

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13750

研究課題名(和文) タンパク質量の均一化による微量タンパク質の網羅的解析

研究課題名(英文) Proteome analysis for low abundant proteins

研究代表者

松本 桂彦 (Matsumoto, Katsuhiko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：60632859

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)：細胞の機能を調節している転写因子などの重要なタンパク質のおおくは、細胞内で微量にしか発現していないことが多く、これらを質量分析によって検出することは困難であった。そこで、無細胞翻訳系を用いた簡便な同位体標識標準ペプチドと、静電相互作用、疎水性相互作用を用いたクロマトグラフィーによる多次元分離により、標的タンパク質フラグメントの純度を高めることで、微量タンパク質の高感度な絶対定量法であるMS-QBiC法を確立した。これにより1細胞内に数千分子しか存在しない概日時計の転写因子の増減を定量的に検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Important proteins such as transcription factors are expressed only small amount in the cells and it was difficult to detect them by mass spectrometry. Therefore, we developed highly sensitive absolute quantification method which is combined with simple internal standard synthesis system (MS-QBiC) method and multidimensional separation by electrostatic interaction and hydrophobic interaction chromatography. As a result, we succeeded in quantitatively detecting the oscillation of the circadian clock proteins which has only several thousand molecules in a cell.

研究分野：化学

キーワード：プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質は、数百コピーしか存在しないものから、数千万コピーも存在するものまで量的に非常に多様であることが知られており、タンパク質の種類も1細胞に1万種類は存在すると考えられている。これだけ多種類かつ存在量の大きく異なるものを一度に網羅的に解析しようというのがプロテオーム解析であるが、現状では、細胞内に微量しか存在しない転写因子やシグナル伝達分子、膜タンパク質、キナーゼなどを一度に同定・定量することは非常に困難であった。質量分析器を用いた微量タンパク質のプロテオーム解析が困難な原因の大きな要因は、タンパク質の多様性と、タンパク質の存在量のダイナミックレンジの広さに起因しており、イオン化の際、存在量の多いタンパク質が優先的にイオン化されてしまうことにより存在量の少ないタンパク質がイオン化され難くなり(イオンサプレッション)、結果として微量タンパク質の検出感度が実際の存在量以上に低くなることもある。このことにより、およそ10万 copies/cell(cpc)以下のタンパク質は同定が困難なことが多く、例えば概日時計を制御している時計タンパク質のほとんどは通常のプロテオーム解析では検出することができない状況である。特に、生体機能で重要な役割を果たしているリン酸化されたタンパク質は、その存在量自体が少なく、さらにイオン化効率も悪いため、プロテオーム解析による生体機能の解析を困難にしている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内にごく微量しか含まれていない転写因子、特に概日時計の制御にかかわる時計タンパク質の高感度な測定法の開発を行う。微量タンパク質を高感度に測定するためには、イオンサプレッションを抑える必要がある。イオンサプレッションを抑えるためには、イオン化されるときタンパク質(その酵素消化物)の純度を高める方法がとられることが多い。具体的には、標的のタンパク質を免疫沈降やゲル電気泳動によって精製または、イオン交換カラムや疎水性相互作用によって成分を分離する手法が用いられる。これに、イオンサプレッションの大きな要因である分子数の均一化方法を加えることで、より広い範囲でタンパク質の高感度な測定が可能な手法を確立する。

3. 研究の方法

培養細胞を用い、時計タンパク質で重要なPERIODタンパク質とCryptochromeのプロテオーム解析を行い、PERIODタンパク質の修飾状態とCryptochromeの関連を検証した。さらに、この手法を用いて感度の高いペプチドの選定を行い、無細胞翻訳系を用いて同位体元素を含む内部標準ペプチドの作製を行った。これを、用いてマウス肝臓細胞内の時計

タンパク質20種類の絶対定量を行い、その量的変化の測定を行った。

4. 研究成果

PERIODタンパク質、Cryptochromeタンパク質は、概日リズムの中核のタンパク質であり、PERIODタンパク質はリン酸化を受ける事で細胞内の安定性が変化し、それによって1日のリズムを作り出していると考えられている。そこで、PERIODタンパク質の機能に重要なリン酸化サイトの同定を行い、Cryptochromeと関連を検証した。さらに、リン酸化以外の修飾状況も網羅的に解析するため、ショットガンプロテオームを基盤にしたmodificome解析法を確立した。

まず、HEK293T細胞にFLAGタグを導入したPERIOD1またはPERIOD2タンパク質をコードしたプラスミドベクターのトランスフェクションを行った。そのまま2日間培養を行い、細胞の回収を行った。細胞溶解液中で超音波破碎を行い、細胞抽出液を作製し、Anti-FLAG M2セファロースビーズを使ってPERIOD1, PERIOD2タンパク質の精製を行った。これを、リシルエンドペプチダーゼとトリプシンを用いてペプチド断片化を行い、IMACレジンを用いてリン酸化、非リン酸化画分に分画を行った。これを、アルカリ水溶液中で処理することで、イオン化され難いリン酸化セリン、リン酸化スレオニンのリン酸基を脱離させ、デヒドロ体へと誘導することで、イオン化効率の向上をおこなった。これを、C18のナノ高圧液体クロマトグラフィーを通してOrbitrap MSで測定を行った。これにより、40カ所以上のリン酸化サイト、メチル化サイト、酸化サイトの同定することに成功した。次に、リン酸化状態がCryptochrome1によって変化するのかを検証するため、定量性の高いSILAC法を導入した。HEK293T細胞を通常のDMEM培地と、C13, N15でラベルされたリシン、アルギニンを含むDMEM培地でそれぞれ培養を行い、それぞれにPERIOD1, PERIOD2, Cryptochrome1遺伝子をトランスフェクションを行い、PERIODタンパク質のリン酸化状態の定量を行った。これにより、PERIOD2タンパク質はCryptochrome1存在下でリン酸化されたペプチド量が増加しており、PERIOD2タンパク質はCryptochrome1存在下においてなんらかのキナーゼによるリン酸化が促進されている可能性が示唆された。(図2)

次に、生体組織中の微量タンパク質を高感度かつハイスループットに同定、定量を行うために、内部標準試料の簡便かつ安価な作製方法が必要であった。そこで、無細胞翻訳システムであるPURE systemを用いて同位体アミノ酸を含むペプチドを作製することで、多種類の内部標準ペプチドを安価に作成した。PURE systemで作製した内部標準ペプチドを定量するため、BSAのトリプシン消化物と同じ配列をタンデムで作製し、これを濃度既知のBSAと比較定量することで、PURE system

で作製した標的的内部標準ペプチドの濃度を決定する。これを、マウス肝臓から抽出した細胞抽出液に加えることで、マウス肝臓細胞ないの標的タンパク質、標的ペプチドの簡便な絶対定量が可能。MS-based Quantification By isotope labeled Cell-free products (MS-QBiC)法を確立した。

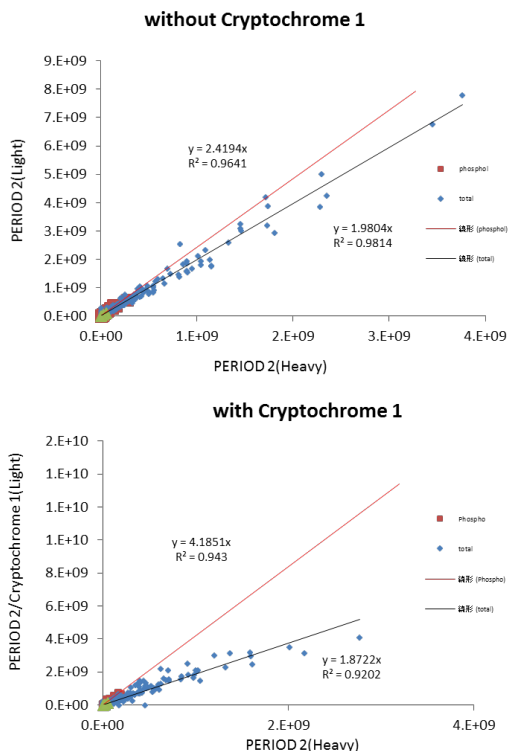


図 1. PERIOD2 タンパク質の Cryptochrome 1 によるリン酸化状態の変化

この MS-QBiC 法を用いて、概日時計に関連する 20 種類のタンパク質の絶対定量を行い、マウス肝臓内で 1 日にそれぞれのタンパク質がどのように変化するかを絶対定量を行った。20 種類のタンパク質の定量に用いるペプチドは、これまでに確立したショットガンプロテオーム解析により、感度の良いペプチドフラグメントを選定した。マウス肝臓抽出液を、リシルエンドペプチダーゼ、トリプシンを用いてペプチド断片化を行った。次に、イオンサプレッションを抑えるために、

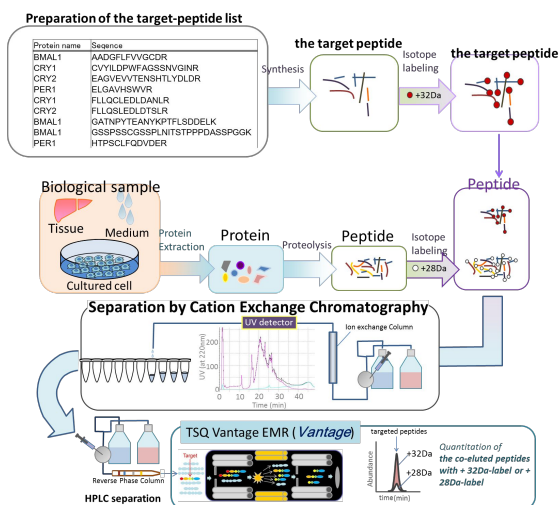


図 2 MS-QBiC 法を用いた微量タンパク質の高感度絶対定量

イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画を行った。それぞれの画分のなかで、標的ペプチドを含む画分を疎水性相互作用を用いた C18 シリカゲルを用いたナノ高圧液体クロマトグラフィーによるペプチドの分離を行い、高感度かつ定量性の高い三連四重極質量分析器を用いて標的ペプチドの定量を行った。これにより、1 細胞内で 1000 分子以下しか発現していないタンパク質まで絶対定量することができ、時計タンパク質の概日リズムによる存在量の変化を定量することに成功した。

これまでは、イオン化の時のペプチドフラグメントの純度を上げることによってイオンサプレッションを抑えること、イオン化しやすいペプチドを選ぶことで高感度化を行ってきたが、発現量の多いタンパク質の量を減らすことで、イオンサプレッションの影響を減らす試みを行った。まず、濃度の異なる BSA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。これを、結合容量の小さいメンブレン (濾紙) に転写を行った。図 3 のように、存在量の多い BSA も少ない BSA もほとんど一定量しかメンブレンに補足されず、アクリルアミドゲル上で分離されたタンパク質はある程度等量に転写する可能が示された。しかし、結合量が微量すぎたため、メンブレンからトリプシンなどによる酵素消化、質量分析を行う量を回収することが困難であり、プロテオーム解析に使用するためには、メンブレンからの効率の良い抽出方法の開発の必要である。

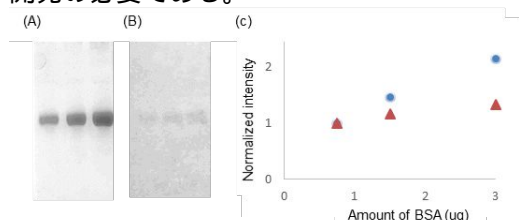


図 3 BSA のタンパク質量の均一化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ryohei Narumi, Yoshihiro Shimizu, Maki Ukai-Tadenuma, Koji L. Ode, Genki N. Kanda, Yuta Shinohara, Aya Sato, Katsuhiko Matsumoto, Hiroki R. Ueda

Proc Natl Acad Sci USA., 査読有, 113 巻, 2016 年 E3461-7

Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins.

doi:10.1073/pnas.1603799113

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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 桂彦 (MATSUMOTO Katsuhiko)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・特別研究員
研究者番号：60632859

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

上田 泰己 (UEDA Hiroki)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・グループディレクター
研究者番号：20373277

鳴海 良平 (NARUMI Ryohei)
国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・テクニカルスタッフ
研究者番号：60582202

清水 義宏 (SHIMIZU Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命シス
テム研究センター・ユニットリーダー
研究者番号：90401231