

HEK 293T 細胞で過剰発現したヒト・デオキシシチジンキナーゼ の TALON[®] 樹脂による精製とリン酸化部位の同定

Caroline Smal¹⁾, Didier Vertommen²⁾, Luc Bertrand^{2,3)}, Sandrine Ntamashimikiro¹, Mark H. Rider²⁾, Eric Van Den Neste^{1,4)}, and Francoise Bontemps¹⁾

¹⁾Laboratory of Physiological Chemistry and ²⁾Hormone and Metabolic Research Unit, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, Universite catholique de Louvain, ³⁾Division of Cardiology, Universite catholique de Louvain and ⁴⁾Department of Hematology, Cliniques universitaires Saint-Luc, Universite catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium

ヒト・デオキシシチジンキナーゼ(dCK)はリン酸化タンパクであることがいくつかの報告で示唆されていたが、直接実証されてはいなかった。この仮説を実証するために、TALON金属アフィニティー樹脂で精製可能なようにN末端にポリヒスチジンタグをつけた形でdCKをHEK 293T細胞で過剰発現させた。³²P]-オルトリン酸存在下で細胞を培養したのち、dCKを精製し、SDS-PAGEとオートラジオグラフィーに供し、³²P]-標識を検出した。精製したdCKをトリプシン消化し、タンデム質量分析法で放射性ペプチドを分析したところ、*in vivo*でのリン酸化部位が4つ(Thr-3, Ser-11, Ser-15, Ser-74)同定され、Ser-74がもっとも強くリン酸化されていることが明らかになった。本研究により、dCKは真核細胞内で構成的にリン酸化されていることが直接実証された。

はじめに

デオキシシチジンキナーゼ(dCK)はヌクレオシド・サルベージ経路の律速ステップを触媒する。また、抗ガンおよび抗ウイルス化学療法でよく用いられているいくつかのヌクレオシド・アナログの活性化を開始し、それらの化学療法の効果に必須の役割を果たしている(1)。最近、dCK活性は翻訳後修飾によって制御されている可能性が示唆されている。dCKタンパク質の量的変化として説明できないdCK活性の増加が、遺伝毒性物質処理後の正常リンパ球あるいは白血病リンパ球で繰り返し観察されている(2,3)。さらに、トタンパク質ホスファターゼで細胞抽出液を処理すると、dCK活性が減少することが示されている(2,3)。我々は、インタクトな細胞内でdCKがリン酸化されていることを実証するために研究を始めた(4)。

dCKの*in vivo*でのリン酸化

予備実験として、白血病細胞を³²P]-オルトリン酸存在下で培養したが、dCKタンパク質のリン酸化を検出できなかった。おそらく発現レベルが低かったためであろうと思われる。この問題を回避するために、N末端に6xHisタグを融合させた形でdCKをヒト・胎児腎臓(HEK)293T細胞で過剰発現させた。トランスフェクションはjetPEI[™](PolyPlus Transfection, Illkirch, France)を用いて行った。この方法により、dCK活性は500~1000倍増加した。*in vivo*での標識実験では、このHEK 293T細胞を³²P]-オルトリン酸存在下で培養した後、細胞を溶解した。ライセートを遠心して沈殿を除去し、上清をクロンテック社のTALON Metal Affinity Resin(製品コード635502)を用いて精製した。この1ステップ精製で得られた産物をゲル電気泳動に供し、ゲルをクマシーブルーで染色したところ、単一の34 kDaのバンドが観察された(図1)。このバンドは、30.5 kDaのdCKサブユニットに6xHisタグが融合したものと推定される(5)。dCKは約20%の収率で約30倍に精製された。SDS-PAGEゲルのオートラジオグラフィーにより、34 kDaのバンドが放射性標識されたことがわかり(図2)、クマシーブルーで染色されたバンドおよび抗ポリHisモノクローナル抗体が反応したバンドと一致した。この結果から、放射性標識されたバンドは組換えdCKのバンドであり、構成的にリン酸化されていることが示された。

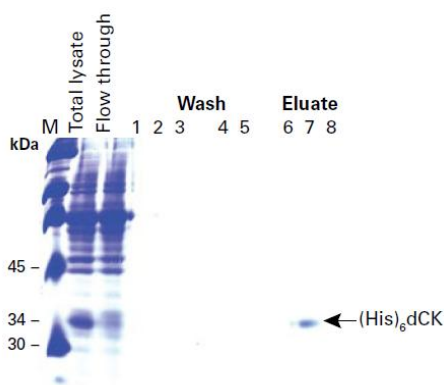


図1. HEK 293T 細胞で過剰発現した dCK の精製

dCKを過剰発現している細胞をPBSで洗浄した後、50 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM NaF, 1 mM K_2HPO_4 , 0.1 % β -メルカプトエタノール, 5 mM β -グリセロリン酸, 5 mM $Na_4P_2O_7$, 1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤 (1 mM *p*-toluenesulfonyl fluoride, 5 mM benzamidine, 5 μ g/ml ロイペプチンおよびアンチパイン) および1 mM sodium orthovanadateを含む細胞溶解バッファーで溶解した。ライセートを遠心し、組換えdCKを含む上清をTALONアフィニティーカラムにロードした。50 mM HEPES, pH 7.5, 0.1 % β -メルカプトエタノール, プロテアーゼ阻害剤および300 mM NaClを含む洗浄バッファーで3回洗浄した後、10 mMイミダゾールを添加した洗浄バッファーで2回洗浄した。次に溶出バッファー (洗浄バッファーに150 mMイミダゾールを添加し、NaClを除いたもの) で組換えdCKを溶出した。精製画分の100 μ lをSDS-PAGEに供し、クマシーブルーで染色した。レーンM : 分子量マーカー。レーン1~3 : 300 mM NaClを含むバッファーで洗浄した画分。レーン4および5 : 300 mM NaClおよび10 mMイミダゾールを含むバッファーで洗浄した画分。レーン6~8 : 150 mMイミダゾールを含むバッファーで溶出した画分。

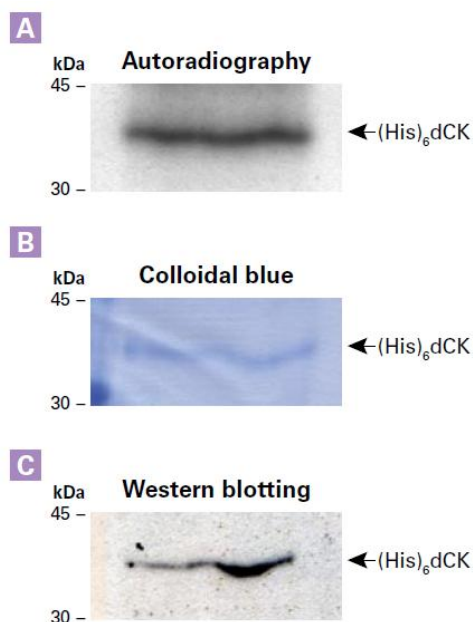


図2. HEK 293Tから精製したリン酸化dCKの検出

dCKを過剰発現する、一過性トランスフェクションしたHEK 293T細胞 (1.5×10^6 cells)を、トランスフェクションの2日後に $[^{32}P]$ -オルトリン酸 (670 μ Ci/ml) 存在下で3.5時間培養し、細胞を溶解した。クオンテックのTALON Resinと図1で述べたバッファーを用いて、細胞抽出液からdCKを精製した。精製されたdCKを限外濾過により濃縮し、SDS-PAGEに供した。ゲルをクマシーブルーで染色した後、オートラジオグラフィを行った。 ^{32}P を用いた条件で、ポリヒスチジンタグを付けたdCKを、抗ポリヒスチジンモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティングにより検出した。

dCKにおける*in vivo* リン酸化部位の同定

dCKに対応するバンドをゲルから切り出し、トリプシンで消化した。逆相HPLCによりペプチドを分離し、各画分のチェレンコフ放射をカウントした(図3)。放射活性のピークがいくつか検出され、組換えdCKに複数のリン酸化部位が存在することが示唆された。フロースルー(素通り)画分に現れたピークI以外の各放射性ピークについて、nano-ESI-MS/MSを用いてH₃PO₄(98 Da)のneutral lossを指標としたリン酸化ペプチドの検出スクリーニングを行った。この手法により、4つのリン酸化残基が同定された(表1)。

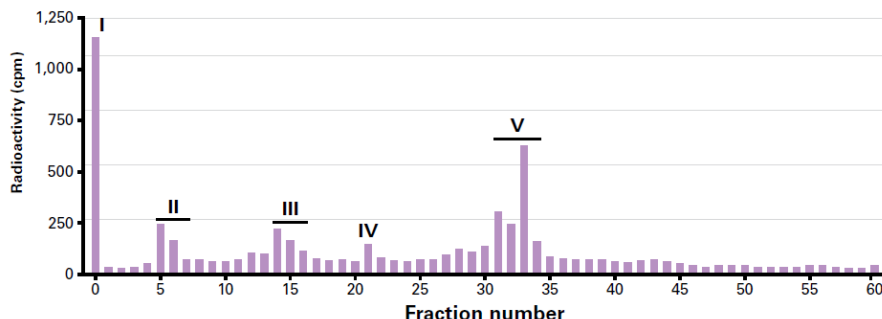


図3. トランスフェクションしたHEK 293T細胞から単離精製したdCKをトリプシン処理した後の[³²P]-標識ピークのHPLCプロファイル

HEK 293T細胞を[³²P]-オルトリン酸存在下で培養した後、放射性標識されたdCKをTALON Resinで精製し、メタノール-クロロホルムで沈殿させた後、SDS-PAGEに供した。dCKに対応するバンドを切り出し、トリプシンで消化した。標識されたペプチドを、同じ方法で得た非標識の消化産物と混合し、アセトニトリルの直線濃度勾配を用いた逆相narrow-bore HPLCで分離した。各画分のチェレンコフ放射をカウントした。ペプチドを含むピークをII~Vと表示した。下線を付したピークはリン酸化残基を含んでいる。

表1. Nano-ESI-MS/MSによって決定されたdCKリン酸化ペプチドの配列*1		
ペプチド	配列	リン酸化残基
II	- ₂ pEF6/HisDPA ₂ pTPPKR ₇	Thr-3
III	₈ ScPpSFSApSSEGR ₂₀	Ser-11, Ser-15
IV	ND	ND
V	₅₈ WcNVQSTQDFEELT _{M_{ox}} pSQK ₇₆	Ser-74

*1: 標識された(His)₆dCK HPLCピーク(図3)をnano-ESI-MS/MSで分析した。リン酸化ペプチドは、衝突誘起解離(collision-induced dissociation)における98 Daの喪失により同定した。リン酸化された残基は、MS3 modeでのフラグメンテーションにより同定した。ペプチドIIの最初の2つのアミノ酸(アスパラギン酸とプロリン)は、発現ベクターpEF6/Hisに由来するものであり、その後にdCKのAla-2が存在する。最初のメチオニンは存在しないが、それはdCK cDNAにBam HI制限酵素部位が導入されたためである。c=acrylamide(propionamide)-modified cysteine またはiodoacetamide(carboxamidomethyl)-modified cysteine。p=リン酸化残基。M_{ox}=酸化されたメチオニン。ND=検出されず。

ピークIVではリン酸化ペプチドは検出されなかった。HPLCピークの相対標識率は3つの個々の実験で計算した。Ser-74の相対標識率は³²P全取り込み量の44.6 ± 6.2%であり、主な*in vivo* リン酸化部位であると思われる。さらに部位特異的変異導入実験により、Ser-74のリン酸化はdCK活性に必須であり、一方、他の同定部位のリン酸化は必須ではないことが示された。本研究の詳細は文献4を参照されたい。

結語

[³²P]-標識実験により、dCKは真核細胞で発現後、構成的にリン酸化され、dCKの活性はSer-74のリン酸化の状態に依存することが実証された。dCKに6xHisタグを付けて発現させることにより、TALON Metal Affinity Resinを用いて1ステップ精製することができる。これにより、タンパク質のロスを最小限にし、作業時間を軽減でき、また[³²P]-標識物質を簡便に扱うことができる。

参考文献

1. Arner, E. S. & Eriksson, S. (1995) *Pharmacol. Ther.* **67**(2):155–186.
2. Csapo, Z., *et al.* (2001) *Biochem. Pharmacol.* **61**(2):191–197.
3. Smal, C., *et al.* (2004) *Biochem. Pharmacol.* **68**(1):95–103.
4. Smal, C., *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* **281**(8):4887–4893.
5. Chottiner, E. G., *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(4):1531–1535.

製品ガイド

- ▶ タンパク質精製および関連製品 [製品ガイド]

Notice to Purchaser

Data reprinted from The Journal of Biological Chemistry, Volume **281**(8), C. Smal, D. Vertommen, L. Bertrand, S. Ntamashimikiro, M. H. Rider, E. Van Den Neste & F. Bontemps, "Identification of *In Vivo* Phosphorylation Sites on Human Deoxycytidine Kinase. Role of Ser-74 in the Control of Enzyme Activity," pages 4887–4893. © 2006 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.