

- Shenkarev, Z.O., Berlin, Y.A., & Korshun, V.A. (2004) *Eur. J. Org. Chem.*, 1298-1307.
- 15) Prokhorenko, I.A., Malakhov, A.D., Kozlova, A.A., Momyaliev, K., Govorun, V.M., & Korshun, V.A. (2006) *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 599, 144-151.
- 16) Ham, J., Jose, J., Mei, E., & Burgess, K. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1684-1687.
- 17) Goze, C., Ulrich, G., & Ziesel, R. (2007) *J. Org. Chem.*, 72, 313-322.
- 18) Shimizu, H., Fujimoto, K., Furusyo, M., Maeda, H., Nanai, Y., Mizuno, K., & Inouye, M. (2007) *J. Org. Chem.*, 72, 1530-1533.

藤本 和久, 清水 久夫, 井上 将彦
(富山大学大学院医学薬学研究部薬化学研究室)

Alkynylpyrenes as novel hydrophobic fluorophores having high fluorescence quantum yields under biological conditions

Kazuhisa Fujimoto, Hisao Shimizu, and Masahiko Inouye
(Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan)

EGF 受容体下流のプロテオミクスより同定された新規タンパク質の機能解析

1. はじめに

様々な生物種におけるゲノム配列が決定され、詳細な遺伝子情報データベースが確立し、また、質量分析装置を用いたタンパク質解析技術の急速な発展に伴い、現在ではそれらを応用することにより、微量なタンパク質からでもそのアミノ酸配列を決定することが可能となった。そして、その技術を用いた様々なタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）が盛んに行われている。ここでは、細胞増殖因子のシグナル伝達機構の包括的理解や、それに起因する疾患原因タンパク質の同定を目指したプロテオミクスに焦点を絞り、我々の最近の研究結果を交え紹介させていただく。

2. 細胞増殖因子受容体シグナル伝達に着目したリン酸化プロテオミクス

一般的に、細胞増殖因子受容体は細胞外領域でリガンドと結合すると細胞内領域のタンパク質リン酸化酵素活性が上昇し、受容体自身もしくは他の基質をリン酸化することにより、下流へのシグナル伝達を開始される。EGF (epi-

dermal growth factor: 上皮細胞増殖因子)をはじめとして、細胞増殖因子のシグナル伝達機構は細胞増殖のみならず、細胞の形態変化や運動能獲得、細胞周期進行など、細胞の様々な生理現象に関与する。また、そこで機能するいくつかのタンパク質は、受容体自身を含め、がんや他の疾病との直接的関与が見出され、臨床面からも注目されている。近年、受容体抗体や受容体リン酸化酵素活性阻害剤が分子標的医薬として開発され、がん治療等に利用されている¹⁾。そのような背景から、細胞増殖因子やサイトカインシグナル伝達機構をより詳細に理解するために、それらの刺激により細胞内でリン酸化されるすべてのタンパク質を網羅的に明らかにするためのリン酸化プロテオミクスが盛んに行われている。

3. リン酸化プロテオミクスの戦略

まず、リン酸化チロシン特異的抗体を用いた方法が挙げられる。アミノ酸側鎖の大きさの影響からか、広範なリン酸化セリン、スレオニン残基を認識する優れた抗体はなかなか作製されていないのが現状であるが、4G10 や PY20 などのモノクローナル抗体は様々なタンパク質のリン酸化チロシン残基を認識し、特異性も高く、細胞内シグナル伝達機構の研究において大変便利なツールとして用いられている。これらの抗体を用いた免疫沈降により、細胞内でチロシンリン酸化されたタンパク質、もしくはそれらに結合する因子を比較的容易に数多く精製することができ、そのサンプルを質量分析装置により網羅的に同定する試みが筆者らのグループも含め行われてきた。2000 年ごろから、この方法によるチロシンリン酸化タンパク質、およびリン酸化部位の同定に関する報告がなされ、ここ数年の質量分析装置の性能向上に伴い、年を追うごとにリン酸化ペプチドの同定数が増加してきた。2005 年には種々のリン酸化抗体を販売する Cell Signaling Technology のグループが、様々な細胞系 (Pervanadate 処理した Jurkat 細胞、活性化型 Src を過剰発現した NIH3T3 細胞、およびリン酸化酵素 ALK が転座し活性化している未分化大細胞型リンパ腫) から 688 種類のチロシンリン酸化ペプチドを取得し、628 箇所チロシンリン酸化部位を同定したことを報告した²⁾。

4. セリン・スレオニン残基のリン酸化を含めたリン酸化プロテオミクスの現状

(我々の解析の反省も含め記すと) 細胞内で実際に生じるタンパク質中のリン酸化アミノ酸残基はチロシンに比較してセリン、スレオニンの方が圧倒的に多い。細胞増殖因子

刺激に伴って活性化されるセリン・スレオニンキナーゼも多く知られており、そのシグナル伝達において重要なタンパク質中のセリン、スレオニン残基も数多くリン酸化されるはずである。ゆえに、チロシンリン酸化タンパク質のみに着目しては、細胞増殖因子受容体に関するリン酸化タンパク質の網羅的解析には不十分である。この問題を解決するために、最近では、TiO₂などのメタルキレートカラムで全リン酸化タンパク質を効率的に精製濃縮する方法が開発され用いられている³⁾。また、リン酸化を誘導する刺激を施した細胞のみを異なる安定同位体からなるアミノ酸を含む培地で培養する方法 (SILAC: stable-isotope labeling by amino acids in cell culture) を用いて、その分子量の差と目的リン酸化ペプチドの量比を比較することにより、刺激依存的にリン酸化量が変化するタンパク質の網羅的取得の試みが成されている。プロテオミクス全般において先駆的な研究をしている M. Mann 博士のグループは、これらの方法を用いて EGF 刺激により経時的に変化する基質タンパク質中のリン酸化の度合いについて大規模な解析を行い、2244 のタンパク質から 6600 箇所のリン酸化部位を同定したと昨年末 Cell 誌に発表した⁴⁾。この報告によると、リン酸化部位の内訳としてはセリン、スレオニン、チロシンが 86.4%、11.8%、1.8% の比であった。二次元薄層クロマトグラフィーを用いたリン酸化アミノ酸分析により得られた、Src を発現した細胞内タンパク質のチロシンリン酸化の割合は約 0.05% とされていたが⁵⁾、本実験においては不安定なチロシンリン酸化ペプチドの回収率が向上したことにより、前述のような割合になり、これまでは同定されていなかったものが多数含まれていると説明している。また、彼らはこのデータを PHOSIDA というリン酸化サイトデータベース (<http://www.phosida.com>) として一般利用できるようにしている。

5. 当研究室における EGF 受容体下流のプロテオミクスの現状

我々は、複数のチロシンリン酸化抗体を組み合わせて用いることにより、EGF 刺激した扁平上皮がん由来 A431 細胞より効率的にチロシンリン酸化タンパク質を回収した。銀染色で可視化した後、質量分析装置によりこれらすべてのアミノ酸配列を決定したところ、150 種類以上のタンパク質が同定できた (図 1)。この数は解析当時の 2003 年には出色のものであったが、前述の通り現在では他のグループの後塵を拝している。ところで、リン酸化タンパク質の同定数や、リン酸化量の刺激依存的変動を解析することも

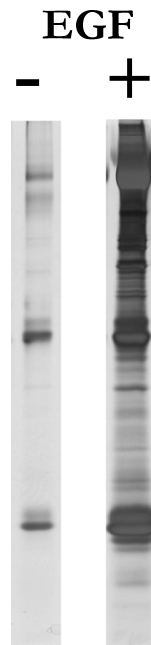


図 1 EGF 刺激により細胞内でチロシンリン酸化を受けるタンパク質の濃縮精製とその網羅的配列決定

EGF 刺激前後 (-+) の扁平上皮がん細胞 A431 から細胞抽出物を調整し、複数のリン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降を行った。サンプルを SDS 電気泳動し、銀染色を行った結果を示す。さらに、ゲル内消化後、質量分析装置を用いてできる限り多くのこのゲルに含まれるタンパク質の配列決定を行った結果、刺激後の画分より約 150 種類のタンパク質を同定できた。その内で未知タンパク質に着目し、その役割について解析を行った。

重要であるが、我々は同定できたタンパク質の中から新規なものに着目した。プロテオミクスの共通の盲点として、多数のタンパク質が同定された後、特に新規なものに関しての解析が進まないことが挙げられる。当然のことながら、新規タンパク質の目的プロテオミクスにおける意義づけ、および機能解析において効率的な解析法は特になく、これまでと同様に多大な労力を必要とする。しかし、その工程を避けてはせっかく得られた新規タンパク質の機能はおろか、本当に解析サンプルに含まれていたのかさえも不明のままになってしまう。我々は得られた新規タンパク質の抗体作製、リン酸化部位の同定、結合タンパク質の解析、ならびに細胞内における局在などについて解析を行い、それらの役割を調べた。

6. CFBP (CD2AP family binding protein)⁶⁾ (図 2)

273 個のアミノ酸からなる新規タンパク質は解析を始めた当初、他のタンパク質との有意な相同性は見当たらず、機能推測も困難であった。組換えタンパク質および欠失変異体を用いた解析により、このタンパク質は確かに EGF 刺激によりチロシンリン酸化され、そのリン酸化部位は 204 番目のチロシン残基 (Y204) であった。さらに FLAG タグを付加した組換えタンパク質を培養細胞中に発現し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した場合に CFBP と共沈する分子量約 80kDa のタンパク質のアミノ酸配列を決定したところ CD2-associated protein (CD2AP) であった。CD2AP

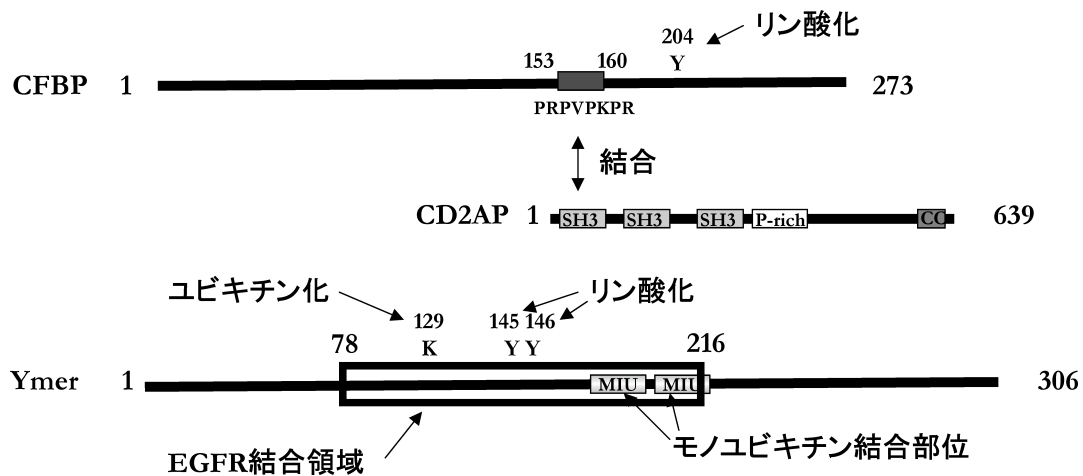


図2 新規チロシンリン酸化タンパク質 CFBP, Ymer の一次構造模式図

数字はアミノ酸番号を示す。CFBP 中の 204 番目のチロシン(Y)が EGF 刺激によりリン酸化される。また、153 から 160 番目のプロリンに富む領域を介し CD2AP/CIN85 の SH3 領域と結合する。

Ymer 中の 129 番目のリジン(K)はポリユビキチン化部位。145, 146 番目のチロシンは EGF 刺激によりリン酸化される。78 から 216 番目のアミノ酸部分が EGFR との結合に必要である。

MIU, motif interacting ubiquitin; P-rich, proline-rich region; CC, coiled-coil ドメイン

はその類縁タンパク質 CIN85 (Cbl-interacting of 85kDa) と同様にユビキチンリガーゼ Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) に結合し、EGF 受容体の細胞内移行や分解を制御するアダプタータンパク質である⁷⁾。そこで、この未知タンパク質を CFBP と名付け、CD2AP/CIN85 の制御タンパク質としての機能を予測し解析を行った。CFBP は分子内に PX(P/A)XXR (P:プロリン, A:アラニン, R:アルギニン, X:任意のアミノ酸) というアミノ酸モチーフを有し、ここを介して CD2AP/CIN85 中に三つ存在する SH3 領域に結合する。また、その中でも最もアミノ末端側に位置する SH3 領域にアフィニティーが高い (最近、三つのうちで C 末端側の SH3 領域がユビキチンに結合すると報告された⁸⁾)。結果的に、CFBP と CD2AP/CIN85 の結合量は EGF 刺激依存的に増加し、CFBP の Y204 のリン酸化が結合に重要であった。また、CFBP が CIN85 に結合することにより、CIN85 と Cbl の結合量が増加し、EGF 刺激に伴う EGF 受容体の分解が促進された。興味深いことに、A431 細胞では PX(P/A)XXR を含む翻訳領域である 5 番目のエクソン部分を欠く、EGF 受容体分解促進能を持たない CFBP 変異体を発現していた。A431 細胞は EGF 受容体を過剰に発現することで知られている。これは、EGF 受容体の細胞内移行および分解制御機構が破綻し、大量の EGF 受容体が常時細胞膜上に存在していることを予想させる。その破綻要因の一つに CFBP 変異体発現が関与して

いるかは不明であるが、EGF 受容体の発現異常に伴うがんの発生および悪性化と CFBP の関与について興味を持たれる。

7. Ymer⁹⁾ (図2)

解析を始める前にすでに C3orf6 として cDNA の報告はなされていたが¹⁰⁾、その機能はまったく不明であった。その後、我々を含めた類似のプロテオミクスを行ったグループより、このタンパク質がチロシンリン酸化されることが見出された¹¹⁾。さらに、そのリン酸化部位が 145 番目のチロシン(Y145)であることも報告された¹²⁾。余談であるが、このタンパク質は M. Mann 博士のグループの B. Blagoev 博士が Ymer と名付けたのだが、彼らは未知のタンパク質に北欧神話の登場人物の名前をつけることにしているようで (彼らはデンマークのグループである)、odin などその一例だそうである¹³⁾。Ymer の場合、Y は当然ながらチロシンを意識してつけたらしい。さて、Ymer には 482 および 306 アミノ酸をコードする 2 種のスプライスバリエントが存在することが、遺伝子レベルでの解析から明らかとなっていたが、我々の解析では、タンパク質レベルで発現しているものは分子量の小さいものがほとんどであった。また、Ymer は Y145 の他に Y146 も EGF 刺激依存的にリン酸化を受ける他、ユビキチン化を受けることも明らかにした。質量分析装置による解析から、ユビキチン化サイト

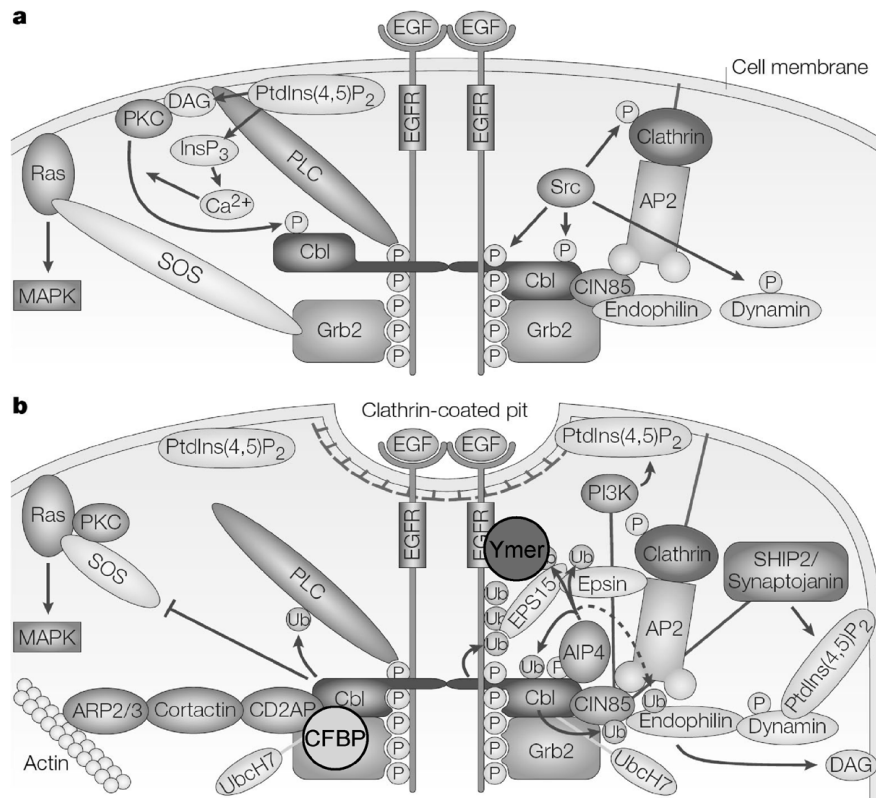


図3 Cbl複合体を介したEGF受容体の細胞内移行と分解機構の模式図(文献7より改変, 転載)

EGF刺激直後(a), その後, さらに図中の分子が作用し, 受容体の細胞内移行が始まる(b).

CFBPはEGF刺激によりチロシンリン酸化を受けCD2APおよびCIN85に結合し, EGFRの細胞内移行を促進する. 一方, YmerはEGF刺激によりチロシンリン酸化, ユビキチン化を受け, EGFRに結合し, EGFRの細胞内移行を阻害する.

EGFR, epidermal growth factor receptor; PLC, phospholipase C; DAG, diacylglycerol; InsP₃, inositol trisphosphate; PKC, protein kinase C; Grb2, growth-factor receptor bound-2; SOS, son-of-sevenless; MAPK, mitogen-activated protein kinase; SHIP2, SH2-containing inositol phosphatase-2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; ARP2/3, actin related protein 2/3; AP2, adaptor protein-2; UbcH7, ubiquitin conjugating enzyme; AIP4, atrophin-1-interacting protein-4; EPS15, EGFR pathway substrate 15; PtdIns(4,5)P₂, phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate.

の一つは129番目のリジン残基であることが判明したが, その他にも複数箇所が多様な(モノ, マルチ, ポリ)ユビキチン化を受けていることが示唆された. EGF受容体の細胞内移行にはチロシンリン酸化の他, ユビキチン化修飾も重要であり, 特にモノユビキチン化は受容体のプロテアソーム分解よりもむしろ, エンドソームへの移行に必要な他の分子との結合に関与することが見出されている¹⁴⁾. 結果的にYmerはEGF受容体と同様な翻訳後修飾を受けるが, エンドソームへの移行は見られず, EGF刺激の有無に限らず恒常的に細胞膜に局在する. これらのことから,

Ymerの過剰発現はEGF受容体の細胞内移行および分解を抑制することが示唆された. 最近になって, 新しいモノユビキチン結合部位として同定されたMIU(motif interacting ubiquitin)領域がYmerにも存在することが明らかとなり¹⁵⁾, 実際にYmerがリガンド刺激依存的に(おそらくモノユビキチン化された)EGF受容体と細胞膜付近で結合し, 受容体の細胞内移行を阻害する作用を持つことが明らかになった. 今後, さらに生物個体におけるYmerの生理的役割について解析を進めて行きたい.

8. おわりに

現在までに解析した2分子は、いわゆる Cbl interactome⁷⁾ (図3)に含まれる細胞増殖因子受容体の細胞内移行および分解に関する制御因子であった。我々を含めて、類似のリン酸化プロテオミクスで同定されたものにはCblをはじめとして、受容体のエンドソーム局在やプロテアソーム分解に関与するタンパク質が多数含まれていたことから、まだ未解析の新規タンパク質もこの経路に関与する可能性が高い。今後、できるだけ多くの未知タンパク質の解析を進め、EGF受容体シグナル伝達経路の包括的理解に貢献できればと思う。

謝辞

本研究は徳島大学分子酵素学(現:疾患酵素学)研究センター・酵素分子生理学(現:疾患プロテオミクス)研究部門、谷口寿章教授のご指導のもと行われたものである。谷口研究室の古今のすべてのメンバー、特に田代京子さん、鍋師裕美さん、村田康信博士、佐野悦子博士、山内英美子博士のご協力にこの場をお借りして深く感謝いたします。

- 1) Hynes, N.E. & Lane, H.L. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, 5, 341-354.
- 2) Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E. J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., & Comb, M.J. (2005) *Nat. Biotechnol.*, 23, 94-101.
- 3) Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., & Jorgensen, T.J. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 873-886.
- 4) Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006) *Cell*, 127, 635-648.
- 5) Hunter, T. & Sefton B.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1311-1315.
- 6) Konishi, H., Tashiro, K., Murata, Y., Nabeshi, H., Yamauchi, E., & Taniguchi, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 28919-28931.
- 7) Schmidt, M.H. & Dikic, I. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 907-919.
- 8) Stamenova, S.D., French, M.E., He, Y., Francis, S.A., Kramer, Z.B., & Hicke, L. (2007) *Mol. Cell*, 25, 273-284.
- 9) Tashiro, K., Konishi, H., Sano, E., Nabeshi, H., Yamauchi, E., & Taniguchi, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 24612-24622.
- 10) Vazza, G., Picelli, S., Bozzato, A., & Mostacciolo, M.L. (2003) *Gene*, 314, 113-120.
- 11) Blagoev, B., Ong, S.E., Kratchmarova, I., & Mann, M. (2004) *Nat. Biotechnol.*, 22, 1139-1145.
- 12) Thelemann, A., Petti, F., Griffin, G., Iwata, K., Hunt, T., Settinari, T., Fenyó, D., Gibson, N., & Haley, J.D. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 356-376.
- 13) Pandey, A., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Fernandez, M.,

- Nielsen, M., Kristiansen, T.Z., Ohara, O., Podtelejnikov, A.V., Roche, S., Lodish, H.F., & Mann, M. (2002) *Oncogene*, 21, 8029-8036.
- 14) Raiborg, C., Slagsvold, T., & Stenmark, H. (2006) *Trends Biochem. Sci.*, 10, 541-544.
 - 15) Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A.G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P.P., Polo, S., & Schneider, T.R. (2006) *Cell*, 124, 1183-1195.

小西 博昭

(徳島大学疾患酵素学研究センター
疾患プロテオミクス研究部門)

Proteomic identification of the new functional proteins in the EGF receptor-mediated signaling pathway
Hiroaki Konishi (Institute for Enzyme Research, University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan)

インスリンシグナルにおける転写因子 FoxO1 の役割

1. はじめに

FoxO タンパク質は forkhead ドメインを有する転写因子群の O サブファミリーに属する転写因子であり (Forkhead bOX-containing protein, O subfamily), その転写活性は基本的にはセリン/スレオニンキナーゼである Akt (PKB; protein kinase B) によるリン酸化と、それによって惹きされる核から細胞質への移行により調節されている。つまりインスリンにより Akt が活性化されると、FoxO タンパク質は核内でリン酸化されて細胞質へ移行し、不活性型となる (図1参照)。これまでに FoxO タンパク質は細胞の増殖、分化、アポトーシス、ストレス抵抗性等を調節する非常に多機能なタンパク質であることが明らかとなっていたが、さらに最近の研究結果から、このような細胞レベルでの基本的な機能に加え臓器レベルにおいても多くのインスリン作用に関わることが明らかとなってきた。本稿では、各種インスリン標的臓器における FoxO タンパク質の役割を最近の筆者らの知見も合わせて紹介する。

2. FoxO タンパク質の膵β細胞における役割

膵β細胞は、必要時にインスリンを血中に分泌することで、血糖値を適切な生理的範囲に保つ働きをしている。このβ細胞の絶対的、あるいは相対的な不足がそれぞれ1