

特集：次世代シグナル伝達研究—先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開—

ショットガンプロテオミクスが解き明かす 高解像度シグナル伝達ネットワーク

秦 裕 子, 尾 山 大 明

細胞は多くのタンパク質が織り成す相互作用ネットワークによって増殖、分化といった基本的な生命現象を幅広く制御しており、その作動原理に関する理論的基盤の解明は生命システムの真の理解に向けて至上命題といっても過言ではない。シグナル伝達ネットワークにおいては、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾によって高次の動的制御がなされており、それらの包括的な全体像の計測から今まで予測されなかった知見の導出が大いに期待される。本稿では、近年技術的な進展が目覚ましく、数百から数千の因子に関する一斉同定・定量を可能とする先端的ショットガンプロテオミクス解析技術の現状と、膠芽腫患者由来細胞や薬剤耐性能を獲得した乳がん細胞に関するシグナルネットワーク解析への応用から得られた我々の最近の知見の紹介を通して、シグナル伝達研究の新たな方向性を議論したい。

1. はじめに

シグナル伝達系は細胞の運命決定を担う最も重要な生命制御システムの一つであるが、その全体像はいまだブラックボックスに近い状態である。しかしながら現在までの研究から、細胞内で翻訳されたタンパク質そのものの相互作用のみにとどまらず、リン酸化やユビキチン化をはじめとするタンパク質翻訳後修飾のダイナミクスが作動メカニズムの規定に大きく関与することがわかってきている。このことから、この複雑な生命システムに関する作動原理の解明には、細胞内で発現しているタンパク質群に関する包括的な理解のみならず、それらの翻訳後修飾に関する詳細な動態解析が必須であることは自明の理である。近年、超低

流速液体クロマトグラフィーと高感度質量分析計を組み合わせたショットガンプロテオミクス解析技術の登場により、数百から数千の因子に関する一斉同定及びそれらの定量が可能となった。本稿では、膠芽腫患者由来細胞及び薬剤耐性能を獲得した乳がん細胞に関して最近筆者らが進めてきた研究を例として、細胞内のタンパク質及びリン酸化修飾に関する包括的なネットワーク解析によって得られた知見を紹介し、プロテオミクスあるいはタンパク質の翻訳後修飾を網羅的に解析するモディフィコミクスデータを基盤とするシグナル伝達系のシステム解析に向けた新たな研究の潮流に関して議論を深めたい。

2. 膠芽腫患者由来細胞に関する包括的タンパク質ネットワーク解析

膠芽腫は、より未分化度の高い細胞集団から成る最も悪性度が高い脳腫瘍の一つであり、診断確定後の余命は1年程度と短く、その治療成績は過去10年以上にわたりほとんど改善されていない。近年、がん組織にも自己複製能と多分化能を持つ幹細胞が存在するというがん幹細胞仮説が提唱され、脳腫瘍においてもその存在が実験的に証明されていることから、膠芽腫根治に向けて上記のがん幹細胞を

東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー
(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

High-resolution signal transduction networks revealed by
shotgun proteomics technology

Hiroko Kozuka-Hata and Masaaki Oyama (Medical Proteomics Laboratory, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

ターゲットとした新たな治療戦略の展開が急務であることは言及するまでもない事実である。そこで患者組織から無血清培養にて樹立した膠芽腫細胞株を対象として、ナノフロー液体クロマトグラフィーとフーリエ変換型高精度質量分析計をオンラインで連結させたプロテオミクス解析システムを用いて、細胞内タンパク質群の包括的な同定及び得られた大規模プロテオームデータに基づくパスウェイ解析を行った。ショットガン解析の結果、ペプチドレベルでは8,896種類、タンパク質レベルでは2,089種類の分子群が同定され、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) によるパスウェイ解析によって、リボソーム、スプライソソーム、及びプロテアソームに加え、解糖/糖新生、ピルビン酸代謝、ペントースリン酸経路などの Warburg 効果に関連する様々な代謝経路が高い発現レベルを示していることが浮き彫りとなった¹⁾。

シグナル伝達系を制御する代表的な翻訳後修飾であるリン酸化、ユビキチン化に関しては、プロテオーム解析を指向した生化学的な精製・濃縮技術の開発が精力的に進められており、特にリン酸化に関しては、IMAC²⁾、TiO₂³⁾、Phos-tag⁴⁾などのリン酸化残基親和性化合物によってリン酸化タンパク質/ペプチドを効率的に捕捉する方法が汎用されている。チロシン残基のリン酸化に焦点を絞った解析を行う場合においては、特異性の高い抗体 (4G10, P-Tyr-

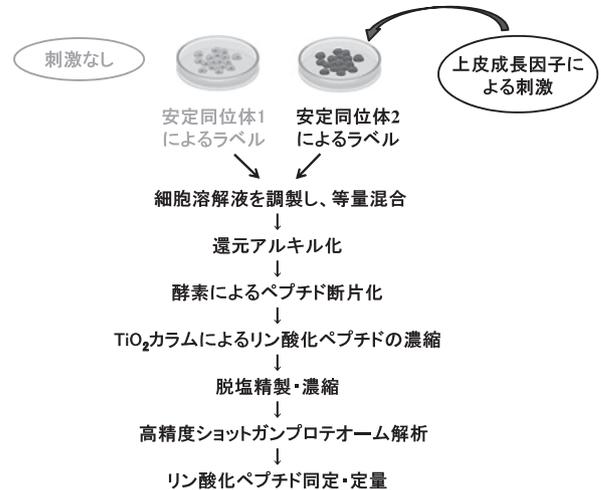


図1 SILAC法を基盤としたグローバル定量リン酸化プロテオミクス解析の流れ

アルギニンあるいはリシン残基に関して質量の異なる安定同位体を導入した細胞株群を用いて、一方の細胞株には上皮成長因子による刺激を加え、他方には刺激を加えずに細胞を処理した後、細胞溶解液を調製する。これらを等比で混合した後、還元アルキル化反応によってタンパク質配列中のシステイン残基を化学的に保護し、タンパク質分解酵素によって細胞内タンパク質のペプチド断片化を行う。生成したペプチド混合物からTiO₂カラムを用いてリン酸化ペプチドを精製し、脱塩濃縮を行った後、高精度質量分析システムによってショットガンプロテオーム解析を行う。得られた大規模測定データから解析ソフトウェアによってリン酸化タンパク質の同定・定量が可能となる。

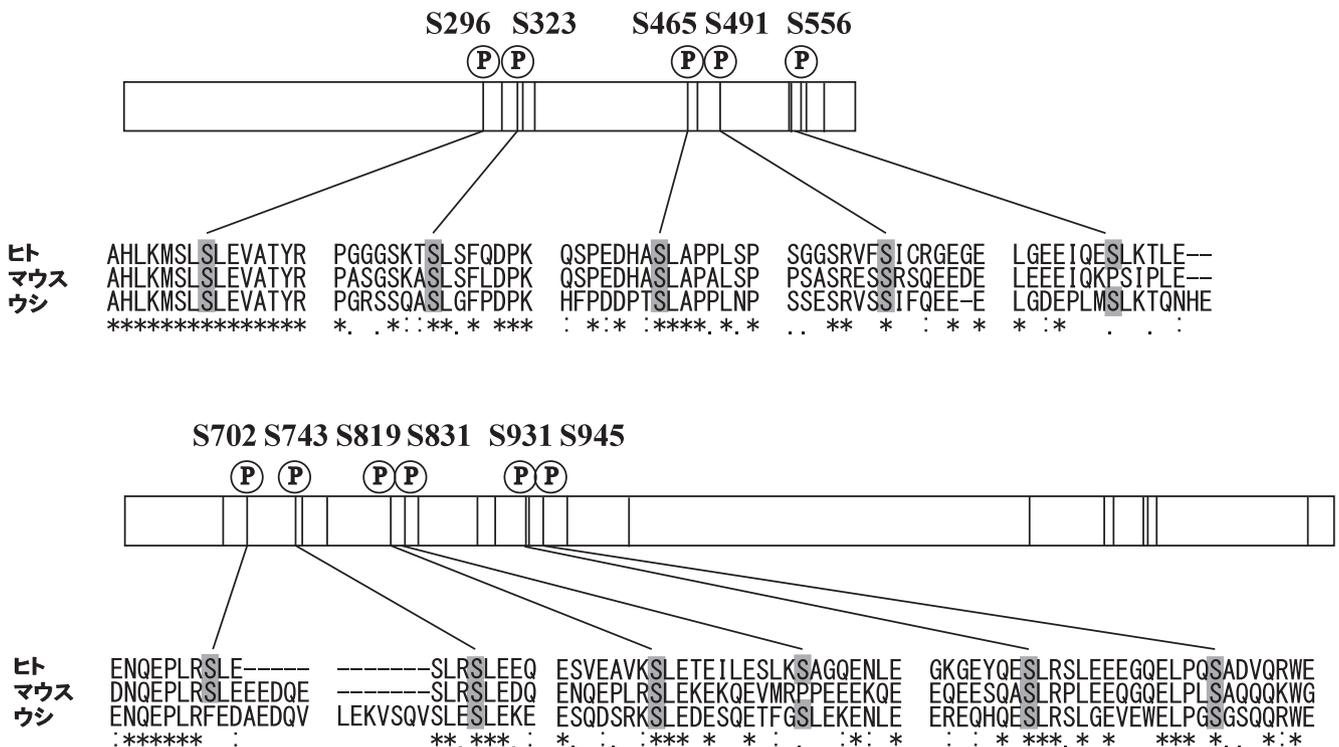


図2 膠芽腫患者由来細胞から同定されたネスチンのリン酸化部位に関する種間アミノ酸配列比較解析
 膠芽腫患者由来細胞から新たに同定された神経幹細胞マーカーネスチンのリン酸化部位に関して、近傍のアミノ酸配列に関する種間比較を示す。Ⓟ：新規リン酸化部位，灰色：リン酸化を受けているアミノ酸残基。

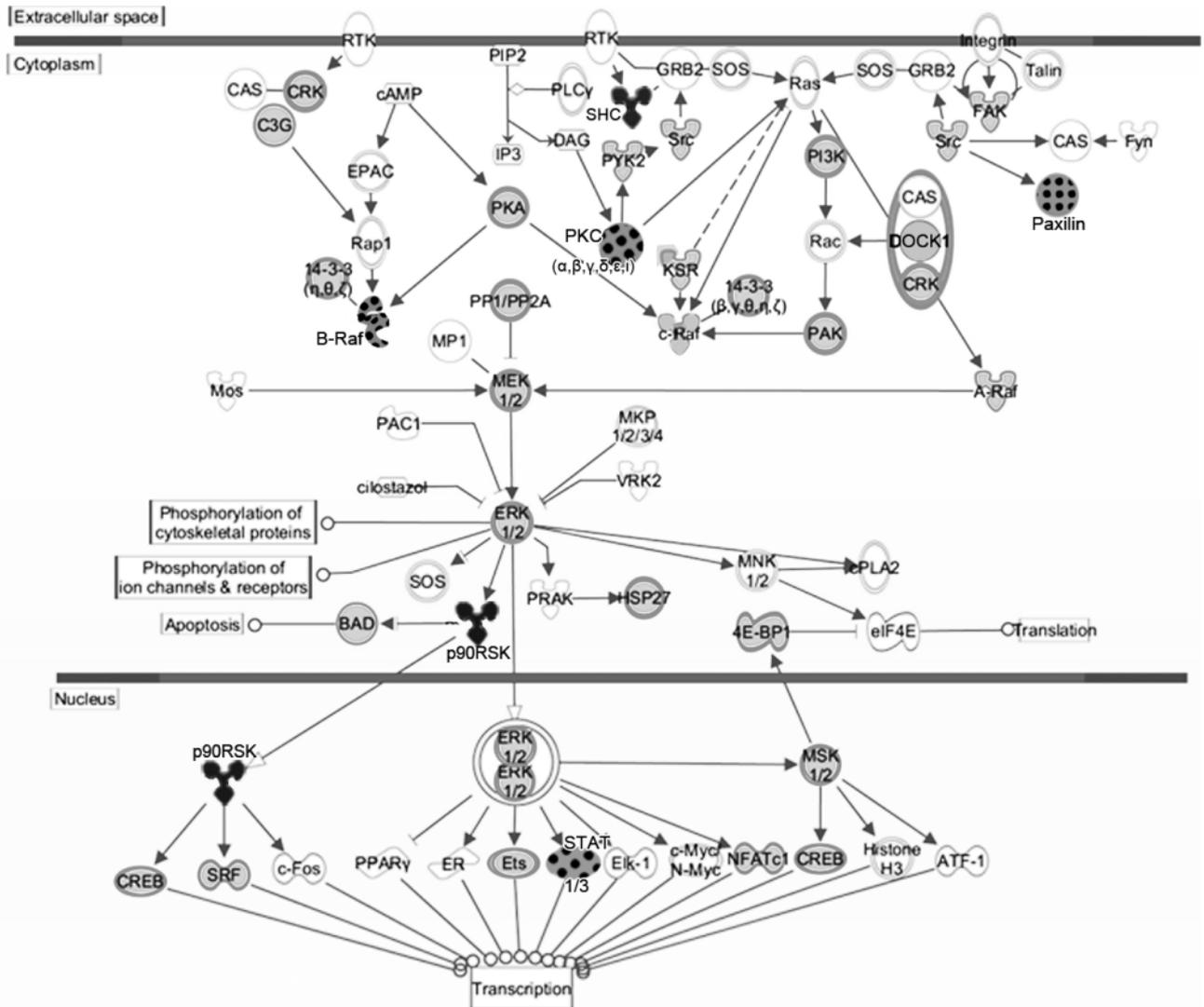


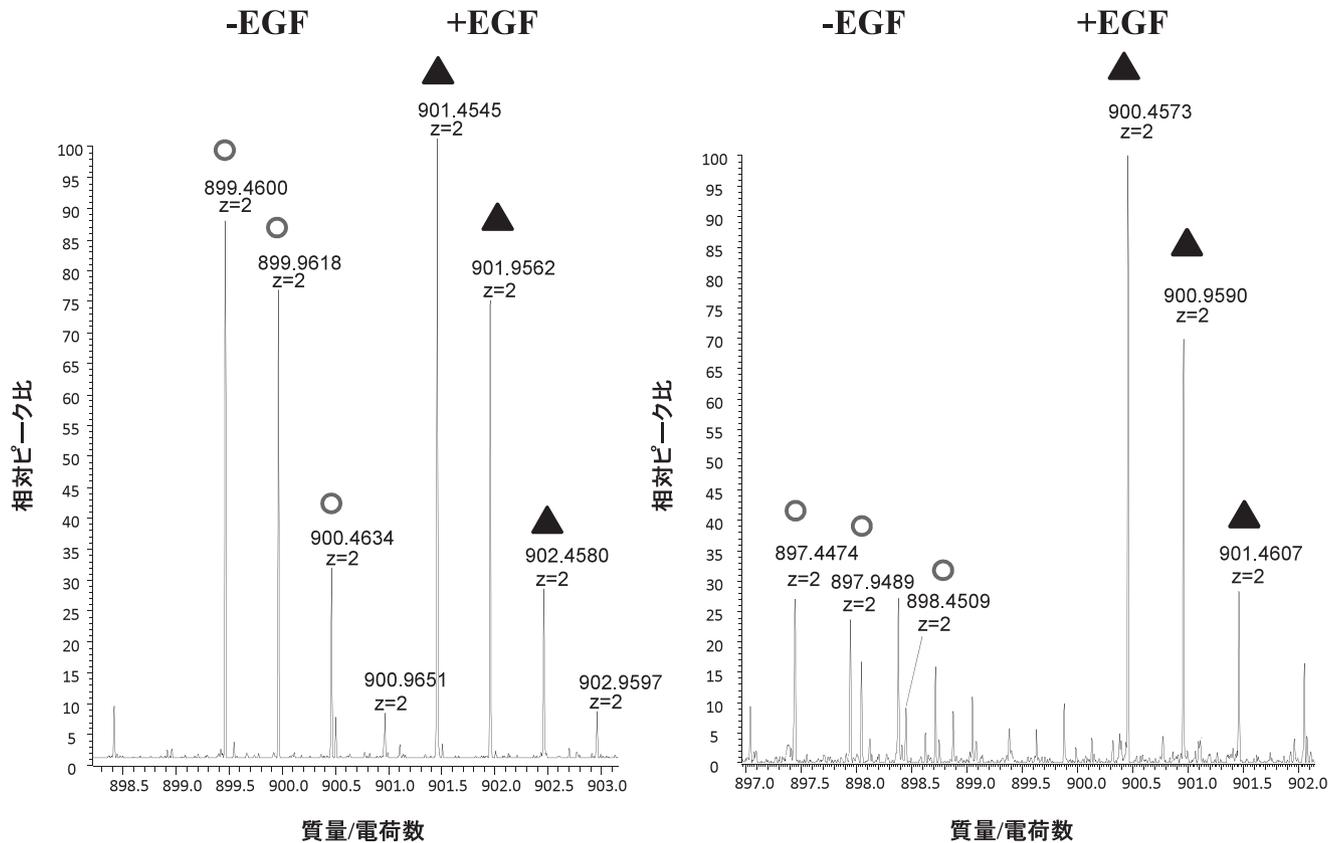
図3 膠芽腫患者由来細胞のリン酸化プロテオームデータに基づくパスウェイ解析

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) によって可視化された ERK/MAPK シグナルパスウェイの一例を示す。無地：EGF 刺激によってリン酸化レベルが上昇したシグナル因子，水玉：EGF 刺激によってリン酸化レベルが下降したシグナル因子．色の濃淡は活性化の変動レベルを示す。

100) を用いて精製を行うことが可能であり^{5,6)}，ユビキチン化に関しても修飾部位をトリプシン処理した後に生成されるジグリシン修飾リシンを標的とするモノクローナル抗体を用いた画期的な精製方法が報告されている⁷⁻⁹⁾。

シグナル伝達においては，細胞外からの刺激に应答して時間依存的に各シグナル因子の翻訳後修飾レベルが変動することにより，情報の伝達が制御される．このような活性変動を相対的に定量化するために計測対象であるタンパク質にラベルを施す技術が，定量プロテオーム解析において効力を発揮する．時間依存的な変動を計測するためには定量精度が高い *in vivo* ラベルが非常に有効であり，最も代表的な SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) 法¹⁰⁾においては，アルギニンあるいはリシン

残基に関して質量の異なる安定同位体を細胞中の全タンパク質に導入し，各ラベル化細胞に対して異なる刺激時間を設定することにより，活性変動に関する時系列相対定量が可能となる¹¹⁾(図1)．膠芽腫患者由来細胞に関する包括的定量リン酸化プロテオーム解析から，2,282種類のリ酸化タンパク質に由来する6,073種類のリ酸化ペプチドが同定され，その中でリン酸化部位が1か所同定されたペプチドは5,497種類，2か所以上同定されたペプチドは576種類であった¹²⁾．また大変興味深いことに代表的な神経幹細胞マーカーの一つであるネスチンに関しては36か所のリン酸化部位が同定され，11か所の新規リン酸化部位を含むアミノ酸配列が種間でよく保存されていた(図2)．さらに，得られたリン酸化プロテオームデータを基に In-



子宮頸がん細胞

膠芽腫患者由来細胞

図4 supervillin-like (LOC645954) によりコードされた新規リン酸化ペプチド (GLApSPTAITPVASAICGK) に関する EGF 刺激依存的な活性変動を示す MS スペクトル

左：子宮頸がん細胞，右：膠芽腫患者由来細胞。

genuity Pathways Analysis (IPA) (<http://www.ingenuity.com/>) によるネットワーク解析を行ったところ、ERK/MAPK シグナルパスウェイにおいては転写制御に至るまでの主要因子が同定されていることがわかった (図3)。また、従来非翻訳領域と考えられてきた RNA 配列部位がコードする新規ペプチドのセリン残基がリン酸化され、上皮成長因子 (EGF) 刺激により活性制御を受けていることも新たに見いだした (図4)。これらの結果から、膠芽腫患者由来細胞において従来の想定を超える多様なシグナル制御機構がネットワークレベルで作動している可能性が示唆された。

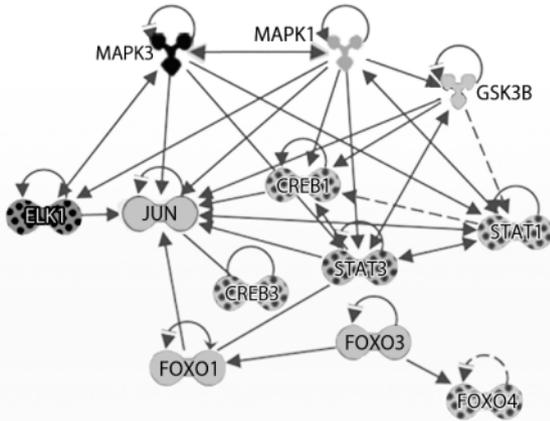
3. リン酸化プロテオミクスと遺伝子発現データの統合から見えるシグナル制御ネットワーク

シグナル伝達は転写・翻訳と連動してダイナミックな細胞応答を惹起するが、最先端のリン酸化プロテオーム解析技術を用いると転写や翻訳に関連する因子の活性化までを包含したグローバルなリン酸化ダイナミクスが計測される¹³⁾ことから、シグナル伝達の下流で起きる遺伝子発現の

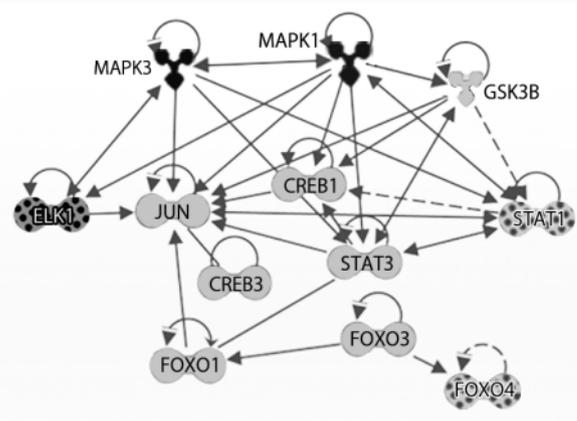
網羅的な活性変動情報との統合により、システムレベルでのシグナル-転写制御機構を見いだすことが可能になる。我々のグループでは、代表的なヒト乳がん細胞株である MCF-7 細胞の野生株、及び抗がん剤のタモキシフェンに対して耐性能を獲得した薬剤耐性株の双方について増殖シグナル依存的な時系列リン酸化プロテオームデータを取得し、各細胞株に関する時系列遺伝子発現情報との統合解析から薬剤耐性を担うシグナル-転写経路の同定を試みたので以下に紹介したい。

乳がん細胞における代表的なシグナルパスウェイであるエストロゲン受容体シグナル及び ErbB 受容体シグナルに関して、各受容体のリガンドである 17β -エストラジオール (E2) 及びヘレグリン (HRG) により刺激を施した細胞に関して、ショットガンプロテオミクスによる刺激時間 (0~60 分) 依存的な定量リン酸化プロテオーム解析を行った。リン酸化因子の生化学的精製・濃縮においては、セリン・トレオニン・チロシンリン酸化の全てを捕捉することが可能な Phos-tag に加え、細胞内での相対的な存在量が少ないチロシンリン酸化を特異的に認識する抗チロシンリン

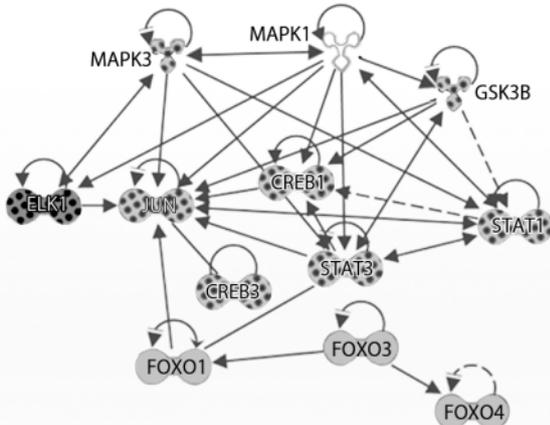
野生株 (HRG刺激)



薬剤耐性株 (HRG刺激)



野生株 (E2刺激)



薬剤耐性株 (E2刺激)

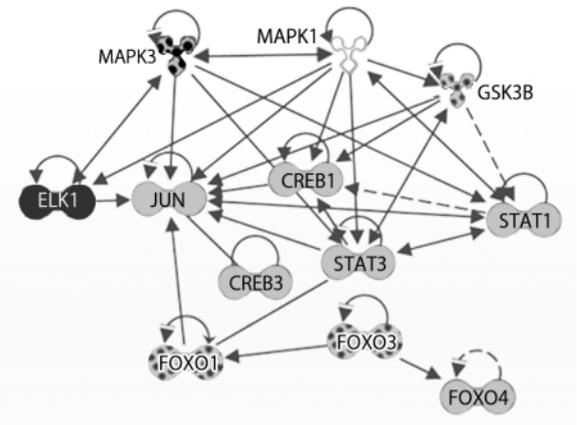


図5 リン酸化プロテオーム及び遺伝子発現ダイナミクスに基づく統合システム解析

時系列リン酸化プロテオームデータからネットワーク解析によって抽出されたキーシグナル因子の情報と遺伝子発現プロファイルから転写因子結合モチーフ解析によって推定された転写因子群の活性変動に関する統合解析から、薬剤耐性に関与する転写制御コアネットワークを絞り込むことが可能である。無地：刺激によって活性が上昇したシグナル因子，水玉：刺激によって活性が下降したシグナル因子。色の濃淡は活性化の変動レベルを示す。

酸化抗体 (4G10, P-Tyr-100) を併用し、MCF-7 野生株及び薬剤耐性株双方併せて 286 種類のリン酸化タンパク質が刺激依存的に変動することを明らかにした¹⁴⁾。

一方、遺伝子発現に関しても GeneChip を用いて E2 及び HRG 刺激後 0~48 時間の時系列データを取得し、MCF-7 野生株、薬剤耐性株双方から合わせて 1,603 種類の刺激依存的応答遺伝子が抽出された。これらの変動遺伝子群の転写因子結合配列モチーフを解析したところ、上流の制御因子として 27 の転写因子群が推定され、リン酸化プロテオームデータからネットワーク解析によって選択された 70 のシグナル因子との相互作用に関してパスウェイ解析を行った結果、リン酸化シグナル伝達因子 MAPK 及び GSK3 β から転写因子 AP-1 及び CREB へのシグナル-転写パスウェイに関して、タモキシフェン薬剤耐性株におけるシステムレベルでの活性昂進の相関が見いだされた¹⁵⁾ (図 5)。

4. おわりに

シグナル伝達ネットワークにおいては、本稿で紹介したリン酸化にとどまらず、ユビキチン化、グリコシル化など非常に多彩な翻訳後修飾が協調的、あるいは競合的に関与し合いながら精密にタンパク質間相互作用の動的制御を行い、システムレベルでの情報のやりとりを規定している。各々の修飾に対する効率的な生化学的精製方法の確立とショットガンプロテオミクス解析技術のさらなる高感度化・高精度化が進むことにより、様々な翻訳後修飾ダイナミクスに関する大容量の計測データを多角的・統合的に捉えることが近い将来、技術的に可能になると考えられる。最先端の質量分析技術が描き出す網羅性が高いプロテオミクス・モディフィコミクスデータを基盤として *in silico* で再構築される精緻なシグナル伝達ネットワーク像は、情報伝達因子間の複雑な相関性を条件付き確率で記述するべ

ジアンネットワーク^{16,17)}や各因子のステータスと細胞応答の間を定量的に関連付けるPLS回帰^{18,19)},あるいはシミュレーション²⁰⁾などの統計科学的・数理科学的解釈を通して,システム生物学的視点からの緻密なシグナル制御理論の検証を可能にすると期待される。

文 献

- 1) Kozuka-Hata, H., Nasu-Nishimura, Y., Koyama-Nasu, R., Ao-Kondo, H., Tsumoto, K., Akiyama, T., & Oyama, M. (2012) *Current Topics in Peptide & Protein Research*, **13**, 1-47.
- 2) Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., & White, F.M. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **20**, 301-305.
- 3) Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., & Jørgensen, T.J. (2005) *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 873-886.
- 4) Kinoshita, E., Yamada, A., Takeda, H., Kinoshita-Kikuta, E., & Koike, T. (2005) *J. Sep. Sci.*, **28**, 155-162.
- 5) Blagoev, B., Ong, S.E., Kratchmarova, I., & Mann, M. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1139-1145.
- 6) Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E. J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., & Comb, M.J. (2005) *Nat. Biotechnol.*, **23**, 94-101.
- 7) Xu, G., Paige, J.S., & Jaffrey, S.R. (2010) *Nat. Biotechnol.*, **28**, 868-873.
- 8) Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W., & Gygi, S.P. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 325-340.
- 9) Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., & Choudhary, C. (2011) *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, M111.013284.
- 10) Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002) *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 376-386.
- 11) Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Tasaki, S., Semba, K., Hattori, S., Sugano, S., Inoue, J., & Yamamoto, T. (2009) *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 226-231.
- 12) Kozuka-Hata, H., Nasu-Nishimura, Y., Koyama-Nasu, R., Ao-Kondo, H., Tsumoto, K., Akiyama, T., & Oyama, M. (2012) *PLoS One*, **7**, e43398.
- 13) Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006) *Cell*, **127**, 635-648.
- 14) Oyama, M., Nagashima, T., Suzuki, T., Kozuka-Hata, H., Yumoto, N., Shiraiishi, Y., Ikeda, K., Kuroki, Y., Gotoh, N., Ishida, T., Inoue, S., Kitano, H., & Okada-Hatakeyama, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 818-829.
- 15) Kozuka-Hata, H., Goto, Y., & Oyama, M. (2013) in *Oncogenomics and Cancer Proteomics—Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer* (Lopez-Camarillo, C. & Arechaga-Ocampo, E. eds.), pp. 185-206, InTech.
- 16) Bose, R., Molina, H., Patterson, A.S., Bitok, J.K., Periaswamy, B., Bader, J.S., Pandey, A., & Cole, P.A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9773-9778.
- 17) Guha, U., Chaerkady, R., Marimuthu, A., Patterson, A.S., Kashyap, M.K., Harsha, H.C., Sato, M., Bader, J.S., Lash, A. E., Minna, J.D., Pandey, A., & Varmus, H.E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14112-14117.
- 18) Wolf-Yadlin, A., Kumar, N., Zhang, Y., Hautaniemi, S., Zaman, M., Kim, H.D., Grantcharova, V., Lauffenburger, D.A., & White, F.M. (2006) *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 54.
- 19) Kumar, N., Wolf-Yadlin, A., White, F.M., & Lauffenburger, D. A. (2007) *PLoS Comput. Biol.*, **3**, e4.
- 20) Tasaki, S., Nagasaki, M., Kozuka-Hata, H., Semba, K., Gotoh, N., Hattori, S., Inoue, J., Yamamoto, T., Miyano, S., Sugano, S., & Oyama, M. (2010) *PLoS One*, **5**, e13926.