

## パスウェイ・ネットワークの絶対定量による動態解析

●夏目 徹<sup>1)</sup> ◆家村 俊一郎<sup>1)</sup> ◆中山 洋<sup>2)</sup> ◆澁谷 浩司<sup>2)</sup>

1) 産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター 2) 理化学研究所和光研究所中央研究所  
3) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

### <研究の目的と進め方>

細胞内のシグナル伝達のパスウェイは、多くのシグナリング分子は互いに相互作用し、複合体を形成しパスウェイを生み出す。

このようにパスウェイを構成する相互作用を高次機能として捉えるには、統一的な方法論での網羅的相互作用解析を行う必要がある。またこれらの相互作用はシグナルの伝達に伴ってダイナミックに変化する可能性があり、これらの動態を捉える技術開発が生命システムの解明に必須である。

これまで、シグナリングパスウェイを構成するタンパク質を直接同定・定量することは極めて困難なことであった。最近、著しく進歩を遂げたタンデム質量計 (MS/MS) は、タンパク質の内部アミノ酸配列情報とペプチド断片の質量値を自動的に取得することが可能となった。更にゲノム研究の発展と共に配列情報が十分にデータベース化され、且つインフォマティクスの進歩により、タンパク質の大規模同時同定の自動化が実現した。このようなプロテオミクス技術を駆使し、パスウェイ全体の動態解析を行い (パスウェイに関わるタンパク質の網羅的相互作用リネージマッピングと、その動態変化の記載)、生物情報科学の深化に供することを旨とする。

### <2007年度の研究の当初計画>

質量分析を用いたパスウェイの動態定量を行うため、サンプルの質量分析計への導入と、クロマトグラフィの再現性を高める技術開発を前年度までに行い、検出されたペプチドイオンの強度比から相対定量を行う方法をDQN法 (Direct Quantitation of Non-labeled proteome) と名付けた。このDQN法を自動化し、高効率に動態解析を行うため、各ペプチドイオンのクロマトの溶出時間と分子量など数値情報をクロマトグラフィ上から自動抽出しピーク面積を計算し、定量化するソフトウェアの開発も行ってきた。今年度は、問題となったピーク認識の曖昧性を排除するための処理技術の向上をめざしするとともに、質量分析計が取得したデータをピークリストファイルに変換する際のバグ修正などを行う。

細胞内の内因性のシグナル伝達分子複合体の相対・及び絶対定量を行うための技術開発に着手する。そのためにまず、内因性の複合体を認識する抗体の作製を行う。また、絶対定量を行うための内標準ペプチドの設計と作製を行い、小規模な試験的な研究を、古典的マップキナーゼカスケードの最下流にあたるErkを中心に行う。

### <2007年度の成果>

①DQN法を用いたパスウェイ解析の自動化を終了し、クロマトグラフィとサンプルの同定結果の再現性を確認した。多重検定をパラメトリックで行い各データの再現性が極めて高く、ペイトが異なる場合の各特異的な相互作用が極めて低い危険率でほぼ自動的に抽出可能であることを確認した。

②当初計画で掲げた課題である古典的MAPキナーゼカスケードの動態解析に追加し、神経細胞でのカルシウムシグナルに関わる分子もbaitとして用いパスウェイの解析を行った。具体的にはCa<sup>2+</sup>依存性のキナーゼであるCaMKのサブファミリー全てを用い網羅的なネットワーク解析を行った。その結果、CaMKIが小分子量G

タンパク質であるbeta-PIXと相互作用しリン酸化し活性化していることを明らかにした。beta-PIXはGTP交換因子であるRacとそれにより制御されるキナーゼであるPAKらと共にsignalosomeを形成している。活性化したbeta-PIXはRacを介してSAKを活性化し、PAKは細胞骨格であるミオシンを制御するMLCをリン酸化し細胞骨格のダイナミクスに変化を与え、神経突起の形成を引き起こすことが明らかとなった。さらにCaMKIはやはりカルシウム依存的キナーゼであるCaMKKにより活性化されることも明らかにした。CaMKKは神経活動によってNMDA受容体などを介して流入するカルシウムイオンによって活性化する。従って神経活動によりダイナミクスが変化する神経突起形成されるが、その新規で重要なパスウェイの全貌を明らかにすることに成功した (Neuron 57, 94-107, 2008)。従って、我々が開発してきた手法が、既知のパスウェイの動態を定量することにとどまらず、新規なパスウェイの発見にも貢献できることを示すことが出来た。

### <国内外での成果の位置づけ>

本研究開発の中心的な解析システムは、質量分析の感度が極めて高く、且つサンプル前処理・導入法と解析環境を含めた全体最適化によって達成されている。このような試みは世界的にも殆どなく、類似の手法での網羅的な解析での成功例は世界的にもない。従って、本研究開発の世界的な優位性は高い。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2007年当初は、パスウェイの絶対定量を目指し、内因性の相互作用を検出定量する方法論の開発を行い、小規模な検証研究を行う計画であった。そのために古典的MAPキナーゼカスケードに関わるコアとなる分子10個に対するファージ抗体を作製し、内因性の相互作用の検出を試みた。しかし内因性の複合体を免疫沈降可能である抗体は10分子中6分子にしか取得できなかった。また、この6抗体を用いた質量分析実験を行ったが、これまで得られている相互作用情報を殆ど得ることが出来なかった。その要因は、ピーズへの抗体の固定化方法が最適化されておらず免疫沈降の効率が悪いことが挙げられる。また、各抗体により複合体タンパク質の溶出条件がことなり最適化がやはり困難であった。

### <今後の課題>

- ①引き続き、これまでのDQN法を用いたパスウェイ解析の定量化を継続する。
- ②内因性の相互作用を検出定量するためのファージ抗体の固定化等の最適化を検討し、残り4分子の行程も取得するよう努力する。
- ③パスウェイ解析で得られた新規相互作用の機能解析を継続する。また、カルシウムシグナルと古典的MAPキナーゼカスケードとのクロストークも新たなターゲットとして解析を進める。

### <成果公表リスト>

#### 1. 603021810 (論文)

Komatsu M, Chiba T, Tatsumi K, Iemura SI, Tanida I, Okazaki N, Ueno T, Kominami E, Natsume T, and Tanaka K., A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold

- modifier., *EMBO J.*, 2004 .23(9): p.1977-86
2. 603021814 (論文)  
Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI., Skp2-Mediated Degradation of p27 Regulates Progression into Mitosis., *Dev Cell.*, 2004 .6 (5): p.661-72.
  3. 603021821 (論文)  
Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., and Mikoshiba, K., Subtype-specific and ER-lumenal-environment-dependent Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 by ERp44., *Cell*, 120,85-98(2004)
  4. 603021830 (論文)  
Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K, Nakajima K., STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(12):4524-9(2005)
  5. 603021832 (論文)  
Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y., JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage., *Nat Cell Biol.*, 7(3):278-85(2005)
  6. 603021841 (論文)  
Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, Natsume T, Tanaka K, Murata S., A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes., *Nature.*, 2005 Oct 27;437(7063):1381-5.
  7. 608011401 (論文)  
Hishiya A, Iemura S, Natsume T, Takayama S, Ikeda K, Watanabe K., A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy., *EMBO J.*, 25(3), 554-64 (2006)
  8. 608011409 (論文)  
Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y., Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin., *Nature.*, 441(7089), 46-52 (2006)
  9. 608011417 (論文)  
Yamada M, Ohnishi J, Ohkawara B, Iemura S, Satoh K, Hyodo-Miura J, Kawachi K, Natsume T, Shibuya H., NARF, an Nemo-like Kinase (NLK)-associated Ring Finger Protein Regulates the Ubiquitylation and Degradation of T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF)., *J Biol Chem.*, 281(30), 20749-60 (2006)
  10. 608011421 (論文)  
Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M., Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein., *J Biochem.*, 139(5), 921-30 (2006)  
Hyodo-Miura J, Yamamoto TS, Hyodo AC, Iemura S, Kusakabe M, Nishida E, Natsume T, Ueno N., XGAP, an ArfGAP, is required for polarized localization of PAR proteins and cell polarity in *Xenopus* gastrulation., *Dev Cell.*, 11(1), 69-79 (2006)
  11. 701101116 (論文)  
Hamazaki J, Iemura S, Natsume T, Yashiroda H, Tanaka K, Murata S., A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes., *EMBO J.*, 25(19), 4524-36 (2006)
  12. 701101119 (論文)  
Kajino T, Ren H, Iemura S, Natsume T, Stefansson B, Brautigan DL, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J., Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway., *J Biol Chem.*, 281(52), 39891-6 (2006)
  13. 701101122 (論文)  
Hirano Y, Hayashi H, Iemura S, Hendil KB, Niwa S, Kishimoto T, Kasahara M, Natsume T, Tanaka K, Murata S., Cooperation of Multiple Chaperones Required for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes., *Mol Cell.*, 24(6), 977-84 (2006)
  14. 801171437 (論文)  
Iioka H, Iemura S, Natsume T, Kinoshita N., Wnt signalling regulates paxillin ubiquitination essential for mesodermal cell motility., *Nat Cell Biol.*, 2007 Jul;9(7):813-21.
  15. 801171444 (論文)  
Lee RH, Iioka H, Ohashi M, Iemura S, Natsume T, Kinoshita N., XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway., *EMBO J.*, 2007 Aug 8;26(15):3592-606. Epub 2007 Jul 12.
  16. 801171504 (論文)  
Satoh K, Ohnishi J, Sato A, Takeyama M, Iemura S, Natsume T, Shibuya H., Nemo-like kinase-myocyte enhancer factor 2A signaling regulates anterior formation in *Xenopus* development., *Mol Cell Biol.*, 2007 Nov;27(21):7623-30.
  17. 801171507 (論文)  
Saijou E, Itoh T, Kim KW, Iemura S, Natsume T, Miyajima A., Nucleocytoplasmic shuttling of the zinc finger protein EZI Is mediated by importin-7-dependent nuclear import and CRM1-independent export mechanisms., *J Biol Chem.*, 2007 Nov 2;282(44):32327-37
  18. 801171702 (論文)  
Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata JI, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura SI, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K., Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice., *Cell.*, 2007 Dec 14;131(6):1149-1163
  19. 801171704 (論文)  
Hamuro J, Higuchi O, Okada K, Ueno M, Iemura SI, Natsume T, Spearman H, Beeson D, Yamanashi Y., Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in DOK-7., *J Biol Chem.*, 2007 Dec 29
  20. 801171706 (論文)  
Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR., Activity-Dependent Synaptogenesis: Regulation by a CaM-Kinase Kinase/CaM-Kinase I/betaPIX Signaling Complex., *Neuron.*, 2008 Jan 10;57(1):94-107