

令和元年6月19日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08206

研究課題名(和文) MS/MSシミュレーションによる、高感度タンパク質リン酸化部位同定法の開発

研究課題名(英文) Development of a sensitive localization method for protein phosphorylation sites based on MS/MS spectral simulation

研究代表者

今西 進 (Imanishi, Susumu)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：00757502

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)：リン酸化ペプチドMS/MSスペクトルのシミュレーション用プログラムを開発した。Windows OSのコマンドプロンプトにより動作していたものにユーザーインターフェイスを与え、種々のパラメーターを容易に変更可能にし、このプログラムをSimPhosphoバージョン1とした。SimPhosphoをTripleTOF質量分析計で取得したMS/MSスペクトルに対して用いることにより、SpectraSTソフトウェアによるスペクトルライブラリ検索でリン酸化ペプチドの同定が可能であることを確認した。さらにリン酸化部位を特異的かつ高感度に同定できるよう、シミュレーション条件の最適化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、生体タンパク質の網羅的解析(プロテオミクス)を行うことにより一度に数万ものリン酸化が観察でき、それら膨大な報告は、PhosphoSitePlusなどのデータベースに次々と蓄積されている。本研究では、その検出感度をさらに高感度化したことにより、今まで困難であった低存在量リン酸化の観察を可能にすると期待できる。リン酸化は細胞内情報伝達を中心としており、様々な生体機能の制御に関わっていることから、それらリン酸化の網羅的解析は、今後、生命科学および医学・薬学のさらなる発展に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a simulation program for MS/MS spectra of phosphopeptides. Although the original version of the program was based on Windows command prompt, the program was given an user interface and named SimPhospho version 1, which offers variable simulation parameters. The SimPhospho was evaluated on MS/MS spectra acquired using a TripleTOF mass spectrometer, and enabled phosphopeptide identification by spectral library searching using SpectraST software. Furthermore, simulation conditions were optimized for confident and sensitive localization of phosphorylation sites.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：質量分析 プロテオミクス リン酸化部位同定 シミュレーション プログラム開発 タンパク質リン酸化 スペクトルライブラリ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内にはさまざまなタンパク質が存在し、細胞内外において重要な役割を担っている。タンパク質は翻訳後修飾を受けることにより、その酵素活性、タンパク質間相互作用、細胞内局在など、様々な機能が制御される (Jensen, 2006)。それらタンパク質翻訳後修飾の中でも、現在までに最も詳細に研究されてきたものがリン酸化である。リン酸化酵素 (kinase) により、主に基質タンパク質のセリン、スレオニン、チロシン残基の水酸基がリン酸化され、脱リン酸化酵素 (phosphatase) とのバランスにより、そのリン酸化量は調節されている。それら生体内タンパク質のリン酸化を網羅的に解析するため、ナノ流速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (nano LC-MS/MS) による測定が行われてきた。タンパク質の網羅的解析をプロテオミクスと呼ぶことから、それらリン酸化の網羅的解析はリン酸化プロテオミクスと呼ばれている。近年、質量分析装置及び試料調整方法の開発がすすみ、一度の実験において数千~数万種のタンパク質リン酸化の観察が可能になっている (Zhang et al., 2013; Sharma et al., 2014)。

プロテオミクスでは、ボトムアップと呼ばれる手法が現在主流である (Zhang et al., 2013)。まずトリプシンなどの酵素を用いてタンパク質を 1000-3000 Da 程度のペプチドに消化し、それらを C18 カラムなどを用いて脱塩処理後、nano LC-MS/MS において測定する。得られた MS/MS スペクトルを、タンパク質のアミノ酸配列データベースから考えられ得る理論値と照らし合わせ、検索することにより、ペプチド及び消化前のタンパク質の同定を行う。その際、タンパク質消化後に親和性クロマトグラフィーを用いることにより、リン酸化ペプチドを濃縮・精製することができ、リン酸化タンパク質及びそのリン酸化部位の同定を大幅に促進することができる (Jensen, 2006)。親和性クロマトグラフィーとしては、金属イオン固定化親和性クロマトグラフィー (IMAC) や二酸化チタン (TiO₂) 親和性クロマトグラフィーが用いられている。

研究代表者も、2005 年より、フィンランドの Turku Centre for Biotechnology (Turku CBT) において、リン酸化プロテオミクスにおける種々の手法の開発・改良を行ってきた。その中でも特に最近では、リン酸化部位を高感度に同定する新たなデータ解析法 SimSpectraST (Sun et al., 2015) の開発を進めている。この手法は、これまでに報告されている他の代表的なプログラム、Ascore (Beausoleil et al., 2006) や phosphoRS (Taus et al., 2011) などと比べ、より高い検出感度を示している。リン酸化ペプチドとその対応する非修飾ペプチドは、四重極などのビーム型の衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) を用いた測定条件化では、フラグメントイオン強度分布が非常に似た MS/MS スペクトルを示すことを、研究代表者らは報告している (Imanishi et al., 2007)。これは、イオントラップ型の CID では観察されない現象である。その知見をもとに、非修飾ペプチドの MS/MS スペクトルを鋳型にして、リン酸化ペプチドをコンピュータ上でシミュレートすることに成功した (Sun et al., 2015)。このリン酸化のシミュレーションは、セリン・スレオニン・チロシン残基、いずれに対しても行うことができる。そのため、ペプチド配列上に起こり得る、全てのリン酸化パターンをシミュレートすることにより、リン酸化部位網羅的な MS/MS スペクトルのライブラリが作成可能となる。結果、実際に測定したリン酸化ペプチドの MS/MS スペクトルを、SpectraST プログラムを用いてライブラリとマッチングさせることにより、高精度なリン酸化ペプチド同定を可能にした (SimSpectraST)。しかし、今のところ、一リン酸化のシミュレーションにのみ対応している。

2. 研究の目的

【平成 28 年度】 SimSpectraST に用いるシミュレーションアルゴリズムに変更を加え、二リン酸化、さらに多リン酸化のペプチドにまで対応可能にする。また、そのプログラムにユーザーインターフェイスを搭載する。

【平成 29 年度】 合成リン酸化ペプチドなどのモデルデータをもとに、高精度かつ高感度なリン酸化部位同定結果が得られるよう、プログラムの改良・調整を行う。その際、異なる種類の質量分析計への、SimSpectraST の互換性も併せて検討する。

【平成 30 年度】 腎リン酸化プロテオームを測定し、そのデータをもとに、改良版 SimSpectraST の有効性を、他のプログラムと比較検討する。さらに、リン酸化プロテオームを定量解析することにより、腎細胞がんの情報伝達系をシステム生物学的に検討する。

3. 研究の方法

【平成 28 年度】

図 1 に示すように、それまでの SimSpectraST 用アルゴリズムを用いることにより、一リン酸化ペプチドの MS/MS スペクトルをシミュレートすることが可能である。これは、市販リン酸化タンパク質であるカゼイン、及び、合成リン酸化ペプチドの測定結果をモデルデータとし、それらをもとに考案されたものである (Imanishi et al., 2007; Sun et al., 2015)。さらに、二リン酸化、多リン酸化に関しても、一リン酸化と同様の法則が成り立つと考えられる (Imanishi et al., 2007)。そこで、一リン酸化用のシミュレーションを多重的に行うことにより、多リン酸化のシミュレーションを行えるよう、アルゴリズムに改良を加える。

リン酸化シミュレーションの鋳型として必要な非修飾ペプチドの MS/MS スペクトルは、リン酸化ペプチドを脱リン酸化酵素で処理することにより得られる。以前の研究では、HeLa 細胞の脱リン酸化ペプチドを鋳型スペクトルとして用いていた (Sun et al., 2015)。本研究においても同じデータを用い、アルゴリズムの開発をすすめる。

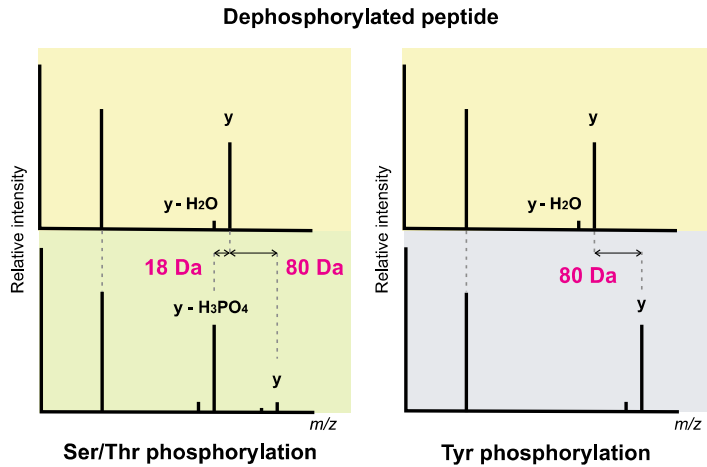


図1 MS/MSスペクトル上での、
リン酸化ペプチドのシミュレーション
(フラグメントイオンの予測)

また、現在のプログラムは、Windows OS のコマンドプロンプトにより動作するが、他の OS でも動作可能にするよう改良する。さらに、ユーザーインターフェイスを与え、種々のパラメーターを設定可能にすることにより、それらの条件検討を容易にする。

併せて、モデルデータとして、合成多リン酸化ペプチド及びカゼインの測定を行う。既に、112 種の合成多リン酸化ペプチドを、Turku CBT において購入済みである。以前のデータは、オービトラップ型質量分析計である LTQ Orbitrap Velos 及び Q Exactive を、nano LC-MS/MS 測定に用いて得られたものであった (Sun et al., 2015)。本研究では、Q Exactive に加えて、さらに Q-TOF 型質量分析計である TripleTOF 5600 も用いることにより、SimSpectraST 用プログラムのデータ互換性も検討する。

【平成 29 年度】

研究初年度に得られたモデルデータをもとに、より高精度かつ高感度なリン酸化部位同定結果が得られるよう、プログラムの改良・調整を行う。

また、モデルデータだけではなく、実際の生体データの解析も行うことにより、新規プログラムの有用性を示す。そのため、培養腎がん細胞のリン酸化プロテオームを、nano LC-MS/MS により測定する。その際、SimSpectraST 解析には、シミュレートされたスペクトルライブラリを構築するために、非修飾ペプチドの MS/MS スペクトルが必要である。そこで、リン酸化ペプチドを濃縮後に脱リン酸化し、それらの nano LC-MS/MS 測定も行う。

【平成 30 年度】

上述の腎細胞のデータ解析は、phosphoRS 等、他の主要プログラムとの比較検討により行う。それにより、新規プログラムを用いた改良版 SimSpectraST の性能および特徴を明らかにする。

また、腎がん細胞に、マルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブ・スニチニブや mTOR 阻害薬であるエベロリムス・テムシロリムス进行处理することにより、それら分子標的薬が引き起こす細胞内リン酸化状態の変化を、システムレベルで詳細に比較検討する。以前、研究代表者らは、リン酸化プロテオームの非標識定量解析を高精度に行う手法を開発している (Kauko et al., 2015)。そこで、同様の手法を用いて定量解析後、パスウェイ解析やキナーゼ予測などを行う。

4. 研究成果

【平成 28 年度】

リン酸化ペプチド MS/MS スペクトルのシミュレーション用プログラムの開発をすすめた。Windows OS のコマンドプロンプトにより動作していたものを、他の OS 上でも動作可能に改良した。さらにユーザーインターフェイスを与え、種々のパラメーターを容易に変更可能にした。

平成 28 年に、最新型質量分析計 Sciex TripleTOF 6600 およびナノ流速液体クロマトグラフ Eksigent 425 が名城大学分析センターに導入された。まず、それらを nano LC-MS/MS 測定に有効に用いられるよう、測定条件の検討を行った。結果、牛タンパク質アルファカゼインの分析において、初期測定条件と比較し測定時間を半分に短縮したにもかかわらず、タンパク質配列のカバー率を約 1.3 倍向上させた。その際、愛知医科大学において TripleTOF 5600 による測定も行い、結果を比較しつつ測定条件の検討を行った。さらに、ヒト慢性骨髄性白血病由来 K562 細胞の抽出液を用いることにより、複雑な試料への測定条件の最適化も行った。また、試料調製法も検討し、多くの試料をより簡便に調製できるようにした。これらの実験条件を用い、K562 細胞のリン酸化ペプチドおよびそれらを脱リン酸化したペプチド、さらに、合成リン酸化ペプチドおよびその脱リン酸化ペプチドの測定を行った。上記合成ペプチドは、フィンランド Turku 大学において Q Exactive による測定も行った。これら測定データは、その後プログラム開発用のモデルデータとして使用した。

【平成 29 年度】

Turku 大学との共同研究により、リン酸化シミュレーション用アルゴリズムおよびそのユーザーインターフェイスの開発・改良をすすめ、このプログラムを SimPhospho バージョン 1 とした。その際、Q Exactive 質量分析計および TripleTOF 質量分析計を用いて前年度に取得したモ

デルデータを使用し、SimPhospho の動作確認を行いつつ適宜修正した。この SimPhospho を TripleTOF データに対して用いることにより、SpectraST によるスペクトルライブラリ検索によるリン酸化ペプチド同定が行えることを確認した。さらに SimPhospho ではシミュレーション条件を種々変更できるようにしたこと、最も高感度にリン酸化部位特異的に同定できる条件を検討した。その結果、最適化条件を用いることにより、世界的に汎用されている MaxQuant データベース検索と比べ、2 倍以上高感度にリン酸化部位同定を行うことができるようになった。

【平成 30 年度】

SimPhospho の開発に関して論文としてまとめ、Bioinformatics 誌において発表した。さらに、TripleTOF データの解析条件をより詳細に検討し、これらの研究成果を論文としてまとめた(投稿中)。また、Q Exactive データに対しても SimPhospho の条件を最適化した。

(参考文献) Beausoleil et al., Nat. Biotechnol. 24, 1285-1292 (2006); Imanishi et al., Mol. Cell. Proteomics 6, 1380-1391 (2007); Jensen, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 7, 391-403 (2006); Kauko et al., Sci. Rep. 5, 13099 (2015); Sharma et al., Cell Rep. 8, 1583-1594 (2014); Suni et al., J. Proteome Res. 14, 2348-2359 (2015); Taus et al., J. Proteome Res. 10, 5354-5362 (2011); Zhang et al., Chem. Rev. 113, 2343-2394 (2013).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Veronika Suni, Tomi Suomi, Tomoya Tsubosaka, Susumu Y. Imanishi, Laura L. Elo, and Garry L. Corthals. SimPhospho: a software tool enabling confident phosphosite assignment. Bioinformatics 34, 2690-2692 (2018). 査読有
DOI: 10.1093/bioinformatics/bty151
2. Otto Kauko, Susumu Y. Imanishi, Evgeny Kuleskiy, Teemu Daniel Laajala, Laxman Yetukuri, Anni Laine, Mikael Jumppanen, Pekka Haapaniemi, Luyao Ruan, Bhagwan Yadav, Veronika Suni, Taru Varila, Garry Corthals, Juri Reimand, Krister Wennerberg, Tero Aittokallio, Jukka Westermarck. Rules for PP2A-controlled phosphosignalling and drug responses. bioRxiv, 271841 (2018). 査読無
DOI: 10.1101/271841
3. Josef Gullmets, Elin Torvaldson, Julia Lindqvist, Susumu Y. Imanishi, Pekka Taimen, Annika Meinander, and John E. Eriksson. Internal epithelia in *Drosophila* display rudimentary competence to form cytoplasmic networks of transgenic human vimentin. FASEB Journal 31, 5332-5341 (2017). 査読有
DOI: 10.1096/fj.201700332R
4. 高井 彩乃、坪坂 朋哉、谷 郁孝、岩城 圭一郎、Veronika Suni、今西 進：リン酸化プロテオーム解析法 SimSpectraST の TripleTOF データへの最適化 名城大学総合研究所紀要 第 23 号 173-176 2018 年 査読無
5. 今西 進、川原 聖也、酒井 麻衣、岩城 圭一郎、谷 郁孝、清水 美衣、水野 智博、原田 健一：SWATH 法を用いた DIC モデルマウスの定量プロテオーム解析 名城大学総合研究所紀要 第 23 号 169-172 2018 年 査読無
6. 谷 郁孝、岩城 圭一郎、今西 進：TripleTOF 6600 を用いた nanoLC-MS/MS 測定の条件検討 — α -カゼイン消化物の分析— 名城大学総合研究所総合学術研究論文集 第 16 号 11-18 2017 年 査読有
7. 今西 進、酒井 麻衣、谷 郁孝、清水 美衣、原田 健一：血栓症研究に向けたプロテオーム解析法の検討 名城大学総合研究所紀要 第 22 号 273-276 2017 年 査読無
8. Sandra Soderholm, Denis E. Kainov, Tiina Ohman, Oxana V. Denisova, Bert Schepens, Evgeny Kuleskiy, Susumu Y. Imanishi, Garry Corthals, Petteri Hintsanen, Tero Aittokallio, Xavier Saelens, Sampsa Matikainen, and Tuula A. Nyman. Phosphoproteomics to characterize host response during influenza A virus infection of human macrophages. Molecular & Cellular Proteomics 15, 3203-3219 (2016). 査読有
DOI: 10.1074/mcp.M116.057984
9. Niina M. Santio, Sebastian K.-J. Landor, Laura Vahtera, Jani Ylä-Pelto, Elina Paloniemi, Susumu Y. Imanishi, Garry Corthals, Markku Varjosalo, Ganesh babu Manoharan, Asko Uri, Urban Lendahl, Cecilia Sahlgren, and Päivi Koskinen. Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. Oncotarget 7, 43220-43238 (2016). 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.9215

[学会発表](計 17 件)

1. 後藤 彩花、岩城 圭一郎、平野 裕大、今西 進：リン酸化プロテオミクスへの SWATH 測定条件の検討 日本薬学会第 139 年会 千葉(平成 31 年 3 月 23 日)
2. 平野 裕大、高井 彩乃、岩城 圭一郎、Veronika Suni、今西 進：リン酸化シミュレーションソフトウェア SimPhospho を用いた SWATH データ解析法の開発 日本薬学会第 139 年会 千葉(平成 31 年 3 月 23 日)

3. 山本 未来、衣斐 大祐、小島 侑也、岩城 圭一郎、後藤 彩花、間宮 隆吉、今西 進、平松 正行：ベタインを連続暴露したアルツハイマー型認知症モデルマウスの海馬におけるプロテオーム解析 生体機能と創薬シンポジウム 2018 福岡（平成 30 年 8 月 24 日）
4. 杉浦 拓磨、藤井 貴夢、谷 郁孝、今西 進、水本 秀二、山田 修平：ラット C6 グリオーマの産生するコンドロイチン硫酸/ヒアルロン酸分解酵素の精製 第 64 回日本薬学会東海支部大会 名古屋（平成 30 年 6 月 30 日）
5. 吉田 颯人、酒井 裕司、今西 進、中山 亮太、永松 正：糖尿病性腎症に關与する走化性因子の探索 第 64 回日本薬学会東海支部大会 名古屋（平成 30 年 6 月 30 日）
6. 社本 悠、吉田 颯人、今西 進、水本 秀二、山田 修平、永松 正：糖尿病マウスの血液中における糖化アルブミン凝集体の検出 第 64 回日本薬学会東海支部大会 名古屋（平成 30 年 6 月 30 日）
7. 岩城 圭一郎、吉見 陽、村川 依代、久保 緋紗子、谷 郁孝、野田 幸裕、尾崎 紀夫、今西 進：SWATH 法を用いた統合失調症関連タンパク質の網羅的解析 第 64 回日本薬学会東海支部大会 名古屋（平成 30 年 6 月 30 日）
8. Mina Kawamura, Seiya Kawahara, Fumihiko Nagano, Kei-ichiro Iwaki, Mai Sakai, Fumitaka Tani, Mie Shimizu, Tomohiro Mizuno, Ken-ichi Harada, and Susumu Y. Imanishi: Quantitative proteomics of lethal thrombosis model mice by SWATH analysis. 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Diego, CA, USA (June 6, 2018).
9. 岩城 圭一郎、吉見 陽、村川 依代、久保 緋紗子、谷 郁孝、野田 幸裕、尾崎 紀夫、今西 進：SWATH 測定による統合失調症患者リンパ芽球様細胞株膜タンパク質の定量リン酸化プロテオミクス 日本薬学会第 138 年会 金沢（平成 30 年 3 月 28 日）
10. 原田 健一、川原 聖也、酒井 麻衣、岩城 圭一郎、谷 郁孝、水野 智博、清水 美衣、今西 進：SWATH 法を用いた DIC モデルマウスのプロテオーム解析 第 42 回日本医用マススペクトル学会年会 東京（平成 29 年 9 月 14 日）
11. Tomoya Tsubosaka, Ayano Takai, Satoko Akahori, Seiya Kawahara, Veronika Suni, and Susumu Y. Imanishi: Optimization of SimSpectraST search conditions for phosphoproteomics. 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis, IN, USA (June 8, 2017).
12. 川原 聖也、酒井 麻衣、岩城 圭一郎、谷 郁孝、水野 智博、清水 美衣、原田 健一、今西 進：血栓症研究に向けたプロテオーム解析法の検討 第 65 回質量分析総合討論会 つくば（平成 29 年 5 月 18 日）
13. 高井 彩乃、坪坂 朋哉、谷 郁孝、岩城 圭一郎、Veronika Suni、今西 進：リン酸化プロテオーム解析法 SimSpectraST における検索条件の最適化 第 65 回質量分析総合討論会 つくば（平成 29 年 5 月 17 日）
14. Otto Kauko, Susumu Imanishi, Evgeny Kuleskiy, Teemu D. Laajala, Laxmana Yetukuri, Artur Padzik, Mikael Jumppanen, Pekka Haapaniemi, Bhagwan Yadav, Veronika Suni, Taru Varila, Garry Corthals, Wennerberg Krister, Tero Aittokallio, and Jukka Westermarck: Systemic map of protein phosphatase 2A (PP2A)-regulated phosphotargets and drug responses in cancer cells. AACR annual meeting 2017, Washington, D.C., USA (April 5, 2017)
15. 坪坂 朋哉、谷 郁孝、Veronika Suni、今西 進：リン酸化プロテオーム解析法 SimSpectraST における検索条件の最適化 日本薬学会第 137 年会 仙台（平成 29 年 3 月 25 日）
16. 谷 郁孝、今西 進：リン酸化プロテオーム解析を行うための試料調製法の検討 第 62 回日本薬学会東海支部大会 名古屋（平成 28 年 7 月 9 日）
17. Tiina Pakula, Elizabeth V. Nguyen, Susumu Y. Imanishi, Pekka Haapaniemi, Yadav Avinash, Markku Saloheimo, and Garry L. Corthals: Quantitative site-specific phosphoproteomics of Trichoderma reesei signaling pathways upon induction of hydrolytic enzyme production. 13th European Conference on Fungal Genetics, Paris, France (April 5, 2016).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/kenkyu/environmenta/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：妹尾 洋

ローマ字氏名：(SENO, Hiroshi)

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50236113

研究分担者氏名：水野 智博

ローマ字氏名：(MIZUNO, Tomohiro)

所属研究機関名：名城大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 40711669

(2)研究協力者

研究協力者氏名：CORTHALS, Garry

ローマ字氏名：(CORTHALS, Garry)

研究協力者氏名：SUNI, Veronika

ローマ字氏名：(SUNI, Veronika)

研究協力者氏名：ERO-UHLGREN, Laura

ローマ字氏名：(ERO-UHLGREN, Laura)

研究協力者氏名：HAAPANIEMI, Pekka

ローマ字氏名：(HAAPANIEMI, Pekka)

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。