

平成 30 年 3 月 29 日

平成 29 年度徳島大学先端酵素学研究所
「酵素学研究拠点」共同利用・共同研究
成果報告書

京都大学大学院生命科学研究科
吉村成弘

研究項目

共同利用 A-3 (プロテオーム解析) (担当 : 小迫英尊教授)

研究課題

分裂期移行に伴うタンパク質リン酸化のプロテオーム解析

研究の背景

分裂期の細胞では、核膜の崩壊、染色体の凝縮・分配・脱凝縮、紡錘体の形成、収縮環の形成などの大規模な構造変化・構造再編が進行する。一連の大規模構造再編を引き起こす要因として重要なのが、サイクリン依存型キナーゼをはじめとする分裂期キナーゼおよび脱リン酸化酵素群によるタンパク質の大規模なリン酸化-脱リン酸化サイクルである。近年のリン酸化プロテオミクスによると、分裂期におけるリン酸化は、タンパク質の種類で千種以上、部位の数では 1 万ヶ所以上にのぼる。しかし、このような「部位」の情報が蓄積する一方で、細胞内で実際にどれだけのタンパク質がリン酸化されているかという「量的」な問題は未解決のままである。そこで本研究では、分裂期移行に伴うタンパク質リン酸化の増減を、タンデムマスタグ (TMT) 法を用いた質量分析により定量解析し、細胞分裂における大規模構造再編におけるリン酸化の役割を明らかにすることを目的とする。

研究の方法

分裂期に同調もしくは非同調（間期）の HeLa 細胞をグアニジン塩酸バッファーで溶解し、トリプシン消化を行った。得られたペプチドを同位体元素を含む 6 種類のタンデムマスタグ試薬でラベルしてから混合し、酸化チタン (TiO_2) でリン酸化ペプチドを濃縮した後に質量分析器で測定した。データ解析ソフト Proteome Discoverer によって大規模な比較定量データを得た後に、様々なデータベースへの参照を行って核膜孔・染色体・核小体などの再編に関与すると推測されるリン酸化ペプチドの候補を絞り込んだ。これらの候補ペプチドについて、parallel reaction monitoring (PRM)法によって精密な比較定量解析を行った。

研究の成果

総数 17,003 種のリン酸化ペプチドを検出した。10,128 個の定量比較可能なリン酸化部位のうち、間期と分裂期に 1.5 倍以上の差がある部位は、4,544 個であった。このうち、分裂期に多く存在するリン酸化部位は 3,401 箇所に及んだ。このことは、間期から分裂期への移行に伴い、細胞内タンパク質のリン酸化量が増加することを示す。この結果は、他の生化学的実験によるリン酸化タンパク質の定量結果とよく一致する。また、分裂期リン酸化では、間期のリン酸化と比べて、1 タンパク質あたりのリン酸化部位の数も多く、複数リン酸化が分裂期リン酸化の特徴の 1 つとして抽出された。

次に、リン酸化部位の構造的特性及び保存性を解析した。分裂期に有意にリン酸化される部位は、間期に有意にリン酸化される部位と比較して、天然変性領域外により多く存在し、より保存されている（ラットとの比較）ことが特徴的であった。これは、リン酸化による、分裂期の厳密なタンパク質制御を表していると考えられる。しかし逆に、天然変性領域内に存在し、保存性の低いリン酸化部位もまた、分裂期リン酸化に特徴的に見られた。これは、部位特異的なタンパク質の厳密な機能・構造制御と、部位非特異的なリソ酸基付加によるバルクな効果という、分裂期における 2 つの異なるリン酸化の役割を示唆している。

さらに、分裂期に有意にリン酸化される部位のモチーフ解析を行った。CDK や MAPK などが属する Proline-directed : ([pS/pT]-P)、PLK1 やカゼインキナーゼなどが属する Acidophilic : ([pS/pT]-X-X-[D/E]、または[pS/ pT]-X-[D/E]、または[D/E]-X-[pS/pT])、PKA や PKC、Aurora キナーゼなどが属する Basophilic : ([K/R]-X-X-[pS/pT]、または[K/R]-X-[pS/pT]) の典型的な 3 種類のモチーフに分類したところ、いずれのモチーフにも当てはまらず、かつ天然変性領域内に存在する部位が、分裂期に特異的にリン酸化されることが分かった。このリン酸化部位をさらに詳細に解析したところ、リン酸化部位の C 末側にリシン、アルギニンを多く持つ非典型的な Basophilic モチーフであった。この非典型的な Basophilic モチーフを多く持つタンパク質として、増殖マーカータンパク質である Ki-67 が挙げられた。Ki-67 は分裂期の凝縮染色体の構造に深く関与しており、非典型的なリン酸化部位の分裂期における重要な役割が示唆される。現在、非典型的な Basophilic モチーフをリン酸化するキナーゼの同定及び、そのようなリン酸化の分裂期における機能解析を進めている。