

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290078

研究課題名(和文) 多次元プロテオミクスによる細胞内パスウェイ構造決定法の確立

研究課題名(英文) Method for determination of cellular pathway structure using multidimensional proteomics

研究代表者

松本 雅記 (Masaki, Matsumoto)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60380531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではゲノムワイドな組換えタンパク質ライブラリーを用いたターゲットプロテオミクス解析プラットフォームであるiMPAQT(in vitro proteome assisted protein absolute quantification)法を構築し、これを用いて細胞内パスウェイを定量的な可視化を試みた。18000以上のヒト組換えタンパク質に対して質量分析によってターゲットプロテオミクスに必要な情報取得し、データベース化を完了した。本プラットフォームを用いて、代謝経路やシグナル伝達経路を構成するタンパク質の発現絶対量を複数の細胞に対して実施し、生化学パスウェイの定量的構造取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we originally developed a novel platform for targeted proteomics, iMPAQT (in vitro proteome assisted MRM for protein absolute quantification) using genome-wide recombinant protein library and applied this method to obtain quantitative structure of the pathways in biological system. We subjected more than 18000 recombinant proteins to LC-MS/MS analysis and obtained information for targeted proteomics to construct database. Using this platform, we performed absolute quantification of proteins associated with metabolism and signal-transduction pathway across various cell lines and succeeded to obtain the quantitative structure of biochemical pathways.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：代謝 プロテオミクス シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生命システムがどのように構築されているかを問うシステム生物学的研究が盛んに行われている。ゲノム情報や各種生物学的研究で得られた知見を元に各生命現象に関わるパスウェイ・モデルの構築がなされており、これを基盤にシステム生物学が発展してきた。しかしながら、これらはあくまで異なる研究目的や研究対象で得られたデータを集約し一般化したものであり、状況に応じて変化する現実の生命システムを的確に表現できている保証はない。そこで本研究では、様々なプロテオーム解析技術を用いて、より現実に近いパスウェイ・モデルの構築(=パスウェイ構造決定)を試みる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、われわれが考案した次世代定量プロテオミクス技術の構築とそれを用いたタンパク質絶対量計測法によって生命システムを構成するパスウェイ構造を決定することである。本研究では、パスウェイ・モデルを実体化するために、タンパク質絶対量計測によるパスウェイ構造の決定と、様々な条件下でのパスウェイ構成成分間の相互作用やリン酸化の定量的解析によるモデルの拡充と検証を行う。

### 3. 研究の方法

・情報基盤 MRM 法によるタンパク質大規模絶対定量

#### 1) 情報基盤 MRM 法の最適化

情報基盤定量法では大規模に合成した組み換えタンパク質を酵素消化し、得られたペプチド試料を、LC-MS/MS 解析を行うことで、各ペプチドの座標(LC 上の保持時間、質量、部分質量)の決定を行い、これらの情報をデータベース化して利用する情報基盤 MRM (multiple reaction monitoring) 法を構築する。組み換えタンパク質消化物を内部標準として使用することで、タンパク質の絶対量を算出することができる。

#### 2) 代謝経路の絶対定量

様々な細胞状態や細胞種における、代謝パスウェイを構成する酵素の発現絶対量計測を実施する。

#### 3) シグナル伝達経路の絶対量計測

増殖因子受容体やタンパク質リン酸化酵素などのタンパク質の発現量計測を実施す

る。

・翻訳後修飾や相互作用情報取得

1) リン酸化情報の網羅的取得とデータベース化

高純度リン酸化ペプチド精製法を用いて、タンパク質リン酸化情報を網羅的かつ定量的に取得し、データベース化を試みる。

2) 相互作用情報取得

代謝酵素やシグナル伝達分子を免疫沈降して結合タンパク質の同定を行う。世代多軸ロボットを用いた全自動免疫沈降法を確立し、タンパク質間相互作用の定量化を試みる。

・絶対量情報を用いたパスウェイ構造決定

既知パスウェイ情報に、絶対量情報、相互作用情報を統合・可視化し静的パスウェイ構造の決定・拡張を行う。

### 4. 研究成果

・情報基盤 MRM 法によるタンパク質大規模絶対定量

1) パスウェイ構成タンパク質測定メソッド構築

本研究が開始する前にすでに 18,000 種類のタンパク質に関して候補ペプチド情報の取得を完了し、データベース化を終了していた(約 200,000 ペプチド)。本研究では、これらの候補ペプチドを対象に、すべて MRM 法による実測を行い、得られた MRM クロマトグラムをすべてデータベース化した。これらの情報から、主要パスウェイ構成タンパク質約 2,000 種類を測定可能な MRM メソッドを構築した。

2) パスウェイ構成タンパク質の発現量実測

ヒト由来の 12 種類の細胞に関して代謝酵素の絶対量計測を行い、代謝パスウェイ構造の細胞間比較を行い、各細胞で保存され

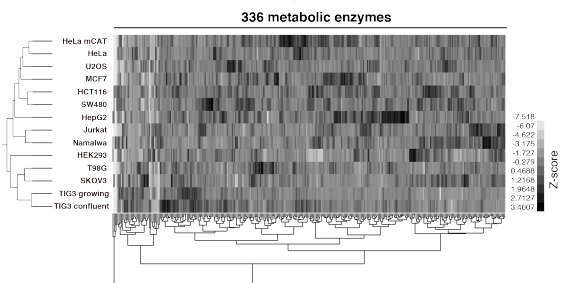


図1 代謝酵素発現絶対量解析

ている経路の同定や細胞特徴を規定する代謝酵素セットの同定に成功した(図1)。

・ 翻訳後修飾や相互作用情報取得  
約 30,000 以上のリン酸化部位を同定しデータベース化を行った。また、次世代型ロボットを用いて全自動免疫沈降法を構築し、幾つかのシグナル伝達因子の相互作用因子の定量に成功した。

・ 発現絶対量情報を用いたパスウェイ構

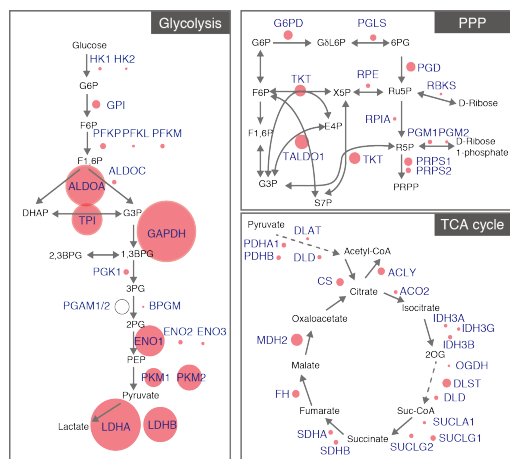


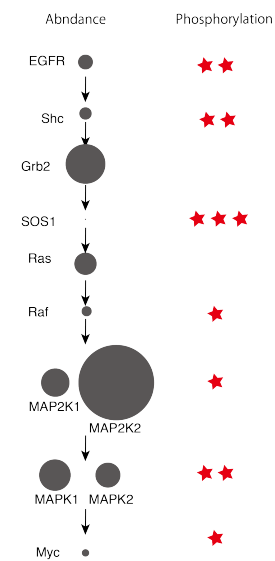
図2 中央代謝経路の定量マップ

造決定

既知パスウェイ情報に、絶対量情報、相互作用情報を統合・可視化した。ヒト正常線維芽細胞における代謝酵素発現量を実測し、発現絶対量に基づく代謝経路構造の可視化を実施した。その結果、代謝経路の律速段階に位置する酵素の発現量が著しく低いことが明らかとなった(図2)。

また、シグナル伝達関連因子の絶対量と増殖因子であるEGF刺激に伴うリン酸化の変化量を可視化したところ、極めて低発現であるSOS1はリン酸化応答がもっとも大きいことが判明した(図3)。

図3 EGFシグナル伝達経路の定量マップ



## 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11件)

- 1) Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN $\gamma$  in memory-type Th2 cells. *Nat. Commun.* 7, 11289, 2016. (査読有)  
doi: 10.1038/ncomms11289 (査読有)
- 2) Inoue D, Matsumoto M, Nagase R, Saika M, Fujino T, Nakayama KI, Kitamura T. Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Exp. Hematol.*, 44(3), 172-176, 2016. (査読有)  
doi:10.1016/j.exphem.2015.11.011.
- 3) Matsunuma R, Niida H, Ohhata T, Kitagawa K, Sakai S, Uchida C, Shiotani B, Matsumoto M, Nakayama KI, Ogura H, Shiiya N, Kitagawa M. UV Damage-Induced Phosphorylation of HBO1 Triggers CRL4DDB2-Mediated Degradation To Regulate Cell Proliferation. *Mol. Cell Biol.*, 36(3), 394-406, 2015. (査読有)  
doi: 10.1128/MCB.00809-15
- 4) Yugi K, Kubota H, Toyoshima Y, Noguchi R, Kawata K, Komori Y, Uda S, Kunida K, Tomizawa Y, Funato Y, Miki H, Matsumoto M, Nakayama KI, Kashikura K, Endo K, Ikeda K, Soga T, Kuroda S. Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep.*, 8: 1171-1183, 2014. (査読有)  
doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.021
- 5) Kikuchi S, Kaibe N, Morimoto K, Fukui H, Niwa H, Maeyama Y, Takemura M, Matsumoto M, Nakamori S, Miwa H, Hirota S, Sasako M. Overexpression of Ephrin A2 receptors in cancer stromal cells is a prognostic factor for the relapse of gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2015 Jul;18(3):485-94 (査読有)  
doi: 10.1007/s10120-014-0390-y

[学会発表](計10件)

松本 雅記、中山 敬一

大規模定量プロテオミクスで挑むがん代謝の実体解明

第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会 合同大会

2015年12月1日~12月4日 神戸

松本 雅記

ハイスループットかつ精密な定量プロテオームのための試料調整法開発

日本プロテオーム学会年会

2015年7月23日~7月24日 熊本

松本雅記, 中山敬一

網羅的ターゲットプロテオミクスによるヒトプロテオーム定量マップ作成

日本プロテオーム学会大会 2014 年会

2014年7月17日~7月18日 つくば国際会議場

松本雅記, 中津海洋一, 中山敬一

リン酸化定量プロテオミクスによるシグナル伝達研究

第14回蛋白質科学会年会

2014年6月25日~年6月27日 横浜

松本雅記, 押川清孝, 松崎芙美子, 五島直樹, 夏目徹, 中山敬一

次世代ターゲットプロテオミクスによるヒト全代謝経路の絶対定量マッピング

第87回日本生化学会大会

2014年10月15日~10月18日 国立京都国際会館

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 1件)

名称：タンパク質の定量方法  
発明者：中山敬一, 松本雅記  
権利者：九州大学  
種類：特許  
番号：特許第5468073号  
取得年月日：2014年2月7日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 雅記 (MATSUMOTO, Masakki)  
九州大学生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：60380531

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)  
九州大学生体防御医学研究所・教授  
研究者番号：80291508