

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510261

研究課題名(和文) プロテオミクス技術によるキナーゼ基質の簡便な同定システム

研究課題名(英文) A convenient proteomic system for kinase substrate identification

研究代表者

服部 成介 (Hattori, Seisuke)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：50143508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroリン酸化系と細胞内キナーゼ発現系を用い、新規p38 MAPキナーゼ基質を7種同定した。キナーゼ結合タンパク質として、新規ERK基質adducinを同定し、ERKリン酸化によりアクチン線維との相互作用が減弱することを示した。また、mTORC2新規基質としてFilamin Aを同定し、リン酸化により細胞接着斑が制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established an in vitro dephosphorylation-phosphorylation system, by which we identified 7 novel p38 MAP kinase substrates. We also identified novel ERK and mTOR substrates as kinase-bound proteins. ERK phosphorylation of adducin attenuated adducin-actin filament interaction. Furthermore, we identified Filamin A as a novel mTOR substrate. mTOR phosphorylation of Filamin A controls focal adhesions.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学、生物分子科学

キーワード：プロテオミクス キナーゼ 二次元ゲル電気泳動 リン酸化 ERK mTOR p38 MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

特定のキナーゼの基質群の同定とリン酸化による制御を明らかにすることは、そのキナーゼの生理的機能の理解に必須である。これまでキナーゼ基質の同定は、個々の研究者の洞察力に基づく細胞生物学および遺伝学的研究によってなされてきた。しかしこうしたアプローチには限界があり、予測できない新規基質の発見は困難である。申請者は、プロテオミクス技術に基づくキナーゼ基質の簡便で網羅性の高い同定システムを提案したい。ヒト疾患の多くは細胞内シグナル伝達系の異常に起因する。そこで近年、特定のタンパク質キナーゼを標的とした肺がん治療薬イレッサ、慢性骨髄性白血病治療薬のグリベックなどの分子標的医薬品が上市されている。しかし、薬剤耐性細胞の出現が問題視されている。この点を克服するために、標的キナーゼ基質を対象とした医薬品の開発が望まれている。こうした背景を踏まえ、申請者は、新たな発想に基づくキナーゼ基質の網羅的同定システムを提案したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、プロテオミクス技術に基づく申請者独自の実験系により、タンパク質キナーゼ基質の簡便な同定法の確立を目指すものである。キナーゼの生理的機能を明らかにするためには、その基質の同定が必須である。本実験系は、*in vitro* リン酸化系と細胞内キナーゼ発現系を用い、プロテオミクス技術を組み合わせ、キナーゼ基質を効率良く同定するものである。また、キナーゼ-基質間相互作用を利用して、キナーゼ固相化カラムあるいは、キナーゼ免疫沈降複合体中の基質を同定する。本研究による成果は、タンパク質リン酸化が関与する生命現象の解明に有用な知見をもたらすとともに、創薬における標的分子数を飛躍的に増大させることが期待される。

3. 研究の方法

申請者らは、リン酸化タンパク質精製と二次元ゲル電気泳動を組み合わせることにより、従来検出が困難であったシグナル伝達系因子のリン酸化を効率よく同定する独自のシステムを開発した。このシステムを用いて 24 種の新規 ERK 基質を同定し、そのリン酸化による機能制御を調べた (Kosako *ら* Nature Struct & Mol Biol, 2009)。本研究では、この技術を基盤として、汎用性の高いキナーゼ基質同定システムを確立する。実験系として以下の二つの系を主なシステムとして用いる。また、キナーゼとして mTOR、ERK および p38 MAP キナーゼを対象とし、その基質を同定する。

モデルキナーゼとして、既知の基質が数多く報告されている ERK、p38 MAP キナーゼおよび mTOR (mammalian target of rapamycin) 等を用いる。

(1) 新しいアイデアに基づく *in vitro* リン酸化系

細胞あたりのリン酸化部位の総数は 1 万を超えるが、特定のキナーゼによりリン酸化されるものはその 1% 程度であろう。そこで、細胞の全リン酸化タンパク質をホスファターゼ処理により脱リン酸化した後、*in vitro* で特定のキナーゼによりリン酸化されるタンパク質を解析することで、対象とするリン酸化タンパク質数を大幅に減じて解析を行なう (図 1)。基質同定には、リン酸化タンパク質精製、2 次元ゲル電気泳動と LC-MS による同定を併用する。

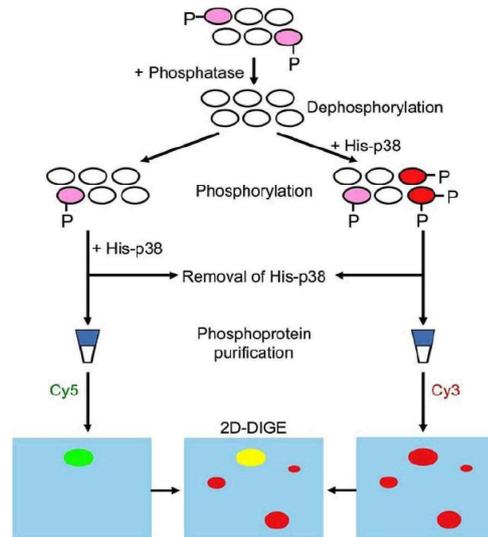


図1. *in vitro* リン酸化系の概念図

(2) キナーゼと基質の相互作用は一般的に弱く、これまでは相互作用を利用して基質を単離することは困難であるとされてきた。しかし、機器の感度が向上したため、こうした弱い相互作用も検出可能であると考えられる。キナーゼを免疫沈降し、結合してくる因子を LC-MS により網羅的に解析することで基質の同定を行なう。キナーゼ過剰発現系による基質同定は、前項と同様に行なう。また、キナーゼ結合タンパク質として基質を探索し、さらに免疫沈降物を用いた *in vitro* キナーゼアッセイによりリン酸化されるタンパク質を基質として絞り込む。

(3) 細胞レベルにおける基質の検証と、リン酸化による機能制御について検討する。リン酸化部位を同定し、リン酸化されない変異体およびリン酸化を模倣する変異体を作成する。野生型およびリン酸化に関する変異体を細胞内に導入し、細胞内機能に関する効果を検討する。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 脱リン酸化とリン酸化による p38

MAP キナーゼ基質の同定

アニソマイシン処理により、p38 MAP キナーゼを活性化した HeLa 細胞の総抽出液をイモ由来酸性ホスファターゼにより脱リン酸化し、既知の p38 MAP キナーゼ基質のリン酸化型抗体を用いて、脱リン酸化反応が進行していることをモニタした。脱リン酸化処理した試料を、遺伝子組換え法にて作成した p38 MAP キナーゼによりリン酸化し、リン酸化タンパク質精製および二次元ゲル電気泳動と組み合わせ、新規 p38 MAP キナーゼ基質を同定した(図2)。この結果は、細胞総抽出液よりリン酸化タンパク質を精製し、同様に二次元ゲル電気泳動と比較した際の結果より、はるかにリン酸化タンパク質スポット数が少なく、研究が予測通り進行したことを示している。

さらに候補スポットを切り出し、基質タンパク質を質量分析計で同定し、二次元ウェスタンブロットングで細胞内リン酸化を確認した。その結果、7種の新規 p38 MAP キナーゼ基質を同定した。

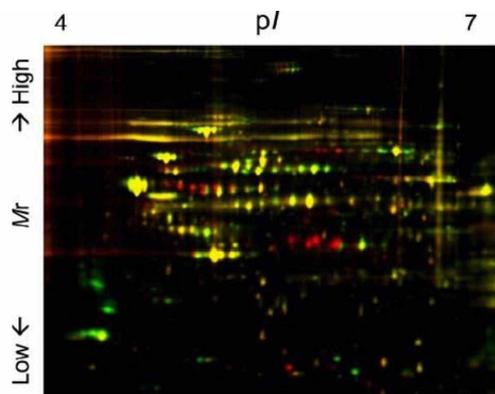


図2 in vitro リン酸化系による新規 p38 MAPキナーゼ基質の同定

(2) キナーゼ結合タンパク質としてのキナーゼ基質の同定

新規 ERK 基質 adducin の同定

ERK は細胞の増殖・分化を制御しているが、ERK の多面的な機能を考慮すれば、まだ未同定の基質が存在すると考えられる。そこで、ERK 結合タンパク質として、基質を探索する方法を開発した。

GST-ERK を用いたプルダウン法により ERK 結合タンパク質を回収し、1M NaCl にて溶出した。試料に活性型 ERK を加え、ATP 存在下/非存在下で in vitro におけるリン酸化反応を行い、2D-DIGE の試料とした。両者のスポットを比較することで、ERK と結合しリン酸化されるタンパク質を判別し、それらを質量分析計によって同定した。この手法により、既知の ERK 基質である p90RSK, SYN1 が同定され、さらにいくつかの新規基質候補タンパク質も同定できた。その中の一つである adducin は、アクチン線維架橋因子であるが、ERK リン酸化にともなって、ア

クチン線維との結合が減弱することを見いだした。この結果は、ERK による adducin 制御という新たな知見をもたらすものである。

プロテオミクス技術による mTOR 基質の同定

mTOR は 2 つの複合体 mTORC1、mTORC2 を形成し、それぞれ異なる機能を担う。そのため、細胞内の多くの機能をコントロールしている。mTORC1 は細胞の増殖や大きさ、オートファジーの制御に関与し、mTORC2 はアクチン細胞骨格や細胞生存シグナルを制御する。これまでに、がん細胞から mTORC1 の活性化型 mTOR 変異体を同定しており、mTOR 制御機構の異常がヒトの疾患に大きく関わることを示した。また、mTORC1 の上流に位置するタンパク質の異常も同様にがんの誘発に関与することや、mTORC1 の選択的阻害剤であるラパマイシン誘導体が抗がん作用を示すことが報告されており、欧米ではすでに進行性腎細胞癌の治療薬として認可されている。しかし、mTORC2 の活性を調節するメカニズムについてはいまだ不明な点が多く、さらなる解析による全貌解明が必要とされている。そこで、mTORC2 複合体を構成するタンパク質のプロテオーム解析を行い、mTORC2 シグナル伝達に関与するタンパク質の網羅的同定を試みた。

mTOR2 複合体の構成因子である rictor を免疫沈降した結果、新規結合タンパク質として Filamin A を同定した。mTORC2 と filamin A が結合する条件を免疫染色により検討したところ、インスリン刺激時において運動先端に共局在すること(図3) また、PI3K-Rac1 経路依存的事であることを明らかにした。

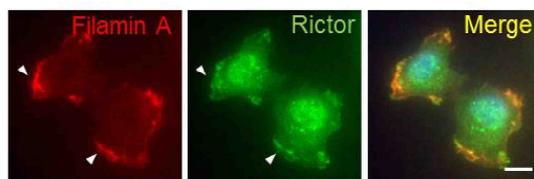


図3. インスリン刺激による mTORC2 および Filamin A の共局在

また in vitro キナーゼアッセイの結果、mTORC2 複合体は直接 Filamin A のセリン 2152 番をリン酸化することを見出した。また、このリン酸化は細胞内においても観察され、インスリンにより上昇すること、mTOR 阻害剤により阻害されることを明らかにした。

mTORC2 複合体による Filamin A リン酸化の生理的意義を検討するため、非リン酸化変異体を作成して解析を行った。その結果、変異体は野生型と比較してインテグリン $\beta 7$ の細胞内ドメインとの結合が弱く、また、培養細胞に発現させた時、野生型と比較して変

異体発現細胞はより小さい接着斑しか形成しなかった。このことから mTORC2 複合体は Filamin A をリン酸化して細胞-基質間の接着を制御すると考えられた。

(3) 考察および今後の展望

細胞の全リン酸化タンパク質を脱リン酸化した後、*in vitro* で p38 MAP キナーゼによりリン酸化されるタンパク質を解析した結果、複数の基質が同定された。この結果を他のキナーゼにも応用して、基質を網羅的に検索して行きたい。

キナーゼと基質の相互作用を利用して基質を単離することは困難であるとされてきたが、GST-ERK 固相化カラムで ERK 結合タンパク質を精製し、結合タンパク質から新規 ERK 基質 adducin を同定した。また、mTOR 複合体結合タンパク質として Filamin A を同定した。本研究で得られた知見は、新たなキナーゼ基質同定法を供するものである。

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 8 件)

. Shirakabe K, Hattori S, Seiki M, Koyasu S, Okada Y. VIP36 protein is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage Raw 264.7 cells. *J Biol Chem*. 286, 43154-43163, 2011. doi: 10.1074/jbc.M111.275586.

. Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC-1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell*. 22, 1824-1835, 2011. doi: 10.1091/mbc.E10-12-0929.

. Kajiho Y, Harita Y, Kurihara H, Horita S, Matsunaga A, Tsurumi H, Kanda S, Sugawara N, Miura K, Sekine T, Hattori S, Hattori M, Igarashi T. SIRP interacts with nephrin at the podocyte slit diaphragm. *FEBS J*. 279, 3010-3021, 2012. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08682.x.

. Minegishi Y, Shibagaki Y, Mizutani A, Fujita K, Tezuka T, Kinoshita M, Kuroda M, Hattori S, Gotoh N. Adaptor protein complex of FRS2 and CIN85/CD2AP provides a novel mechanism for ErbB2/HER2 protein downregulation. *Cancer Sci*. 104, 345-352, 2013. doi: 10.1111/cas.12086.

. Shirakabe K, Shibagaki Y, Yoshimura A, Koyasu S, Hattori S. A proteomic approach for the elucidation of the specificity of ectodomain shedding. *J Proteomics* 98, 233-243, 2014. doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.012.

. Iida N, Fujita M, Miyazawa K, Kobayashi M, Hattori S. Proteomic identification of p38 MAP kinase substrates using *in vitro* phosphorylation. *Electrophoresis* 35, 554-562, 2014. doi: 10.1002/elps.201300392.

. Shibagaki Y, Ikuta N, Iguchi S, Takaki K, Watanabe S, Kaihotsu M, Masuda C, Maeyama K, Mizumoto K, Hattori S. An efficient screening system for influenza virus cap-dependent endonuclease inhibitors. *J Virol Methods* S0166-0934(14)00048-2, 2014. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.005.

. Shiheido H, Aoyama T, Takahashi H, Hanaoka K, Abe T, Nishida E, Chen C, Koga O, Hikida M, Shibagaki Y, Morita A, Nikawa T, Hattori S, Watanabe T, Shimizu J. A novel CD3-specific antibody induces immunosuppression via impaired phosphorylation of LAT and PLC-1 following T-cell stimulation. *Eur J Immunol*. *in press*

[学会発表](計 10 件)

第 36 回日本分子生物学会年会 2013/12/05 (神戸ポートアイランド、神戸)
佐藤 龍洋, 石井 淳子, 太田 悠貴, 佐々木 恵理, 柴垣 芳夫, 服部 成介「mTORC2 は filamin A を介して接着斑形成と細胞運動を制御する」

第 36 回日本分子生物学会年会 2013/12/05 (神戸ポートアイランド、神戸)
鶴見 晴子, 張田 豊, 栗原 秀剛, 林 健二, 小迫 英尊, 服部 元史, 服部 成介, 岡 明, 五十嵐 隆「EPLIN (Epithelial protein lost in neoplasm) は接着斑を安定化し、PDGF 刺激によるメサンギウム細胞の運動性を制御する」

第 36 回日本分子生物学会年会 2013/12/04 (神戸ポートアイランド、神戸)
吉本 真吾, 小川 瑞基, 鳥井 鈴子, 根岸 豊,

飯田 直幸, 服部 成介「ERK による adducin のリン酸化は、細胞の突起伸長や細胞間接着を調節する」

第 36 回日本分子生物学会年会
2013/12/03 (神戸ポートアイランド、神戸)
白壁 恭子, 柴垣 芳夫, 吉村 昭彦, 小安 重夫, 服部 成介「プロテオミクス解析によるシェディングの刺激・基質特異性の解明」

HUPO 12th annual world congress (パシフィコ横浜) 2013/09/17 Naoyuki Iida, Masayuki Fujita, Kohtaro Miyazawa, Michimoto Kobayashi, Seisuke Hattori
「Identification of Novel p38 MAP Kinase Substrates Using In Vitro Phosphorylation」

HUPO 12th annual world congress (パシフィコ横浜) 2013/09/17 Tatsuhiko Sato, Yoshio Shibagaki, Seisuke Hattori
「mTOR Complex 2 Phosphorylates Filamin A to Regulate Cell Migration」

第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡マリンメッセ、福岡) 2012/12/14 飯田 直幸, 吉本 真吾, 根岸 豊, 吉村 憲彦, 柴垣 芳夫, 服部 成介「ERK は adducin をリン酸化し、F-actin との結合を調節する」

第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡マリンメッセ、福岡) 2012/12/12 赤須 仁美, 佐藤 龍洋, 柴垣 芳夫, 服部 成介「低分子量 G 蛋白質 Rheb によるヌクレオチド生合成への関与」

第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡マリンメッセ、福岡) 2012/12/12 佐藤 龍洋, 柴垣 芳夫, 服部 成介「mTORC2 は Filamin A を介して細胞運動を制御する」

第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡マリンメッセ、福岡) 2012/12/12 本屋 勇樹, 佐藤 龍洋, 服部 成介「神経分化における mTOR の機能解析」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ
<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
服部 成介 (HATTORI, Seisuke)
北里大学・薬学部・教授
研究者番号: 50143508

(2) 研究分担者
佐藤 龍洋 (SATO, Tatsuhiko)
北里大学・薬学部・助教
研究者番号: 70547893

(3) 連携研究者
飯田 直幸 (IIDA, Naoyuki)
北里大学・薬学部・講師
研究者番号: 10376618

柴垣 芳夫 (SHIBAGAKI, Yoshio)
北里大学・薬学部・講師
研究者番号: 90235565