

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591168

研究課題名（和文） リン酸化プロテオーム解析による白血病細胞のリン酸化異常の解明および治療への応用

研究課題名（英文） Proteomic analysis of phosphorylation in leukemic cells

研究代表者

嶋田博之（SHIMADA HIROYUKI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80265868

研究成果の概要（和文）：

種々の病型の白血病細胞株（25 種程度）およびレトロウイルス感染系を用いて BCR-ABL を導入したマウス骨髄細胞のトリプシン消化物から、HAMMOC法を用いてリン酸化ペプチドを濃縮し、LC-MS/MS法によりリン酸化タンパク質の同定ならびにリン酸化部位の同定を行った。その結果、BCR-ABL陽性細胞において4500以上のリン酸化部位を同定した。BCR-ABL陰性の白血病細胞株を並べて解析すると、BCR-ABL陽性細胞群から検出したリン酸化蛋白質はクラスターを形成することから、BCR-ABLによって特異的なリン酸化シグナル伝達ネットワークが生じることが示唆された。さらに、BCR-ABL陽性細胞にチロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブを添加すると、① Ras/MAPK経路の活性化に関与するSHC1蛋白質のリン酸化が抑制されること、②自身の活性化を制御する転写因子ATF-2のリン酸化が抑制されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Protein phosphorylation is a crucial regulatory posttranslational modification in eukaryotes. Mass spectrometric methods have been improved to obtain a snapshot of the phosphoproteomes to pave the way for in-depth mapping of phosphorylation sites. By innovating our unique method for phosphopeptide enrichment, we have identified more than 4,500 phosphorylated sites through analysis of BCR-ABL-positive cell, K562. Protein interaction analysis among the phosphoproteins showed unique cellular signaling network in BCR-ABL positive cell. Furthermore, BCR-ABL-positive leukemic cell lines formed a phosphopeptide-cluster in parallel analysis of multiple cell lines, suggesting a unique signaling phosphorylation pathway commonly expressed in BCR・ABL・positive cells. Imatinib induced phosphorylation-status change in BCR-ABL-positive cell, in particular, downregulation of phosphorylated SHC1 (Src homology2 domain-containing-transforming protein C1) which has a role in activating Ras/MAPK pathway, or downregulation of phosphorylated ATF-2 which transcriptional activity is active. In conclusion, our phosphoproteomic approach allows us to study cell signaling networks in relatively high-throughput mode, and can be adapted for a variety of cancer cells in which aberrant phosphorylation signaling is involved.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、白血病発症に関わる多くのキメラ遺伝子や遺伝子変異が同定された。現在白血病をはじめ、がんの分子標的治療薬として臨床応用されている薬剤はもっぱらシグナル伝達異常を標的とした薬剤である。タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達において中心的な役割を果たしており、タンパク質間相互作用の変化や立体構造の変化を誘導することでタンパク質の機能の調節を行っている。細胞内シグナル伝達は経路毎に独立しているわけではなく、複数の経路が合流したり分岐したり複雑に入り組んでおり、また一つのタンパク質に対して複数のリン酸化サイトが存在し、それぞれが異なった経路を担っている場合も多い。したがって、白血病細胞内のシグナル伝達を理解するためには、個々の経路ではなくネットワーク全体の異常を調べる必要がある。またタンパク質単位ではなく、リン酸化部位単位で解析する必要がある。近年の質量分析計 (MS) やその周辺技術の技術革新は著しく、それに伴って MS を基盤技術とするプロテオーム解析技術も飛躍的に発展してきた。その中でも特にリン酸化プロテオミクスは、リン酸化ペプチドの特異的濃縮法が実現したことにより現実的な研究手段となりつつある。今回我々は、細胞抽出物の消化ペプチド混合物から直接リン酸化ペプチドを選択的に濃縮する方法 (hydroxy acid-modified metal oxide chromatography: HAMMOC 法) を用いて、ハイスループットなリン酸化プロテオーム解析を白血病研究に応用する研究の着想に至った。

2. 研究の目的

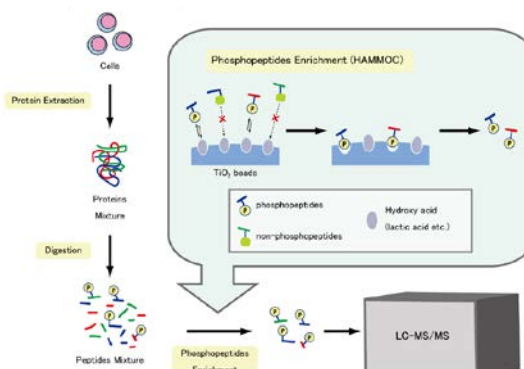
白血病細胞のシグナル伝達異常を、独自で開発した世界最高効率のリン酸化プロテオーム計測技術 (HAMMOC 法) を用いて解析し、白血病細胞の自己複製あるいは不死化の鍵となるシグナル伝達分子を標的とした薬剤を臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) BCR-ABL 陽性白血病細胞株 K562 から抽出した蛋白質を Lys-C、トリプシン、アスパラギンで消化後、HAMMOC 法を用いてリン酸化ペプチドを濃縮。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) によって測定されたペプチド断片のスペクトルから Mascot

データベース検索を用いてリン酸化部位を同定した (図 1)。

図 1



(2) BCR-ABL 陽性細胞のリン酸化プロテオームのスナップショットを得るために、STRING データベースを用いて、物理的および機能的相互作用を解析した。

(3) BCR-ABL 陽性白血病細胞株と BCR-ABL 陰性白血病細胞株を並べてリン酸化蛋白質のクラスター解析を行った。

(4) イマチニブ添加および非添加の白血病細胞株 K562 から抽出した蛋白質を Lys-C、トリプシンで消化後、HAMMOC 法とアミノ基の同位体ジメチルラベル化を用いた定量法を組み合わせて、リン酸化ペプチドの網羅的定量解析を検討した (図 2)。

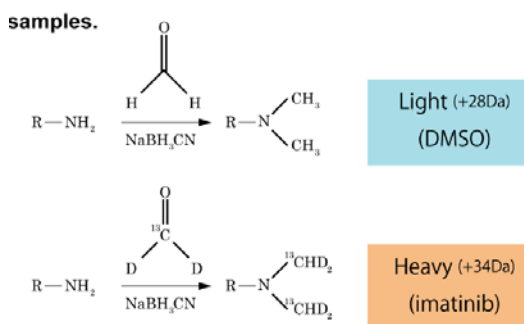


図 2

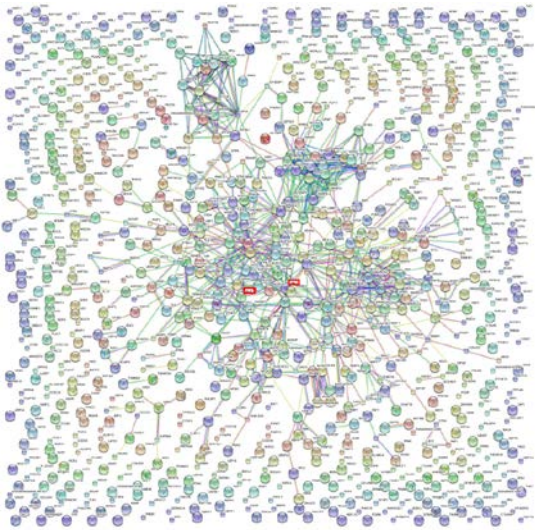
4. 研究成果

(1) K562 から 1901 個のリン酸化蛋白質、4550 個のリン酸化部位を同定した。

(2) BCR-ABL は BCR、ABL、LYN、SHC-1、MAPK1、

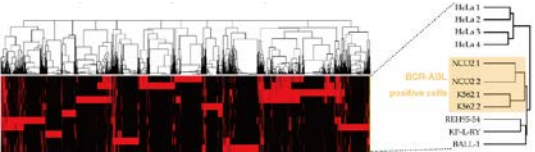
MAPK3、STAT5A、STAT5B、MYC などとグループ化された (図 3)。

図 3



(3) BCR-ABL 陽性白血病細胞株である K562、NOC2 から検出したリン酸化蛋白質はクラスターを形成した (図 4)。

図 4



(4) イマチニブによってリン酸化が抑制される蛋白質を 15 個 (表 1)、誘導される蛋白質を 17 個 (表 2) 同定した。

表 1

Protein	Protein Description	Ratio (L/R)	Peptide sequence	Phosphosite
SPC1	SPK repeat protein complementing 3P-C cells	0.49	SEAAAMPTAGDQLSDEEETTSQEAAR	5586
SAAP	E2F-associated phosphoprotein	0.49	YVDDYFDGSDGDEDAVDVTK	5106, 5111
SMAP	Small acidic protein	0.48	SAIPDQDGLSSNFEADLQNEERK	5117
HBM7	RNA-binding protein 7	0.48	SFSPSPENFGR	5126
HRI18	Putative snr-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase SHC18	0.47	LLDEGSEETVSR	5103, 5106
TB12	182 kDa tankyase-1-binding protein	0.46	ASRPVSDREVEEPPQSR ASRPVSDREVEEPPQSR SPGSPFVVEEPPQSR	51816, 51821 51820, 51821 51820, 51821
RLA1	60S acidic ribosomal protein P1	0.43	KEESEEQQDQKSLD	5179
NCP58	Nucleolar protein 58	0.41	KFSKEEVSQGEAEVQK	5566, 5570
SFR19	Splicing factor arginine-serine-rich 19	0.35	YRGRSPAPAPAPAAAGPPTK	5488, 5509
LA	Luciferase protein	0.33	FAGDDEKDEKDSGATGPK FAGDDEKDEKDSGATGPKR	5386 5386
USX7	USX domain-containing protein 7	0.27	SESLDHSDESOLEAAR SESLDHSDESOLEAAR	5276, 5289 5286, 5288
TPK	Nucleoprotein TPK	0.17	TGGFAEAPQVAVGPR	52155
NCP81	Nuclear cap binding protein subunit 1	0.11	TGDANETDEKLELQK	5122
TP1B	Transcription intermediary factor 1-beta	0.10	RSAGSEVEVQLAR	5473
SHC1	Src-homology 2 domain-containing-transforming protein 1	0.00	ELFDQSDVAVGLDQ	7427

表 2

Protein	Protein Description	Ratio (L/R)	Peptide sequence	Phosphosite
HBM10	RNA-binding protein 10	2.11	QLVAAYVGEQDEEGR	5176, 5178
K492	492kDa domain protein kinase type II-alpha regulatory subunit	1.65	SPGSDPGLVPPGR	5176, 560
H90B2	Putative heat shock protein HSP 90-alpha 2	2.45	EDVQDEEESGK	5177
S98M2	Sarcoma arginine represses matrix protein 2	2.45	HGGSPQLATPLSGEPPRPPSASPR	5177, 7400
O5TF1	Osteocalcin-stimulating factor 1	2.43	TLNANEDVLDQEDG TLNANEDVLDQEDG	5213 5212, 5213
TEBP	Phosphatidylethanolamine synthase 3	2.42	SNEDGSDGKQKQK	5212
SVEP	Bifunctional snr-mRNA 3'-end-processing factor SVEP	2.40	VYVQGPLSGSSDSPTK VYVQGPLSGSSDSPTK	5888 5888
ROCK3	Sarcoma/thyrosinase protein kinase ROCK3	2.39	AMPFEDQSDGDFVWQDTK	5125, 5127, 5128
SFB1	Splicing factor 1	2.39	TGDLGPHNEDGSPRPNSEK TGDLGPHNEDGSPRPNSEK	580, 582 580, 589
FPI1	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FPI1	2.38	SHGSPVIVNDEER SRGSPVIVNDEER	7484, 5050 5432
TB02S	TBC1 domain family member 5	2.36	NSGSPVLSGQGR	5541, 5544
NDUN2	NDUN2 cytosolic 5'-3' untriphosphatase NDUN2	2.30	ASGNGPCLAKLQVYAGCDRAGVPPK	5742, 5751
BRE1A	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	2.30	ALVYKPEPDSQNGER	5128
H93GA	Heat shock protein HSP 90-alpha	2.29	ISEDKPEEDVGGDEEK	5283
H49P2	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein	2.17	SLDPSGSDQDQYQK	560, 563
BDP1	Neurokinin biosynthesis protein BDP1	2.08	IGDVFYSGDEEGR	5128, 5127
VME	Vimentin	2.03	SLVASPGQVYTR	554

抑制される蛋白質のいくつかは BCR-ABL によるリン酸化の標的蛋白質であり (図 5)、Ras/MAPK 経路の活性化に参与する SHC1 や BCR-ABL 自身の活性化を制御する転写因子 ATF-2 が含まれた (図 6)。

図 5

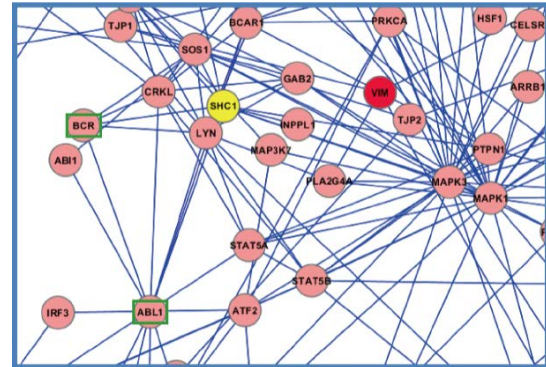
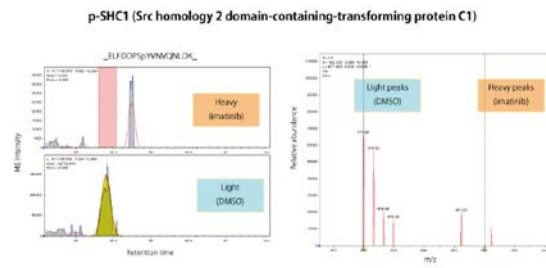
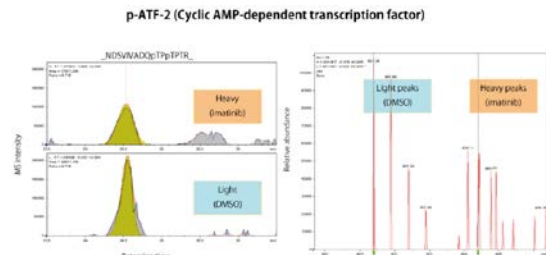


図 6



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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Yoshihara H, Shimada H, Shima H, Tomita M, Ishihama Y. Phosphoproteomic profiling of leukemia cells. 15th European Hematology Association congress. June 11, 2010. Barcelona, Spain.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 博之 (SHIMADA HIROYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80265868

(2) 研究分担者

吉原 宏樹 (YOSHIHARA HIROKI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90348706

嶋 晴子 (SHIMA HARUKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80424167

(3) 連携研究者

石濱 泰 (ISHIHAMA YASUSHI)

京都大学・薬学研究科 (研究院)・教授

研究者番号：30439244

北林 一生 (KITABAYASHI KAZUO)

国立がんセンター・分子腫瘍学部・部長

研究者番号：20261175