

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710168
 研究課題名（和文） 定量的リン酸化プロテオミクスによるシグナル伝達ネットワークの解析
 研究課題名（英文） Network analysis of signal transduction by quantitative phosphoproteomics
 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

研究成果の概要（和文）：細胞は外的刺激に対して、様々な応答を示すことが知られているが、その特異性を決定する機構は未だ不明な点が多い。このようなシグナル伝達の本質的な問題を解くために、申請者は細胞内シグナル伝達の担い手であるタンパク質リン酸化の網羅的同定・定量法の開発を行い、数千ヶ所のリン酸化部位の同定・定量を可能とするシステムを構築した。本システムを用いて、様々な細胞株等を用いて各種刺激下でのリン酸化情報を取得し、のべ2,5000カ所以上のリン酸化部位に関する時間依存的な変動情報取得に成功した。

研究成果の概要（英文）：It is well known that cells express various responses to extracellular stimuli, but these mechanisms in which distinct stimuli induce specific response remained poorly understood. To resolve this essential issue concerning signal transduction, I established the system for large scale identification and quantification of protein phosphorylations. Using this system, I obtained quantitative time-resolved information about more than 25,000 phosphorylation sites from several cell lines which were treated with various stimulants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：プロテオミクス

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：シグナル伝達、システム生物学、リン酸化、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

受容体刺激などで引き起こされる細胞内シグナル伝達機構においてタンパク質のリン

酸化が重要な役割を担っていることは周知の事実であり、リン酸化はタンパク質間で受け渡されるシグナルの実体と言っても過言

ではない。様々な状況下で、「いつ」、「如何なるタンパク質」の「どの部位」が「どれくらい」リン酸化を受けているかを網羅的に解析することは、リン酸化を介して活性化するシグナル伝達ネットワークのダイナミクスを計測することと同義であり、シグナル伝達機構のシステム的理解に大いに貢献することが期待される。このような背景から、申請者は細胞内リン酸の網羅的同定および定量を行うための技術開発を行い、数々の要素技術基盤を構築に注力してきた。その結果、極めて特異性の高いリン酸化ペプチド精製技術やハイスループットな定量法の開発を既に成功しており、実際に大規模細胞内リン酸化の解析を行うための準備が整ったことから、本研究を計画した。

2. 研究の目的

細胞は与えられた外的刺激に対して、様々な応答を示すことが知られているが、刺激に対応した特異性を決定する機構は未だ不明である。本研究では、大規模リン酸化プロテオーム解析技術を用いて、様々なシグナル伝達経路をリン酸化を指標に横断的に解析し、各々のシグナル伝達におけるダイナミックな変化を比較することで、その類似点および相違点を抽出し、シグナル伝達経路が特異性を生み出す機構を明らかにする。また、合わせて、キナーゼ特異的阻害剤の効果やシグナル伝達分子のノックダウンなどによるシグナル伝達ネットワークの攪乱を行い、シグナル伝達ネットワーク構造の解明を目指す。

3. 研究の方法

の基盤要素技術を利用して大規模なリン酸化定量プロテオーム解析プラットフォームを構築する。定量法としては、*in vivo* 標識法である SILAC 法と *in vitro* 標識法である iTRAQ 法の二つを採用する。

SILAC 法は、タンパク質の消化やリン酸化ペプチドの精製の前に比較したいタンパク質試料を混合できる。そのため、消化や精製における実験誤差を最小限に抑えることができる。しかしながら、本申請課題においては複数検体間の定量的比較が必要であり、試料混合物を内部標準として利用するなどの工夫を行う必要がある。また、比較する条件が増え、著しいサンプル数の増加を伴うため、ハイスループットな実験手順を選択する必要がある。一般にはイオン交換後に IMAC を行うプロトコルが繁用されているが、申請者らは図 1 に示すような大容量 IMAC とその後のイオン交換クロマトグラフィーによるハイスループット化を検討しており、既存の手法と比較して飛躍的に時間と労力の短縮を実現している。

iTRAQ 法は、トータル質量が同じであるが、

CID による開裂によって MS/MS スペクトル上で異なる質量のリポーターイオンを生じる 4 種類の標識試薬 (iTRAQ 試薬) を用いた標識を行う方法であり、多点間の比較定量が容易である。ただし、iTRAQ 法では、消化・リン酸化ペプチドの精製までを各々のサンプルで独立に操作後、標識を行う必要があり、実験誤差が大きくなりやすい。従って、リン酸化ペプチドの精製の再現性を向上させるための、結合条件の最適化や、消化や精製の前に標準リン酸化タンパク質を添加することとで実験誤差をモニターする方法を考案した。

4. 研究成果

【平成 20 年度】

1) 定量的リン酸化プロテオミクス解析技術の構築

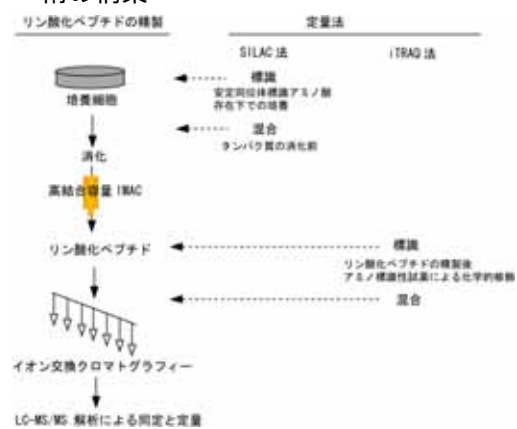


図 1. 定量的リン酸化解析法の流れ

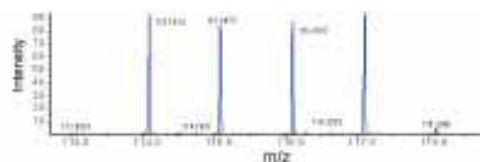


図 2 内部標準リン酸化ペプチドの定量スペクトル

SILAC 法と iTRAQ 法を用いたリン酸化の定量解析をそれぞれ行いその結果を評価したところ、SILAC 法では実験定量誤差は少ないものの、スループットの面で iTRAQ が圧倒的に有利であった。また、iTRAQ 法は *in vitro* 標識法であるためにマウスの組織等の培養不可能な試料でも適用可能であることから、iTRAQ 法の積極的な利用を決定した。しかしながら、iTRAQ 法では精製後のリン酸化ペプチドを標識するために標識前の操作過程で生じる回収量等のバラつきが定量値に反映されてしまうという大きな問題点が生じた。そこで、細胞からタンパク質を抽出してきた時点で、標品リン酸化タンパク質 (ヒト培養細胞に存在しないウシ *-casein*) を添加して、実験誤差のモニターおよび定量値の補正

法を開発した。本方法によって極めて正確にリン酸化ペプチドの大規模定量が可能となった(図2)。

2) 異なる細胞外刺激応答の比較

HeLa細胞を用いて、EGF, およびインシュリンによって活性化される細胞内リン酸化を時間軸を追って変動解析を行った。本解析によってそれぞれ10,000カ所以上のリン酸化の刺激依存的な変化をとらえることが可能であった。刺激依存的に変化するリン酸化はEGFとインシュリンにおいて共通のものが多かったが、そのリン酸化の変化パターンが大きく異なった。また、一部のリン酸化に関しては刺激特異的なものも見出された。

3) キナーゼ機能阻害によるネットワーク攪乱効果の検証

MAPキナーゼ経路、およびmTOR経路を各々に特異的な阻害剤で細胞を処理し、血清刺激後のリン酸化状態を阻害剤非存在下の場合と比較した。その結果、100種類以上のErkの基質候補と、30種類以上のmTORの基質候補を同定した。

【平成21年度】

1) 大規模なリン酸化部位同定・定量情報データベースの構築

前年のEGFおよびInsulin刺激の解析に加えて、アミノ酸、TNFの刺激によって変動するリン酸化の大規模定量情報の取得をおこなった。さらに、Jurkat細胞におけるT細胞受容体刺激、Namalwa細胞におけるB細胞受容体刺激、マウス繊維細胞におけるトロンビン刺激、酸化ストレス刺激、マウス脾臓より純化したB細胞におけるB細胞受容体などの刺激下でのリン酸化情報を取得した。これらのデータをすべて統合し、のべ2,500種類以上のリン酸化部位の情報を含むデータベース(SPIDER)を開発した(図3)。



図3. 定量的リン酸化情報データベース

2) シグナル伝達の攪乱によるキナーゼ基質探索

いくつかのキナーゼ阻害剤やsiRNAによるキナーゼロックダウンでシグナル伝達経路を攪乱した場合のリン酸化の挙動を解析した。これら取得した一連の大規模データを全て統合し、リン酸化モチーフやジーンオントロジーなどの機能情報の付加を行った。さらに、クラスタリングやパスウェイ解析によって各刺激の特異性を規定する要素の選出を行うことで、新規のシグナル経路間のクロストークやフィードバック機構の存在を見いだした。

3) mTORの下流因子の機能解析

前年度に行ったmTOR阻害剤を利用したmTOR下流因子探索の結果、20種類の基質候補分子に関して、機能解析を行った。mTORは細胞の成長に関連することが知られているので、これらの候補分子の過剰発現やロックダウンによって細胞の体積が変化するものを探索した。その結果、複数の分子が過剰発現によって細胞の体積を増加させること、また、ロックダウンによって逆の作用を示すことが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子に関してリン酸化部位の変異株を取得し、細胞成長促進作用が消去されることを確認した。このように定量的リン酸化プロテオーム解析によって重要なキナーゼの下流分子の同定が可能であった。

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5件)

1) Tada, H., Okano, H.J., Takagi, H., Shibata, S., Yao, I., Matsumoto, M., Saiga, T., Nakayama, K.I., Kashima, H., Takahashi, T., Setou, M., Okano, H. Fbxo45, a novel ubiquitin ligase, regulates synaptic activity. *J. Biol. Chem.* 285(6):3840-3849 (2010)

2) Bohgak, M., Matsumoto, M., Atsumi, T., Kondo, T., Yasuda, S., Horita, T., Nakayama, K.I., Okumura, F., Hatakeyama, S., Koike, T. Plasma gelsolin facilitates interaction between beta(2) glycoprotein I and alpha5beta1 integrin. *J Cell Mol Med.* in press (2009)

3) Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S., and Nakayama, K.I. Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or

BCR activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 9, 3549-3563 (2009)

4) Saiga, T., Fukuda, T., Matsumoto, M., Tada, H., Okano, H.J., Okano, H., and Nakayama K.I. Fbxo45 forms a novel ubiquitin ligase complex and is required for neuronal development *Mol. Cell Biol.* 29, 3529-3543 (2009)

5) Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N., and Komada, M. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J. Cell Sci.* 122 678-686 (2009)

〔学会発表〕(計2件)

1) 松本 雅記、小山田 浩二、中山 敬一、定量リン酸化プロテオミクスによるシグナル伝達の包括的解析 第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸

2) 松本 雅記 定量リン酸化プロテオミクスによるシグナル伝達の包括的解析 蛋白質化学会年会, 2009年5月21日 熊本

〔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

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

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：