

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02466

研究課題名(和文) ヒトキノームの基質認識モチーフ探索

研究課題名(英文) Comprehensive profiling of substrate recognition motifs for human kinome

研究代表者

杉山 直幸 (Sugiyama, Naoyuki)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50545704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内での全プロテインキナーゼ(キノーム)の機能、役割を解明することを目指して、ヒトの全タンパク質(プロテオーム)内に存在するキナーゼ基質モチーフ、キナーゼ結合モチーフの網羅的探索を行い、生体内で起こるタンパク質リン酸化反応についてその責任キナーゼをキノームレベルで予測、同定した。また、同定されたモチーフ情報から、各キナーゼに超高選択的にリン酸化される人工基質ペプチドを設計し、実験的に選択性、感度を評価した。得られたペプチドライブラリを用いて細胞内のキノーム活性を計測する手法を開発した。さらに基質配列とキナーゼ結合モチーフを連結された基質ペプチドを創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各キナーゼの生理的条件下における基質選択性の予測、およびキナーゼ高選択的選択的基質ペプチドによるキナーゼ活性の一斉計測が可能になったことにより、大規模リン酸化プロテオームデータの有効活用と補間、シグナル伝達の詳細な制御機構や細胞内リン酸化ネットワークの全体像の解明につながることを期待できる。タンパク質のリン酸化異常が関与する多くの疾病のメカニズム解明や病気の診断や層別化、新規な分子標的薬の開発にも応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the functions and roles of human kinome in cells, comprehensive search of kinase substrate motifs and kinase-binding motifs in all human proteome and the kinase responsible for protein phosphorylation reactions occurring in vivo was predicted and identified at the kinome level. Based on the identified motifs, we designed artificial substrate peptides that are hyper-selectively phosphorylated by each kinase, and experimentally evaluated their selectivity and sensitivity. Using the designed peptide libraries, we developed a method to measure intracellular kinome activity. Furthermore, we have created substrate peptides in which the substrate sequence is linked to a kinase-binding motif.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス シグナル伝達 タンパク質キナーゼ 質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内では生命現象の制御、維持のために細胞の内外で情報を伝達する分子機構が存在し、タンパク質の翻訳後修飾、特にタンパク質のリン酸化はそのシグナル伝達において重要な役割を果たしている。タンパク質のリン酸化反応を触媒する酵素(プロテインキナーゼ)は、ヒトでは少なくとも 500 種類以上存在することがゲノム情報から分かっており、これによって多数の分子が連携する複雑な細胞内シグナル伝達ネットワークが形成されると考えられている。また、がんをはじめとして多くの疾患ではタンパク質リン酸化酵素であるプロテインキナーゼの変異や過剰発現による活性化によるシグナル伝達異常が関与している。シグナル伝達におけるキナーゼの役割、すなわち、その基質特異性や制御機構について数多くの研究が行われているものの、研究の対象になっているキナーゼは既に機能が良く調べられているものや疾患に関連した一部のキナーゼに集中しており、多くのキナーゼについては未解明のままである。

近年、質量分析計の進歩やリン酸化化合物の濃縮技術の改良などによって、細胞内で起こるタンパク質リン酸化の大規模解析、すなわちリン酸化プロテオミクスが様々な研究で用いられるようになった。一方で、上述のようにキナーゼがいつ、どこで、どの基質をリン酸化しているかといった情報が不足していることから、リン酸化プロテオミクスより得られるタンパク質リン酸化情報の中で責任キナーゼがわかっているものはわずか 5%程度であり 1)、大部分はシグナル伝達機構を解明する上で十分に活用されていない。キナーゼ基質を *in silico* で予測するといった、シグナル伝達解析のための様々なツールやリソースが開発されているが 2)、元となるキナーゼ-基質間情報が圧倒的に不足していることから、予測の正確性は低く、全キナーゼを網羅できていないことが課題である。

2. 研究の目的

本課題では、細胞内での全プロテインキナーゼ(キノーム)の機能、役割を解明することを目指して、ヒトの全タンパク質(プロテオーム)内に存在するキナーゼ基質モチーフ、キナーゼ結合モチーフの網羅的探索を行い、生体内で起こるタンパク質リン酸化反応についてその責任キナーゼをキノームレベルで予測、同定することを研究目的とする。また、同定されたキナーゼ結合モチーフとキナーゼ選択的にリン酸化される基質配列を組み合わせることで、各キナーゼに超高選択的にリン酸化される人工基質ペプチドを創出し、細胞内のキノーム活性を計測する手法を開発した。

3. 研究の方法

(1) ヒトキナーゼ基質の大規模同定を目的として、ヒト由来の培養細胞株の破砕物に対してヒトキナーゼの組換え体を用いた *in vitro* 試験を行い、リン酸化された基質タンパク質及びリン酸化部位を LC/MS/MS により同定した。*in vitro* キナーゼ反応後に酵素消化を行い、リン酸化ペプチドの濃縮をヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー法により行った後、陰イオン交換クロマトグラフィーによる前分画を行って LC/MS/MS 測定を行った。また、チロシンキナーゼの基質を高選択的に同定するために、酸化金属クロマトグラフィーと配位子交換クロマトグラフィーを併用したチロシンリン酸化ペプチド(pY ペプチド)濃縮法の開発、最適化を行った。

(2) 高深度リン酸化プロテオミクスにより同定されたキナーゼ基質情報を用いて、キナーゼ選択的基質ペプチドの再設計を行った。実際にペプチドを合成し、キナーゼ組換え体と個別に反応させることにより、選択性および感度の評価を行った。

さらに、docking motif を含むペプチドと基質配列を連結させたペプチドを設計、合成し、選択性の向上を図った。

4. 研究成果

(1) 前分画後に LC/MS/MS 測定を行うことにより、*in vitro* キナーゼ基質の同定数が分画なしの条件と比較して大幅に向上した。また、*in vitro* 基質の同定数を増加させて基質モデルを改良後にキナーゼ選択的人工基質ペプチドの再設計を行い、*in silico* 予測、および合成ペプチドを用いた *in vitro* 試験によるキナーゼ選択性評価を行った結果、基質選択性の類似したキナーゼに対しても特異的な基質配列を設計可能なことが示唆された。一方、未変性条件下における *in vitro* 試験反応を数個のキナーゼを用いて評価した結果、変性条件下と比較して脱リン酸化効率やリン酸化効率が低いことが示されたことから、脱リン酸化条件の改良やキナーゼ基質同定手

法の高感度化が必要であることが分かった。

Phos-tag を用いた配位子交換金属クロマトグラフィーによるリン酸化ペプチド濃縮において、共存する金属イオンを変えることによりリン酸化チロシンに対する選択性が向上することが分かった。銅イオン共存下、Phos-tag によるリン酸化ペプチドを濃縮した結果、Cu²⁺/Phos-tag カラムで濃縮しない場合に比べ、リン酸化ペプチド全体に占める pY ペプチドの含量が増加し、本法が生体試料中の pY ペプチドを選択的に濃縮するのに有効であることが示唆された。特に、存在量の少ない pY ペプチドに関して、Cu²⁺/Phos-tag 法を用いることにより同定することが可能になった(図1)。加えて、ペプチドの長さや等電点などのペプチドの性質によって溶出プロファイルが異なることがわかり、この分画によってより深いリン酸化プロテオーム解析が可能になることが示唆された。

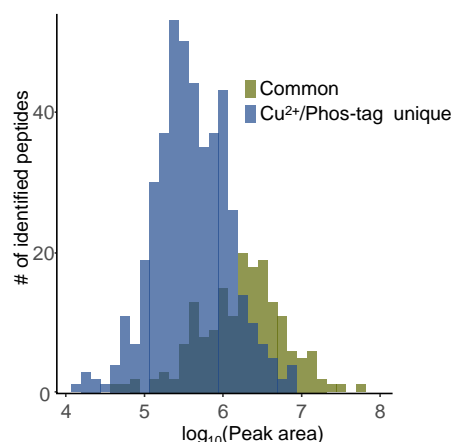


図1 pY ペプチド濃縮による高深度化

また、生理的条件下におけるキナーゼ基質の効率的な絞り込みを行う手法として、近位依存性ピオチン標識 (BioID) 法と特定キナーゼ摂動後のリン酸化プロテオーム解析、*in vitro* 基質モデルを組み合わせた方法を開発し、Molecular&Cellular Proteomics 誌に発表した¹⁾。さらに *in vitro* キナーゼ反応の応用として、Motif-centric リン酸化プロテオーム解析によるキナーゼ阻害薬評価法について、Cancers 誌に発表した²⁾。

変性条件下における *in vitro* キナーゼ基質の高深度同定を実施した。得られたキナーゼ-基質間情報に基づき、キナーゼのクラスタリングを行った。キナーゼドメインの相同性に基づく従来の分子系統樹上では離れているが、*in vitro* 基質の類似性が高いキナーゼ群に着目し、リン酸化部位から離れた位置にみられる共通のアミノ酸配列を抽出した。

高深度に取得したキナーゼの基質モデルの改善を行い、ヒトの全タンパク質のすべてのセリン、スレオニン、チロシンに対して、リン酸化される部位とその責任キナーゼを予測した。実際に標的既知のキナーゼ阻害薬を処理した細胞のリン酸化プロテオーム解析結果とよく一致したことから、予測結果が妥当であることが示された。今後さらに評価する必要があるものの、各キナーゼの生理的条件下における基質選択性を予測可能になったことにより、大規模リン酸化プロテオームデータの有効活用、およびシグナル伝達の詳細な制御機構や細胞内リン酸化ネットワークの全体像の解明につながることを期待できる。また、タンパク質のリン酸化異常が関与する多くの疾病のメカニズム解明や病気の診断や層別化、新規な分子標的薬の開発にも応用可能であると考えられる。

(2) 高深度リン酸化プロテオミクスにより得られたキナーゼ-基質間情報をもとに人工基質配列の再設計を行った。最適な基質配列決定を行う際の候補ペプチドの選出方法および使用するデータセットを評価した結果、既存の基質ペプチドよりも選択性の高い基質ペプチドをデザインできる可能性が示された。さらに選択性を向上させるために、MAPK に属するいくつかのキナーゼについて、docking motif を含むペプチドと基質配列を連結させたペプチドを設計、合成した。現在、キナーゼ組換え体を用いた *in vitro* 反応試験により、選択性評価実験を進めている。

また、プロテインキナーゼC (PKC) のアイソフォームを区別することが可能な超高選択的基質ペプチド創出を目的として、アイソフォームの *in vitro* 基質の高深度同定、および安定同位体標識による定量解析を行い、特定のアイソフォームのみに選択的にリン酸化されるペプチド配列を同定した。また、アイソフォーム選択的基質モデルを position weight matrix として抽出し、人工基質ペプチドを設計した。実際に合成ペプチドを用いて選択性の評価を行った結果、ヒトプロテオーム内に存在するペプチドの方が高いアイソフォーム選択性を示すことが明らかになった。

<引用文献>

1) Niinae T, Imami K, Sugiyama N, Ishihama Y. Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs. Mol Cell Proteomics. 2021;20:100119.

2) Ogata K, Takagi S, Sugiyama N, Ishihama Y. Motif-Targeting Phosphoproteome Analysis of Cancer Cells for Profiling Kinase Inhibitors. Cancers (Basel). 2022 Dec 23;15(1):78.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosuke Ogata, Shunsuke Takagai, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama	4. 巻 15
2. 論文標題 Motif-Targeting Phosphoproteome Analysis of Cancer Cells for Profiling Kinase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15010078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsai Chia-Feng, Ogata Kosuke, Sugiyama Naoyuki, Ishihama Yasushi	4. 巻 2
2. 論文標題 Motif-centric phosphoproteomics to target kinase-mediated signaling pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100138 ~ 100138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2021.100138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Niinae Tomoya, Imami Koshi, Sugiyama Naoyuki, Ishihama Yasushi	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Proteomics	6. 最初と最後の頁 100119 ~ 100119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcpro.2021.100119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fuji Saashia, Yamauchi Shota, Sugiyama Naoyuki, Kohchi Takayuki, Nishihama Ryuichi, Shimazaki Ken-ichiro, Takemiya Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Light-induced stomatal opening requires phosphorylation of the C-terminal autoinhibitory domain of plasma membrane H ⁺ -ATPase	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-45236-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niinae Tomoya, Sugiyama Naoyuki, Ishihama Yasushi	4. 巻 28
2. 論文標題 Validity of the cell extracted proteome as a substrate pool for exploring phosphorylation motifs of kinases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 727 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 リン酸化プロテオミクスを応用したキノーム活性評価法の開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 ヒトキノーム活性計測および予測法の開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古屋翔梧、中田花菜、南部早紀、金尾英佑、小形公亮、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 配位子交換クロマトグラフィーによるチロシンリン酸化ペプチド濃縮プラットフォームの開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新苗智也、津曲和哉、今見考志、杉山直幸、大石真也、大野浩章、大高章、石濱泰
2. 発表標題 チロシンホスファターゼ網羅的解析に向けたリン酸化チロシンミミックペプチドプローブの開発
3. 学会等名 BMAS2021 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井郁那、富岡亮太、杉山直幸、小形公亮、石濱泰
2. 発表標題 ナノLC/イオンモビリティスペクトロメトリー/MSを用いた新規プロテオーム解析手法の開発
3. 学会等名 BMAS2021 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小形公亮、Chia-Feng Tsai、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 シグナル伝達経路解明に向けたキナーゼ基質モチーフ標的型リン酸化プロテオミクス
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田朝登、小形公亮、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 In vitroリン酸化タグを用いたタンパク質の構造変化検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山直幸
2. 発表標題 ボトムアップ法によるリン酸化プロテオフォーム解析と課題
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 2023 年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyuki Sugiyama, Shogo Furuya, Kana Nakata, Saki Nambu, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Enrichment of tyrosine-phosphorylated peptides using immobilized metal ion affinity chromatography
3. 学会等名 11th AOHPPO and 7th AOAP0 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Junqi Liang, Mao Uehara, Junna Nakazono, Dai Sakamoto, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Kinase-specific substrate peptides for kinome activity profiling
3. 学会等名 3rd International BMS Symposium 2023 in Kyoto ((国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Liang Junqi, 上原 茉緒, 中園 純菜, 坂本 大, 杉山 直幸, 石濱 泰
2. 発表標題 Development and optimization of kinome activity profiling approaches based on kinase-specific substrate peptides
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 2023 年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 戸井沙紀、Liang Junqi、花田毅己、中園純菜、坂本大、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 人工基質ペプチドを用いるキナーゼアイソフォーム特異的な活性計測
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学薬学研究科 石濱研究室 https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizai/ Database of in vitro human kinome profiling http://seizai.pharm.kyoto-u.ac.jp/kinapple/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	L i a n g J u n q i (Liang Junqi)	京都大学・大学院薬学研究科・修士課程 (14301)	
研究協力者	戸井 沙紀 (Toi Saki)	京都大学・薬学部・学部生 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------