

疾患に関与する細胞内情報伝達機構を解明するためのリン酸化プロテオミクス技術

(徳島大学 先端酵素学研究所 藤井節郎記念医科学センター 細胞情報学分野<sup>1)</sup>)

こさこ ひでたか  
○小迫 英尊<sup>1)</sup>

### Phosphoproteomic Approaches for the Elucidation of Cellular Signaling Mechanisms

(Fujii Memorial Inst. of Medical Sciences, Inst. of Advanced Medical Sciences, Tokushima Univ.<sup>1)</sup>)

○Hidetaka Kosako<sup>1)</sup>

**Short Abstract:** Protein kinases are encoded by over 500 genes in the human genome and play central roles in various cellular signaling pathways. Consequently, many diseases are associated with mutations in protein kinases. To fully understand the complex phosphorylation-mediated signaling networks, it is essential to develop analytical strategies for the global identification and functional characterization of downstream substrates of individual protein kinases. We have developed and adopted various phosphoproteomic approaches such as IMAC/2D-DIGE/MS, TMT/IMAC/bRP/LC-MS, Phospho-PRM and Phos-tag PAGE. These approaches have enabled efficient identification and validation of protein kinases substrates. Here we present these phosphoproteomic approaches to elucidate signaling mechanisms mediated by several disease-associated protein kinases including ERK, PKD, TBK1 and PINK1.

**Keywords:** Cell Signaling, Phosphoproteomics, Phos-tag, IMAC, TMT, PRM

ヒトにはタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）が 500 種類以上も存在し、それぞれ標的とする基質タンパク質をリン酸化することにより、様々な細胞内情報伝達経路で中心的な役割を果たしている。キナーゼの遺伝子異常は種々の疾患を引き起こすため、個々のキナーゼの下流基質を同定し、そのリン酸化による機能制御を明らかにすることは、基礎研究のみならず診断・創薬などの臨床応用の見地からみても重要である。近年の各種プロテオミクス技術の著しい進歩により、キナーゼ基質を効率的かつ網羅的に同定してその情報伝達機構を明らかにすることが可能になっている。

これまでに我々は IMAC と 2D-DIGE（蛍光標識二次元電気泳動）を組み合わせた新たなリン酸化プロテオーム解析法を開発した<sup>1,2)</sup>。さらに質量分析装置を用いた TMT (tandem mass tag)標識法や PRM (parallel reaction monitoring)法による定量解析、及び Phos-tag 電気泳動などに基づく様々なリン酸化プロテオミクス技術を導入・改良している。本教育セッションでは、ERK<sup>1,3)</sup>、PKD<sup>4)</sup>、TBK1<sup>5)</sup>や PINK1<sup>6)</sup>などの疾患関連キナーゼを介した細胞内情報伝達機構の解明を実例として、これらのリン酸化プロテオミクス技術について紹介したい。

#### 参考文献

- 1) H.Kosako et al., *Nature Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1026-1035 (2009).
- 2) H.Kosako, K.Motani, *Methods Mol. Biol.*, **1487**, 137-149 (2017).
- 3) Y.Shindo et al., *Nature Commun.*, **7**, 10485 (2016).
- 4) E.Ishikawa, et al., *Nature Commun.*, **7**, 12756 (2016).
- 5) M.Sato et al., *Nature Cell Biol.*, **20**, 81-91 (2018).
- 6) F.Koyano et al., *Nature*, **510**, 162-166 (2014).