

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681009

研究課題名(和文) 超高感度プロテオーム解析を用いた新規DNA損傷応答シグナルの解明

研究課題名(英文) High-sensitive proteomic analysis of proteins modified in response to DNA damage.

研究代表者

足立 淳 (Adachi, Jun)

独立行政法人医薬基盤研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20437255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)： ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析器(nanoLC-MS/MS)を用いたプロテオーム解析によって、DNA損傷応答シグナルを解析する目的で、ガンマ線照射後のリン酸化修飾変動を定量した。その結果、25971リン酸化サイトを同定し、そのうち6555サイトが照射後1時間以内に変動していた。このリン酸化大規模データをインフォマティクス解析することによって、これまでDNA損傷応答との関連が知られていなかったキナーゼを見いだすことに成功した。さらにキナーゼの阻害によって、ATM、ATRを含むDNA損傷応答シグナルが活性化されること、コロニー形成能が抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： In order to gain broader insight into the phosphorylation signal controlling DNA damage response (DDR), system-wide analysis of phosphorylation dynamics after gamma irradiation has been investigated. 25971 phosphosites were identified with accurate quantification. 6555 phosphosites displayed dynamic changes in phosphorylation status during one hour after irradiation. We identified distinct dynamic phosphorylation patterns of kinases, which had not been known to be associated with DNA damage, by the bioinformatics analysis based on matching sequence motif and protein-protein interaction. We found that DNA damage signaling is activated and colony formation is inhibited by the inhibition of the kinases.

研究分野：プロテオーム解析

キーワード：DNA損傷応答 シグナル伝達 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

細胞は放射線を浴びると、DNA 損傷応答シグナルを動かすことで、細胞の増殖を停止したり、DNA 損傷修復を活性化して、ゲノムに変異が蓄積することを防いでいる。この反応には、リン酸化やユビキチン化修飾などのタンパク質の翻訳後修飾が極めて重要な働きをしていることが見いだされつつある。翻訳後修飾解析手法として、主に修飾特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法が用いられているが、特異性・感度の点で使用できる抗体が極めて限定されている。そのため、修飾部位や種類に依存せずに定量することができる質量分析計を用いたプロテオーム解析が急速に広まりつつある。研究代表者は、以前からナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析器(nanoLC-MS/MS)を用いて、1 万個以上のリン酸化部位の同定を行ってきた。この大規模なリン酸化修飾解析技術を DNA 損傷応答シグナル研究に応用することで、どの蛋白質のどのアミノ酸がどの時間帯にどのような修飾を受けているかが網羅的に分かれば、今まで知られていなかった DNA 損傷応答シグナルを解明できるのではないかと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、 γ 線照射直後のリン酸化修飾の経時変化を、世界最高レベルの高感度・高精度で、網羅的に定量することにより、翻訳後修飾を介した新規 DNA 損傷応答シグナルを解明することを主目的とした。

3. 研究の方法

リン酸化・ユビキチン化プロテオーム解析

γ 線照射直後のリン酸化修飾解析のために、SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture)法を採用し、Hela-S3 細胞に Light、Medium、Heavy の 3 種類のアミノ酸標識を行った。これらの標識細胞に、 γ 線照射し、0 分(照射直後)、5 分、20 分、60 分後及び未照射の細胞を回収し、各標識細胞を等量混合してから解析を行った。リン酸化プロテオーム解析は試料中の蛋白質を還元アルキル化、トリブシンによる断片化をした後、鉄を結合したビーズを用いて、リン酸化ペプチドを濃縮し、陽イオン交換カラムで分画後に質量分析計で同定・定量した。ユビキチン化プロテオーム解析は、抗ユビキチン抗

体(FK2、Apu2)を用いて、ユビキチン化タンパク質を濃縮し、1 次元電気泳動によって分離後、ゲル内消化法によって、還元アルキル化、トリブシンによる断片化をした後、質量分析計を用いてユビキチン化タンパク質の同定・定量解析を行った。コントロールとして、抗体で濃縮しないサンプルを同様に解析し、ユビキチン化サンプルとコントロールサンプルで検出されるバンド位置を比較し、ユビキチン化サンプルでバンド位置が高質量側にシフトしているタンパク質のみを選択して解析対象とした。

活性化キナーゼ予測解析

リン酸化プロテオーム解析で得られたリン酸化の部位(基質情報)、定量情報、キナーゼ認識モチーフ情報、タンパク間相互作用情報を用いたバイオインフォマティクス解析(NetWORKIN2.0)によって、 γ 線処理後の各キナーゼ群の活性を予測した。

DNA 損傷応答関連キナーゼ群の機能解析

活性化が予測されたキナーゼ群については、阻害剤や siRNA を用いて、コロニー形成能、リン酸化変動解析(リン酸化プロテオーム解析、western blotting)、免疫染色、複合体解析を行った。

4. 研究成果

γ 線照射によるリン酸化修飾変動

Hela-S3 細胞に γ 線を 6 Gy 照射し、0 分後、5 分後、20 分後、60 分後のサンプルを未照射サンプルと比較定量した。その結果、5041 蛋白質、25971 リン酸化サイトを同定し、そのうち 6555 サイトが変動していた。このデータは既存研究(*Science*, 2007, 316, 1160, *Mol. Cell. Proteom.*, 2010, 9.6, 1314, *Sci. Signal.*, 2010, 151, rs3)を大きく上回る規模であり、 γ 線照射の影響が極めて広範囲の蛋白質リン酸化に及ぶことを示している。変動サイトには、ATM、ATR、DNA-PK をはじめ、DNA 損傷応答に関わる蛋白質の大部分が同定された。例えば NBS1 の場合、既知の ATM リン酸化サイト S343、S397 が照射後 5 分で 4-5 倍にリン酸化されていた(図 1)。さらに、新

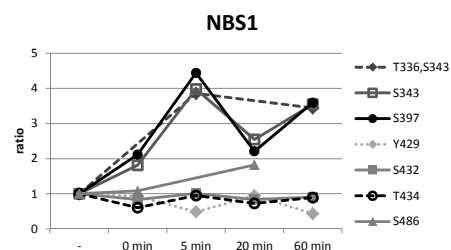


図1 γ 線照射後のNBS1のリン酸化ダイナミクス

規のリン酸化サイト T336、S486 も同定された。このように一つの蛋白質について複数のリン酸化サイトが同定された場合、どのサイトが DNA 損傷シグナル反応性であるかが明白に分かり、また多数の新規リン酸化修飾サイトの変化も一度に捉えることが可能になった。

γ 線照射によるユビキチン化修飾変動

抗ユビキチン抗体(FK2、Apu2)を用いて免疫沈降したユビキチン化タンパク質を定量解析した結果、FK2、Apu2 抗体でそれぞれ、22、45 タンパク質が γ 線照射後 5 分、もしくは 60 分後に有意な差を示した (図 2)。

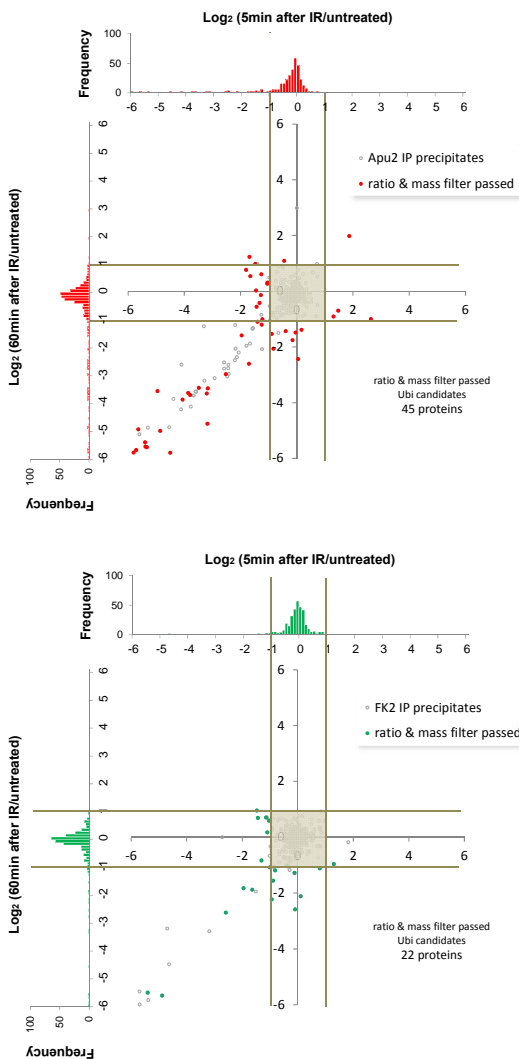


図 2 γ 線照射後のユビキチン化修飾変動

例えば、Histone H2B は照射 5 分後に未修飾体はほとんど変動しないが、ユビキチン化修飾体は 10% 以下にまで減少することが明らかになった (図 3)。

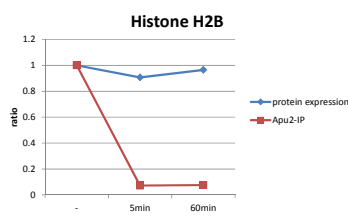


図 3 Histone H2B のユビキチン化修飾変動

インフォマティクスによる γ 線照射後のキナーゼ活性予測

未知リン酸化シグナル因子を発掘するために、リン酸化プロテオームデータ、キナーゼ認識モチーフ、蛋白質間相互作用情報を用いたバイオインフォマティクス解析によって、各キナーゼ活性が γ 線照射後にどのように変化したか推測した。図 4 に活性化が予測されたキナーゼ群の活性化プロファイルを示す (赤色の濃い部分が強い活性化を示している)。ATM/ATR の場合、照射 0 分後にやや活性化し、5 分後から強く活性化していると推測され、ATM の活性化指標となる S1981 リン酸化の変化とよく相関していた。驚くべきことに、これまで DNA 損傷応答との関連が知られていなかった、セリンスレオニンキナーゼ X が 0 分後から ATM/ATR よりも強く活性化していると推測された。

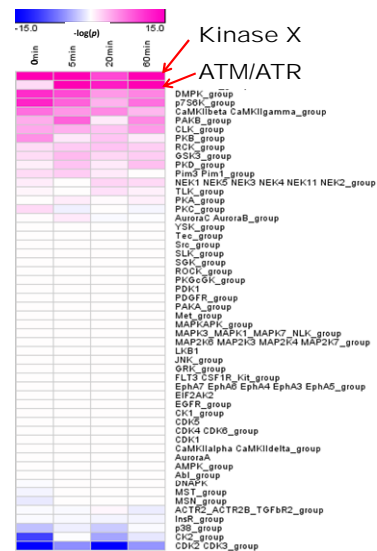


図 4 γ 線照射後のキナーゼ群の推定活性

DNA 損傷応答関連キナーゼの機能解析

インフォマティクス解析によって、DNA 損傷応答との関連性が推測されたキナーゼについて、その阻害剤を用いるとコロニー形成能が抑制された (図 5)。

キナーゼ阻害時の DNA 損傷応答シグナルを調べるために、リン酸化プロテオーム解析を行ったところ、未照射であっても、SQ/TQ モチーフを有するリン酸化部位のリン酸化昂進が認められた (図 6)。また照射時においては、SQ/TQ モチーフを有

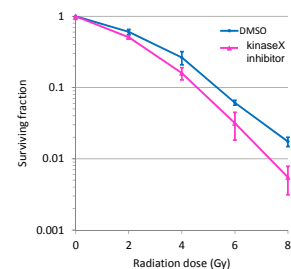


図 5 キナーゼ阻害によるコロニー形成能の抑制

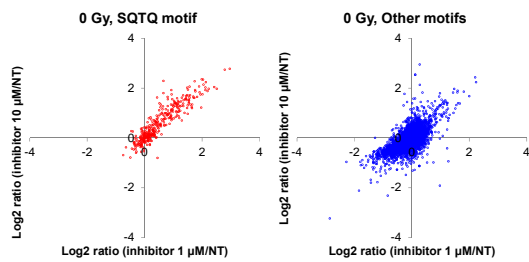


図6 キナーゼ阻害時のSQ/TQモチーフおよびその他のリン酸化修飾変動

するリン酸化部位がさらに過剰にリン酸化されていた。さらに阻害剤および siRNA を用いたノックダウン実験によって、キナーゼ阻害時には、SQ/TQ モチーフ認識キナーゼである ATM、ATR が活性化されることを確認した。また免疫染色によって、キナーゼ阻害時におけるリン酸化H2AXの集積も確認された。またキナーゼ X の複合体解析からは、ATM、ATR との直接的な結合を示すデータは得られなかった。

これらの知見から、リン酸化プロテオミクスによって見いだされたキナーゼ X は DNA 損傷応答シグナルを司る ATM、ATR の活性化に関与することが明らかになった。その関与の仕組みについては、間接的であることが示唆されたが、詳細な仕組みの解明は今後の研究課題である。

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 10 件)

すべて査読有り

1. Adachi J., Kishida M., Watanabe S., Hashimoto Y., Fukamizu K., and Tomonaga, T (2014) Proteome-wide discovery of unknown ATP binding proteins and kinase inhibitor target proteins using ATP probe. *J Proteome Res*, 13 (12), 5461–5470.
2. 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., and Tomonaga, T. (2014 Jun) Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* 13: 1471-84.
3. Hara Y., Kawasaki N., Hirano K., Hashimoto Y., Adachi J., Watanabe S., and Tomonaga, T. (2013 Dec). Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyopathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8, 197.
4. Muraoka, S., Kume, H., Adachi J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T., Ishihama, Y., and Tomonaga, T. (2013). In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. *J Proteome Res* 12, 208-213.
5. Shiromizu, T., Adachi J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S., and Tomonaga, T. (2013). Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J Proteome Res* 12, 2414-2421.
6. Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J., Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto K, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M. (2013). A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.*, 41 (14), 6930-6941.
7. Kuga, T., Kume, H., Kawasaki, N., Sato, M., Adachi J., Shiromizu, T., Hoshino, I., Nishimori, T., Matsubara, H., and Tomonaga, T. (2013). A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I alpha and FAM83H in colorectal cancer. *J Cell Sci* 126, 4721-31.
8. Muraoka S, Kume H, Adachi J., Shiromizu T, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Tomonaga T. In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein list. *Journal of Proteomics Research*, 2012, 12(1): 208-213.
9. Narumi R, Murakami T, Kuga T, Adachi J., Shiromizu T, Muraoka S, Kume H, Kodera Y, Matsumoto M, Nakayama K, Miyamoto Y, Ishitobi M, Inaji H, Kato K, Tomonaga T. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *Journal of Proteomics Research*, 2012, 11(11): 5311-5322.
10. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Adachi J., Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Kodera Y, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Tomonaga T. Strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples. *Journal of Proteomics Research*, 2012, 11(8): 4201-4210.

[学会発表] (計 10 件)

1. Jun Adachi, Kazunari Hashiguchi, Misako Sato, Kazuna Fukamizu, Takeshi Tomonaga, Simplified and minimized fractionation using StageTips for in-depth proteome and phosphoproteome analysis, Human Proteome Organization (HUPO) 13th annual congress, Madrid, Spain, 2014 年 10 月 6 日
2. Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Kinome and ATPome-wide selectivity profiling of ATP-competitive kinase inhibitors. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 26 日
3. 足立淳、橋口一成、佐藤美佐子、橋本裕希、深水和菜、朝長毅: StageTip を用いた新規分画法により、プロテオーム解析・リン酸化プロテオーム解析の深さと簡易性の両立を図る、日本プロテオーム学会 2014 年会、筑波、2014 年 7 月 17 日
4. 足立淳: ターゲットプロテオミクス～Beyond SRM～. 第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013 年 9 月 13 日
5. Adachi J, Higo D, Kishida M, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Fukamizu K, Nishiwaki E, Tomonaga T ” ATP Accessibility Screening (AAS), a high-throughput and high-resolution kinase analysis platform for signaling research” Human Proteome Organization (HUPO) 12th annual congress, Yokohama, JAPAN, 15 September, 2013.
6. 足立淳、久家貴寿、白水崇、久米秀明、村岡賢、中山敬一、井倉毅、高田穰、朝長毅: Discovery of early-response kinases in DNA-damage signaling using phosphoproteome analysis. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19-21 日
7. Jun Adachi, Takahisa Kuga, Takashi Shiromizu, Hideaki Kume, Satoshi Muraoka, Kazunari Hashiguchi, Ryohei Narumi, Shio Watanabe, Masayoshi Kuwano, Masaki Matsumoto, Kei-ichi Nakayama, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura, Minoru Takata and Takeshi Tomonaga “Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling” HUPO2012 11th World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.
8. 足立淳、久家貴寿、白水崇、橋口一成、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉毅、高田穰、朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、2012 年 9 月 6-9 日
9. 足立淳、久家貴寿、白水崇、久米秀明、村岡賢、橋口一成、鳴海良平、渡邊史生、桑野晶喜、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉毅、高田穰、朝長毅: DNA 損傷初期応答シグナル解析から創薬標的

- の探索へ. 第 10 回北里疾患プロテオーム研究会、神奈川、2012 年 8 月 23 日
10. 足立淳、久家貴寿、白水崇、久米秀明、村岡賢、橋口一成、鳴海良平、渡邊史生、桑野晶喜、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉毅、高田穰、朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本プロテオーム学会 2012 年会、東京、2012 年 7 月 26-27 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibio.go.jp/proteome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 淳 (ADACHI JUN)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクト研究員

研究者番号: 20437255

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: