

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710186

研究課題名（和文） 情報基盤定量プロテオミクスによるヒトプロテオームの絶対定量

研究課題名（英文） Absolute quantification of human proteome by information based quantitative proteomics

## 研究代表者

松本 雅記（MATSUMOTO MASAKI）

九州大学・生体防御医学研究所

研究者番号：60380531

研究成果の概要（和文）：従来の質量分析計を用いたプロテオミクスではタンパク質発現量の広大なダイナミックレンジのため、複雑な試料中の微量タンパク質の検出は困難であった。本研究では、この問題を解決するために、質量分析計による特定タンパク質検出法である MRM 法とヒト cDNA ライブラリーを元にした組換えタンパク質を利用してあらゆるヒトタンパク質の絶対定量を可能とする新規タンパク質定量解析プラットフォームの構築に成功した。本システムを用いて、従来検出が困難であった低発現タンパク質を含む多種類のタンパク質絶対量情報を取得することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：Due to the huge dynamic range of proteins amount, the detection of proteins expressed in low copy number by conventional proteomics based on mass-spectrometry is a major challenge. To solve this issue, we developed novel method to detect and quantitate human proteins by the combination of MRM, target proteomics and recombinant proteins generated from cDNA library. Using this system, we obtained information about the absolute expression level of many proteins including low abundant proteins that were difficult to detect.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2000000	600000	2600000
2011年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

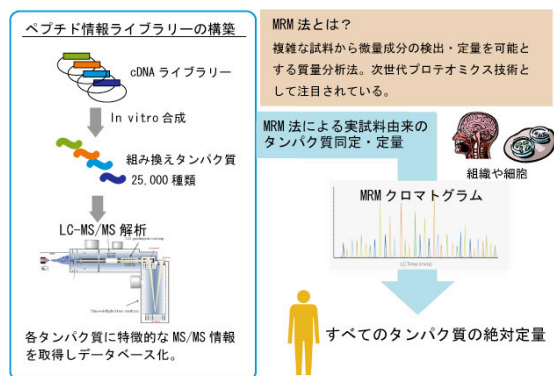
近年、ゲノム情報の解明を背景に、網羅的解析が盛んに行われ、様々な生命現象をシステムとして理解する試みがなされている。中でも生命現象と直接的に結び付くタンパク

質の量的・質的变化をグローバルにとらえるプロテオーム解析の重要性は明白である。しかしながら、もっとも本質的で重要なタンパク質発現情報の取得に関しては、極めて発展途上であり、これを可能にする画期的な技術

の開発が渴望されていた。われわれはこの重要課題に挑むため3連4重極型質量分析計を用いたターゲットプロテオミクスであるMRM法に着目し、その高感度化に注力してきた。その結果、わずか1マイクログラムの全細胞抽出液(細胞10,000個に相当)から1細胞当たり1,000分子程度の低発現タンパク質の検出を可能とする高感度分析システムを構築した。

## 2. 研究の目的

本来、MRM法は特定タンパク質を質量分析計によって高感度に検出する方法であり、大規模タンパク質発現量解析に利用できるものではない。これは、MRM法を実行する前に、標的ペプチドの質量および開裂断片の質量などの事前情報を必要とする。本研究ではこれらタンパク質を規定するペプチドの固有座標(液体クロマト上の保持時間、質量、および部分質量)を、ヒトcDNAライブラリーから試験管内合成系を用いて作製した25,000種類のタンパク質を対象に事前取得しデータベース化する。この情報を元に超高感度定量法であるMRM法によってすべてのタンパク質の絶対定量が可能なシステムの構築を目指す。



## 3. 研究の方法

図1 情報基盤定量プロテオミクスの概要

【平成22年度】

### 1) 情報基盤定量プロテオミクスの実用化

#### a. 組み換えタンパク質リソースを用いたMS/MS情報取得

100種類程度の組み換えタンパク質をまとめた混合物を酵素消化した試料を1検体と

してLC-MS/MS解析を行う。同様の測定を250回繰り返すと25,000種類すべてのタンパク質を分析する。ここでタンパク質によっては検出が難しいものがある場合は、混合する数を減らして二次・三次スクリーニングを行う。得られたMS/MSスペクトル情報からMRM-transitionを設定する。

#### b. 液体クロマトグラフィーの標準化

情報基盤定量プロテオミクスでは液体クロマトグラム上の保持時間をペプチド座標の一つとする。保持時間は試料の組成やカラムの劣化、あるいは室温変動などの影響を受けるため、再現性を厳密にコントロールは不可能である。そこで、合成ペプチドによる保持時間マーカを開発し、試料に添加することで各クロマトグ標準化を行う。

#### c. 情報基盤MRMのための情報処理プラットフォーム構築

保持時間・質量・部分質量の三つのペプチド座標をデータベース化し、これを用いて情報基盤定量プロテオミクスを実施する。具体的にはいくつかのヒト培養細胞株を用いて、特定の機能分類毎にタンパク質の絶対量の計測を行い、本方法が実用レベルにあるか検証する。

【平成23年度】

### 2) ヒト全プロテオームの絶対定量

上記のデータベースの構築とパイロット実験が成功すれば、全プロテオームの絶対定量を目指して、大規模に情報基盤定量プロテオミクスを実施する。さらに、さまざまな条件下でのプロテオームの差異も本方法で解析し、シグナル伝達の分子機構の解明などに応用する。合わせて、リン酸化ペプチドに対する情報基盤定量プロテオミクスも構築し、シグナル依存的なリン酸化のダイナミクスを網羅的に計測する。

### 3) 情報基盤定量法の改良

情報基盤定量プロテオミクスは将来的には各種疾患の診断や治療効果の判定などにも利用が十分に期待できる分析法である。そのためには今以上の高感度化を達成する必要がある。ハードウェアの改良や試料の前処理法の開発によってより微量なタンパク質の検出が可能なシステムへ発展させる。

## 4. 研究成果

### 1) 情報基盤定量プロテオミクスの実用化

a. 組換えタンパク質リソースを用いた MS/MS 情報取得

複数種類の組み替えタンパク質を混合してタンパク質の同定数を評価した結果、約 100 種類までは 90%以上のタンパク質を同定することが可能であった。また、各タンパク質あたりの同定ペプチド数は 70-80%が 3 ペプチド以上を検出可能であった。従って、96 種類のタンパク質を一セットとして約 200 セットの混合物を作製し、すべて 2 回以上の繰り返し測定を行った。その結果、約 15000 種類のタンパク質に対して高感度に検出され得るペプチド種を決定することが可能であった (約 120000 種類のペプチド)。

b. 液体クロマトグラフィーの標準化

微量液体クロマトグラフィーにおける各ペプチドの保持時間は様々な要因で変化し、厳密な再現性を得ることが極めて困難である。そこで、ヒトプロテオーム中に存在し得ない疎水性の異なる 12 種類のペプチド配列を合成し、保持時間マーカーとした。これらの保持時間マーカーをタンパク質同定の際、混合することで、同定されたすべてのペプチドに関して、液体クロマトグラフィー上での保持時間を相対位置情報化することに成功した。MRM 解析で使用するカラムやグラジエント条件で保持時間マーカーの保持時間プロフィールを取得すれば、各ペプチドの相対位置情報から保持時間の正確な予測が可能であった。

c. 情報基盤MRM法プラットフォーム構築

MASCOT 検索結果 (MASCOT dat ファイル) から各セットに含まれるタンパク質のみを抽出し、MySQL によって構築した独自のデータベースへ登録を行った。本データベースは 1) 同定されたペプチド情報をゲノム情報に自動リンクさせ、各ペプチドの特異性情報 (タンパク質特異的ペプチド、遺伝子特異的ペプチド、あるいは冗長ペプチド) を元にクラス分けを行う機能や 2) 任意のタンパク質名、遺伝子名、あるいはパスウェイ名などを元に目的タンパク質の PTP 情報を抽出する機能、3) MRM を行うために必要な情報 (Q1, Q3, collision energy などのパラメータ) を付加して MRM 測定メソッドを自動作成する機能、4) 保持時間マーカーに対する相対的な位置情報を元に保持時間予測を行う機能など、多

様な機能を実装させた。

【平成 23 年度】

2) ヒト全プロテオームの絶対定量

上記のデータベースを利用して大規模に MRM 法を実行することが可能となった。そこで主要パスウェイ構成タンパク質を対象に情報基盤 MRM 法を実行した。その結果、細胞周期関連タンパク質やシグナル伝達経路、代謝経路などの構成タンパク質を多数絶対定量することが可能であった。

3) 情報基盤定量法の改良

情報基盤 MRM 法の高感度化を達成ため、ハードウェアの改良や試料の前処理法の開発を行った。具体的には微量前分画システムをナノフロー HPLC とオートサンプラーを組み合わせた自動分取システムを構築した。アルカリ条件下での逆相クロマトグラフィーを実施することで、試料の複雑さを低減させ、飛躍的な高感度化を実現した。さらに、イオン源のカスタマイズを実施することで、数倍の高感度化を達成した。

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 9 件)

すべて査読あり

- 1) Oshikawa K, Matsumoto M, Oyamada K, Nakayama KI. Proteome-wide identification of ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin. *J. Proteome Res.*, 11: 796-807 (2012)  
DOI: 10.1021/pr200668y
- 2) Kanie T, Onoyama I, Matsumoto A, Yamada M, Nakatsumi H, Tateishi Y, Yamamura S, Tsunematsu R, Matsumoto M, Nakayama KI. Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation *Mol. Cell Biol.*, 32: 590-605 (2011)  
DOI : 10.1128/ MCB.06570-11
- 3) Matsuzaki F, Shirane M, Matsumoto M, Nakayama KI. Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol. Biol. Cell.*, 22: 4602-4620 (2011)  
DOI: 10.1091/mbc.E11-01-0068
- 4) Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y,

- Matsumoto, M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki K. Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156:117-128 (2011)  
DOI: 10.1104/pp.111.175943
- 5) Okumura F, Okumura AJ, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S. TRIM8 regulates Nanog via Hsp90 $\beta$ -mediated nuclear translocation of STAT3 in embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta.*, 1813:1784-1792 (2011)  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.05.013
- 6) Tachiyama R, Ishikawa D, Matsumoto M, Nakayama KI, Yoshimori T, Yokota S, Himeno M., Tanaka Y., Fujita H. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells.*, 16: 448-66 (2011)  
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01499.x
- 7) Hayakawa H, Fujikane A, Ito R, Matsumoto M, Nakayama KI, Sekiguchi M. Human proteins that specifically bind to 8-oxoguanine-containing RNA and their responses to oxidative stress. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 403:220-224 (2010)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.011,
- 8) Takeda H, Kawamura Y, Miura A, Mori M, Wakamatsu A, Yamamoto J., Isogai T., Matsumoto M, Nakayama KI., Natsume T., Nomura N., Goshima N. Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate specificity in vitro *J. Proteome Res.*, 9:5982-5993 (2010)  
DOI: 10.1021/pr100773t
- 9) Hatano A, Matsumoto M, Higashinakagawa T, Nakayama KI. Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 397:93-99 (2010)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.074

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 松本 雅記、中山 敬一  
定量プロテオミクスによる生命科学研究の新展開 日本ヒトプロテオーム学会  
2011年7月19日 新潟・朱鷺メッセ
- 2) 松本 雅記 MS 定量解析および大規模データ解析 日本生化学会  
2011年9月13日 京都・国立国際会館
- 3) 松本 雅記、五島 直樹、夏目 徹、中山 敬一  
情報基盤ターゲット・プロテオミクスを用いたヒト・プロテオームの絶対定量 日

- 本プロテオーム学会,  
2010年7月27日 東京ベイホテル東急
- 4) 松本 雅記 定量プロテオミクスが拓く  
生命科学研究の新展開 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  
2010年12月8日 神戸ポートアイランド

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 雅記 (MATSUMOTO MASAKI )  
九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：60380531

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：