

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241062

研究課題名(和文) 分子標的創薬に向けたリン酸化ネットワーク基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of intracellular phosphorylation network for molecular targeting drug discovery

研究代表者

石濱 泰 (Ishihama, Yasushi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30439244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*in vitro*キナーゼ大規模アッセイに基づく精度の高いキナーゼ基質モチーフ取得とそれを用いた基質予測スコアリング法の開発に成功した。また、定量リン酸化プロテオミクスの高性能化も順調に進展し、細胞内キナーゼに対する摂動から得られるリン酸化変動からキナーゼ基質を同定・推定し、さらにはリン酸化プロテオーム変動をキナーゼ変動に変換することにも成功した。測定系のスループットもマルチプレックス定量タグの導入により1測定あたりに要する時間は1時間と実用的であり、今後さらに大規模なデータを取得することにより、細胞内リン酸化ネットワークの分子基盤解明の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have successfully developed the analytical system to acquire the high-precision kinase substrate motifs based on a large-scale *in vitro* kinase assay as well as substrate prediction scoring methods. Moreover, we further developed a workflow for quantitative phosphoproteomics using meter-scale monolithic silica capillary columns combined with multiplex quantitation tags, and applied to phosphorylation perturbation studies. As a result, this system allowed to identify intracellular kinases as well as their substrates regulated by various perturbations, by converting the phosphoproteome fluctuations to kinase variation. Since the throughput of the measurement system is practical (1 hour per analysis), this system could contribute to the evolution of the molecular basis of intracellular phosphorylation network by acquiring a more extensive data in future.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：シグナル伝達 プロテオーム リン酸化 キナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

がん分子標的治療に向けたキナーゼ阻害薬の開発は世界中で活発に行われており、キナーゼ活性を有するがん遺伝子産物を標的としたがん分子標的治療薬が次々と承認されている。これらのキナーゼ阻害薬は複数標的に作用する場合が多く、その複雑な作用機序を完全に明らかにすることは容易ではない。特に開発早期段階では詳細な作用機序は解明されていないことも多い。これは、がん細胞内シグナル伝達ネットワークが複雑であり、かつ個別の細胞によって異なる活性化プロファイルを示すからである。がん分子標的創薬を強力に推進していくためには、細胞内シグナル伝達ネットワーク全体を定量的に俯瞰できる方法の確立が強く求められている。代表者らは細胞内シグナル伝達ネットワークの鍵反応であるキナーゼ・ホスファターゼによるリン酸化修飾可逆反応に注目し、特異的リン酸化ペプチド濃縮法HAMMOCと液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC/MS)を駆使した独自のリン酸化プロテオーム解析法を開発した。現在までに代表者らは、90,596個のヒトタンパク質リン酸化部位と14,271リン酸化タンパク質を同定しているが、このようなリン酸化プロテオミクスの高性能化による新規分子の大量同定により、既存のパスウェイ解析では対応できなくなってきた。そこで、様々な標的既知のキナーゼ阻害薬を用いて得られるリン酸化摂動プロファイルのリファレンスとして集積し、標的未知化合物のリン酸化摂動プロファイルと照合することにより、その作用機序を予測することが可能となるのでは、と考えた。さらにそれぞれのリン酸化サイト間の変動プロファイル類似性を解析することにより、細胞内リン酸化ネットワーク構成因子の相互関係に関わる情報を大量に明らかにできる可能性があり、これらの情報は分子標的創薬や分子標的治療の基盤となる新たな知見を提供できるのではと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では細胞内リン酸化ネットワークの分子基盤を解明することを目的とし、組換えキナーゼと組織細胞抽出物を用いた *in vitro* リン酸化反応解析・相互作用解析に加え、様々なキナーゼ阻害薬やキナーゼ siRNA によって攪乱される *in vivo* リン酸化ネットワークの選択的変動をプロテオーム規模で解析することにより、リン酸化ネットワーク構成分子の相互関係を明らかにする。本研究から得られる大規模リン酸化プロファイル情報は、リン酸化異常を伴うがんの分子標的創薬の基盤データベースとなる。

### 3. 研究の方法

キナーゼ阻害薬やキナーゼ siRNA を用いた摂動による細胞内リン酸化変動データのHAMMOC-LC/MS法による大規模取得をベ

ースに、*in vitro* キナーゼアッセイと組み合わせデータマイニングし、リン酸化ネットワークを構築し、細胞内リン酸化ネットワークの分子基盤を明らかにする。

#### (1) 摂動による細胞内リン酸化変動データの大規模取得

2種類の市販分子標的薬(gefitinib および lapatinib)を用いた予備検討をすでに行っており、標的分子阻害濃度 IC50 値の 1/10 - 10 倍の濃度範囲で、処理時間は 5-30 分で良好なデータ取得が行える目安がついている。定量法としては、SILAC 法もしくは dimethyl ラベル法を用いる予定であり、データ解析ツールも研究室内で確立しており、技術的障害はない。現在市販されている分子標的薬、臨床開発中の化合物およびキナーゼ阻害試薬として入手可能な化合物について、既知情報を精査し、数十種程度の分子標的化合物を選定・入手・ライブラリー化する。HAMMOC-LC/MS 法においては多検体処理能力を最大化したリン酸化プロテオミクス測定系を構築し、数十種の分子標的化合物による *in vivo* リン酸化プロファイルの測定を開始する。同様に、市販のキナーゼ siRNA ライブラリーを用いて試料を調製し、そのリン酸化変動プロファイルを取得する。すでに予備実験として HeLa 細胞におけるキナーゼノックダウン試料抽出タンパク質 0.1 mg を調製し、数千種のリン酸化ペプチド変動データからそのキナーゼを含む 24 遺伝子のリン酸化が有意に変動しているデータを得ている。

#### (2) 細胞試料と組換えキナーゼを用いた *in vitro* リン酸化解析

摂動実験で選択した細胞株を用いて、組換えキナーゼ 350 種について *in vitro* リン酸化実験を行う。実験条件をさらに最適化し、より多くの基質配列情報を取得し、詳細なモチーフ情報を取得する。

#### (3) リン酸化ネットワーク分子基盤解析法の確立

上記で得られた情報を用いて細胞内のキナーゼ-基質予測に基づくネットワーク構築法の確立を目指す。(1)で取得したデータを用いてクラスター解析を含めた様々な統計解析を行い、予備実験で得られた標的分子毎のリン酸化プロファイルが得られることを確認する。さらに、グルーピングされたリン酸化サイト情報と(2)で取得した *in vitro* データを比較し、キナーゼ-基質ペア候補を抽出する。さらにそれらのペアをタンパクタンパク相互作用データベース等の公共情報との重なりを調べる。それとともに摂動の種類間でのクラスター解析もすすめ、標的分子の類似性についても検討する。別に、リン酸化プロファイルを構成する具体的な分子情報を切り離して、摂動の種類 fingerprint としてリン酸化プロファイルを用いる方法もバ

ックアップとして検討する。また、ネットワークマップに基づき、定量的リン酸化プロテオミクスデータを入力として、変動経路を特定するネットワーク解析ソフトウェアの開発にも着手する。取得したリン酸化プロファイルやネットワーク解析ソフトウェアは公開サーバーを通じて外部に公開するので、そのためのサーバーの整備を行う。

#### 4. 研究成果

まずは、*in vitro* キナーゼアッセイ系に着目し、より広域かつ詳細な基質プロファイルを同定することを目標に、LC-MS/MS と *in vitro* リン酸化反応の組み合わせ実験系を構築した。cAMP 依存性 A キナーゼ (PKA)、細胞外シグナル調節キナーゼ 1 (ERK1)、および、RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT1) の3種のセリン-トレオニンキナーゼを用いて検討を行ったところ、3585種、4347種および1778種のリン酸化部位をそれぞれ同定することができた。これらは現在知られている基質の約10倍に相当するものであり、これにより配列類似性の高いPKAとAKT1もモチーフレベルで区別することが可能となった(論文)。このように取得した基質モチーフを細胞内キナーゼ-基質同定に適用可能であるかを検討するため、キナーゼとしてPCTK1を選びHeLa細胞に対し、siRNA処理および過剰発現させ、細胞内のリン酸化変動を定量リン酸化プロテオミクスで計測するとともに、組換えPCTK1とHeLa細胞由来のタンパク質を*in vitro*キナーゼ反応させ、*in vitro*基質の同定およびモチーフ抽出を行った。その結果、細胞内でキナーゼ発現量にもなってリン酸化が変動し、かつキナーゼ基質としてモチーフ配列が一致するものを15種まで絞り込むことができた。さらに15種のsiRNA実験を行い、PCTK1-siRNAと同様のフェノタイプが観測されたものとしてKAP0を基質として同定した。KAP0は*in vitro*基質そのものとして同定されており、本法の有用性を示すことができた(論文)。同様にキナーゼPik1についても生理的基質リン酸化サイトであるvimentin-S459を新たに同定した(論文)。

本法の更なる一般化と高性能化をめざし、既知情報が豊富なPKAをモデルに検討を行った。基質候補とモチーフとの一致度を定量的にスコア化するべく、いくつかのパラメータを検討した結果、モチーフ抽出時に得られるfold-increase (FINC)あるいはモチーフそのものの表現型であるPSSMとの一致度をスコアに用いることにより、既知基質同定におけるSpecificity-Sensitivity ROC解析においてAUC > 0.8の高い確率で基質を予測することがわかった。これはPKAだけでなくAKT1, ERK2についても同様であった。生理的な基質同定にも適用可能かを検証するため、PKAに対する阻害薬および作動薬で処理した細胞におけるリン酸化プロテオーム変動をSILAC法により定量計測した。SILAC変動とFINC/PSSMス

コアの相関をみたところ、既知基質は高い相関を示しており、さらに未知の基質候補分子6種を抽出することができた。これらについて*in vitro*キナーゼアッセイを行ったところ、すべてPKAにより直接リン酸化されることがわかった。

次にリン酸化プロテオミクス計測系の効率化、高機能化を検討した。メートル長モノリスシリカキャピラリーカラムを用いて10時間グラジエントをかけてLC-MS解析を行うことにより、1回の測定で約10,000リン酸化ペプチドを解析することが可能となった。さらに通常のLCMS測定では解析しづらいチロシンリン酸化ペプチドおよびマルチリン酸化ペプチドについても、それぞれを選択的に濃縮する方法を開発した。チロシンはHAMMOC法とチロシンリン酸化抗体による免疫沈降法を直列に配置することにより、同定率を10倍以上向上させることに成功した。またマルチリン酸化ペプチドについてはHAMMOC法において、溶出溶媒にメチルホスホン酸を用いることで選択的にモノリン酸化ペプチドを溶出させることができることを見出し、2段階溶出によりマルチリン酸化ペプチドの同定率を向上させた(論文投稿中)。さらには各リン酸化サイトにおけるリン酸化率を大規模に定量できる手法を世界で初めて開発し、培養細胞の基底状態におけるリン酸化率の分布について解析した(論文)。本手法を細胞抽出物を基質プールとして用いた*in vitro*キナーゼアッセイに適用し、リン酸化率と各モチーフの関係を調べたところ、FINC/PSSMスコアとリン酸化率の間には正の相関が認められた。このことは、FINC/PSSMスコアの妥当性がリン酸化率の点からも支持されていることを示す。

最後に、リン酸化プロテオーム情報とモチーフ情報からリン酸化ネットワーク全体を定量するためのシステムの検討をおこなった。*In vitro*キナーゼアッセイから得られるモチーフ情報に加えてタンパク質間相互作用情報(PPI, STRING-DBより入手)を用い、摂動による細胞内のリン酸化プロテオーム変動をネットワークレベルでキナーゼ群に収束させる方法を構築した。検証実験として、HeLa細胞をEGFで刺激し、そのリン酸化変動データを取得した。モチーフとPPIを用いた手法を適用したところ、変動すると予測された21種のキナーゼのうち15種が実際に変動していることがわかった。またすでにリン酸化が報告されている基質候補分子の情報を加味すると、KEGGのErbB/MAPKパスウェイに登録されているほぼすべてのキナーゼを予測することが可能であった。本システムを異なる標的をもつキナーゼ阻害薬9種に適用した。定量リン酸化プロテオミクスにより計測後、上記手法を用いてリン酸化プロテオーム情報をキノーム情報に変換したところ、それぞれの阻害薬が持つキナーゼ阻害プロファイルと相関が認められた。さらにキノ

ーム情報に対してパスイエイ濃縮解析にかけたところ、阻害キナーゼ下流のパスイエイに対する変動を同定することが可能であった。本系をさらに発展させ、メートル長モノリスシリカカラムと 10 種の安定同位体定量タグ (TMT-10-plex) を組み合わせ、より多検体測定が可能なシステムを構築し、16 種の分子標的薬評価を行ったところ、1 種の分子標的薬あたり 1 時間で約 9000 種のリン酸化サイトの変動に基づくプロファイリングを行うことに成功した。

本研究では、in vitro キナーゼ大規模アッセイに基づく精度の高いキナーゼ基質モチーフ取得とそれを用いた基質予測スコアリング法の開発に成功した。また、定量リン酸化プロテオミクスの高性能化も順調に進展し、細胞内キナーゼに対する摂動から得られるリン酸化変動からキナーゼ基質を同定・推定し、さらにはリン酸化プロテオーム変動をキナーゼ変動に変換することにも成功した。測定系のスループットもマルチプレックス定量タグの導入により 1 測定あたりに要する時間は 1 時間と実用的であり、今後さらに大規模なデータを取得することにより、細胞内リン酸化ネットワークの分子基盤解明の進展が期待される。

#### 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 21 件)

C.F. Tsai, Y.T. Wang, H.Y. Yen, C.C. Tsou, W.C. Ku, P.Y. Lin, H.Y. Chen, A.I. Nesvizhskii, Y. Ishihama, and Y.J. Chen. 2015. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. *Nat Commun.* 6: 6622. DOI: 10.1038/ncomms7622

S.R. Piersma, J.C. Knol, I. de Reus, M. Labots, B.K. Sampadi, T.V. Pham, Y. Ishihama, H.M. Verheul, and C.R. Jimenez. 2015. Feasibility of label-free phosphoproteomics and application to base-line signaling of colorectal cancer cell lines. *J. Proteomics.* in press. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.03.019

K. Masuda, T. Chiyoda, N. Sugiyama, A. Segura-Cabrera, Y. Kabe, A. Ueki, K. Banno, M. Suematsu, D. Aoki, Y. Ishihama, H. Saya, and S. Kuninaka. 2015. LATS1 and LATS2 Phosphorylate CDC26 to Modulate Assembly of the Tetratricopeptide Repeat Subcomplex of APC/C. *PLoS One.* 10: e0118662. DOI: 10.1371/journal.pone.0118662

S. Iwano, A. Satou, S. Matsumura, N. Sugiyama, Y. Ishihama, and F. Toyoshima. 2015. PCTK1 regulates integrin-dependent

spindle orientation via protein kinase A regulatory subunit KAP0 and myosin X. *Mol Cell Biol.* 35: 1197-208. DOI: 10.1128/MCB.01017-14

Y. Zhou, T. Tanaka, N. Sugiyama, S. Yokoyama, Y. Kawasaki, T. Sakuma, Y. Ishihama, I. Saiki, and H. Sakurai. 2014. p38-Mediated phosphorylation of Eps15 endocytic adaptor protein. *FEBS Lett.* 588: 131-7.S0014-5793(13)00854-5. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.020

M. Wakabayashi, H. Yoshihara, T. Masuda, M. Tsukahara, N. Sugiyama, and Y. Ishihama. 2014. Phosphoproteome analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections mounted on microscope slides. *J Proteome Res.* 13: 915-24. DOI: 10.1021/pr400960r

K. Shiba-Fukushima, T. Arano, G. Matsumoto, T. Inoshita, S. Yoshida, Y. Ishihama, K.Y. Ryu, N. Nukina, N. Hattori, and Y. Imai. 2014. Phosphorylation of Mitochondrial Polyubiquitin by PINK1 Promotes Parkin Mitochondrial Tethering. *PLoS Genet.* 10: e1004861. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004861

H. Kume, S. Muraoka, T. Kuga, J. Adachi, R. Narumi, S. Watanabe, M. Kuwano, Y. Kodera, K. Matsushita, J. Fukuoka, T. Masuda, Y. Ishihama, H. Matsubara, F. Nomura, and T. Tomonaga. 2014. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis. *Mol Cell Proteomics.* 13: 1471-84.M113.037093. DOI: 10.1074/mcp.M113.037093

Y. Ishihama, and K. Imami. 2014. [Quantitation of cellular phosphorylation dynamics by phosphoproteomics approaches]. *Yakugaku Zasshi.* 134: 521-7. DOI: 10.1248/yakushi.13-00251-4

H. Imamura, N. Sugiyama, M. Wakabayashi, and Y. Ishihama. 2014. Large-scale identification of phosphorylation sites for profiling protein kinase selectivity. *J Proteome Res.* 13: 3410-9. DOI: 10.1021/pr500319y

K. Ikawa, A. Satou, M. Fukuhara, S. Matsumura, N. Sugiyama, H. Goto, M. Fukuda, M. Inagaki, Y. Ishihama, and F. Toyoshima. 2014. Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle.* 13: 126-37.26866 DOI: 10.4161/cc.26866

K. Horie, T. Kamakura, T. Ikegami, M. Wakabayashi, T. Kato, N. Tanaka, and Y. Ishihama. 2014. Hydrophilic interaction

- chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS. *Anal Chem.* 86: 3817-24. DOI: 10.1021/ac4038625
- M., S. Matsumura, A. Satou, C. Takahashi, Y. Oda, C. Higashiura, Y. Ishihama, and F. Toyoshima. 2014. Pregnenolone Functions in Centriole Cohesion during Mitosis. *Chem Biol.* 21: 1707-21.S1074-5521(14)00412-8. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.11.005
- R. Yamana, M. Iwasaki, M. Wakabayashi, M. Nakagawa, S. Yamanaka, and Y. Ishihama. 2013. Rapid and Deep Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Proteome by One-shot NanoLC-MS/MS Analysis with Meter-scale Monolithic Silica Columns. *J Proteome Res.* 12: 214-21. DOI: 10.1021/pr300837u
- Y. Araki, W.C. Ku, M. Akioka, A.I. May, Y. Hayashi, F. Arisaka, Y. Ishihama, and Y. Ohsumi. 2013. Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J Cell Biol.* 203: 299-313.jcb.201304123 DOI: 1083/jcb.201304123
- M. Iwasaki, Y. Ishihama. 2014. Challenges Facing Complete Human Proteome Analysis. *Chromatography.* 35: 73-80. DOI: 10.15583/jpchrom.2014.013
- D. Inoue, I. Kimura, M. Wakabayashi, H. Tsumoto, K. Ozawa, T. Hara, Y. Takei, A. Hirasawa, Y. Ishihama, and G. Tsujimoto. 2012. Short-chain fatty acid receptor GPR41-mediated activation of sympathetic neurons involves synapsin 2b phosphorylation. *FEBS Lett.* 586: 1547-54.S0014-5793(12)00310-9. DOI: 1016/j.febslet.2012.04.021
- K. Imami, N. Sugiyama, H. Imamura, M. Wakabayashi, M. Tomita, M. Taniguchi, T., M. Toi, and Y. Ishihama. 2012. Temporal profiling of lapatinib-suppressed phosphorylation signals in EGFR/HER2 pathways. *Mol Cell Proteomics.* 11: 1741-57.M112.019919. DOI: 10.1074/mcp.M112.019919
- C.W. Hu, M.H. Lin, H.C. Huang, W.C. Ku, T.H. Yi, C.F. Tsai, Y.J. Chen, N. Sugiyama, Y. Ishihama, H.F. Juan, and S.H. Wu. 2012. Phosphoproteomic analysis of *Rhodospseudomonas palustris* reveals the role of pyruvate phosphate dikinase phosphorylation in lipid production. *J Proteome Res.* 11: 5362-75. DOI: 10.1021/pr300582p
- M. Helmy, N. Sugiyama, M. Tomita, and Y. Ishihama. 2012. Mass spectrum sequential subtraction speeds up searching large peptide MS/MS spectra datasets against large nucleotide databases for proteogenomics. *Genes Cells.* 17: 633-44. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01615.x
- 21 T. Chiyoda, N. Sugiyama, T. Shimizu, H. Naoe, Y. Kobayashi, J. Ishizawa, Y. Arima, H. Tsuda, M. Ito, K. Kaibuchi, D. Aoki, Y. Ishihama, H. Saya, and S. Kuninaka. 2012. LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol.* 197: 625-41.jcb.201110110. DOI: 10.1083/jcb.201110110
- 〔学会発表〕(計 23 件)
- 敷田奈都紀、佐藤綾香、若林真樹、杉山直幸、石濱泰、定量的リン酸化プロテオミクスを用いたプロテインキナーゼのリン酸化修飾と活性に関する研究、日本薬学会第135年会、2015/03/25-28、神戸サンポーホールエリア(兵庫県神戸市)
- 小形公亮、矢崎達也、林侑生、若林真樹、杉山直幸、石濱泰、モチーフターゲットリン酸化プロテオミクスによる分子標的薬の評価、日本薬学会第135年会、2015/03/25-28、神戸サンポーホールエリア(兵庫県神戸市)
- 石濱泰、翻訳後修飾プロテオミクスと分子標的創薬、日本薬学会第135年会、2015/03/25-28、神戸学院大学(兵庫県神戸市)
- Yasushi Ishihama, Challenges Facing Complete Human Proteome Analysis, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, 2014/12/07-10, Funai Tetsuro Auditorium Kyoto University at Katsura (京都府京都市)
- 林侑生、若林真樹、杉山直幸、石濱泰、定量的リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的薬プロファイリング、第37回日本分子生物学会年会、2014/11/25-27、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 石濱泰、深化するHigh Resolution LC-MSとプロテオミクスへの応用、第86回日本生化学会大会、2014/10/15-18、国立京都国際会館(京都府、京都市)
- Shunsuke Takagi, Tatsuya Yazaki, Kosuke Ogata, Masaki Wakabayashi, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, Motif-targeting phosphopeptide enrichment for quantitative phosphoproteome analysis, 13th Human Proteome Organization World Congress, 2014/10/05-08, Centro de Convenciones Norte, IFEMA (Madrid, Spain).
- Naoyuki Sugiyama, Haruna Imamura, Pasrawin Taechawattananant, Dai Sakamoto, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Monitoring Kinome Activities Using the Highly Specific and Sensitive Substrate Peptides, 13th Human Proteome

Organization World Congress, 2014/10/05-08, Centro de Convenciones Norte, IFEMA (Madrid, Spain).

石濱泰, 深化するプロテオミクスLC-MS, 日本分析化学会第63年会, 2014/09/17-19, 広島大学東広島キャンパス (広島県東広島市)

若林真樹, Jordan T Aerts, Stanislav S Rubakhin, 石濱泰, Jonathan V Sweedler, 単一細胞プロテオーム解析への挑戦, 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014/08/20-21, 帝京大学板橋キャンパス (東京都板橋区)

Yasushi Ishihama, High Resolution LC coupled with High Resolution MS for In-Depth Proteomics, 11th International Symposium on Mass Spectrometry in the Health & Life Sciences: Molecular & Cellular Proteomics, 2014/08/17-21, Hotel Nikko San Francisco (San Francisco, CA, USA)

小椋麻由, 若林真樹, 杉山直幸, 石濱泰, ホルマリン固定パラフィン包埋検体等の組織試料に対する定量的リン酸化プロテオーム解析法の開発, 日本プロテオーム学会2014年会, 2014/07/17-18, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

林侑生, 若林真樹, 杉山直幸, 石濱泰, 定量的リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的薬プロファイリング, 日本プロテオーム学会2014年会, 2014/07/17-18, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

矢崎達也, 高木俊輔, 若林真樹, 杉山直幸, 石濱泰, 定量リン酸化プロテオミクスによる標的パスウェイのリン酸化動態解析, 第62回質量分析総合討論会, 2014/05/14-16, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)

石濱泰, 高深度プロテオミクスを用いたキヌームリン酸化シグナリング, 大阪大学蛋白質研究所セミナー: キナーゼシグナリング, 2014/03/14-15, 大阪大学蛋白質研究所 (大阪府吹田市)

N. Sugiyama, S. Yoshida, M. Iwasaki, M. Wakabayashi, and Y. Ishihama, Unveiling Phosphoproteome by pY-Enhanced Phosphopeptide Enrichment Coupled with High Resolution Capillary LC-MS, HUPO 12th Annual World Congress, 2013/09/14-18, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Y. Hayashi, S. Ichihara, M. Wakabayashi, N. Sugiyama, and Y. Ishihama, Deep Profiling of Molecular-Targeted Drugs by One-Shot Quantitative Phosphoproteomics, HUPO 12th Annual World Congress, 2013/09/14-18, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

S. Tamaki, H. Imamura, M. Tomita, N. Sugiyama, and Y. Ishihama, Prediction of

Phosphorylated Residues Based on Machine Learning Technique and Large Scale Phosphoproteomics Experiment, HUPO 12th Annual World Congress, 2013/09/14-18, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

林侑生, 市原駿, 小椋麻由, 吉田繁治, 若林真樹, 杉山直幸, 石濱泰, 定量的リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的薬プロファイリング, 日本薬学会第133年会, 2013/03/30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

石濱泰, リン酸化プロテオミクスを用いた細胞内リン酸化ネットワークの解明, 日本薬学会第133年会, 2013/03/29, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

21 N. Sugiyama, M. Gouda, H. Imamura, M. Tomita, and Y. Ishihama, Profiling of Human Kinome using *in vitro* Kinase Assay in combination with Quantitative Phosphoproteomics, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012/09/21, 京都国際会館 (京都府京都市)

22 M. Wakabayashi, A. Sato, M. Iwasaki, N. Sugiyama, and Y. Ishihama, In-depth pharmaco-phosphoproteomics using meter-long monolithic columns to evaluate molecular-targeting drugs, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012/09/19, 京都国際会館 (京都府京都市)

23 N. Sugiyama, M. Gouda, H. Imamura, M. Tomita, and Y. Ishihama, Kinase-substrate networks based on *in vitro* kinase profiling combined with quantitative phosphoproteomic approach, HUPO 11th Annual World Congress, 2012/09/10, Hynes Convention Center (Boston, USA).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石濱 泰 (ISHIHAMA, Yasushi)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 30439244

### (2)研究分担者

杉山 直幸 (SUGIYAMA, Naoyuki)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号: 50545704

### (3)連携研究者

豊島 文子 (TOYOSHIMA, Fumiko)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号: 40397576

若林 真樹 (WAKABAYASHI, Masaki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 70552024