

リン酸化プロテオームによるインスリン/Akt経路の標的因子の網羅的解析法の開発

●小迫 英尊 ◆小林 道元

東京大学医科学研究所細胞ゲノム動態解析 (BML) 寄付研究部門

〈研究の目的と進め方〉

我々は特定のシグナル伝達経路に関与するリン酸化タンパク質を効率的・網羅的に同定するための、汎用性の高いプロテオーム解析法の開発を目標としている。そのモデル系として、インスリンやPDGFなどの細胞外因子によって活性化するPI3キナーゼ/Akt経路およびMAPキナーゼ経路のリン酸化プロテオーム解析を開始している。これまでの研究により、全細胞タンパク質からのリン酸化タンパク質の濃縮・精製法と蛍光標識二次元ディフュージョン電気泳動 (2D-DIGE) 技術を組み合わせることにより、Akt経路およびMAPキナーゼ経路に位置するリン酸化タンパク質を網羅的に検出できることを明らかにした。本研究ではこの手法をさらに発展させ、AktおよびMAPキナーゼの新規基質を多数同定した後、その機能解析を進める予定である。

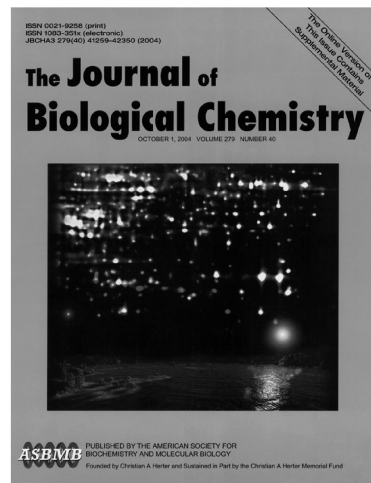
〈研究開始時の研究計画〉

まずガリウムイオンを用いたIMACによるリン酸化タンパク質の濃縮・精製法の改良を試みる。次いでヒトインスリン受容体を過剰発現しているCHO-IR細胞を用いて、インスリン刺激によって増大し、かつwortmanninやLY294002などのPI3キナーゼ阻害剤で前処理するとインスリンによる増大が抑制されるスポットを2D-DIGE法によって検索する。ERK MAPキナーゼ経路の検索には活性化型B-Rafをエストロゲン受容体との融合タンパク質として発現しているNIH3T3細胞を用いて、エストロゲン受容体アンタゴニスト4-HTでRaf-MEK-ERK経路を選択的に活性化させ、MEK阻害剤U0126で処理した場合と比較して増大するスポットを検索する。またp38 MAPキナーゼ経路の検索には、HeLa細胞においてアニソマイシン刺激によって増大し、かつSB203580前処理によって抑制されるスポットを検索する。このとき微量なリン酸化基質のスポットの分離を可能にするため、上述のIMACにより細胞粗抽出液からリン酸化タンパク質を精製してから2D-DIGEを行う。このIMACと2D-DIGE技術の併用により、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する。

〈研究期間の成果〉

ガリウムイオンを用いたIMACにおいて、キレート担体、pHやイオン強度等の至適化により、全細胞抽出液からリン酸化タンパク質を約10倍濃縮することに成功した。そして2D-DIGE解析ゲルイメージにおいて変動が認められたスポットを切り出した後、MALDI-TOF型質量分析計を用いてPMF解析を行った。ERK経路の解析で同定された33種類のタンパク質において、14種類はMEK1/2, ERK1/2, RSK2, cPLA2, hnRNP K, caldesmon, cortactin, vinexin, lamin A/C, eIF4Eなどの既知のERK経路構成因子であり、残りの19種類は新規ERK基質の候補と考えられた1)。この中から特に興味深い候補を10個選択してcDNAクローニングを行い、GST融合タンパク質として

発現させたところ、1個を除いて活性化型ERK2によってin vitroで強くリン酸化された。このin vitroでのリン酸化部位を質量分析計で同定し、抗リン酸化抗体を作製することにより、核膜孔複合体構成因子Nup50と細胞質ダイニンの中間鎖がin vivoにおける新たなERK基質であることを明らかにした。またp38経路の新規構成因子として、MAPKAPキナーゼ2の基質となるBAG2を見出した2)。



〈国内外での成果の位置づけ〉

キナーゼ基質の同定法には、cDNA発現ライブラリーをフィルター上でリン酸化するスクリーニング法、酵母two-hybrid法、コンセンサス配列に基づくデータベース検索などが用いられている。我々のアプローチはこれら従来の方法とは全く異なるプロテオミクス的手法であり、Akt及びMAPキナーゼの新規基質を見出すことができると期待される。IMACでリン酸化タンパク質を精製してから2D-DIGEすることにより、異なるゲル間の泳動誤差を排除しつつ微量因子を同定することが可能となった。このためERK経路の活性化状態が異なる細胞粗抽出液を別々に二次元電気泳動して比較した以前の報告と比較して網羅性が高くなった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

インスリンやアニソマイシンのような細胞外因子による刺激で調製したサンプルでは、エストロゲン受容体との融合タンパク質を用いた誘導系で調製したサンプルと比べて変動スポットの数が少なかった。またCHO細胞ではデータベースが不十分のためにPMF解析によるタンパク質同定がやや困難であった。しかしながら変動スポットの一部はAktのリン酸化コンセンサスに対する抗体と反応したため、Akt基質である可能性が高く、現在MALDI-TOF/TOF型質量分析計による同定を進めている。

〈今後の課題〉

IMACと2D-DIGE技術に加えて他の手法をさらに併用することにより、出来るだけ多数のAktおよびMAPキナーゼ基質を同定する。例えばタンパク質の等電点や細胞内局在の違いに基づく分画、高分子量タンパク質の分離を可能とするアガロースゲルを用いた等電点電気泳動、リン酸化モチーフに対する抗体、タンパク質間の特異的

相互作用などを利用する。またエストロゲン受容体との融合タンパク質などを用いた誘導系でAkt経路を活性化できるヒトかマウスの細胞を樹立する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 小迫英尊, 牛山正人, 服部成介 (2004) 2D DIGE技術を用いたリン酸化プロテオーム解析によるシグナル伝達経路構成因子の網羅的同定法. 実験医学, 22 (9) , 1299-1304.
- 2) Ueda, K., Kosako, H., Fukui, Y. and Hattori, S. (2004) Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate. J. Biol. Chem., 279 (40) , 41815-41821.