

研究題目 プロテオミクスを基盤とした分裂期染色体における タンパク質リン酸化ネットワークの大規模解析

研究組織

研究代表者：太田 信哉（高知大学医学部 生化学講座）

共同研究者：谷口 寿章（徳島大学先端酵素学研究センター 疾患プロテオミクス研究分野）

【1】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。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、複雑かつ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、分裂期染色体タンパク質のプロテオーム解析技術、分裂期特異的リン酸化同定技術、そして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。本年度は、数種類の責任キナーゼによる分裂期染色体タンパク質のリン酸化サイトの決定を目標に研究を進めた。

【2】研究の方法・経過

[2-1]

Bromodomain Adjacent to Zinc finger domain protein 1B (BAZ1B) は、DNA の 2 本鎖切断時にその修復のためのシグナルとしてヒストン H2A.X の Y142 をリン酸化するキナーゼである。我々は既に BAZ1B キナーゼ欠失変異体 (BAZ1B KO) および、BAZ1B とその類似タンパク質 BAZ1A の両方を欠失した変異体 (BAZ1A/B double-KO) を保持している。したがって、これらの細胞から分裂期染色体を単離し、そのタンパク質組成を Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture (SILAC) と質量分析で定量的に解析すれば、野生型と

BAZ1B キナーゼ非存在の分裂期染色体プロテオームを比較できる。また、ペプチド断片処理後に Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography (HAMMOC) によるリン酸化ペプチドを濃縮し、質量分析を用いた網羅的なリン酸化の定量比較も行い、BAZ1B キナーゼの分裂期染色体に及ぼす影響を確認した。

[2-2]

次に、細胞の生存に必須のキナーゼ非存在下の分裂期染色体を解析するために、CDK1 活性が PP1 アナログ物質 1NMPP1 感受性である変異体細胞を用いて研究を進めることとした。この細胞は 1NMPP1 の添加により簡便に分裂期進入直前の G2 期に同調させられる。この 1NMPP1 と AuroraB キナーゼ阻害剤 ZM447439、あるいは Haspin キナーゼの阻害剤 BI 6727 を組み合わせて用いることで、AuroraB や Haspin の活性を G2/M から分裂期まで阻害し、標的キナーゼの非影響下の分裂期染色体を単離することに成功した (図 C, D)。本年度は、そのうち AuroraB 阻害剤で処理した細胞から単離した分裂期染色体のタンパク質組成と含まれるタンパク質リン酸化を、[2-1] と同様に質量分析で定量し、野生型のそれと比較した。

【3】研究成果

[3-1]

BAZ1B KO および BAZ1A/B double-KO 細胞より生化学的に単離した分裂期染色体から 1,438 種類のタンパク質の野生型との変化を定量的に測定し、新たな知見を獲得した。例えば、クロマチン制御因子の一つである SWI/SNF-related Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily A member 5 (SMARCA5) が BAZ1B に、分裂期染色体 periphery タンパク質 Ki-67 は BAZ1A か BAZ1B のどちらか一方に依存して分裂期染色体に結合することを見出した (図 A)。

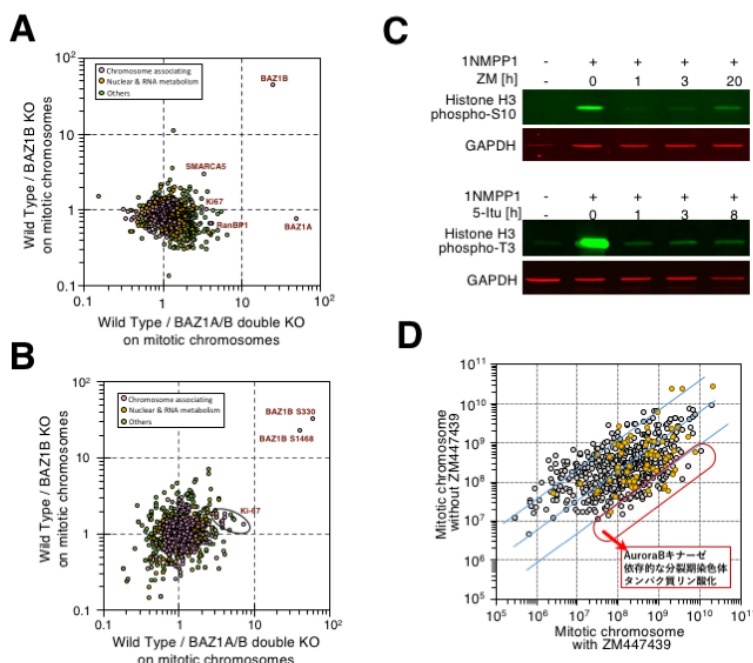


図 (A, B) 分裂期におけるBAZ1B KO染色体とBAZ1A/B double-KO染色体のタンパク質組成変化(A)とタンパク質リン酸化(B)の定量比較 (C) 1NMPP1による同調後、AuroraBキナーゼ阻害剤 (ZM447439、上段) とHaspinキナーゼ阻害剤 (5-Iodotubercidin、下段)の添加による分裂期特異的リン酸化に対する効果のウェスタンブローディングによる確認 (D) AuroraBキナーゼ阻害剤 (ZM447439)の有無による分裂期染色体タンパク質リン酸化の違いの定量比較

一方で、BAZ1 タンパク質には分裂初期の染色体凝縮への関与が、我々の機能解析から示唆されている。しかし、本研究で定量したコンデンシン複合体サブユニットやトポイソメラーゼ II といった染色体凝縮に関与する他のタンパク質は、BAZ1 タンパク質に非依存的に分裂期染色体に結合することがわかった。さらに我々は、4,151 のリン酸化サイトの同定・定量を行う事ができた。しかし、分裂期特異的な染色体上のBAZ1キナーゼに依存した有益なリン酸化の同定には至っていない (図 B)。

[3-2]

ZM447439 存在下で単離した分裂期染色体に含まれるタンパク質のリン酸化を先述のHAMMOGと質量分析を利用し同定、定量した。定量結果を野生型の染色体タンパク質リン酸化と比較し、多くのリン酸化は野生型とAuroraBキナーゼ不活性型の分裂期染色体で変化しないが、一部のリン酸化については、リン酸化の度合いが1/10以下にまで低下していることを確認した。つまり、それらがAuroraBを責任キナーゼとするリン酸化である可能性が高い。例えば、動原体において微小管との接着に必須のKNL2のS246や分裂期の染色体構造形成を担うトポイソメラーゼIIαのS1499のリン酸化がそれにあたる (図 D)。反対に、シュゴシンのS578のリン酸化が10倍程度に増加していることは興味深い。分裂期特異的な脱リン酸化酵素をAuroraBキナーゼが制御している可能性が考えられる。これらを含め、ここで得られたデータは、分裂期染色体の制御機構を理解する上で重要なリソースとなる。

【4】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。

【5】主な発表論文等

学会発表

Quantitative proteomics revealed that BAZ1 proteins regulate the precious timing of chromosome condensation in early mitosis

第15回日本プロテオーム学会2017年年会、シンポジウム「Basic biology (Animal)」

大阪、2017年7月

【6】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。