

Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化タンパク質の定量的解析：

Cdk5 活性化サブユニット p35 を例にして

久永眞市

首都大学東京 大学院理工学研究科 生命科学専攻

タンパク質のリン酸化は様々な細胞機能の制御機構として最も用いられている翻訳後修飾である。リン酸化の解析には様々な方法が用いられているが、*in vitro* のリン酸化に比べて、細胞内や組織内など *in vivo* のリン酸化を解析するのは容易ではない。これまでは、SDS-PAGE でのわずかな移動度の変化やリン酸化抗体などで調べられてきた。最近、広島大・木下らによって開発された Phos-tag 法を用いたところ、*in vivo* のリン酸化を定量的に解析することができた。我々が研究している Cdk5 の制御サブユニット p35 のリン酸化について、Phos-tag を用いた研究例の一つとして紹介したい。

Cdk5 はサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の一つであるが、主な Cdk (Cdk1 や Cdk2 など) が増殖細胞において細胞周期の進行を促進しているのに対して、最終分裂を終え、分化した神経細胞で機能する Cdk である。Cdk5-p35 の神経機能として、脳形成期の神経細胞の移動と層構造の形成、成体脳ではシナプス活動の調節、また、Cdk5 の異常活性化による神経細胞死などが知られている。

Cdk5 活性は p35 の合成と分解によって主に制御されている。p35 は2種類のプロテアーゼ分解を受ける。Cdk5-p35 の不活性化は p35 のプロテアソームによる分解で行われている。一方、p35 はカルパインによって限定分解され p25 (C末側の Cdk5 活性化領域から主になる) となり、異常活性化される。p25 は膜から遊離し、また、長寿命となり、細胞内のリン酸化状態を変化させ、神経細胞を死に導く。p35 のプロテアソームによる分解もカルパインによる分解も、p35 のリン酸化によって制御されている。即ち、p35 のリン酸化は神経細胞が生存していくためには非常に重要な役割を果たしている。我々は p35 のリン酸化について、*in vitro* のリン酸化、2次元フォスフォペプチドマップ、

リン酸化抗体など様々な手法を用いて解析してきた。その結果、p35 は Ser8 と Thr138 が主なリン酸化部位であり、Cdk5 自身によってリン酸化されていること、p35 の分解シグナルは Thr138 のリン酸化である一方、カルパインによる p25 への限定分解をも防いでいること示した。しかし、これまでの方法では *in vivo* におけるリン酸化を定量的に扱うことができなかった。

Phos-tag SDS-PAGE で p35 のリン酸化を調べたところ、リン酸化による移動度変化が非常に大きく、しかも限られた複数のバンドとして検出された。そこで p35 のリン酸化部位とバンドパターンを対応させることにした。p35 の主なリン酸化部位である Ser8 と Thr138 の Ala 変異体を、COS-7 細胞に Cdk5 またはキナーゼ活性を持たない knCdk5 と共発現させた。Cdk5 との共発現で上方にシフトすることから、Cdk5 によってリン酸化されることが確認された。また、p35 の Ser8 と Thr138 の Ala 変異で移動度変化が殆どなくなることから、Ser8 と Thr138 が主なリン酸化部位であることが確認できた。さらに、Ser8 と Thr138 のリン酸化の移動度変化が異なっていたため、殆ど全てのバンドとリン酸化を対応させることができた。なお、新規のリン酸化部位 Ser91 を見つけ、そこは CaMKII によってリン酸化されることも明らかにした。以上のように同定したリン酸化の標準マップを用いて、神経細胞内および脳内における p35 のリン酸化状態を解析した。培養神経細胞、ラット脳のいずれにおいても、p35 のリン酸化部位は Ser8、Thr138 と Ser91 の 3 か所であったが、リン酸化の部位と割合が異なっていた。培養神経細胞では Ser8 のみのリン酸化と Ser8 と Thr138 のリン酸化された p35 がほぼ同じ割合で存在していた。脳内の p35 は胎児と成体でリン酸化状態が異なっていた。胎児でリン酸化状態が高く、成体では減少していた。胎児ではリン酸化 Ser8 とリン酸化 Ser8/Ser91 が主で、Thr138 のリン酸化は 15%程度の p35 でしか見られなかった。成体脳では全てのリン酸化部位でリン酸化が減少していたが、特に Ser91 と Thr138 で著しく、Thr138 ほとんど見られなくなっていた。逆に 30%程度の p35 が非リン酸化型となっていた。

Phos-tag を用いた実験結果は、これまで  $^{32}\text{P}$  によるメタボリックラベルと 2 次元フォスホペプチドマップによって得た結果やリン酸化抗体を用いて得た結果と定性的にはよく一致していた。しかし、どのような部位の組み合わせでリン酸化されているか、またどの程度リン酸化されているかが判ったのは Phos-tag を用いて初めて出来たことである。