ Nishiura H, Nonaka H, Revollo IS, Semba U, Li Y, Ota Y, Irie A, Harada K, Kehrl JH, Yamamoto T: Pro- and anti-apoptotic dual functions of the C5a receptor: involvement of regulator of G protein signaling 3 and extracellular signal-regulated kinase. *Lab. Invest.*, 89:676-694, 2009 (査読有り)
- ⑨ Ikuta Y, Hayashida Y, Hirata S, Irie A, Senju S, Kubo T, Nakatsura T, Monji M, Sasaki Y, Baba H, Nishimura Y: Identification of the H2-Kd-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci.*, 100: 132-137, 2009 (査読有り)
- ⑩ Kobayashi D, Kumagai J, Morikawa T, Wilson-Morifuji M, Wilson A, Irie A, Araki N: An integrated approach of differential mass spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival. *Mol. Cell Proteomics*, 8: 2350-2367, 2009 (査読有り)
- ⑪ Nitta H, Imamura T, Wada Y, Irie A, Kobayashi H, Okamoto K, Baba H: Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*. *J. Immunol.*, 181: 3602-3608, 2008 (査読有り)
- ⑫ Harao M, Hirata S, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Komori H, Ikuta Y, Yokomine K, Imai K, Inoue M, Harada K, Mori T, Tsunoda T, Nakatsuru S, Daigo Y, Nomori H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y: HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int. J. Cancer*, 123: 2616-2625, 2008 (査読有り)
- ⑬ Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tsunoda T, Nakatsuru S, Nakagawa H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y: Identification of a novel tumor-associated antigen, cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.*, 14: 6487-6495, 2008 (査読有り)
- ⑭ Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson-Morifuji M, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, Araki N: NF1 tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, collapsin response mediator protein-2. *J. Biol. Chem.*, 283: 9399-9413, 2008 (査読有り)
- ⑮ Tsukamoto H, Irie A, Senju S, Hatzopoulos AK, Wojnowski L, Nishimura Y: B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol.*, 38: 518-527, 2008 (査読有り)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① A. Irie, K. Harada, N. Araki, Y. Nishimura  
Protein kinase D2 regulates protein phosphatase 2A (PP2A) activity through phosphorylation of Ser171 of a PP2A inhibitor, SET, in human T

- cells.  
14th International Congress of Immunology, (神戸、神戸国際会議場、神戸ポートピアホテル) 2010年8月23~27日
- ② Chen YZ, Liu G, Senju S, Qidi W, Irie A, Haruta M, Matsui M Nishimura Y  
Identification of HLA-A24-restricted CTL epitopes of SARS-CoV protein.  
第39回日本免疫学会総会 (大阪、大阪国際会議場) 2009年12月2~4日
- ③ Irie A, Harada K, Nishimura Y  
Protein kinase D2 regulates protein phosphatase 2A (PP2A) activity through phosphorylation of Ser171 of a PP2A inhibitor, SET, in human T cells.  
第39回日本免疫学会総会 (大阪、大阪国際会議場) 2009年12月2~4日
- ④ 入江 厚、原田久美子、西村泰治  
プロテインキナーゼ D2 による SET のリン酸化を介した PP2A の活性制御  
第4回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 (熊本、熊本大学) 2009年11月13~14日
- ⑤ 林田裕希、生田義明、平田真哉、入江 厚、千住 覚、横峰和典、池田徳典、井上光弘、中面哲也、片桐豊雅、古川洋一、角田卓也、馬場秀夫、中村祐輔、佐々木裕、西村泰治  
ヒト diffuse-type 胃癌に高発現する SPARC を標的としたマウス癌免疫療法モデルの構築  
第13回日本がん免疫学会 (小倉、北九州国際会議場) 2009年6月24~25日
- ⑥ 富田雄介、今井克憲、入江 厚、池田徳典、平田真哉、原尾美智子、井上光弘、角田卓也、森 毅、千住 覚、中村祐輔、伊藤隆明、野守裕明、興梠博次、西村泰治  
肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原、CDC45L の同定  
第13回日本がん免疫学会 (小倉、北九州国際会議場) 2009年6月24~25日
- ⑦ 澤 智裕、藤井重元、入江 厚、岡本竜哉、居原 秀、本橋ほづみ、山本雅之、赤池孝章  
S-Guanylation proteomics: unique post-translational modification of thiols dependent on nitric oxide and reactive oxygen species.  
第9回日本 NO 学会学術集会 (静岡、グランシップ) 2009年5月8~9日
- ⑧ 入江 厚、原田久美子、荒木令江、西村泰治  
PKD2 による SET-Ser171 のリン酸化は PP2A ホスファターゼ活性を制御する  
第38回日本免疫学会総会 (京都、京都国際会館) 2008年12月1~3日
- ⑨ Sawa T, Fujii S, Irie A, Okamoto T, Kobayashi A, Yamamoto M, and Akaike T.  
NO dependent modification of Keap1 thiol by nitrated nucleotide, 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate.  
第67回日本癌学会総会 (名古屋、名古屋国際会議場) 2008年10月28~30日
- ⑩ Sawa T, Fujii S, Irie A, Okamoto T, Motohashi H, Yamamoto M, and Akaike T.  
Nitric oxide-dependent sulfhydryl modification of Keap1 by 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate.  
5th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic applications of NO, Bregenz, (Festspielhaus Bregenz), Austria, 2008年8月24~28日
- ⑪ 入江 厚、原田久美子、荒木令江、西村泰治  
PKD2 による SET-Ser171 のリン酸化は PP2A ホスファターゼ活性を制御する  
第6回日本ヒトプロテオーム機構大会 (大阪、ホテル阪急エキスポパーク) 2008年7月29~30日
- ⑫ 入江 厚  
T 細胞免疫応答に関わるプロテインキナーゼ D2 の解析  
第5回プロテオミクスシンポジウム (熊本、熊本大学) 2008年3月11日

[図書] (計4件)

- ① 西村泰治、入江 厚  
「第5章 T細胞に対する抗原提示」の  
翻訳, pp181-217  
Janeway's 免疫生物学 (Janeway's  
Immunobiology, 7th ed.)、南江堂、2010  
年
- ② 入江 厚、西村泰治  
「第16章 がんと免疫系の相互作用」の  
翻訳, pp480-497  
エッセンシャル免疫学(第2版) (原著  
The Immune System, 3rd ed.)、メディカ  
ルサイエンスインターナショナル、2010  
年
- ③ 入江 厚  
「インテグリンファミリー」  
広範囲 血液・尿化学検査免疫学的検査-  
その数値をどう読むか-日本臨床、68巻、  
pp163-166、日本臨床社、2010年
- ④ 西村泰治、入江 厚、千住 覚  
「第12章 移植免疫」, pp257-286  
免疫学最新イラストレイテッド (改訂第  
2版)、小安重夫編、羊土社、2009年

[その他]

ホームページ等

[http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/  
immunoge/immunoge.html](http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/immunoge/immunoge.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入江 厚 (IRIE ATSUSHI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：30250343

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

荒木 令江 (ARAKI NORIE)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：80253722