

研究課題別評価書

1. 研究課題名

オミクス解析用超微小エレクトロスプレー法の開発

2. 氏名

石濱 泰

3. 研究のねらい

ヒト、マウスをはじめとする様々な生物種のゲノムシーケンスプロジェクトが終了し、本格的なポストゲノム時代が始まった。トランスクリプトミクスがDNA マイクロアレイや次世代シーケンサとともに実用化された一方、プロテオミクスについては解析技術の飛躍的な進歩があるにもかかわらず、現在までに全プロテオーム一斉解析法は実用化されていない。現在、最も有力な分析手段は質量分析計を用いる方法である。通常、タンパク質混合物は質量分析計に導入する前に、感度や溶解性を向上させる為にトリプシンなどの消化酵素を用いてペプチドに断片化し、液体クロマトグラフィーで分離しながらタンデム質量分析計でペプチドのアミノ酸配列情報を読み取る。このショットガンプロテオミクス法の問題点は試料の複雑さと試料成分間の濃度差の広さであり、これを解決することがプロテオーム解析法の網羅性拡大につながる。さきがけ研究では、ショットガンプロテオミクス法を3パート(試料前処理、分離、質量分析)に分け、技術開発を行うこととした。試料前処理では、全プロテオーム中で重要度が高いが解析が困難な2つのサブプロテオーム(リン酸化修飾プロテオームおよび膜プロテオーム)にフォーカスした試料前処理法を検討した。分離パートでは、従来から用いられてきた多次元分離法ではなく、質量分析計にオンラインで接続した逆相クロマトグラフィーそのものの性能向上を目指した。質量分析パートでは、逆相クロマトグラフィーとのインターフェースにもなっているエレクトロスプレーイオン化法を極微小化することによる感度向上を検討した。これらのパートを統合し、ショットガン法を用いたプロテオーム解析システムの網羅性向上を目指した。

4. 研究成果

ショットガンプロテオミクス法では、細胞・組織などの試料から抽出されたタンパク質混合物はトリプシンなどの消化酵素を用いて断片化される。トリプシン消化ペプチドは通常は強イオン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動法などを用いて分画され、それぞれの画分はタンデム質量分析計とオンラインで接続したナノ液体クロマトグラフィー(nanoLC)を介して、質量分析に供される。ショットガンプロテオミクス法の高性能化を目指し、本法を3パート(試料の前処理法、オンライン分離法 およびエレクトロスプレーインターフェース)に分け、以下の検討を行った。

(4-1) 網羅的解析に向けた試料前処理法の開発

【リン酸化修飾ペプチドの高選択的濃縮法の開発】

タンパク質の翻訳後修飾は遺伝子解析では決して得られない情報であり、細胞の様々な機能をコントロールする必要不可欠な役割を果たしている。したがって、プロテオーム解析の標的として翻訳後修飾情報を積極的に解析していくことは、細胞機能を理解する上できわめて重要である。様々な翻訳後修飾の中で、最も一般的な修飾の一つにタンパク質リン酸化があり、哺乳類では全タンパク質の 20-30%がリン酸化修飾を受けると言われている。この可逆的リン酸化反応は細胞内シグナル伝達をはじめとして多くの重要な細胞機能の制御に関わることが知られている。通常、細胞全抽出物由来のペプチド混合物中のリン酸化ペプチド存在量は 1ppm 以下であり、リン酸化修飾タンパク質のプロテオーム解析(リン酸化プロテオーム解析)を行うにはリン酸化ペプチドに選択的な濃縮法が必須である。まず、古くからリン酸基に対して親和性を有することが知られているチタニアやジルコニアなどの酸化金属を担体として用いた酸化金属クロマトグラフィーを検討したが、親和性はわずかだが大量に存在する非リン酸化ペプチド(主として酸性ペプチド)により、リン酸化ペプチドをほとんど検出することができなかった。そこで、酸化金属に対する親和性がリン酸基より弱く、カルボン酸よりも強いヒドロキシ酸で酸化金属を修飾することにより、細胞抽出物の消化ペプチド混合物からリン酸化ペプチドを選択的に濃縮する方法を確立し、HAMMOC 法 (Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography)と名づけた(図1)。HAMMOC 法により 100 μg 程度の細胞抽出タンパク質試料から、数千個のリン酸化サイトを同定することが可能となった。ヒト由来培養細胞株に対し大規模解析を行った結果、タンパク質公共データベース

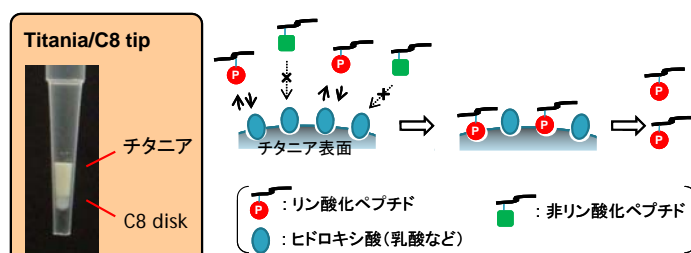


図1 HAMMOC 法の原理

UniProt に登録されているヒトタンパク質 20,328 種のうち 61%がリン酸化修飾をうけていることを実験的に証明した(図2)。ここで全体の 31%に相当する 6,315 タンパク質については、今回 HAMMOC 法によって初めてリン酸化修飾を受けることがわかったものである。このことは HAMMOC 法が従来法と比較し、いかに優れているかを表している。HAMMOC 法を植物プロテオーム解析に応用し、世界で初めて植物リン酸化プロテオームの全体像を明らかにした。その結果、シロイヌナズナおよびイネにおいて、存在しないと言われていたチロシンリン酸化が哺乳動物と同じ程度存在することを明らかにした。HAMMOC 法は現在キット化され、全世界で販売されている。また、さきがけ成果に基づく応用研究として、抗がん剤等として使用されているキナーゼ阻害薬の薬効メカニズム評価法に HAMMOC 法を用いる研究を開始している(JST 育成研究)。

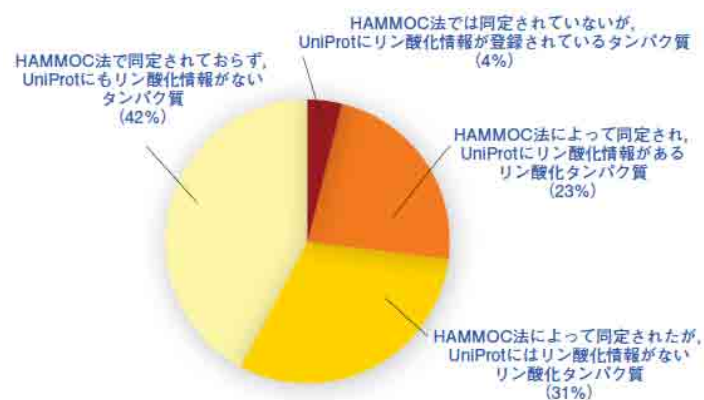


図2 ヒトタンパク質におけるリン酸化修飾

UniProt に登録されているヒトタンパク質 20,328 種のうち 61%がリン酸化修飾をうけていることを実験的に証明した(図2)。ここで全体の 31%に相当する 6,315 タンパク質については、今回 HAMMOC 法によって初めてリン酸化修飾を受けることがわかったものである。このことは HAMMOC 法が従来法と比較し、いかに優れているかを表している。HAMMOC 法を植物プロテオーム解析に応用し、世界で初めて植物リン酸化プロテオームの全体像を明らかにした。その結果、シロイヌナズナおよびイネにおいて、存在しないと言われていたチロシンリン酸化が哺乳動物と同じ程度存在することを明らかにした。HAMMOC 法は現在キット化され、全世界で販売されている。また、さきがけ成果に基づく応用研究として、抗がん剤等として使用されているキナーゼ阻害薬の薬効メカニズム評価法に HAMMOC 法を用いる研究を開始している(JST 育成研究)。

【膜タンパク質の抽出・消化法の開発】

細胞膜には様々な種類のタンパク質が局在し、細胞認識や分子輸送、細胞外シグナルの伝播など生命活動を維持するための重要な機能を担っている。しかし、膜プロテオーム解析において、膜タンパク質を可溶性タンパク質と同程度に抽出および同定することは困難であった。これは、膜タンパク質は一般的に発現量が少なく、難溶性であるため、加えた可溶化剤がトリプシンなどの消化酵素の活性を阻害したり、可溶化剤が LC-MS/MS システムの安定性や感度を妨害したりするからである。そこで、トリプシン活性を阻害せず可溶化剤を効率よく除去できる方法を検討し、陰イオン性界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウム(SDC)等の胆汁酸を可溶化剤として用いる方法を確立した。これは、動物の消化管中でのトリプシンによる食物の消化をミミックしたものであるためトリプシンとの相性もよく、1%濃度でトリプシン活性を約 5 倍上昇させ、SDS とほぼ同等の膜タンパク質可溶化能を示した。消化後の SDC 除去は、有機溶媒相を加えた試料溶液を酸性条件にすることで SDC のみを有機相に移動させることにより達成した。SDC のような二相間を移動する界面活性剤(Phase Transfer Surfactant)を用いるため、本法を相間移動溶解法(PTS 法)と名づけた。SDC を用いた PTS 法を従来法と比較すると、約 14 倍同定効率の向上が認められた。

(4-2)オンライン LC 分離の高性能化

ショットガンプロテオミクスの問題点である試料の複雑さと試料成分間の濃度差の広さを軽減するため、オンライン LC 分離の性能向上を検討した。従来の粒子充填型カラムを用いた緩勾配グラジエントによる分離スペースの拡大には限界があり、より分離効率の高いカラムが必要であった。そこで高理論段数が期待できるメートル長をもつモノリス型シリカカラムを検討することとした。PTS プロトコルを用いて調製した大腸菌細胞抽出試料 4 μ g を 3.5m 長カラムに注入し、グラジエント時間を 40 時間に設定し測定したところ、発現プロテオームの約 8 割に当たる 1,991 タンパク質を一度に同定することができた。さらに測定を繰り返したところ、計 360 時間でマイクロアレイデータの 1.15 倍にあたる 2,929 タンパク質(31,563 ペプチド)が同定された。このうち 953 種は膜タンパク質で、マイクロアレイ測定で検出された膜タンパク質をコードしている mRNA は 919 種であったので、発現している膜タンパク質もほぼ 100%本システムによって同定されていると考えられる。

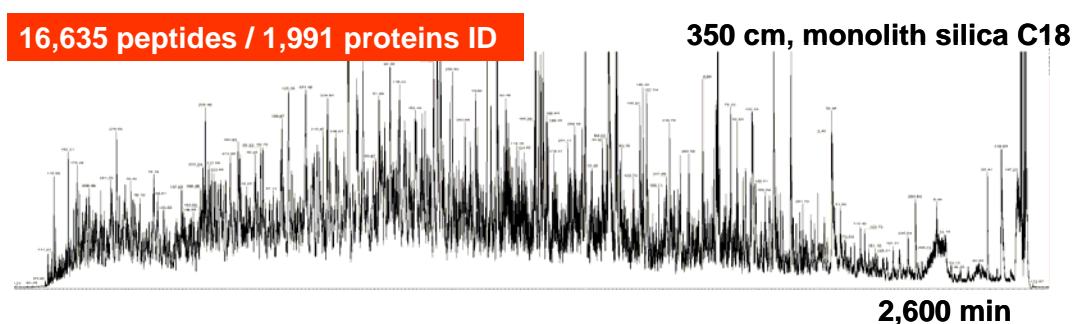


図3 モノリスカラムを用いた大腸菌抽出試料の TIC クロマトグラム

(4-3)エレクトロスプレーイオン化法の高感度化

スプレーニードル先端を従来の 6 μ m から 2 μ m まで微小化し、オリフィスとの距離を近づけ、ス

プレー電圧と流速を最適化することにより、MS シグナルの向上が認められた。さらなる高感度化をはかるため、オリフィス入口を加工し、V 字型の広口タイプのオリフィスキャピラリーを作製した。スプレーヤーの先端をオリフィス内に設置したところ、200–500nL/min の流速下で最大の感度上昇を確認した(図 4)。本条件は 75–100 μ m 径カラムに適用可能であり、汎用型 nanoLC とのカップリングで様々な LC-MS システムの構築が可能である。

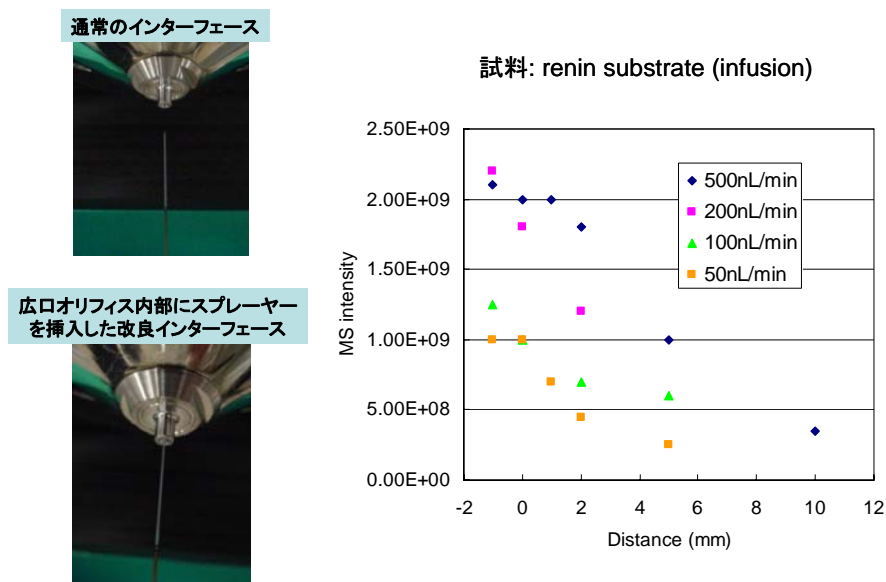


図4 広口オリフィスを用いた高感度エレクトロスプレーインターフェース

【謝辞】 本研究を進めるにあたり、メートル長モノリスキャピラリーカラムを作製、供給していただいた京都工芸繊維大学 田中信男教授、修士1年三輪昌平氏に感謝いたします。

5. 自己評価

当初の目標は(1)エレクトロスプレー微小化・オンライン LC の最適化による高感度化(2)網羅的解析に向けた前処理法の開発(膜タンパク&リン酸化タンパク)の2つを行い、(3)網羅的プロテオーム解析へ応用すること、であった。(2)の前処理法の開発に関して、リン酸化修飾についてはHAMMOC法、膜タンパク質についてはPTS法という独自の方法の開発に成功し、世界レベルの性能を実現できた。したがって、自己評価は満点である。(1)について、エレクトロスプレーの微小化やインターフェースの工夫により高感度化が実現可能であることを示すことができたが、実際のショットガンプロテオーム解析においては試料中の成分濃度差の広さに起因するMS測定時のイオン化抑制が最も重要な因子であることがわかったため、研究期間後半は高分離能分析法の開発に注力した。試料成分のイオン化抑制と複雑性を軽減するために最も一般的に用いられている多次元分離法ではなく、メートル長モノリスカラムを用いた一次元LC-MSシステムで緩勾配グラジエント溶出を行うことにより高分離とイオン化抑制軽減を実現することに成功した。本法により大腸菌については、プロテオーム一斉解析の目処がたった。ただしヒトをはじめとする哺乳動物のプロテオーム一斉解析を達成するには更なる工夫が必要であり、(1)(3)については90点の達成

率とした。

6. 研究総括の見解

オミクス解析のための試料前処理法の開発、微小エレクトロスプレー法の開発による LC-MS の高感度化、開発技術の網羅的プロテオーム解析への応用を目指した。主たる成果は次の 3 点である。

1. チタニア等の金属酸化物を吸着剤とするリン酸化ペプチドの前処理法にヒドロキシ酸を添加することによりリン化ペプチドに対する親和性を飛躍的に高めることに成功し HAMMOC 法と命名した。これにより世界中で知られていたヒトタンパク質におけるリン酸化修飾部位の2倍以上を同定することに成功した。また、膜タンパク質の選択的抽出法としてデオキシコール酸を可溶化剤として用いる相間移動溶解法を開発し、従来法よりも約 14 倍同定率の向上に成功した。

2. シリカモノリス逆相マイクロカラム 3.5 m 長に緩勾配グラジエント溶離法を適用し、大腸菌抽出試料中の 1991 タンパク質を一度の分析で同定した。これは発現プロテオームの約 8 割に相当し、今後のプロテオーム解析法に一つの方向性を示した。

3. エレクトロスプレー法のニードル径、オリフィス形状の最適化、電圧、流速などの最適条件の把握を行い MS 検出の高感度化に成功した。

また、他の研究機関や企業との共同研究を推進し、その結果として得られたタンパク質リン酸化に関する興味深いいくつかの知見、前処理用キットの商品化などの実績も高く評価される。

これらの成果は 22 篇の原著論文にまとめられ、20 件の招待講演で発表された。また平成 19 年に第 39 回内藤記念科学奨励金、平成 20 年に Analytical Sciences 誌 Hot Article Award、平成 21 年に日本質量分析学会誌賞を受賞している。

試料前処理、高性能分離、高感度 MS 検出まで幅広く検討し豊富なノウハウを蓄積しつつ力強い研究を推し進め、実用的な全プロテオームの解析手法の基礎を着実に築いたといえる。今後は、プロテオミクスのみならず広くオミクス研究分野への応用を視野に入れた解析法の展開を期待したい。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

- T. Masuda, N. Saito, M. Tomita, Y. Ishihama, "Unbiased quantitation of Escherichia coli membrane proteome using phase transfer surfactants", *Mol Cell Proteomics* 2009, 8, 2770-7.
- N. Sugiyama, H. Nakagami, K. Mochida, A. Daudi, M. Tomita, K. Shirasu, Y. Ishihama, "Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis", *Mol. Syst. Biol.* 2008, 4, 193.
- Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, Y. Ishihama, "Successive and selective release of phosphorylated peptides captured by hydroxy acid-modified metal oxide chromatography", *J*

Proteome Res 2008, 7, 4585–93.

- N. Sugiyama, T. Masuda, K. Shinoda, A. Nakamura, M. Tomita, Y. Ishihama, "Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications", *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 1103–9.

(2)特許出願

研究期間累積件数:5件

発明者:石濱泰、増田 豪

発明の名称:タンパク質試料の調製方法

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2007年10月2日

出願番号:特願2007-259176

発明者:石濱泰、京野完

発明の名称:リン酸化ペプチド又はリン酸化タンパク質の分離方法

出願人:学校法人慶應義塾、ジーエルサイエンス株式会社

出願日:2008年4月20日

出願番号:特願2008-102268

発明者:石濱泰、モントン マリアロウエナニコデマス

発明の名称:吸着防止方法、吸着防止材、内壁コートキャピラリ、その製造方法、及び、リン酸化合物とアニオンの同時分析方法

出願人:学校法人慶應義塾、日油株式会社

出願日:2008年5月22日

出願番号:特願2008-134494

発明者:石濱泰、増田 豪

発明の名称:タンパク質試料の調製方法

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2008年9月30日

出願番号:PCT/JP2008/068124

発明者:石濱泰、モントン マリアロウエナニコデマス

発明の名称:吸着防止方法、吸着防止材、内壁コートキャピラリ、その製造方法、及び、リン酸化合物とアニオンの同時分析方法

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2009年5月22日

出願番号:PCT/JP2009/059436

(3)受賞

- 2007年10月 第39回(2007年度)内藤記念科学奨励金(研究助成)、「マラリアのシグナル伝達プロテオーム解析」
- 2008年1月 Analytical Sciences 2008, 24, Hot Article Award、「Automated Phosphoproteome Analysis for Cultured Cancer Cells by Two-dimensional NanoLC-MS Using a Calcined Titania/C18 Biphasic Column」
- 2009年3月 2009年度日本質量分析学会誌賞「プロテオミクス解析用ナノ液体クロマトグラフィー質量分析システム」

(4)著書

- 増田豪、石濱泰, “ショットガンプロテオミクスによる膜タンパク質の網羅的解析のための試料調製法” J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2009, 57, 145-151.
- 杉山直幸, 石濱泰, “リン酸化プロテオーム解析による分子標的薬評価”, 実験医学「プロテオミクスが解き明かす情報伝達ネットワーク」, 服部成介, 石濱泰 編, 羊土社, 東京, 2009, Vol. 27, pp. 2552-57.
- 京野完, 杉山直幸, 石濱泰, “翻訳後修飾プロテオミクスの最前線”, 細胞工学別冊「明日を拓く新次元プロテオミクス」, 中山敬一, 松本雅記 編, 学研メディカル秀潤社, 東京, 2009, pp. 41-50.
- 石濱泰, “プロテオミクスにおけるナノLC-MSシステム” Chromatography 2008, 29, 25-31.
- 石濱泰, “プロテオミクス解析用ナノ液体クロマトグラフィー質量分析システム” J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2007, 55, 157-164.

(5)学会発表

口頭発表(国際)

- Y. Ishihama, T. Masuda, M. Iwasaki, M. Tomita, “Unbiased Quantitation of Membrane Proteome Using Phase-Transfer Surfactants.” HUPO 8th Annual World Congress (2009).
- N. Sugiyama, Y. Kyono, K. Imami, S. Ohnuma, M. Tsukahara, M. Tomita, Y. Ishihama, “Evaluation of Kinase Inhibitors by Phosphoproteomics-based Phosphorylation Profiling.” HUPO 8th Annual World Congress (2009).
- Y. Kyono, N. Sugiyama, K. Imami, M. Tomita, Y. Ishihama, “Optimization of Elution Conditions for Phosphopeptides Captured by Aliphatic Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography (HAMMOG).” HUPO 7th Annual World Congress (2008).
- K. Imami, N. Sugiyama, Y. Kyono, M. Tomita, Y. Ishihama, “Phosphoproteome analysis using a calcined TiO₂/C18 biphasic column and a novel stable isotope labeling method.” The 33rd International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related

Techniques (HPLC 2008 Kyoto) (2008).

口頭発表(国内)

- ・ 岩崎未央, 三輪昌平, 富田勝, 田中信男, 石濱泰, “プロテオーム一斉解析のためのショットガンプロテオミクス測定システムの構築.” 第29回キャピラリー電気泳動シンポジウム (2009).

(6)招待講演

招待講演(国際)

- ・ Y. Ishihama, “Exploring Signaling Proteome by High Performance Phosphoproteomics.” 2009 TPS International Proteomics Conference and 5th AOHUPO MPI Workshop (2009).
- ・ Y. Ishihama, “Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography for Uncovering and Exploiting Phosphoproteome.” 2008 Taiwan-Japan Proteomics Symposium 'Frontier in Protein PTMomics' (2008).
- ・ Y. Ishihama, “Signaling Proteome of Breast Cancer by High-Accuracy Mass Spectrometry.” Organization for Oncology and Translational Research 4th Annual Conference (2007).

招待講演(国内)

- ・ 石濱泰, “Development of proteomics technologies to open the new phases of biological applications.” 第32回日本分子生物学会年会 (2009).
- ・ 石濱泰, “リン酸化プロテオミクスの高性能化とシグナル伝達研究への応用.” 第82回日本生化学会大会(2009).

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ T. Umezawa, N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama, K. Shinozaki, “Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis”, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 17588-93.