

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750372

研究課題名(和文)リン酸化シグナリング解析手法の確立とシグナル研究への展開

研究課題名(英文)Development of a method for phosphorylation signaling

研究代表者

杉山 康憲(Sugiyama, Yasunori)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10632599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内プロテインキナーゼの発現量とリン酸化状態を解析するため、マルチPK抗体とPhos-tagを組み合わせた新手法を開発した。ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60を用いた解析により、抗がん剤耐性に関わるキナーゼの同定や細胞の分化に関わるキナーゼを検出した。これらの研究から、開発した新手法が細胞内プロテインキナーゼの解析を通して様々な生命現象や疾病の解明に有用であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To analyze expression and phosphorylation state of cellular protein kinases, we developed new method using Multi-PK antibodies and Phos-tag techniques. Analysis using human promyelocytic leukemia HL-60 cells, we identified and detected protein kinase involved in resistance of anticancer agent and differentiation. Our present study revealed that the new methods can be used for the elucidating of biological phenomena and disease pathogenesis through analysis of intracellular protein kinases.

研究分野：生化学

キーワード：リン酸化シグナリング プロテインキナーゼ マルチPK抗体 Phos-tag プロテオミクス 二次元電気泳動

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達において重要な役割を果たすプロテインキナーゼ(PK)は、タンパク質のリン酸化を介して、シグナルの ON/OFF を制御する鍵分子である。PKはこの機能を通して様々な生命現象や多くの疾病に深く関与している。哺乳動物には500種類以上のPKの存在が知られており、細胞外からの刺激などの状況に応じてその活性が調節されるだけでなく組織分布、細胞内局在、発現量などが刻々と変動している。従って、細胞内でのPKの全体像を解析することができれば、生命現象の基本メカニズムの解明や、疾病の原因究明において非常に重要な意味を持つ。このような背景の中、我々は細胞内に発現する様々なPKを幅広く検出できるモノクローナル抗体であるマルチPK抗体を作製した(Kameshita et al., Anal. Biochem. 322, 215 (2003), Sugiyama et al., Anal. Biochem. 347, 112 (2005))。さらに、この抗体を用いたPKのプロファイル法(Sugiyama et al., Anal. Biochem. 359, 271 (2006))やPKの同定法(Sugiyama et al. Anal. Biochem. 373, 173 (2008))を開発し、2型糖尿病やレット症候群といった疾病に関与するPKを同定・解析してきた(Kameshita et al., BBRC 377, 1162 (2008), Sugiyama et al., Metabolism 60, 145 (2011))。しかし、PKの解析において重要であるPK活性を網羅的に解析する手法が開発されていない状況で本研究を開始した。

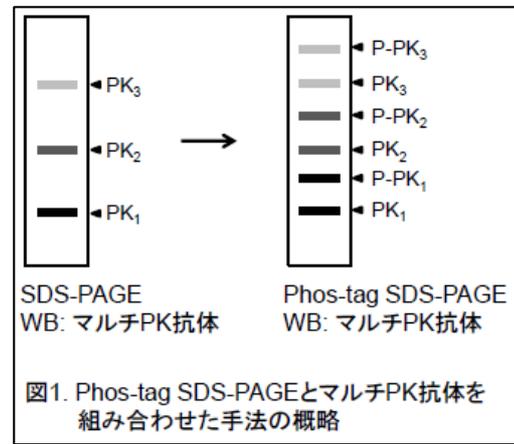
### 2. 研究の目的

本研究では生命現象や疾病の原因となる細胞内におけるリン酸化シグナル経路の全貌を解明するために、リン酸化を制御するPK群の活性変化の全体像を解析する手法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

細胞内のPK群の活性変化の全体像を解析する手法の開発には、申請者が作製したPK群を幅広く検出できるモノクローナル抗体であるマルチPK抗体と、広島大学で開発され申請者が改良に携わったリン酸基を認識して結合する化合物であるPhos-tagを利用する。これらを組み合わせて用いることにより、PK全体の活性化状態を解析するリン酸化シグナリング解析手法を確立した(図1)。この手法では、細胞抽出液などのサンプルをSDS-PAGEおよびPhos-tag SDS-PAGEにより分離し、マルチPK抗体を用いたウエスタンブロット解析により、PKのバンドおよびリン酸化PKのアップシフトバンドを検出した。さらに、一次元目に等電点電気泳動を、二次元目にPhos-tag SDS-PAGEを利用したリン酸化PKプロファイル法を開発した。

本手法の有用性を確認するためには、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60を用いた。HL-60に様々なPKを標的とする抗がん剤を処理し、



開発した手法を利用して細胞内PKを解析した。また、HL-60にTPAを処理してマクロファージ様に分化した際の細胞内PKの動態変化については二次元電気泳動を用いた手法を利用して解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)リン酸化シグナル解析手法の開発

多くのPKは上流のPKによるリン酸化や自己リン酸化によって活性が制御されている。そのため、リン酸化と活性は密接に関与することが報告され、PKの活性化の解析には多様なリン酸化部位特異的抗体が利用されてきた。そこで、本研究ではPhos-tag SDS-PAGEを利用することでリン酸化タンパク質を非リン酸化タンパク質と分離し、マルチPK抗体を用いてPKを特異的かつ幅広く検出できる手法を確立した(Sugiyama et al., MethodsX 2, 469 (2015))。

#### (2)PKの発現およびリン酸化動態のプロファイル法の開発

上記で説明したリン酸化シグナル解析手法を用いると、細胞内の多様なPKの発現量およびリン酸化動態を解析することができる。しかし、細胞内の複数のPKがリン酸化されている場合に、どのPKがリン酸化されているかを特定することは困難である。そのため、PK全体をプロファイルする手法の開発が重要である。そこで我々は、一次元目に等電点電気泳動、二次元目にPhos-tag SDS-PAGEを用いた二次元電気泳動とマルチPK抗体を組み合わせたPKプロファイル法を新たに開発した。

#### (3)抗がん剤耐性に関わるPKの同定

ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に、米国にて主にセカンドラインで使用されており様々なPKを標的としている抗がん剤(axitinib, cabozantinib, pazopanib, vandetanib)を3日間処理した。HL-60におけるPKの発現量およびリン酸化状態の変化を「リン酸化シグナル解析法」により解析した。その結果、抗がん剤処理によって、約4種類のチロシンキナーゼの発現量の変動が確認

された。また、約4種類のチロシンキナーゼのリン酸化状態の変化が見られた。さらに、この中のひとつがチロシンキナーゼの Syk であることを特異的抗体を用いた解析により同定した。

(4)細胞分化に関わるPKのプロファイリング  
HL-60 細胞はホルボールエステル(TPA)で処理することによってマクロファージ様に分化することが知られている。そこで我々はHL-60 細胞に 10 nM TPA を処理して、細胞分化を促し分化に関与する PK を「PK の発現およびリン酸化動態のプロファイル法」により解析した。その結果、約12個のスポットが検出され、その中の4個以上のスポットの発現とリン酸化が TPA 処理の時間に伴って変化することを明らかとした。

#### 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11件)

(1) Ami Oi, Syouichi Katayama, Naoya Hatano, Yasunori Sugiyama, Isamu Kameshita, Noriyuki Sueyoshi, Subcellular distribution of cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) is regulated through phosphorylation by dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 482, 2017, 239-245  
Doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.048.

(2) Yasunori Sugiyama, Sho Yamashita, Yuuki Uezato, Yukako Senga, Syouichi Katayama, Naoki Goshima, Yasushi Shigeri, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita, Phosphorylated TandemBP: A unique protein substrate for protein phosphatase assay, *Analytical Biochemistry*, 査読有, 513, 2016, 47-53  
Doi: 10.1016/j.ab.2016.08.020.

(3) Takuma Higuchi, Hiroshi Todaka, Yasunori Sugiyama, Masafumi Ono, Nobuyuki Tamaki, Etsuro Hatano, Yuka Takezaki, Kazuhiro Hanazaki, Takeshi Miwa, Lai Sylvia Chin See, Keiko Morisawa, Masayuki Tsuda, Taketoshi Taniguchi, Shuji Sakamoto, Suppression of miR-7 biogenesis by NF90-NF45 controls cell proliferation in hepatocellular carcinoma, *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 291, 2016, 21074-21084  
Doi: 10.1074/jbc.M116.748210

(4) Syouichi Katayama, Yukako Senga, Ami Oi, Yosuke Miki, Yasunori Sugiyama,

Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita, Expression analyses of splice variants of zebrafish cyclin-dependent kinase-like 5 and its substrate, amphiphysin 1, *Gene*, 査読有, 2016, 583, 15-23  
Doi: 10.1016/j.gene.2016.02.036.

(5) 片山 将一、千賀 由佳子、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇、ゼブラフィッシュ cyclin-dependent kinase-like 5 による amphiphysin 1 のリン酸化、*香川大学農学部 学術報告*、査読無, 68, 2016, 17-23

(6) Yasunori Sugiyama, Syouichi Katayama, Isamu Kameshita, Keiko Morisawa, Takuma Higuchi, Hiroshi Todaka, Eiji Kinoshita, Eniko Kinoshita-Kikuta, Tohru Koike, Taketoshi Taniguchi, Shuji Sakamoto, Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK antibody and Phos-tag SDS-PAGE, *MethodsX*, 査読有, 2, 2015, 469-474  
Doi: 10.1016/j.mex.2015.11.007.

(7) 杉山 康憲、亀下 勇、坂本 修士、マルチ PK 抗体と Phos-tag を利用した細胞内リン酸化動態の新規解析法、*電気泳動*, 59, 査読有, 2015, 82-84  
[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/electroph/59/2/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/electroph/59/2/_contents/-char/ja/)

(8) Naohiro Kon, Yasunori Sugiyama, Hikari Yoshitane, Isamu Kameshita, Yoshitaka Fukada, Cell-based inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations, *Communicative & Integrative Biology*, 査読有, 8, 2015, e982405  
Doi: 10.4161/19420889.2014.982405.

(9) Hiroshi Todaka, Takuma Higuchi, Ken-ichi Yagy, Yasunori Sugiyama, Fumika Yamaguchi, Keiko Morisawa, Masafumi Ono, Atsuki Fukushima, Masayuki Tsuda, Taketoshi Taniguchi, Shuji Sakamoto, Overexpression of NF90-NF45 represses myogenic microRNA biogenesis, developing skeletal muscle atrophy and centronuclear muscle fibers, *Molecular and Cellular Biology*, 35, 査読有, 2015, 2295-2308  
Doi: 10.1128/MCB.01297-14.

(10) 杉山 康憲、片山 将一、馬場 裕美、末吉 紀行、亀下 勇、液相等電点泳動を用いた二次元電位泳動法の活用、*生物物理化学*, 58, 査読有, 2014, 56-58  
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/sbk/-char/ja/>

(11) Naohiro Kon, Tomoko Yoshikawa, Sato Honma, Yoko Yamagata, Hikari Yoshitane, Kimiko Shimizu, Yasunori Sugiyama, Chihiro Hara, Isamu Kameshita, Ken-ichi Honma, Yoshitaka Fukada, CaMKII is essential for the cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms, *Genes & Development*, 28, 査読有, 2014, 1101-1110  
Doi: 10.1101/gad.237511.114.

〔学会発表〕(計 28 件)

(1) Sylvia Lai, 樋口 琢磨、津田 雅之、森澤 啓子、杉山 康憲、三輪 武司、戸高 寛、坂本 修士、膵島β細胞において内在性 RNA 結合タンパク質 NF45 が有する新たな細胞制御作用、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(2) 藤井 修作、戸高 寛、樋口 琢磨、坂本 修士、村尾 孝児、杉山 康憲、慢性的な高グルコースによるインスリン分泌細胞 INS-1 内のコレステロールの増加はインスリン発現の障害を誘導する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3) 樋口 琢磨、三輪 武司、延本 篤也、森澤 啓子、Lai Sylvia Chin See、池 恩燮、戸高 寛、杉山 康憲、津田 雅之、坂本修士、二本鎖 RNA 結合タンパク質 NF90-NF45 の発現増加は生体における造腫瘍能を上昇させる、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(4) 樋口 琢磨、森澤 啓子、Lai Sylvia Chin See、三輪 武司、池 恩燮、戸高 寛、杉山 康憲、津田 雅之、坂本修士、がん部における miRNA を介した NF90-NF45 の発現制御、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(5) Issei Yoshino, Makoto kawate, Mayu Onodera, Rina Takaoka, Yasunori Sugiyama, Akira Watanabe, Akihito Yoshihara, Ken Izumori, Yasuhiko Asada, Cultivation of some edible mushrooms on the sawdust medium supplemented with rare sugars, The 6th Symposium of International Society of Rare Sugars, 2016 年 11 月 24-26 日, Kagawa International Conference Hall (Kagawa・Takamatsu city)

(6) 杉山 康憲、亀下 勇、マルチ PK 抗体：プロテインキナーゼを幅広く認識できる解析ツール、第 67 回日本電気泳動学会総会、2016 年 8 月 26-27 日、釧路市観光国際交流セ

ンター(北海道・釧路市)

(7) Hiroshi Todaka, Takuma Higuchi, Keiko Morisawa, Takeshi Miwa, Lai Sylvia Chin See, Masayuki Tsuda, Yasunori Sugiyama, Mikihiro Arikawa, Takayuki Sato, Shuji Sakamoto, Elucidation of the role of the doublestranded RNA binding protein NF90-NF45 complex in muscular regeneration, RNA2016, 2016 年 6 月 28 日-7 月 2 日, Kyoto International Conference Center (Kyoto・Kyoto city)

(8) 樋口 琢磨、戸高 寛、三輪 武司、森澤 啓子、Sylvia Lai Chin See、小野 正文、杉山 康憲、津田 雅之、坂本 修士、造腫瘍能における二本鎖 RNA 結合蛋白質複合体 NF90-NF45 の影響、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、2016 年 5 月 27-28 日、高知大学医学部(高知県・南国市)

(9) Lai Sylvia Chin See、樋口 琢磨、杉山 康憲、森澤 啓子、三輪 武司、戸高 寛、津田 雅之、坂本 修士、膵臓ランゲルハンス島における RNA 結合タンパク質が有する新たな細胞制御作用、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、2016 年 5 月 27-28 日、高知大学医学部(高知県・南国市)

(10) 井戸 彩詠、樋口 琢磨、戸高 寛、坂本 修士、村尾 孝児、杉山 康憲、2 型糖尿病の糖毒性に関わるリン酸化シグナル因子の同定と解析、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、2016 年 5 月 27-28 日、高知大学医学部(高知県・南国市)

(11) 上里 裕樹、山下 翔、千賀 由佳子、片山 将一、五島 直樹、茂里 康、末吉 紀行、亀下 勇、杉山 康憲、脱リン酸化解析用タンパク質基質(リン酸化 TandemBP)の開発、第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会、高知大学医学部(高知県・南国市)

(12) 秋月 一駿、千賀 由佳子、杉山 康憲、亀下 勇、末吉 紀行、Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ) による Distal-less homeobox 1 (Dlx1) のリン酸化とオステオカルシンの転写制御、BMB2015、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(13) 大井 愛海、片山 将一、三木 洋祐、波多野 直哉、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇、Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK 1A) による Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) のリン酸化とその意義、BMB2015、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(14) 杉山 康憲、片山 将一、亀下 勇、森澤 啓子、樋口 琢磨、戸高 寛、木下 英司、木下 恵美子、小池 透、坂本 修土、抗がん剤を処理したヒト白血病細胞 HL-60 の細胞内キナーゼの発現およびリン酸化動態の解析、BMB2015、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

(15) 山下 雅史、片山 将一、千賀 由佳子、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇、担子菌 *Coprinopsis cinerea* の成長菌糸に存在する CaM キナーゼ (CoPK02) の性質、BMB2015、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

(16) Lai Sylvia Chin See, 樋口 琢磨、杉山 康憲、森澤 啓子、戸高 寛、三輪 武司、津田 雅之、坂本 修土、臍臓における二本鎖 RNA 結合タンパク質 NF90 及び NF45 の機能解析、BMB2015、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

(17) 杉山 康憲、亀下 勇、坂本 修土、マルチ PK 抗体と Phos-tag を利用した細胞内リン酸化動態の新規解析法、第 66 回日本電気泳動学会総会、2015 年 9 月 4 日、東京工科大学 (東京都・大田区)

(18) Isamu Kameshita, Noriyuki Sueyoshi, Yasunori Sugiyama, Multi-PTK Antibody: A Powerful Tool to Detect a Wide Variety of Protein Tyrosine Kinases (PTKs), The 29th Annual Symposium of The Protein Society, 2015 年 7 月 22-25 日、Barcelona (Spain)

(19) 秋月 一駿、千賀 由佳子、杉山 康憲、亀下 勇、末吉 紀行、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I アイソフォーム (CaMK1 $\alpha$  と CaMK1 $\delta$ ) の自己リン酸化に着目した比較解析、第 56 回日本生化学会中国・四国支部例会、2015 年 5 月 29-30 日、島根大学学会館 (島根県・松江市)

(20) 大井 愛海、片山 将一、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇、Rett 症候群の発症に関わる Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) のアミノ酸変異と基質リン酸化活性、第 56 回日本生化学会中国・四国支部例会、2015 年 5 月 29-30 日、島根大学学会館 (島根県・松江市)

(21) 広瀬 健太郎、杉山 康憲、吉種 光、秦 (小塚) 裕子、尾山 大明、深田 吉孝、マウス肝臓の概日時計を制御する転写因子複合体のプロテオミクス解析、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(22) 片山 将一、千賀 由佳子、大井 愛海、三木 洋祐、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇、

ゼブラフィッシュに存在する 2 種類の Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) のスプライスバリエーションの比較解析、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(23) 千賀 由佳子、杉山 康憲、亀下 勇、末吉 紀行、Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase I $\delta$  (CaMKI $\delta$ ) による Distal-less homeobox 1 (Dlx1) を介した骨形成メカニズム、第 37 回分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(24) 杉山 康憲、片山 将一、馬場 裕美、末吉 紀行、亀下 勇、液相等電点泳動を用いた二次元電気泳動法の活用、第 65 回日本電気泳動学会総会、2014 年 10 月 25 日、横浜情報文化センター (神奈川県・横浜市)

(25) Yukako Senga, Yasunori Sugiyama, Isamu Kameshita, Noriyuki Sueyoshi, Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase I $\delta$  (CaMKI $\delta$ ) regulates Distal-less homeobox 1 (Dlx1) during osteogenic signaling, The 15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB Conference, G11-72, 2014 年 10 月 20-28 日、台北 (台湾)

(26) Naohiro Kon, Tomoko Yoshikawa, Sato Honma, Yoko Yamagata, Hikari Yoshitane, Kimiko Shimizu, Yasunori Sugiyama, Chihiro Hara, Isamu Kameshita, Kenichi Honma, Yoshitaka Fukada, Roles of CaMKII in circadian clock system, 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

(27) 樋口 琢磨、安東 徳子、三輪 武司、戸高 寛、森澤 啓子、Lai Chin See Sylvia, 杉山 康憲、津田 雅之、坂本 修土、二本鎖 RNA 結合タンパク質が関与する肝細胞癌の新たな遊走能制御、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

(28) 杉山 康憲、森澤 啓子、樋口 琢磨、戸高 寛、山口 史佳、安東 徳子、坂本 修土、マルチ PK 抗体と Phos-tag を利用した細胞内リン酸化シグナリング解析法、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 豊田 優、馬谷 千恵、杉山 康憲、羊土社、実験医学、2015、143

(2) 有澤 琴子、馬谷 千恵、大上 雅史、小野田 淳人、香川 璃奈、杉山 康憲、高橋 裕佳、瀧 慎太郎、道喜 慎太郎、豊田 優、藤原 慶、秀和システム、「これだけ！生化学」(6 章および 7 章) 2014、145-224

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/sugiyama/TOP.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

杉山 康憲 (SUGIYAMA, Yasunori)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10632599