

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 3 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790889
研究課題名（和文） 定量プロテオミクスに基づく心筋症発症を規定する分子ネットワークの網羅的解析
研究課題名（英文） Comprehensive analysis of cardiomyopathy-related signaling networks based on quantitative phosphoproteomics
研究代表者
若林 真樹（WAKABAYASHI MASAKI）
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：70552024

研究成果の概要（和文）：本研究では再現性、網羅性、定量性を担保し、組織中のタンパク質を抽出する手法を確立した。本手法を最適化したリン酸化ペプチド濃縮法と組み合わせ、LC-MS/MS 測定に供することで、2種類の心筋症モデルマウスとその対照マウスの心臓組織から約 6000 のリン酸化ペプチドを同定することに成功した。これらすべてのペプチドの定量比較を行ったところ、全体の約 20% 程度のリン酸化ペプチドにおいて、2 倍以上の変化がみられることが明らかとなった。これらの情報から病態を誘発しうるシグナルネットワークの同定を進めている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, a novel method for reproducible, unbiased, and quantitative extraction of tissue proteins was successfully developed. Using this method combined with an optimized protocol for phosphopeptide enrichment and LC-MS/MS analysis, more than 6,000 phosphopeptides were identified and quantified from two kinds of mouse models for cardiomyopathy and a control one, and 20% of the identified peptides showed more than two-fold changes in MS signals. From these data, I am attempting to identify specific signal networks closely related to the onset and development of cardiomyopathy.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：プロテオミクス・ペプチド科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋症・リン酸化プロテオミクス・定量プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

心筋症は、心内腔の拡大と収縮不全を呈する拡張型心筋症と、心室壁の肥厚による拡張傷害を主徴とする肥大型心筋症に大別される。拡張型心筋症は慢性進行性のことが多く、予後不良の疾患であり、肥大型心筋症も若年発症例では非常に予後が悪く、これらの疾患の原因究明・有効な治療法の開発は急務とな

っている。

現在までに、心筋症を発症する要因となる遺伝子変異が多数報告され、肥大型心筋症の約 6 割、拡張型心筋症の約 2 割程度の症例で変異が認められることが明らかとなっている。しかし、その遺伝子変異は心筋の収縮単位であるサルコメアや Z 帯の構成タンパク質などに非常に多数見られるほか、拡張型心筋

症ではカルシウム代謝に関わるタンパク質や転写因子などでも認められ、非常に多岐にわたっている。また、同一遺伝子の変異でも肥大型、拡張型の両表現型を示す例があること、肥大型心筋症の拡張相への移行がしばしば見られること、既知の遺伝子変異が認められない症例が未だ多数存在することなどに鑑みれば、それぞれの病態形成が単一の病態因子にのみ依存しているとは考えにくい。従って、様々な病態が進展し心筋症という表現型に収束していく分子機構を、タンパク質レベルで明らかにすることが非常に重要な課題であると考えられる。しかし、遺伝子変異に関する解析が幅広く行われているのに比べ、タンパク質レベルで心筋症発症機序に関する網羅的解析が行われた報告は少ない。いくつかのタンパク質では心筋症病態において上方制御、下方制御されるとの報告がなされているが、これらはごく一部にすぎず、その全容は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子変異を含む様々な病態誘発因子が最終的に心筋症という表現型を引き起こす分子機構を、プロテオーム解析を用いて解明し、治療戦略へと応用することを目指した。具体的には、心筋症様症状を呈する各種モデル動物から採取した心臓のプロテオームを解析し、対照群と比較することで病態特異的に発現量が変動するタンパク質を網羅的に同定する。また、リン酸化されたタンパク質を特異的に濃縮し、そのプロテオームを比較することで、活性が変動するシグナル伝達経路を推定し、新たな薬剤の標的となる分子の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) タンパク質抽出法の確立

測定用試料からタンパク質を効率よく、また再現性良く回収することは、プロテオーム解析を行う上で最も重要な検討事項の一つである。特に組織試料の場合、精製タンパク質や培養細胞試料などと比べ、均一な試料を作成することや、全てのタンパク質を偏りなく回収することがより困難であるため、再現性良く、不偏的にタンパク質を回収する方法の確立が必須となる。

まず初めに、マウスの肝臓・心臓組織に対して、Qproteome、Rapigest、Liqued Tissue、の三種の市販されているタンパク質抽出試薬と、細胞試料からの高効率タンパク質抽出法としてわれわれが開発した相間移動可溶化剤（デオキシコール酸ナトリウム・ラウロイルサルコシン酸ナトリウム混合溶液）を用いて組織からのタンパク質抽出効率の比較を行った。続いて、メタノールによる組織固

定や煮沸、超音波破砕が抽出効率に与える影響を検討した。

また、ヒト心筋症試料の入手は非常に困難であることから、保存試料の適時的解析を可能とするために、凍結保存組織やホルマリン固定パラフィン包埋組織からのタンパク質抽出効率に関しても同様の検討を行った。

(3) リン酸化プロテオーム解析

ペプチド同定・定量用 LC-MS/MS システムとして、Ultimate 3000 (Dionex) と TripleTOF5600 (ABSCIEX) もしくは Qstar-XL (ABSCIEX) を用いた。使用した移動相とグラジエント条件を以下に記す。(A) 0.5% acetic acid, (B) 80% acetonitrile + 0.5% acetic acid. ①5-10% B in 5 min, 10-40% B in 60 or 240 min, 40-100% B in 5 min, and 100% B for 10 min

各試料について、タンパク質 100 もしくは 200 μ g からリン酸化ペプチド濃縮を行い、LC-MS/MS による測定を行った。さらに、各測定において同定したリン酸化ペプチドの質量電荷比と LC の保持時間情報を、他の測定データにマッチングさせることで、同定できた全リン酸化ペプチドの定量演算を全ての LC-MS 測定データにおいて行った。

4. 研究成果

(1) タンパク質抽出法の確立

相間移動可溶化剤と既存の 3 種のタンパク質抽出試薬の比較を行ったところ、溶液へのタンパク質抽出効率はその試薬においても大きな差がないことが分かった。しかしながら、相間移動可溶化剤以外の 3 種の試薬においては、質量分析に供する際には必須となる抽出試薬の除去や脱塩過程を経ることで、大量のタンパク質を失った結果、ペプチド同定数が大幅に減少することが分かった (Table. 1)。

さらに、相間移動可溶化剤に直接浸透後、細断、煮沸、超音波処理の手順を施す方法が最も効率よくタンパク質を回収することができ、メタノール固定によるタンパク質回収量の改善は見られなかった。本手法は非常に再現性が高いことに加え、膜たんぱく質など一般的に回収が困難なタンパク質をも不偏的に回収可能であった。

instrument	extraction method	Protein recovery	No. of identified peptides
Qstar XL	PTS	23.6	1943
	Liquid Tissue	22.0	1654
	Qproteome	27.2	-
TripleTOF 5600	PTS	29.9	6457
	Rapigest SF	38.5	2481

Table. 1. 各手法によるタンパク質回収量とペプチド同定数

(3) リン酸化プロテオーム解析

2種類の心筋症モデルマウスとその対照マウスから採取した左心室組織各 200 μ g より、上述の通り最適化した手法を用いてリン酸化ペプチドを濃縮した。テクニカルリプリケートとしてそれぞれ3サンプルずつLC-MS/MSへと供し、全サンプルにおいて同定されたリン酸化ペプチドの定量を行った。結果として、6069のリン酸化ペプチドと4135のリン酸化サイトを同定することに成功した。これらすべてのリン酸化ペプチドの定量比較を行った結果、約20%のペプチドが対照マウスに対して2倍以上の増加もしくは減少を示すことが明らかとなった。これらの結果をもとに、KEGG pathway や DAVID などの情報に基づいた分類を行い、心筋症発症に基づいて変動しているリン酸化シグナルネットワークの推定を行っている。

また、凍結保存組織やホルマリン固定組織のリン酸化プロテオーム解析への有用性を検討するため、各組織から相間移動可溶化剤を用いて抽出したタンパク質 100 μ g を用いてリン酸化ペプチド濃縮を行い、LC-MS/MSに供した。同定したリン酸化ペプチドの種類、量ともに新鮮組織との類似性は非常に高く、遡及的に心筋症試料のリン酸化プロテオーム解析を行えることが示唆された。

以上の結果から、今後心筋症の発症・進展機序をさらに詳細に解明する上で重要な知見を得られるとともに、本手法を応用して、これまでに蓄積されたヒト臨床試料を遡及的に解析することで、さらに有用な情報を得ることが可能となる。

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4件)

(1) Ryota Yamana, Mio Iwasaki, Masaki Wakabayashi, Masato Nakagawa, Shinya Yamanaka, Yasushi Ishihama. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12, 214-221
DOI: 10.1021/pr300837u

(2) Koshi Imami, Naoyuki Sugiyama, Haruna Imamura, Masaki Wakabayashi, Masaru Tomita, Masatoshi Taniguchi, Takayuki Ueno, Masakazu Toi, Yasushi Ishihama. *Temporal Profiling of Lapatinib-suppressed Phosphorylation Signals in EGFR/HER2 Pathways. Molecular and Cellular Proteomics*, 2012, 11, 1741-1757
DOI: 10.1074/mcp.M112.019919

(3) Yoshiaki Nakayama, Naosuke Nakamura, Sayoko Oki, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Ayumi Miyake, Nobuyuki Itoh, Akira Kurosaka. *A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSOR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis. The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287, 32222-32235
DOI: 10.1074/jbc.M112.370932

(4) Haruna Imamura, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama. *Analytical strategies for shotgun phosphoproteomics: status and prospects. Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23, 2012, 836-842
DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.05.007

[学会発表] (計11件)

(1) 若林真樹、塚原麻伊、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、日本プロテオーム学会 2011 年大会、2011/07/28-30、朱鷺メッセ (新潟)

(2) 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、2011/10/20-22、東北大学 (宮城)

(3) Masaki Wakabayashi, Enhanced identification of phosphopeptides by peptide dimethylation coupled with titan chromatography, 60th American Society for Mass Spectrometry Conference, 2012/05/20-24, Vancouver (Canada)

(4) Masaki Wakabayashi, Enhanced identification of phosphopeptides by peptide dimethylation coupled with titan chromatography, Asia Oceania Human Proteome Organization 6th Congress, 2012/05/05-07, Beijing (China)

(5) 若林真樹、微量組織試料のリン酸化プロテオーム解析法、日本プロテオーム学会 2012 年大会 (招待講演)、2012/07/26-27、日本科学未来館 (東京)

(6) 若林真樹、リン酸化プロテオーム計測システムの高感度化と極微量組織試料への応用、第 11 回次世代を担う若手のためのフィジカルファーマフォーラム、

2012/08/06-07、ホテル平安の森京都（京都）

（7）若林真樹、リン酸化修飾シグナル病の解明に向けた極微量臨床試料解析法の構築、第25回バイオメディカル分析化学シンポジウム（招待講演）、2012/08/08-10、慶応大学薬学部（東京）

（8）Masaki Wakabayashi, Highly sensitive phosphoproteome profiling of various human cancers from minuscule amount of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections on slides, HUP0 2012 11th Annual World Congress, 2012/09/09-13, Boston (USA)

（9）Masaki Wakabayashi, In-depth pharmaco-phosphoproteomics using meter-long monolithic columns to evaluate molecular-targeting drugs, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012/09/15-21, 京都国際会館（京都）

（10）若林真樹、ジメチル標識ペプチドのRP-LCにおける保持共同評価と定量プロテオミクスの高効率化、第23回クロマトグラフィー科学会議、2012/11/15-16、長良川国際会議場（岐阜）

（11）若林真樹、リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的薬プロファイリング、日本薬学会第133年会（招待講演）、2013/03/27-30、パシフィコ横浜（神奈川）

[図書]（計1件）

（1）若林真樹、杉山直幸、石濱泰、メディカルドゥ、ナノバイオ技術と最新創薬応用研究、2012、102-108

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 真樹 (WAKABAYASHI MASAKI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：70552024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし