

ヒトのタンパク質キナーゼ基質の大規模同定に成功

—細胞内情報伝達の全貌の解明に向けて—

概要

生体内では生命現象の維持のために様々な情報伝達が行われています。タンパク質のリン酸化修飾は細胞内のシグナル伝達にとって最も重要なメカニズムの一つで、様々な生命現象のみならず、がんなどの疾病発症とも深く関連しています。ヒトの場合、500種類以上のタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）が存在すると考えられていますが、多くのキナーゼについては詳細な機能がほとんど分かっていません。

このような問題を解決するために、京都大学大学院薬学研究科の石濱泰 教授、杉山直幸 同准教授らのグループは、ヒトの全タンパク質キナーゼのおよそ70%について、試験管内（*in vitro*）で細胞破砕物とリン酸化反応を行い、質量分析を用いてリン酸化されたタンパク質とその修飾部位の同定を行いました。本研究で得られた大規模な *in vitro* 基質情報は、今まで報告されていたキナーゼの基質情報をはるかに上回るものであり、細胞内シグナル伝達の全貌を解明したり、キナーゼを標的とする抗がん剤などの創薬を行ったりする上で有用なデータソースとなることが期待されます。

本研究成果は、2019年7月19日に国際科学誌「Scientific Reports」のオンライン版に掲載されました。

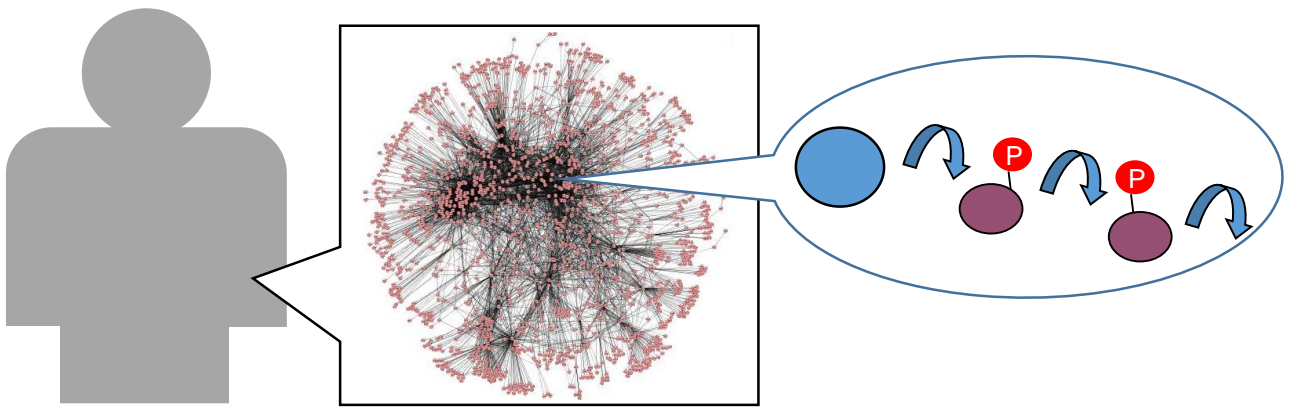


図 細胞内のシグナル伝達ネットワークおよびタンパク質のリン酸化修飾

1. 背景

生体内では生命現象の制御、維持のために、細胞の内外で様々なシグナル伝達が行われています。タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達において最も重要な翻訳後修飾の一つであり、ヒトには 500 種類以上のタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）が存在することがゲノム情報から分かっています。このような多くの種類のキナーゼがそれぞれ異なる機能を持つことによって細胞内の複雑なシグナル伝達ネットワークが形成されると考えられていますが、多くのキナーゼはその機能やリン酸化する相手のタンパク質（基質タンパク質）が十分に解明されていません。

研究グループはこれまでにヒトや植物、細菌などの細胞内で起こるタンパク質リン酸化修飾の大規模解析（リン酸化プロテオミクス）を行ってきましたが、得られたリン酸化情報の大部分は生命にとってどのような意味があるのかが不明なままでした。各キナーゼがどのような性質を有していて、どのタンパク質をリン酸化するか（基質タンパク質）が明らかになれば、細胞内のシグナル伝達ネットワークの全体像を理解することが出来るのではと考え、本研究ではヒトの全キナーゼ（キノーム）の基質タンパク質の同定に着手しました。

2. 研究手法・成果

本研究ではヒトの全キナーゼのおよそ 70%に相当する 354 種の組換え体キナーゼに対して、試験管内 (*in vitro*) で細胞破砕物と反応を行い、リン酸化された基質タンパク質およびリン酸化されたアミノ酸の位置を液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) によって同定しました (図 1)。これまでに我々のグループで開発したヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー法 (HAMMOC 法) を用いたリン酸化ペプチドの高選択的濃縮と安定同位体標識による定量解析を利用することで、大規模かつ信頼性の高いキナーゼの *in vitro* 基質の同定を行いました。

その結果、計 17 万以上のキナーゼ - 基質間情報を同定し、各キナーゼがどのような周辺アミノ酸配列を好んでリン酸化するかという特性（リン酸化モチーフ）の抽出に成功しました (図 2)。

得られた情報に基づき、各キナーゼを分類したところ、従来の分類法では区別できなかった、リン酸化アミノ酸（セリン、スレオニン、チロシン）の割合を反映した新しい分類を創出することができました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で得られたキナーゼの大規模な *in vitro* 基質情報は、生理的条件下における各キナーゼの基質や機能の予測、様々な生命現象の制御メカニズムや細胞内シグナルネットワークの全貌を解明する上で非常に有用なデータソースとなると考えます。特定のキナーゼの変異や過剰発現によるタンパク質リン酸化の異常はがんをはじめとした多くの疾患と深く関連していることから、詳細な細胞内シグナルネットワークの理解や観測は、がん等の疾病診断や治療、あらたな創薬ターゲットの発見につながることを期待できます。

今後、この大規模情報をもとに、さらなる技術開発や情報科学を駆使して、キナーゼの選択的活性計測法や生理条件下におけるキナーゼ基質予測法の開発を進めていきたいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は科学技術振興機構 (JST) 育成研究 (課題番号: 8003058)、JST - 日本医療研究開発機構 (AMED) 先端計測 (課題番号: 13414532, 15652450)、JST A-STEP プログラム (課題番号: 17937296)、日本学術振興会科学研究費補助金 (課題番号: 11J04789 (今村春菜), 26830125 (杉山直幸), 16K07198 (杉山直幸), 18H04799 (杉山直幸), 21310129 (石濱 泰), 24241062 (石濱 泰), 17H03605 (石濱 泰)) の助成を受けて行わ

れました。また、研究の初期段階は慶應義塾大学先端生命科学研究所で実施され、山形県および鶴岡市の研究助成を受けて行われました。

<研究者のコメント>

ヒトのゲノムにコードされている 500 種類以上のタンパク質キナーゼの内、十分にその機能や基質が研究されているものは限定されています。本研究によって同定されたキナーゼの *in vitro* 基質情報は既存情報を大きく上回るものであり、今後は生理条件におけるキナーゼ基質の同定、および細胞内シグナル伝達の全体像の解明に展開していきたいと考えています。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. (ヒトキノーム基質の大規模同定)

著者：杉山直幸、今村春奈、石濱 泰

掲載誌：Scientific Reports DOI：10.1038/s41598-019-46385-4.

< 参考図表 >

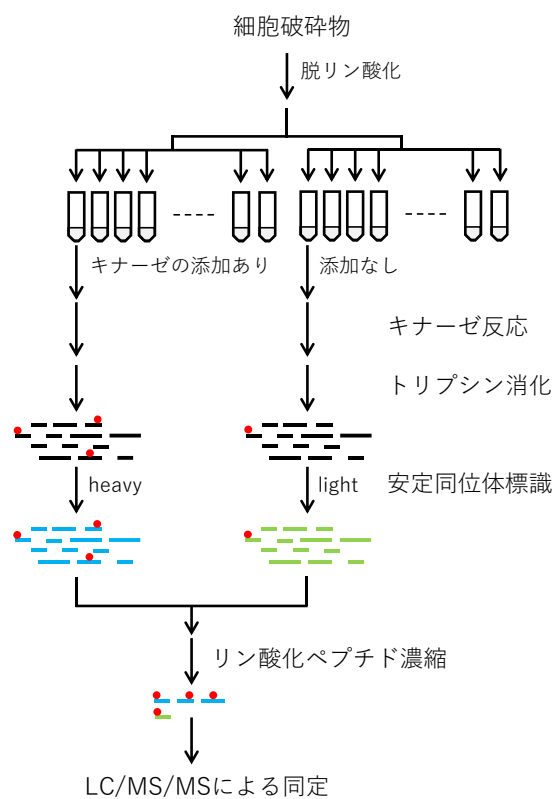


図1 実験の概要

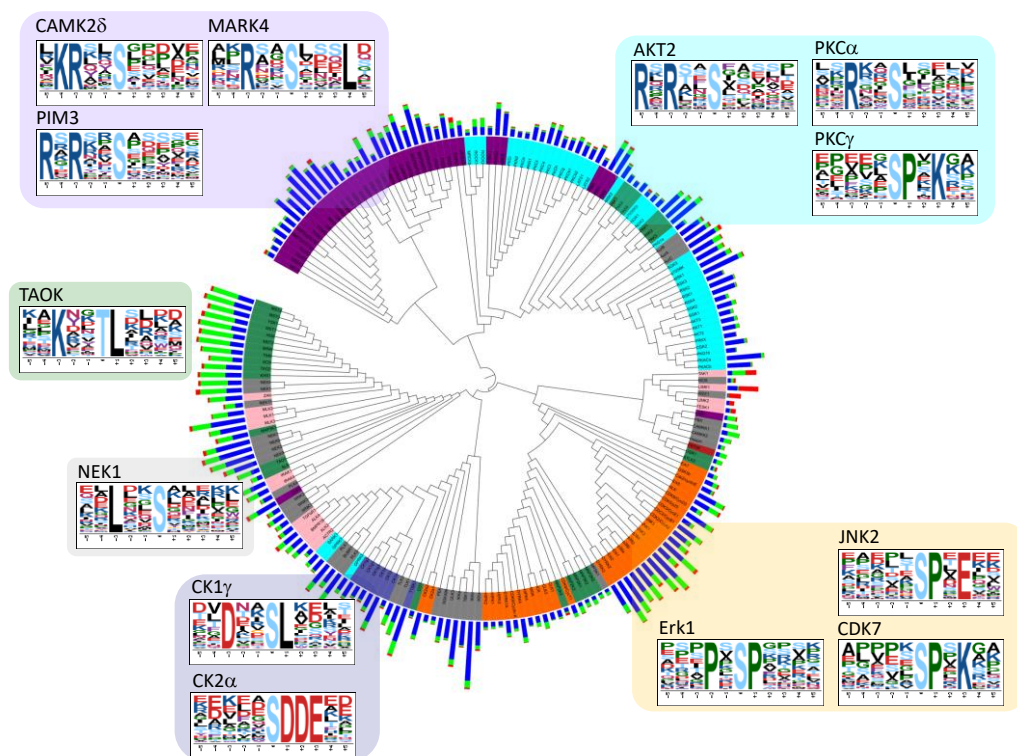


図2 取得したリン酸化モチーフの一部

各キナーゼの基質タンパク質に共通する、リン酸化修飾部位周辺のアミノ酸配列（リン酸化モチーフ）を表しています。例えば CAMK2δ の場合、XKRXXSXXXX (K,R,S はそれぞれリジン、アルギニン、セリン、X は任意のアミノ酸) というアミノ酸配列をリン酸化する傾向があることを示しています。