

21N-am09

リン酸化チロシンミミックペプチドプローブを用いたプロテインホスファターゼ濃縮法の開発

○高見 祐哉¹, 津曲 和哉¹, 張 心儀¹, 杉山 直幸¹, 大高 章², 石濱 泰¹(¹京大院薬, ²徳島大薬)

【背景・目的】

プロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼによる可逆的タンパク質リン酸化修飾は様々な細胞機能の調節に関与しており、その破綻は様々な疾患の原因となるため、これらの酵素は創薬標的や薬効マーカーとして重要である。キナーゼについては今までに数多くの阻害薬が開発され、その機能についても研究されてきたが、ホスファターゼについては未だに機能が分からないものも多い。そこで、ホスファターゼ全体を解析対象とするホスファトミクスのための基盤技術開発を目的とし、非加水分解性リン酸化チロシンミミックアミノ酸を含むペプチドプローブを用いたホスファターゼ濃縮法の開発を検討した。

【方法・結果】

非加水分解性リン酸化チロシンミミックアミノ酸である phosphonodifluoromethyl phenylalanine (F₂Pmp) を含むビオチン化ペプチドをプローブとして合成した。ヒト胎児腎細胞由来 HEK293T 細胞からタンパク質を抽出し、アビジンビーズに固定化したプローブを用いて F₂Pmp と相互作用するタンパク質をアフィニティ精製した。コントロールには、ビオチンのみを固定化したプローブを用いた。精製されたタンパク質をトリプシン消化し、得られたペプチドをコントロールプローブ由来ペプチドと区別するために異なる安定同位体ジメチル標識した後 LC/MS/MS 測定を行った。その結果、F₂Pmp ペプチドプローブ試料には、リン酸化チロシン認識 SH2 ドメイン (Src homology 2 domain) を含む FER、FYN、YES 等のタンパク質が濃縮されていることが確認された。また、F₂Pmp プローブのアミノ酸配列を変えることにより、PTN13 や PPI 等のホスファターゼの同定にも成功した。