

2015 年 学会賞受賞者論文 総合論文

2-D DIGE 法による細胞内シグナル伝達系の解析

服 部 成 介 *^{1,2}

*E-mail: hattoris@pharm.kitasato-u.ac.jp

¹ 東京大学医科学研究所細胞ゲノム動態解析動態 (ピー・エム・エル) 寄付研究部門: 108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

² 北里大学薬学部生化学教室: 108-8641 東京都港区白金 5-9-1

(受付 2016 年 4 月 22 日, 改訂 2016 年 5 月 31 日, 受理 2016 年 6 月 1 日)

プロテオミクス技術により, 細胞内シグナル伝達系の動態を解析することは, その構成タンパク質の細胞内含量が少ないため困難である。それゆえ, 目的の成分を濃縮する方法とプロテオミクス技術との組合せが有効である。筆者らは, ラフトタンパク質の単離と蛍光ディフレンスゲル二次元電気泳動 (two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis: 2D-DIGE) の組み合わせにより, T 細胞の初期応答が解析できることを示した。さらに, IMAC によるリン酸化タンパク質の精製法を確立し 2D-DIGE と組み合わせることにより, p38 MAP キナーゼ基質や ERK 基質を網羅的に同定することが可能となった。ERK 基質は多様な機能を示すタンパク質群から構成されていた。その中には核膜孔タンパク質が複数含まれており, これらのリン酸化は核輸送タンパク質との相互作用を低下させ, 核移行制御機構として関与することが判明した。

1 はじめに

筆者は, 長年がん遺伝子産物の機能解析を通して細胞増殖を制御するシグナル伝達系の研究に従事してきた。その当時から, シグナル伝達系の解析にプロテオミクス技術を応用できないかずっと考えていた。すなわち, 増殖刺激に対する細胞の初期応答を, プロテオミクス技術で解析するシステムを創出することである。しかし, 筆者が研究を開始した 2002 年当時は, 二次元ゲル電気泳動と液体クロマトグラフィー-タンデムマスマス質量分析計 (LC-MS/MS) という二つのプロテオミクス技術は, とともに細胞内シグナル伝達系解析には充分な解像度と感度を備えておらず, 解析の対象とする成分を効率よく濃縮する前分画法 (prefractionation) との組合せが必要であると考えられた。筆者らは, 適切な前分画法と二次元ゲル電気泳動との組合せにより, T 細胞ラフトにおける抗原刺激時の動態や, キナーゼ活性化によるリン酸化プロテオームの変化を解析する方法を確立した。これら一連の研究により, 筆者は 2015 年度の日本プロテオーム学会学会賞を拝受する栄誉に浴した。本総説は受賞講演に基づき, その内容に研究の経緯, 当時の研究背景等を加筆したものである。筆者らの研究は, 二次元ゲル電気泳動を用いて行われたが, 前分画法とプロテオミクス技術の組合せは, 将来においても重要な研究手法であり, 本総説での記述は他の分画法を用いる場合でも有用であろう。

2 細胞内シグナル伝達系研究の歴史

細胞内シグナル伝達系の研究は, がん研究とともに発展してきた。1911 年のラウス肉腫ウイルスの発見¹⁾, ラウス肉腫ウイルスのがん遺伝子としての *src* の発見と細胞相同遺伝子の発見 (1976 年)²⁾, *Src* がチロシンキナーゼであることの証明 (1979 年)³⁾, *ras* 遺伝子のヒトがんにおける活性化 (1982 年)⁴⁾ などである。その後, 多くのがん遺伝子の単離とその機能の解明は, 細胞増殖を制御するシグナル伝達系の全貌を明らかにし, がんが細胞増殖シグナルを制御する系の異常に起因するという概念が確立された。

近年では, 細胞内シグナル伝達系の異常ががんにとどまらず極めて広範な範囲の疾患の原因であることが明らかとなり, 疾患特異的な異常タンパク質を標的とした分子標的薬が競って開発されている。従来の治療薬が対症療法であったのに対し, 疾患の原因を直接標的とする分子標的薬は, 高い治療効果とともに副作用の軽減が期待されている。特にがんを対象とした分子標的薬の開発には矚目するものがある。分子標的薬の標的のほとんどは, タンパク質キナーゼであり, その中で特にチロシンキナーゼがその対象となっている。

3 がん研究におけるプロテオミクスの敗因とそこからのスタート

先に述べた通り, 筆者は細胞内シグナル伝達系, 中でもがんを対象とした異常なシグナル伝達系を研究していたこ

とから、二次元ゲル電気泳動によるがんと正常組織のプロテオームの比較には、大きな興味を持って注目していた。しかし、筆者がプロテオミクス研究を開始した2002年までに2,000を越す研究が発表されたにもかかわらず(PubMed 検索による)、二次元ゲル電気泳動を用いてがんの発症原因に迫る研究は、一つも存在しなかった。

一方で、がんのゲノム DNA 断片をマウス正常線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) に導入することで、体細胞変異を生じたがん遺伝子を単離する試みは、ヒト腫瘍細胞株からの変異 *ras* 遺伝子の単離を端緒として、これまでに200以上のがん遺伝子の単離という大きな成功をもたらした。プロテオミクス技術により細胞内シグナル伝達系の動態を可視化するためには、この問題は避けて通れない大きな問題であった。

現在では、がんは遺伝子の変異が蓄積することによって発症する疾患であることが明らかとなっている⁵⁾。その結果、がん種によって変異が生じる遺伝子は異なっているが、①細胞の増殖を正に制御する遺伝子の活性化変異(がん原遺伝子の活性化変異)と、②細胞増殖を抑制する数種のがん抑制遺伝子の機能喪失とが同一の細胞に生じることにより発症に至るという概念が確立されている。したがって、がんの原因に迫るには、①がん原遺伝子の変異によって生じた異常なタンパク質を検出できること、②がん抑制遺伝子産物の消失が検出できること、が必要である。しかし、従来のプロテオミクス技術によるがん研究は、この二つの基準を達成できなかったことは明白である。

その原因として、がん原遺伝子産物が構成している細胞増殖を制御するシグナル伝達系因子の細胞内含量は低レベルであり、多量に存在するタンパク質に覆い尽くされて、その変化が検出できないことが考えられた。例えば、かなり量的に多く存在する ERK (extracellular signal-regulated kinase) や EGF (epidermal growth factor) 受容体でも、その細胞内含量はタンパク質重量比 (w/w) で1万分の1程度であり、Ras タンパク質は数万分の1である。Ras の調節因子群の細胞内含量はもっと少ない。Ras の GAP (GTPase-activating protein) である neurofibromin は、その遺伝子が欠失すると Ras の恒常的活性化をもたらす、若年性白血病やがんを多発する神経線維腫症を発症するが、その含量は10万分の1以下である。筆者らが精製し、その遺伝子を単離した別の Ras GAP である Gap1^m は数十万分の1であった⁶⁾。逆に、こうした因子が二次元ゲル電気泳動で可視化できれば、十分な分解能を備えていると考えることができる。そのためには、Fig. 1 の虫眼鏡で示したような、なんらかの拡大法、すなわち前分画法が必要となる。

4 プロテオミクスと前分画法の組合せ

プロテオミクスに用いられる前分画法として、細胞分画

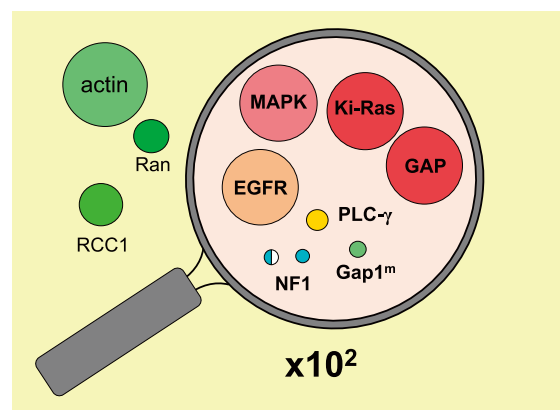


Fig. 1 Low abundance of signal transduction components

Detection of signaling events using proteomics is technically challenging because of the low abundance of signaling proteins.

法、カラムクロマトグラフィー、中心体や紡錘体などの複合体の単離、特定の翻訳後修飾を受けたタンパク質の濃縮などがある。筆者らは、ラフト画分の単離およびリン酸化タンパク質の精製と二次元ゲル電気泳動とを組合せることにより、従来ウェスタンブロッティングでしか検出することができなかった細胞内シグナル伝達系因子の動態を、二次元ゲル電気泳動上のスポットそのものの変動として可視化できることを示した。プロテオミクス技術の別のアプローチとして、LC-MS/MS があるが、当時の機器の性能は、まだ細胞内シグナル伝達系の解析に十分な分解能に達していないと判断した(その後の機器性能の驚異的な向上を予測できなかったという方が適切であるかもしれない)。

5 ラフトにおける T 細胞抗原受容体刺激応答の動態

細胞膜ラフトとは、周囲の細胞膜と脂質組成を異にするスフィンゴミエリン脂質に富む筏状の構造で、増殖因子受容体、3量体 G タンパク質、低分子量 G タンパク質、チロシンキナーゼなどシグナル伝達系の因子が集積している部位である。そこで、ラフト画分を単離して二次元ゲル電気泳動で分析することは、細胞外刺激によって誘起される初期応答を解析する上で有効であると考えた。

ラフト画分は、界面活性剤 Triton X-100 不溶性の比重が軽い膜画分として、ヒト T 細胞株 Jurkat 細胞抽出液からショ糖密度勾配遠心により調製した⁷⁾。ラフト画分には、細胞抽出液の総タンパク質の1.8%が回収されるが、ラフトに存在するチロシンキナーゼ Lck の70%が回収されるので、Lck の比活性は、一回のショ糖密度勾配遠心で約35倍に上昇する。T 細胞抗原受容体を抗体でクロスリンクすることで細胞を刺激し、未処理の細胞を対照として、両細胞からラフト画分を単離した。二つの試料のタンパク質を異なる蛍光色素で標識し、混合した後、同一二次元ゲル電気泳動で分析した。この手法を、two-dimensional

fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE) と呼ぶ。

その結果、T 細胞抗原受容体刺激にともない、二次元ゲル電気泳動上で変動するスポットとして、Lck, Fyn, Src, Yes, ITK などのチロシンキナーゼや、アダプタータンパク質 SWAP70 および SLAT, PI3-キナーゼ制御サブユニット p85, Ras 制御因子 Gap1^m などが同定された (Fig. 2A)⁷⁾。これらのタンパク質は、ラフトに移行したものの、ラフト上で翻訳後修飾を受けたものなどの可能性が考えられる。

SWAP70, SLAT, PI3-キナーゼ p85 サブユニットおよび Gap1^m が同定されたスポット周辺の領域に対して、それぞれの因子に対する抗体を用いたウェスタンブロットティングを実施したところ、二次元ゲル電気泳動上での変動を示すスポットとウェスタンブロットティングで検出されるスポットがよく一致していた (Fig. 2B)。この結果はラフトでシグナル伝達を担う分子の動態が、タンパク質スポットの変化そのものとして可視化できたことを意味する。Gap1^m は、筆者らがラット脳から 30 万倍に精製した因子である。Gap1^m の精製はかなり困難であったが、その因子にゲル上で再会したことは、ちょっとした感動であった。その後の実験から、Gap1^m は T 細胞抗原受容体刺激にともないラフトに移行し抗原提示細胞との免疫シナプス間に集積すること、さらに等電点シフトを生じる翻訳後修飾を受けることも明らかとなった。

6 タンパク質リン酸化反応の全体像の可視化

ラフト精製と二次元ゲル電気泳動の組合せにより、多数

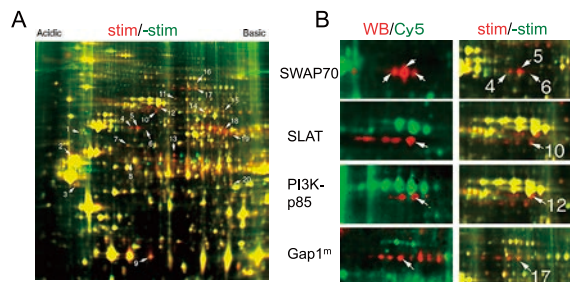


Fig. 2 Proteomic comparison of raft proteins from TCR/CD28 co-stimulated and control Jurkat T-cells

A. Raft proteins from TCR/CD28 co-stimulated Jurkat and control cells were respectively labeled with Cy5 and Cy3 dyes, mixed and subjected to 2D-DIGE analysis. Cy5- and Cy3-images are illustrated using red and green pseudo-colors. IPG strips (pI 3-10, nonlinear) were used for IEF, and 9% SDS-PAGE for the second dimension. B. Western blots for the identified proteins. Cy5-labeled raft proteins from stimulated cells were separated by 2-D gel, and subjected to western blots for indicated proteins (left panels). Signals of ECL-Plus and Cy5-labeled proteins are respectively illustrated using red and green pseudo-colors. The 2D-DIGE images of corresponding areas are shown in right panels. Data are taken from reference 8.

のシグナル伝達系因子の動態を可視化することができたが、筆者らは同時期にタンパク質リン酸化反応の可視化にも取り組んでいた。タンパク質リン酸化は、細胞内シグナル伝達系の上で最も重要な反応の一つであり、酵素活性、タンパク質間相互作用、細胞内局在、タンパク質分解など、細胞内のあらゆる反応がタンパク質リン酸化によって制御されている⁸⁾。

タンパク質リン酸化のモデル系として多くの研究報告がなされていた ERK および p38 MAP キナーゼを対象とし、その基質を網羅的に探索することとした。両キナーゼともに、極めて多彩な細胞応答に関与しているにもかかわらず、既知の基質のみでは、これらの現象をすべて説明することが困難であり、未知の基質が多数存在する可能性を想定したからである。

6-1 リン酸化タンパク質精製法の開発

はじめに、リン酸化タンパク質の精製法を検討した⁹⁾。リン酸化タンパク質の精製法は確立されていなかったため、リン酸化ペプチドの精製に用いられていた III 価のガリウムイオンを金属キレートビーズに固相化し、ガリウムイオンにリン酸基が配位する現象、すなわち IMAC を利用して精製した (Fig. 3A)。pH およびイオン強度を最適化

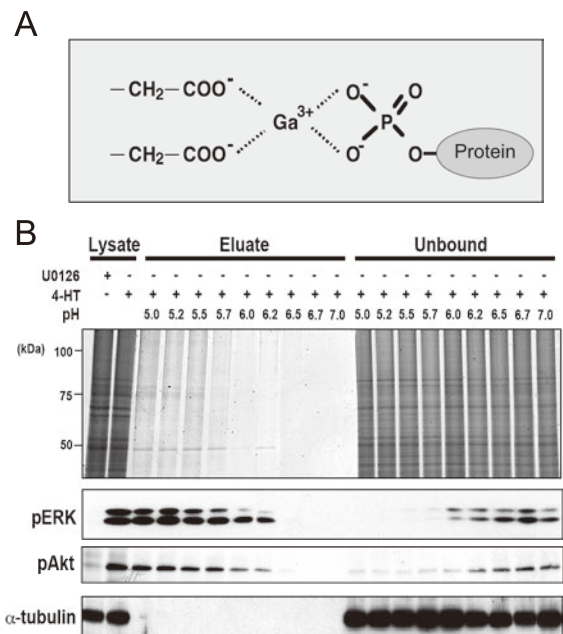


Fig. 3 Effect of pH and ionic strength on the purification of pERK and pAkt by IMAC

A. A schematic illustration of protein IMAC. B. Lysates (100 µg, 1 mg/ml) were diluted with 1 ml of MES buffer at varying pH containing 0.5 M NaCl and fractionated by IMAC. Aliquots of the lysates, the unbound fractions, and the eluates were analyzed by 10% SDS-PAGE (stained with silver, upper panel) or by western blots with anti-pERK (middle), anti- α -tubulin (middle) and anti-pAkt (bottom) antibodies. Data from reference 10.

した結果、0.5 M NaCl 存在下 pH 5.0–5.5 の範囲では、リン酸化 ERK (pERK, Fig. 3B) がほぼ定量的に回収されるのに対し、非リン酸化タンパク質である微小管タンパク質 α -チューブリンは、どの pH においてもカラムに結合しなかった。カラムに結合する総タンパク質量は、添加試料の 10% 程度であり、pERK の比活性は 10 倍に上昇した。Akt およびその基質も効率よく精製された。

その後、広島大学の木下らは、リン酸化ペプチドおよびタンパク質精製の担体として、リン酸基に対して高い特異性を有する Phos-tag を開発している¹⁰⁾。

6-2 2-D DIGE 法による細胞内リン酸化の可視化

リン酸化タンパク質精製法の確立を受けて、p38 MAP キナーゼおよび ERK 基質を網羅的に探索した。原理は、基質を探索したいキナーゼを活性化した細胞と、キナーゼ阻害剤を加えてその活性を抑制した細胞からそれぞれリン酸化タンパク質を精製し、そのパターンを 2-D DIGE 法で比較するものである (Fig. 4)。キナーゼ活性化細胞中でリン酸化される基質は、活性抑制細胞にはないスポットとして検出される。

p38 MAP キナーゼ基質の探索には、活性化剤としてアニソマイシンを、活性抑制細胞ではさらに p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 を添加した¹¹⁾。これらの細胞および対照とした薬剤無処理の細胞よりリン酸化タンパク質を精製し、2-D DIGE 法で解析した。3つの細胞のリン酸化タンパク質パターンを青 (対照細胞)、赤 (キナーゼ活性化細胞)

および緑 (活性抑制細胞) で表示し、これらのパターンを重ね合わせると、活性化細胞のみに存在する基質候補タンパク質のスポットは赤で、3種の細胞で変化しないタンパク質は白で表示される。基質候補スポットを分析したところ、Hsp27 等既知の p38 MAP キナーゼ基質が同定され、さらに BAG2 (Bcl2-associated athanogene 2) が p38 MAP キナーゼによってリン酸化されて活性化する MAPKAPK2 (MAP kinase-activated kinase 2) の新規基質であることも明らかとなった。

Fig. 5 は、この論文が掲載された *Journal of Biological Chemistry* 誌の表紙であるが、二次元ゲル上のスポットを星に見立て、闇に浮かび上がる幻想的な地球をイメージするイラストと組合せたデザインを、論文筆頭著者である植田幸嗣博士が作成したものである。同時期の研究としては、小田らが開発した SILAC 法¹²⁾ を応用し、81 タンパク質のチロシンリン酸化の変動を LC-MS/MS により解析した研究がある¹³⁾。この研究は、抗チロシン抗体による免疫沈降を前分画法としている。

6-3 ERK 基質の網羅的探索

このシステムを ERK 基質探索にも応用した¹⁴⁾。ERK を過剰発現すると、本来の基質以外にもリン酸化反応が生じる可能性があるため、ERK の上流のキナーゼである B-Raf のキナーゼ領域にエストロゲン受容体を融合したタンパク質を発現させた NIH3T3 細胞を用いた (Δ B-Raf: ER 細胞)。この細胞にエストロゲン受容体のアンタゴニスト 4-ヒド

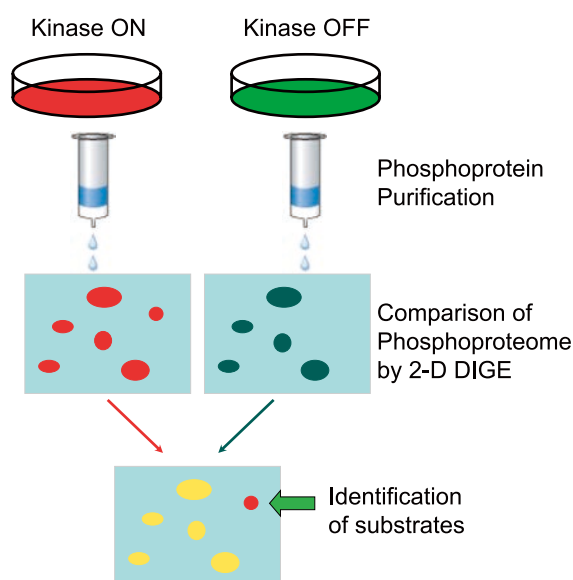


Fig. 4 Detection of substrates of a given kinase with a combination of IMAC and 2D-DIGE

A comparison of phosphoproteome of kinase-activated and kinase-suppressed cells by phosphoprotein purification and 2-D DIGE enables us to identify substrates of a given kinase. See text for details.

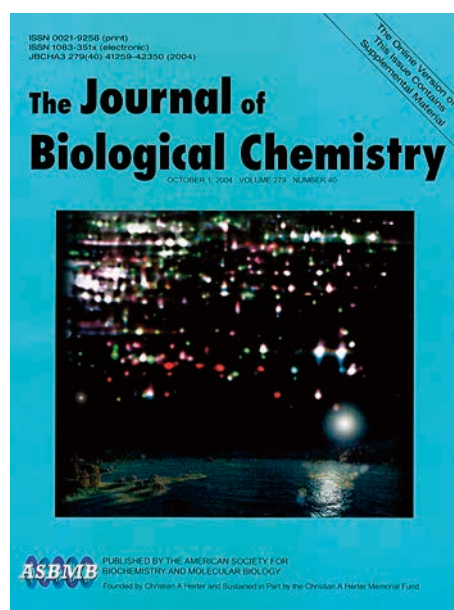


Fig. 5 The cover image of The Journal of Biological Chemistry

This cover image was designed by combining our proteomic data for the identification of p38 MAP kinase substrates with a fantastic image of the earth, likening the universe.

ロキシタモキシフェン (4-HT) を添加すると, B-Raf キナーゼ活性を可逆的に活性化することができる。

ERK 活性化細胞として 4-HT を添加した細胞を, 活性抑制細胞として B-Raf により活性化され ERK をリン酸化して活性化する MEK (MAPK/ERK kinase) の阻害剤 U0126 を添加した細胞を用い, リン酸化タンパク質パターンを比較した。その結果, 基質候補と考えられる活性化細胞のみに認められるスポット数は数十に達し, その中から 38 種のタンパク質を同定することができた (Fig. 6A)。リン酸化タンパク質精製前の抽出液を同一条件下で比較しても, 赤のスポットはほとんど検出されないことから, リン酸化タンパク質精製の有効性が確認できる (Fig. 6B)。

同定したタンパク質のうち, 既知の基質は 14 種であり, 24 種は新規基質候補であった。24 種の基質の機能は期待通りの多様性を示し, MEK1/2-ERK1/2-RSK2 と連なるキナーゼカスケードを構成する因子の他に, 細胞内膜輸送, タンパク質分解と折りたたみ, mRNA プロセッシングと輸送に関わる因子, 核膜孔複合体因子, 細胞骨格系因子, その他機能未知の因子などが同定された。

ERK の基質候補タンパク質として同定されたタンパク質を二次元ウェスタンブロットングで検証したところ, 試みた 11 種すべてのタンパク質のスポットが, ERK 活性化にともない酸性側にシフトしていた。二次元ゲル電気泳動上のスポット変化と, ウェスタンブロットングの結果を統合すると, リン酸化部位および stoichiometry に関する豊富な情報を与えてくれる。Fig. 7 は, ERK 基質 EPLIN の ERK 活性抑制細胞 (U: U0126) と活性化細胞 (4-HT) におけるウェスタンブロットングのパターンを, それぞれの細胞の二次元ゲル電気泳動でのパターンと比較したものである。活性抑制細胞で認められる緑色のスポットの連

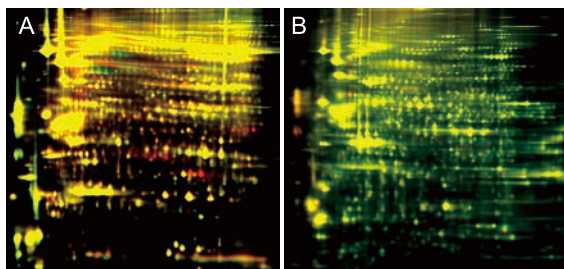


Fig. 6 Detection of ERK pathway components with a combination of IMAC and 2D-DIGE

Δ B-Raf:ER cells were treated with 20 μ M U0126 or 1 μ M 4-HT for 30 min to inhibit or activate the ERK pathway, and cell lysates were subjected to IMAC followed by 2D-DIGE. Phosphoprotein fractions (A) and total lysates (B) from ERK-inhibited or ERK-activated cells were labeled with Cy3 or Cy5, respectively. The 2D gels were scanned at different wavelengths to visualize spot patterns corresponding to proteins labeled with Cy3 (shown in green) or Cy5 (shown in red). Data are reprinted from reference 14.

なりが, 活性化細胞で酸性側にシフトしている。このようなパターンから, リン酸化 EPLIN の割合が判定でき, さらに同一分子上に複数のリン酸化部位があることも推定される。実際に EPLIN には 3 つの主要なリン酸化部位と複数の一部リン酸化される部位とが存在する¹⁵⁾。

これらのタンパク質は, ERK の直接の基質である可能性と RSK2 など下流で活性化されるキナーゼによりリン酸化される可能性がある。そこで, 14 種の組換えタンパク質を作成し, ERK によるリン酸化反応を検証したところ, 7 種が強く, 6 種が中程度にリン酸化され, リン酸化されなかったタンパク質は 1 種のみであった。したがって, 同定したタンパク質のほとんどが, ERK の基質であることが明らかとなった。

リン酸化タンパク質精製と二次元ゲル電気泳動によるキナーゼ基質の網羅的同定法は, キナーゼ活性化因子と特異的阻害剤が利用可能であれば, あらゆるキナーゼに適用できる汎用性の高い系である。また, このシステムにより同定された 38 種の基質と, 同時期に発表された LC-MS/MS 系による 64 種の ERK 基質の同定¹⁶⁾ とでは, 重複が 10 種のみとかなり少なく, 異なる同定法が補完的な関係にあることを示唆している。

7 *in vitro* リン酸化による基質探索

キナーゼ基質を *in vitro* で探索する方法もいくつか提唱されている。産業総合研究所の五島らが開発したプロテインアレイは, 完全長のタンパク質を非変性あるいは変性条件下に基板上に固相化でき, キナーゼ基質探索に適したも

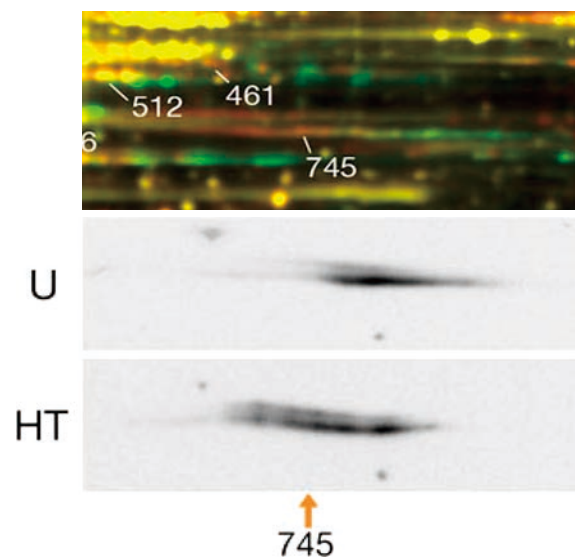


Fig. 7 Acidic shifts of EPLIN by ERK phosphorylation

Two-D DIGE pattern of an area containing the spots of EPLIN (spot #745, arrow) and 2-D western blotting of EPLIN from ERK-inhibited (U) or ERK-activated (HT) cells. Data are reprinted from reference 14.

のである¹⁷⁾。従来のバクテリオファージ中で cDNA ライブラリーを発現させたものは、cDNA がランダムに挿入されていたため、偽陽性の危険性が高かったが、非変性タンパク質を固相化することで、その可能性は低くなっている。

また、キナーゼ-基質相互作用を基質探索に用いる方法も考案されている。すなわち、キナーゼを固相化したカラムに、細胞抽出液を添加し、結合したタンパク質に対して当該キナーゼを用いてリン酸化反応を実施し、基質を探索する方法である。Rho キナーゼの既知の基質がカラムに結合することが示され、実際に試験管内でのリン酸化が確認されている¹⁸⁾。この技術は PKA, ERK, CDK5 など 7 種類のキナーゼにも適用され、各々 100 程度もの基質候補が同定されている¹⁸⁾。従来は、キナーゼ-基質相互作用は一過性であり、この方法で基質を探索することは困難と考えられていた。しかし、プロテオミクス技術の向上が、こうした探索法を可能にしたと考えられる。

筆者らは、細胞内の全タンパク質を 1 度ホスファターゼで脱リン酸化し、その後特定のキナーゼでリン酸化する方法を検討した¹⁹⁾。一連の反応により、リン酸化プロテオームの複雑性が低下し、特定のキナーゼ基質の探索が容易になることが期待される。

これらの *in vitro* リン酸化反応によるキナーゼ基質の同定は、細胞中のキナーゼおよび基質の局在や発現パターンの時空間的な制御から逸脱した反応を含む可能性があり、基質候補タンパク質の評価は、細胞中で生理的な条件下で検証する必要がある。

8 プロテオミクスから細胞生物学へ

プロテオミクス研究を行なう研究者には二通りのタイプがあり、技術としてのプロテオミクス解析法を極めていく研究者と、プロテオミクスによる成果を本来研究したい領域に還元する研究者が存在する。筆者は後者のグループに属すが、同定した多数のタンパク質の中から、どの因子を選択し詳細に研究するかという問題が非常に重要となる。

キナーゼ基質のリン酸化による機能調節を解析するには、最低でも 1-2 年はかかり、しかもよい結果が得られるとは限らない。ERK 基質の網羅的探索についても、プロテオミクスのデータは 2003 年頃の研究のごく初期に得られていたが、ERK による核移行の制御機構を解析し、論文として刊行できたのは、2009 年である。如何に細胞生物学的な研究に時間がかかるかをよく示している。

しかし、どの因子が面白くなるかは、未知であるからこそ楽しいともいえる。筆者の場合は、①労力に値する興味深い機能を有しているか、②どれくらいの割合でリン酸化されているか、③リン酸化部位数がどれくらい多いか、などを勘案して選択してきた。この中で期待通りに展開した数少ない例として、ERK による核移行の制御について紹

介したい。

8-1 核膜孔複合体構成因子の ERK によるリン酸化と核移行の制御

ERK 基質の探索から、新規基質として核膜孔複合体構成因子 (ヌクレオポリン) Nup50 (nuclear pore complex protein 50) を同定した¹⁴⁾。ヌクレオポリンの細胞分裂時におけるリン酸化は、核膜孔複合体の崩壊を誘導することが示されていたが、ERK が活性化する G₀/G₁ 期において核-細胞質間輸送のリン酸化による制御は知られておらず、そのリン酸化の意義を解析することとした。

Nup50 のリン酸化部位は複数存在したが、いずれも分子中央部の FG リピート領域 (フェニルアラニンとグリシンに富む配列が繰り返している領域) に存在していた。FG リピートは複数のヌクレオポリンに共通に認められる領域であり、核移行時にシャトルとして機能する importin-β と結合する領域である。そこで、ERK リン酸化が Nup50-importin-β 相互作用におよぼす影響を調べた結果、その相互作用が著しく低下することが判明した。importin-β ファミリーに属する transportin との相互作用も、同様に低下していた。Nup50 以外の FG リピート領域を有するヌクレオポリンのリン酸化を調べたところ、Nup153 および Nup214 が、いずれも ERK 活性化にともない Phos-tag 電気泳動上での移動度が顕著に低下し、さらに *in vitro* でのこれらの因子の ERK によるリン酸化は、ともに importin-β との相互作用を低下させた。importin-β は、核移行シグナルを有するタンパク質の運び手として機能することから、ERK による核移行制御の可能性を検討した。

ジグトニン処理により、細胞膜に穴をあけたセミインタクト細胞に、GFP 融合 importin-β タンパク質を取り込ませ、核移行を調べた。その結果、ERK 活性化細胞では、対照細胞に比べて GFP 融合 importin-β の核移行速度が低下していた (Fig. 8A)。GFP 融合 importin-β の核移行は、Nup50 の siRNA によるノックダウンにより低下したが、

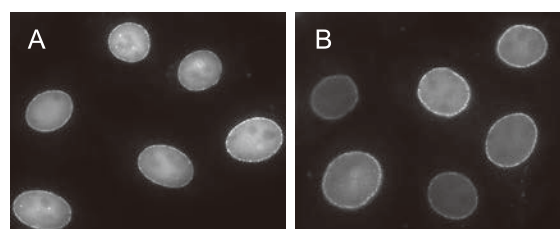


Fig. 8 Nuclear migration of importin-β is impaired in ERK-activated, digitonin-permeabilized cells

ΔB-Raf:ER cells were treated with 20 μM U0126 (A) or 1 μM 4-HT (B) for 60 min and then permeabilized with digitonin. Cell-free transport assay of GFP-importin-β was performed for 5 min on ice. Data are reprinted from reference 14.

正常 Nup50 を戻した場合には核移行は回復し, ERK による制御も見られた. しかし, リン酸化を受けないアラニン置換体およびリン酸化を模倣した変異体では, 核移行は回復するものの前者は, 速度が高いまま, 後者は低いままであり ERK による制御は認められなかった. 以上の結果から, ERK によるヌクレオポリンのリン酸化は, 核移行を制御していると考えられた. ERK による核移行制御の生理的な意義については, 今後の研究が必要である.

9 プロテオームによるシグナル伝達系研究の将来

プロテオミクス技術の進歩はめざましく, 研究が進歩したのか機器が進化したのかよくわからないままに, 夥しい量のデータが日々報告されている. 確かなことは, データの量が膨大となったことであり, 不確かなことは, どの現象が重要かを判断する基準である. しかし, データ量はデジタルカメラの画素数に対応し, 飛躍的な画素数の増加は, データ処理を適切に行えば, まるでそこに生きた人がいるようなくっきりとした表情をもたらすはずである. LC-MS/MS においてもリン酸化の stoichiometry を定量化する方法がいくつか提唱されており, 変化の程度と定量化を指標として重要性に重み付けを行なうことにより, 細胞の美しいスナップショットが得られることを期待する.

10 あとがき

筆者は, 大学院博士課程で研究していた酵素のサブユニット構成を二次元ゲル電気泳動で分析した²⁰⁾. この酵素は, 同一分子量のサブユニット 2 種と, 異なる分子量のサブユニットがそれぞれ 1 分子結合した複合体であるが, 分子量が等しいサブユニットを分離するには二次元ゲル電気泳動が効果的であった. 当時, 二次元ゲル電気泳動装置はほとんど市販されておらず, 一次元目のゲルには, 2 ml のガラスピペットを切断してカラム状に加工したものを用いた. それから四半世紀後にシグナル伝達系を 2-D DIGE 法で分析することになろうとは, 夢想だにし得なかったことであり, 感慨深いものがある.

謝 辞

本研究の成果は, 多くの共同研究者の努力の賜であり, 言葉で言い尽くせない程に感謝している. 本研究は, 東京大学医科学研究所細胞ゲノム動態解析動態 (ビー・エム・エル) 寄付研究部門および北里大学薬学部で実施された. 寄付研究部門を支援していただいた株式会社ビー・エム・エル社に深く感謝する. また本研究は, 文部科学省科学研究費補助金 (平成 14-16 年度特定領域研究 13216116, 平成 17-19 年度特定領域研究 17014022, 平成 23-25 年度基盤研究 C23510261), 平成 17 年 - 平成 22 年東京女子医科大学「国際統合医科学研究・人材育成拠点の創成」(分担),

平成 22 年度学術研究振興資金 (日本私立学校振興・共済事業団) の援助を受けて実施された. 2-D DIGE 用のスキャナーは, GE ヘルスケア株式会社より貸与された.

利益相反

本研究の結果により利益を受ける可能性がある団体・個人と筆者との間に利害関係はない.

文 献

- 1) Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 1911;13:397-411.
- 2) Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 1976;260:170-173.
- 3) Eckhart W, Hutchinson MA, Hunter T. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell.* 1979;18:925-933.
- 4) Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:851-891.
- 5) Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, *et al.* Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339:1546-1558.
- 6) Maekawa M, Nakamura S, Hattori S. Purification of a novel ras GTPase-activating protein from rat brain. *J Biol Chem.* 1993;268:22948-22952.
- 7) Kobayashi M, Katagiri T, Kosako H, *et al.* Global analysis of dynamic changes in lipid raft proteins during T-cell activation. *Electrophoresis.* 2007;28:2035-2043.
- 8) Hattori S, Iida N, Kosako H. Identification of protein kinase substrates by proteomic approaches. *Expert Rev Proteomics.* 2008;5:497-505.
- 9) Machida M, Kosako H, Shirakabe K, *et al.* Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis. *FEBS J.* 2007;274:1576-1587.
- 10) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:749-757.
- 11) Ueda K, Kosako H, Fukui Y, Hattori S. Proteomic identification of Bcl2-associated athanogene 2 as a novel MAPK-activated protein kinase 2 substrate. *J Biol Chem.* 2004;279:41815-41821.
- 12) Oda Y, Huang K, Cross FR, *et al.* Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:6591-6596.
- 13) Blagoev B, Ong SE, Kratchmarova I, Mann M. Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol.* 2004;22:1139-1145.
- 14) Kosako H, Yamaguchi N, Aranami C, *et al.* Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:1026-1035.
- 15) Han MY, Kosako H, Watanabe T, Hattori S. Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase regulates actin organization and cell motility by phosphorylating the actin cross-linking protein EPLIN. *Mol Cell Biol.* 2007;27:8190-8204.

- 16) Old WM, Shabb JB, Houel S, *et al.* Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma. *Mol Cell.* 2009;34:115–131.
- 17) Takeda H, Goshima N, Nomura N. High-throughput kinase assay based on surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol.* 2010;627:131–145.
- 18) Amano M, Hamaguchi T, Shohag MH, *et al.* Kinase-interacting substrate screening is a novel method to identify kinase substrates. *J Cell Biol.* 2015;209:895–912.
- 19) Iida N, Fujita M, Miyazawa K, *et al.* Proteomic identification of p38 MAP kinase substrates using in vitro phosphorylation. *Electrophoresis.* 2014;35:554–562.
- 20) Hattori S, Iwasaki K. Studies on the high molecular weight form of polypeptide chain elongation factor-1 from pig liver. I. Purification and subunit structure. *J Biochem.* 1980;88:725–736.

Analysis of Intercellular Signal Transduction by 2-D DIGE

Seisuke Hattori*^{1,2}

*E-mail: hattoris@pharm.kitasato-u.ac.jp

¹Division of Cellular Proteomics (BML), Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

²Division of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

(Received: April 22, 2016; Revised: May 31, 2016; Accepted: June 1, 2016)

Detection of signaling events using proteomics is technically challenging because of the low abundance of signaling proteins. To overcome this issue, prefractionation procedures are effective. Isolation of membrane rafts followed by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) enabled us to analyze signaling events induced by T-cell stimulation. The combination of phosphoprotein purification and 2-D DIGE was quite effective to globally identify substrates of a given kinase such as p38 MAP kinase and ERK. ERK regulates nuclear transport through the phosphorylation of multiple nuclear porins.

Keywords: 2-D DIGE; ERK; p38 MAP kinase; phosphorylation; raft