

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【図1】。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

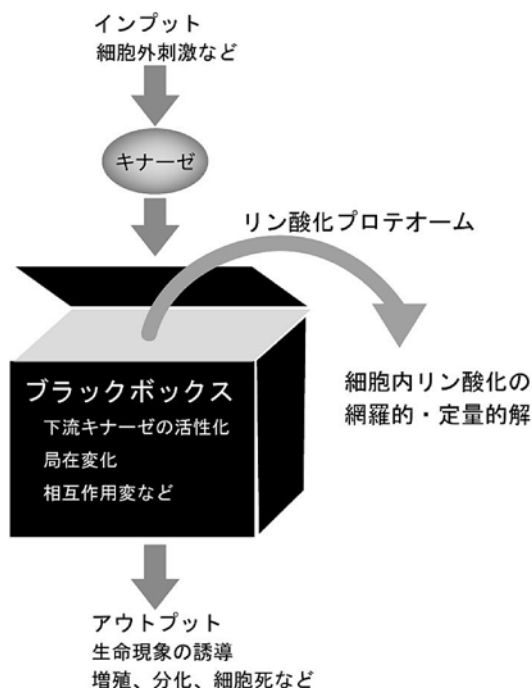


図1：リン酸化の大規模解析

わせによるリン酸化ペプチド同定効率の向上、4）これらの技術を用いた細胞周期やシグナル伝達研究、を遂行する。

<研究開始時の研究計画>

【2006年度】

・リン酸化ペプチドの精製技術の確立
金属キレートカラム（IMAC: immobilized metal affinity chromatography）によるリン酸化ペプチドの精製は操作の簡便さなどから汎用されているが、その反面、特異性は決して高いものではなく、非リン酸化ペプチドの混入が大きな問題である。したがって、IMACによるリン酸化ペプチド精製法の詳細な最適化を行い、より特異的かつ管便なリン酸化ペプチドの精製法を確立する。

・リン酸化ペプチドの同定技術の確立

質量分析計におけるリン酸化ペプチドの解析はリン酸化ペプチドのイオン化効率の低さなどから十分な成果が得られていないのが実情である。この問題点を解消するために、精製したリン酸化ペプチドを脱リン酸化処理後、質量分析計による測定を行う方法（PID: Post-IMAC dephosphorylation法）を確立する。

【2007年度】

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。

<研究期間の成果>

【2006年度】

・リン酸化ペプチド精製条件の確立
これまでにガリウム（Ga）をリガンドとした金属キレートカラム（Ga-IMAC）を用いて詳細な条件検討を行い、高い特異性でリン酸化ペプチドを回収できる条件を確立した。しかしながら、全細

胞抽出液を直接酵素消化して得たペプチド混合物からのリン酸化ペプチドの精製は非特異的吸着等によって効率が悪く、同定できるペプチドの数に制限が生じる事が判明した。したがって、電気泳動による分子量分画後ゲル内酵素消化、あるいはイオン交換によってタンパク質を分画した後、酵素消化を行うなどの前処理法の検討を行い、より多くのリン酸化ペプチドを効率よく精製するための方法論の確立を行った。

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ての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。

・PID法の確立

チロシンリン酸化タンパク質を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を用いてPID法の予備的な実験を行い、確かに脱リン酸化処理によって効率よくリン酸化ペプチドの同定が可能であることが判明した(図2)。また、全細胞抽出液から精製したリン酸化ペプチドに対してもPID法を適用し、脱リン酸化によって同定信頼性の向上を認めた。

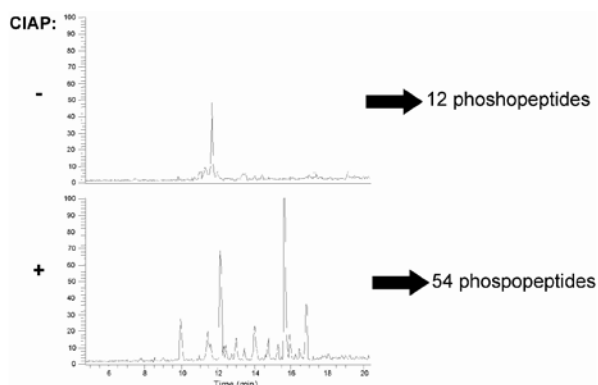


図2 PID法解析例:

精製したチロシンリン酸化タンパク質を酵素消化後、IMACによるリン酸化ペプチドを精製し、二つに分けた後一方を脱リン酸化処理して、両者をLC-MS/MSにて分析した。脱リン酸化処理によって著しい感度向上が見られ、多数のペプチドが検出された。

【2007年度】

・定量リン酸化解析法の確立

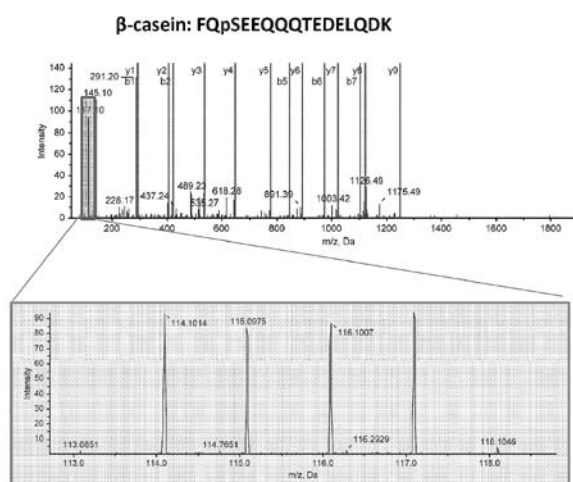


図3 標品リン酸化タンパク質内部標準法:

内部標準として試料(HeLa細胞消化物)に添加した β -casein由来のリン酸化ペプチドのMS/MSスペクトルを示す(下のスペクトルは低質量領域の拡大図)。配列の同定と同時に定量が可能となる。一定量添加した内部標準由来のシグナルはほぼ一定であることから、実験過程のエラーは最小限に抑えられていたことが分かる。

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かを検討した。

特にiTRAQ法に関しては、タンパク質の抽出、消化、リン酸化ペプチドの精製の後に、iTRAQ試薬での標識を行う必要があるため、実験誤差が定量値に反映されてしまう危険性がある。そこで、内部標準としてリン酸化タンパク質を試料に添加してから、消化や精製を行う方法を考案した。本方法によって、サンプル調整の際に生じる実験操作上のエラーをモニターすることが可能である。さらに多少の誤差であれば、標準タンパク質由来のリン酸化の定量値を用いて、試料由来のリン酸化ペプチドの定量値を補正することができるため、より信頼性の高い定量解析が可能となった(図3)。

・SILAC法による細胞周期特異的リン酸化の解析

SILAC法によるリン酸化定量比較を、非同調細胞とM期同調細胞のみに適用した(図4)。通常培養した細胞を非同調細胞とし、安定同位体標識アミノ酸(13C6-ロイシンおよび13C5-バリン)存在下で培養した細胞を薬剤を用いてM期に同調させた。子らの細胞からタンパク質を抽出し、酵素消化後、陽イオン交換クロマトグラフィーにて分画した後、Ga-IMACに導入し、リン酸化ペプチドを回収した。Ga-IMACのフロースルー分画はさらにFe-IMACに導入し、Ga-IMACでの結合が弱い1リン酸化ペプチドや塩基性配列リン酸化ペプチドを回収した。これらの各分画をLC-MS/MS解析することにより、大規模にリン酸化ペプチドの同定および定量を行った。最終的には3000種類以上のユニークなリン酸化ペプチド(約1500種類のタンパク質に相当)の同定・定量に成功した。非同調細胞と比較してM期において2倍以上リン酸化が増加しているものをM期特異的リン酸化とし

た(図5)。これらの中には既知のM期リン酸化タンパク質が多数含まれており、本システムによる解析の信頼性が確認された。また、これまでに報告がなされていないM期特異的リン酸化も多数同定され、新規細胞周期制御因子探索のための有効な手段であることが示唆された。

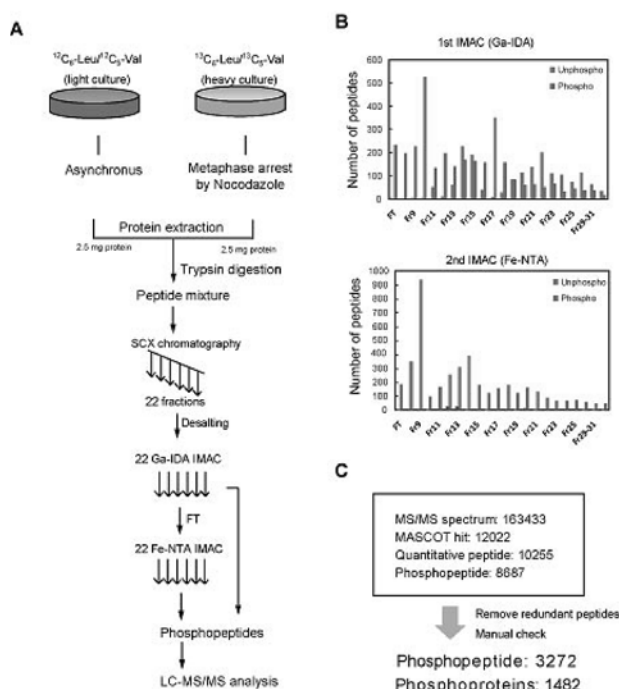


図4 SILAC法によるM期リン酸化の定量解析法:

非同調細胞(通常培養)とM期同調細胞(安定同位体標識アミノ酸培養)からタンパク質を抽出、混合、酵素消化を行い、陽イオン交換クロマトグラフィーによって分画した。各々の分画をGa-IMACとFe-IMACをタンデムに実行した。各分画を各々LC-MS/MS解析することでリン酸化ペプチドの同定および定量を行った。

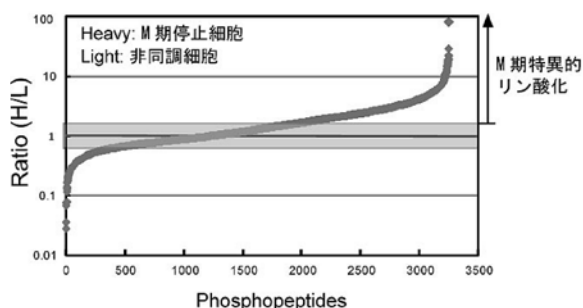


図5 SILAC法によるM期特異的リン酸化の同定:

同定されたリン酸化ペプチドを二つの検体間での比率(M期/非同調)によって並べて図示する。非同調細胞と比較して2倍以上リン酸化が行進しているものをM基特異的リン酸化とした。

・iTRAQ法によるシグナル伝達におけるリン酸化大規模定量解析
上述したようにiTRAQ法を用いてリン酸化の定量解析を高い信頼性で実行するシステムを構築したので、シグナル伝達の時系列解析に応用した。具体的にはEGF刺激を様々な時間施し、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行った。

大規模なリン酸化の解析のためにはリン酸化ペプチドの精製に加えてイオン交換クロマトグラフィー等による分画を行うことが非常に有効であるが、iTRAQ法ではリン酸化ペプチド精製後に標識を行う必要があるためiTRAQ標識後にペプチドを混合し、イオン交換(アニオンおよびカチオン交換)による分画を行った。

約40分画の測定の結果、10000種類以上のリン酸化の経時変化をとらえることに成功した(図6)。EGFシグナル伝達経路の主要タンパク質の多くが今回の解析によってEGF依存的にリン酸化していることが示された。また、これまでEGFシグナルとの関連が認識されていなかったタンパク質群が新たにEGFシグナルによってリン酸化を受けることが判明した。例えば、核膜孔タンパク質複合体(NPC)の構成成分の多くが著しくリン酸化を受けていることが判明し、EGFシグナルが細胞質-細胞核輸送を核膜孔タンパク質のリン酸化を介して制御している可能性が示唆された。

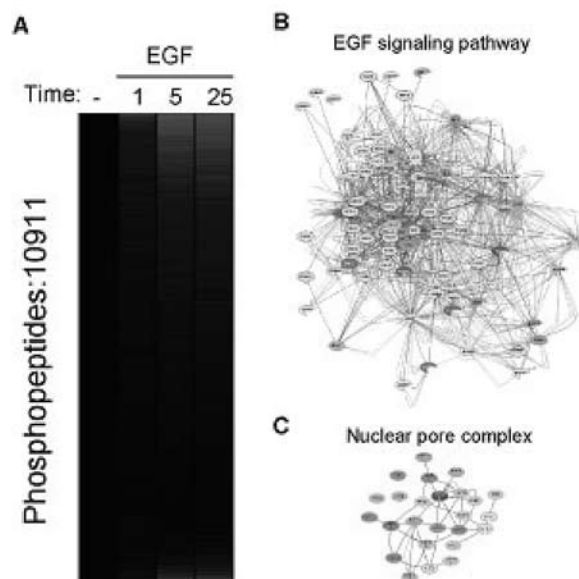


図6 phospho-iTRAQ法によるEGF依存的リン酸化の大規模定量解析:

HeLa細胞を血清飢餓後40nMのEGF存在下で1, 5, 25分処理した後、タンパク質を抽出し、酵素消化後、IMACによるリン酸化ペプチドの精製を行った。得られたリン酸化ペプチドはiTRAQ114(刺激なし)、iTRAQ-115(EGF 1min), iTRAQ-116(EGF 5min), およびiTRAQ-117(EGF 25min)で標識した。標識リン酸化ペプチドをイオン交換クロマトグラフィーによって分画し、LC-MS/MS解析を行った。

<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10000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。

<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、展望>

これまでの研究成果より、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認することができた。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、シグナル伝達経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、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ため、現在独自にこれらの開発を行っている。

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法の導入するでの解決や、リン酸化ペプチド同定のために特化した検索エンジンの開発が必要である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1.(0912011153)

Matsumoto M., Oyamada K., Takahashi H., Sato T., Hatakeyama S., *Nakayama K.I.: Large-scale proteomic analysis of tyrosine phosphorylation induced by TCR or BCR activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 9: 3549-3563 (2009)

2) 図書

1. (0607242032)

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

2. (0607242041)

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~