

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659017

研究課題名(和文) 血漿中微量発現プロテオーム濃縮法の開発

研究課題名(英文) Enrichment of low abundant proteome in plasma

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroリン酸化反応とその後のリン酸化ペプチド濃縮により、タンパク質混合物試料中のタンパク質組成を自由に操作し、低発現量タンパク質の検出感度を向上させる新規手法を開発し、血清・血漿プロテオミクスに応用することを目的とし、検討を行った。その結果、高発現血清タンパク抗体カラムによる試料前処理と最適なキナーゼによるin vitroリン酸化反応を組み合わせることにより、ヒト血漿プロテオームデータベースにも同定記録のない、超低発現サイトカイン類の同定が可能となった。さらに、本法を培養細胞中の低発現リン酸化タンパク定量に適用したところ、通常法では不可能であったリン酸化ペプチド定量に成功した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel method to enrich low abundant proteins, in which target proteins are labeled with phosphate by in vitro phosphorylation reaction using selected spiked kinases, followed by phosphopeptide enrichment, for applying to plasma/serum proteome analysis. As a result, by combining the in vitro phosphorylation by optimal kinase with sample treatment by antibody-based serum depletion column, it becomes possible to identify several cytokines with very low expression level in plasma, which have never been reported to identify from plasma by conventional proteomics approaches due to their low abundance. Furthermore, we successfully quantified low abundant phosphorylated proteins in cultured cells by this method, which were not possible by the conventional methods.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：プロテオーム 血漿プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

血漿中タンパク試料は、高発現タンパクと低発現タンパクとの濃度差が  $10^{12}$  倍も違う最も難しいプロテオーム解析対象である一方、バイオマーカー測定試料としては入手しやすく情報も豊富という点から最も重要な試料ソースの一つである。今までに国際プロジェクトが組まれて世界中のプロテオミクス研究者が取り組んできたが、いまだに標準法の設定ができず、プロテオーム解析の中で最もチャレンジングな分析対象となっている。

代表者らは、今までにタンパク質リン酸化修飾にフォーカスしたリン酸化プロテオミクスの新規手法開発に取り組んできたが、その中でリン酸化ペプチド濃縮後に同定されるタンパクリストには、通常のプロテオーム解析ではまれにしか見つからないタンパクを非常に多く含んでいることに気付いた。すなわちキナーゼによるリン酸化修飾反応をうまく利用できれば、発現量の低いタンパクをもっと効率的に同定できるのではないかと考えた。代表者らが蓄積してきた細胞内ヒトリン酸化プロテオーム情報を解析すると、リン酸化は実に7割以上のタンパク質で起きており、これを試験管内で反応させれば、更に多くのリン酸化修飾を起こさせたり、修飾率を向上させたりできる可能性がある。HeLa細胞からの抽出タンパク質混合物に対し、395種の組換えキナーゼをそれぞれ別々に試験管内で反応させ、リン酸化プロテオミクスの手法で解析したところ、合計4,076種のタンパク質が同定され、そのうち1,745タンパク質(43%)は通常のプロテオーム解析では見つかっていない新規同定タンパク質であった。更に詳細に結果を解析したところ、いくつかのキナーゼは同定効率を落とさずに低発現タンパク質をより選択的に修飾していることがわかってきた。そこで本反応を試料中のタンパク組成操作法として一般化し、血漿プロテオーム解析の前処理法として適用することを着想するにいたった。

## 2. 研究の目的

タンパク質混合試料中のタンパク質組成を試料前処理過程で自由に操作し、低発現タンパク質の検出感度を向上させる新規手法を提案する。これは、試験管内におけるキナーゼを用いたアミノ酸配列選択的なリン酸基導入反応と、チタニアのリン酸基に対するケモアフィニティーを用いた濃縮精製法を組み合わせるものである。本手法を血漿プロテオーム解析法に適用する。血漿タンパク質の網羅的解析は、近年発展の著しいプロテオミクスの最先端手法を用いても困難を極めており、世界中で様々な試みがされているが未だに標準法は確立していない。518種のプ

ロテインキナーゼが有する様々なリン酸化モチーフを利用することで、従来の血漿プロテオーム解析では困難な低発現プロテオームの検出感度を向上させ、血漿バイオマーカー探索研究を強力に加速させる。

## 3. 研究の方法

本研究では、最適キナーゼカクテルの選択、試験管内キナーゼ反応効率を最大化する反応条件の探索、標準血漿試料への適用等を行い、血漿プロテオーム解析のための新規前処理法としての可能性を見極める。入手可能な約400種の組換えキナーゼの中から、高発現タンパクへのタグ導入率を抑え、低発現タンパクへの導入効率が高いキナーゼを複数選択し、その組み合わせや混合比を最適化する。また、ATP量、金属塩濃度およびタンパク質の断片化効果などについて検討し、リン酸基導入効率を最大化する。これらの検討結果に基づき最適条件下で血漿試料に適用し、どのような低発現タンパクを同定・定量できるかを検証する。

## 4. 研究成果

キナーゼ反応条件も含めた種々の前処理条件の最適化の結果、高発現血清タンパク抗体カラムによる試料前処理と最適なキナーゼによる *in vitro* リン酸化反応を組み合わせることにより、従来法(無処理・強カチオン交換クロマトグラフィーによる分画)と比較して、より低発現量領域までタンパク質同定のカバー率を向上することができ(図1A)、タンパク質同定数自体を増加させることにも成功した(図1B)。興味深いことにプロテオーム解

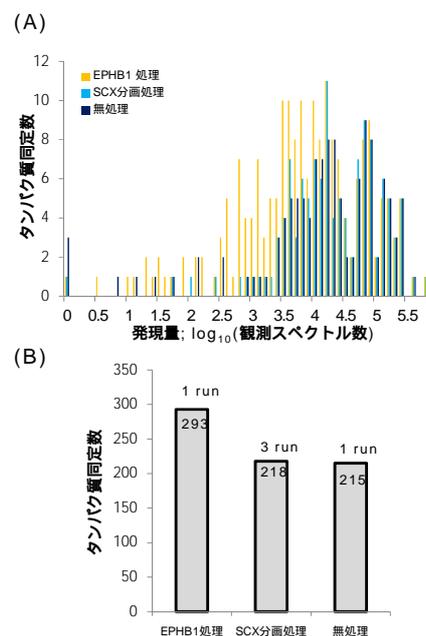
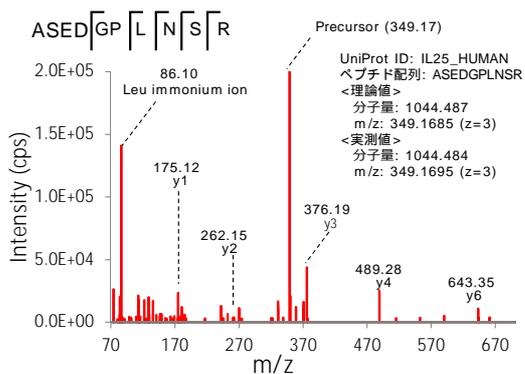


図1 *in vitro* キナーゼ処理の効果

析で最も汎用されている SCX - 逆相系の二次元分離が、カバー率及び同定数の面でほとんど効果を示さないのに対し、本法は1回の分析でカバー率及び同定数を大きく向上させており、強力な複雑性軽減効果を有していることが確認できた。

本法はキナーゼによって基質特異的にリン酸化されたペプチドのみを濃縮することが可能なため、従来法で調製された試料とは含有されるタンパク質の量的プロファイルが異なることが予想された。そこで、従来法と本法で調製した試料中に含まれる各タンパク質の量的プロファイルと比較した。その結果、従来法では上位5タンパク質が占める割合がモル比で88%であったのに対し、本法ではそれが70%に減少していた。これはすなわち、本法では低発現量タンパク質を含む領域が2倍以上に増加していることを示している。タンパク質の量的プロファイルを操作することが可能ということは、タンパク質濃度ダイナミックレンジを変化させることが可能ということであり、本法がヒト血清のように広大なタンパク質濃度ダイナミックレンジを有する試料から低発現量タンパク質を同定する上で強力な手段となり得ることを示している。

複数のキナーゼを用いて低発現量タンパク質の同定を試みたところ、ERK2を用いて調製した *in vitro* リン酸化プロテオーム中から、interleukin 25 (IL25\_HUMAN)を同定することに成功した(図2)。

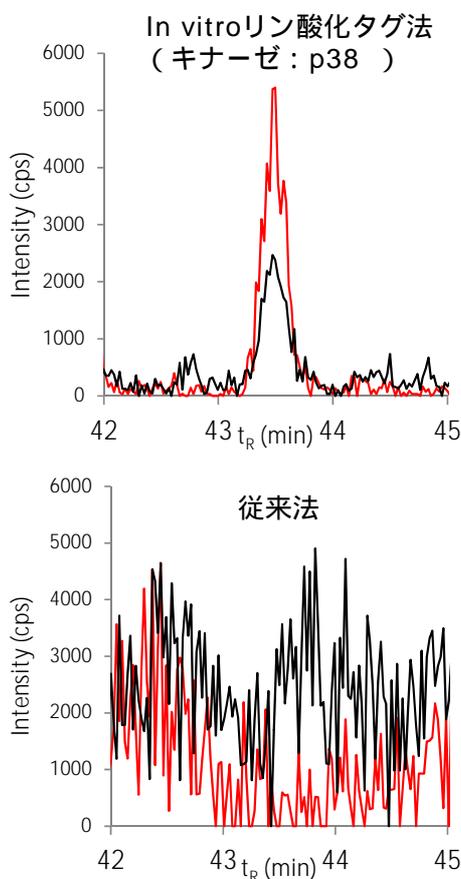


**図2 ERK2を用いた *in vitro* リン酸化タグ法により同定されたヒト血清中 Interleukin 25 由来ペプチドのMS/MSスペクトル**

Interleukin 類は発現量が極めて低いことが報告されており、今回同定された interleukin 25 は現在得られる最大規模の血漿プロテオームデータベース(Human Plasma PeptideAtlas 2012-08)にも同定された記録が投稿されていない。本手法はヒト血清中から低発現量タンパク質を効率よく同定する上で強力な手法

である。

さらに培養細胞中の低発現リン酸化プロテオームの定量解析への応用を検討した。細胞抽出タンパク試料をトリプシン消化し、リン酸化ペプチド濃縮を行ったのち、ホスファターゼを用いて脱リン酸化し、任意のキナーゼによる *in vitro* リン酸化タグ法により、標的ペプチドを濃縮し、LC-MSにて定量した。その結果、試料の複雑性を大幅に軽減することが可能であり、従来法ではイオン化抑制のため検出できなかった低発現リン酸化ペプチドが多数定量可能となった。図3に一例として転写因子 FRA2 由来のリン酸化ペプチド RSpSSSGDQSSDSLNPSTLLAL の抽出イオンクロマトグラムを示す。



**図3 In vitroタグ法と従来法の比較**

EGF刺激(赤)とコントロール(黒)の転写因子FRA-2由来リン酸化ペプチドの抽出イオンクロマトグラム

FRA-2 は HeLa 細胞を EGF によって刺激した際、C 末端ペプチドが特徴的な経時的リン酸化量変動を示すことが報告されている。従来法では試料の複雑性を低減するため、数 10 mg 以上の細胞を用いて 13 画分に分画した後、分析を行っている。一方、本法では、各タイムポイントでサンプルとコントロールにそれぞれ 400  $\mu$ g タンパク質相当のペプチドを用いているため、必要試料量は 3.2 mg であっ

た。本法では、LC-MS 分析前に試料を分画することなく対象ペプチドを定量し、経時的リン酸化量変動を解析することに焦点を当て、p38 $\delta$  処理と無処理間で定量性を比較しながらデータ解析を行った。その結果、無処理では検出が不可能であった FRA-2 由来ペプチドを、p38 $\delta$  処理試料から良好な S/N 比で検出することに成功した。本ペプチドのピークトップ (43.5 分) でのマススペクトルを確認したところ、無処理ではノイズレベルが高く該当するピークが観測されないのに対し、p38 $\delta$  処理ではコントロール群・EGF 刺激群の両ピークが同位体クラスターを含め完全な形で観測された。本法を用いることで無処理では不可能であった経時的リン酸化量変動解析が可能となった。以上より、本法の試料複雑性低減効果による定量性向上効果を確認することができた。

本研究では、測定時間を増大させずに試料の複雑性を軽減し、低発現量タンパク質を解析する手法として *in vitro* リン酸化タグ法を開発した。本法を血清/血漿プロテオームおよび HeLa 細胞リン酸化プロテオームに適用したところ、同定効率及び定量性が向上し、低発現量タンパク質の解析に成功した。本法を用いることで分析時間を増大させることなく同定効率及び定量性を向上させることが可能なため、本法は低発現量タンパク質をハイスループットで解析する上で有効であり、今後創薬やバイオマーカー探索等への応用が期待できる。

## 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 16 件)

Horie, K.; Kamakura, T.; Ikegami, T.; Wakabayashi, M.; Kato, T.; Tanaka, N.; Ishihama, Y., Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Meter-Scale Monolithic Silica Capillary Column for Proteomics LC-MS. *Anal Chem* **2014**, *86* (8), 3817-24, 査読有  
DOI:10.1021/ac4038625.  
Ishihama, Y.; Imami, K., Quantitation of cellular phosphorylation dynamics by phosphoproteomics approaches. *Yakugaku Zasshi* **2014**, *134* (4), 521-7.  
DOI: 10.1248/yakushi.13-00251-4  
Kume, H.; Muraoka, S.; Kuga, T.; Adachi, J.; Narumi, R.; Watanabe, S.; Kuwano, M.; Kodera, Y.; Matsushita, K.; Fukuoka, J.; Masuda, T.; Ishihama, Y.; Matsubara, H.; Nomura, F.; Tomonaga, T., Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected

reaction monitoring and tissue microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* **2014**, M113.037093. 査読有  
DOI: 10.1074/mcp.M113.037093.  
Wakabayashi, M.; Yoshihara, H.; Masuda, T.; Tsukahara, M.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y., Phosphoproteome analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections mounted on microscope slides. *J Proteome Res* **2014**, *13* (2), 915-24. 査読有  
DOI: 10.1021/pr400960r.  
Zhou, Y.; Tanaka, T.; Sugiyama, N.; Yokoyama, S.; Kawasaki, Y.; Sakuma, T.; Ishihama, Y.; Saiki, I.; Sakurai, H., p38-Mediated phosphorylation of Eps15 endocytic adaptor protein. *FEBS Lett* **2014**, *588* (1), 131-7. 査読有  
DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.020.  
Araki, Y.; Ku, W. C.; Akioka, M.; May, A. I.; Hayashi, Y.; Arisaka, F.; Ishihama, Y.; Ohsumi, Y., Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J Cell Biol* **2013**, *203* (2), 299-313. 査読有  
DOI: 10.1083/jcb.201304123.  
Kami, K.; Fujimori, T.; Sato, H.; Sato, M.; Yamamoto, H.; Ohashi, Y.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y.; Onozuka, H.; Ochiai, A.; Esumi, H.; Soga, T.; Tomita, M., Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics* **2013**, *9* (2), 444-453. 査読有  
DOI: 10.1007/s11306-012-0452-2  
Iwasaki, Y. W.; Kiga, K.; Kayo, H.; Fukuda-Yuzawa, Y.; Weise, J.; Inada, T.; Tomita, M.; Ishihama, Y.; Fukao, T., Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. *RNA* **2013**, *19* (4), 490-7. 査読有  
DOI: 10.1261/rna.036608.112.  
Yamana, R.; Iwasaki, M.; Wakabayashi, M.; Nakagawa, M.; Yamanaka, S.; Ishihama, Y., Rapid and Deep Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Proteome by One-shot NanoLC-MS/MS Analysis with Meter-scale Monolithic Silica Columns. *J Proteome Res* **2013**, *12* (1), 214-21. 査読有  
DOI: 10.1021/pr300837u.  
Shiba-Fukushima, K.; Imai, Y.; Yoshida, S.; Ishihama, Y.; Kanao, T.; Sato, S.; Hattori, N., PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep* **2012**, *2*, 1002.  
DOI: 10.1038/srep01002. 査読有  
Imami, K.; Sugiyama, N.; Imamura, H.; Wakabayashi, M.; Tomita, M.; Taniguchi, M.; Ueno, T.; Toi, M.; Ishihama, Y., Temporal profiling of lapatinib-suppressed

phosphorylation signals in EGFR/HER2 pathways. *Mol Cell Proteomics* **2012**, *11* (12), 1741-57. 査読有  
DOI: 10.1074/mcp.M112.019919.  
Hu, C. W.; Lin, M. H.; Huang, H. C.; Ku, W. C.; Yi, T. H.; Tsai, C. F.; Chen, Y. J.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y.; Juan, H. F.; Wu, S. H., Phosphoproteomic analysis of *Rhodospseudomonas palustris* reveals the role of pyruvate phosphate dikinase phosphorylation in lipid production. *J Proteome Res* **2012**, *11* (11), 5362-75.  
DOI: 10.1021/pr300582p. 査読有  
Namiki, J.; Suzuki, S.; Masuda, T.; Ishihama, Y.; Okano, H., Nestin protein is phosphorylated in adult neural stem/progenitor cells and not endothelial progenitor cells. *Stem Cells Int* **2012**, *2012*, 430138. 査読有  
DOI: 10.1155/2012/430138.  
Helmy, M.; Sugiyama, N.; Tomita, M.; Ishihama, Y., Mass spectrum sequential subtraction speeds up searching large peptide MS/MS spectra datasets against large nucleotide databases for proteogenomics. *Genes Cells* **2012**, *17* (8), 633-44. 査読有  
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01615.x.  
Chiyoda, T.; Sugiyama, N.; Shimizu, T.; Naoe, H.; Kobayashi, Y.; Ishizawa, J.; Arima, Y.; Tsuda, H.; Ito, M.; Kaibuchi, K.; Aoki, D.; Ishihama, Y.; Saya, H.; Kuninaka, S., LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol* **2012**, *197* (5), 625-41. 査読有  
DOI: 10.1083/jcb.201110110.  
Inoue, D.; Kimura, I.; Wakabayashi, M.; Tsumoto, H.; Ozawa, K.; Hara, T.; Takei, Y.; Hirasawa, A.; Ishihama, Y.; Tsujimoto, G., Short-chain fatty acid receptor GPR41-mediated activation of sympathetic neurons involves synapsin 2b phosphorylation. *FEBS Lett* **2012**, *586* (10), 1547-54. 査読有  
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.04.021.

#### [学会発表](計8件)

鎌倉健雄; 市原駿; 堀江勘太; 岩崎未央; 若林真樹; 杉山直幸; 石濱泰 メートル長モノリスシリカカラムを用いたLC-MS/MSシステムの開発とヒトプロテオーム一斉解析への挑戦, 日本薬学会第134年会, 熊本大学, 2014/03/29.  
高木俊輔; 吉田繁治; 今村春菜; 若林真樹; 杉山直幸; 石濱泰 In vitro リン酸化修飾を用いた標的キナーゼ基質の定量的リン酸化プロテオミクス, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 2013/12/03-06.

市原駿; 岩崎未央; 若林真樹; 杉山直幸; 石濱泰 25ミクロン径のメートル長モノリス型シリカキャピラリーによるプロテオミクスLC-MSシステムの高感度化, 第24回クロマトグラフィー科学会議, 東京大学工学部2号館(東京), 2013/11/11-13.  
Takagi, S.; Imamura, H.; Wakabayashi, M.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y. In Vitro Phosphorylation-Assisted In-Depth Human Serum Proteome Analysis, HUPO 12th Annual World Congress Yokohama, Japan, 2013/09/14-18.  
Ishihama, Y. Illuminating cellular phosphorylation through one-shot phosphoproteomics, The 4th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference, Taipei International Convention Center, Taiwan, 2013/07/10-12.  
高木俊輔; 今村春菜; 若林真樹; 杉山直幸; 石濱泰 人工リン酸化プロテオーム解析によるヒト血清中低発現量タンパク質同定法の開発, 第23回クロマトグラフィー科学会議, 長良川国際会議場(岐阜), 2012/11/15.  
Takagi, S.; Imamura, H.; Wakabayashi, M.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y. In vitro phosphorylation to manipulate the abundance profiles in proteomic samples, 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto, Japan, 2012/09/19.  
高木俊輔; 今村春菜; 若林真樹; 杉山直幸; 石濱泰 人工的リン酸化プロテオーム調製に基づく低発現量タンパク質同定法の開発, 日本プロテオーム学会2012年会, 日本科学未来館, 東京, 2012/07/26.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石濱 泰 (ISHIHAMA Yasushi)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号: 30439244

##### (3) 連携研究者

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