

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07017

研究課題名（和文）MS/MSシミュレーションによる、修飾部位網羅的タンパク質リン酸化定量法の開発

研究課題名（英文）Development of a site-specific and comprehensive quantification method for protein phosphorylations based on MS/MS spectral simulation

研究代表者

今西 進（Imanishi, Susumu）

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：00757502

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：以前開発したリン酸化ペプチドMS/MSスペクトルのシミュレーション用ソフトウェア SimPhosphoを応用し、データ非依存的质量分析法であるSWATH測定によるリン酸化ペプチドの定量解析法を開発した。SimPhosphoをTripleTOF質量分析計で取得したMS/MSスペクトルに対して用いた後、データフォーマットを調整することにより、SkylineソフトウェアによるSWATH解析でリン酸化ペプチドの定量が可能であることを確認した。さらにリン酸化部位を特異的かつ高感度に同定した上で定量解析が行えるよう、シミュレーション条件の最適化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、生体タンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）を行うことにより一度に数万ものリン酸化が観察でき、それら膨大な報告は、PhosphoSitePlusなどのデータベースに次々と蓄積されている。本研究では、網羅的定量解析におけるリン酸化部位の決定を高精度化したことにより、より信頼度の高いリン酸化の定量的な観察を可能にすると期待できる。リン酸化は細胞内情報伝達を中心としており、様々な生体機能の制御に関わっていることから、それらリン酸化の網羅的解析は今後の生命科学および医学・薬学のさらなる発展に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a mass spectrometry based phosphopeptide quantification method using a data-independent acquisition method SWATH, in combination with SimPhospho software a simulation program for MS/MS spectra of phosphopeptides. SimPhospho was applied to MS/MS spectra acquired using a TripleTOF mass spectrometer, and adjusting its data format enabled phosphopeptide quantification by SWATH analysis using Skyline software. Furthermore, simulation conditions were optimized for confident and sensitive localization of phosphorylation sites to be quantified.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：質量分析 定量プロテオミクス タンパク質リン酸化 シミュレーション スペクトルライブラリ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体内にはさまざまなタンパク質が存在し、細胞内外において重要な役割を担っている。タンパク質は翻訳後修飾を受けることにより、その酵素活性、タンパク質間相互作用、細胞内局在など、様々な機能が制御される (Jensen, 2006)。それらタンパク質翻訳後修飾の中でも、現在までに最も詳細に研究されてきたものがリン酸化である。リン酸化酵素 (kinase) により、主に基質タンパク質のセリン、スレオニン、チロシン残基の水酸基がリン酸化され、脱リン酸化酵素 (phosphatase) とのバランスにより、そのリン酸化量は調節されている。タンパク質の網羅的解析をプロテオミクスと呼ぶことから、それらリン酸化の網羅的解析はリン酸化プロテオミクスと呼ばれている。解析にはまず、トリプシンなどの酵素を用いてタンパク質を 1000~3000 Da 程度のペプチドに消化し、金属イオン固定化親和性クロマトグラフィー (IMAC) や二酸化チタン (TiO₂) 親和性クロマトグラフィーでリン酸化ペプチドを濃縮後、ナノ流速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (nano LC-MS/MS) により測定する。得られた MS/MS スペクトルを、タンパク質のアミノ酸配列データベースから考えられ得る理論値と照らし合わせることで、ペプチド及び消化前のタンパク質の同定を行う。質量分析装置や試料調製法・データ解析法の開発が進んだ結果、現在では、一度の実験において、数千~数万種のリン酸化の観察が可能になっている (von Stechow et al., 2015)。

近年、観測される全化合物イオンの MS/MS スペクトルを取得するデータ非依存的解析法 (DIA) と呼ばれる方法が普及し始めている。DIA のひとつである SWATH 測定は、Q-TOF 型質量分析計である TripleTOF を用いて行うことができる手法であり、一度に多くのタンパク質を再現性よく定量することができることと期待されている (Gillet et al., 2012)。SWATH 測定では、ペプチドのプレカーサーイオンの測定質量範囲 (例えば m/z 400~1000) を約 25 m/z ごとの window に分け、各 window に対し MS/MS 測定を高速で繰り返す。取得したデータの中には、理論的には全てのプレカーサーイオンに由来する混合 MS/MS スペクトルが含まれ、それらは溶出時間ごとに整理されている。さらに、翻訳後修飾の測定において、修飾部位特異的に生じるフラグメントイオンをクロマトグラム上で観察することにより、ペプチド中の修飾部位を高精度に同定できると期待されている (Gillet et al., 2012)。

SWATH データから定量解析を行うには、あらかじめ同定したペプチドデータのライブラリを作成し、それと比較することにより、混合 MS/MS スペクトル及びそのクロマトグラムからペプチドを同定しなければならない。しかし、全ての修飾部位、特に存在量の少ないもの全てをあらかじめ同定することは現実的には不可能であり、ライブラリの欠損により誤同定が引き起こされる可能性が考えられる。つまり、false localization rate (FLR) が高くなる。

2. 研究の目的

研究代表者は、2005 年より、フィンランドの Turku Centre for Biotechnology (現 Turku Bioscience) において、リン酸化プロテオミクスにおける種々の手法の開発・改良を行ってきた。その中でも特に最近、新たなデータ解析法の開発を進めている。リン酸化ペプチドを酵素的に脱リン酸化し、その MS/MS スペクトルを鋳型として用いることにより、コンピューター上でリン酸化ペプチドをシミュレートすることに成功している (Sun et al., 2015、及び、図 1 参照)。そこで本研究では、SWATH データ解析に対するリン酸化シミュレーションの応用を試みた。SWATH 用ライブラリを作成する前に、独自に開発したソフトウェア SimPhospho (Sun et al., 2018) を用いることにより、ペプチド配列上に起こり得る全てのリン酸化パターンをシミュレートする。その後、様々なデータフォーマットに対応する定量プロテオミクス用ソフトウェア Skyline (Pino et al., 2017) を用いて、ライブラリの作成及びデータ解析を行う。この SimPhospho と Skyline を併用した新規 SWATH データ解析法 (SimSkyline) により、多くのリン酸化部位を同定・定量できるようになるだけでなく、ライブラリの欠損による誤同定を防ぐことができ、FLR の改善につながることを期待した。しかし、現状の SimPhospho アルゴリズムは一リン酸化用に限定されている。

現在のプロテオミクス技術では一度に数万ものリン酸化が観察でき、それら膨大な報告は、PhosphoSitePlus などのデータベースに次々と蓄積されている。本研究では、その部位特異的定量解析をより高精度化することにより、今まで困難であった低存在量リン酸化の変動をも観察可能にす

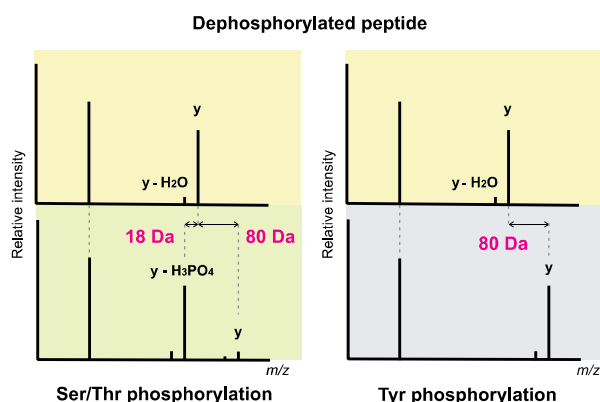


図1 MS/MS スペクトル上での、一リン酸化ペプチドのシミュレーション (フラグメントイオンの予測)

ることを目的とした。リン酸化は細胞内情報伝達の中心を担っており、様々な生体機能の制御に関わっていることから、それらリン酸化の網羅的解析は、今後、生命科学及び医学・薬学のさらなる発展に貢献すると考えられる。

3. 研究の方法

タンパク質リン酸化の部位特異的かつ網羅的な定量法の開発を行った。SimPhospho を応用し、データ非依存的測定法である SWATH 測定によるリン酸化ペプチドの定量解析法を検討した。まずモデルデータを得るため、TripleTOF 6600 を用い、合成リン酸化ペプチドの SWATH 測定を行った。また、合成リン酸化ペプチドを酵素的に脱リン酸化し、データ依存的測定法である IDA 測定を行った。データベース検索ソフトウェア X!Tandem により IDA データから脱リン酸化ペプチドを同定し、それに対し SimPhospho を用いてリン酸化シミュレーションを行った。それらシミュレートされたデータのライブラリを定量解析ソフトウェア Skyline 上で構築し、リン酸化ペプチドの SWATH データを解析した。さらに、脱リン酸化ペプチドの IDA 測定データおよび同定結果に対し、SimPhospho を用いて異なる条件でリン酸化ペプチドをシミュレーションし、SWATH 測定データの解析に用いることで、リン酸化シミュレーション条件の最適化を試みた。

4. 研究成果

TripleTOF 6600 により合成リン酸化ペプチドの SWATH 測定及びそれらの脱リン酸化ペプチドの IDA 測定を行い、モデルデータとした。SimPhospho でリン酸化シミュレーション後にデータフォーマットを一部変更することにより、Skyline の特定バージョンで解析が可能であることが確認された。他のソフトウェアと比較検討したところ、より多くのリン酸化ペプチドを検出することができたが、リン酸化部位の誤同定が多数含まれていた。そこで、Skyline における種々の解析条件を検討したところ、SWATH データからある程度高精度にリン酸化部位を検出することができた。

そこで、SimPhospho を用いて異なる条件でリン酸化ペプチドをシミュレーションし、Skyline での SWATH 解析結果を比較した。その結果、シミュレーション条件によりリン酸化部位同定における精度および感度が大幅に変動することが確認された。最適なシミュレーション条件を用いることにより、SWATH 測定データから 1% FLR と高精度にリン酸化部位を検出することができた。また、それまでは特定バージョンの Skyline でのみ本解析手法を用いることができたが、データフォーマットを一部変更することにより、最新バージョンの Skyline においても互換性を得ることができた。

今後は、シミュレーション条件がリン酸化部位同定にどのように影響し得るのかその関連性を検討し、より最適な解析条件の確立を試みる。また、生体試料などの複雑な SWATH 測定データにおいて、高精度かつ高感度なリン酸化ペプチドの網羅的定量解析を試みていく。

<引用文献>

Gillet et al., *Mol. Cell. Proteomics* 11, O111.016717 (2012); Jensen, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 391-403 (2006); Pino et al., *Mass Spectrom. Rev.* (2017) doi: 10.1002/mas.21540; Suni et al., *J. Proteome Res.* 14, 2348-2359 (2015); Suni et al., *Bioinformatics* 34, 2690-2692 (2018); von Stechow et al., *Expert Rev. Proteomics* 12, 469-487 (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ayano Takai, Tomoya Tsubosaka, Yasuhiro Hirano, Naoki Hayakawa, Fumitaka Tani, Pekka Haapaniemi, Veronika Suni, and Susumu Y. Imanishi	4. 巻 14
2. 論文標題 Optimization of TripleTOF spectral simulation and library searching for confident localization of phosphorylation sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kauko, Imanishi, Kuleskiy, Yetukuri, Laajala, Sharma, Pavic, Aakula, Rupp, Jumppanen, Haapaniemi, Ruan, Yadav, Suni, Varila, Corthals, Reimand, Wennerberg, Aittokallio, and Westermarck	4. 巻 295
2. 論文標題 Phosphoproteome and drug-response effects mediated by the three protein phosphatase 2A inhibitor proteins CIP2A, SET, and PME-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4194-4211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 早川直希、平野裕大、高井彩乃、岩城圭一郎、Veronika Suni、今西進	4. 巻 -
2. 論文標題 リン酸化シミュレーションソフトウェアSimPhosphoを用いたリン酸化部位特異的SWATHデータ解析法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 名城大学総合研究所紀要	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 今西進
2. 発表標題 質量分析によるタンパク質翻訳後修飾の網羅的解析への取り組み
3. 学会等名 第5回日本医用マスペクトル学会西部会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Amon Suzuki, Yasuhiro Hirano, Mina Kawamura, Akihiro Ishizu, and Susumu Y. Imanishi
2. 発表標題 Quantitative proteomics of tuberculosis lung FFPE tissue by SWATH analysis
3. 学会等名 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hinano Tasaki, Mina Kawamura, Seiya Kawahara, Fumihiko Nagano, Ayaka Goto, Kei-ichiro Iwaki, Mai Sakai, Fumitaka Tani, Mie Shimizu, Tomohiro Mizuno, Ken-ichi Harada, and Susumu Y. Imanishi
2. 発表標題 Quantitative proteomics of lethal thrombosis model mice and vascular endothelial cells by SWATH analysis
3. 学会等名 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村 美奈、田崎 ひなの、川原 聖也、酒井 麻衣、長野 文彦、岩城 圭一郎、谷 郁孝、後藤 彩花、水野 智博、清水 美衣、原田 健一、今西 進
2. 発表標題 SWATH測定による致死性血栓症モデルマウスの定量プロテオミクス
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田 千佳、吉見 陽、岩城 圭一郎、後藤 彩花、内田 美月、伊藤 貴博、長谷川 章、北垣 伸治、尾崎 紀夫、今西 進、野田 幸裕
2. 発表標題 統合失調症様モデルマウスにおけるクロザピン反応性タンパク質の同定
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川 直希、平野 裕大、高井 彩乃、岩城 圭一郎、Veronika Suni、今西 進
2. 発表標題 リン酸化シミュレーションソフトウェアSimPhosphoを用いたリン酸化部位特異的SWATHデータ解析法の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川 紗希、Yuan-Chen Tsai、後藤 彩花、平野 裕大、Shiva Tyagarajan、今西 進
2. 発表標題 PRMIによるシナプス後部タンパク質ゲフィリンの日内リン酸化変動解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野 里咲、鈴木 亜門、平野 裕太、石津 明洋、今西 進
2. 発表標題 FPPE肺組織切片に対するSWATH法による定量プロテオーム解析法の条件検討
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 亮樹、高羽 里佳、前田 恭佑、近藤 萌花、田崎 ひなの、衣斐 大祐、平松 正行、今西 進
2. 発表標題 ケタミン投与マウスの大脳皮質及び海馬における抗うつ作用関連分子の探索
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大瀧 優衣、中野 里咲、今西 進
2. 発表標題 TripleTOF 6600を用いた定量プロテオーム解析における試料調製法の条件検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤 萌花、佐藤 亮樹、高羽 里佳、前田 恭佑、田崎 ひなの、衣斐 大祐、平松 正行、今西 進
2. 発表標題 プロテオーム解析を用いたケタミン投与マウスの大脳皮質及び海馬における抗うつ作用関連分子の同定
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 夏帆、早川 直希、平野 裕大、高井 彩乃、岩城 圭一郎、Veronika Suni、今西 進
2. 発表標題 リン酸化シミュレーションソフトウェアSimPhosphoを用いたリン酸化部位特異的SWATHデータ解析法の条件検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉見 陽 (Yoshimi Akira) (00637671)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	スニ ヴェロニカ (Sunī Veronika)		
研究協力者	コータルズ ギャリイ (Corthals Garry)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フィンランド	University of Turku			
スイス	University of Zurich			
米国	University of Pennsylvania			