

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02459

研究課題名(和文)大規模プロテオフォーム解析法の開発とその全体像の理解

研究課題名(英文)Large-scale proteoform analysis for unveiling the entire view

研究代表者

石濱 泰 (Ishihama, Yasushi)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30439244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質混合物から、消化・単離という2ステップでタンパク質N末端およびC末端ペプチドをそれぞれ単離するCHAMP法を開発した。CHAMP法を非小細胞性肺がん細胞株11種に適用し、試料選択的なプロテオフォームプロファイルを計測した。その結果、未報告例を含む3181のプロテオリシス産物の同定・定量に成功した。また、1122のペプチドがSwiss-Prot由来のタンパク質に含まれない、非典型タンパク質由来なものとして同定された。この1122の非典型タンパク質由来のペプチドについて詳細な解析を行った結果、多くのSNV含有ペプチド、スプライシングアイソフォーム、新規翻訳開始点候補が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年タンパク質をnon-coding RNAが多数報告されてきたが、このなかには非典型タンパク質として翻訳されているものがあることがリボソームプロファイリングから予測されてきたが、今回の結果よりその全貌の一旦が明らかとなった。また、翻訳後にプロテオリシスをうけて生じたプロテオフォームについてもプロテオーム規模で明らかにすることができた。今後これらの制御機構がより詳細にわかり、疾患特異的なプロテオフォームが明らかになれば、新たな創薬標的となる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We developed the CHAMP method to isolate protein N- and C-terminal peptides from protein mixtures in two steps: digestion and isolation, respectively. The CHAMP method was applied to 11 non-small cell lung cancer cell lines and sample-selective proteoform profiles were measured. As a result, we successfully identified and quantified 3181 proteolysis products including unreported cases. In addition, 1122 peptides were identified as being derived from noncanonical proteins that are not included in the Swiss-Prot-derived proteins. Detailed analysis of the 1122 noncanonical protein-derived peptides led to the identification of many SNV-containing peptides, splicing isoforms, and novel translation start site candidates.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオフォーム プロテオーム スプライシング 翻訳開始点 プロテオリシス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスクリプトーム解析により、ヒト mRNA の 90%以上は選択的スプライシングによるアイソフォームを持ち、その 50%以上は組織特異的に発現していることが報告されている。また細胞種や、発生や分化とも関連し、がん細胞ではゲノム変異により異なるアイソフォームが作られることも報告されている(例えば、Cell Reports 2017, 21, 798-812)。一方、SwissProt (www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot)に登録されているヒトタンパク質は 20,365 種で、RNA スプライシング産物でタンパク質として確認されているものを考慮しても約 50,000 種であるが、翻訳後に生じるプロテオリシス産物や翻訳後修飾体も考慮すると、その総数は爆発的に増える。ところが、これらのプロテオフォームの全体像は不明であり、RNA スプライシング由来タンパク質がどの程度発現しているのか、翻訳後プロテオリシス産物の発現特異性はどの程度あるのか、タンパク質 N 末端修飾の有無によるタンパク質分解への影響はどの程度なのか、など多くの点が未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、①プロテオーム規模でプロテオフォームを解析する技術を開発し、②プロテオフォームがもたらすプロテオーム多様性が、RNA スプライシングも含めてどのような制御を受けて形成されているか、その全体像「プロテオフォームランドスケープ」を明らかにする。

3. 研究の方法

細胞培養

本研究ではモデル試料として、11 種類の非小細胞肺癌細胞株を用いた。各細胞株は 10% 牛胎児血清および 1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma-Aldrich) 入りの液体培地にて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

タンパク質抽出・消化

各細胞株からのタンパク質抽出および消化には、相間移動溶解剤による PTS 法¹⁰を用いた。消化後 PTS 法により SDC と SLS を取り除き、水相を SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) で真空乾燥させ、SDB-XC StageTip¹¹を用いて脱塩した。

安定同位体標識

消化後のペプチド 10 µg を 200 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.5) 5 µL に溶解させ、TMTpro 16plex 標識試薬 0.1 mg を溶解したアセトニトリル (ACN) 5 µL と混合して 25 °C で 1 時間静置した。反応後、最終濃度 0.33 % になるようにヒドロキシルアミンを加えて反応を停止し、SDB-XC StageTip で脱塩した。また、複製間の正確な定量のための内部標準試料として、複製内の全てのサンプルの等量混合試料 50 µg を同様の手順で標識した。

高 pH 逆相クロマトグラフィーによる前分画

各細胞株から得られたペプチド試料および内部標準試料を合計 100 µg になるように混合し、SDB-XC StageTip を用いた高 pH 逆相クロマトグラフィーによる前分画により 8 つの画分へと分画した。

タンパク質 NC 末端ペプチド濃縮のための強カチオン交換クロマトグラフィー

16-gauge ニードルでくりぬいた Empore cation-SR disk (GL Sciences) 3 枚を 200 µL サイズのピペットチップに充填し、1 M NaCl、30% ACN 200 µL で活性化、0.6% TFA、30% ACN 400 µL で平衡化を行った。0.6% TFA、30% ACN 65 µL に溶解させた LysC/トリプシン消化物をロードし、フロースルー画分を回収した。さらに 0.6% TFA、30% ACN 65 µL で溶出することで得られる洗浄画分も合わせて、計 130 µL を回収した。回収したペプチド溶液を SpeedVac で真空乾燥させ、LC/MS/MS で測定した。

タンパク質 C 末端ペプチド濃縮のための酸化金属リガンド交換クロマトグラフィー

16-gauge ニードルでくりぬいたポリエチレンフリットを 200 µL サイズのピペットチップに詰め、CeO₂ 90 mg のメタノール懸濁液をロードした後、遠心分離により充填した。移動相には 50 mM 5-アミノ吉草酸、1 M NaCl と ACN を 60:40 で混合したもの (pH 5.0) を使用した。400 µL の移動相でカラムを平衡化した後、150 µL の移動相に溶解させた V8 protease 消化物をロードし、フロースルー画分を回収した。さらに 150 µL の移動相で溶出することで得られる洗浄画分も合わせて、計 300 µL を回収した。回収したペプチド溶液は SpeedVac で真空乾燥させ、SDB-XC StageTip を用いて脱塩後に LC/MS/MS で測定した。

タンパク質 N 末端ペプチド濃縮のための強カチオン交換クロマトグラフィー

ペプチド試料として LysargiNase 消化物、移動相の TFA 濃度を 1.0 % とした以外はすべてタン

パク質 NC 末端ペプチド濃縮の項と同様の手順で行った。

LC/MS/MS 分析

全ての測定で、真空乾燥させた試料は 0.5 % TFA、4 % ACN に再溶解させた。LC/MS/MS 分析には、UltiMate 3000RSLCnano システム (Thermo Fisher Scientific) および Orbitrap Exploris 480 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) から成る nanoLC/MS/MS システムを用いた。移動相 A には 0.5 % 酢酸、移動相 B には 80 % ACN、0.5 % 酢酸を用い、90 分間のグラジエント条件で分析した。分析用カラムとして、粒子径 1.9 μm の ReproSil-Pur C18-AQ (Dr.Maisch) が充填された 25 cm 長の自家製スプレーヤー一体型カラム¹²を用い、流速 400 nL/min、カラムオープン (Sonation GmbH) 中 50 $^{\circ}\text{C}$ で分離を行った。全ての分析は Data Dependent Acquisition モードで行った。

データ解析

LC/MS/MS データは、MaxQuant¹³ (ver 1.6.17.0) を用いて処理した。ペプチド同定のためのデータベースには Swiss-Prot ヒトタンパク質データベース (配列数 : 42390)、検索エンジンには Andromeda¹⁴ を用いた。消化酵素条件には試料に応じて trypsin、V8、LysargiNase のいずれかを設定し、ターミノーム解析では、N 末端・C 末端の少なくとも一方の基質特異性を考慮する半特異的検索を行った。ペプチドの定量は安定同定体標識試薬のレポーターイオンの強度に基づき行われ、内部標準試料に対する比として表された。

タンパク質切断部位周辺配列のシーケンスロゴの作成には iceLogo¹⁵ を用いた。PWM および PWM スコアは、Wasserman らの報告¹⁶を参考にして算出した。また、各プロテアーゼにおける基質情報としては、MEROPS¹⁷に登録されているものを用いた。

4. 研究成果

1. タンパク質ターミノミクスによるプロテオリシス産物の大規模計測

タンパク質末端配列解析とそれに続くデータベース検索により同定されたペプチド配列には、N 末端もしくは C 末端のどちらか一方がボトムアッププロテオミクスのワークフローで用いるプロテアーゼの基質特異性と異なるものが存在する。これらの配列は、試料由来のプロテアーゼによる内因性プロテオリシスに起因する末端配列(プロテオリシス末端)であると考えられ、各試料におけるプロテアーゼの活性プロファイリングに用いることができる。11 種の肺がん細胞株それぞれについてのターミノーム解析の結果、1058 のプロテオリシス N 末端、2123 のプロテオリシス C 末端、計 3181 のプロテオリシス末端が同定・定量された(図 1A)。そのうち 2839 の配列は、タンパク質末端配列の包括的なデータベースである TopFIND¹⁸ に未登録の新規プロテオリシス末端配列であった(図 1B)。また、3 種類の消化酵素それぞれで同定された全ペプチドについて、定量値の相対標準偏差の中央値が 10 % を下回っており、定量再現性も十分であった(図 1C)。

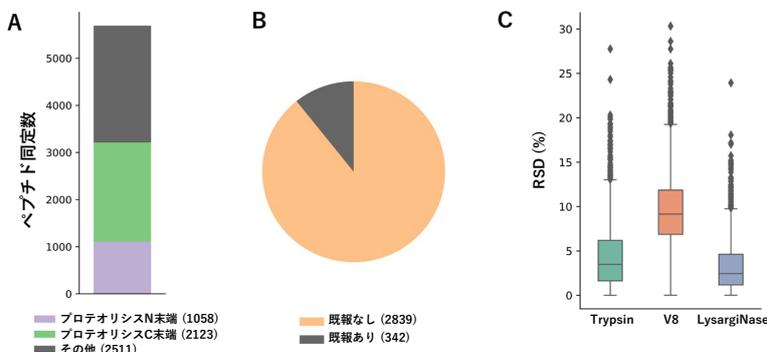


図 1: 得られたデータセットの概要

(A) ペプチド同定数とその内訳。その他には、タンパク質本来の末端配列や末端以外の配列が含まれる。(B) 同定されたプロテオリシス末端のうち、既に報告があったものの割合。(C) 各実験における全ペプチドの定量再現性を示す箱ひげ図。実験ごとに、 $n = 3$ で得られたペプチドの定量値をもとに相対標準偏差(RSD)を計算した。

次に、同定されたプロテオリシス末端の特徴を捉えるため、タンパク質ごとに同定されたプロテオリシス末端の数を調べたところ、同定された全 1201 のタンパク質のうち 6 割ほどは 1 つの切断部位のみを持つ一方で、一部のタンパク質は数十もの切断部位が同定されていた(図 2A)。同定された切断サイト数が上位 5 つのタンパク質には、ENO1 や ACTB などの解糖系や細胞骨格に関与するような生体内でも存在量が豊富であると考えられるタンパク質が見られ、実際にタンパク質の存在量に関するデータベースである PaxDb¹⁹においても上位 1%の存在量であった(図 2A)。存在量の多いタンパク質は、その分解産物の存在量も多いと考えられることから妥当な結果と言える。さらに、切断サイト数が最も多かった ENO1 について、同定されたプロテオリシス末端を確認すると、末端が数残基ごとずれたペプチド配列の組み合わせ(ラダー状ペプチ

ド)が複数同定されていた(図 2B)。これはタンパク質が分解される際の、エンドペプチダーゼによる切断とそれに続くエキソペプチダーゼによる切断を反映していると考えられる。

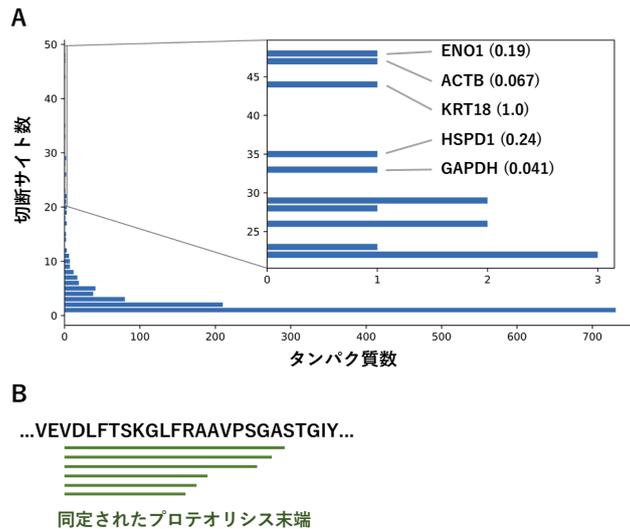


図 2： 同定されたプロテオリシス末端の特徴

(A) 各タンパク質における、同定されたプロテオリシス末端の数の分布と上位 5 タンパク質。()内の数字は PaxDb における存在量のパーセントを示す。(B) ENO1 で同定されたラダー状ペプチドの例。

2. プロテオリシスにおける細胞株特異性の評価

次に、同定されたプロテオリシス末端から、がん細胞株ごとのプロテアーゼ活性をプロファイリングするための定量解析を行った。まず、同定されたペプチドの定量値に基づく分散分析 (ANOVA) を行い、発現量が有意に変動 ($p < 0.01$) していた 2032 ペプチドを抽出した。続いて、有意な変動がみられた 2032 のプロテオリシス末端について、定量値に基づく階層的クラスタリングを行ったところ、各プロテオリシス末端の定量値のプロファイルが細胞株ごとに異なることが確認された (図 3A)。それぞれのプロテオリシス末端は何らかのプロテアーゼによる切断を受けており、その特徴は切断面に現れると考えられる。そこで、属するプロテオリシス末端が 20 以上である各クラスターについて切断部位周辺-4 から+4 の位置に存在するアミノ酸残基の特徴を調べた。特に出現アミノ酸の特徴が顕著だった上位 2 つのクラスターが図 3A 中緑色で示すクラスター1 と灰色で示すクラスター2 であり、クラスター1 では P1 部位にアスパラギン(N)、クラスター2 では P1 部位にロイシン(L)をもつような配列が濃縮されていた(図 3B, C)。この結果から、それぞれのクラスターでアスパラギンの C 末端およびロイシンの C 末端で切断するようなプロテアーゼの活性が上昇している可能性が示唆された。

続いて、先ほど周辺配列に存在するアミノ酸が特に特徴的であった 2 つのクラスターに注目し詳細な解析を行った。図中緑色で示すクラスター1 は、11 種の細胞株のうち H1650、H1975 で特に発現量が多く、次いで PC-9、II-18 でわずかに発現量が多いようなクラスターである。これら 4 つの細胞株の主要な変異に着目すると、すべてが EGFR に変異を持つ細胞株であり、このクラスターが EGFR 変異によるプロテオリシス制御の変動を反映している可能性が示唆された。また、図中灰色で示すクラスター2 は、1 つの細胞株 A427 で特異的に発現量の上昇がみられるクラスターである。A427 は KRAS 変異を有する細胞株であるが、A427 と同じ KRAS に変異を持つ他の細胞株では発現量の上昇は見られず、KRAS 以外の、細胞株特異的な変異を反映している可能性を示唆している。

3. PWM スコアリングに基づく責任プロテアーゼの探索

前章で、各クラスターに含まれるプロテオリシス末端は、その切断部位周辺配列に特徴を持つことが確認できた。この情報から、各クラスターで発現が亢進している責任プロテアーゼが探索できると考えた。ここで、責任プロテアーゼとしては、あるプロテオリシス末端についてその最終断片を生成するプロテアーゼのみを考慮することとした。ここで、プロテアーゼとしては、MEROPS に登録されているプロテアーゼのうち基質情報が 20 以上登録されている 106 種を用い、閾値として PWM スコア > 2 を採用した。まず、図 3A のクラスター1 に含まれる 153 配列を元に探索を行った結果、PWM スコアの閾値を超える配列数が最も多かったのはレグマイン (LGMN) であった。レグマインについて、実際に MEROPS に登録されている基質情報を元にシークエンスロゴを確認すると、アスパラギンの P1 部位に強い特異性をもつプロテアーゼであった。これは先ほどのクラスター1 に含まれる配列でのシークエンスロゴの特徴と一致しており、PWM スコアを用いた評価が正しく責任プロテアーゼを探索できていることが示唆された。この結果

から、レグマインが肺がん細胞内においても発現量が異常に亢進していることが示唆された。さらにこのクラスター1は肺がん細胞株の中でも、EGFR変異を有する株で発現量が上昇しているクラスターであったことから、レグマイン発現量の異常亢進にEGFR変異が関与している可能性が示唆された。

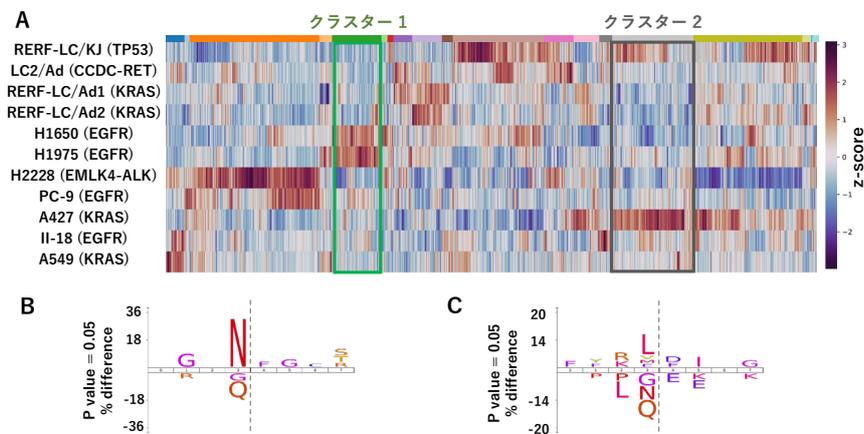


図3：同定されたプロテオリシス末端のクラスター解析

(A) 同定されたプロテオリシス末端の定量値に基づく階層的クラスタリングの結果とヒートマップ。定量値は z-score として標準化されており、横軸はペプチド、縦軸が細胞株を表す。横軸の色が各クラスターに対応している。() 内は各細胞株の主要なドライバー変異を表す。(B, C) クラスター1(B)および2(C)における切断部位周辺配列のシーケンスロゴ。破線は切断部位を示す。

【参考文献】

1. Rawlings ND, *et al.* Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, Jan 4;44(D1): D343-50. (2016)
2. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol.*, 6(1), 79-87, (2005).
3. Mason, S. D., & Joyce, J. A. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.*, 21(4), 228-237, (2011).
4. Lehmann BD, *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* Jul;121(7):2750-67, (2011).
5. Gevaert K, *et al.* Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat Biotechnol.* May;21(5):566-9, (2003).
6. Kleifeld, O., *et al.* Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol.*, 28(3), 281-288, (2010).
7. Chang, C. H., Chang, H. Y., Rappsilber, J., & Ishihama, Y. Isolation of Acetylated and Unmodified Protein N-Terminal Peptides by Strong Cation Exchange Chromatographic Separation of TrypN-Digested Peptides. *Mol. Cell. Proteomics*, 20, 100003, (2021).
8. Nishida, H., & Ishihama, Y. One-Step Isolation of Protein C-Terminal Peptides from V8 Protease-Digested Proteins by Metal Oxide-Based Ligand-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.*, 94(2), 944-951, (2022).
9. Tsumagari K, Chang CH, Ishihama Y. A protocol for analyzing the protein terminome of human cancer cell line culture supernatants. *Star Protoc.* Jul 22;2(3):100682, (2021).
10. Masuda, T., Tomita, M., & Ishihama, Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J. Proteome Res.*, 7(2), 731-740, (2008).
11. Rappsilber, J., Mann, M., & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.*, 2(8), 1896-1906, (2007).
12. Ishihama, Y., Rappsilber, J., Andersen, J. S., & Mann, M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J. Chromatogr. A*, 979(1-2), 233-239, (2002).
13. Cox, J., Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.*, 26, 1367-1372, (2008).
14. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., & Mann, M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.*, 10(4), 1794-1805, (2011).
15. Colaert, N., *et al.* Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat. methods*, 6(11), 786-787, (2009).
16. Wasserman, W. W., & Sandelin, A., Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.*, 5(4), 276-287, (2004).
17. Neil D Rawlings, *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Res.*, 46, Issue D1, 4 January D624-D632. (2018).
18. Nikolaus Fortelny, *et al.* Overall, Proteome TopFIND 3.0 with TopFINDER and PathFINDER: database and analysis tools for the association of protein termini to pre- and post-translational events, *Nucleic Acids Res.*, 43, Issue D1, 28 January 2015, D290-D297, (2015).
19. Huang, Q., *et al.* PaxDb 5.0: Curated Protein Quantification Data Suggests Adaptive Proteome Changes in Yeasts. *Mol. Cell. Proteomics*, 22(10), 100640, (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Niinae Tomoya, Sugiyama Naoyuki, Ishihama Yasushi	4. 巻 28
2. 論文標題 Validity of the cell extracted proteome as a substrate pool for exploring phosphorylation motifs of kinases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 727 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishida Hiroshi, Kanao Eisuke, Ishihama Yasushi	4. 巻 95
2. 論文標題 Centrifugal Gel Crushing Tips for Gel-Based Proteome Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 18311 ~ 18315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c02527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomioaka Ryota, Tomioaka Ayana, Ogata Kosuke, Chan Hsin-Ju, Chen Li-Yu, Guzman Ulises H., Xuan Yue, Olsen Jesper V., Chen Yu-Ju, Ishihama Yasushi	4. 巻 35
2. 論文標題 Extending the Coverage of Lys-C/Trypsin-Based Bottom-up Proteomics by Cysteine S-Aminoethylation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 386 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jasms.3c00448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 OGATA Kosuke, ISHIHAMA Yasushi	4. 巻 43
2. 論文標題 Temperature Dependence of Retention Behavior of Phosphorylated Peptides in Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 137 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2022.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Shunsuke, Shibata Masayoshi, Suzuki Nobuyuki, Ishihama Yasushi	4. 巻 1685
2. 論文標題 Immunoreactivity profiling of Anti-Chinese hamster ovarian host cell protein antibodies by isobaric labeled affinity purification-mass spectrometry reveals low-recovery proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 463645 ~ 463645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2022.463645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Battellino Taylor, Ogata Kosuke, Spicer Victor, Ishihama Yasushi, Krokhin Oleg	4. 巻 22
2. 論文標題 Acetic Acid Ion Pairing Additive for Reversed-Phase HPLC Improves Detection Sensitivity in Bottom-up Proteomics Compared to Formic Acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 272 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.2c00388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogata Kosuke, Takagi Shunsuke, Sugiyama Naoyuki, Ishihama Yasushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Motif-Targeting Phosphoproteome Analysis of Cancer Cells for Profiling Kinase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 78 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15010078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niinae T, Imami K, Sugiyama N, Ishihama Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics	6. 最初と最後の頁 100119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcpro.2021.100119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogata K, Tsai CF, Ishihama Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Nano-scale solid-phase isobaric labeling for multiplexed quantitative phosphoproteomics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Proteome Res	6. 最初と最後の頁 4193-4202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.1c00444.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuke Ogata, Yasushi Ishihama	4. 巻 20
2. 論文標題 CoolTip: Low-Temperature Solid-Phase Extraction Microcolumn for Capturing Hydrophilic Peptides and Phosphopeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics	6. 最初と最後の頁 100170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcpro.2021.100170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsumagari K, Niinae T, Otaka A, Ishihama Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Peptide probes containing a non-hydrolyzable phosphotyrosine-mimetic residue for enrichment of protein tyrosine phosphatases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 e2100144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202100144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chia-Feng Tsai, Kosuke Ogata, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama	4. 巻 2
2. 論文標題 Motif-centric phosphoproteomics to target kinase-mediated signaling pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Nishida, Yasushi Ishihama	4. 巻 94
2. 論文標題 One-step Isolation of Protein C-terminal Peptides from V8 Protease-digested Proteins by Metal Oxide-based Ligand Exchange Chromatography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anal Chem	6. 最初と最後の頁 944-951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c03722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K Tsumagari, CH Chang, Y Ishihama	4. 巻 2
2. 論文標題 A simple protocol for analyzing the protein terminome of culture supernatants of human cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Star Protocols	6. 最初と最後の頁 100682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計35件 (うち招待講演 16件 / うち国際学会 15件)

1. 発表者名 Hiroshi Nishida, Kazuya Morikawa, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Protein N- and C-terminomics platform with one-step isolation of protein terminal peptides
3. 学会等名 11th AOHPPO (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森川和哉、西田紘士、今見考志、石濱 泰
2. 発表標題 ピペットチップ型カラムを用いたワンステップタンパク質末端ペプチド濃縮法
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 プロテオフォーム大規模解析とプロテオームデータベース
3. 学会等名 第2回環境化学物質3学会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口優斗、西田紘士、奥田修二郎、石濱泰
2. 発表標題 タンパク質末端ペプチド濃縮法を用いた非小細胞肺癌細胞株のプロテオフォーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 2023 年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森川和哉、西田紘士、今見考志、石濱泰
2. 発表標題 ワンステップタンパク質N末端ペプチド単離法による包括的タンパク質N末端解析
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Large-scale analysis of protein N- and C-termini for profiling human proteoforms
3. 学会等名 AOMSC-KSMS 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口優斗、西田紘士、奥田修二郎、石濱泰
2. 発表標題 がん細胞のプロテアーゼ制御機構解明に向けたタンパク質ターミノーム解析
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森川和哉、西田紘士、今見考志、石濱泰
2. 発表標題 Identification of Signal Peptide Cleavage Sites by One-step N-terminomics
3. 学会等名 第7回 京都市体質量分析研究会国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 谷口優斗、西田紘士、奥田修二郎、石濱泰
2. 発表標題 Proteogenome analysis of lung cancer cell lines for comprehensive identification of novel proteoforms
3. 学会等名 第7回 京都市体質量分析研究会国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 今見考志、内山純貴、森川和哉、石濱泰
2. 発表標題 新生ポリペプチド鎖のプロテオミクス
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田紘士、工藤拓実、石濱泰
2. 発表標題 GelC-MS/MSのためのピペットチップを用いた簡便なゲル破碎法の開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川和哉、西田紘士、内山純貴、今見考志、石濱泰
2. 発表標題 共翻訳 N 末端アセチル化修飾の大規模解析法の開発
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 プロテオミクスの最前線
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第33回サマースクール(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 精密化プロテオミクスへの挑戦
3. 学会等名 第8回がん代謝研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 未開拓プロテオミクスへの挑戦
3. 学会等名 第16回近畿支部若手夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Protein terminome-centric proteoform analysis
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会pre-congress webinar（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田 紘士、今見 考志、高地 雄太、石濱 泰
2. 発表標題 タンパク質末端解析データを用いたノンカノニカルタンパク質の同定
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川和哉、西田紘士、今見考志、石濱泰
2. 発表標題 新生ポリペプチド鎖N末端解析によるノンカノニカルタンパク質の同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Nishida, Koshi Imami, Yuta Kochi, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Non-canonical Protein Identification by Protein Terminomics
3. 学会等名 HUP02022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Large-scale proteoform analysis in proteogenomics: current status and challenges
3. 学会等名 International Cancer Proteogenomics Symposium Tokyo 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Peak Identification and Quantification by Proteomic Mass Spectrogram Decomposition
3. 学会等名 10th Asia-Oceania Human Proteome Organization Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Nishida, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Isolation of Protein C-terminal Peptides by V8 Protease Digestion Coupled with Ligand Exchange Chromatographic Separation
3. 学会等名 10th Asia-Oceania Human Proteome Organization Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱 泰
2. 発表標題 薬学プロテオミクスの最前線
3. 学会等名 第47回BMSコンファレンス(BMS2020/2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Nishida, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Novel one-step isolation method for protein C-terminal peptides with ligand exchange chromatography
3. 学会等名 PBA2021 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Protein Terminomics to Uncover Human Proteoform Atlas
3. 学会等名 PBA2021 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田 紘士、石濱 泰
2. 発表標題 配位子交換クロマトグラフィーによるワンステップタンパク質C末端ペプチド濃縮法の開発
3. 学会等名 BMA2021 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 プロテオーム解析のための基盤技術開発と応用
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 タンパク質プロテオフォームの大規模解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Large-Scale Identification of Protein N- and C-Termini to Profile Human Proteoforms
3. 学会等名 Asian Conference on Analytical Sciences 2021 (ASIANALYSIS 2021)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 ショットガンプロテオミクスのためのペプチド分離
3. 学会等名 クロマトグラフィー次世代技術セミナー2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田 紘士、今見 考志、石濱 泰
2. 発表標題 N末端プロテオミクスによる新規翻訳開始点の同定
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 オミクス解析のための微量分離技術の開発
3. 学会等名 第41回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Analytical challenges to unveil human proteome and proteoforms
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川和哉、内山純貴、西田紘士、今見考志、石濱泰
2. 発表標題 新生ポリペプチド鎖N末端アセチル化修飾の大規模解析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川和哉、内山純貴、西田紘士、今見考志、石濱泰
2. 発表標題 新生ポリペプチド鎖N末端アセチル化修飾の大規模解析法の開発
3. 学会等名 第3回生体分子分析ワークショップ
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今見 考志 (Imami Koshi)		
研究協力者	小形 公亮 (Ogata Kosuke)		
研究協力者	金尾 英佑 (Kanao Eisuke)		
研究協力者	杉山 直幸 (Sugiyama Naoyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------