

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：27701

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23701086

研究課題名（和文） リン酸化によるプロテアソームの質的変動と機能調節機構に関する研究

研究課題名（英文） Development of monitoring method for the alteration of phosphorylation status in proteasome subunits using Phos-tag electrophoresis

研究代表者 木村 弥生 (KIMURA YAYOI)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任助教

研究者番号：80391936

研究成果の概要（和文）：プロテアソーム構成サブユニットのリン酸化修飾は、プロテアソームの機能において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、プロテアソーム構成サブユニットのリン酸化修飾状態と機能調節との関係はあまり知られておらず、プロテアソームのリン酸化修飾状態についても詳細には調べられていない。本研究では、リン酸化修飾によるプロテアソーム構成サブユニットの質的変動をモニタリングするために、各サブユニットのリン酸化修飾フォームを Phos-tag 親和性電気泳動を用いて調べた。その結果、2 種類のプロテアソーム構成サブユニットについては、Phos-tag 親和性電気泳動を用いることでリン酸化修飾フォームを分離・検出することができ、これらサブユニットのリン酸化修飾状態は、過酸化水素刺激により変動することがわかった。

研究成果の概要（英文）：The phosphorylation of proteasome subunits is thought to play an important role in the function of proteasome. However, the relationship between the phosphorylation of proteasome subunits and the regulation of functions has not been examined, and the phosphorylated status of proteasome subunits has not been biochemically characterized in detail. To monitor the alteration of phosphorylation status in proteasome subunits, the phosphorylated forms of each subunit were investigated using Phos-tag electrophoresis followed by immunoblotting. The results indicated that Phos-tag electrophoresis enabled us to separate and detect the phosphorylated forms of two proteasome subunits. Furthermore, Phos-tag electrophoresis indicated that the phosphorylation status in these proteasome subunits was modulated in response to external stimulation with hydrogen peroxide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：プロテオミクス、リン酸化、Phos-tag 親和性電気泳動、プロテアソーム

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プロテアソームは、細胞内において、ポリユビキチン化されたタンパク質を認識し ATP 依存的に分解することで、多くの重要な生理機能に関与している。著者らは、これまでの酵母プロテアソーム構成サブユニット

の網羅的翻訳後修飾解析から、33 種類の構成サブユニット中、21 種類の N 末端アセチル化を、1 種類の N 末端ミリストイル化を、28 種類 71 箇所のリン酸化部位を同定し、一方で、糖鎖修飾は受けていないことを証明した (Kimura ら 2000, 2001, 2003, Kikuchi ら

2010)。また、著者らは、N 末端アセチル化酵素変異株を用いて、酵母プロテアソームのペプチド分解活性調節における N 末端アセチル化の役割やその重要性を明らかにした。さらに、著者らは、脱リン酸化酵素処理により、ATP 分解活性やペプチド分解活性が低下することを示し、リン酸化修飾による機能調節の可能性を示唆した。ヒトにおいても、34 種類の構成サブユニット中 28 種類 97 箇所リン酸化修飾部位が同定されており、酵母同様、リン酸化による機能調節の重要性が予想されている。しかし、酵母およびヒトにおいて、サブユニット毎のリン酸化修飾状態とプロテアソームの機能調節機構との関係については、未だ十分な知見は得られておらず、このような観点の研究は、国内外でもほとんど行われていない。

(2) タンパク質の多くは、前駆体ポリペプチドとして合成された後、ほぼ例外なく翻訳後に何らかの修飾を受ける。多くのタンパク質は、このような翻訳後修飾を受けて成熟タンパク質となり、本来の機能を発揮する。数ある翻訳後修飾の中でも、タンパク質のリン酸化は、細胞内において時間的/空間的に変化する極めて動的な現象であり、細胞の機能維持に係わる重要な調節機構として働く。そのため、リン酸化修飾に異常が生じると、そのタンパク質がかかわる生理機能が異常となり、疾患を引き起こす要因となることがある。実際、がんや神経変性疾患、自己免疫性疾患、代謝異常など様々な疾患において、タンパク質のリン酸化修飾異常との関連を示す例が報告されており、疾患関連タンパク質分析の分野でも、リン酸化修飾によるタンパク質の質的な変化を捉えることが重要になってきている。一般に、タンパク質リン酸化修飾部位の網羅的な解析は、酵素による断片(ペプチド)化、リン酸化修飾ペプチドの濃縮(必須)、質量分析装置による同定の順で行われる(図1)。近年、リン酸化修飾ペプチド濃縮法や質量分析装置の開発・改良が進み、著者らも、一度に 1,500 程度のリン酸化修飾ペプチドを常時同定し、定量比較解析を行っている。しかし、タンパク質のリン酸化修飾状態は一様

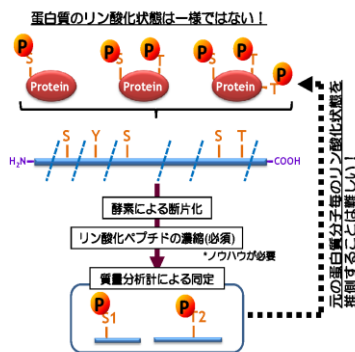


図1 蛋白質リン酸化部位の網羅的な解析

ではない場合が多いため、リン酸化修飾ペプチドの定量情報から、タンパク質のリン酸化修飾状態を推測することは非常に難しく、リン酸化修飾によるタンパク質の質的変動を十分に捉えられない場合が多い(図1)。

(3) Phos-tag 親和性電気泳動法(Phos-tag SDS-PAGE)は、Ser/Thr/Tyr すべてのリン酸化体の特異的に捕捉する Phos-tag と呼ばれる金属錯体を含むアクリルアミドを重合させたゲルを用いて行う電気泳動法である。電気泳動中にリン酸化修飾タンパク質が、リン酸化修飾部位やリン酸基数等のリン酸化修飾の程度に応じて Phos-tag に捕捉され、移動度が変化する。著者らは、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 K の研究において、この Phos-tag SDS-PAGE が、従来の手法では捉えられなかったリン酸化修飾による質的変動を検出するための有用な方法であることを示した (Kimura ら 2010)。

## 2. 研究の目的

Phos-tag 親和性電気泳動法を活用し、ヒトプロテアソームの各構成サブユニットをリン酸化修飾状態毎に分離し、リン酸化修飾によるプロテアソームの質的変動をモニタリングするシステムを構築すると共に、プロテアソームの機能とリン酸化修飾との関連性について調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料調製

ヒト 26S プロテアソームの精製は、C 末端に TEV プロテアーゼ切断部位-アビジン結合部位を持つ Rpn11 を発現する形質転換 HEK293 細胞を用いて行った。脱リン酸化処理については、アルカリフォスファターゼを用いて行い、蛍光標識は CyDye DIGE Fluor Cy3 または Cy5 saturation dye を用いて行った。

### (2) 電気泳動およびイムノブロット分析

非変性電気泳動(Native PAGE)は、90 mM トリス-ホウ酸、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、0.5 mM EDTA、1mM DTT を含むポリアクリルアミドゲル(4%T、pH8.3)と 90 mM トリス-ホウ酸緩衝液(pH 8.3)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、1 mM DTT の電極液を用いて電気泳動を行った。Phos-tag SDS-PAGE は、0.37 M トリス-HCl、0.1% SDS、50 μM MnCl<sub>2</sub>、25 μM Phos-tag アクリルアミドを含むポリアクリルアミドゲル(10%T、2.6%C)を用いて行った。二次元電気泳動については、一次元目は等電点電気泳動(pH 3-5.6 または pH 4-7 IPG ゲルを使用)を行い、二次元目は Phos-tag SDS-PAGE (10%T、2.6%C) または SDS-PAGE (10%T、2.6%C) を行った。イムノブロット分析は、電気泳動

後、タンパク質をゲルから PVDF 膜へブロットし、各抗プロテアソーム構成サブユニット抗体を 2,000 倍希釈したものを一次抗体として、HRP 標識ウサギまたはマウス IgG 抗体を 5,000 倍希釈したものを二次抗体として用いて行った。

#### 4. 研究成果

(1) 26S プロテアソームは、14 種類のサブユニットで構成される 20S プロテアソームの両側または片側に、少なくとも 19 種類のサブユニットで構成される 19S 調節因子が会合した構造をとっている。無処理および脱リン酸化処理した 26S プロテアソームを Native PAGE により分離した結果、20S プロテアソームの高次構造維持にリン酸化修飾は関係しないが、26S プロテアソームおよび 19S 調節因子の高次構造維持にはリン酸化修飾が関与することが示唆された。

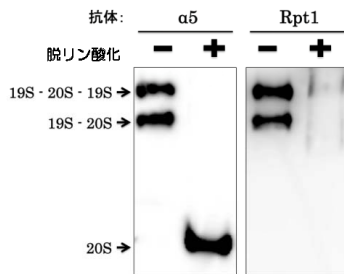


図2 抗α5, Rpt1抗体を用いたヒト26SプロテアソームのNative PAGE-イムノブロット分析像

(2) 無処理および脱リン酸化処理したプロテアソーム構成サブユニットを、異なる蛍光試薬で標識し混合後、Phos-tag SDS-PAGE により分離した結果、それぞれに特徴的なバンドを検出することができ、Phos-tag SDS-PAGE は、リン酸化修飾状態の違いによりプロテアソーム構成サブユニットを分離できる有用な方法であることが明らかとなった。

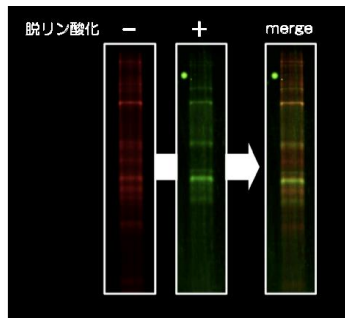


図3 ヒト26SプロテアソームのPhos-tag SDS-PAGE像

(3) 22 種類のサブユニットに対する抗体を用いたイムノブロット分析により、Phos-tag SDS-PAGE において、複数のサブユニットで SDS-PAGE では検出されないで移動度の遅いバンドが検出できた。なかでも特にシグナル強度の強い 2 種類のサブユニットについて、

アルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化処理による検出パターンの変化を調べたところ、一次元および二次元 Phos-tag SDS-PAGE において、ともに脱リン酸化処理後に移動度の遅いバンドの消失またはシグナル強度の減衰が確認でき、これらのバンドはリン酸化修飾分子であることが明らかになった。

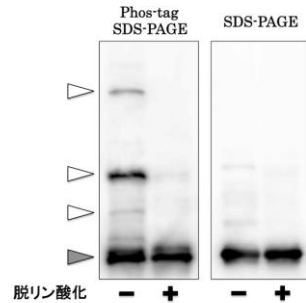


図4 Subunit AのPhos-tag SDS-PAGEおよびSDS-PAGE-イムノブロット分析像

(4) 培養細胞を過酸化水素刺激した場合の 2 種類のサブユニットのリン酸化修飾状態の質的変動を Phos-tag SDS-PAGE を用いて調べたところ、過酸化水素刺激後にリン酸化修飾分子の量の増加と非リン酸化修飾分子の量の減少が確認できた。以上の結果から、2 種類のプロテアソーム構成サブユニットについては Phos-tag SDS-PAGE を用いることでリン酸化修飾状態の質的な変動をモニターリングすることが可能であると考えられた。

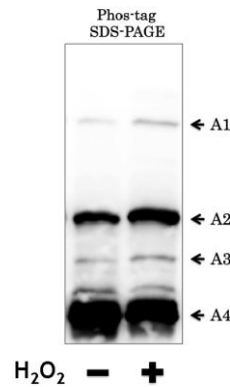


図5 過酸化水素刺激細胞におけるSubunit AのPhos-tag SDS-PAGE-イムノブロット分析像

#### 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 4 件)

(1) Yoichi Kurata, Yayoi Kimura, Yuko Yamanaka, Akiyo Ishikawa, Hiroyuki Okamoto, Tetsuji Masaoka, Hiroyuki Nagoya, Kazuo Araki, Shunsuke Moriyama, Hisashi Hirano, Tsukasa Mori. Effects of growth hormone on the salmon

pituitary proteome. J. Proteomics. 75:1718-1731, 2012. 査読有  
doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.009

(2) Masahiro Kamita, Yayoi Kimura, Yoko Ino, Roza M. Kamp, Bogdan Polevoda, Fred Sherman, Hisashi Hirano, N $\alpha$ -Acetylation of yeast ribosomal proteins and its effect on protein synthesis. J. Proteomics. 74: 431-441, 2010. 査読有  
doi:10.1016/j.jprot.2010.12.007

(3) 木村弥生, 野村文子, 井野洋子, 小原收, 平野久. Phos-tagアガロースおよび質量分析装置を用いたリン酸化ペプチドのショットガン分析. 生物物理化学 56; s25-s28, 2012. 査読有  
doi:10.2198/sbk.56.s25

(4) 木村弥生, 永田佳代子, 平野久, 小原收. 二次元 Phos-tag 親和性電気泳動. 生物物理化学. 56; s21-s24, 2012. 査読有  
doi:10.2198/sbk.56.s21

〔学会発表〕(計5件)

① 紙田正博, 木村弥生, 井野洋子, 倉田洋一, 山田哲司, 尾野雅哉, 平野久 出芽酵母リボソームタンパク質の N $\alpha$ -アセチル化とそれがタンパク質合成に及ぼす影響, 日本プロテオーム学会 2012年大会, 2012年7月26-27日, 東京

② 倉田洋一, 木村弥生, 紙田正博, 山中結子, 石川晃代, 岡本裕之, 正岡哲治, 名古屋博之, 荒木和男, 森山俊介, 森 司, 平野久 サケ脳下垂体プロテオームに対する成長ホルモンの影響, 日本プロテオーム学会 2012年大会, 2012年7月26-27日, 東京

③ 増石有佑, 木村弥生, 平野久 GPI アンカー型タンパク質の網羅的解析法の開発, 日本プロテオーム学会 2012年大会, 2012年7月26-27日, 東京

④ 菅原経継, 木村弥生, 戸田年総, 平野久 Phos-tag 親和性電気泳動法を用いたヒトプロテアソームサブユニットのリン酸化状態の解析, 日本プロテオーム学会 2012年大会, 2012年7月26-27日, 東京

⑤ 木村弥生, 永田佳代子, 石川晃代, 平野久. 酵母プロテアソームサブユニットのN末端メチル化, 日本プロテオーム学会 2011年大会, 2011年7月28-29日, 新潟

〔図書〕(計2件)

(1) 木村弥生, 平野久. LC/MS/MSによる疾患プロテオーム解析, 試料分析講座 タンパク質分析(日本分析化学会編), 丸善出版, 東京, pp.247-258, 2012.

(2) 木村弥生. 翻訳後修飾のプロテオミクス(平野久, 大野茂男 編), 講談社, 東京, pp.52-67, 91-104, 144-151, 175-178, 2011.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木村 弥生 (KIMURA YAYOI)

横浜市立大学・

生命ナノシステム科学研究科・特任助教

研究者番号: 80391936