

リン酸化プロテオミクスによるキナーゼ基質の大規模解析

1. はじめに

タンパク質のリン酸化は負電荷と親水性の付与によってタンパク質の酵素活性、局在、安定性、相互作用などを可逆的かつダイナミックに制御することが可能であり、真核生物において最も広範に認められる翻訳後修飾である。このためタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）はヒトの場合で500種類以上と数多く存在し、様々な細胞内情報伝達系で中心的な役割を果たしている。タンパク質キナーゼをコードする遺伝子の変異は癌・パーキンソン病・ダウン症候群・心不全などの疾患と深く関連することが知られている。さらに炭疽菌・らい菌・赤痢菌などの多くの病原性細菌が特定のキナーゼを標的にしていることが最近明らかとなった。個々のキナーゼの生理的・病理的機能を理解し、診断・創薬などの応用研究に役立てるためには、複雑で精緻なリン酸化ネットワークの全貌を解明することが必要である。近年種々のプロテオミクス技術が著しく進歩したことにより、生体内におけるキナーゼの標的基質を大規模に同定する方法が複数報告されている¹⁾。本稿ではこれらのリン酸化プロテオーム解析法について概説すると共に、新たに同定されたキナーゼ基質の機能解析の例についても紹介したい。

2. リン酸化プロテオーム解析の基本的な方法

プロテオーム解析における基盤的技術として、二次元電気泳動と液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC-MS/MS)の2種類の方法がある。両者ともに複雑な生体試料中の微量で一過的なリン酸化を多数検出するためには、リン酸化タンパク質ないしリン酸化ペプチドの精製や特定のオルガネラの単離などが分析前に必要である。この前分画のステップを特異的かつ再現性よく行うことは極めて重要であり、様々な手法が報告されている。そして目的とするキナーゼがリン酸化する標的基質群を同定するためには、そのキナーゼが活性化した試料と特異的に阻害された試料(キナーゼ阻害剤やノックアウトマウスなどが用いられる)の間でリン酸化量を比較する必要がある。二次元電気泳動もLC-MS/MSも操作ごとのばらつきがあるため、操作を繰り返して統計処理を行うか、比較するサン

プルを異なる蛍光色素や安定同位体で標識後に混合して同時に分析操作する方法が開発されている。

3. 二次元電気泳動を用いたキナーゼ基質の同定

二次元電気泳動は各タンパク質に固有の等電点と分子量に基づいて分離する分析法である。タンパク質試料を酵素消化して得られた断片化ペプチドを分析するLC-MS/MSと異なり、タンパク質をそのまま分離する二次元電気泳動ではアイソフォームや種々の翻訳後修飾の差異を検出することが容易である。即ち、ゲル上においてこれらの差異は別個のスポットの連なりとして現れ、泳動後に抗体等でウェスタンブロットすることによって検証することができる。特にリン酸化はタンパク質の等電点を確実に酸性側に変化させるため、二次元電気泳動はリン酸化量の変化を検出するのに適している。近年リン酸化タンパク質に特異的な染色試薬や特定のリン酸化モチーフを認識する抗体群が開発されたこともあり、リン酸化プロテオミクスの分野において二次元電気泳動は改めて注目されつつある。

二次元電気泳動によってキナーゼ基質を同定するためには、その活性を操作した複数の試料を泳動して比較する必要があるが、通常の二次元電気泳動ではゲル間のスポットパターンのばらつきが大きく、煩雑なマッチング操作が必要となる。蛍光標識二次元ディフェレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)は、比較する試料を2または3種類の蛍光色素で標識した後、混合して同一ゲルで泳動する手法であり、高い定量性と再現性を特長とする変動解析技術である²⁾。私達は以前に、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)によってリン酸化タンパク質を精製してから2D-DIGE解析することにより、ヒト培養細胞からp38 MAPキナーゼ経路に位置する多数のタンパク質スポットを検出することに成功した³⁾。そしてこれらのスポットの一つであるBAG2がp38の下流キナーゼMAPKAPK2の新たな標的基質であることを明らかにした。またWangらのグループはシロイヌナズナの細胞膜画分を2D-DIGEすることにより、ステロイドホルモンの受容体キナーゼの基質となる下流キナーゼファミリーを同定した⁴⁾。このように前分画操作と2D-DIGEの組み合わせは、リン酸化シグナル伝達ネットワークの解明に有効なアプローチの一つである⁵⁾。

真核生物に普遍的に存在し、細胞内で多彩かつ重要な役割を果たすERK/MAPキナーゼは国内外の多数のグループによって詳細に解析されてきており、その標的基質も転写因子を中心に数多く報告されている。私達は最近、

IMACと2D-DIGEの併用に加えて、エストロゲン受容体との融合によるキナーゼ活性の操作系とリン酸化モチーフ抗体を取り入れた新たなリン酸化プロテオーム解析法を開発した(図1)⁶⁾。そして新規ERK基質を13種類同定し、その中に含まれていたアクチン架橋タンパク質EPLINと核膜孔複合体構成因子(ヌクレオポリン)に注目して機能解析を行った。その結果、ERKによるリン酸化によってEPLINのアクチンとの親和性が低下し、ストレスファイ

バーの消失や細胞運動性の上昇が促されることを明らかにした⁷⁾。一方で一部のヌクレオポリンが有するFGリピート領域(疎水的なフェニルアラニン-グリシン配列の繰り返しと親水性アミノ酸に富むリンカー配列からなるフレキシブルな領域)がERKによってリン酸化されると、輸送運搬体であるimportin-βファミリーとの疎水的な相互作用が抑制されることを見出した⁶⁾。核膜孔を介した核-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

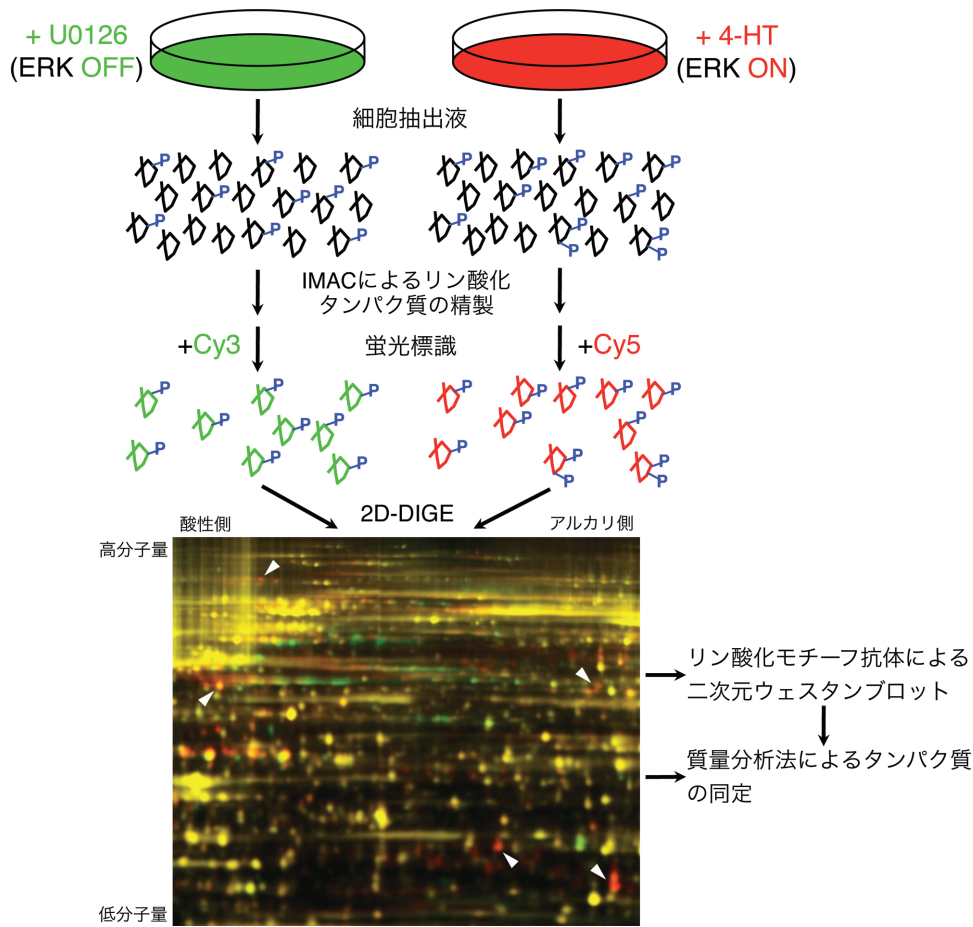


図1 2D-DIGEを用いたリン酸化プロテオミクスによるERK/MAPキナーゼ基質候補の大規模同定

まず活性化型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マウス繊維芽細胞に対し、MEK阻害剤(U0126)またはエストロゲン受容体アンタゴニスト(4-HT)処理によってRaf-MEK-ERK経路を選択的に阻害または活性化した。そして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。それぞれのリン酸化タンパク質画分を異なる蛍光色素で標識した後、混合して同一ゲル上で二次元電気泳動して蛍光パターンを検出・比較する2D-DIGEを行った。その結果ERK経路の活性化によってリン酸化されたと思われる変動スポットを多数検出することができた(白矢頭など)。これらの変動スポットの幾つかはERKがリン酸化するコンセンサス配列を認識するリン酸化モチーフ抗体と反応したため、ERKの直接的な基質と考えられた。質量分析計を用いた解析により、49個の変動スポットから38種類のタンパク質を同定することに成功した⁶⁾。

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。ごく最近多くのスクレオポリンが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⁸⁾、核膜孔における複数のス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。

4. LC-MS/MSを用いたキナーゼ基質の同定

リン酸化ペプチドの精製とLC-MS/MS解析により、細胞内の多数のリン酸化タンパク質とそのリン酸化部位をハイスループットに同定することが可能である。様々なリン酸化ペプチドの精製法が開発されているが、IMACと酸化金属クロマトグラフィー(MOC)が現在広く用いられている。そしてLC-MS/MS解析における定量法には安定同位体による標識の有無によって大別される。標識せずに定量する場合、各ペプチドをMS/MS解析した回数やペプチドイオンのMSクロマトグラム上の強度を指標にする。AhnらのグループはMS/MS解析においてリン酸化ペプチドから PO_3 が遊離したペプチドイオンの強度を測定することにより、ヒト悪性黒色腫細胞からB-Raf-MEK-ERKシグナル系によって制御されるリン酸化部位を90カ所同定した⁹⁾。そしてERKの新たな標的基質として機能未知タンパク質であるFam129bを同定し、リン酸化されたFam129bが癌細胞の浸潤能を高めることを明らかにした。

安定同位体標識の方法として、安定同位体アミノ酸を含む培地を用いて代謝的に*in vivo*で標識するSILAC(stable isotope labeling by amino acids in cell culture)法と、ペプチドのアミノ基を化学的に*in vitro*で標識するiTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)またはTMT(tandem mass tags)と呼ばれる方法がある。MannらのグループはSILAC法によるリン酸化プロテオーム解析を開発・発展させており、ごく最近細胞周期における2万カ所以上のリン酸化部位の定量を報告した¹⁰⁾。さらにその中の5千カ所以上についてはリン酸化のstoichiometry(化学量論)を測定し、Cdk1などの分裂期キナーゼがその標的基質群を分裂期にほぼ完全にリン酸化することによって不活性化している可能性を指摘した。またCell Signaling Technology社を中心としたグループは、Akt, RSK, p70 S6キナーゼが共通にリン酸化するモチーフに対する抗体でリン酸化ペプチドを精製することにより、複数の癌細胞株からこれら三つのキナーゼの基質候補を300種以上同定し

た¹¹⁾。そして様々なキナーゼ阻害剤によるリン酸化の変化をSILAC法で定量し、受容体型チロシンキナーゼから三つのキナーゼに至る経路における各基質の位置づけを行った。さらに細胞の生存への影響を各々の基質をノックダウンすることで検討し、リン酸化によってPDGF受容体を安定化するシャペロンタンパク質を見出した。

5. リン酸化部位の同定と検証

リン酸化ペプチドをLC-MS/MS解析することによってリン酸化部位を同定することができるが、ペプチド配列中に複数のセリン、スレオニンまたはチロシン残基がある場合、どの残基がリン酸化されているか一義的に決定することは困難な場合が多い。従って質量分析以外の方法によってリン酸化部位を検証することは、キナーゼ基質のリン酸化による制御機構を明らかにする上で重要である。リン酸化部位をアラニン残基に置換した変異体と野生型に対し、対象とするキナーゼがリン酸化するか比較する実験が一般に行われる。またリン酸化部位特異的抗体は特定部位のリン酸化のみを認識し、さらにその細胞内局在も可視化できる有用なツールである^{6,7)}。しかしながら市販のリン酸化部位特異的抗体の数には限りがあり、その作製にも費用と労力を要する。

最近開発されたPhos-tagはリン酸基を特異的に捕捉する二核金属錯体であり、Phos-tagを含むゲルでSDS-PAGE後、標的基質に対する抗体でウェスタンブロットすることにより、基質のリン酸化量を移動度のシフトによって評価することができる(図2A)^{12,13)}。野生型またはアラニン変異体を発現する細胞の抽出液をPhos-tagウェスタンブロットすることにより、細胞内におけるリン酸化部位を確認することが可能と考えられる(図2B)。

6. リン酸化の機能解析

最新の高性能LC-MS/MSシステムを用いることにより、細胞内における3万カ所以上ものリン酸化部位の同定と定量が報告されるようになった¹⁴⁾。しかしながらその大部分はキナーゼと基質の対応関係が明らかになっていないため、さらなる解析が必要である。様々なキナーゼがリン酸化するコンセンサス配列の情報に基づき、特定の基質に対するキナーゼを予測する検索サイト(ScanSite, NetPhosなど)はこの際に有用である。またプロテオミクスや生化学・細胞分子生物学的手法によって同定されたリン酸化部位とその関連情報を文献から集めたデータベース(PhosphoSitePlus, Phospho.ELMなど)の整備も進んでいる。

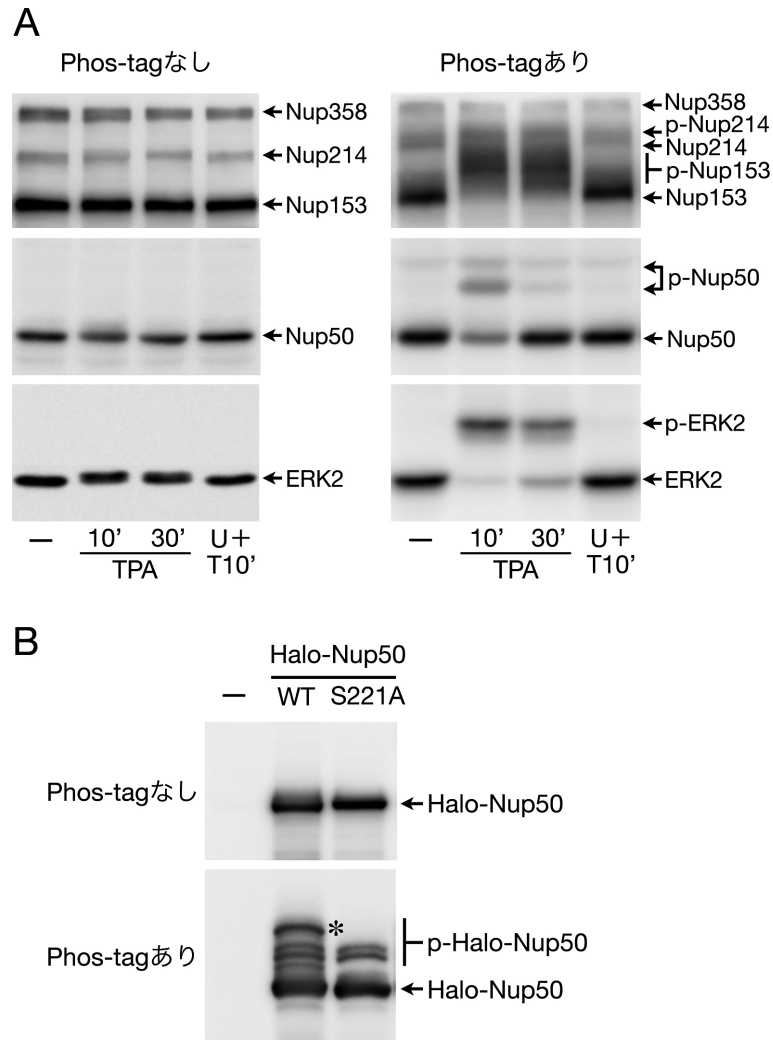


図2 Phos-tag ウェスタンブロットによる細胞内でのリン酸化の検出
 (A) HeLa 細胞に対し、U0126 (U) による前処理の有無で TPA 刺激を行った。細胞抽出液を Mn^{2+} -Phos-tag を含むゲルと含まないゲルで SDS-PAGE した後、FG スクレーポリン、Nup50 および ERK2 に対する抗体でウェスタンブロットした。
 (B) 野生型 (WT) およびアラニン変異体 (S221A) の Nup50 に Halo タグを付加して 293T 細胞に発現させた後、抽出液を調製した。抗 Halo タグ抗体を用いた Phos-tag ウェスタンブロットにより、リン酸化された Halo タグ付き Nup50 のバンドが複数検出された。アラニン変異によって消失するバンド (星印) が認められたことから、221 番目のセリンがリン酸化部位の一つであることが判明した。

このようなバイオインフォマティクスによって特定のリン酸化部位とそのキナーゼ候補に注目し、リン酸化の機能的意義を解明することは重要である。即ち、特定のキナーゼによるリン酸化を介した標的基質の新たな機能制御機構を見出してこそ、リン酸化プロテオミクス研究の価値が高

まると考えられる。リン酸化による酵素活性や相互作用の変化の検討、リン酸化部位特異的抗体による免疫染色、ノックダウンまたはノックアウト細胞への野生型またはリン酸化部位の変異体の導入など、様々な解析を行うことになる。

表1 主なリン酸化プロテオーム解析法の長所と短所

方法	長 所	短 所
2D-DIGE	リン酸化の化学量論を測定しやすい 二次元ウェスタンブロットによる検証ができる シンプルで正確な定量性 幅広いサンプルに適用できる	低いスループット タンパク質の同定数が比較的少ない リン酸化部位を同定することが難しい
SILAC	高いスループット ペプチドとそのリン酸化部位を多数同定できる 正確な定量性	通常培養細胞に限られる 安定同位体アミノ酸が代謝的に相互変換してしまう リン酸化の化学量論を測定することが難しい
iTRAQ/TMT	高いスループット ペプチドとそのリン酸化部位を多数同定できる 幅広いサンプルに適用できる	標識するまでの前分画の操作中に誤差を生じやすい リン酸化の化学量論を測定することが難しい

7. おわりに

今回紹介した2D-DIGE, SILAC, および iTRAQ/TMT を用いたリン酸化プロテオーム解析法の長所と短所を表1にまとめた。細胞内における膨大なリン酸化部位の約2/3は機能的に重要でない「ノイズ」だとする報告がある¹⁵⁾。従って質量分析装置を駆使したリン酸化部位の大規模同定と定量に留まらず、バイオインフォマティクスなどを利用して生理的に重要と推測されるリン酸化を抽出し、その意義を多角的に機能解析する必要がある¹⁶⁾。システムバイオロジーの発展により、古典的なシグナル伝達パスウェイからクロストークやフィードバック経路を含めた複雑なリン酸化シグナルネットワークを描き出すことも可能になってきた¹⁴⁾。また一般にリン酸化はポリペプチド鎖が大きく揺らいだ天然変性領域で起こりやすいことが知られている。このためX線結晶解析だけでなく、X線小角散乱(SAXS)や分子動力学シミュレーションも用いてリン酸化の働きを構造レベルで解明しようとする研究がはじまっている。

次世代シーケンサーの普及により、個人の全キナーゼ(kinome)の配列を取得し、変異に基づく個人に適した診断・治療が可能になっていくと予想される。キナーゼが関与する疾患の診断や予測の信頼性を向上させるためには、細胞や患者間の不均一性の問題を乗り越える必要があり、キナーゼとその標的基質群を「パスウェイバイオマーカー」として多数解析することが重要になると考えられる。今回紹介した様々なアプローチにより、「キナーゼ基質のプロファイリングとそのカタログ化」が整備され、バイオマーカーや創薬の分子標的の発見につながる事が期待される。

- 1) Kosako, H. & Nagano, K. (2011) *Expert Rev. Proteomics*, 8, 81-94.
- 2) Kondo, T. & Hirohashi, S. (2006) *Nat. Protoc.*, 1, 2940-2956.
- 3) Ueda, K., Kosako, H., Fukui, Y., & Hattori, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 41815-41821.
- 4) Tang, W., Kim, T.W., Oses-Prieto, J.A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A.L., & Wang, Z.Y. (2008) *Science*, 321, 557-560.
- 5) Morales, M.A., Watanabe, R., Dacher, M., Chafey, P., Osorio y Fortéa, J., Scott, D.A., Beverley, S.M., Ommen, G., Clos, J., Hem, S., Lenormand, P., Rousselle, J.-C., Namane, A., & Späth, G.F. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 8381-8386.
- 6) Kosako, H., Yamaguchi, N., Aranami, C., Ushiyama, M., Kose, S., Imamoto, N., Taniguchi, H., Nishida, E., & Hattori, S. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 1026-1035.
- 7) Han, M.-Y., Kosako, H., Watanabe, T., & Hattori, S. (2007) *Mol. Cell Biol.*, 27, 8190-8204.
- 8) Kodiha, M., Crampton, N., Shrivastava, S., Umar, R., & Stochaj, U. (2010) *Nucleus*, 1, 237-244.
- 9) Old, W.M., Shabb, J.B., Houel, S., Wang, H., Coutts, K.L., Yen, C.-Y., Litman, E.S., Croy, C.H., Meyer-Arendt, K., Miranda, J.G., Brown, R.A., Witze, E.S., Schweppe, R.E., Resing, K.A., & Ahn, N.G. (2009) *Mol. Cell*, 34, 115-131.
- 10) Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., Brunak, S., & Mann, M. (2010) *Sci. Signal.*, 3, ra3.
- 11) Moritz, A., Li, Y., Guo, A., Villén, J., Wang, Y., MacNeill, J., Kornhauser, J., Sprott, K., Zhou, J., Possemato, A., Ren, J.M., Hornbeck, P., Cantley, L.C., Gygi, S.P., Rush, J., & Comb, M. J. (2010) *Sci. Signal.*, 3, ra64.
- 12) Kinoshita, E. & Kinoshita-Kikuta, E. (2011) *Proteomics*, 11, 319-323.
- 13) Kosako, H. (2009) *Nat. Protoc.*, doi: 10.1038/nprot.2009.170.
- 14) Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M.E., & Gygi, S.P. (2010) *Cell*, 143, 1174-1189.
- 15) Landry, C.R., Levy, E.D., & Michnick, S.W. (2009) *Trends Genet.*, 25, 193-197.

- 16) Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V., & Blagoev, B. (2011) *Sci. Signal.*, 4, rs3.

小迫 英尊
(徳島大学疾患酵素学研究センター
疾患プロテオミクス研究部門)

Global analysis of protein kinase substrates using phospho-proteomic techniques

Hidetaka Kosako (Division of Disease Proteomics, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan)

ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 による EGFR 細胞内トラフィックの制御

1. はじめに

ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 (leucine-rich repeat kinase 1) は, Ras に似た GTPase ドメインと MAPKK キナーゼに似たキナーゼドメインを持つユニークなタンパク質である. 近年 LRRK1 のファミリー分子 LRRK2 が, 家族性パーキンソン病原因遺伝子 Park8 であることが明らかとなり, ROCO ファミリーキナーゼは臨床的にも非常に注目を集めている^{1,2)}. しかし, 現在のところ LRRK1, LRRK2 の細胞内における機能は, ほとんど明らかにされていない. 我々は LRRK1 の機能を明らかにする目的で, LRRK1 と相互作用する因子の探索を行った. その結果, LRRK1 は上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) の下流で機能するアダプター分子 Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) と相互作用することを見出した. その後の解析から, LRRK1 が Grb2 を介して活性化した EGFR と複合体を形成し, EGFR の細胞内トラフィックの制御に関与することが明らかになった³⁾. 本稿では, LRRK1 による EGFR 細胞内トラフィックの制御機構について概説する.

2. EGFR 細胞内トラフィック

細胞膜上の EGFR はリガンドによって活性化すると, MAP キナーゼ経路など下流シグナル伝達経路を活性化するとともに, 自身はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる. 細胞内に取り込まれた EGFR は早期エンドソームに集められ, ここで細胞膜に戻されリサイクルさ

れるか, 多胞体 (multivesicular body, MVB) / 後期エンドソームに運ばれリソソームによって分解されるか, 選別される. この選別には, ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 複合体と呼ばれる一群のタンパク質が重要な役割を果たしている⁴⁾. ESCRT 複合体は ESCRT-0, I, II, III の四つの複合体から成り, 主に早期エンドソーム膜上で EGFR をリソソーム分解経路に選別している (MVB sorting). この選別にはユビキチンがタグとして機能しており, ユビキチン化された EGFR は, ESCRT 複合体によって認識されるとエンドソーム内腔へと取り込まれる. 早期エンドソームは, 細胞内を移動しながら内腔小胞を形成していき, MVB / 後期エンドソームへと成熟していく⁵⁾. リソソーム分解経路に選別された EGFR は, エンドソームの成熟とともにどんどん内腔小胞に取り込まれていき, 最終的にリソソームと融合して分解される (図 1). 我々は, LRRK1 が EGFR とともに早期エンドソームに局在することを見出したことをきっかけに, EGFR 細胞内トラフィックにおける役割について解析を行った.

3. EGFR 細胞内輸送における LRRK1 の機能

LRRK1 は Grb2 と常に結合しており, EGF 刺激依存的に Grb2 を介して EGFR と複合体を形成する. その後 LRRK1 は, EGFR とともにエンドサイトーシスされ早期エンドソームに局在する. LRRK1 の機能を検討するため, siRNA を用いて内在性 LRRK1 をノックダウンしたところ, EGFR は早期エンドソームに蓄積し MVB / 後期エンドソームへ移行できないことが明らかとなった (図 2). LRRK1 をノックダウンした細胞に野生型 LRRK1 を戻すと, EGFR は MVB / 後期エンドソームへ移行できるようになるのに対し, キナーゼ活性を欠失した LRRK1 変異体を戻しても EGFR の MVB / 後期エンドソーム移行の回復は見られなかった. このことから, LRRK1 はキナーゼ活性依存的に EGFR の早期エンドソームから MVB / 後期エンドソームへの移行を制御していることが明らかとなった.

EGFR の早期エンドソームから MVB / 後期エンドソームへの移行には, 二つの重要なステップが存在する. 一つ目のステップは, 細胞膜近傍から核付近への空間的な移動である. ほとんどの細胞では, 早期エンドソームは細胞膜近傍あるいは細胞質全体に散在し, MVB / 後期エンドソーム及びリソソームは核付近に存在している. つまり, 細胞膜から取り込まれ早期エンドソームに局在した EGFR がリソソームで分解されるためには, 細胞膜近傍から核付