

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07198

研究課題名(和文) in vitroキナーゼ-基質間情報に基づく細胞内リン酸化ネットワーク解析

研究課題名(英文) Phosphorylation network analysis based on in vitro kinase-substrate relationships

研究代表者

杉山 直幸 (Naoyuko, Sugiyama)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50545704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内におけるタンパク質間のリン酸化ネットワークの網羅的な解析を目的とし、in vitro反応試験によって得られた基質情報から各キナーゼの基質モデルを構築し、キナーゼの生理条件下における基質の予測法を開発した。標的分子が既知であるキナーゼ阻害薬による刺激を与えた細胞に対して大規模なタンパク質リン酸化解析を行い、変動したリン酸化サイトに対応する責任キナーゼを抽出することで、予測したキナーゼ-基質間情報の妥当性の評価を行った。既存法と比較して、標的キナーゼおよびその下流のシグナル伝達経路に属するキナーゼ群の阻害をより高い確度で予測することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質のリン酸化は細胞内のシグナル伝達に非常に重要な役割を果たしており、リン酸化酵素であるキナーゼの異常は様々な疾患と関連があることが知られている。本研究では、細胞内情報伝達ネットワークの全体像の解明を目的として、細胞内に存在するキナーゼ群の基質となるタンパク質を予測する方法を開発した。本研究によって開発した方法を用いて各キナーゼの詳細な機能や細胞内リン酸化ネットワークの全体像が明らかとなれば、タンパク質のリン酸化異常が関与する多くの疾病のメカニズム解明や病気の診断や層別化、新規な分子標的薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To analyze a comprehensive overview of intracellular phosphorylation networks, we constructed phosphorylation model of individual human protein kinase based on in vitro kinase-substrate relationships, and developed a method for prediction of physiological kinase substrates.

The predicted kinase-substrate relationships were evaluated by using a large-scale quantitative phosphoproteome profiling, in which cultured cells were treated with or without a kinase inhibitor. Responsible kinases for the downregulated phosphorylation sites were predicted using the our method. As a result, we successfully predicted inhibition of targeted and its downstream kinases and found that the prediction accuracy is higher than that of the existing techniques.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス シグナル伝達 タンパク質キナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達においてもっとも重要な役割を果たしている翻訳後修飾の一つである。そのリン酸化反応を担う酵素プロテインキナーゼの過剰発現や調節損失による恒常的活性化によるシグナル伝達異常は、がんをはじめとした様々な疾患に関連することが知られている。すなわち、タンパク質のリン酸化を介したシグナル伝達のメカニズムを観測することは生命現象の理解のみならず、病気の診断や治療、創薬研究を行う上でも非常に有用である。ヒトでは518種類のプロテインキナーゼがこれらのリン酸化を担っていると考えられているが、その基質特異性や制御メカニズムについては十分な知見が得られていない。

申請者はこれまでにヒトキナーゼ組換え体を用いて *in vitro* 反応試験を行い、LC-MS/MSを用いた定量的リン酸化プロテオーム解析によって *in vitro* 基質の同定を実施した。現在354個のヒトキナーゼについて、平均して約500の基質を同定し、リン酸化モチーフを決定することに成功している。

2. 研究の目的

本研究課題では、細胞内におけるタンパク質間のリン酸化ネットワークの網羅的な解析を目的とし、上述の *in vitro* 反応試験によって得られた基質情報から各キナーゼの基質モデルを構築した。さらに、タンパク質間相互作用、細胞内局在、摂動実験によるリン酸化プロファイリングと組み合わせ、キナーゼの生理条件下における基質の予測および検証を行った。

3. 研究の方法

(i) *in vitro* 基質情報を用いた、*in vivo* キナーゼ基質の予測

これまでに取得しているキナーゼの *in vitro* 基質情報を基に、*in vivo* 基質の予測を行った。予測には *in vitro* 条件下でリン酸化された配列情報から作成した部位特異的配列マトリックス (position-specific sequence matrix, PSSM)、②公共データベースから取得したタンパク質間相互作用、局在情報、③大規模リン酸化プロテオミクスにより得られたヒトタンパク質のリン酸化情報の3つを用いたスコアリングにより行った。

(ii) キナーゼ阻害薬実験を用いた予測結果の検証

項目(i)で予測した *in vivo* キナーゼ基質が妥当であることを示すために、実際の細胞中の特定のキナーゼの活性を阻害、あるいは発現を抑制する実験を行い、予測された基質タンパク質のリン酸化が減少するかを検証した。標的分子が既知のキナーゼ阻害剤を用いた細胞刺激実験を行ったのち、リン酸化プロテオーム解析により変動したリン酸化サイトを同定することで、予測結果の評価を行った。

4. 研究成果

(i) キナーゼの *in vitro* 基質同定、PWMの構築

研究代表者は、これまでの研究において354種のヒトキナーゼ組換え体を用いた *in vitro* 反応試験を行い、リン酸化プロテオーム解析により *in vitro* 基質を大規模に同定している。対象キナーゼの拡張を行い、本研究では385種のヒトキナーゼに対する *in vitro* 基質の同定を行った(図1)。得られた結果に基づき、キナーゼのクラスター解析を行い、キナーゼの分類図を作成した結果、従来のキノーム系統樹と非常に良い一致が見られた一方、セリン/スレオニンに対する選択性が顕著に反映されるという相違点も見られた。論文投稿中、in revision)。得られたキナーゼ-基質間情報に基づき、各キナーゼの基質選択性を表す PWM(position weight matrix)を作成した。

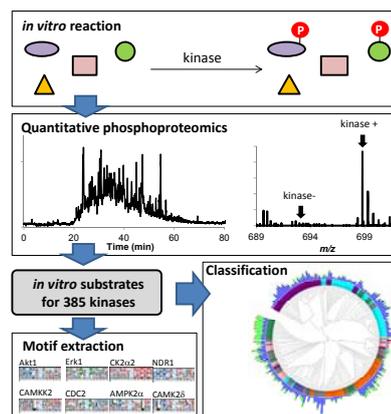


図1 キナーゼの *in vitro* 基質同定

(ii) *in vivo* キナーゼ基質の予測と予測結果の検証

上述の各キナーゼの PWM、*in vitro* 基質、モチーフの fold-increase (FINC) の基づくスコア (研究業績: 雑誌論文⑥)、報告されているタンパク質間相互作用¹や細胞内局在情報²などを組み合わせ、288種のヒトキナーゼを対象とした基質予測法を開発した。次に、刺激を与えた細胞に対して大規模なタンパク質リン酸化解析を行い、予測したキナーゼ-基質間情報の妥当性の評価を行った。EGFR 阻害薬であるゲフィチニブによる刺激によりリン酸化レベルが有意に減少したリン酸化部位に対する責任キナーゼを各キナーゼの PWM (position weight matrix) に基づくスコアによって予測した結果、EGFR signaling pathway または MAPK signaling pathway に属するキナーゼ群が高スコアを有するキナーゼとして抽出された。KSEA 法³など既存の予測法と比較しても、上記パスウェイに属するキナーゼ群の活性化をより高い確度で予測すること

が出来た(図2)。また、EGFRの阻害薬であるゲフィチニブを用いて同様の実験を行ったところ、同様なキナーゼ群の活性化予測されたことから、本方法による責任キナーゼ予測の妥当性が示された。

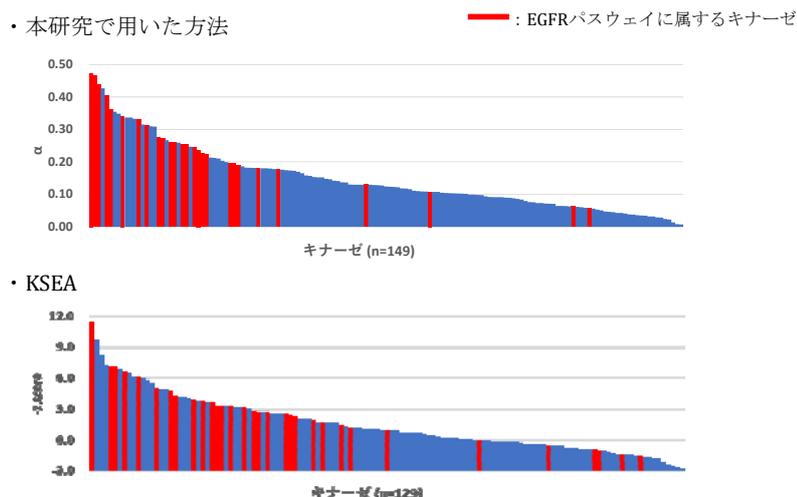


図2 ゲフィチニブ処理により変動したリン酸化サイトに対する責任キナーゼ予測

(iii) ゲノム配列未知生物のプロテオーム解析のためのデータベース構築法の開発

ゲノム配列情報のない生物種に対して大規模プロテオミクスを行うためのデータベース構築法を開発し、ゲノム未知なヘリコバクター・ピロリ株の大規模なプロテオーム解析に応用した。ゲノム既知の52株のタンパク質データベースから、non-redundantなペプチドデータベースを構築し(図3)、ゲノム未知のピロリ株に対して、ゲノム既知株と同程度の深度でプロテオーム解析を行うことに成功した。7種類の発現プロテオームプロファイルを用いてクラスター解析を行った結果、ゲノム配列や疾患との関連性よりも地域特性を反映していた。さらにリン酸化プロテオーム解析を行った結果、タンパク質N末端の2番目のセリンがリン酸化されるというモチーフが見出された(研究業績: 雑誌論文②)。

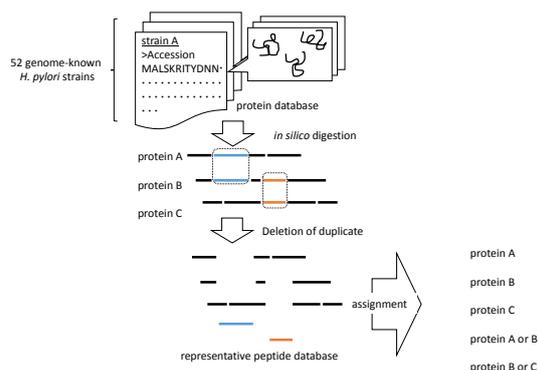


図3 ヘリコバクター・ピロリ DBの構築

<引用文献>

1. Szklarczyk, D. et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* **43**, D447-452 (2015).
2. Orre, L.M. et al. SubCellBarCode: Proteome-wide Mapping of Protein Localization and Relocalization. *Molecular cell* **73**, 166-182 e167 (2019).
3. Wiredja, D.D., Koyuturk, M. & Chance, M.R. The KSEA App: a web-based tool for kinase activity inference from quantitative phosphoproteomics. *Bioinformatics* (2017).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6件)

- ① Takahashi C, Yazaki T, Sugiyama N, Ishihama Y. Selected Reaction Monitoring of Kinase Activity-Targeted Phosphopeptides. *Chromatography 2019 in press*, 査読有
- ② Sugiyama N, Miyake S, Lin MH, Wakabayashi M, Marusawa H, Nishiumi S, Yoshida M, Ishihama Y. Comparative proteomics of *Helicobacter pylori* strains reveals

geographical features rather than genomic variations. *Genes Cells*. 2019 Feb;24(2):139-150. doi: 10.1111/gtc.12662. 査読有

- ③ Amagai A, Honda Y, Ishikawa S, Hara Y, Kuwamura M, Shinozawa A, Sugiyama N, Ishihama Y, Takezawa D, Sakata Y, Shinozaki K, Umezawa T. Phosphoproteomic profiling reveals ABA-responsive phosphosignaling pathways in *Physcomitrella patens*. *Plant J*. 2018 May;94(4):699-708. doi: 10.1111/tpj.13891. Epub 2018 Apr 23. PubMed PMID: 29575231. 査読有
- ④ Hiyama A, Takemiya A, Munemasa S, Okuma E, Sugiyama N, Tada Y, Murata Y, Shimazaki KI. Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nat Commun*. 2017 Nov 3;8(1):1284. doi: 10.1038/s41467-017-01237-5. 査読有
- ⑤ Okuda S, Watanabe Y, Moriya Y, Kawano S, Yamamoto T, Matsumoto M, Takami T, Kobayashi D, Araki N, Yoshizawa AC, Tabata T, Sugiyama N, Goto S, Ishihama Y. jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jan 4;45(D1):D1107-D1111. doi: 10.1093/nar/gkw1080. 査読有
- ⑥ Imamura H, Wagih O, Niinae T, Sugiyama N, Beltrao P, Ishihama Y. Identifications of Putative PKA Substrates with Quantitative Phosphoproteomics and Primary-Sequence-Based Scoring. *J Proteome Res*. 2017 Apr 7;16(4):1825-1830. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00087. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 吉川侑樹・杉山直幸・石濱泰、キナーゼ収斂リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的薬プロファイリング、日本薬学会第 139 年会、2019 年
- ② 杉山直幸、細菌叢の高深度メタプロテオーム解析、Meta-Omics Workshop in Kyoto 2019、2019 年
- ③ 杉山直幸・今村春菜・坂本大・中園純菜・八児一隆・高橋知里・Hsin-yi, Chang・石濱泰、キノームプロファイリングによるリン酸化ネットワーク解析、日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会、2018 年
- ④ Naoyuki Sugiyama, Dai Sakamoto, Junna Nakazono, Kazutaka Yachigo, Hsin-Yi Chang, Yasushi Ishihama、Direct Profiling of Kinome Activities Using Kinase-Specific Substrate Peptides、25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques(ITP2018)、2018 年
- ⑤ Naoyuki Sugiyama、Phosphoproteome and Kinome Profiling Using NanoLC-MS/MS、2nd International BMS Symposium 2018、2018 年
- ⑥ Naoyuki Sugiyama , Yasushi Ishihama、Human Kinome Profiling using Phosphoproteomic Approaches、KBMSS2018、2018 年
- ⑦ 杉山直幸、石濱 泰、プロテオミクスを用いたキナーゼ収斂型シグナルネットワーク解析、質量分析フォーラム 2017、2017 年
- ⑧ 杉山直幸、石濱 泰、リン酸化プロテオーム解析技術を用いたキノームプロファイリング、第 77 回分析化学討論会、2017 年
- ⑨ Naoyuki Sugiyama, Dai Sakamoto, Haruna Imamura, Pasrawin Teachawattananant, Natsumi Ishikawa, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama、Profiling Kinome Activities Using Kinase-Specific Substrate Peptides、HUP02016、2016 年
- ⑩ 杉山直幸、三宅里美、坂本 大、Pasrawin Teachawattananant、若林真樹、石濱 泰、データベース構築とキナーゼ基質予測を用いた大規模発現/翻訳後修飾プロテオーム解析、ヒトプロテオーム学会 2016 年大会、2016 年
- ⑪ 杉山直幸、坂本 大、今村春菜、Pasrawin Teachawattananant、石川奈津美、若林真樹、石濱 泰、ヒトキノームの基質特異性および活性プロファイリング、第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

研究室ホームページ：<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizai/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：新苗 智也

ローマ字氏名：NIINAE, Tomoya

研究協力者氏名：吉川 侑樹

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, Yuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。