

主論文の要旨

**Focused proteomics revealed a novel Rho-kinase
signaling pathway in the heart**

（プロテオミクス解析を用いた心臓における
新規 Rho-kinase シグナル経路の解明）

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

（指導：室原 豊明 教授）

由良 義充

【緒言】

タンパク質リン酸化反応は心筋細胞内の情報伝達に必要不可欠である。適切なリン酸化が心筋の収縮や弛緩を制御している一方、過剰なリン酸化が心筋肥大や心不全といった心疾患を引き起こすことが知られている。これまでに報告された心臓特異的なリン酸化基質は、心臓から抽出されたタンパク質に放射性ラベルされた ATP が取り込まれるか一つ一つ確認する古典的な方法によって同定された。この方法では量の少ないタンパク質や微細なリン酸化を検出することができないため、最近では新しい心臓特異的なリン酸化基質はほとんど見つかっていない。また、近年は液体クロマトグラフィータンデム質量分析法によるリン酸化プロテオミクスが普及し、心臓におけるリン酸化タンパク質の検出がなされているが、どのタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）がそれらのタンパク質をリン酸化するかを知ることはできない。このように心筋細胞内のタンパク質リン酸化シグナル解析は非常に重要にも関わらず、研究が十分には進んでおらず、特定のキナーゼの基質の網羅的な検索方法は報告されていない。

【方法と結果】

我々は、アフィニティクロマトグラフィーと質量分析技術を組み合わせることによって、リン酸化基質スクリーニング方法（KISS 法：Kinase-Interacting Substrate Screening）を開発した（天野ら、J Cell Biol. 2015）。この方法は、キナーゼが基質をリン酸化する際に一過性にキナーゼと基質が複合体を形成する性質を利用している。本法を用いて心臓におけるリン酸化シグナル経路の解析を試みた。ビーズにキナーゼの触媒領域を固相化し、ラット心臓由来のタンパク質抽出液と混合後にプルダウンすることで、キナーゼと複合体を形成するタンパク質を分離することができる。引き続きこの複合体に ATP を加えてリン酸化反応を起こし、そのサンプルを質量分析装置により解析することでリン酸化タンパク質を同定する。この方法によりキナーゼの基質を効率良く同定することができる。初めに、心臓において比較的よく研究されているキナーゼ（PKA: Protein kinase A、ERK: Extracellular signal-regulated kinase）について基質のスクリーニングを試みた。リン酸化されたタンパク質を、PKA あるいは ERK のリン酸化基質を認識するモチーフ抗体を用いてイムノプロットすることにより、実際にそれぞれの基質候補が効率よくリン酸化されていることを確認した。このサンプルについて質量分析を行ったところ、既知の基質を含む多数の基質候補タンパク質を得ることができた。また、それぞれのキナーゼがリン酸化する配列を解析したところ、報告されているリン酸化モチーフとよく一致していた（Figure 1）。以上より、比較的よく研究されているキナーゼを例にして、KISS 法を用いることで心筋細胞中のリン酸化基質を同定できることが示された。次に、心臓における Rho-kinase の基質を検索した。Rho-kinase は、血管平滑筋と比べて心筋における働きが十分に研究されていないが、最近では心筋肥大や心不全の発症に関連していることが徐々に明らかになり、注目を集めている（下川ら、Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015）。これまで、心臓特異的な Rho-kinase の基質は報告されていないため、その役

割や作用機序については明らかにされていない。Rho-kinase を用いた KISS 法の結果、細胞骨格系のタンパク質、低分子量 G タンパク質の GEF/GAP、転写制御因子などを含む 300 個以上の基質候補タンパク質が検出された。この中で、核内で心筋肥大反応を抑制すると考えられている CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein) タンパク質に注目して機能解析を行った。放射性ラベルした ATP を用いて、実際に Rho-kinase が CARP をリン酸化することを確認した。質量分析により同定されたリン酸化サイトをアラニン置換して同様のアッセイを行うことで、Thr102 と Ser314 が主要なリン酸化サイトであることが示唆された (Figure 2)。Rho-kinase によってリン酸化された CARP の結合タンパク質のスクリーニングを施行したところ、14-3-3 タンパク質がリン酸化 CARP 特異的に結合することを見出した。14-3-3 タンパク質ファミリーは、リン酸化セリン/スレオニンを含むモチーフを認識し、結合することで標的タンパク質の生理機能や細胞内局在を変化させることが知られているスキヤフォールドタンパク質である。プルダウン法を用いて、RhoA/Rho-kinase の下流で CARP がリン酸化され、14-3-3 タンパク質との結合が亢進することを確認した (Figure 3)。14-3-3 タンパク質と CARP を培養細胞に共発現させたところ、野生型 CARP の細胞内局在が核から細胞質に変化した。非リン酸化型 CARP ではこの反応は確認できなかった。このことから、CARP のリン酸化とそれに引き続く 14-3-3 タンパク質との結合が、CARP の細胞内局在を調節している可能性が示唆された。CARP は核内で転写因子と結合することによって心筋肥大関連遺伝子の発現を抑制することが知られている。胎児心筋細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを施行したところ、非リン酸化変異型の CARP は野生型の CARP と比べて心筋肥大関連遺伝子の転写活性をより強く抑制することが確認された (Figure 4)。以上のことから Rho-kinase が CARP をリン酸化することで、細胞内局在の変化を介して心筋肥大関連遺伝子の転写活性を調整していることが示唆された。

【結語】

本研究では、我々が開発した KISS 法により PKA、ERK といった心臓における主要な働きをしているキナーゼの基質を網羅的にスクリーニングできることを示した。その上で、これまで特異的な基質が報告されていない Rho-kinase の基質についても網羅的なスクリーニングを行い、数多くのリン酸化基質候補タンパク質を得た。その中で新規基質 CARP を同定し、このリン酸化が CARP の機能を抑制することを示した。このように、KISS 法を用いることにより心筋細胞内情報伝達の解析が進み、ひいては心疾患の病態解明および治療法の確立に貢献することが期待される。