

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19310129

研究課題名(和文) リン酸化シグナルパスウェイ解析

研究課題名(英文) Analysis of phosphorylation signaling pathways

研究代表者

井原 茂男 (IHARA SIGEO)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授

研究者番号：30345136

研究成果の概要：ヒト臍帯静脈上皮細胞、および脂肪前駆細胞の転写調節の動きを DNA アレイチップや機能を阻害する手法を用いて解析し、細胞内で刺激応答に起因する内在性のリン酸化状態変化を網羅的にプロテオミクスの観点からとらえることを目標にした。マイクロアレイの時系列データをもとにリン酸化シグナルパスウェイを予測し、報告者の文献情報データも含めたプロテオミクスの方法から検証し、刺激応答のリン酸化ダイナミクスに関係する遺伝子および蛋白質を選定し、シグナル伝達における細胞の反応のダイナミクスの一端を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：リン酸化、転写複合体、シミュレーション、プロテオミクス、膜タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化と脱リン酸化はシグナルの伝達や酵素活性調節および転写調節など細胞内の情報伝達と調節に重要な役割を担っている。なかでもチロシンのリン酸化は増殖因子受容体のシグナル伝達に重要であることから広範な研究が進められてきたが、細胞内の90%以上を占めるセリン・スレオニンリン酸化については、重要なキナーゼが同定されてはいるものの、リン酸化によ

る反応のパスウェイは明らかになっていない。この問題の困難な点は、たとえばプロテインキナーゼC (PKC) ではcPKCが4種類、nPKCが4種類、aPKCが2種類、さらに近年注目を集めているPKCu (PKD) で3種類とファミリータンパク質の種類が多く、刺激に対して複数のキナーゼが反応し、相互活性化や基質相補性があることから、相互作用が極めて複雑になることが挙げられる。またシグナル伝達系ではキナーゼだけでは

くプロテインホスファターゼも刺激依存的に反応するためリン酸化と脱リン酸化が複雑に絡みあい解析を困難にしている。これまでの生化学的・分子生物学的解析では、リン酸化反応に関与するキナーゼの同定とその基質の同定および酵素反応キネティクスの解析が主として行なわれてきたが、細胞の中で実際にどのようなシグナル伝達が行われて細胞の反応がおこっているかを解析するためには、内在性の基質を一挙に解析してパスウェイを同定する方法の開発が必要と考えられる。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに

(1) 高親和性抗体の作成法を開発し、また低ノイズ磁気ビーズを用いるターゲットドプロテオミクス法の開発を行なってきている。また、

(2) ヒト臍帯静脈上皮細胞 (HUV EC) を用い、TNF やコレステロール変動およびラジカルなど各種刺激により細胞内の転写調節の動きをDNAアレイチップやRNAiなどの手法を用いて解析し、大容量のデータベースを有している。

さらに、

(3) 申請者らは、20万のタンパク質名に対して文献情報処理を用いて、PubMedから自然言語処理による深い文法解析を行って役50万件のタンパク質相互作用を網羅的に集めることを行い、既存のツールと異なり全ネットワークの関係性を利用したアプローチを展開し、85%以上の高い正解率タンパク質の複合体解析に適用を進めている。

そこで、これらの解析結果および解析技術を利用して、データのなかからキーキナーゼとなると考えられるPKCを中心としてリン酸化パスウェイ解析を行ない、プロテオミクスによるリン酸化パスウェイ解析を試みる。

具体的には、リン酸化、脱リン酸化に対して様々な構文を集め、高精度に關係性を収集する。次に、このように収集した關係性を整理統合化したデータベース、およびその表示のためのインターフェースを構築し、本研究の基本データとした。(データ収集が進んだ段階で将来一般にも公開する。)さらに、リン酸化部位の同定と刺激前後でのリン酸化状態変化の解析を通して、リン酸化の素過程あるいは複合過程をモデリングとシミュレーションおよびプロテオミクスを併用しその時系列変化を求めることで、リン酸化タンパク質のインフォーマティクスを形成する。

3. 研究の方法

本研究方法のユニークな点は、細胞内で刺激

応答に起因する内在性のリン酸化状態変化を網羅的にプロテオミクスにより捕らえること、さらにインフォーマティクス解析によりリン酸化タンパク質相互の關係性をシミュレーションし、リン酸化シグナルのパスウェイを予測することにある。この予測に基づき、阻害剤のデータや分子生物学的解析によって妥当性の検討を行なう。このようなシステム生物学的アプローチは、様々に試みられるようになってきたが、in silicoとウェットバイオロジーが連携してデータの受け渡しを行い、モデル妥当性を検証しながら双方向性に解析を進めていく試みは極めて少ない。

報告者等は、既に開発したタンパク質名辞書を用い、關係性の抽出に複雑な付加的条件をつけ、リン酸化、脱リン酸化に対して様々な構文集め、高精度にこれらの關係性を収集し、専門家によりデータを精選した。このように収集した關係性を整理統合化するネットワーク情報収集のためのデータベース、および表示のためのインターフェースを構築し、本研究の情報基盤を構築した。またLSIやインターネットのネットワーク評価に用いられているパケット輸送をリン酸化の伝達モデルと仮定した動的シミュレーションを行うことにより、リン酸化のダイナミックシミュレーションを試みた。

ヒト臍帯静脈上皮細胞を用いて炎症刺激におけるシグナル伝達および転写活性化について研究を行ってきた経緯より有している、TNFをはじめとする刺激やコレステロール調節における詳細なトランスクリプトーム解析データからパスウェイ解析を行いハブとなるタンパク質を同定した。これらのキータンパク質に対する抗体によるターゲットドプロテオミクスを進め、さらに阻害剤によるパスウェイのバリデーションを行った。これらのウェットの結果をもとにデータ解析を検討し精度を高めた。

4. 研究成果

以下述べる成果が得られた。

(1) リン酸化タンパク質のパスウェイ解析

文献やデータベースから抽出した約50万件のタンパク質相互作用対から全タンパク質相互作用ネットワークを構築し、実験から得られたタンパク質の対(ペア)に対して、リン酸化、脱リン酸化の相互作用をする様々な構文を決定し、高精度にこれらの關係性を計算機による自動的に収集し、さらに、生物学関連の博士を持つ専門家によって、自動化によりやむを得ず混入する誤りを訂正し、既知情報からのリン酸化ネットワークを構築し、候補となるリン酸化パスウェイを予測で

きるようにした。

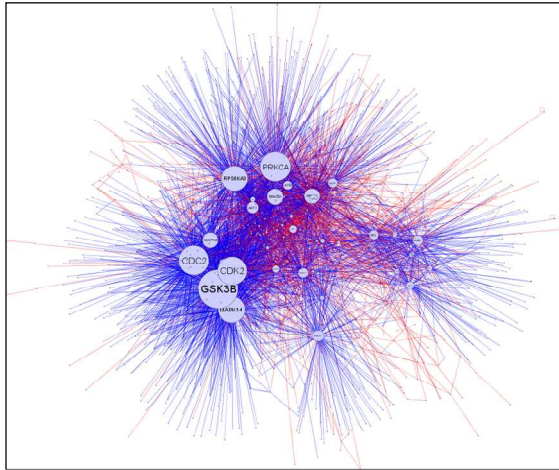


図1 リン酸化ネットワーク
青線はLindin、赤線は報告者らの相互作用、ノードはリン酸化 Kinase でハブ規模がサイズになっている

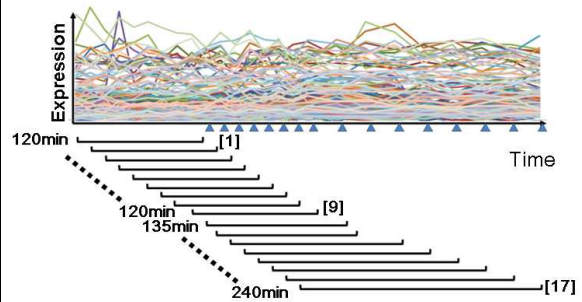
報告者と同じような試みは、時を同じくしてLinding等によって行われ、Cell 129, 1415-26 (2007)に発表された。彼らの方法は、実験結果だけでなく、文献から蛋白質名とリン酸化が同じ文章中にあればリン酸化相互作用とするという荒い関係性の抽出方法を取り、さらにコンセンサスモチーフで相同計算した結果をまとめたために誤差を多く含むと考えられる。そのため、蛋白質[リン酸化酵素] リン酸化相互作用の動詞 基質蛋白質というペア相互作用の数は4723であった。報告者らは上記のように丁寧な相互作用の収集法を採用してたためにペア相互作用の数は1498であった。そのうちLinding等の相互作用との共通部分は123ペアしかなかったが、残りの1375は正しいと考えられるものであることを実験と文献から確かめた。ただ、彼らのデータと合わせると、6098のリン酸化ペア相互作用をもつ世界最大級のリン酸化相互作用データを収集できたことになる。ネットワークとして表示すると図1のようになる。本報告事項は投稿中である。

(2) リン酸化部位の同定と刺激前後でのリン酸化状態変化の解析

HUVEC 細胞の TNF 刺激実験

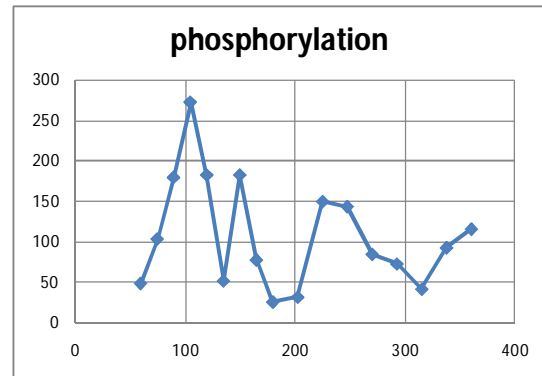
Gene Ontology (GO) はマイクロアレイ解析などで広く使われている。そこでGOを用いて遺伝子発現ネットワークを構築し、時系列データに対して信頼性の高い新しいクラ

スタリング手法を開発し、エンリッチメント解析を組み合わせることによって検出漏れの低い機能について関係する遺伝子群をモジュール集合として取得した。次に、この方法を用いて時刻毎のウィンドウに対して(図2)機能ごとに一定条件下で最大遺伝子数となるモジュールを取得し、時間依存の属性モジュールのサイズ、関連遺伝子を抽出できる方法を開発した。この方法をHUVEC細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞)のTNF刺激実験の時



系列発現データに対して適用し、リン酸化に関するモジュールを抽出した。その結果、リン酸化に関連したモジュールを7種類の選定し、その時間変化を追跡した。

図2 時間ウィンドウの定義
時系列発現データに対して時刻点が9点のウィンドウを定義。この結果、17個のスライドウィンドウが得られる。時刻が4時間以前は15分間隔、4時間以降は30分間隔となるので、ウィンドウの時刻幅は1から9番目



までは120分それ以降は最大240分まで変化する。ここではそのうち3つをあげる。

図3 リン酸化モジュールの時間変化
横軸は時間(分) 縦軸はモジュールクラスター中の遺伝子数

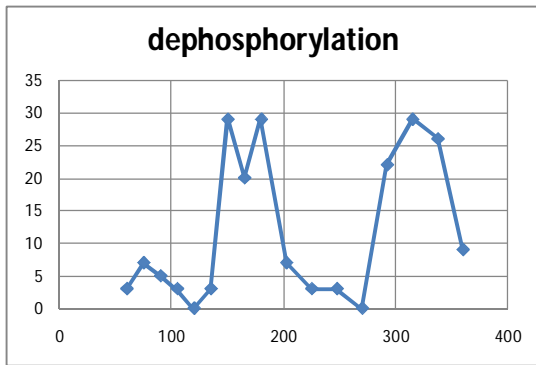


図4 脱リン酸化モジュールの時間変化
横軸は時間(分) 縦軸はモジュール
クラスター中の遺伝子数

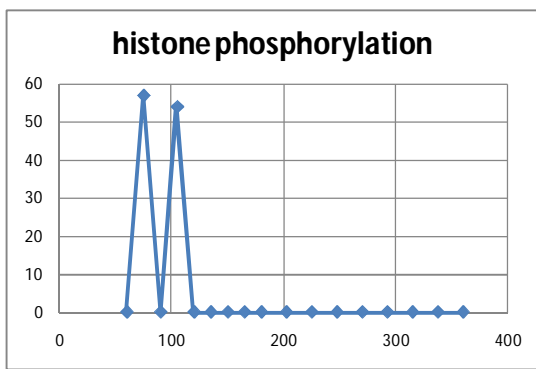


図5 ヒストンリン酸化モジュールの時間
変化 横軸は時間(分) モジュール
クラスター中の遺伝子数

新規遺伝子および新規タンパク質の機能を予測する上で、ネットワーク解析で数時間程度の時間窓で、近い機能の遺伝子が集まる傾向がある。これを報告者らは、局所的時間機能モジュール近似(local time-functional module approximation :LTFA)とし、実験結果の解析で未知の遺伝子や新規タンパク質が同じ時間で相互作用する可能性があるかどうかを検証してきた。今回の手法は、モジュールと未知遺伝子の相関関係から、機能を予測する手だてを与えるものとする。図3-5に示すように、ピーク時刻が相反するという興味深い結果を得ている。本内容についても論文化を進めている。

3T3L1 細胞の時間

細胞分化への適用として、脂肪前駆細胞の転写調節の動きをDNAアレイチップやRNAiなどの手法を用いて解析し、その結果に

対して、Gene Ontologyと遺伝子発現ネットワークを用いた時系列データに対する新しいクラスタリング手法を適用した。3T3L1細胞の脂肪細胞への変化に対して、リン酸化のデータに対して時間変動を調べ論文とした。

次に、3T3L1細胞の脂肪細胞への変化に対して適用し、WNT添加後のデータと比較した。3T3L1とそれにWNTを添加したときのクラスタサイズを比較すると、3T3L1でのphosphorylation(リン酸化)クラスターの遺伝子数934に対して、WNT添加によってリン酸化クラスターは1208に増加する結果が得られた。以上の結果は、文献にあるようにWNTはリン酸化と強い関係が知られていることと矛盾しないことから検証にもなると思う。(Xin Zeng, Nature (2005) 438, 873-7 および, Mascha van Noort et al., Wnt Signaling Controls the Phosphorylation Status of beta-Catenin, JBC, (2002) 277, 17901-17905. 複合体を形成する遺伝子群の転写のタイミングなどがこれによって同定できることが分かった。この内容も論文化中である。

(3) リン酸化部位の同定と刺激前後でのリン酸化状態変化の解析

リン酸化シグナル系ではまだ、公表はしていませんが、リン酸化ペプチド濃縮法の改良と質量分析計がリニアトラップ型のLTQから超高分解のorbitrapになったことで、細胞抽出液を使った1回の実験で以前は100リン酸化ペプチド程度同定できていたのが現在では3倍の300程度同定できるようになった。網羅性の観点からすると、実験だけでは十分ではないが、検証としては機能した。今後、実験から情報処理の結果に反映させる体制および施設を形成することができた。

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 3件)

Ken-ichi Wakabayashi, Masashi Okamura, Shuichi Tsutsumi, Naoko Nishikawa, Toshiya Tanaka, Iori Sakakibara, Jun-ichi Kitakami, Sigeo Ihara, Yuichi Hashimoto, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, Hiroyuki Aburatani, and Juro Sakai, PPAR/RXR Heterodimer Targets Genes of Histone Modification Enzymes Setd8 and Regulates Adipogenesis through a Positive Feed-Back Mechanism, Mol. Cell. Biol. 2009 : MCB.01856-08v1 (In press) 査読有

Nobuhiro Tanuma, Sei Eun Kim, Monique Beullens, Yao Tsubaki, Shinya Mitsuhashi, Miyuki Nomura, Takeshi Kawamura, Kyoichi Isono, Haruhiko Koseki, Masami Sato, Mathieu Bollen, Kunimi Kikuchi, and Hiroshi Shima. Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1 (NIPP1) Directs Protein Phosphatase-1 (PP1) to Dephosphorylate the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle (snRNP) Component, Spliceosome-associated Protein 155 (Sap155). The Journal of Biological Chemistry. 283 35805-35814 (2008) 査読有

Nobuhiko Oshida and Sigeo Ihara, Structural dependence of robustness and load tolerance in scale-free networks. arXiv:0710.2513. 査読なし

[学会発表](計 6件)

Nobuhiko Oshida, Naoko S. Nishikawa, Yoshihiro Ohta, Rikako Suzuki, and Sigeo Ihara, Packet traffic analysis of interactome networks. The Conference on Interactome Networks, Welcome Trust, UK, August 29 - September 1, 2007. 査読有

Nobuhiko Oshida, Jun-ichi Kitakami, and Sigeo Ihara, Traffic efficiency of scale-free networks in biological systems. The Conference on Engineering Principles in Biological Systems, Cold Spring Harbor Laboratory, USA, December 3-6, 2006. 査読有

Nobuhiko Oshida and Sigeo Ihara, Robustness analysis of network topology and node removal strategy. European Conference on Complex Systems, Dresden, Germany. October 1-5, 2007. 査読有

Nobuhiko Oshida, Jun-ichi Kitakami, Naoko S. Nishikawa, Yoshihiro Ohta, and Sigeo Ihara, Robustness of the protein interaction network. The 7th international workshop on advanced genomics. Tokyo, Japan, November 27-28, 2007. 査読有

Kenji Daigo, Takeshi Kawamura, Satoshi Katayose, Yoshihiro Ohta, Toshiya

Tanaka, Sigeo Ihara, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, "High-resolution targeted proteomics of endogenous nuclear receptor complex using high-quality immunomagnetic beads, Cold Spring Harbor Laboratory Mechanisms of Eukaryotic Transcription meeting, 2007年8月31日 Cold Spring Harbor, NY 査読有

Tatsuhiko Kodama, Yoshihiro Ohta, Meng Xu, Takashi Minami, Youichiro Wada, Shu-ichi Tsutsumi, Shumpei Ishikawa, Takao Hamakubo, Hiroyuki Aburatani, Peter R Cook, and Sigeo Ihara, Multiple Snapshots Obtained Using Genomic Tiling Arrays Reveal the Dynamics of Transcription in Human Umbilical Endothelial Cells, Sydney, Australia 2008, June, 1-5 査読有

[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]

<http://www.lsbm.org/>

<http://www.escut.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 茂男 (IHARA SIGEO)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授

研究者番号: 30345136

(2) 研究分担者

浜窪 隆雄

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号: 90198797

南敬

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号: 0034514

川村 猛

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号: 70306835

大田 佳宏
東京大学・先端科学技術研究センター・特
任研究員
研究者番号：80436592

(3)連携研究者