

2023 年度年次報告書
生命現象と機能性物質
2023 年度採択研究代表者

小形 公亮

京都大学 大学院薬学研究科
助教

リン酸化修飾タンパク質構造ダイナミクスの包括的解析

研究成果の概要

本研究では、これまでに「酵素自身の活性」の増減で説明されてきた細胞内のリン酸化修飾制御について、反応を受ける「基質の状態」に依存した制御の可能性を探るため、少数のリン酸化修飾部位ではなく、生体内に存在するリン酸化修飾全体(リン酸化プロテオーム)規模で、キナーゼやホスファターゼがどのような状態の基質を認識するのかを明らかにすることを目的とする。さらに、本知見に基づき「リン酸化修飾部位のアクセスしやすさ」を高スループットに評価する解析技術「リン酸化タンパク質フットプリント法」を開発し、タンパク質の液滴形成に代表される細胞内高次複合体制御にかかわる様々なリン酸化修飾タンパク質の構造ダイナミクスを包括的に明らかにする。

本年度は、キナーゼ反応の基質構造依存性の解明のために SRC キナーゼを用い酵素反応時間の検討を行った。具体的には、HEK293 細胞から非変性条件で抽出したタンパク質試料に対し、SRC キナーゼを加え一定時間インキュベートを行い、リン酸化修飾効率を評価した。結果、今回検討した中で最も短時間である 15 分の酵素反応において、最も鋭敏に基質の構造状態を検出可能であることが明らかとなった。さらに、短い反応時間で得られる低収量のリン酸化修飾部位の検出率向上のために、質量分析測定パラメータ、データ解析パラメータを検討し、一度の測定で 1000 を超えるリン酸化修飾部位についてその反応効率を明らかにすることが可能となった。今後は、キナーゼと同様にホスファターゼ反応条件・測定条件についても精査する予定である。