

細胞内リン酸化修飾の大規模計測に成功

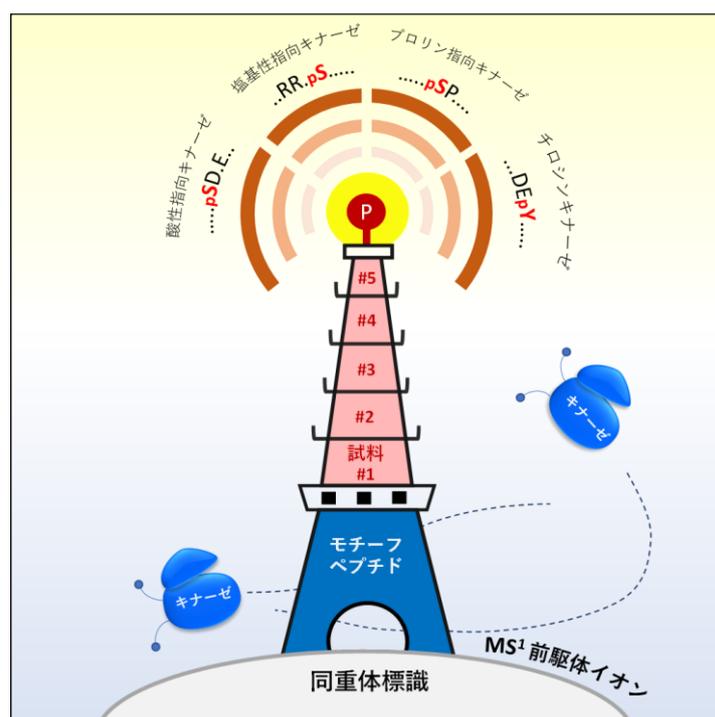
—極微量試料からのリン酸化経路解析も可能に—

概要

生体内では、タンパク質のリン酸化修飾は細胞内のシグナル伝達にとって最も重要なメカニズムの一つで、様々な疾病と深く関連しています。近年、質量分析を用いて細胞内のリン酸化修飾を解析するリン酸化プロテオミクスの発展により、様々なサンプルの個々のリン酸化部位に関する情報を大規模に収集することが可能になりました。しかし、限られた試料量からキナーゼ-基質関係に基づくリン酸化経路を明らかにする汎用的な手法はありませんでした。

このような問題を解決するために、京都大学大学院薬学研究科の石濱泰 教授、Chia-Feng Tsai 同日本学術振興会外国人特別研究員(研究当時、現：米国太平洋北西国立研究所研究員)、小形公亮 同特定助教らの研究グループは、基質のリン酸化モチーフ配列^{注1}を利用した多重同重体標識リン酸化プロテオミクス法^{注2}を開発し、標的リン酸化ペプチドの選択的かつ包括的な定量を行いました。特に、25 μg の試料から 7,000 以上のチロシンリン酸化部位を定量し、既存法の感度・同定数を数百倍向上させることに成功しました。これにより、個別化医療、精密医療の実現への指向が進む現在において、ゲノム情報などでは記述できない、より精密な分子情報としてのリン酸化修飾プロファイルの有効活用にご期待されます。

本研究成果は、2022年1月14日に国際科学誌「Cell Reports Methods」にオンライン掲載されました。



同重体標識による高感度化の模式図

同重体標識により、5つの試料由来のペプチドと、人工的なキナーゼ反応で作ったペプチドが同一のピークとなり、高感度化する様子を電波塔としてあらわしたものの。様々なモチーフを持つペプチドを狙って高感度化することができる。

1. 背景

キナーゼ活性の調節異常に伴うタンパク質リン酸化シグナルネットワークの変化は、様々な病態と密接に関連しています。しかし、キナーゼ-基質関係に基づくリン酸化ネットワークを明らかにする定量的かつ多重化^{注3}可能な試験法は、希少な試料に対しては存在しませんでした。特に存在量の少ないチロシンリン酸化修飾については抗体による免疫沈降^{注4}が必要であり、ミリグラム単位の試料から百種程度のリン酸化部位を同定することしかできませんでした。研究グループは、以前より *in vitro* キナーゼ-基質関係に関する大規模解析を行っており、*in vitro* キナーゼ反応で生成するリン酸化ペプチドを標的とした同重体標識^{注5}を行えば、内在性キナーゼ基質のシグナルを狙って増幅できるのではないかと考え、基質のリン酸化モチーフを中心とするアプローチの開発に着手しました。

2. 研究手法・成果

本研究では、高感度化のために、異なる試料中の同一ペプチドを多重化同重体試薬 TMT で標識し、MS1 レベルで単一ピークとして集積する手法を開発しました。また、TMT チャンネルの 1 つをシグナル増幅用に設定し、*in vitro* キナーゼ反応により生成した標的配列モチーフを持つリン酸化ペプチドを利用して、標的キナーゼ基質の検出能を向上させました (図 1)。タンデム MS では、内因性ペプチドと *in vitro* で作製されたモチーフペプチドからの TMT 標識前駆体イオンが断片化され、b または y イオンの集積シグナルがペプチド同定に使われます。異なる試料間の内因性リン酸化ペプチドの相対定量は、MS3 レベルでのレポーターイオンの強度比によって行われ、前駆体イオンの共分離による干渉シグナルを低減することができます。キナーゼ阻害薬処理を行ったヒト培養細胞株を用いて行った検討から、25 μg の試料から 7,000 以上のチロシンリン酸化部位の定量や、複数のキナーゼを介したリン酸化ネットワークのターゲット定量が可能であることがわかりました。

3. 波及効果、今後の予定

本手法の開発により、特に今まで実現が困難であった臨床検体のチロシンリン酸化大規模解析が進むと考えられます。個別化医療、精密医療の実現に向けて、それぞれ個人ごとの疾病のプロファイリングとその結果に応じた治療の選択が指向されている現在、ゲノム情報などでは記述できない、より精密な分子情報としてのリン酸化修飾プロファイルの有効活用に向けて、開発を進めていきたいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) (課題番号: 18070870)、日本学術振興会科学研究費補助金 (課題番号: 15F15343 (Chia-Feng Tsai), 17H03605, 21H02459 (石濱泰), 20K21478 (石濱泰, 小形公亮), 20H04845, 21H02466 (杉山直幸)) の助成を受けて行われました。

<用語解説>

注 1 リン酸化モチーフ配列: キナーゼによって認識される基質タンパク質のリン酸化部位周辺の特定のアミノ酸配列。大別して、酸性モチーフ、塩基性モチーフ、プロリン指向性モチーフおよびチロシンリン酸化モチーフに分けられる。

注 2 多重同重体標識リン酸化プロテオミクス法: 安定同位体元素の組み合わせにより、全体の質量は同じだが、ある一部分の質量が異なる同重体を用いて、複数試料をまとめて同時解析できるように標識し、リン酸化ペプチドの解析を行う手法。

注3 多重化：複数の試料をまとめて同時に解析できるようにすること。

注4 免疫沈降：抗体を用いて、標的とする抗原（この場合チロシンリン酸化タンパク質）を不溶化させ、分離精製する手法。

注5 同重体標識：複数の安定同位体の組み合わせにより、全体の質量は同じだが、ある一部分の質量が異なる同重体分子により化学標識すること。プロテオミクスでは、TMT(タンデムマスタグ)標識がよく使われる。

<研究者のコメント>

セリン・スレオニンリン酸化ペプチド濃縮法を開発してから15年、悲願であったチロシンリン酸化ペプチドの大規模かつ高感度な分析法がついに完成しました。今まで手が出せなかった臨床検体などの極微量試料の解析がいよいよ可能になりました。標的パスイ解析とともに、様々な試料のチロシンリン酸化大規模解析に展開していきたいと考えています。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Motif-centric phosphoproteomics to target kinase-mediated signaling pathways（キナーゼを介したシグナル伝達経路を標的としたモチーフに基づくリン酸化プロテオミクス）

著者：Chia-Feng Tsai, 小形公亮、杉山直幸、石濱 泰

掲載誌：Cell Reports Methods, 2022, 100138, DOI：10.1016/j.crmeth.2021.100138

<イメージ図>

図1 実験の概要

