

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21478

研究課題名(和文)MSサイレンシングによる時空間プロテオミクス

研究課題名(英文)Spatio-temporal proteomics based on MS silencing

研究代表者

石濱 泰(Ishihama, Yasushi)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30439244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的器官や標的1細胞由来のプロテオームのシグナルを選択的に検出し、その時空間情報を一斉取得する手法を確立するため、標的とする局所以外にランダムな化学修飾や酵素修飾を施すことにより質量分析(MS)によってタンパク質を検出できなくする新技術「MSサイレンシング」の開発を目指した。化学修飾については、光反応性アリールジアジリウムを選択した結果、標的タンパク質由来のMSシグナルを1/10以下に減衰させることに成功した。酵素反応では、*in vitro*キナーゼ反応によりタンパク質表面をリン酸基により標識し、その標識率の差からタンパク質構造変化の検出が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞や組織の中には数万種のタンパク質がひしめき合っており、その中である条件をもつタンパク質群のみを選択的に検出する手法を開発することにより、今まで見えなかったものが新たに見えてくる可能性がある。そのため一般的な手法として、今回のMSサイレンシング法の開発に成功した。ここでは、化学反応を用いる方法と酵素反応を用いる方法をそれぞれ開発し、いずれの方法も目的の性能を有していることを証明することができた。今後、様々な応用例に適用されることを期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, to establish a method for selectively detecting signals in the proteome derived from target organs or target cells and simultaneously obtaining their spatiotemporal information, we aimed to develop a new technique called "MS Silencing", a new technology that renders proteins undetectable by mass spectrometry (MS) by applying random chemical or enzymatic modifications outside the target region. For the chemical modification, photoreactive aryl diazirines were selected to attenuate the MS signal from the target protein to 1/10 or less. In the enzymatic reaction, the protein surface was labeled with phosphate groups by *in vitro* kinase reaction, and the protein conformational change could be detected from the difference in the labeling rate.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：質量分析 プロテオミクス タンパク質構造 化学修飾 リン酸化修飾

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

1 細胞ゲノム、トランスクリプトーム解析が実用化した現在、さらに詳細な細胞機能解析を行う上で、1 細胞プロテオーム解析は大きな期待を集めている。多くの研究者がしのぎを削って研究しているにも関わらずまだ技術的に不十分であり、既存の技術をただ最適化し、微小化するだけでは限界があることは自明である。我々が提案する時空間解析手法では、試料の生化学的分画を必要としないように、他の夾雑タンパク質シグナルを完全に排除することが可能であり、従来法と比べて感度、解析深度の両面で大幅な向上を達成することが可能である。これまでに、化学修飾による MS での感度低下を逆手に取った高感度化手法の例はなく、世界初の試みである。世界初の実用的 1 細胞プロテオーム解析プラットフォームの確立に挑戦し、生命科学研究にインパクトを与えるための萌芽研究として本研究を提案した。

2. 研究の目的

近年、単一細胞、単一分子の解析技術が急速に発達し、ゲノム、トランスクリプトーム等の 1 細胞オミクス解析が盛んに行われているが、1 細胞プロテオーム解析技術は未だ確立されていない。本研究では、標的とする局所以外にランダムな化学修飾を施すことにより、質量分析(MS)によってタンパク質を検出できなくする新技术「MS サイレンシング」を提案する。これにより標的器官や標的 1 細胞由来のプロテオームのシグナルを選択的に検出し、その時空間情報を一斉取得する手法を確立する。

3. 研究の方法

MSの急速な高感度化にも関わらず、極微量試料のプロテオーム解析が困難な理由としては、試料前処理過程を未だに前世紀の生化学的手法に頼っているため、試料の大半をロスすることなどがあげられる。つまり、極微量プロテオーム解析法を構築するためには、高感度 MS に適合した、根本的に新しい技術を開発することが必要不可欠である。

近傍に存在する分子に対して効率よく反応する光反応性試薬を用いて標的タンパク質の様々な部位をランダムに化学修飾することで、酵素消化後に生成されるペプチド断片の質量を不規則にかつ複数ピークにシフトさせる。質量分析時のピークが分散し、光の照射を受けなかった未修飾ペプチドのシグナルが選択的に生き残ることで、ネガティブセレクションを行い、結果として標的シグナルを増幅される。本提案では、光反応性試薬を用いた MS サイレンシングの開発を通じて極微量試料、ひいては 1 細胞試料の時空間プロテオーム解析手法の開発を目指す。具体的な項目は以下に示す通りである。

A. 光反応性試薬を用いた MSサイレンシングの確立

化学修飾により生成するペプチドは、未修飾の酵素消化ペプチドと比してイオン化効率が極めて低く、MSシグナルとして検出されにくいように設計される。ジアジリン系光反応性プローブを開始点として、ペプチドに対する反応効率が高いこと、修飾ペプチドのイオン化を抑制する傾向が強いことを主な指標として新しい光反応性試薬の設計・合成を行う。

B. MSサイレンシングを用いた極微量試料の時空間プロテオーム解析

光反応性試薬を細胞内オルガネラに意図的に局在化させることで空間特異的に MS シグナルを消失させ、オルガネラ選択的プロテオーム情報を取得する。特に極微量試料に対し、生化学的な分離手法を省略できる点が特長である。これを実現するために、項目 A において合成した試薬に対して各種オルガネラ局在有機低分子を付与することで、オルガネラ特異的プローブを作成する。

C. MSサイレンシングを用いた標的1細胞プロテオーム解析

MSサイレンシングの最大の利点は、標識が施されたタンパク質由来消化ペプチドのシグナルがMSでの検出時にのみ消失または大幅に減弱することである。解析対象とする細胞のみ光照射を避け、多数の標識細胞と同時に回収、解析を行うことで、光照射により修飾を受けたタンパク質を吸着防止用マトリクスとして利用し、各前処理段階でのロスやLC/MSシステム導入時に起きるロスを防いだうえで、MS検出において標的細胞に由来するシグナルのみを浮き上がらせる。

4. 研究成果

MSサイレンシングの基本原則を示す(図1)。

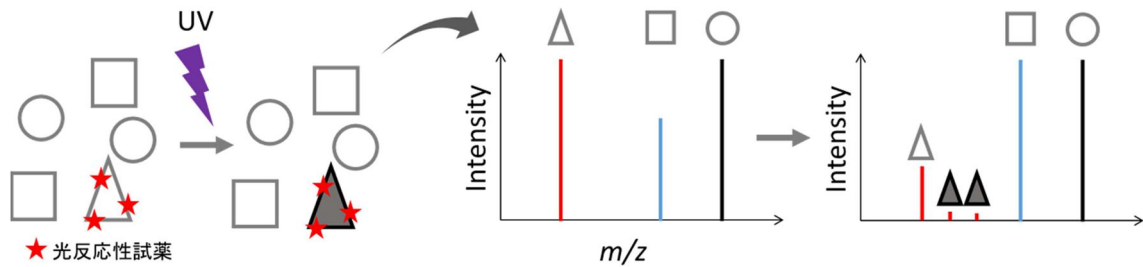


図1. MSサイレンシングによるターゲットペプチドのネガティブセレクション
光反応性試薬により化学修飾を施すことで、MSシグナルの減弱を誘起する

近傍に存在する分子に対して効率よく反応する光反応性試薬を用いて標的タンパク質の様々な部位をランダムに化学修飾することで、酵素消化後に生成されるペプチド断片の質量を不規則にかつ複数ピークにシフトさせる。質量分析時のピークが分散し、光の照射を受けなかった未修飾ペプチドのシグナルが選択的に生き残ることで、ネガティブセレクションを行い、結果として標的シグナルを増幅される。

R2年度は 標的タンパク質に対する反応効率、 化学修飾の標的アミノ酸の多様性を指標に、試薬ならびに反応条件の検討を行った。 タンパク質への反応効率については、化学反応後の試料の測定結果から未反応体タンパク質由来のMSシグナルを抽出し、その減衰率を指標として検討を行った。 標的アミノ酸の多様性については、同じく化学反応後の試料の測定を用い、反応生成物由来のMSシグナルから反応点を同定することで検討を行った。タンパク質消化酵素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、Langlois 試薬、アリアルジアジリンを用いた反応を検討し評価した。化学反応について幅広くスクリーニングを行った結果、光反応性アリアルジアジリンが最も多くの種類のアミノ酸残基と反応したため、 標的アミノ酸の多様性の観点からアリアルジアジリンを選択しさらに検討を行った。反応効率を指標に、試薬濃度、反応温度、照射光強度、光照射時間などの反応条件について詳細に検討を行った結果、標的タンパク質由来のMSシグナルを

ミオグロビン由来ペプチド HGTVVLTALGGILK (3+)

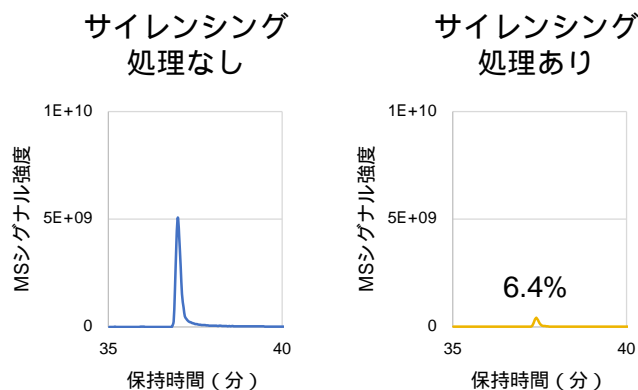
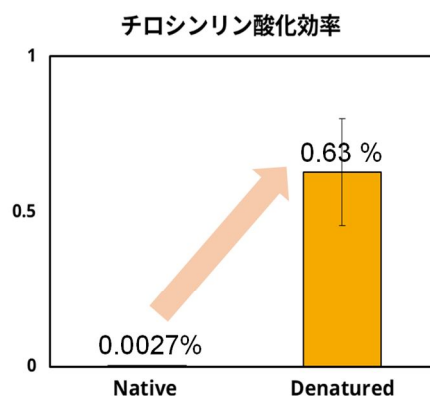


図2 サイレンシング処理によるMSシグナル

1/10 以下に減衰させることが可能であった (図 2)。さらに、その減衰プロファイルからタンパク質の局所環境情報を抽出することが可能であった。

一方、化学反応だけではなく、酵素反応を積極的に用い、標的分子由来の MS シグナルをバックグラウンド分子由来の MS シグナルから切り離す手法について検討した、酵素反応としては約 350 種の酵素に対する反応選択性データ[1]を有する *in vitro* キナーゼ反応を選択した。任意のキナーゼを試料溶液に添加し、ある特性をもつタンパク質表面に選択的にリン酸基を導入し、その標識率の差からタンパク質構造変化の検出が可能かどうかを検討した。原理の実証実験として、キナーゼには組換えチロシンキナーゼ SRC を用い、基質として変性処理を行ったアルブミンと、無処理のアルブミンを用い、*in vitro* キナーゼ反応を行った。その結果、変性処理を行ったアルブミンでは、無処理のアルブミンと比較し、チロシンリン酸化効率が約 200 倍に増加した (図 3)。



* = (チロシンリン酸化ペプチドのピーク面積の合計 / 全ペプチドのピーク面積の合計) × 100

図 3 アルブミンの変性処理のリン酸基導入効率への影響

さらに本手法をアポミオグロビンの熱変性過程に適用したところ、熱変性プロファイルに合致したリン酸化プロファイルを示すチロシン残基と変化を全く示さないものが明確に分かれており、このことから、SRC キナーゼは基質タンパク質の構造変化を認識してリン酸化修飾を行っている可能性が示唆された。

以上より、本研究は当初目指していた 1 細胞プロテオーム解析よりもむしろ構造プロテオーム解析の手法として、その有用性を示すことができた。

<引用文献>

[1] Sugiyama, N.; Imamura, H.; Ishihama, Y., Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. *Sci Rep* 2019, 9 (1), 10503.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Niinae T, Imami K, Sugiyama N, Ishihama Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics	6. 最初と最後の頁 100119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcpro.2021.100119	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 -
1. 著者名 Ogata K, Tsai CF, Ishihama Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Nano-scale solid-phase isobaric labeling for multiplexed quantitative phosphoproteomics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Proteome Res	6. 最初と最後の頁 4193-4202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.1c00444.	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 -
1. 著者名 Kosuke Ogata, Yasushi Ishihama	4. 巻 20
2. 論文標題 CoolTip: Low-Temperature Solid-Phase Extraction Microcolumn for Capturing Hydrophilic Peptides and Phosphopeptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Proteomics	6. 最初と最後の頁 100170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcpro.2021.100170	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 -
1. 著者名 Tsumagari K, Niinae T, Otaka A, Ishihama Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Peptide probes containing a non-hydrolyzable phosphotyrosine-mimetic residue for enrichment of protein tyrosine phosphatases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proteomics	6. 最初と最後の頁 e2100144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pmic.202100144	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 -

1. 著者名 Chia-Feng Tsai, Kosuke Ogata, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama	4. 巻 2
2. 論文標題 Motif-centric phosphoproteomics to target kinase-mediated signaling pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100138	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 -

1. 著者名 Hiroshi Nishida, Yasushi Ishihama	4. 巻 94
2. 論文標題 One-step Isolation of Protein C-terminal Peptides from V8 Protease-digested Proteins by Metal Oxide-based Ligand Exchange Chromatography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anal Chem	6. 最初と最後の頁 944-951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c03722	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 -

1. 著者名 Kosuke Ogata, Chih-Hsiang Chang and Yasushi Ishihama	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Phosphorylation on the Collision Cross Sections of Peptide Ions in Ion Mobility Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mass Spectrom	6. 最初と最後の頁 A0093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspectrometry.A0093	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Peak Identification and Quantification by Proteomic Mass Spectrogram Decomposition
3. 学会等名 10th Asia-Oceania Human Proteome Organization Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Ogata, Chih-Hsiang Chang, Darien Yeung, Victor Spicer, Oleg Krokhin, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Proteomic profiling of peptide collision cross-sections with trapped ion mobility spectrometry
3. 学会等名 10th Asia-Oceania Human Proteome Organization Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 薬学プロテオミクスの最前線
3. 学会等名 第47回BMSコンファレンス(BMS2020/2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Ogata, Chih-Hsiang Chang, Darien Yeung, Victor Spicer, Oleg Krokhin, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Proteome-wide profiling of the position specific amino acid contributions to the peptide collision cross-sections
3. 学会等名 PBA2021 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Protein Terminomics to Uncover Human Proteoform Atlas
3. 学会等名 PBA2021 31st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小形公亮, Chih-Hsiang Chang, Darien Yeung, Victor Spicer, Oleg Krokhin, 石濱泰
2. 発表標題 配列特異的なアミノ酸の相対衝突断面積に基づくペプチドイオンモビリティ予測
3. 学会等名 BMAS2021 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 プロテオーム解析のための基盤技術開発と応用
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 タンパク質プロテオフォームの大規模解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Large-Scale Identification of Protein N- and C-Termini to Profile Human Proteoforms
3. 学会等名 Asian Conference on Analytical Sciences 2021 (ASIANALYSIS 2021)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 ショットガンプロテオミクスのためのペプチド分離
3. 学会等名 クロマトグラフィー次世代技術セミナー2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小形 公亮, Taylor Battellino, Victor Spicer, Oleg Krokhin, 石濱 泰
2. 発表標題 プロテオミクスLC/MS/MSにおける感度向上を目的とした移動相添加剤の検討
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小形公亮、Chia-Feng Tsai、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 シグナル伝達経路解明に向けたキナーゼ基質モチーフ標的型リン酸化プロテオミクス
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石濱泰
2. 発表標題 オミクス解析のための微量分離技術の開発
3. 学会等名 第41回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Analytical challenges to unveil human proteome and proteoforms
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小形公亮
2. 発表標題 キナーゼ基質モチーフ標的型リン酸化プロテオミクス
3. 学会等名 第19回 北里疾患プロテオーム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田朝登、小形公亮、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 In vitroリン酸化タグを用いたタンパク質の構造変化検出法の開発
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 前田朝登、小形公亮、杉山直幸、石濱泰
2. 発表標題 In vitroリン酸化タグを用いたタンパク質の構造変化検出法の開発
3. 学会等名 第3回生体分子分析ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Ogata, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Trypsin Limited Proteolysis Strategy towards in-depth Structural Proteomics
3. 学会等名 第68回アメリカ質量分析学会 (ASMS2020Reboot) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Challenges to unveil human proteoform landscape by shotgun proteomics approaches
3. 学会等名 HUPO Connect 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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 分担者	小形 公亮 (Ogata Kosuke) (80866781)	京都大学・薬学研究科・特定助教 (14301)	

	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	杉山 直幸 (Sugiyama Naoyuki)		
研究 協力者	今見 考志 (Imami Koshi)		

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
---------	---------