

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K12220

研究課題名（和文）プロテイン・キナーゼの特異的基質認識機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the specific substrate recognition mechanism of protein kinases

研究代表者

福地 佐斗志（Fukuchi, Satoshi）

前橋工科大学・工学部・教授

研究者番号：70360336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質リン酸化データベースPhosphoSite Plus よりすべてのリン酸化部位データを入手した。入力した特徴量ベクトルを基に基質間の距離を求め、系統樹を作成するパイプラインを整備した。系統樹を特定のアミノ酸残基を考慮しないで描く、特定の領域のみで描く、といった方法により、MAPKファミリーのキナーゼにリン酸化される基質に、リン酸化サイトの近くの電荷の分布および離れた部位のプロリンの分布に特徴があることが示唆された。このことは、これまでリン酸化サイト近傍のみに着目されていたモチーフ検索とは異なり、それ以外の部分にも配列的特徴があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

よく似た配列を異なるキナーゼがリン酸化する際、どのように基質を見分けているのかという機構については不明な点が多い。本研究は、基質配列のリン酸化サイトから離れた位置の配列的特徴を示唆するものである。これまで、MAPキナーゼ基質にはDモチーフと呼ばれる配列があることが知られていたが、本研究で示唆された領域はDモチーフとは異なっている。本研究はアミノ酸残基の配置のみの解析であり、また、全ての基質に共通に見られる特徴であるか、といった点には踏み込めていない。しかしながら、今後さらなる検討により、キナーゼの認識部位のヒントとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Data of phosphorylation sites were obtained from the protein phosphorylation database, PhosphoSitePlus. We developed a pipeline to generate a phylogenetic tree by calculating the distances between substrates based on the input feature vectors. The phylogenetic trees were drawn without considering specific amino acid residues or only in specific regions, suggesting that the substrates phosphorylated by MAPK family kinases are characterized by the distribution of charged residues near the phosphorylation sites and proline distributions on distant regions from the phosphorylation sites. This suggests that there are sequence features in other parts of the substrates in addition to the motifs near phosphorylation sites.

研究分野：生命情報学

キーワード：タンパク質リン酸化 生命情報学 配列解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は真核生物において最も多く見られる翻訳後修飾の一つである。ヒトは、500 種以上のプロテイン・キナーゼ (以下キナーゼ) をもち、これらのキナーゼは 10 以上の有力な抗がん剤のターゲットとなっている。すべてのキナーゼは共通の活性ドメインを持ち、外界からの刺激に対応しシグナル伝達経路を調節し細胞活動制御している。キナーゼはリン酸化残基の選択性を基に、チロシン・キナーゼ、セリン・トレオニン・キナーゼに大別される。これらのキナーゼの活性化部位は、シグナル伝達経路を制御するために特異的な基質を認識する必要があるが、リン酸化部位及びその周辺配列のみでは基質の特異的認識には不十分である。なぜならば、キナーゼによるリン酸化サイトのコンセンサス配列は 1 から 3 残基程度の短いものであり、このような短いモチーフはプロテオームを眺めればほぼすべてのタンパク質に存在するといっても過言ではない。キナーゼはこれらの候補モチーフの中から特異的基質のみを選択し、ターゲット以外のタンパク質は除外しなければならない。さらに、キナーゼの中には非常に類似したリン酸化サイトをリン酸化する例が多い。例を挙げれば、Protein Kinase A のリン酸化サイトと Pak kinase のリン酸化サイトは、R[R/K]xS 及び [R/K]RxS (R は疎水性残基、S はリン酸化を受けるセリン) と酷似しているが、これらのキナーゼは各々基質を特異的に認識している。現状、キナーゼの基質認識機構についての理解は限られているが、これらの事実は、リン酸化部位以外に何らかの配列特異性が存在し、キナーゼの基質認識に関与していることを示唆している。

一方、キナーゼによるリン酸化は創薬の観点からも重要である。リン酸化は多くの生命現象を調節するため、創薬ターゲットとして有力であり、2000 年代に入り約 30 種のキナーゼ阻害薬が米国食品医薬局 (FDA) により認可されている。このように、キナーゼは有力な創薬ターゲットであるが、キナーゼの阻害薬を開発するにあたり重大な問題となるのは副作用である。キナーゼは共通のリン酸化活性ドメインを持ち、先にあげたようにリン酸化サイトのコンセンサスは曖昧であると同時に、非常に類似したコンセンサス配列が異なるキナーゼで共有されている。このため、標的とするキナーゼ以外に阻害薬が作用してしまう危険性が高い。このような状況では標的キナーゼを完全特異的に阻害することは極めて難しく、多くのキナーゼ阻害薬では副作用を考慮し、投薬制限が必要である。このため、キナーゼの基質認識機構を理解することは、阻害薬の選択性の観点からも極めて重要である。

2. 研究の目的

今世紀に入り、天然変性タンパク質が注目されて来ている。タンパク質はアミノ酸鎖が折り畳まれて球状の立体構造を形成し機能するが、天然変性タンパク質は天然変性領域と呼ばれる球状構造を形成せずヒモ状で存在すると考えられている領域を持つ。天然変性領域は数十から長いものでは数百残基に及ぶと考えられており、天然変性領域は様々な機能を持っている。特に天然変性領域領域には、10 残基前後のタンパク質相互作用部位を有し、パートナータンパク質と過渡的な相互作用を行いシグナル伝達経路等でスイッチのような役割を演じている。また、リン酸化といった翻訳後修飾の多くが、天然変性領域に集中していることが指摘されて来ている。リン酸化は、キナーゼやフォスファターゼがリン酸化領域に結合・解離を繰り返すことで制御され

ており、キナーゼによるリン酸化は典型的な天然変性領域とタンパク質の過渡的な相互作用の一例と見なすことができる。

キナーゼファミリーの一つ Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーについて、リン酸化活性部位以外の領域に基質との相互作用部位が存在することが報告されている。MAPK ファミリーには、活性部位以外に D-site と DEF-site と呼ばれる基質結合領域が存在し、この領域に基質の D-site モチーフ、DEF-site モチーフと呼ばれる配列が特異的に結合する。このように MAPK ファミリーでは、リン酸化領域のみで基質を見分けているわけではなく、活性部位以外の基質結合領域が基質の特異的認識に関与していると考えられる。MAPK ファミリーでは基質認識機構に関する示唆が得られ始めているが、その他多数のキナーゼについては同様な機構で基質認識が得られているのか、不明である。このため、MAPK ファミリー以外のキナーゼについて同様な機構が見つければ、キナーゼの基質認識機構理解の大きな手がかりとなる。また、D-site と D-site モチーフの結合を阻害する化合物がキナーゼ阻害剤として開発されている [Kinoshita et al., B. 仮に、他のキナーゼでも同様な機構で基質を特異的に認識しているとする、各キナーゼの基質認識部位特有の阻害剤を開発することで、選択性を有するキナーゼ阻害薬の開発が可能である

3. 研究の方法

本研究では、翻訳後修飾データベース PhosphoSite Plus [<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>] の情報を基に解析を行う。PhosphoSitePlus は、キナーゼ・基質データとして約 18000 サイトの情報を有しており、このリン酸化サイトは 727 個のキナーゼとヒモ付けされている。すなわち、18000 個のリン酸化サイトのリン酸化がどのキナーゼにより行われているか、が判明している。この情報をもとに、キナーゼ毎に基質を分類し、基質配列の特徴・共通性を探索してゆく。基質配列をリン酸化するキナーゼ毎に分類し、天然変性領域の配列特徴を抽出する。配列の特徴として、アミノ酸組成、アミノ酸の二残基組成等と共に、データベース AAindex [<https://www.genome.jp/aaindex/>] に収録されたアミノ酸の物理化学的性質の分布等を抽出する。データ抽出は、リン酸化サイトからの位置も考慮したデータとする。これらに加え場合により、多変量解析、機械学習の手法を用いた解析も考慮し、キナーゼ毎の配列の特徴を抽出する。

4. 研究成果

タンパク質リン酸化データベース PhosphoSite Plus よりすべてのリン酸化部位データを入手した。入手したリン酸化サイトはキナーゼと紐付けされており、データの概要を掴むためデータの統計を取った。キナーゼ数、キナーゼ毎の基質数、キナーゼ毎のリン酸化サイト数などを把握するとともに、アミノ酸配列のデータセットを整備した。同時に、対応する Uniprot データベースエントリも取得できるようにした。

リン酸化の多くは天然変性領域 (IDR) 中の残基で起こるため、本研究は IDR 配列のキナーゼ毎に基質配列の IDR の特徴を捉えることが目標である。実験的に実証された IDR は限られるため、精度の良い IDR 予測が重要である。本研究室で開発中の NeProc の予測モデルが完成し、世界的に信頼性の高い予測プログラム Disopred3, SPOT-disorder などと性能を比較した。この結果、こ

の二つのプログラムと同等または上回る予測性能を示した。

リン酸化サイト情報の多いキナーゼ、CK2A1, ERK2, PKACA, PKCA のリン酸化基質を解析した。まず NeProc による IDR 予測を行い、アミノ酸配列の特徴を示すもっとも簡単な量であるアミノ酸組成を分析した。アミノ酸ごとの組成に加え、連続する二つのアミノ酸の組成、二残基組成も分析した。基質配列間の比較に加えキナーゼ間の類似性もキナーゼドメインの系統樹を作成し比較した。この結果、IDR のアミノ酸組成、二残基組成から得られた類似関係とキナーゼの類似関係には相関は見られなかった。この結果から、類似キナーゼにリン酸下される IDR のアミノ酸組成、二残基組成は必ずしも似ていないことが示された。基質配列の天然変性領域が認識されるキナーゼ毎に特徴があるのかどうかを把握したい。リン酸化サイト情報の多いキナーゼ、6 種のキナーゼファミリーに属する 23 個のキナーゼにリン酸化される基質を解析した。昨年度作成した解析パイプラインを用い、リン酸化基質がリン酸化されるキナーゼごとに特徴があるのかをさまざまな特徴量を用い吟味した。さまざまな特徴量の中で、電荷の偏りとプロリンの密度から特徴が見つかった。特に MAPK ファミリーにリン酸化される基質配列で特徴が見られた。電荷の偏りを基に基質間で系統樹を描くと、リン酸化サイトに比較的近い部位での系統樹で MAPK ファミリーの基質がクラスターを形成していた。プロリンの密度ではリン酸化サイトから離れた領域の配列で系統樹を描くと MAPK 基質がクラスターとなった。このことから、MAPK にリン酸化される基質では、リン酸化サイトの近くの電荷の分布および離れた部位のプロリンの分布に特徴があることが示唆された。このことは、これまでリン酸化サイト近傍のみに着目されていたモチーフ検索とは異なり、それ以外の部分にも配列的特徴があることを示唆している。さらに、リン酸化モチーフの類似する MAPK ファミリーキナーゼと CDK ファミリーキナーゼにリン酸化される基質を比較したところ、リン酸化サイトから N 末端方向 240 から 300 残基、C 末端方向 180 から 260 残基付近で、MAPK 基質に関してプロリンが多くみられることが示唆された。これらは数百のリン酸化サイトを、リン酸化サイトを揃え前後の残基をカウントした平均的な残基の分布であり、ここの基質に関してどこまでこのルールが当てはまるのか、といった点まで踏み込むことはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内山竜也, 福地佐斗志
2. 発表標題 MAPKファミリーにリン酸化される基質の特徴発見
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 関口拓実, 福地佐斗志
2. 発表標題 キナーゼのリン酸化基質の配列モチーフによらない特異性の発見
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------