

平成22年 6月10日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17017042

研究課題名（和文） パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析

研究課題名（英文） Quantitation analysis of pathway network analysis

研究代表者

夏目 徹（NATSUME TOHRU）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・研究チーム長

研究者番号：00357683

研究成果の概要（和文）：

細胞内のシグナル伝達のパスウェイは、多くのシグナリング分子は互いに相互作用し、複合体を形成しパスウェイを生み出す。このようにパスウェイを構成する相互作用をネットワークとして捉えるため、統一的な方法論で網羅的相互を定量する技術開発を行った。また、開発したシステムを用い、新たなパスウェイを発見した。

研究成果の概要（英文）：

Cellular signaling comprises numerous numbers of proteins, which interact each other, Forming protein interaction network. To understand networks systematic and comprehensively, we developed proteomic analytical platform to quantify protein interactions. By the system, we found several novel signaling pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	15,800,000	0	15,800,000
2006年度	14,300,000	0	14,300,000
2007年度	14,100,000	0	14,100,000
2008年度	14,600,000	0	14,600,000
2009年度	15,200,000	0	15,200,000
総計	74,000,000	0	74,000,000

研究分野：細胞生物学、タンパク質科学

科研費の分科・細目：システムズ生物学、プロテオミクス

キーワード：タンパク質間相互作用 タンパク質ネットワーク解析 プロテオミクス 質量分析 動態解析 マップキナーゼカスケード シグナル伝達 Erk

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内のシグナル伝達のパスウェイは、多くのシグナリング分子は互いに相互作用し、複合体を形成しパスウェイを生み出す。このようにパスウェイを構成する相互作用を高次機能として捉えるには、統一的な方法論での網羅的相互作用解析を行う必要があ

る。またこれらの相互作用はシグナルの伝達に伴ってダイナミックに変化する可能性があり、これらの動態を捉える技術開発が生命システムの解明に必須である。

## 2. 研究の目的

これまで、シグナリングパスウェイを構成するタンパク質を直接同定・定量することは極

めて困難なことであった。最近、著しく進歩を遂げたタンデム質量計(MS/MS)は、タンパク質の内部アミノ酸配列情報とペプチド断片の質量値を自動的に取得することが可能となった。更にゲノム研究の発展と共に配列情報が十分にデータベース化され、且つインフォマティクスの進歩により、タンパク質の大規模同時同定の自動化が実現した。このようなプロテオミクス技術を駆使し、パスウェイ全体の動態解析を行い(パスウェイに関わるタンパク質の網羅的相互作用リンケージマッピングと、その動態変化の記載)、生物情報科学の深化に供することを旨とする。

### 3. 研究の方法

タンデム質量計(MS/MS)超高感度化するため、独自に開発したダイレクトナノ LC をオンライン化した。このシステムは、サブ・フェムトモルのオーダーで 150 - 200 個のコンポーネントからなる最も複雑なタンパク質複合体でも、一回の分析で網羅的に同定することが可能である。この解析プラットフォームを駆使し、パスウェイ全体の相互作用動態解析を行う。

そのために、パスウェイに関わる全 cDNA に共通のタグを融合し培養細胞に遺伝子導入する (bait)。その発現タンパク質のタグを介して相互作用複合体を細胞より抽出し、そこに含まれているコンポーネントを一網打尽的に同定する。

これと平行し、cDNA の bait を用いず、細胞内の内因性のシグナル伝達分子複合体の相対・及び絶対定量を行うための技術開発も行う。そのために先ず、内因性の複合体を認識する抗体の作製、パスウェイ全体に網羅的に行うことを目指す。

研究開発は、先ずシステムの フィージビリティスタディ研究からスタートする。そのために、最も詳細な解析が進んでいる、古典的 MAP キナーゼカスケードに関係する 25 程度の遺伝子を用い、これらの相互作用のマッピングを行い、シグナルの休止期と刺激時の相互作用の変化を捉える。本解析プラットフォームで、既に報告されている相互作用がどの程度カバーできるかを先ず詳細に検討する。また、絶対定量を行うための、内標準用のペプチドの合成等を行い、小規模なフィージビリティ研究を行う。ここで、新規な相互作用を発見した場合、その相互作用の生物学的な意義も個別に検討する。

### 4. 研究成果

#### フィージビリティ研究

パスウェイ全体解析に先立ち、シグナル伝達分子以外を含む機能既知遺伝子を用い、システムの検証研究を行った。すなわち、既知遺伝子の既知相互作用をハイスループットに検出可能であるのか、またその coverage

を評価した。その結果、既知相互作用を検出できるにとどまらず、細胞周期調節因子、タンパク質分解系、タンパク質生合成系、カルシウムイオンチャンネルなどのシステム中に多くの新規相互作用が発見され、その生物学的な意義が証明された。

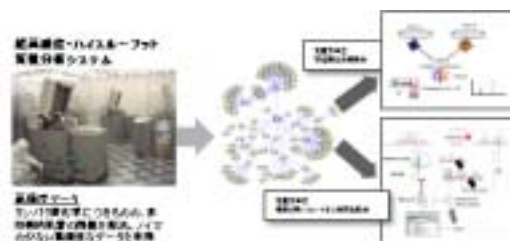
この検証研究を踏まえた上で、古典的 MAP キナーゼカスケードに関係する 25 程度の遺伝子を用いた相互作用のマッピングを行った。その結果、約 90 の相互作用と、それに関わる 65 のタンパク質を同定した。そのうち、85%ほどは既に報告された相互作用であり、残りの 25%は予想されていたが、未報告のものであった。また、シグナルのカスケードは受容体から核内のイフェクターに至るまで、ほぼ網羅的に相互作用が検出された。

さらに、新規と思われる相互作用も数個検出された。安定同位体ラベル、あるいはペプチド内標準を用い、シグナルの休止期と刺激時の相互作用の動態を定量することにより、その一つは、新規な Erk イフェクターであることが予想された。

#### 新規な解析手法の開発

安定同位体ラベル、化学ラベルを用いる、相対定量法は、使用できる細胞株に制限が多く、また馴化や培養条件の至適化など大規模解析に適さないことが次第に明らかとなった。また可能だとしても細胞が生理的な条件下で生育しておらず、栄養飢餓などの非生理的な相互作用を検出しかねないという危惧が常につきまとう。そのため、安定同位体ラベルを用いない相対定量の開発を行った。

対照とサンプルを従来通り、別々に解析し、両方で観察されたペプチドイオンの強度比からの定量を試みた。このためには、independent に行われるクロマトグラフィの再現性を高める高精度な超微量クロマト技法を確立した。また、各ペプチドイオンを、クロマトの溶出パターンと分子量などの情報から複数のクロマトグラフィ上から自動抽出しピーク面積を計算し、定量するソフトウェアの開発を行った。



このペプチドイオンの強度比からの相対定量法を DQN 法 (Direct Quantitation of Non-labeled proteome) と名付けた。この DQN 法の評価のため、古典的マップキナーゼカス

ケードの最下流にあたる Erk を用いた。定常時、EGF 刺激時と恒常的活性型 MEK 遺伝子導入時とを比較し、Erk 相互作用分子の変化を定量した。その結果、刺激・非刺激時で Erk の既知基質で 100 倍程度までシグナルが変化を定量することが可能であった。それらの定量性の再現性を検討したところ、変化のあったペプチド 77 本中 75 本 (97%) が 4 回の繰り返し実験において CV 値が 10% 以内であった。また 10% の CV 値に収まらなかったペプチドは全てイオンカウントが 30 以下の弱いシグナル強度であり、S/N 比などの問題から再現性が得られなかった。よって、シグナル強度が十分高く且つ、ダイナミックレンジが 2 桁の範囲であれば、再現性の良い相対定量が出来る目処がたたったといえる。

そこで、さらに DQN 法を行うためのデータ処理を自動化するプログラムの開発にも着手した。これは各ペプチドのクロマトの溶出時間、分子量と価数の情報から複数のクロマトグラフィ上から同一種のペプチドピークを自動抽出し、Raw peak にスムージング等を施しピーク面積を計算・定量するものである。定量の自動化において、先ず問題となったのはピークのスムージングが不適切であるとピーク認識が曖昧となり、本来一つのピークを複数の異なるピークとして定量してしまうことであった。この傾向はシグナル強度が低いピークほど顕著であり、スムージングパラメータの至適化で対処したが、抜本的な対策は今のところない。また、質量分析計が取得したデータをピークリストファイルに変換する際のバグなどが一部まだ修正されておらず今後の課題である。しかし、概ねシステムとして完成した。さらに、クロマトグラフィとサンプルの同定結果の再現性を確認した。多重検定をパラメトリックで行い各データの再現性が極めて高く、バイトが異なる場合の各特異的な相互作用が極めて低い危険率でほぼ自動的に抽出可能であることを確認した。



また、DQN 法によるデータ再現性をさらに詳細に評価するために、37 の異なる bait タンパク質を用い 4 回の繰り返し実験を行った (合計 148 解析)。これらの bait は全て小胞体内のレドックスタンパク質であり、非

常に多くのタンパク質と相互作用し酸化還元と基質タンパク質のフォールディングに関わっている。従って、bait と共に同定される Prey タンパク質の総数は 791 に及び、合計 14,432 のペプチドが検出された。この検出されたペプチド数を確率論に基づきランダムにペプチドが出現するモデリングを行った。また、実際のペプチドが 4 回の繰り返し実験によって揺らぎなく出現した場合から、4 回とも全て揺らぎがあった場合までを 1~4 と数値化した。これらを用い実験結果から等分散と見なされる割合をランダムモデルと比較検定を行った。その結果、実験データ中の等分散と見なされるタンパク質とランダムモデルにおける等分散数の有意差は  $p < 10^{-21}$  という驚異的な差が認められ、生物データとしては極めて高い再現性があると判定された (同法による、一般的な生物データの再現性は  $p < 10^{-2}$  程度で高再現率と判定される)

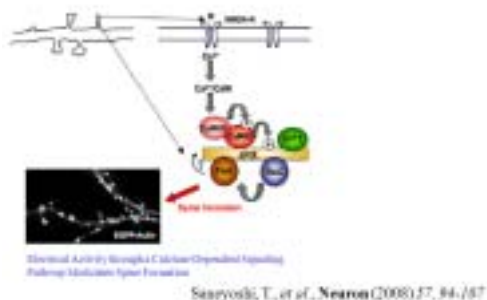
#### 新規パスウェイの同定

開発して DQN 法を用い、神経細胞でのカルシウムシグナルに関わる分子を bait として用いパスウェイの解析を行った。具体的には  $Ca^{2+}$  依存的キナーゼである CaMK のサブファミリー全てを用い網羅的なネットワーク解析を行った。

その結果、CaKI が小分子量 G タンパク質である beta-PIX と相互作用しリン酸化し活性化していることを明らかにした。beta-PIX は GTP 交換因子である Rac とそれにより制御されるキナーゼである PAK らと共に signalosome を形成している。活性化した beta-PIX は Rac を介して SAK を活性化し、PAK は細胞骨格であるミオシンを制御する MLC をリン酸化し細胞骨格のダイナミクスに変化を与え、神経突起の形成を引き起こすことが明らかとなった。さらに CaMKI はやはりカルシウム依存的キナーゼである CaMKK により活性化されることも明らかにした。CaMKK は神経活動によって NMDA 受容体などを介して流入するカルシウムイオンによって活性化する。従って神経活動によりダイナミズムが変化する神経突起形成されるが、その新規で重要なパスウェイの全貌を明らかにすることに成功した (Neuron 57, 94-107, 2008: 下図)。従って、我々が開発してきた手法が、既知のパスウェイの動態を定量することにとどまらず、新規なパスウェイの発見にも貢献できることを示すことが出来た。

さらに、神経細胞におけるカルシウムシグナルに関わる分子のパスウェイ解析を続行した。具体的にはカルモジュリン依存的キナーゼである CaMK のサブファミリー全てを用い網羅的なネットワーク解析を行った。CaMK は I・II・IV・KK というサブタイプが知られている。また CaMKI と II には・・・とい

う4つのアイソフォームが、CaMKKには・・という二つのアイソフォームが存在する。従ってこれら11分子全てをbaitとして用いた。またwild typeのみならずconstitutively activeとkinase deadである変異体も用いた。また、細胞はHEK293細胞の他にCortical NeuronとHippocampal Neuronのラット初代細胞も用いた。その結果、CaMKと相互作用する186個の新規な分子を発見し、そこから8つの新たなCaMK機能複合体を発見した。また基質候補の絞り込みのために、生化学的手法によるリン酸化部位決定とともに、やはり質量分析によるリン酸化タンパク質の解析を試みた。具体的には、細胞にカルシウム刺激、あるいはconstitutively activeなCaMKを発現させた細胞のリン酸化タンパク質を網羅的に定量しリン酸化が上昇したタンパク質群とネットワーク解析によって検出された新規相互作用分子との比較を行った。その結果、1分子についてはCaMK Iの新規な基質であることが確認された。この分子をbaitとしてさらに「芋づる式」パスウェイの探索を行ったところ、Erkのパスウェイの上流に収束することを発見した(現在論文投稿準備中)。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

1. Komatsu, M., H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y.S. Sou, I. Ueno, A. Sakamoto, K.I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S.I. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka, M. Yamamoto, The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive

transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1., Nat cell biology, 査読有, 12(3), 2010, 213-223,

2. Kaneko, T., J. Hamazaki, S. Iemura, K. Sasaki, K. Furuyama, T. Natsume, K. Tanaka, S. Murata, Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones., Cell 査読有, 137(5), 2009, 914-925.
3. Nishiyama, M., K. Oshikawa, Y. Tsukada, T. Nakagawa, S. Iemura, T. Natsume, Y. Fan, A. Kikuchi, A.I. Skoultchi, K.I. Nakayama, CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis., Nat cell biology, 査読有, 11(2), 2009, 863-876,
4. Hara, T., A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J.L. Guan, N. Mizushima, FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells., The Journal of cell biology, 査読有, 181(3), 2008, 497-510,
5. Saneyoshi, T., G. Wayman, D. Fortin, M. Davare, N. Hoshi, N. Nozaki, T. Natsume, T.R. Soderling, Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex., Neuron, 査読有, 57(1), 2008, 94-107,
6. Iioka, H., S. Iemura, T. Natsume, N. Kinoshita, Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility., Nat cell

- biology, 査読有, 9(7), 2007 813-821,
7. Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y.S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice., Cell, 査読有, 131(6), 2007, 1149-1163,
  8. Lee, R.H., H. Iioka, M. Ohashi, S. Iemura, T. Natsume, N. Kinoshita (2007) XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway., The EMBO journal, 査読有, 26(15), 2007, 3592-3606,
  9. Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S., A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes., The EMBO journal, 査読有, 25(19), 2006, 4524-36.
  10. Hyodo-Miura, J., Yamamoto, T.S., Hyodo, A.C., Iemura, S., Kusakabe, M., Nishida, E., Natsume, T., and Ueno, N. (2006). XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in Xenopus gastrulation. Dev Cell, 査読有, 11(1), 2006, 69-79,
  11. Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. Shugoshin

collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin., Nature, 査読有, 441(7089), 2006, 46-52,

12. Hishiya, A., Iemura, S., Natsume, T., Takayama, S., Ikeda, K., and Watanabe, K. (2006). A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy., Embo J, 査読有, 25(3), 2006, 554-64.

〔学会発表〕(計3件)

1. 「New generation proteomics」、夏目徹、日本ヒトプロテオーム機構、北里大学、2009/7/30
2. “Systematic Analysis of Protein Interaction Networks Using Human Full Length cDNA.” , 夏目徹 , International chemical congress of pacific basin societies. , Hilton Hawaiian Village, 2005/12/16
3. “Systematic analysis of protein interaction network using human full length cDNA.” , 夏目徹 , VIth European Symposium of The Protein Society , Barcelona、2005/05/01

〔図書〕(計3件)

1. 明日を拓く新次元プロテオミクス 超々高感度質量分析への道のり、夏目徹、p 61-68、学研メディカル秀潤社、2009/12/14
2. タンパク質科学 構造・物性・機能, ポストゲノム時代のタンパク質科学, 夏目徹, 化学同人、2006/10/25
3. 蛋白質核酸酵素 50(16 Suppl) 「ゲノムから生命システムへ」, p2065-71 ゲノムから人間 ヒトプロテオーム、夏目徹、2005、共立出版

6. 研究組織

(1)研究代表者

夏目 徹 (NATSUME TOHRU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ

メディシナル情報研究センター・研究チーム長  
研究者番号：00357683

(2)研究分担者

家村 俊一郎 ( IEMURA SHUN-ICHIRO )  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・主任研究員

研究者番号：90356410

中山 洋 ( NAKAYAMA HIROSHI )  
独立行政法人理化学研究所・中央研究所・研究員

研究者番号：80321793

澁谷 浩司 ( SHIBUYA KOHJI )  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：30261324