

## リン酸化ペプチドの網羅的解析のための新技術開発

●松本 雅記 ◆白根 道子 ◆中山 敬一

九州大学生体防御医学研究所

### <研究の目的と進め方>

従来、生物学の研究は遺伝学に代表されるように「過去の知見や経験を元に仮説を立てて検証する」、いわゆる「仮説主導型」が主流であった。そのため、これまでの常識から逸脱し、説明がつけにくい結果は主観的に排除されることもしばしばあった。一方、網羅的解析のような、「得られたデータを俯瞰することで仮説を立て証明する」、いわゆる「データ主導型」の方法論は従来型の研究では見落とされていた事実を客観的に見出すことが可能であり、場合によっては全く予期しない意外な発見に繋がる可能性も秘めている。タンパク質のリン酸化は細胞内シグナル伝達において最も重要な翻訳後修飾の一つである。例えば、細胞膜受容体への刺激はチロシンキナーゼを活性化し、続く下流分子のリン酸化カスケードを介して、最終的には核内の転写活性化や細胞骨格の再構築などを引き起こす。これまでシグナル伝達機構に関して多くの知見が蓄積しているが、インプット（細胞外刺激など）とアウトプット（細胞応答）との間に依然大きなブラックボックスが存在するのが現状である。本研究では細胞内リン酸化の動態を網羅的・定量的に解析する技術を開発・応用することでシグナル伝達の総合的理解を目指す。具体的には、1) 金属イオン固定化アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によるリン酸化ペプチド精製法の徹底的な最適化による高純度なリン酸化ペプチドの濃縮法、2) 安定同位体標識法による定量技術とリン酸化ペプチド精製技術の組み合わせによって、リン酸化ペプチドの網羅的変動解析法の確立、3) 脱リン酸化法 (PID 法) との組み合わせによるリン酸化ペプチド同定効率の向上、4) これらの技術を応用した細胞周期やシグナル伝達研究、を遂行する。本研究の成功によって、これまで研究者人口が多い分子に偏りがちであったリン酸化情報がバイアスフリーで取得可能となり、シグナル伝達研究に新たな切り口を提案すると思われる。さらにこれらの情報はシステム・バイオロジーにおける重要な変数としての有用性も期待される。

### <2007 年度の研究の当初計画>

昨年度は IMAC を用いて抗リン酸化チロシン抗体によって精製したチロシンリン酸化タンパク質より得られた消化物から高い特異性でリン酸化ペプチドの精製に成功するとともに、脱リン酸化法を用いることで同定の信頼性および網羅性の改善を確認した。しかしながら、当初計画していた iTRAQ 法と脱リン酸化法との組み合わせは予備的な検討に留まった。これは、複雑な試料（全細胞抽出液消化物等）からのリン酸化ペプチドの精製において、非特異的結合による非リン酸化ペプチドの混入によって、回収率や精製度の再現性が低いなどの問題点が生じたため、リン酸化ペプチドの精製法の見直しなどの基盤技術の再検討をおこなったためである。本年度は当初の計画であった脱リン酸化法と iTRAQ

法との組み合わせの実行を引き続き行う。さらに、リン酸化ペプチドを脱リン酸化処理なしに網羅的に同定・定量できるよう、さらなる精製技術の最適化等を行う。

### リン酸化ペプチド解析の網羅性の向上

より網羅的にリン酸化ペプチドを同定するために、細胞消化物の調整法の改善や前処理（イオン交換などによる分画など）の検討を行い、同定ペプチド数の向上を目指す。また、Ga-IMAC と Fe-IMAC をタンデムに利用することで、より取りこぼしの少ないリン酸化ペプチド精製法の確立を行う。

### リン酸化ペプチドの変動解析法の確立

安定同位体標識法による定量法と IMAC によるリン酸化ペプチド精製技術を組み合わせることで、リン酸化ペプチドの定量的変動解析法の確立を目指す。さらに、PID 法と iTRAQ 法を組み合わせることで脱リン酸化処理したペプチド（前リン酸化ペプチド：ex-phosphopeptide）を定量的に解析する ex-phosphopeptide profiling (EPP) 法を構築する。

### 細胞周期やシグナル伝達研究への適用

上記のリン酸化ペプチドの網羅的定量解析技術が確立されれば、細胞周期進行や細胞外刺激などに依存して変動するリン酸化ペプチドの変動解析を行う。

### <2007 年度の成果>

標準タンパク質（精製品）ではなく細胞全抽出液の消化物を用いた最適化を行うことでより実サンプルに即した精製法を確立することを目指し、IMAC 担体や金属の選定、バッファー条件や洗浄回数などの系統的な最適化を詳細に行った。リン酸化ペプチド精製条件の詳細な再検討によって、リン酸化ペプチド精製の回収率・特異性を大幅に改善した。さらに、Ga-IMAC と Fe-IMAC のリン酸化ペプチド精製の特異性の差を見出した。Ga-IMAC は Fe-IMAC と比較してリン酸化ペプチドの保持が弱いいため、1 リン酸化ペプチドの回収率が低いが、2 リン酸化以上のペプチドを効率よく回収できる。一方、Fe-IMAC は 1 リン酸化ペプチドでも十分に回収できるため、存在量比が少ない 2 リン酸化ペプチドの同定が困難である。したがって、Ga-IMAC において先に 2 リン酸化以上のマルチリン酸化ペプチドを回収し、Ga-IMAC に保持できなかった（すなわちフロースルー）に含まれる 1 リン酸化ペプチドを Fe-IMAC にて回収する、tandem IMAC 法を構築した。その結果、現在、わずか 100ug 程度のタンパク質消化物から 700 種類におよぶリン酸化ペプチドが同定可能となっている。

さらに、大規模なリン酸化ペプチド解析のために、種々のイオン交換クロマトグラフィー等と IMAC の組み合わせを詳細に検討

した。その結果、最大 10000 種類のリン酸化ペプチドの同定が可能となるシステムを構築した。さらに SILAC 法や iTRAQ 法などの安定同位体標識法による定量技術を用いることで、実際にリン酸化ペプチドを定量可能かどうかを検証し、2 検体間の定量的比較 (SILAC 法) や多検体間の比較 (iTRAQ 法) による定量法の適用が可能であることが判明した。

上記、定量的なリン酸化ペプチドの大規模解析システムの構築が完了したため、細胞周期やシグナル伝達研究への応用を試みた。まず、非同調細胞と M 期同調細胞の比較を行い、3000 種類以上のリン酸化ペプチド (約 1500 種類のタンパク質に相当) の定量に成功し、多数の M 期特異的なリン酸化を見出した。また、EGF 刺激によって引き起こされるリン酸化の大規模定量解析を iTRAQ 法との併用によって遂行し、10000 種類にリン酸化の経時変化をとらえることに成功した。現在、これらの大規模データを用いて、モチーフ解析やジーンオントロジー解析などのバイオインフォマティクスを用いた解析を行うとともに、各々の新規リン酸化タンパク質 (あるいは新規リン酸化部位) に関して詳細な解析を行っている。

#### <国内外での成果の位置づけ>

本研究では高度なリン酸化ペプチド精製技術や解析技術を構築することで、さまざまな刺激などで変動するリン酸化情報を大規模かつ定量的に取得するための解析プラットフォームの構築を行ってきた。また、単なる技術開発にとどまらず、実際にシグナル伝達や細胞周期研究に応用し、有用な情報を得ることを最終的な目標として研究を展開してきた。国内外において、リン酸化ペプチド精製技術や質量分析計による同定・定量法の構築に関しては激しい研究・開発競争があり、ここ 1-2 年でリン酸化ペプチドの大規模解析の報告がいくつかなされた。しかしながら、最も大規模な解析例においても 6000 ヶ所程度のリン酸化部位の同定・定量にとどまっている。しかも、それらの結果は極めて大量の試料を用いた“デモンストレーション”的な解析である。一方、本研究においては、極めて高純度なリン酸化ペプチド精製技術を確立したことで、1 サンプルあたり 5 mg タンパク質 (15 cm 培養ディッシュ 1 枚の培養細胞) から、先行研究を大幅に超えた 1000 種類以上のリン酸化ペプチドの同定・定量なシステムを構築し、日常の実験のスケールでリン酸化の大規模解析が可能となった。

また、本研究ではリン酸化ペプチドの定量に iTRAQ 法の適用を試みた。これまでの報告では、チロシンリン酸化ペプチドにおいて iTRAQ 法の適用例があるが、全リン酸化の網羅的解析に関してはいまだ報告がない。iTRAQ 法は現時点で 4 点までの同時定量が可能であり (将来的には 8 点定量まで拡張される)、シグナル伝達の解析など多点定量が必要とされる研究に大きな利点がある。

さらに、本研究のような細胞周期研究にリン酸化ペプチド大規模解析を応用した例の報告はなく、本研究が当該分野に与えるインパクトは大きいものと期待される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本年度前半に、高純度のリン酸化ペプチド精製技術を確立できたことから、脱リン酸化法 (PID) との併用によるリン酸化ペプチドの大規模解析を当初予定していた、しかしながら、精製法の改良と質量分析計の高感度化にともないリン酸化除去を行わずに大

規模なリン酸化情報を得ることが可能になった。その結果から、当初予測していた以上に、生体内には近接した部位にリン酸化が複数生じていることが明らかとなった。したがって、脱リン酸化の実行は、確かにペプチドの同定効率の改善は見込める (前年度実証済み) が、多リン酸化などの有用な情報が見逃される可能性が高くなった。このような理由から、現時点での PID 法の大規模解析への適用は見送っている。

#### <今後の課題>

これまでの研究の成果より、数千~1 万ヶ所程度のリン酸化を大規模に定量する技術を確立することができた。これらのデータに含まれるリン酸化情報は過去の個別生物学的研究で既に報告されているものも多数含まれており、本研究によって得られたデータの信頼性の高さが示された。特に、EGF 依存的なリン酸化の定量解析データは、EGF 受容体から、下流キナーゼを介して、種々の基質 (細胞骨格制御因子や転写因子など) につながる経路の主要因子をほぼ網羅できており、シグナル伝達をリン酸化を指標に俯瞰することが現実的に可能となってきた。今後は、この解析プラットフォームを活用して、シグナル伝達経路の特定分子の攪乱 (阻害剤や RNA 干渉法など) と組み合わせることで、シグナル伝達路におけるキナーゼ・基質間の対応関係の解明 (キナーゼネットワーク・マッピング) や複数のシグナル伝達経路間の全体比較などを行い、シグナル伝達経路のシステムとしての理解につなげる研究を展開したい。そのためには、大規模で複雑なデータを管理・解析するための、バイオインフォマティクスの充実が必須であり、今後、特定領域内での共同研究等を通じた、リン酸化データベースの構築や解析ソフトの開発などが必要である。

また、現時点では、同定されるリン酸化はひとつのペプチドあたり最大 3ヶ所程度である (つまり 3 リン酸化ペプチドまでしか検出できない)。これは、複数リン酸化によって MS/MS スペクトルのフラグメントパターンが複雑化するため、検索エンジンのアルゴリズム上の限界によって同定できないものと思われる。今後は、質量分析計における新規イオン解裂法である ETD 法あるいは ECD 法の導入することで、リン酸化ペプチドのより確実に詳細な解析法の開発など行う予定である。

#### <成果公表リスト>

##### 1) その他

翻訳後修飾の網羅的解析: チロシンリン酸化プロテオーム解析によるシグナル伝達研究 (0607242032)

抗体アフィニティーカラムを用いた翻訳後修飾タンパク質の網羅的解析~チロシンリン酸化とユビキチン化を中心に~ (0607242041)