

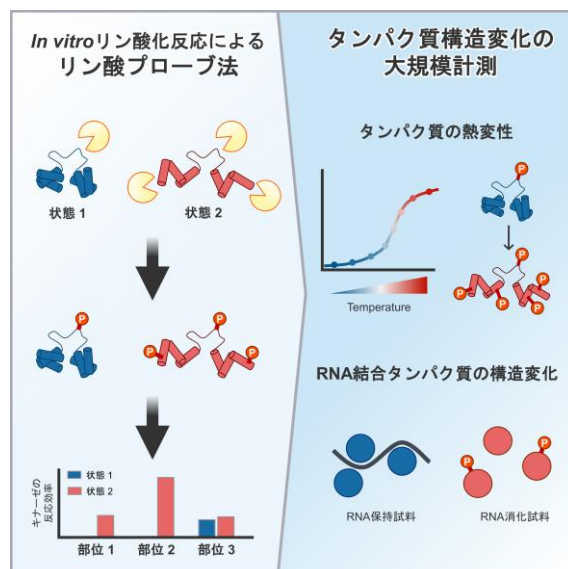
キナーゼをリン酸標識化剤として用いた タンパク質高次構造変化の大規模計測法を開発

タンパク質の高次構造は、その機能と密接に関連しています。細胞内でタンパク質は他のタンパク質や核酸との相互作用、翻訳後修飾などを通じて絶えず構造変化を起こしており、これらの構造ダイナミクスがシグナル伝達や細胞機能の制御に重要な役割を果たしています。このため、細胞内プロテオームの構造変化を網羅的に解析する「構造プロテオミクス」は、生命象の分子基盤を理解する上で不可欠です。しかし、従来のタンパク質構造プロテオミクス手法では、標識ペプチドの不均一性や標識化されたペプチドの検出感度の低さがプロテオーム規模の解析の障壁となっていました。

京都大学大学院 薬学研究科の前田朝登 大学院生、小形公亮 助教、石濱泰 教授の研究グループは、タンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）による *in vitro* リン酸化反応を利用して、タンパク質の高次構造変化をプロテオーム規模で検出する新手法「リン酸プローブ法」を開発しました。本研究では、キナーゼの基質認識による部位特異的なリン酸化と、リン酸化ペプチド濃縮技術を組み合わせることで、タンパク質の構造変化を残基レベルで高感度かつ網羅的に検出することを可能にしました。HEK293T 細胞由来のプロテオーム試料に本手法を適用し、RNA 消化に伴う RNA 結合タンパク質の構造変化を 300 以上のチロシンリン酸化部位で検出することに成功しました。

本成果は、タンパク質の構造ダイナミクスの理解を深めるとともに、創薬標的の探索や疾患メカニズムの解明に貢献することが期待されます。

本研究成果は、2026年5月27日11時（米国東部時間）に国際学術誌「*Cell Reports Methods*」のオンライン版で公開されました。



リン酸標識法の概要。基質タンパク質構造の違いはキナーゼのアクセス性を変えるため、キナーゼの反応効率の差を評価することで基質タンパク質の構造変化の検出が可能になる。

©京都大学 作成：前田朝登 京都大学大学院薬学研究科生体分子計測学分野

<研究の背景と経緯>

タンパク質の高次構造は、その機能と密接に関連しています。細胞内でタンパク質は他のタンパク質や核酸との相互作用、翻訳後修飾などを通じて絶えず構造変化を起こしており、これらの構造ダイナミクスがシグナル伝達や細胞機能の制御に重要な役割を果たしています。このため、細胞内プロテオームの構造変化を網羅的に解析する「構造プロテオミクス」は、生命現象の分子基盤を理解する上で不可欠です。

質量分析（MS）を用いたタンパク質構造解析法として、水素-重水素交換質量分析法（HDX-MS）やヒドロキシラジカルフットプリンティング（HRF）などの標識手法が知られています。また、限定消化一質量分析法（LiP-MS）のような消化酵素を用いた手法も開発されていますが、これらの手法ではアミノ酸非特異的な反応により多数の生成物が生じるため、複雑なプロテオーム試料から、高感度、かつ残基特異的な構造変化解析が困難でした。したがって、残基レベルの分解能を持ちつつ高感度にタンパク質構造変化を検出する手法の開発が求められていました。

<研究の内容>

本研究では、タンパク質キナーゼによる *in vitro* リン酸化反応を利用してタンパク質の高次構造変化を検出する新手法「リン酸プローブ法」を開発しました。この手法では、非変性条件下で抽出したタンパク質試料に対して組換えキナーゼによる短時間の *in vitro* リン酸化反応を行い、リン酸化ペプチド濃縮技術と nanoLC/MS/MS を組み合わせその反応効率を定量することで構造変化が生じた残基を同定します。

まず、モデルタンパク質であるアポミオグロビンを用いて、熱変性によるタンパク質構造変化をリン酸プローブ法で検出できることを実証しました。円偏光二色性（CD）スペクトル解析により確認された α -ヘリックス含量の減少と、リン酸プローブ効率の上昇が相関することを示しました。

次に、HEK293T 細胞から非変性条件下で抽出したプロテオーム試料に本手法を適用し、トリプシン消化の有無によるタンパク質構造の違いがリン酸プローブプロファイルに反映されることを確認しました。非変性試料では 440 カ所、トリプシン消化試料では 678 カ所のチロシンリン酸化部位が同定され、AlphaFold2 の予測構造との比較から、非変性試料で同定された部位の 50%が天然変性領域に、トリプシン消化試料でのみ同定された部位の 95%以上が構造化領域に位置することが明らかになりました。

さらに、RNA 消化によるタンパク質構造変化の検出にも本手法を適用しました。RNA 保持試料と RNase 処理による RNA 消化試料のリン酸プローブ効率を比較した結果、1,881 タンパク質上の 3,126 カ所のチロシンリン酸化部位を同定しました。そのうち 301 カ所で RNA 消化により有意にプローブ効率が増加しました。これらの部位は RNA 結合タンパク質に高度に濃縮されており、60S リボソームタンパク質 L5（RPL5）では、プローブ効率が上昇した 4 つのチロシン残基がすべて RNA 近傍（8 Å 以内）に位置していることが確認されました。

<今後の展開>

本研究で開発されたリン酸プローブ法は、今後さまざまなキナーゼを使用することでリン酸化可能な部位の範囲を拡大し、プロテオーム全体の構造解析カバレッジを向上させることが期待されます。さらに、薬剤結合やタンパク質間相互作用などの微細な構造変化の検出が実現すれば、創薬標的の同定やドラッグリポジショニング、疾患関連タンパク質の構造メカニズム解明などへの幅広い応用が期待されます。

<研究プロジェクトについて>

本成果は、科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 ACT-X（JPMJAX2324；小形公亮）、JST SPRING（JPMJSP2110；前田朝登）、日本学術振興会科学研究費補助金（23K18185, 23H04924；石濱泰、25K18607；小形公亮）、公益財団法人中谷財団（小形公亮）、公益財団法人薬学研究奨励財団（小形公亮）の助成を受けて行われました。

<用語解説>

注1) 構造プロテオミクス

タンパク質の高次構造（立体構造）の変化をプロテオーム規模（細胞内の全タンパク質レベル）で網羅的に解析する研究分野。タンパク質の構造変化は機能変化と密接に関連するため、疾患メカニズムの解明や創薬研究において重要な情報を提供する。

注2) リン酸化ペプチド濃縮

タンパク質消化物からリン酸化されたペプチドだけを選択的に回収する技術。酸化チタン（TiO₂）などの金属酸化物を用いた親和性クロマトグラフィーにより、微量のリン酸化ペプチドを高効率に濃縮でき、質量分析による高感度検出を可能にする。

注3) リン酸プローブ法

本研究で開発された新手法。タンパク質キナーゼによる *in vitro* リン酸化反応を利用して、タンパク質の溶媒露出残基にリン酸基を付加し、その標識効率の違いから構造変化を検出する方法。リン酸化ペプチド濃縮技術と組み合わせることで高感度検出を実現する。

注4) チロシンキナーゼ SRC

チロシン残基をリン酸化するタンパク質キナーゼの一種。幅広い基質タンパク質を *in vitro* でリン酸化できる高い触媒活性を持ち、本研究ではリン酸標識反応用酵素として使用された。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Detecting Protein Higher-Order Structural Changes Using Kinase as a Phospho-Labeler（キナーゼをリン酸標識化剤として用いたタンパク質高次構造変化の検出）

著者：前田朝登、小形公亮、石濱泰

掲載誌：Cell Reports Methods, 2026, DOI：10.1016/j.crmeth.2026.101466