

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	金子 (今村) 春菜
論文題目	リン酸化プロテオミクスを用いた タンパク質キナーゼの基質プロファイルに関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒトには全遺伝子の約2%に相当する500種類以上ものタンパク質キナーゼが存在し、それぞれ固有または共通の標的基質をリン酸化することによって、様々な細胞内情報伝達系にて重要な役割を果たしている。個々のキナーゼが標的とする基質タンパク質の同定は、そのリン酸化による機能制御機構を明らかにするのみならず、診断・創薬などの臨床応用の見地からも重要である。本研究では<i>in vitro</i> キナーゼ実験系を、ナノ液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (nanoLC-MS/MS) を用いたショットガンリン酸化プロテオミクスと組み合わせることでキナーゼ/基質ペアの大規模情報を効率よく取得し、キナーゼの基質特異性に関わるリン酸化部位周辺の配列的特徴を明らかとした (第一章)。続いて、これらの情報を細胞内リン酸化反応へ適用し、薬剤添加に応じて増減するタンパク質のリン酸化修飾の中から、特定のキナーゼによって引き起こされたリン酸化修飾を選択的に抽出することに成功した (第二章)。</p>			
第一章 NanoLC-MS/MSによるキナーゼ/基質のリン酸化プロファイル			
<p>本章では、キナーゼが<i>in vitro</i>条件下でリン酸化する細胞破碎液中のタンパク質を大規模に同定する為の実験手法を確立し、三種類のキナーゼへ適用した。近年、nanoLC-MS/MSと選択的リン酸化ペプチド濃縮法を用いたショットガンリン酸化プロテオミクスの開発により、数千のリン酸化部位を一斉に同定・定量することが可能となった。一方で、これらリン酸化部位の責任キナーゼの大半は未同定であり、基質の機能同定や関連シグナル経路の探索を妨げている。キナーゼが基質認識に利用するリン酸化部位周辺の特徴的な配列 (モチーフ配列) は、基質のキナーゼ予測を行う上で有用な情報となり得る。しかし、実験的に検証されているキナーゼ-基質ペア情報数が圧倒的に足りないことから、現状では既知モチーフ情報も十分でない。そこで、本研究では、<i>in vitro</i> キナーゼ反応とリン酸化プロテオミクスを組み合わせ、多様なキナーゼに応用可能な基質リン酸化部位の大規模検出手法を構築した。この手法をc-AMP regulated protein kinase A (PKA)、extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)、およびRAC-alpha serine/threonine protein kinase (AKT1) に適用した結果、それぞれ3,585、4,374、および1,778種の</p>			

リン酸化部位が同定された。また、得られた大規模配列情報に対してデータマイニングを行った結果、既知情報と比べ、より詳細かつ多様なモチーフ配列を抽出することに成功した。

## 第二章 キナーゼ/基質プロファイルの細胞内シグナル伝達解析への応用

本章では、前章で得られたキナーゼの基質プロテオームプロファイルを利用して、細胞内で起こるキナーゼ特異的なリン酸化反応を特定することを試みた。ヒト子宮頸ガン由来の培養細胞（HeLa細胞）に対してPKAの阻害剤または活性化剤を添加した試料を定量的リン酸化プロテオミクスの手法を用いて測定し、薬剤添加依存的なリン酸化変動データを取得した。この様な細胞への薬剤添加は標的分子の基質のみならず、その下流に位置するシグナル分子のリン酸化変動にも影響を与える。そこで、得られた*in vivo*リン酸化変動データに対して前章で明らかにしたキナーゼの基質認識プロファイルを用いたスクリーニングを行い、PKAの直接的な基質候補を抽出した。

( 論文審査の結果の要旨 )

著者は、*in vitro*キナーゼ実験系を、ナノ液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (nanoLC-MS/MS) を用いたショットガンリン酸化プロテオミクスと組み合わせるシステムを構築し、得られた大規模データに基づくタンパク質キナーゼの基質プロファイル法を確立するとともに、それらを細胞内リン酸化反応に適用し、生理的条件下におけるキナーゼの直接基質を推定する方法を確立した。

まず、第一章では3種類の組換えキナーゼ (c-AMP regulated protein kinase A (PKA)、extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1)、およびRAC-alpha serine/threonine protein kinase (AKT1)) をモデルとして*in vitro*条件下で細胞破碎液から抽出したタンパク質混合物を対象にしてリン酸化反応を行い、キナーゼ基質を大規模に同定する手法を確立した。より多くの基質を同定するため、試料を分画し、その後リン酸化ペプチド濃縮、nanoLC-MS/MS測定というフローを選択した。その結果、これら3種のキナーゼに対し、それぞれ数千種の基質リン酸化部位を同定した。これは現在のところ、世界最大の基質ライブラリーとなっている。この得られた大規模データに基づきデータマイニングを行った結果、既知情報と比べ、より詳細かつ多様なモチーフ配列を抽出することに成功した。これらの情報をさらに詳細に解析することにより、キナーゼ基質のプロファイリングを行い、キナーゼにより選択的な基質の絞り込みを行った。

続いて第二章では、*in vitro*で取得した前章の基質プロファイル情報を細胞内リン酸化反応へ適用し、薬剤添加に応じて増減するタンパク質のリン酸化修飾の中から、特定のキナーゼによって引き起こされたリン酸化修飾を選択的に抽出することを試みた。モデルキナーゼとしてはPKAを選択し、薬剤としてPKA阻害薬および活性化薬を用いた。ヒト子宮頸ガン由来の培養細胞 (HeLa細胞) に対して、これらの薬剤を添加し、一定時間経過後、細胞試料を定量的リン酸化プロテオミクスの手法を用いて測定し、薬剤添加依存的なリン酸化変動データを取得した。この様な細胞への薬剤添加は標的分子の基質のみならず、その下流に位置するシグナル分子のリン酸化変動にも影響を与える。そこで、得られた*in vivo*リン酸化変動データに対して前章で明らかにしたキナーゼの基質認識プロファイルに基づくフィルタリングを用い、PKAの直接的な基質候補を抽出することに成功した。これらの候補分子の中にはすでに既知のPKA生理的条件下での基質分子も含まれており、本法が細胞内リン酸化ネットワーク解析において有効なツールになり得ることを示した。

以上、著者は*in vitro*キナーゼ実験系、ショットガンリン酸化プロテオミクスおよび大規模データマイニングの手法を組み合わせたタンパク質キナーゼの基質プロファイル法を確立し、細胞内リン酸化反応におけるキナーゼの直接基質推定に適用した。近年、ショットガンリン酸化プロテオミクスの開発により、数千のリン酸化部

位を一斉に同定・定量することが可能となったが、これらリン酸化部位の責任キナーゼの大半は未同定であり、基質の機能同定や関連シグナル経路の探索を妨げている。本手法は、細胞内におけるキナーゼ—基質の関係を推定する方法として有効であり、細胞内シグナル伝達研究をさらに発展させることが期待できる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降