

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20570177

研究課題名(和文) 新たなリン酸化プロテオミクスによる細胞内キナーゼ基質の網羅的同定と機能解析

研究課題名(英文) Global identification and functional analysis of protein kinase substrates by a phosphoproteomic approach

研究代表者

小迫 英尊 (KOSAKO HIDETAKA)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：10291171

研究成果の概要(和文)：新たなリン酸化プロテオーム解析法を開発することにより、細胞内情報伝達系で多彩な役割を果たす ERK/MAP キナーゼの新規基質を多数同定した。そして ERK が核膜孔複合体構成因子をリン酸化することで核-細胞質間輸送を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)： A multi-step method for detecting proteins phosphorylated by ERK MAP kinase reveals many new ERK substrates, including three nucleoporins. Nup50 is phosphorylated in FG repeats by ERK *in vitro* and *in vivo*, suggesting a new mechanism by which MAP kinase signaling controls nuclear translocation of proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：プロテオーム、タンパク質キナーゼ、リン酸化、MAP キナーゼ、核膜孔複合体、核-細胞質間輸送、抗リン酸化抗体

1. 研究開始当初の背景

ゲノム配列の解読完了により、ヒトには全遺伝子の約2%に相当する500種以上ものタンパク質キナーゼをコードする遺伝子が存在することが判明した (Manning *et al.*, *Science*, **298**, 1912-1934, 2002)。その中の約半数は癌などの疾患に関与する遺伝子座にマップされており、特定のキナーゼがリン酸化する基質タンパク質を同定することは、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進展により、これらシグナル伝達系のリン酸化タンパク質を効率的・網羅的に解析する試みが期待されている。

このような解析はタンパク質キナーゼが制御する様々な生命システムを包括的に解明する上で必須のものである。研究代表者らは最近、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: immobilized metal ion affinity chromatography) による全細胞タンパク質からのリン酸化タンパク質の濃縮・精製法を開発した (Machida *et al.*, *FEBS J.*, **274**, 1576-1587, 2007)。さらに IMAC と蛍光標識二次元ディフュレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE: two-dimensional difference gel electrophoresis) 技術を組み合わせることにより、従来のプロテオーム解析では検出が困難とされてきた、発現量の

低いシグナル伝達因子のリン酸化による変動を高感度かつ定量的に検出できることを示した (Ueda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 41815-41821, 2004)。本研究ではこの手法を発展させ、特定のタンパク質キナーゼの基質を網羅的に同定し、そのリン酸化の変動を定量解析するための高感度で汎用性の高い新たなプロテオーム解析法を開発することを目標とする。

2. 研究の目的

真核生物において高度に保存されたシグナル伝達経路である ERK MAP キナーゼ経路、p38 MAP キナーゼ経路、JNK 経路、PKB/Akt 経路、p70^{S6K} 経路及び Rho-キナーゼ/ROCK 経路は、それぞれ多彩な細胞機能を制御しており、未だ同定されていない基質の存在が予想されている。これらの6種のキナーゼがリン酸化する基質群を大規模に同定・比較することは、各キナーゼに共通または固有の生理機能の分子機構を解明し、さらにはシミュレーションにより生体応答システムを理解するための重要なステップと考えられる。そこでマウス NIH3T3 細胞などに対し、各種キナーゼ阻害剤による前処理と適切な細胞外刺激を行った後、前述のリン酸化タンパク質の精製法と 2D-DIGE 技術（分解能を高めるべく種々の改良を加える）の併用により、目的のキナーゼの標的タンパク質を網羅的に検出・同定する。2D-DIGE 後のリン酸化モチーフ抗体によるイムノブロットや、タンパク質の等電点や細胞内局在の違いに基づく前分画法を導入することなどによって、より網羅的なキナーゼ基質の同定法の開発を目指す。そして興味深い新規基質について、種々の生化学・細胞分子生物学的な検討を行い、目的キナーゼによるリン酸化を介した新たな細胞機能制御機構を見出す。

3. 研究の方法

(1) 様々な細胞外刺激に対する応答性が高く、増殖・運動・細胞死などへの影響も詳細に解析されているマウス NIH3T3 細胞に対し、各種キナーゼ阻害剤による前処理を行うことによって ERK、Akt、p70^{S6K}、p38、JNK 及び Rho-キナーゼの基質候補を検索するための試料とする。ERK については活性型 B-Raf をエストロゲン受容体との融合タンパク質として安定に発現する NIH3T3 細胞も用いて、エストロゲンアンタゴニスト処理による選択的かつ強力な Raf-MEK-ERK 経路の活性化も行う。細胞抽出液を調製し、IMAC によってリン酸化タンパク質を精製した後、異なる蛍光色素による標識を行う。標識サンプルを混合して二次元電気泳動することにより、上記の6種のキナーゼ経路の標的因子のリン酸化による変動を網羅的に定量解析する。各キナー

ゼがリン酸化するコンセンサス配列を特異的に認識する抗体を用いたイムノブロットイメージと 2D-DIGE イメージとのマッチングにより、基質の同定の効率化を図る (2D-DIGE 解析ゲルを PVDF 膜に転写後、イムノブロットによる検出を化学蛍光法で行って両方の蛍光を同時にスキャンすることにより、マッチングが非常に容易になる)。そして目的とする変動スポットを切り出し、酵素消化の後に MALDI-TOF MS を用いて PMF 解析を行い、タンパク質の同定を行う (PMF による同定が困難な場合は、オフライン型の LC と MALDI-TOF/TOF MS によるタンパク質同定を試みる)。

(2) (1)の方法によって同定された各種キナーゼの新規基質候補の中で特に興味深いものについて、リン酸化制御とその生理的意義について解析を進める。特にそのキナーゼの基質として新たな機能カテゴリーに属するタンパク質や各キナーゼに共通あるいは固有の生理機能を担うと推測されるタンパク質に注目する。まず cDNA を単離して組換えタンパク質を精製した後、各キナーゼが *in vitro* で直接リン酸化することを確認し、LC-MS/MS 解析やアラニン変異体の作製によってリン酸化部位を決定する。そして多数の抗リン酸化抗体を作製し、細胞外刺激によるリン酸化量の変化をイムノブロット法や間接蛍光抗体法を用いて時間的・空間的に詳細に解析する。リン酸化による分子間相互作用の制御を生化学的に検討する際には、免疫共沈降法や GST pull-down 法だけでなく、Biacore システムによる定量解析も行う。さらに NIH3T3 細胞において確立した RNAi とレスキュー実験により (ノックダウン細胞に野生型とリン酸化部位の変異体を発現させて比較する)、細胞増殖・運動・細胞死などにおける新規基質のリン酸化の役割について種々の細胞生物学的検討を加える。

4. 研究成果

(1) 活性型 B-Raf をエストロゲン受容体との

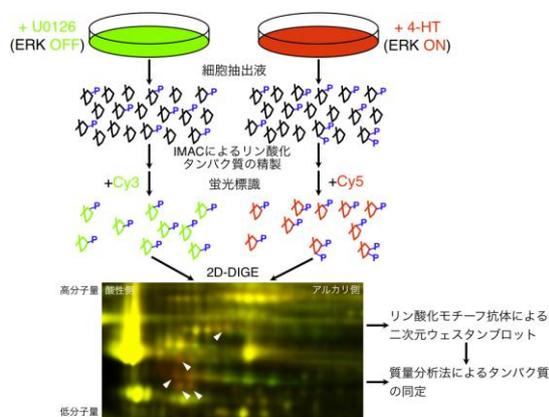


図1. リン酸化プロテオーム解析の流れ

融合タンパク質として安定に発現する NIH3T3 細胞を MEK 阻害剤 U0126 で処理して ERK 経路を阻害したサンプルと、エストロゲンアンタゴニスト 4-hydroxytamoxifen で処理して ERK 経路を活性化させたサンプルを調製した。IMAC による全細胞抽出液からのリン酸化タンパク質の濃縮法、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) 技術、及び ERK のリン酸化モチーフ (PXpSP および pTP) を認識するモノクローナル抗体を組み合わせることにより (図 1)、新規 ERK 基質の候補を 24 種類同定することができた (表 1)。

機能カテゴリー	同定数	タンパク質名
タンパク質キナーゼ	5	MEK1, MEK2, ERK1, ERK2, RSK2
小胞・膜輸送	4	cPLA2, SNX5, CRMP-2, dynamin1
核-細胞質間輸送	1	Nup50/Npap60
転写制御	2	BAF155, KAP-1/TIF1β
細胞骨格系	8	caldesmon 1, cortactin, L-plastin, vimentin β, EPLIN, DYNC112, DYNC1L1, lamin A/C
プロセッシング・翻訳制御	5	hnRNP K, eIF4B, eIF4E, EFTy, U1 snRNP 70kDa
タンパク質品質管理	5	SGT, Rpt5/Psmc3, STI1/Hop, calpastatin, SAPK substrate-1/2/B28
その他・機能未知	8	UDPGDH, tumor protein D52-like 2, proline-rich coiled-coil 1, Fam129b, IK cytokine, etc.

表1. ERK経路関連タンパク質の同定

二次元イムノブロットやバイオフィオマトイクスによる解析結果を考慮して 14 種類を選択し、GST 融合タンパク質を調製したところ、13 種類は ERK により *in vitro* でリン酸化されることが判明した (図 2)。

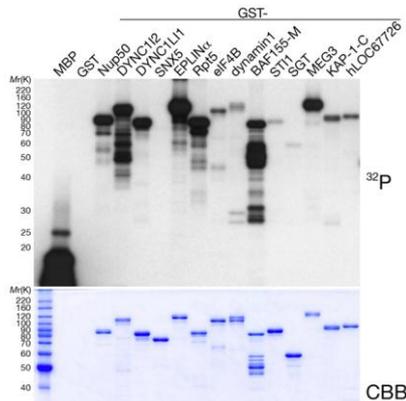


図2. ERKによる基質候補の*in vitro*でのリン酸化

(2) 血清飢餓状態のマウス NIH3T3 細胞に対し、a) 無刺激、b) PDGF 刺激、c) U0126 処理後に PDGF 刺激、d) wortmannin 処理後に PDGF 刺激、e) anisomycin 刺激、f) SB203580 処理後に anisomycin 刺激、g) Y-27632 処理を行うことにより、ERK、Akt、p38 及び ROCK の基質候補を網羅的に同定するための試料とした。各々の処理後に細胞抽出液を調製し、IMAC 後に 2D-DIGE 解析を行ったところ、ERK 活性化による変動スポットは多数認められたのに対し、他のキナーゼの標的タンパク質と思われる変動スポットは僅かしか認められなかった。今後は全細胞抽出液ではなく、膜や核などのオルガネラ画分を調製してか

ら IMAC する必要があると考えられた。

(3) (1)で新規 ERK 基質として見出した核膜孔複合体構成因子 (ヌクレオポリン) の一つ Nup50/Npap60 に注目し、以下の知見を得た。Nup50 は N 末側に importin-α結合ドメイン、中央に importin-βと結合する FG リピード領域、C 末側に GTP 型 Ran 結合ドメインを有するが、ERK は FG リピード領域の二カ所のセリン残基 (S221 および S315) をリン酸化することを明らかにした (図 3)。そして GST プル

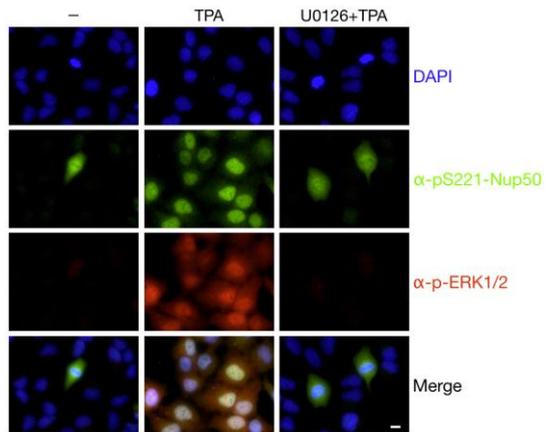


図3. TPA刺激による活性化ERKを介した細胞内でのNup50のS221のリン酸化

ダウン法により、ERK によってリン酸化された Nup50 は importin-βおよび transportin との結合能が特異的に阻害され、importin-α、CAS および GTP 型 Ran との結合は変化しないことを示した。リン酸基を特異的に捕捉する二核金属錯体である Phos-tag を用いたウェスタンブロット法により (図 4)、他の FG ヌクレオポリンである Nup153 と Nup214 も ERK によってリン酸化され、同様に importin-β との親和性が強く阻害されることを示した。

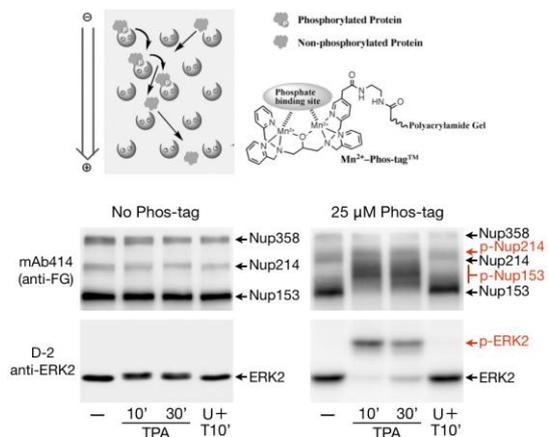


図4. Phos-tagウェスタンブロット法によるNup153とNup214の ERKによるリン酸化の検出

さらに ERK を活性化または阻害してから調製したセミインタクト細胞を用いて *in vitro* 核内移行アッセイを行ったところ、ERK 活性

化細胞では GFP-importin-β または GFP-transportin 単独でのエネルギー非依存的な核内移行が阻害されることを見出した。そこで Nup50 および Nup153 を siRNA によってロックダウンしてから *in vitro* 核内移行アッセイを行ったところ、Nup50 をロックダウンした細胞では ERK 活性化による GFP-importin-β の核内移行の阻害がキャンセルされることを見出した。Nup153 をロックダウンした場合には ERK 活性の有無に関わらず GFP-importin-β の核内移行が抑制されていた。さらに Nup50 をロックダウンした細胞に Nup50 の野生型またはリン酸化部位の変異体でレスキューする実験により、ERK 活性化による GFP-importin-β の核内移行の阻害に Nup50 のリン酸化が関与することが明らかとなった。従って、ERK がヌクレオポリンのリン酸化を介して核-細胞質間輸送を制御する可能性が示唆された (図 5)。核膜孔を介し

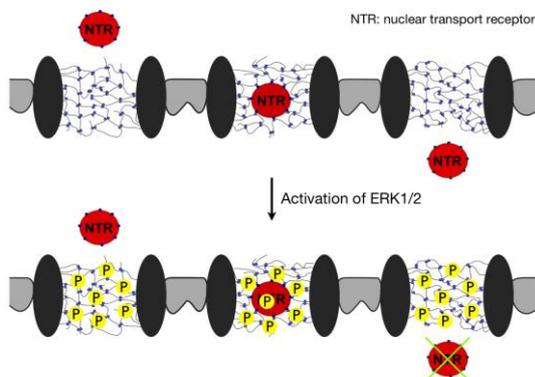


図5. ERKによるFGヌクレオポリンのリン酸化は輸送運搬体分子の核-細胞質間輸送を阻害する

た核-細胞質間の選択的輸送は、核膜を有する真核生物にとってほぼ全ての生命現象に関与する重要な細胞内プロセスの一つであるが、細胞内シグナル伝達によるこの輸送システムの制御機構は殆ど明らかにされていない。ごく最近多くの FG ヌクレオポリンが DNA 損傷や酸化ストレス、ウイルス感染などによってリン酸化されることが報告されており、核膜孔における複数の FG ヌクレオポリンのリン酸化を介して様々なシグナル伝達キナーゼが核-細胞質間輸送を制御している可能性がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

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

- ② [Kosako, H.](#) and Imamoto, N. (2010) Phosphorylation of nucleoporins: signal transduction-mediated regulation of their interaction with nuclear transport receptors. *Nucleus*, 査読有, **1**, 309-313.

- ③ [小迫英尊](#) (2010) リン酸化プロテオミクスで明らかとなった ERK による核膜孔複合体の機能制御. *実験医学*, 査読無, **28**, 69-73.

- ④ [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.*, 査読有, **16**, 1026-1035.

- ⑤ [Kosako, H.](#) (2009) Phos-tag Western blotting for detecting stoichiometric protein phosphorylation in cells. *Nature Protoc. (Protocol Exchange)*, 査読無, doi:10.1038/nprot.2009.170.

- ⑥ Harita, Y., Kurihara, H., [Kosako, H.](#), Tezuka, T., Sekine, T., Igarashi, T., Ohsawa, I., Ohta, S. and Hattori, S. (2009) Phosphorylation of Neph1 triggers Ca^{2+} signaling by recruitment and activation of phospholipase C- γ 1. *J. Biol. Chem.*, 査読有, **284**, 8951-8962.

- ⑦ Hattori, S., Iida, N. and [Kosako, H.](#) (2008) Identification of protein kinase substrates by proteomic approaches. *Expert Rev. Proteomics*, 査読有, **5**, 497-505.

- ⑧ Harita, Y., Kurihara, H., [Kosako, H.](#), Tezuka, T., Sekine, T., Igarashi, T. and Hattori, S. (2008) Neph1, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine phosphorylated by the Src family tyrosine kinase and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J. Biol. Chem.*, 査読有, **283**, 9177-9186.

[学会発表] (計 5 件)

- ① [小迫英尊](#)ら、ERK/MAPキナーゼなどによる FG ヌクレオポリンのリン酸化は核輸送因子との相互作用を制御する, BMB2010, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド

- ② Kosako, H., Phosphoproteomics reveals ERK MAP kinase-mediated regulation of nuclear pore complex proteins., BIT' s 3rd World Cancer Congress-2010, 2010年6月23日, シンガポール
- ③ Kosako, H. et al., Phosphorylation of nuclear pore complex proteins by ERK MAP kinase regulates interaction with transport receptors., ASCB2009, 2009年12月6日, San Diego, USA
- ④ 小迫英尊ら, リン酸化プロテオミクスによって明らかとなったERK/MAP キナーゼによる核膜孔複合体の機能制御, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月24日, 神戸ポートアイランド
- ⑤ Kosako, H. et al., Phosphoproteomic profiling of ERK MAP kinase signaling reveals a role of phosphorylation in the interaction of nucleoporins with transport factors., ASCB2008, 2008年12月15日, San Francisco, USA

[図書] (計1件)

- ① 小迫英尊、後藤由季子、朝倉書店、タンパク質の事典 (分担執筆、猪飼篤ら編)、2008年、863頁 (635-638)

[その他]

ホームページ等

<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/172252/profile-ja.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小迫 英尊 (KOSAKO HIDETAKA)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・
准教授
研究者番号: 10291171