

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510254

研究課題名(和文)高精度時系列プロテオミクスによるシグナル伝達攪乱機構のシステム解析

研究課題名(英文) System-level analysis of cell signaling perturbation by high-resolution mass spectrometry

研究代表者

尾山 大明 (Oyama, Masaaki)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30422398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：シグナル伝達系は細胞の増殖・分化等の基本的な生命活動を制御しており、その破綻は癌をはじめとする種々の疾患の発症と密接に関連することが知られている。本研究課題において、我々はタンパク質安定同位体標識(SILAC)法と高精度nanoLC-MS/MS型質量分析システムを用いてピロリ菌感染応答における胃癌細胞内シグナル伝達系のシステム解析を行い、感染応答によるリン酸化プロテオームの時系列動態情報、並びに病原因子CagAの包括的結合蛋白質情報を取得した。

研究成果の概要(英文)：The signal transduction system regulates fundamental biological events such as cell growth and differentiation. Dysregulation of this machinery is known to be closely associated with various types of diseases including cancer. In this research project, we performed a system-level analysis of signaling network perturbation in *H. pylori*-infected gastric epithelial cells using high resolution nanoLC-MS/MS system coupled with SILAC technology. Here, we report time-resolved description of the phosphoproteome dynamics upon *H. pylori* infection as well as the interactome of the major virulence factor, CagA.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：プロテオミクス シグナル伝達 システムバイオロジー リン酸化 定量生物学

1. 研究開始当初の背景

世界人口の半数以上が感染していると言われている *H. pylori* は、胃粘膜に長期間持続感染して、胃潰瘍や胃癌を誘発する。近年、*H. pylori* の病原因子の一つである CagA が胃粘膜上皮細胞内に注入され、胃発癌のキープクターとして作用していることが明らかになってきた。CagA は、チロシンリン酸化依存的に細胞質内脱リン酸化酵素 Shp2 と結合し、細胞の異常増殖に作用する (Higashi et al., *Science*, 295, 683-686, 2002) 他、アダプター分子である Crk と相互作用して細胞接着の脱制御に関与することが報告されている (Suzuki et al., *J. Exp. Med.*, 202, 1235-1247, 2005) が、現在までに得られている知見は非常に断片的であり、治療薬の開発に向けた発症メカニズムの詳細な検討には程遠いのが現状である。諸外国と比較して我が国は胃癌の発生率が特に高く、癌死亡の第2位を占めていることから、根本的な治療薬の開発に向けた感染・発癌メカニズムの解明は緊急の課題である。

2. 研究の目的

この 20 年間で細胞の増殖や分化、その破綻としての疾患に深く関与するチロシンリン酸化を介した細胞内シグナル伝達系の基本経路はほぼ解明されたが、個々のシグナル伝達系は複雑に絡み合っただネットワークを形成するため、その制御機構を解明することは容易ではない。本申請では、蛋白質の活性変動を経時的かつ網羅的に解析出来る SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) 法を基盤とした高感度質量分析によって、*H. pylori* 感染による宿主胃癌細胞内シグナル伝達ネットワークの攪乱過程を経時的・定量的に測定し、ネットワークモデルを構築する。モデルに基づくキーエレメントの同定により、感染応答による宿主細胞内シグナル伝達システムの作動異常を惹起するメカニズムの全体像を明らかにし、我が国における発生率が非常に高い胃癌発症に関して明確な治療戦略の提示を目指す。

3. 研究の方法

癌化や分化などの高次の生命現象における情報伝達ネットワークは非常に複雑な仕組みで制御されており、従来の個々の分子に着目した手法では鍵となる因子・現象を包括的に捉えることが出来ない。*H. pylori* 感染による胃癌発症の鍵となっている病原因子 CagA と宿主細胞側のシグナル伝達因子との相互作用に関しても現在のところ断片的な知見しか得られておらず、我が国において癌死亡の第2位を占めている胃癌に対する有効な治療戦略の早急な提示に向けて、発症メカニズムの全体像の解明が希求されている。*H. pylori* 感染による宿主細胞のシグナル伝達系の攪乱の仕組みを本質的に理解するためには、情報伝達ネットワークに関する因

子の活性変動を網羅的に計測し、シグナルが伝達される際の反応・制御様式をシステムレベルで解析することが必要不可欠である。しかしながら従来のプロテオーム解析では、細胞中における相対的存在量の多い蛋白質ばかりが検出され、微量シグナル伝達因子の網羅的な解析は困難であるとされてきた。定量性に関しても、サンプルの濃縮、精製を行う際に生じる実験誤差により信頼性の高い定量データを得る事は極めて困難であり、パルス全体ダイナミクスを包括的かつ定量的に捉えるには技術的なハードルが多く残されていた。ところが最近になって、安定同位体による細胞内全蛋白質の *in vivo* 標識法 (SILAC 法) 及び高感度 nanoLC-MS/MS システムを用いて、上皮成長因子 (EGF) シグナル伝達系のチロシンリン酸化因子群に関する網羅的な時系列プロテオーム解析が報告された (Blagoev et al., *Nat. Biotechnol.*, 22, 1139-1145, 2004)。上記の報告では、SILAC 法の適用により従来の *in vitro* 標識法に比べ、定量的実験誤差や標識によるサンプルロスを格段に抑えることが出来るようになったが、回収したチロシンリン酸化蛋白質複合体を電気泳動により分画した後に、従来のゲル内消化法によりサンプルを調製しているため、分画によるサンプルの細分化、及び各ゲル画分から断片化したペプチドを回収する煩雑なステップがデータ取得におけるボトルネックとなってしまう。

そこで申請者らはチロシンリン酸化蛋白質を特異的に溶出・回収し、電気泳動による分離を経ずに複合体を直接酵素処理して試料調製を行う一連の方法論を確立し、得られたプロテオームデータから独自の自動相対定量アルゴリズム (Saito et al., *BMC Bioinformatics*, 8: 15, 2007) による時系列データの一覧化に至るまで、システムレベルでの制御機構を解析する為に必要な時間分解能が高い活性変動データをハイスループットに取得する解析システムを構築した。本研究計画においては、シグナル伝達系において主要な役割を果たすリン酸化ネットワークに焦点を当て、培養細胞系において *H. pylori* 感染により作動するリン酸化蛋白質群の活性変動を包括的に計測し、ネットワークモデルに基づいてシグナル伝達の脱制御を担うコントロールポイントを絞り込む。

4. 研究成果

申請者らはこれまでに SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) をベースにしたチロシンリン酸化ネットワークの相対変動解析法 (Blagoev et al., *Nat. Biotechnol.*, 22, 1139-1145, 2004) を基盤として方法論の改良に取り組み、(1)チロシンリン酸化蛋白質の包括的回収・特異的溶出法の開発、及び(2)溶出物の一括酵素処理によって調製されたサンプルに関するショットガン解析に適合した nanoLC-MS/MS 測定系

の構築、そして(3)得られた生データから自動で相対定量を行う情報解析システムの開発を進め、サンプル調製から活性変動データの作成に至るまでスループットが非常に高い実験系を確立した。細胞の癌化を担う最も代表的なシグナル伝達系である EGFR シグナルパスウェイに関してヒト A431 細胞をモデルとして解析を行った結果、136 種類の因子を同定し、細胞接着・細胞骨格に関するシグナル因子を中心とした精密な時系列データの取得に成功している (Oyama et al., *Mol. Cell. Proteomics* 8: 226-231, 2009)。本研究課題においては上記の SILAC 法及び高精度 nanoLC-MS/MS システムを用いて、ヒト胃癌 AGS 細胞内シグナル伝達系におけるピロリ菌感染依存的なリン酸化プロテオームの時系列動態情報、並びに病原因子 CagA に関する包括的な結合蛋白質情報を取得し、シグナルネットワーク解析を行った。リン酸化プロテオーム解析に関しては、当初予定していたチロシンリン酸化に関する解析のみならず、セリン・トレオニンリン酸化も含めた包括的な解析を行うための微量計測技術を新たに確立し、16,000 を超えるリン酸化ペプチドに関する時系列活性変動情報の取得に成功した。

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 36 件)

Tokuhara D, Alvarez B, Mejima M, Hiroiwa T, Takahashi Y, Kurokawa S, Kuroda M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nochi T, Sagara H, Aladin F, Marcotte H, Frenken LG, Iturriza-Gomara M, Kiyono H, Hammarstrom L, and Yuki Y. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection.

J. Clin. Invest., 123: 3829-3838, 2013. 査読有

DOI: 10.1172/JCI70266.

Kozuka-Hata H, Goto Y, and Oyama M.

Phosphoproteomics-based characterization of cancer cell signaling networks In *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer* (ed. Cesar Lopez-Camarillo and Elena Arechaga-Ocampo), *InTech*, 185-206, 2013. 査読有

DOI: 10.5772/52915

Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsiripan D, Nakayama KI, and Fukada Y.

FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through

ubiquitination and stabilization of cryptochromes.

Cell, 152: 1106-1118, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.054.

Shibata Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Han X, Tanaka Y, Gohda J, and Inoue J. p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO.

Nat. Commun., 3: 1061, 2012. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms2068.

Kozuka-Hata H, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Ao-Kondo H, Tsumoto K, Akiyama T, and Oyama M. Phosphoproteome of human glioblastoma initiating cells reveals novel signaling regulators encoded by the transcriptome.

PLoS One, 7: e43398, 2012. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0043398.

Kozuka-Hata H, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Ao-Kondo H, Tsumoto K, Akiyama T, and Oyama M.

Global proteome analysis of glioblastoma stem cells by high-resolution mass spectrometry.

Current Topics in Peptide & Protein Research, 13: 1-47, 2012. 査読有

<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=13&tid=26&aid=3579&pub=2012&type=3>

Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, and Matsuo K.

Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion.

J. Cell Biol., 197: 553-568, 2012. 査読有

DOI: 10.1083/jcb.201111116.

Gorai T, Goto H, Noda T, Watanabe T, Kozuka-Hata H, Oyama M, Takano R, Neumann G, Watanabe S, and Kawaoka Y. F1Fo-ATPase, F-type

proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 109: 4615-4620, 2012. 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1114728109.

Kozuka-Hata H, Tasaki S, and Oyama M. Phosphoproteomics-based systems analysis of signal transduction networks.

Front. Physiol., 2: 113, 2011. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2011.00113.

Suzuki M, Kiga K, Kersulyte D, Cok J, Hooper CC, Mimuro H, Sanada T, Suzuki

S, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kamiya S, Zou QM, Gilman RH, Berg DE, and Sasakawa C.
Attenuated CagA oncoprotein in Helicobacter pylori from Amerindians in Peruvian Amazon.
J. Biol. Chem., 286: 29964-29972, 2011.
査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.263715.

[学会発表](計 11 件)

Hiroko Kozuka-Hata, Ryo Koyama-Nasu, Yumi Goto, Yukiko Nasu-Nishimura, Hiroko Ao-Kondo, Kouhei Tsumoto, Tetsu Akiyama, Masaaki Oyama
Global Characterization of the Proteome and Phosphoproteome in Human Glioblastoma Initiating Cells by High-Resolution Mass Spectrometry
HUPO 12th Annual World Congress, Sep 16, 2013 Pacifico Yokohama, Japan
Yuta Narushima, Hiroko Kozuka-Hata, Yumi Goto, Tomoko Hiroki, Ryo Koyama-Nasu, Kouhei Tsumoto, Tetsu Akiyama, Masaaki Oyama
SILAC-Based Quantitative Phosphoproteome Analysis of Glioblastoma Stem Cell Differentiation by High-Resolution nanoLC-MS/MS
HUPO 12th Annual World Congress, Sep 16, 2013 Pacifico Yokohama, Japan

尾山 大明、秦 裕子

ショットガンプロテオミクスが解き明かす高解像度シグナル伝達ダイナミクス
第86回日本生化学会大会 2013年9月12日 パシフィコ横浜

秦 裕子、那須 亮、後藤 友美、西村 教子、近藤 裕子、津本 浩平、秋山 徹、尾山 大明

ショットガンリン酸化プロテオーム解析によるグリオブラストーマ幹細胞新規制御因子の同定

第35回日本分子生物学会年会 2012年12月13日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

尾山 大明

定量プロテオミクスによるリン酸化シグナルネットワークの統合システム解析
第84回日本生化学会大会 2011年9月24日 国立京都国際会館

尾山 大明

生命システム解析を指向したプロテオミクス研究の新展開

日本プロテオーム学会 2011 年会 2011年7月28日 朱鷺メッセ

秦 裕子、鈴木 仁人、氣賀 恒太郎、田崎 真哉、津本 浩平、井上 純一郎、山本 雅、笹川 千尋、尾山 大明

ピロリ菌感染応答における宿主シグナル

伝達系のシステム解析
日本プロテオーム学会 2011 年会 2011年7月28日 朱鷺メッセ

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾山 大明 (OYAMA, Masaaki)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：30422398

(2)研究分担者

秦 裕子 (KOZUKA-HATA, Hiroko)
東京大学・医科学研究所・技術専門職員
研究者番号：80401256