

【研究区分：先端的研究】

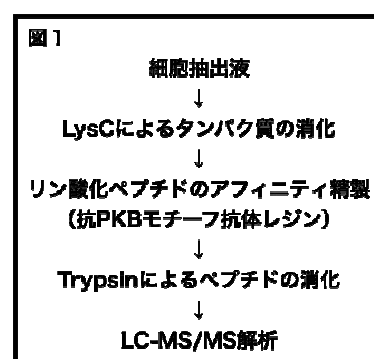
研究テーマ：タンパク質リン酸化酵素 PKB を介した足場非依存的増殖の制御機構の解析	
研究代表者：生物資源科学部 生命環境学科 生命科学コース 助教 松崎秀紀	連絡先：hmatsuzaki@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：なし	
【研究概要】 がんの発生する分子機構の解明はがんを克服するための重要な手がかりとなる重要な研究課題である。我々はがん促進因子の一つであるタンパク質リン酸化酵素 PKB の 2 種類の変異体発現細胞ががん細胞の特徴である足場非依存的増殖能について異なる傾向を示すことを見出し、本研究ではこれらの細胞内における PKB モチーフのリン酸化を受けたタンパク質を網羅的に解析した。その結果、細胞間で異なる制御を受ける複数のタンパク質が見出された。これらのタンパク質は腫瘍形成能の制御に関与する可能性がある。	

【研究内容・成果】

がんは、日本を始め多くの国で死亡原因の上位に挙げられる疾患である。がん細胞は遺伝子の異常により正常な増殖制御を逸脱して自律的に無限に増殖することができるとともに、発生した組織の束縛を逃れて血管やリンパ管に入り込む能力（浸潤能）、細胞外マトリックスに結合せずに移動先の組織で増殖し二次腫瘍を形成する能力（足場非依存的増殖能）などの正常細胞にはない能力を有している。これらのがん細胞の特徴の基盤となる分子機構の解明はがんを理解し、克服するための重要な手がかりとなることから、国内外で多くの研究が行われている。一方、研究代表者は、がん促進因子として知られているタンパク質リン酸化酵素 Protein Kinase B (PKB) のヒンジ領域 (S124) のリン酸化修飾が足場非依存的増殖能を制御することを見出している。即ち、ヒト大腸がん細胞株 HCT-116 を親細胞として樹立した上記リン酸化部位のリン酸化型変異体発現細胞 (S124E 細胞) は軟寒天培地中のコロニー形成能は低く、非リン酸化型変異体発現細胞 (S124A 細胞) は高いコロニー形成能を示す。この結果は、2 種類の PKB の変異体は異なる下流シグナリングを誘導し、その違いが両細胞の足場非依存的増殖能の差をもたらすことを示唆している。そこで、本研究では上記の 2 種類の PKB 変異体発現細胞間で網羅的に PKB 下流タンパク質を比較し、両細胞で異なる制御を受けるタンパク質のなかから足場非依存的増殖能を制御する新たな分子を明らかにすることを目的として以下の解析を行った。

リン酸化ペプチドの精製と解析

上記の 2 種類の PKB 変異体発現細胞の抽出液を作成し、全タンパク質をリジルエンドペプチダーゼ(LysC)を用いて消化した。得られたペプチドを PKB リン酸化モチーフ抗体レジンに添加した後、低 pH バッファーを用いて溶出することで、PKB リン酸化モチーフのリン酸化を受けたペプチドを精製した。得られたリン酸化ペプチドをトリプシン消化した後に液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) 解析に供し、各ペプチドのアミノ酸配列決定し由来するタンパク質を同定するとともにリン酸化部位を決定した。



PKB リン酸化モチーフ部位のリン酸化を受けたタンパク質の比較

上記の解析により両サンプルから 1,800 種類以上のタンパク質に由来するペプチドが検出された。これらのうち、PKB リン酸化モチーフに合致する配列のリン酸化を受けたタンパ

【研究区分：先端的研究】

ク質は 165 種類であった。これらのタンパク質群にはすでに PKB の基質として知られている転写因子 FOXO1 やアポトーシス促進因子 Bad などが含まれており、本方法により PKB 基質のリン酸化を解析できることが確認された。そこで、両細胞間で検出されたリン酸化ペプチドを比較したところ、116 種類のタンパク質に含まれる 138 箇所 of リン酸化部位を含むリン酸化ペプチドは両細胞に共通して検出された。一方、21 種類のタンパク質に由来する 21 箇所のリン酸化部位を含むリン酸化ペプチドはリン酸化型 PKB 変異体発現細胞でのみ検出され、28 種類のタンパク質に由来する 32 箇所のリン酸化部位を含むリン酸化ペプチドは非リン酸化型 PKB 変異体発現細胞でのみ検出された。さらに、両細胞から共通して検出されたリン酸化ペプチドについて、質量分析におけるシグナル強度を比較したところ複数のタンパク質では検出量に大きな違いが見出された。

以上の結果から、異なる足場非依存的増殖能を示す 2 種類の PKB 変異体発現細胞では共通して誘導されるタンパク質群と両細胞間で異なる制御を受けるタンパク質群が存在することが明らかになった。これらのタンパク質のうち両細胞間で異なる制御を受けるタンパク質群はがん細胞の足場非依存的増殖能の調節に重要な役割を担うことが考えられる。なお、これらのタンパク質群には既知の PKB 基質でありがん抑制因子としても知られている TSC2 や PKB との関連は報告されていないものの様々な報告からがんとの関連が指摘されているタンパク質が複数含まれていた。現在、これらの両細胞間でリン酸化レベルの異なるタンパク質について、cDNA を用いた発現プラスミドの構築を進めている。今後、これらのタンパク質について 1) PKB 阻害剤や PKB ノックダウン細胞内の解析、試験管内での PKB によるリン酸化反応を検討 2) PKB 変異体発現細胞間のリン酸化レベルの比較を行うことを計画している。これらの解析により、PKB の直接の基質であり、なおかつに PKB ヒンジ領域の修飾により異なる制御を受けることが見出されたタンパク質については、リン酸化部位変異体発現プラスミドを構築し、各種動物培養細胞に発現して軟寒天培地におけるコロニー形成への効果を解析する。以上の解析を通じて細胞の足場非依存的増殖能を制御するこれまで知られていない PKB シグナリングが明らかとなり、がんを克服するための新たな情報になることが期待される。

