

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710218

研究課題名（和文） 高感度細胞表面抗原マーカー検出に向けたエピトープ領域の網羅的同定

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of cell-surface antigen presenting proteins

研究代表者

増田 豪 (MASUDA TAKESHI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号：70383940

研究成果の概要（和文）：細胞表面抗原タンパク質を網羅的に同定するために、ショットガンプロテオーム解析に適した前処理方法を構築した。LC-MS/MSを用いたショットガンプロテオーム解析はタンパク質の網羅的解析に有用であるが、膜タンパク質である細胞表面抗原タンパク質は疎水性が高く、存在量が少ないため網羅的解析が困難なタンパク質群である。これらのタンパク質の同定効率を改善するために、本研究では膜タンパク質同定に適した消化酵素の組み合わせ予測やショットガンプロテオーム解析に適した細胞分画法、迅速消化カラム、高感度分析カラムの開発を実施した。これらの前処理法を用いることで、わずか0.5 μ gのタンパク質試料から209種類の膜貫通タンパク質が同定され、効果的に細胞表面抗原を同定できると期待された。

研究成果の概要（英文）：The expression patterns of cell-surface presenting proteins are different depending on each cell type. This information has been used for identification of cell types, the typing of cancer stem cells and so on. In this study, to profile the patterns of several cell surface proteins with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based shotgun proteomics, I constructed the subcellular fractionation protocol, rapid digestion protocol and highly sensitive analytical system on LC-MS/MS. By using these analytical systems, membrane proteins were successfully enriched, and 209 transmembrane proteins were identified from only 0.5 μ g of HeLa cell proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：細胞表面抗原、ショットガンプロテオミクス、膜タンパク質、相間移動可容化剤、リン酸化プロテオミクス、細胞分画

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体は約 200 種類の細胞から構成されており、細胞ごとに発現している膜タンパク質の種類が異なる。近年、これらのタンパク質は抗体による細胞種の同定および細胞の分画だけでなく、幹細胞の分化マーカーとしても利用されている。またプロテオミクスにおいても抗体による細胞分画法を用いた単一細胞群に限定した解析が行われている。一方、ヒト膜タンパク質は5000種以上あるのに対し一般的に利用可能な抗体はそこまで達していない。より多くの細胞種を精確に同定・分画するためには高感度かつ多様な抗体を作成することが不可欠である。これまで細胞表面抗原に対する抗体は細胞を抗原として樹立されてきたが、この方法だと発現量が少ない膜タンパク質に対する抗体は樹立されにくい。そこで、効率よく抗体を作成するために、細胞外領域を組換えタンパク質もしくは合成ペプチドとして調製し抗原とする方法が用いられている。この場合、細胞外領域は実験もしくはアミノ酸配列を元にした予測により決定されるが、細胞外領域を正確に予測することは困難である。また、膜タンパク質トポロジーデータベースには114種類のヒト膜タンパク質しか掲載されておらず、実験的に同定されたトポロジー情報は非常に乏しく、膜タンパク質の細胞外領域は実験的に明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では細胞表面抗原を高感度に認識する抗体の作成効率を向上させるために、ヒト膜タンパク質の細胞外(エピトープ)領域を実験的かつ網羅的に同定する技術を開発することを目的とした。細胞表面抗原を認識する抗体は幹細胞から分化した細胞種やガン幹細胞、白血病細胞のタイピングなどに必須なツール

である。多様な細胞種を正確に分類するためには種々の細胞表面抗原を高感度に検出できる抗体の樹立が求められている。本研究で得られた情報は再生医療だけでなく抗体医薬品の開発や構造生物学, 細胞生物学等広い学術分野に寄与できる。

3. 研究の方法

本研究ではヒト膜タンパク質のエピトープ領域を網羅的に同定するために、初年度に基礎技術の開発を行った。申請者は 2008 年に相間移動可容化剤を用いた膜プロテオーム解析法を開発しており、この手法を本研究の基盤技術として以下の項目について実験を行った。

(1) 複数の消化酵素を用いた細胞外領域の網羅的同定法の開発。

(2) トリプシン固定化カラムを用いた膜プロテオーム解析法の迅速・高効率化。

(3) 極細分析カラムを用いた LC-MS/MS の超高感度化。

(4) 細胞分画法の開発

4. 研究成果

(1) 細胞外領域を同定するには複数ある消化酵素の中から最も多く細胞外領域を検出できる酵素を選別する必要があるが、実験的に確認するには組み合わせが多く効率が悪い。そこで、*in silico*で同定結果を予測し(表1)、実験的に確認する候補を絞った。Lys-C とキモトリプシンが最適な組み合わせであり、88%の膜タンパク質の細胞外領域を同定できると予測された。その他、膜タンパク質の同定数が多い5種類の組み合わせについて実験的に確認したところ、トリプシンと Lys-C の組み合わせが最も同定効率が高かった。

	膜貫通タンパク質			全てのタンパク質	消化酵素
	細胞外領域	膜貫通領域	全領域		
	4174	1635	5258	20134	Trypsin
	3190	405	4829	19004	Lys-C
	3280	186	4892	19183	Lys-N
	4237	1490	5230	20105	V8
	4621	3162	5271	20151	Chymotrypsin
	4174	1635	5258	20134	Trypsin/Lys-C
	4148	1631	5260	20144	Trypsin/Lys-N
	4587	2587	5251	20191	Trypsin/V8
	4589	2897	5264	20174	Trypsin/Chymotrypsin
	4453	2116	5260	20170	Lys-C/V8
	4636	3056	5272	20204	Lys-C/Chymotrypsin
	4468	1935	5262	20162	Lys-N/V8
	4632	3000	5271	20204	Lys-N/Chymotrypsin
	4547	2993	5268	20191	V8/Chymotrypsin
	4587	2587	5251	20191	Trypsin/Lys-C/V8
	4589	2897	5264	20174	Trypsin/Lys-C/Chymotrypsin
	4557	2564	5246	20168	Trypsin/Lys-N/V8
	4556	2861	5256	20151	Trypsin/Lys-N/Chymotrypsin
	4291	2710	5230	19960	Trypsin/V8/Chymotrypsin
	4458	2882	5262	20136	Lys-C/V8/Chymotrypsin
	4291	2710	5230	19960	Trypsin/Lys-C/V8/Chymotrypsin
	4232	2688	5216	19869	Trypsin/Lys-N/V8/Chymotrypsin

表1 各消化酵素の組み合わせにおける LC-MS/MS で観測可能なタンパク質の数

(2) 実験の効率を上げるために、消化時間を短縮した。まず、Sigma、GL サイエンスおよびABI 社から販売されているトリプシン固定化ビーズの性能を評価した。その結果、ABI 社の Poroszyme Trypsin beads を使用することで、タンパク質の同定数を減らすことなく、消化時間を 12 時間から 15 分に短縮できた。申請者はスピンカラムの先端に詰めるガラスキャピラリーの内径、長さ、遠心力、遠心時間および beads の充填量を最適化し、最終的に、beads を内径 75 μm 、外径 375 μm ガラスキャピラリーを詰めたゲルローディングチップに充填し、100 x g で 15 分間処理することで最適な結果が得られた。

(3) 分子数の少ない膜タンパク質でも感度良く同定するには、現状の分析システムでは感度が低い。試料導入時の回収率および分析カラムの微小化を試みた。試料導入時の回収率を改善するため、カラムローダーを用いて試料を直接分析カラムに導入した。導入時の試料量、試料溶媒および溶媒組成などを最適化することで同定効率が 2 倍に改善した。また、分析カラムの内径を 0.25 倍に細くすることで感度を 4 倍に促進させた。内径の細かいカラム内で充填材が目詰まりを起こさないように、内径 25 μm の分析カラム先端に 100 μm 長程度の多孔性ガラスフリットを調製した。ガラスフリット調製時の加熱時間を最適化することで(図 1)、再現性よく安定して高感度カラムを作成できるようになった。本実施事項で構築された高感度分析システムを使用することで、従来の LC-MS システムに比べて感度が 80 倍に改善し、同定数は約 5 倍に上昇した。このシステムはプロテオームだけでなく LC-MS を用いる他の分析にも応用可能である。この技術は 2011 年の原著論文および 2012 年の総説で報告した(発表論文 5 および 3)。

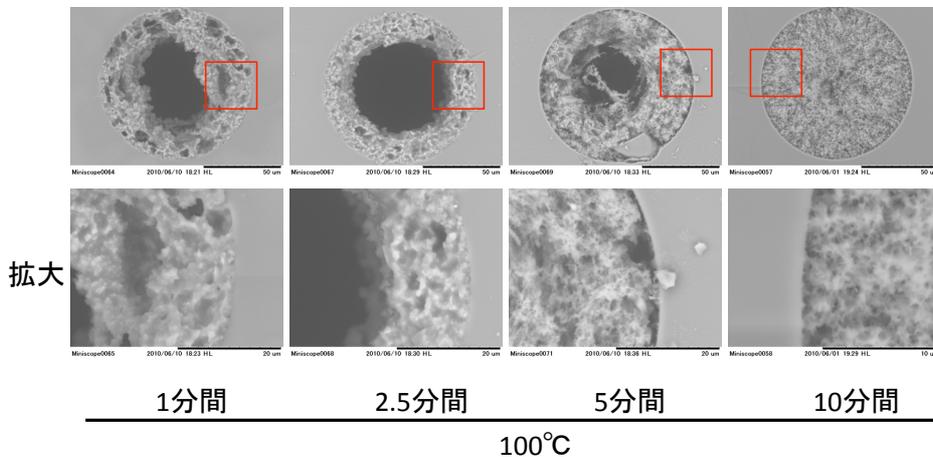


図1 ガラスフリット調製の最適化

(4) デオキシコール酸ナトリウム (SDC) およびラウロイルサルコシン酸ナトリウム (SLS) を用いることで、細胞を細胞質基質、細胞内小器官および核画分に分画できた (図2)。本方法では相間移動可溶化剤であるSDCおよびSLSを用いている。したがって、ショットガンプロテオーム解析の前処理に分画試料を直接使用できるため回収率が高い。また、抗体を用いて分画精度を評価したところ、細胞表面抗原であるCD44は予想した通り細胞内小器官画分に濃縮された。同時に細胞質基質タンパク質、小胞体および核タンパク質であるLDHAやCalnexin、Lamin A/Cはそれぞれ細胞質基質、細胞内小器官および核画分にそれぞれ濃縮された。本方法の効果は細胞分画により各タンパク質の細胞内局在を網羅的に解析できるだけでなく、分画することで試料に含まれるタンパク質の種類が減少し、LC-MS/MSにおけるペプチドおよびタンパク質の同定効率が2倍に改善した。本分画方法をHeLa細胞に適用し、細胞膜が含まれる細胞内小器官画分をショットガンプロテオーム解析に用いたところ、わずか0.5 μgのタンパク質試料から13種類の細胞表面抗原を含む合計209種類の膜貫通タンパク質が同定された。さらにリン酸化プロテオーム解析を組み合わせたところ、リン酸化CD44の核移行 (図3) や核ラミナの脱重合など翻訳後修飾依存的な細胞内局在変動を観察できた。本手法は回収率が高く、既存の方法 (S-PEK、Millipore社) よりも分画精度が高いだけでなく、これまで精確に分画できなかった少ない試料 (10⁵個の細胞) にも適用可能だった。この方法を用いることで、効率よく細胞表面抗原の同定が可能となった。本技術について2012年8月に特許申請を行った。

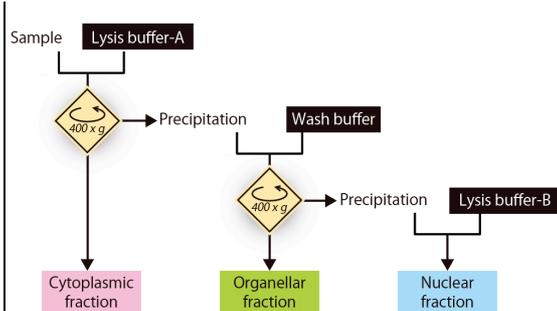


図2 ショットガンプロテオーム解析にも適した細胞分画法

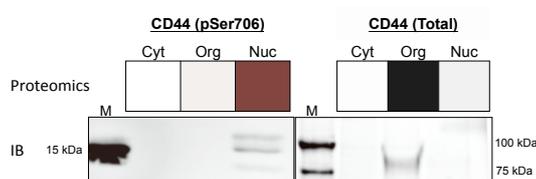


図3 CD44のリン酸化修飾による核以降

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 5 件)

1. Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Shio Watanabe, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, Takeshi Tomonaga, In-depth Membrane Proteomics Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List, *Journal of Proteome Research*, V12, No.1, p208-213, 2013. 査読あり.
2. Jun Namiki, Sayuri Suzuki, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, Hideyuki Okano, Nestin Protein Is Phosphorylated in Adult Neural Stem/Progenitor Cells and Not Endothelial Progenitor Cells, *Stem Cells International*, doi: 10.1155/2012/430138, 2012. 査読あり.

3. Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, Construction of a Microscale Phosphoproteomics System with High Sensitivity, *BUNSEKI KAGAKU*, V61, No.6, p459-467, 2012. 査読あり.
4. Kiyofumi Hamashima, Kousuke Fujishima, Takeshi Masuda, Junichi Sugahara, Masaru Tomita, Akio Kanai, Nematode-specific tRNAs that decode an alternative genetic code for leucine, *Nucleic Acids Research*, V40, No.8, p3653-3662, 2012. 査読あり.
5. Takeshi Masuda, Naoyuki Sugiyama, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama, Microscale phosphoproteome analysis of 10000 cells from human cancer cell lines, *Analytical Chemistry*, V83, No.20, p7698-7703, 2011. 査読あり.

[学会発表] (計 17 件)

1. 佐藤朝子, 増田豪, 富田勝, 伊藤隆, 金井昭夫, 超高熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* における 3 タイプの RNA リガーゼと試験管内 tRNA 断片連結再構成系の構築, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年. (共同発表)
2. Kian-Kai Cheng, Baek-Seok Lee, Takeshi Masuda, Junko Fujikura, Takuro Ito, Kazutaka Ikeda, Jiyang Dong, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita, Bernhard Ø. Palsson, Martin Robert, Metabolic response of *Escherichia coli* adapted to growth on a glycerol minimum medium, *Foundations of Systems Biology in Engineering 2012*, Tsuruoka, 2012, October 22 (共同発表).
3. Takeshi Masuda, Naoyuki Sugiyama, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama, Development of a subcellular fractionation protocol using phase transfer surfactants, *11th Human proteome organization Annual World Congress*, Boston, 2012, September 11 (口頭発表).
4. 増田豪, 相間移動可溶化法を用いたショットガンプロテオーム解析, 第 10 回北里疾患プロテオーム研究会, 北里大学, 2012 年 8 月 23 日 (口頭発表).
5. 増田豪, ショットガンプロテオミクスのための相間移動可溶化法の開発, 日本プロテオーム機構 第 10 回大会, 東京, 2012 年 7 月 26 日 (受賞講演).
6. 増田豪, 杉山直幸, 富田勝, 石濱泰, 相間移動可溶化剤を用いた新規細胞分画法の開発と応用, 日本プロテオーム機構 第 10 回大会, 東京, 2012 年 7 月 26 日 (ポスター発表).
7. Kiyofumi Hamashima, Kosuke Fujishima, Takeshi Masuda, Junichi Sugahara, Masaru Tomita, Akio Kanai, nev-tRNA: A novel nematode-specific tRNA that decodes an alternative genetic code for leucine, *The 17th Annual Meeting of the RNA Society*, Michigan, 2012 (共同発表).
8. Asako Sato, Takeshi Masuda, Masaru Tomita, Takashi Itoh, Akio Kanai, Biochemical Characterization of Three RNA Ligases from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*, *The 17th Annual Meeting of the RNA Society*, Michigan, 2012 (共同発表).
9. Takeshi Masuda, Yasuyuki Igarashi, Masaru Tomita, Jun Namiki, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, Highly sensitive LC-MS/MS analysis of phosphorylated peptides in minimal number of cells, *60th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, Vancouver, 2012, May 24 (口

頭発表).

10. Kiyofumi Hamashima, Kosuke Fujishima, Takeshi Masuda, Junichi Sugahara, Masaru Tomita, Akio Kanai, nev-tRNA: A novel non-canonical type of tRNA in nematodes decodes an alternative genetic code for leucine, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011. (共同発表)

11. 若林真樹, 増田豪, 石濱泰, 高感度 LC-MS/MS システムを用いた極微量組織試料のプロテオーム解析技術の確立, 第22回クロマトグラフィー科学会議, 仙台, 2011年. (共同発表).

12. 金井昭夫, 竹末可奈子, 佐藤朝子, 増田豪, 富田 勝, 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* における3種の RNA ligase の性状解析, 第84回 日本生化学会大会, 京都, 2011年. (共同発表).

13. 増田豪, 杉山直幸, 石濱泰, タンパク質の抽出と分画, 日本プロテオーム機構第9回大会, 新潟, 2011年7月28日. (招待講演).

14. 増田豪, 五十嵐康之, 富田勝, 並木淳, 杉山直幸, 石濱泰, 高感度リン酸化プロテオーム解析システムの開発, 日本プロテオーム機構第9回大会, 新潟, 2011年7月29日 (ポスター発表).

15. 若林真樹, 塚原麻衣, 吉原宏樹, 増田豪, 石濱泰, 微量組織試料に対する定量的リン酸化プロテオーム解析法の確立, 日本プロテオーム機構第9回大会, 新潟, 2011年7月29日. (共同発表).

16. Natsumi Saito, Kenji Nakahigashi, Takeshi Masuda, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita, Metabolic shifts under the stringent response in *Escherichia coli*, 7th International Conference of the Metabolomics Society, Cairns, Australia,

2011, (共同発表).

17. Takeshi Masuda, Yasuyuki Igarashi, Masaru Tomita, Jun Namiki, Yasushi Ishihama, Highly Sensitive Phosphoproteome Analysis of a Minute Number of Cells, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Denver, 2011. (ポスター発表).

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1)

名称: 獣毛繊維の鑑別方法

発明者: 増田豪

権利者: 一般社団法人ニッセンケン評価センター

種類: 特許

番号: 2013-052625

出願年月日: 2013年3月15日

国内外の別: 国内

2)

名称: エチレングリコール及び界面活性剤を含む溶液を用いた細胞分画法

発明者: 増田豪, 杉山直幸

権利者: 学校法人 慶應義塾

種類: 特許

番号: 2012-183398

出願年月日: 2012年8月22日

国内外の別: 国内

[その他]

(賞2件)

1. 奨励賞、日本プロテオーム学会、2012年。

2. 2011 JHUP0 Best Poster Award、高感度リン酸化プロテオーム解析システムの開発、日本プロテオーム学会、2011年。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 豪 (MASUDA TAKESHI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号: 70383940