

研究題目 分裂期染色体のリン酸化ネットワークを理解する機械学習による革新的手法の確立

研究組織

研究代表者：太田信哉（高知大学医学部）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

現在、細胞周期を動かす分子を標的とした抗がん剤が、がんの治療に広く貢献している。そうした抗がん剤創薬に際して、とりわけ注目されているのがタンパク質のリン酸化であり、これは分裂期の染色体動態の制御に深く関わる。分裂期の染色体には様々なキナーゼが集合し、それぞれ複数のタンパク質をリン酸化することで、染色体の構造や動態をコントロールしている。しかし、従来の細胞生物学を基盤とする研究からは、構造や動態の全体を理解するに十分な知見が得られていない。研究代表者は、自身が構築した染色体プロテオミクス的手法を用いて、個々のキナーゼがどのように分裂期の染色体を制御しているのかを包括的に明らかにする。

そのために、機械学習を導入することで、プロテオミクスによる研究を生命システムの全体像を理解する研究へと進化させる。これまでに開発した複数の機械学習によるタンパク質間の制御構造を予測する手法を、タンパク質のリン酸化の制御に対して最適化し、リン酸化を中心としたタンパク質機能を制御するネットワークを明らかにする。最終的に質量分析で観測可能な全てのリン酸化の相関を、コンピュータ上に表示することを目標とする。

[1-2]研究の方法・経過

非常に数多い分裂期におけるリン酸化は、個々のタンパク質機能の ON と OFF の制御のみならず、複数のリン酸化が階層的に制御し合うことで、複雑で緻密に分裂期の進行を制御している。この制御機構を明らかにすることは、

疾患メカニズムを理解することにつながり、抗がん剤治療で抱えている副作用等の問題点を克服するために必要不可欠な試みである。

本研究では、これまでに構築してきた、①分裂期染色体タンパク質のプロテオーム解析技術、②分裂期特異的リン酸化同定技術、そして③プロテオミクスから *in silico* でタンパク質の階層構造に迫る nano Random Forest 法 (NRF) の 3 つの技術を駆使することで、分裂期染色体のリン酸化修飾を介したタンパク質の高次ネットワークの理解を試みる。

本研究期間においては、AuroraB キナーゼをモデルに、ラベルフリーの絶対定量を基にした実験系の確立を試みた。そのために、AuroraB キナーゼの阻害剤である ZM447439 を添加した状態で分裂期に同調した細胞から分裂期染色体 (AuroraB^{OFF}) を単離し、野生型 (WT) のそれと比較することにした。また、タンパク質の同定のみならずペプチド断片処理後に HAMMOC (Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography) によるリン酸化ペプチドの濃縮し、質量分析でリン酸化サイトを同定定量することも可能である。本研究期間内に WT と AuroraB^{OFF} に関して、タンパク質とリン酸化の絶対定量をそれぞれ 4 回ずつ計 16 回の測定を行ない、多くの AuroraB キナーゼ依存的リン酸化サイトの候補も見出した。

しかし、それぞれ 4 回の野生型と AuroraB^{OFF} の測定結果を元に、スペクトラム強度からの個々のタンパク質の定量を試みると、個々の測定間では再現良く全タンパク質を定量比較することは困難であることが示唆された。また、同様にそれぞれ 4 回行った野生型と AuroraB^{OFF} のリン酸化サイトの定量に関しても同様の結果が結論付けられた。これは、トリ

プシン等によるペプチド断片化と HAMMOC 法に定量的な再現性が低いことを示唆している。そこで、SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture)を用いた、野生型との相対定量を行うこととした。これにより、絶対定量の再現性を補い、再現性の高い相対定量値を測定することが期待できる。

また、研究計画に基づいて同様の実験系で Polo-like-kinase1 (PLK1)キナーゼの阻害剤 BI 6727、Haspin キナーゼの阻害剤 5-Itu、Mps1 キナーゼの阻害剤 Reversine を、それぞれ ZM447439 と置き換えて染色体を単離可能であることを確認した。これにより、それぞれの阻害標的のキナーゼを OFF にした分裂期染色体のリン酸化プロテオームを観察が可能である。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本研究期間中に改良を重ね構築した分裂期染色体のリン酸化サイト同定系においては、一度に約 3000 サイトのリン酸化を見だし、定量することができた。本測定系は非常に効率よくリン酸化サイトを同定可能し、限られた量の試料からでも、十分な数のリン酸化を一度の決定できるものである。

これらのうち一部のリン酸化は AuroraB キナーゼの阻害剤である ZM447439 を添加した細胞から単離した分裂期染色体 (AuroraB^{OFF}) には観察できない。すなわち AuroraB キナーゼ依存的なリン酸化サイトである可能性を示唆している。特に、AuroraB キナーゼが直接結合している染色体パッセンジャー複合体のタンパク質の一つである INner CENtromer Protein (INCENP)の C 末端の TSS モチーフのリン酸化が AuroraB キナーゼにより制御されていることを初めてプロテオミクスにより確認することを可能にした。しかし、一部の既知の AuroraB キナーゼ依存的なリン酸化を確認するには十分な結果であるが、未知の AuroraB キナーゼ依存的なリン酸化を決定するためには、その再現性を担保する必要がある。そのために SILAC を基盤とした測定を用いることで、これらの結果を再現することを計画している。

一方で、ヒストン上のリン酸化については、トリプシンの代わりに ArgC を用いてペプチド断片化を行うことで、同定していく計画であっ

た。しかし、ArgC を用いても、ヒストンのような塩基性タンパク質のリン酸化修飾の多くは同定できなかった。これについては、今後、異なるペプチダーゼを用いることで改善を試みていく必要がある。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究の最終目標であるシミュレーションを用いたリン酸化ネットワークの解明が可能になれば、これまで指摘されてこなかったタンパク質相互作用や、制御の階層構造の発見につながり、クロマチン関連分野に留まらない生体分子システムの理解と予測の手法を示していくことにつながる。

【4】今後の課題等

今後は、計画しているキナーゼ阻害剤で処理した細胞から分裂期染色体を単離し、質量分析をしていくことで、分裂期染色体タンパク質のリン酸化について、その責任キナーゼの決定を積み重ね、シミュレーションに必要な大規模データの取得を目指す。そして、それらの結果をコンピュータシミュレーションで組み合わせることにより、リン酸化による分裂期制御構造の全体像を明らかにしていく。