

リン酸化プロテオーム解析法の開発によるプロテインキナーゼの標的基質の網羅的同定とその機能制御機構の解明

徳島大学 疾患酵素学研究センター 疾患プロテオミクス研究部門
小迫 英尊

1. はじめに

細胞内において、多くのタンパク質はプロテインキナーゼによるリン酸化とホスファターゼによる脱リン酸化という可逆的な制御を受けている。リン酸化はその負電荷と親水性によってタンパク質の構造と機能をダイナミックに変化させることが可能であり、真核生物において最も広く認められる翻訳後修飾の一つである。ヒトには全遺伝子の約2%に相当する500種類以上ものプロテインキナーゼが存在し、その約半数は癌・パーキンソン病・ダウン症候群・心不全などの疾患に関連する遺伝子座にマップされている。これらのキナーゼはそれぞれ固有または共通の標的基質をリン酸化することによって、様々な細胞内情報伝達系で重要な役割を果たしていると考えられる。従って個々のプロテインキナーゼが標的とする基質タンパク質を同定し、そのリン酸化による機能制御機構を明らかにすることは、基礎研究のみならず診断・創薬などの臨床応用の見地からみても重要である。近年のプロテオミクス技術の急速な進展もあいまって、キナーゼ基質を効率的・網羅的に同定する方法が既に幾つか報告されている。本研究ではG蛋白質共役7回膜貫通型受容体キナーゼ (GRK) 6をモデルとして、我々が独自に開発しつつあるリン酸化プロテオーム解析法によってその標的基質を網羅的に同定することを試みた。そして興味深い新規基質のリン酸化の生理的・病態的機能を解明することを目標とした。

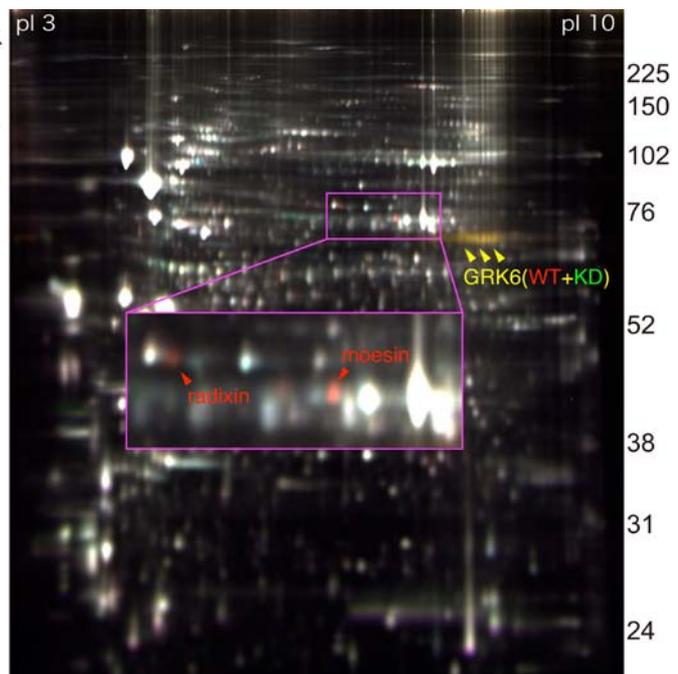
2. 方法

我々は最近、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によるリン酸化タンパク質の精製と蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE)、及びリン酸化モチーフ抗体を組み合わせた新たなリン酸化プロテオーム解析法を開発した (Kosako *et al.*, *Nature Struct. Mol. Biol.*, 2009)。GRK6はG蛋白質共役7回膜貫通型受容体をリン酸化して脱感作するキナーゼファミリーの一つであり、本研究ではこのリン酸化プロテオーム解析法を応用して

GRK6基質の検索を試みた。細胞内におけるGRK6の活性を操作する方法として、レトロウイルスを用いた遺伝子導入法を用いた。マウス NIH3T3 細胞に vector を導入した細胞、野生型のGRK6を導入した細胞、およびkinase-deadのGRK6を導入した細胞からそれぞれIMACによってリン酸化タンパク質を精製した。それぞれのリン酸化タンパク質画分を3種類の異なる蛍光色素

図1. レトロウイルスで遺伝子導入した NIH3T3細胞からのリン酸化タンパク質の2D-DIGE解析

vector
+
GRK6-WT
+
GRK6-KD



で標識した後、混合して二次元電気泳動を行って蛍光パターンを得た。この2D-DIGE解析によってGRK6のキナーゼ活性に依存してリン酸化状態が変化したと思われる変動スポットを切り出し、質量分析法によってタンパク質の同定を行った。

3. 結果 研究成果

GRK6基質同定のための2D-DIGE解析ゲルイメージについて、vector導入細胞からのリン酸化蛋白質を青、野生型のGRK6を導入した場合を赤、kinase-deadのGRK6を導入した場合を緑で表示した(図1)。目的とするGRK6基質は野生型GRK6の発現によって特異的にリン酸化されて酸性側にシフトし、赤いスポットとして現れるはずである。幾つかのそのような赤いスポットが検出されたが、今回は図1の枠内で示した2つの赤いスポットに注目した。ゲルを銀染色後にそれぞれのスポットを切り出してトリプシン消化し、LC-MS/MSによるタンパク質の同定を行った。その結果2つのスポットはradixinとmoesinであることが判明した。ezrin、radixin、moesinからなるERMファミリータンパク質は幾つかのキナーゼによってC末端付近のスレオニン残基がリン酸化されて活性化し、細胞膜とアクチンフィラメントを連結する役割を果たすことが知られている(図2)。そこでこのスレオニン残基のリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化ERM抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、野生型GRK6を発現する細胞では内在性ERMのリン酸化が亢進していることが判明した。

4. 考察 まとめ

今回、GRK6の新たな標的基質としてERMファミリータンパク質を見出すことに成功した。抗リン酸化ERM抗体を用いたウェスタンブロット解析により、細胞内におけるGRK6の活性に依存してERMのリン酸化が起こることを確認した。さらに精製GRK6を用いた*in vitro*キナーゼアッセイにより、GRK6がERMを直接リン酸化することは出来なかったことから、介在するプロテインキナーゼの存在が示唆された(図2)。ごく最近、GRK6は細胞内においてRacの活性化を介してアクチン細胞骨格系のリモデリングに関与することが明らかになったため、ERMのリン酸化との関連を今後検討する予定である。また2D-DIGEゲルイメージにおいてERMとは異なる多数の変動スポットを検出できているため、GRK6の他の基質候補の同定も進めている。

現在プロテオミクス技術を用いてプロテインキナーゼを介した情報伝達系のリン酸化タンパク質を大規模に同定する際には、LC-MS/MSを用いたショットガン解析法が主流である。本研究では二次元電気泳動法を活用している点で特徴的であり、LC-MS/MS解析とは検出しやすいタンパク質が異なるために相補性が高まると考えられる。実際にGRK6によるERMファミリータンパク質のリン酸化部位の周囲の配列はリジン、アルギニン残基が多いため、トリプシン消化によって非常に短いペプチドに断片化されてしまい、LC-MS/MSによる同定はほぼ不可能である。二次元電気泳動ではタンパク質のリン酸化のstoichiometryの違いが異なるスポットとして現れるため、LC-MS/MS法にはない利点がある。また二次元電気泳動後に特異抗体でウェスタンブロットすることにより、質量分析法で同定したタンパク質を容易に確認できるメリットもあり、今回抗ERM抗体と抗リン酸化ERM抗体を用いた確認実験を行うことができた。さらに2D-DIGEではリン酸化によって酸性側に僅かにシフトしたスポットでも、異なるゲル間の泳動誤差を排除しつつ高感度かつ定量的に検出できることから、キナーゼ基質の同定法の基盤技術となる可能性が高いと考えられる。今後2D-DIGEのさらなる高解像度化によって基質同定の網羅性の上昇を目指す予定である。

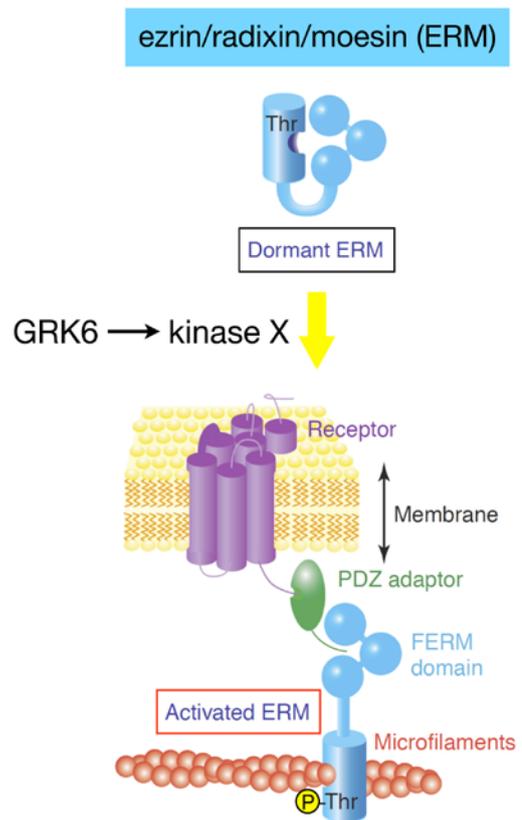


図2. GRK6によるERMのリン酸化制御

5. 発表論文、参考文献

Kosako, H., Yamaguchi, N., Aranami, C., Ushiyama, M., Kose, S., Imamoto, N., Taniguchi, H., Nishida, E. and Hattori, S. (2009) Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nature Struct. Mol. Biol.*, **16**(10), 1026-1035.

Kosako, H. and Nagano, K. (2011) Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev. Proteomics*, **8**(1), 81-94.