

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25513006

研究課題名(和文) 気体引き込み流制御型スプレーイオン源を用いた細胞内リン酸化シグナルの定量計測

研究課題名(英文) Quantitative analysis of cellular phosphorylation signaling using electrospray ionization-mass spectrometry with an air current-regulating system

研究代表者

川上 隆雄 (Kawakami, Takao)

横浜市立大学・生命医科学研究科・客員准教授

研究者番号：40366117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の翻訳後修飾に関する定量的かつ包括的な知見は、細胞の制御機構を正確に理解する上で重要な情報である。本研究では、プロテオーム間の計量比較で広く用いられている非標識法にデータ解析ソフトウェアの改良版を搭載し、分析システム全体を最適化した。この非標識プロテオミクスシステムを乳癌幹細胞の維持機構の解析に適用した。すなわち、乳癌のモデル細胞で発現している2種類の蛋白質リン酸化酵素の遺伝子をノックダウンすると、細胞の増殖・生存が抑制されるとともに、ノックダウン分子そのものや様々な分子群のリン酸化レベルが有意に減少していることが観測された。

研究成果の概要(英文)：Quantitative and comprehensive information of posttranslational modifications of proteins is indispensable for elucidating precisely the cellular control mechanism. The optimized data analysis software improved our label-free LC-MS/MS proteomics system. We applied this system into phosphoproteomics of tumor stem cells from breast cancer. siRNA-knockdown of atypical protein kinase C lambda and zeta resulted in suppression of growth and survival of the cells, together with significant reduction of phosphorylation levels of a variety of signaling protein molecules as well as the target kinases themselves.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：リン酸化 プロテオミクス 質量分析

1. 研究開始当初の背景

生体内で発現しているタンパク質の機能や活性は、多くの場合その翻訳後修飾によって制御を受けている。また、細胞機能の発現は各修飾の連関の結果として説明される。たとえば、細胞内シグナル伝達系は細胞外からの刺激を起点とするタンパク質リン酸化の連鎖からなり、リン酸化された基質タンパク質がリン酸化酵素(キナーゼ)として活性化する(図1)。これはキナーゼカスケードと呼ばれており、活性のフィードバック機構などを通じて核内転写因子の発現が厳密に調節されている。この調節機構の破たんが細胞の癌化をはじめとする各種疾患の原因となる。したがって、細胞内の翻訳後修飾の動態を計測する技術には、これら調節のしくみを包括的かつ定量的に記述するための測定データを出力することが求められる。

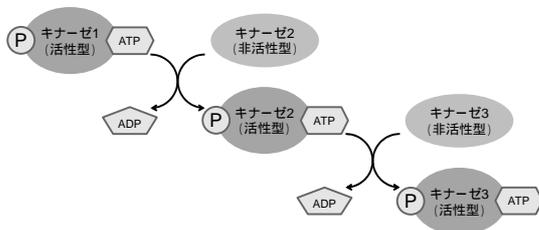


図1. タンパク質キナーゼによるリン酸化シグナル伝達のイメージ

プロテオミクスでは、液体クロマトグラフィー(LC)とタンデム質量分析(MS/MS)を接続した分析系(LC-MS/MS)が定着している。タンパク質試料はプロテアーゼによる加水分解を経てペプチド混合物として測定に供する。網羅的な分析のMS/MSでは、一段目のMSで検出されるイオン群から強度の高い順に衝突誘起解離(CID)のための前駆イオンが選択される。

LC-MS/MSを基盤としたプロテオーム解析法のうち、安定同位体標識を用いない方法(非標識法)は現在広く受け入れられている。非標識法の成否は、おもに連続測定におけるLC-MS/MSの安定性および測定データの解析手法に依存している。

試料毎に取得されたLC-MS/MSデータは、専用のソフトウェアを用いて相互に比較する。この手順は従来の安定同位体標識(Stable isotope labeling)を用いないので、「非標識(Label-free)プロテオミクス」と呼ばれている。

細胞内のタンパク質リン酸化の動態も上記の手順で分析される。その際には、ペプチド断片の混合物からリン酸化ペプチドを選択的に回収する方法を加え、リン酸化の計量とリン酸化部位の同定の効率化が図られている。

2. 研究の目的

LC-MS/MSを基盤とした非標識プロテオミクスの改良と最適化を行い、最適化した分析システムを悪性腫瘍のモデル細胞のリン酸化プロテオミクスに適用する。リン酸化ペプチドの同定/計量結果から、腫瘍細胞の生存と維持に関わるタンパク質リン酸化に関して網羅的な知見を得る。

3. 研究の方法

(1) ペプチド混合物の調製

分析対象の培養細胞を細胞溶解液に懸濁し、超音波処理を加えて破砕した(細胞溶解液の組成: 20 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 9 M urea, phosphatase inhibitor cocktail 2, phosphatase inhibitor cocktail 3 (Sigma))。総タンパク質量の後、150 µg タンパク質に相当する細胞溶解液を分取し、これを出発試料とした。出発試料溶液にジチオトレイトールとヨードアセトアミドによる還元アルキル化処理を施した。還元アルキル化処理後に100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、溶液の尿素濃度を2 Mまで希釈した。最後にトリプシンを加え、37 °Cの条件下で加水分解反応を行った。

(2) リン酸化ペプチドの回収

トリプシン加水分解で生じたペプチド断片の混合物からリン酸化ペプチドを分画回収した。リン酸化ペプチドの特異的吸着にはTiO₂樹脂を用いた。処理手順はGLサイエンス社の「Titansphere Phos-TiO Kit」に準じた。すなわち、マイクロチップに充填したTiO₂樹脂にリン酸化ペプチドを吸着させたあと、強アルカリ溶液で溶出した。溶出試料は減圧下で乾燥した。

(3) LC-MS/MS

分画回収したリン酸化ペプチドの混合物をLC-MS/MSに供した。エレクトロスプレーイオン源を介して液体クロマトグラフ(分離流速: 毎分300 nl)とサーモサイエンティフィック社のLTQ Orbitrap質量分析計を接続した。測定は標準的なショットガン分析用の条件にしたがって実施した(測定時間は145分間)。

気体引き込み流の最適化の検討のために、MicromBioresources社のADAVANCEスプレーイオン源を用いた。

(4) ペプチド及びタンパク質の同定

MS/MSデータを配列データベース検索に供した。検索ソフトウェアとしてマトリックスサイエンス社のMascot 2.4.0 (<http://www.matrixscience.com/>)を用いた。検索用のヒトアミノ酸配列データベースはUniprot (<http://www.uniprot.org/>)からダウン

ロードした。検索条件には、セリン残基、トレオニン残基、およびチロシン残基のリン酸化 (+80 Da) を加えた。

4. 研究成果

(1) LC-MS/MS データ解析ソフトウェアの評価

データ解析ソフトウェアとして、メディカル・プロテオスコプ社の i-RUBY を採用した。i-RUBY のアルゴリズムでは、ペプチド由来の各検出ピークに連結されたペプチド同定情報を測定データ間の LC 溶出時間軸方向の補正に用いる。さらに、ペプチド同定のための配列データベース検索ソフトウェアを連動させ、データ整列化処理から検出強度情報の出力までの全自動化を実現している。

ヒト培養細胞株である OVISE を分析手順の評価に用いた。OVISE から調製したタンパク質抽出液に数種の標準タンパク質を一定量ずつ添加し、トリプシン加水分解物の LC-MS/MS データを i-RUBY に供した。LC 導入量換算で標準タンパク質 10 fmol、50 fmol および 250 fmol 添加の測定データを比較し、タンパク質添加量と当該タンパク質由来のペプチド検出強度との相関を確かめた(図2)。また、標準タンパク質の添加量とピーク検出強度の直線性を LC-MS/MS データから抽出することができた。

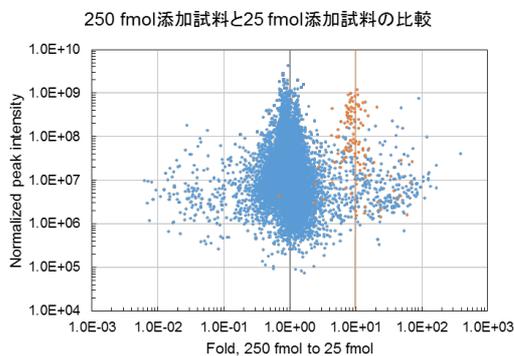
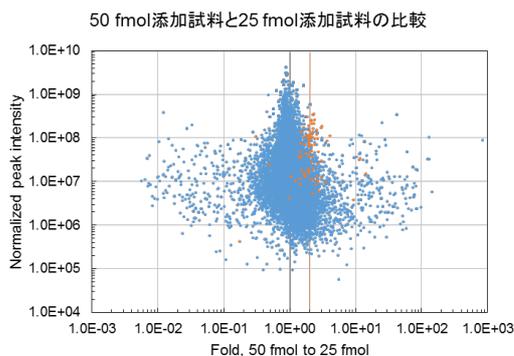


図2. 同定ペプチドの検出強度分布
オレンジ色の点は標準タンパク質由来のペプチドを示す。

(2) 乳癌幹細胞の分析

非標識プロテオミクスをアルデヒドデヒドロゲナーゼ陽性 (ALDH^{high}) 乳癌幹細胞の維持機構の解析に適用した(東京理科大学薬学部・秋本和憲准教授との共同研究)。

乳癌のうち、とくに治療後の予後が悪い basal like 型を対象とした。basal like 型乳癌由来細胞株 MDA-MB157 細胞から、癌幹細胞が濃縮する ALDH^{high} 細胞を単離して解析に用いた。ALDH^{high} 細胞で高発現している2種類のタンパク質リン酸化酵素 atypical protein kinase C lambda および zeta を siRNA によってノックダウンすると、ALDH^{high} 細胞の増殖・生存が抑制された。

次に、ノックダウンにともなう細胞内のリン酸化レベルの変動を見るためにリン酸化プロテオミクスをおこなった。すなわち、ノックダウン処理を施した細胞とその対照からそれぞれタンパク質抽出、トリプシン加水分解、およびチタニア処理を経てリン酸化ペプチド混合物を得た。各ペプチド混合物の LC-MS/MS データを上記のソフトウェア上で比較したところ、合計 1875 のリン酸化ペプチドピークの同定/計量情報が得られた(表)。

表. 検出ピークとペプチドIDの統計

ペプチドピークの数	2047
リン酸化ペプチドのピーク	1875
Fold >= 2.0(対照に対するダブルノックダウン)	40
Fold >= 1.5	108
Fold <= 0.67	405
Fold <= 0.5	100
ユニークペプチドの数	1900
リン酸化ペプチド	1742 (91.7%)
(リン酸化ペプチドが帰属している蛋白質エントリー)	(981)

これらのリン酸化ペプチドが帰属しているタンパク質には、ノックダウン分子そのものや様々なシグナル伝達系の分子群が含まれ、リン酸化レベルが有意に減少していることが観測された(図3)。

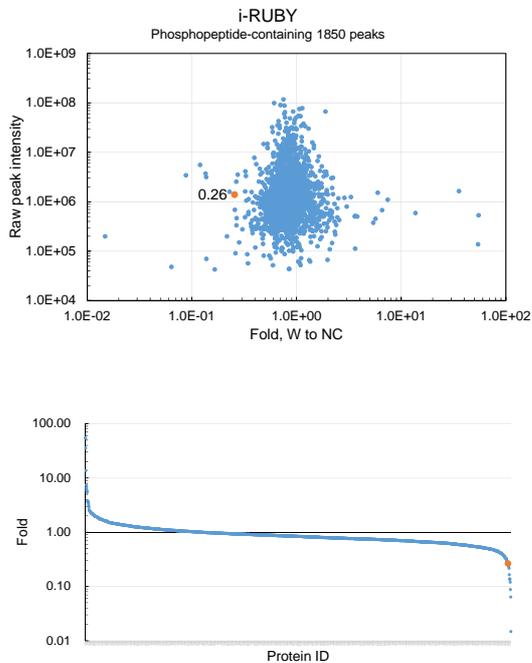


図3. リン酸化ペプチドの倍数値の分布
[上: 倍数値(横軸)対ピーク検出強度(縦軸). 下: 倍数値順の整列(降順)].

オレンジ色の点はノックダウン対象タンパク質由来のリン酸化ペプチドを示す(倍数値0.26).

以上のとおり、本研究で構築した分析システムは、定量分析のターゲットとなるリン酸化修飾を探索する手段として有効である。また、幹細胞のリン酸化プロテオミクスから得られた情報は、乳癌の抗癌剤開発に向けた分子標的の探索のために活用されうる。

(3) 気体引き込み流制御型スプレーイオン源の開発

質量分析の試料導入部では、大気圧下で試料溶液を噴霧する方法によって対象分子が気化およびイオン化される(エレクトロスプレー)。エレクトロスプレーイオン源を微流速の液体クロマトグラフに接続した場合、連続測定を開始から終了までにわたってイオン化ペプチドの高感度検出を維持することが重要である。そこで、閉鎖型のスプレーイオン源を用いてスプレー室に窒素を供給した。この結果、大気に由来するバックグラウンドノイズを5分の1以下に抑えることができた。しかしながら、試料由来のペプチドの検出が安定しないため、気体供給量などの条件をさらに検討する必要がある。

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)

[学会発表](計3件)

川上隆雄. LC-MS/MSを用いたバイオマーカー開発の方法論と実際. 第55回日本臨床化学会年次学術集会, 2015年10月30日~11月1日, 大阪大学コンベンションセンター, 大阪府吹田市.

片山鈴花, 中根裕美, 稲田将大, 小野寺佑佳, 神保美穂, 原泰志, 安部良, 田沼靖一, 川上隆雄, 秋本和憲. リン酸化プロテオミクスを用いた乳癌 ALDH1^{high} 細胞における Atypical Protein Kinase C (aPKC) の機能解析. 第59回日本薬学会関東支部大会, 2015年9月12日, 日本大学薬学部, 千葉県船橋市.

神保美穂, 上田尚学, 高畑良雄, 片山鈴花, 秋本和憲, 川上隆雄. LC-MS/MSのデータ比較解析ソフトウェア i-RUBY の開発と腫瘍リン酸化プロテオミクスへの応用. 日本プロテオーム学会2015年会 (JHUPO 第13回大会), 2015年7月23日~24日, くまもと森都心プラザ, 熊本県熊本市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 隆雄 (KAWAKAMI, TAKAO)
横浜市立大学・生命医科学研究科・客員准教授

研究者番号: 40366117