

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770219

研究課題名(和文) イノシトールリン脂質代謝により変動する細胞内リン酸化シグナルの時空間解析

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of the inositol phospholipids-induced protein phosphorylation

研究代表者

吉崎 尚良 (YOSHIZAKI HISAYOSHI)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：00443490

研究成果の概要(和文):

イノシトールリン脂質シグナルは、細胞増殖、アポトーシス、細胞骨格制御、小胞輸送など多彩な生命現象に關与する。しかし、それらのシグナルの調節は、複雑なためその全容の解明は困難となっている。そこで我々は、タンパク質リン酸化に着目し、イノシトールリン脂質シグナルで変動するタンパク質リン酸化を、網羅的に解析することで、複雑なイノシトールリン脂質シグナルを全体として明らかにすることを提案した。リン酸化シグナルとそのシグナルが担う生理機能の関係を半自動的にスコアリングするシステムの開発を行った。

研究成果の概要(英文):

The structure and dynamics of inositol phospholipids signaling networks gives cell proliferation, apoptosis, cytoskeletal regulation and vesicle trafficking process. These inositol phospholipids signals are very complicated. Here, we introduce network biology and some of its associated technologies. We then focus on the protein phosphorylation signaling pathway and how this has implications for biomarker of cellular process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：生物学・細胞生物学

キーワード：細胞運動、リン酸化プロテオミクス、バイオインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、外界からの情報に従って、伸長と収縮という2つの動作を時空間的に協調(極性化)させることで、特定方向への運動を制御している。この細胞運動は、個体の発生、維持に必須の生命現象である。一方で、細胞運動シグナルの亢進は、炎症や癌細胞の浸潤、転移、癌病巣での血管新生などの病態の原因ともなる。細胞の運動方向を決定付ける細胞の極性化は、イノシトールリン脂質の空間的

な勾配により制御されている<sup>1)</sup>。しかしその下流のシグナルは、細胞骨格の制御をはじめ、小胞輸送、小胞膜融合など多岐にわたり<sup>2)</sup>、その全容は未だ明らかにされていない。細胞内シグナルは、分子間の相互作用と、修飾(主にリン酸化)により伝達される。近年動物組織や培養細胞中のリン酸化蛋白質を網羅的に解析するリン酸化プロテオミクス解析の手法が報告された<sup>3)-4)</sup>。これは既知の非遺伝毒性発がん物質群と、発がん性が認められな

い物質群それぞれを細胞に処理し、リン酸化プロテオミクス解析を行うと、各被験物質群で共通してリン酸化される蛋白質群の同定が可能であることを示唆している。さらにさまざまなリガンド刺激によるリン酸化シグナルを、データベース化するプロジェクトが急速に広がってきている<sup>5)</sup>。申請者は、このリン酸化に着目し、イノシトールリン脂質シグナルで変動するタンパク質のリン酸化を、網羅的に解析することで、複雑なイノシトールリン脂質シグナル伝達経路を全体として明らかにすることを提案した。

## 2. 研究の目的

イノシトールリン脂質は細胞膜に自らを固定する脂肪酸と、脂質キナーゼやホスファターゼによって修飾されるイノシトール環から成り、イノシトール環のリン酸化される位置の違いでシグナル伝達の調節を行う。例えば細胞先端部では PI(3,4,5)P3 量が増加し、下流の Rac や Cdc42 を活性化することで、アクチン骨格の再重合を誘導し葉状仮足を形成する。申請者は、これまで FRET を応用したバイオセンサーの開発を行い、イノシトールリン脂質や、低分子量 G タンパク質の空間制御が、細胞の形態変化に与える影響について調べてきた。その結果、増殖因子刺激により、PI3-K の代謝産物である PI(3,4,5)P3 は形質膜上で緩やかな勾配しか持たないこと、それに対し PI(3,4,5)P3 の代謝産物 PI(3,4)P2 は細胞辺縁でより高い分布を示すこと、また Akt の活性化の局在とタイムコースが PI(3,4)P2 の分布の変化と相関することを示し、RalA の限局した活性制御における PI(3,4)P2 と Akt の関与と、RalA の限局化が細胞膜の伸展に寄与することを明らかにした(研究業績 1,2,8)。しかし、Akt 活性が伸展膜上に限局するメカニズム、Ral を活性化するメカニズム等、Akt-Ral という同じ活性局在を示す 2 つの分子間のシグナル伝達経路のみでもその制御因子は 10 を超え非常に複雑で全体の理解は困難であった(研究業績 2、申請者未発表データ)。その為申請者は、細胞運動のシグナル伝達を理解するには、細胞内のシグナルを俯瞰的に観察することができる技術が必要であると考え、リン酸化プロテオーム解析に着目し、リン酸化の変動から細胞内シグナル伝達経路の予測を行う方法の開発を行った。

## 3. 研究の方法

### リン酸化ペプチドの濃縮

$1 \times 10^7$  の HeLa 細胞を、50ng/mL の EGF で 0 分、2 分、10 分、45 分処理した後、7M urea 2M thiourea 20mM HEPES pH 8.0 で溶解した。可溶化液は、超音波処理の後、10mM DTT で還元、50 mM iodoacetamide でアルキル化した。そ

の後 10ug の Lysyl end peptidase を加え 37 度で 3 時間処理し、20mM HEPES pH 8.0 で 4 倍希釈の後、10ug の Trypsin を加え 37 度で一晩反応させた。反応液は、脱塩、乾固の後、25mM Formic acid 40% Acetonitrile で溶解させ、Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)(Sigma)を用いリン酸化ペプチドの濃縮を行った。溶出は 50 mM KH2PO4 / NH3 pH 10 で行い、脱塩、乾固した。それぞれのサンプルは、安定同位体標識試薬である iTRAQ(Applied Biosystems/MDS Sciex)により標識後、混合し、強陽イオン交換カラムにかけ脱塩の後、質量分析を行った。

### 相互作用プロテオミクス

Flag-RhoA WT (野生型) および Q63L (恒常活性化型) Flag-Rac1 WT および G12V (恒常活性化型) Flag-Cdc42WT および G12V (恒常活性化型) は Flip-in システム(invitrogen)を用いて HEK293T-Rex 細胞(invitrogen)に安定発現させた。それぞれの Flag タグ標識 RhoGTPase 安定発現株は、 $10 \times 10^8$  の細胞を TBS 1%TritonX100 protease inhibitor カクテル (Roshe) で可溶化し、抗 Flag 抗体ビーズ(sigma)を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降産物は、クロロホルム沈殿の後、10mM DTT で還元、50 mM iodoacetamide でアルキル化した。その後 10ug の Lysyl end peptidase を加え 37 度で一晩反応させた。反応液は、脱塩、乾固の後、質量分析を行った。

### ショットガンプロテオミクス

リン酸化ペプチド濃縮液は、nanoflow 液体クロマトグラフィーシステムを用い、C18 カラムにロードした。ペプチドは、nanoflow LC-MS/MS system を使い、0.1% formic acid 存在下、90-120 分で acetonitrile 0-50% のグラジエントをかけ溶出した (flow rate of 50 nL/分)。溶出ペプチドは直接イオン原として、Quadrupole/Time of Flight (Q-ToF) MS/MS である Qstar (Applied Biosystems/MDS Sciex) にスプレーした。ペプチド情報は、質量分析情報を、ProteinPilot (Applied Biosystems/MDS Sciex) にかけ同定した。

### システムバイオロジー

各リン酸化ペプチドの定量結果は、各パターンの相関係数をもとにクラスタリングにかけ、分類した。リン酸化モチーフのクラスタリングは、Markov Cluster algorithm を用いた MCL クラスタリングで行った (<http://micans.org/mcl/>)。シーケンスログは、WebLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/>) を用いて作成した。ヒトタンパク質の基本情報 (Gene Ontology, function, secondary structure) は、Swiss-Prot

(<http://ca.expasy.org/sprot/>) の情報をアサインした。ドメイン情報は Pfam からアサインした。細胞内シグナル伝達経路の地図は、Cytoscape ソフトウェアを用いて構築した (<http://www.cytoscape.org/>)。

#### 4. 研究成果

### HeLa 細胞の増殖因子刺激におけるリン酸化プロテオミクス解析

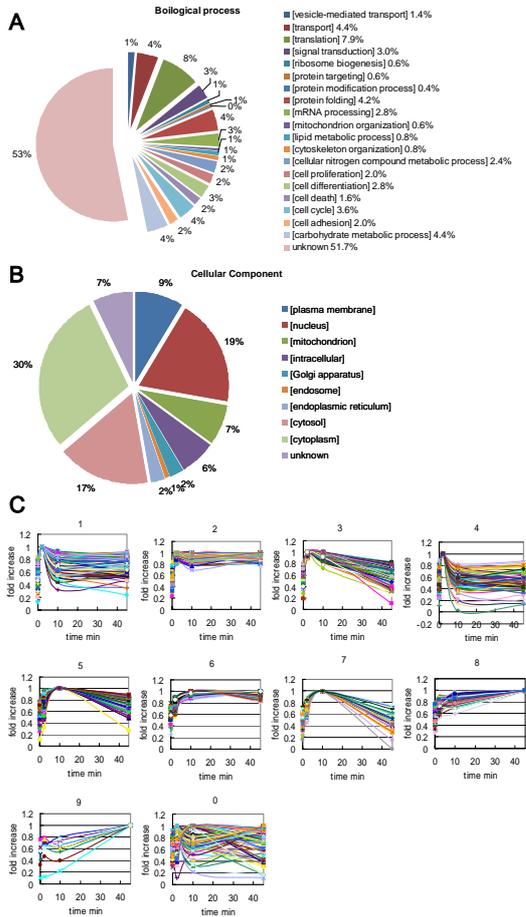


図1 リン酸化プロテオミクス。

同定したリン酸化ペプチドはGeneOntrogyのBiological processと cellular componentの情報をアサインし、その分布を調べた(A, B)。安定同位体標識による定量差異解析の結果をクラスタリングし、増殖因子刺激によるリン酸化の経時変化を分類した(C)。

リン酸化プロテオミクス解析を用い、非遺伝発がん物質のマーカースイグナルを同定するためには、解析で得られる、膨大なリン酸化サイトの変動から、正確に発がんシグナルをピックアップする必要がある。そこで筆者らは、HeLa 細胞における増殖因子シグナルのリン酸化プロテオミクスを例に、増殖シグナルを抽出するための技術開発を試みた。まず、HeLa 細胞に上皮増殖因子(EGF)を処理し、0, 2, 10, 45 分後の細胞を回収、それぞれのサンプルを IMAC カラムにかけ、リン酸化ペプチド

の濃縮を行う。濃縮されたリン酸化ペプチドは安定同位体標識試薬である iTRAQ により標識後、質量分析にかけると、4 種類の異なる蛋白質試料間の定量的差異解析を行った。4 回の差異解析を行い、平均 10067 のリン酸化サイトを同定した。このうち 2 回以上の再現性と安定同位体標識を指標にした変動パターンの相関が相関係数 0.9 以上のリン酸化サイトを抽出し、1550 サイトのリン酸化の変動を信頼性の高いリン酸化サイトとして選択し以後の解析に進めた。それぞれのリン酸化サイトは、GeneOntrogy の情報をアサインし、機能と局在の分布を調べた(図 1A, B)。またリン酸化の経時的変動パターンで相関をとり、クラスタリングし、9 つのパターンに分類した(図 1C)。

### 増殖因子で調節されるリン酸化サイトの性質

同一キナーゼによる基質のリン酸化パターンは似る傾向にあるため、クラスタリングされたリン酸化サイトに共通性があるか調べるため、リン酸化モチーフの抽出を MCL クラスタリングで行い、WebLOGO を用いてシーケンスロゴを作製した(図 2A)。この結果、複数のクラスタで見られるモチーフと、特定のクラスタでしか見られないクラスタを分類できた。

ある種のキナーゼは、結果として、特定の機能をつかさどるタンパク質群を重点的にリン酸化する傾向がみられる。そこで、リン酸化モチーフとリン酸化されるタンパク質の機能に相関があるかを Gene Ontrogy とリン酸化モチーフでクラスタリングすることで調べた(図 2B)。その結果明確な機能とリン酸化モチーフの相関は見られなかった。しかし GO の階層を深くすることで相関が出てくる可能性はあるので今後の検討課題とした。さらに、タンパク質の 2 次構造、およびドメイン構造でリン酸化のパターンに相関があるか調べた(データ不掲載)。ヘリクスやシートといった構造をとる部位ではほとんどリン酸化を受けないことが示された。ドメイン構造単位の高次構造とリン酸化パターンの相関は、ドメイン以外でのリン酸化パターンの相関係数は 0.62 に対し、ドメイン間における相関係数は、平均 0.72 で、同じドメイン間でリン酸化パターンは相関する傾向にあった。

### リン酸化モチーフから関連するキナーゼの予測

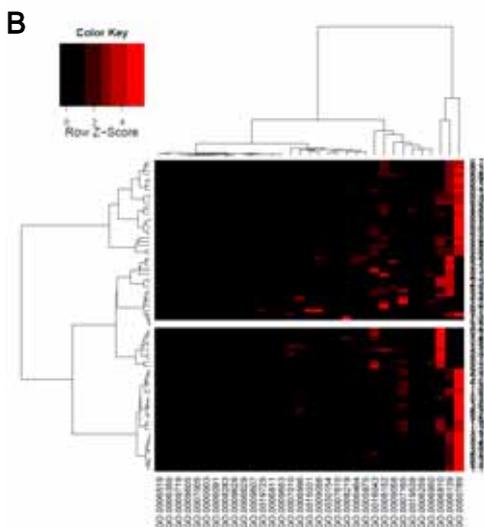
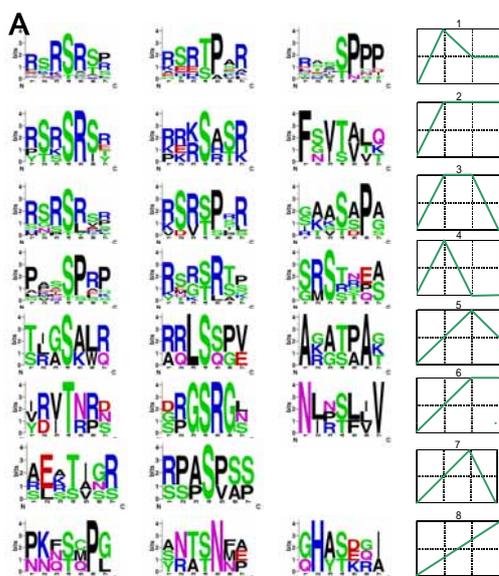


図2 EGF依存的に変動するリン酸化サイトのモチーフ解析. リン酸化の経時変化で分類したペプチド配列は、共通したモチーフをMCLクラスタリングにより分類した(A:一部抜粋). タンパク質機能(GeneOntrogy)とリン酸化モチーフの相関でクラスタリングした(B)

キナーゼはリン酸化する周辺 4 - 5 アミノ酸を認識していることが知られる。そこで、既知のリン酸化部位のパターン化と、その新しく構築したモチーフにリン酸化しうるキナーゼ群をアサインした。Phosphosite plus(<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>) 及び PhosphoELM(<http://phospho.elm.eu.org/>) に登録されている 34366 サイトをリン酸化部位の前1-後ろ5アミノ酸、同3-3、5-1、5-5でそれぞれMCLクラスタリングし、分割した。さらにweblogoを用いシーケンスロゴを作成した。作成したロゴから配列を確認、整理し、さらに、既知のモチーフを追加することで再分類した結果、187のモチーフを得た。そしてPhosphosite plusに登録されている触媒するキナーゼが既知のリン酸化サイト 12285

サイトを元に、先に行った187のモチーフがどのキナーゼによってリン酸化されるか、その可能性を検証した。各モチーフが、どのキナーゼ - 基質の組み合わせに含まれるかを調べ、アサインされるキナーゼが複数の場合、そのキナーゼ間で共通した特徴があるか検証した。特徴は、キナーゼドメインの系統樹による分類<sup>6)</sup>、およびGene Ontrogyを参考にした。その結果、リン酸化モチーフはキナーゼドメインの相同性に応じて、分類できることが分かった(表1)。

表1 リン酸化モチーフからリン酸化酵素の予測

motif No	kinase family	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
21	CMGC		ASTQE	X	SATQE	S	P	ASTVN	ASTVG	
22	CMGC		P	P	X	X	P	X		
23	CK2		DEN	ST	DEN	ST	DN		P	
44	CMGC			RK	X	P	S			
48	CMGC					V	S		P	
100	CK2		DE	DE	DE	S	DE			
143	CK1CK2			DE	ST	DE	ST	DE		
174	CAMK2		R	X	X	ST	V			
176	CK1/GSK3					ST	X		X	
178	CDK2					ST	P	X	RK	S

### EGF 刺激依存的にリン酸化シグナルが入る、Rho ファミリーGTPase シグナルのシグナル伝達地図の構築

イノシトールリン脂質の一つであるPI(3,4,5)P3の下流ではRac1やCdc42といったRhoファミリーGTPaseが働くことが知られる。そこでこのRhoファミリーGTPaseシグナルを例に、EGF刺激でリン酸化シグナルが入力されるシグナル伝達経路の解析を行って見た。方法は、RhoA, Rac1, Cdc42と相互作用する分子を相互作用プロテオミクスで同定し、RhoファミリーGTPaseの相互作用地図を構築し、この地図とEGF刺激でリン酸化の入る分子のシグナル伝達地図と重ね合わせることで、EGF刺激依存的にリン酸化シグナルが入る、RhoファミリーGTPaseシグナルのシグナル伝達地図の構築を行った。

EGF刺激によるリン酸化シグナル伝達地図は、リン酸化タンパク質に相互作用するタンパク質を、タンパク質間相互作用データベースであるSTRING(<http://string-db.org/>), BioGRID(<http://thebiogrid.org/>)から抽出し、増殖因子シグナルのシグナル伝達地図を構築した(図3A)。RhoファミリーGTPaseの相互作用分子は、Flag標識RhoA, Rac1, Cdc42の野生型と恒常活性型を、それぞれHEK293細胞に発現させ、抗Flagビーズで免疫沈降し、免疫沈降産物を質量分析にかけ検出できた分子とした。中でも野生型と比べ、恒常活性型で特異的に検出できた分子を標的分子とし相互作用地図の構築に使用した(図3B)図3Aのリン酸化シグナル伝達地図に、図3BのRhoA, Rac1, Cdc42の相互作用情報をアサインすることでEGFシグナルでリン酸化シグナルが入力されるRhoGTPaseシグナル伝達経路を予測することができる。Cdc42の例を図示した(図3C)。この地図にGOの情報をアサインすることで、特定の機能を持つシグナル

伝達経路を抽出することが可能になり、新規の増殖シグナル伝達経路候補の予測が可能となった(図 3D)。今後抽出したシグナル伝達経路の構成タンパク質の性質から、イノシトールリン脂質の変動が、どのような生理機能に直結しているのか、GO のスコアリングを行う方法を開発し、実際に様々なイノシトールリン脂質の分布を変化させた細胞で、リン酸化プロテオミクスを行い、上記のスコアでイノシトールリン脂質による、シグナル伝達経路を網羅的に選別できるか検証を進めていく予定である。

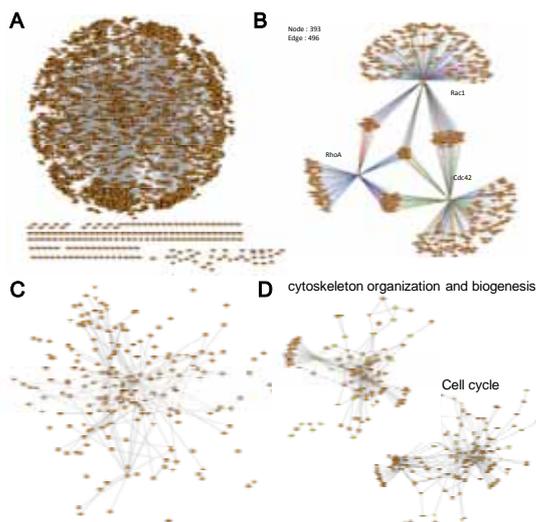


図3 Rhoファミリー-GTPase相互作用地図におけるEGF依存的リン酸化シグナルの予測  
リン酸化プロテオミクスにより同定されたタンパク質、およびデータベースで報告されている相互作用タンパク質、リン酸化部位から予測されるキナーゼファミリーの情報をまとめ、増殖因子シグナル伝達経路の地図を構築した。シグナル伝達地図はCytoscapeを用いて描写した(A)。RhoA, Rac1, Cdc42の相互作用プロテオミクスの結果から描写される相互作用地図(B)。EGF依存的なリン酸化の変動が検出されたRhoファミリー-GTPaseシグナル伝達地図(C)Bの地図にGOをアサインし、cytoskeleton organization and biogenesisとCell cycleのGOを持つタンパク質と、その相互作用タンパク質から、細胞骨格制御、細胞増殖に関するシグナル伝達地図を再構築した(D)。黄色のサークルはEGF依存的にリン酸化の変動がみられた分子

## 文献

- 1) Kölsch V, Charest PG, Firtel RA, The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling., *J Cell Sci.* 2008 Mar 1;121(Pt 5):551-9.
- 2) Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):37-48.
- 3) Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks., *Cell.* 127(3):635-48, 2006
- 4) 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):1896-906, 2007

5) Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzel R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J, Comb MJ, Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131(6) : 1190-203, 2007  
6) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S., The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298(5600):1912-34, 2002

## 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0件)

[学会発表](計3件)

1. 大松洋平, 早野俊哉, 吉崎尚良, Identification of the RhoA-interacting proteins using proteomic approach, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県)(2010.12.09)

2. 吉崎尚良, 大松洋平, 早野俊哉, Proteomic analysis of Cdc42 interacting Proteins in mitotic cells, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県)(2010.12.09)

3. 大松洋平, 山本裕史, 早野俊哉, 吉崎尚良, プロテオミクス技術を用いた R h o A 相互作用分子の探索, 第32回日本分子生物学会年会, パシフィック横浜(神奈川県)(2009.12.10)

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.sk.ritsumei.ac.jp/yo/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉崎 尚良 (Yoshizaki Hisayoshi)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号: 00443490