

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830125

研究課題名(和文)チロシンリン酸化の大規模計測によるシグナル伝達ネットワーク解析

研究課題名(英文) Analysis for Signaling Networks by Large-scale Monitoring of Phosphorylated Tyrosines

研究代表者

杉山 直幸 (Sugiyama, Naoyuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50545704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チロシン残基のリン酸化の解析に焦点を当てて、リン酸化チロシン含有ペプチドを選択的に濃縮する手法を開発し、細胞内で起きているチロシンリン酸化の大規模解析およびそのデータに基づくシグナル伝達ネットワーク解析を行った。

従来のリン酸化ペプチド濃縮法である酸化金属クロマトグラフィー法と抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降、あるいは組み換えチロシンキナーゼを用いた *in vitro* リン酸化を組み合わせた方法の開発により、生体試料における大規模なリン酸化チロシンの同定に成功した。これらの方法を用いて、がんの分子標的薬の作用評価を行い、薬物処理によって変動するリン酸化部位の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, a highly selective method for phosphotyrosine (pY)-containing peptides was developed to comprehensively identify pYs and analyze cellular signaling networks based on the data.

By a combination use of metal oxide chromatography and immunoprecipitation using anti-pY antibody or *in vitro* kinase reaction with recombinant tyrosine kinases, phosphotyrosines in biological samples were successfully identified in large scale. Using this approach, molecular-targeting agents of a cancer were evaluated and regulated phosphorylated sites were determined.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオーム シグナル伝達 リン酸化プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼやホスファターゼによるタンパク質の可逆的リン酸化反応は、細胞内のシグナル伝達において重要な役割を果たしている。キナーゼの過剰発現や調節損失によるシグナル伝達の異常な活性化は、多くの疾患に関連しており、タンパク質のリン酸化を介したシグナル伝達メカニズムを観測することは生命現象の理解のみならず、疾患の診断や治療、創薬研究を行う上でも非常に有用である。

近年、質量分析計を用いたタンパク質のリン酸化の大規模解析によるシグナル伝達解析が様々な研究で用いられるようになった。一つのタンパク質のリン酸化の挙動だけではなく、細胞内の全リン酸化タンパク質(リン酸化プロテオーム)を同時に観測することにより、新規なシグナル伝達経路や制御機構の発見といった知見が得られている。

このようなリン酸化タンパク質の大規模計測を可能とした要素の一つに、リン酸化タンパク質やペプチドの選択的濃縮法の開発が挙げられる。化学量論的に見て、リン酸化修飾されたタンパク質は非修飾タンパク質と比較して極めて少ないことから、大規模なリン酸化プロテオーム情報を効率よく取得する為には、あらかじめリン酸化タンパク質/ペプチドを選択的に濃縮する必要がある。リン酸化ペプチド濃縮法として、抗体を用いた免疫沈降、金属イオンや酸化金属を用いたアフィニティークロマトグラフィー法がリン酸化プロテオーム解析に広く用いられている。

研究代表者らはこれまでにヒドロキシ酸共存化で酸化金属クロマトグラフィーを行う手法(Hydroxy Acid Modified Metal Oxide Chromatography; HAMMOC法)を開発している(図1左上)。大過剰のヒドロキシ酸が競合剤として働く事で非リン酸化ペプチドの吸着を抑制することができ、既存の手法と比較してリン酸化ペプチドに対する選択性や回収率において大幅な向上が見られた。HAMMOC法を用いて、世界で初めて生体試料から前分画を行わずに数千個のリン酸化ペプチドを同定することに成功した。また、ヒトの全キナーゼの約70%に相当する354キナーゼについて、組替え体キナーゼを用いて*in vitro*反応試験を行った。HAMMOC法によりリン酸化された基質タンパク質及びその部位を同定し、各キナーゼのリン酸化モチーフ情報を取得している。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)リン酸化チロシン含有ペプチドを選択的に濃縮する手法の開発と、その手法を用いて、(2)細胞内で起きているチロシンリン酸化の大規模計測およびシグナル伝達ネットワーク解析を行う。

(1)リン酸化チロシン含有ペプチド濃縮法の開発

免疫沈降法、酸化金属を用いたアフィニティークロマトグラフィー法、化学反応によるリン酸化セリン/スレオニンの選択的脱リン酸化法を組み合わせ、リン酸化チロシン含有ペプチドを選択的に濃縮する手法を開発する。現在、HAMMOC法を用いることで、100 $\mu$ gのタンパク質に相当する細胞抽出物から、約10,000種類のリン酸化ペプチドの同定が可能となっている。しかし、その内、リン酸化チロシン含有ペプチドの同定数はわずかに数百個程度である。予備的な検討として、HAMMOC法と抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫沈降法を併用した結果、単独使用時と比べてリン酸化チロシン含有ペプチドに対して10倍以上の濃縮効率を得られた。本研究では、強塩基処理によるリン酸化セリン/スレオニンの脱離の併用や濃縮条件の最適化を行うことにより、リン酸化チロシン含有ペプチドの同定数をさらに向上させる。具体的には無刺激状態の細胞に対して1,000個以上のリン酸化チロシンサイトの同定を目標とする。

(2)リン酸化チロシンの大規模計測およびシグナル伝達ネットワーク解析

開発したリン酸化チロシン含有ペプチド濃縮法を用いて、培養細胞中の大規模なリン酸化チロシン解析を行い、情報を取得する。同時に従来のリン酸化プロテオーム解析手法によりリン酸化セリン/スレオニンの情報も取得する。様々な摂動実験後のリン酸化プロテオームデータとこれまでに得ているキナーゼのリン酸化モチーフ情報を用いた責任キナーゼ予測からシグナル伝達ネットワークの構築を行う。

## 3. 研究の方法

(1)リン酸化チロシン含有ペプチド濃縮法の開発

酸化金属クロマトグラフィーによるリン酸化ペプチド全般の高選択的濃縮、免疫沈降法によるリン酸化チロシン含有ペプチドの濃縮、および脱離によるリン酸化セリン/スレオニンの脱リン酸化を組み合わせ、リン酸化チロシン含有ペプチドを高選択的に濃縮する手法を開発する。セリン、スレオニン、またはチロシンがリン酸化されている短鎖のペプチドの配列の一部をランダム化した合成リン酸化ペプチドを試料として、様々な条件下で酸化金属クロマトグラフィーにより濃縮実験を行う。

(2)リン酸化チロシンの大規模計測およびシグナル伝達ネットワーク解析

様々な摂動実験におけるリン酸化プロテオーム解析の集積と予測キナーゼ-基質間情報から、シグナル伝達ネットワークの構築を行う。これまでの研究で取得した、ヒトキナーゼの*in vitro*反応試験における基質情報を用いて、キナーゼ-基質間情報の予測を行い、予測リン酸化ネットワークと上記の摂動実験におけるリン酸化プロテオーム解析結

果から、連動して変動が見られるリン酸化ネットワークを抽出することで有意性の高いリン酸化ネットワークを構築する。

#### 4. 研究成果

##### (1) リン酸化チロシン含有ペプチド濃縮法の開発

最初に、酸化金属クロマトグラフィーを用いたリン酸化ペプチド濃縮によって、リン酸化チロシンを含むペプチドを選択的に濃縮することが可能な方法の開発を行った。吸着・溶出時の溶媒の種類や pH を変えて検討したが、有意な選択性の変化は観測されなかった。一方、リン酸化ペプチド濃縮に用いる酸化チタニウムや酸化ジルコニウムを別の酸化金属や金属化合物に変えて評価したところ、リン酸化チロシンに対する選択性が向上した担体が見いだされたが、リン酸化ペプチドの回収率が低下した。現時点では、酸化金属クロマトグラフィー単独でチロシンリン酸化を大規模に同定するための効率的な方法の確立に至っていない。

別法として、抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降と酸化金属クロマトグラフィーを組み合わせた方法によるリン酸化チロシン含有ペプチドの濃縮を行った(図1)。また、酸化金属クロマトグラフィーによるリン酸化ペプチド濃縮後に強塩基処理によるリン酸基の脱離を行うことで、セリン、スレオニンを脱リン酸化し、リン酸化チロシンを選択的に濃縮する方法も行った。これらの手法を用いることで、培養細胞から数千サイト以上のリン酸化チロシンの同定に成功した。また、濃縮したリン酸化ペプチドを脱リン酸化処理後にチロシンキナーゼ組換え体の添加による再リン酸化を行うモチーフターゲット法を開発し、生理的にリン酸化されていたと考えられるリン酸化チロシンの大規模同定に成功した。さらにモチーフターゲット法に最適なチロシンキナーゼの組み合わせの検討を行い、3種の基質特異性が異なるキナーゼを用いた *in vitro* 反応試験を行うことで、細胞破碎物から1,000個以上のリン酸化チロシンの同定に成功した。

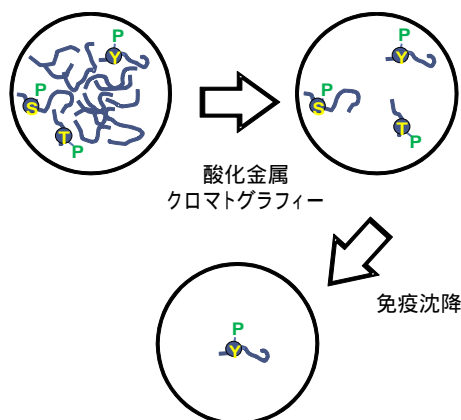


図1 リン酸化チロシンの濃縮

##### (2) リン酸化チロシンの大規模計測およびシグナル伝達ネットワーク解析

上述の免疫沈降と酸化金属クロマトグラフィーを組み合わせた方法を用いて、マウス由来の13種の組織について、リン酸化チロシンを含むリン酸化プロテオームデータを取得した。50個のチロシンキナーゼ自身のリン酸化を含む計1,123個のリン酸化チロシンを同定した(各組織につき数百~500部位)。特に脳において、組織特異的なリン酸化部位が多く観測された。

また、リン酸化チロシン濃縮法と従来のリン酸化プロテオーム解析法を用いて、キナーゼ阻害薬処理を行ったヒト培養細胞と未処理の細胞におけるリン酸化タンパク質の定量解析を行い、薬物処理によってリン酸化レベルが変動するリン酸化チロシンおよびセリン、スレオニンを同定した(図2)。8種のキナーゼ阻害薬について評価を行い、それぞれの薬物においてプロテインキナーゼやホスファターゼの活性制御に重要と考えられているリン酸化部位が特徴的に変動していることの観測に成功した。

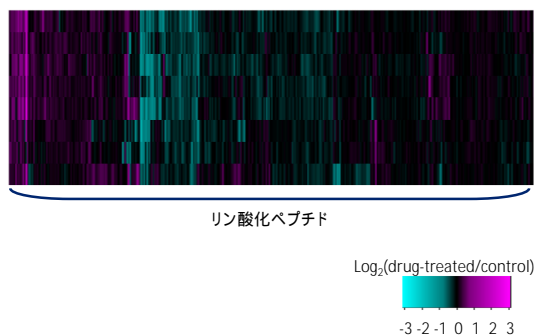


図2 薬物処理によるリン酸化の変動

次にヒトキナーゼ組換え体を用いた *in vitro* 試験で同定されたキナーゼ基質及び、タンパク質間相互作用情報 (STRING; <http://string-db.org/>) から生理的条件下におけるキナーゼ-基質間情報の予測を行った。薬物処理によって不活性化されたキナーゼ群の予測を行い、クラスタリングを行った。その結果、標的キナーゼが同一であるキナーゼ阻害薬間に高い相同性が見られた。

#### 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 8 件)

Sugiyama N, Ishihama Y, Large-Scale Profiling of Protein Kinases for Cellular Signaling Studies by Mass Spectrometry and Other Techniques, J Pharm Biomed Anal, in press, doi:10.1016/j.jpba.2016.05.046. 査読有

Wagih O, Sugiyama N, Ishihama Y, Beltrao P. Uncovering Phosphorylation-Based Specificities through Functional Interaction Networks. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Jan;15(1):236-45. doi: 10.1074/mcp.M115.052357. 査読有

Itaba N, Matsumi Y, Okinaka K, Ashla AA, Kono Y, Osaki M, Morimoto M, Sugiyama N, Ohashi K, Okano T, Shiota G. Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice. *Sci Rep*. 2015 Nov 10;5:16169. doi: 10.1038/srep16169. 査読有

Wakabayashi M, Kyono Y, Sugiyama N, Ishihama Y. Extended Coverage of Singly and Multiply Phosphorylated Peptides from a Single Titanium Dioxide Microcolumn. *Anal Chem*. 2015 Oct 20;87(20):10213-21. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01216. 査読有

Lin MH, Sugiyama N, Ishihama Y. Systematic profiling of the bacterial phosphoproteome reveals bacterium-specific features of phosphorylation. *Sci Signal*. 2015 Sep 15;8(394):rs10. doi: 10.1126/scisignal.aaa3117. 26373674. 査読有

Masuda K, Chiyoda T, Sugiyama N, Segura-Cabrera A, Kabe Y, Ueki A, Banno K, Suematsu M, Aoki D, Ishihama Y, Saya H, Kuninaka S. LATS1 and LATS2 phosphorylate CDC26 to modulate assembly of the tetratricopeptide repeat subcomplex of APC/C. *PLoS One*. 2015 Feb 27;10(2):e0118662. doi: 10.1371/journal.pone.0118662. 査読有

Iwano S, Satou A, Matsumura S, Sugiyama N, Ishihama Y, Toyoshima F. PCK1 regulates integrin-dependent spindle orientation via protein kinase A regulatory subunit KAP0 and myosin X. *Mol Cell Biol*. 2015 Apr;35(7):1197-208. doi:10.1128/MCB.01017-14. 査読有

Imamura H, Sugiyama N, Wakabayashi M, Ishihama Y. Large-scale identification of phosphorylation sites for profiling protein kinase selectivity. *J Proteome Res*. 2014 Jul 3;13(7):3410-9. doi: 10.1021/pr500319y. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

杉山 直幸、大規模プロテオミクスのための解析ワークフローと統合データベース(jPOST) 京都大学宇治おうばくプラザ(京都、宇治) 招待講演、2015年10月29日

Naoyuki Sugiyama, Kosuke Ogata, Tatsuya Yazaki, Yuu Hayashi, Shunsuke Takagi, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Evaluation of Protein Kinase Inhibition Using Motif-Targeting Phosphoproteomics, 14<sup>th</sup> Human Proteome Organization World Congress (HUPO2015), Vancouver (Canada), ポスター, Sep 28, 2015

小形公亮、矢崎 達也、若林 真樹、杉山 直幸、石濱 泰、日本プロテオーム学会、くまもと森都心プラザ(熊本、熊本) ポスター、2015年7月24日

杉山 直幸、坂本 大、今村 春菜、Pasrawin Taechawattananant、若林真樹、石濱 泰、高選択的基質ペプチドを用いたキノーム活性測定、日本プロテオーム学会、くまもと森都心プラザ(熊本、熊本) 口頭、2015年7月24日

Naoyuki Sugiyama, Haruna Imamura, Pasrawin Taechawattananant, Dai Sakamoto, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Monitoring Kinome Activities Using the Highly Selective Substrate Peptides, 13<sup>th</sup> Human Proteome Organization World Congress, Madrid (Spain), ポスター, Oct 6, 2014

杉山 直幸、プロテオミクスのデータ処理法とツール、日本プロテオーム学会2014年会、つくば国際会議場(つくば) 口頭、2014年7月17日

〔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〕

ホームページ:

京都大学大学院薬学研究科 石濱研究室

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし