プロテオミクスを用いた細胞内リン酸化動態の計測

石濱 泰,^{*,a} 今見 考志^b

Quantitation of Cellular Phosphorylation Dynamics by Phosphoproteomics Approaches

Yasushi Ishihama^{*,a} and Koshi Imami^b

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University; 46-29 Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan; and ^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia; Vancouver, BC, V6T 1Z4, Canada.

(Received November 9, 2013)

Reversible phosphorylation of proteins controlled by kinases and phosphatases is one of the most ubiquitous post-translational modifications, and regulates a variety of cell functions through cellular signal transduction pathways. These signals are involved in various diseases such as cancer and rheumatism, and often cause the disease itself or drive the progression. Quantitative phosphoproteomics based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with phosphopeptide enrichment and stable isotope labeling allows profiling thousands of phosphorylation sites on human proteins and has been applied to monitoring cellular phosphorylation dynamics induced by various growth factors, hormones and other perturbations including kinase inhibitors. Here, we employed these technologies to quantify the temporal response of phosphorylation dynamics in SKBR3 breast cancer cells to lapatinib, a kinase inhibitor for epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR2 (also known as HER2). Among 4953 identified phosphopeptides from 1548 proteins, a small proportion (5–7%) was regulated at least twofold by 1–10 μ M lapatinib. The results provide new insights into EGFR/HER2 regulation through region-specific phosphorylation, as well as a global view of the cellular signaling networks associated with the anti-breast cancer action of lapatinib.

Key words—phosphoproteomics; molecular-targeting drug; kinase inhibitor; hydroxy acid-modified metal oxide chromatography; mass spectrometry

1. はじめに

タンパク質の可逆的リン酸化修飾反応は、様々な細胞内シグナル伝達経路のほぼすべてに係わっており、細胞機能を幅広く制御している。このリン酸化修飾反応の責任酵素であるプロテインキナーゼは、ヒトゲノム中で約2%を占めており、最大のファミリーの1つである。コード遺伝子は518種あると予測されており、80%強がセリン/スレオニンキナーゼで残りがチロシンキナーゼである。UniProt (www.uniprot.org) 中の Swiss-Prot Protein Knowledgebase では、現在ヒトプロテインキナーゼと注釈づけされ

ているタンパク質は483種となっている。このリン酸化修飾は、増殖、細胞分裂、代謝、分化、オルガネラ輸送、筋肉収縮、細胞接着、記憶、情動等々、ありとあらゆる様々な細胞機能や生命機能調節に係わっており、最もユニークな翻訳後修飾である。リン酸化修飾がプロテオミクスの手法で解析され始める以前は、リン酸化タンパク質数は全ヒトタンパク質の30%程度であると推測されていた。¹⁾しかし、リン酸化プロテオミクス（後述）の手法が取り入れられて以降、リン酸化タンパク質数は驚異的な数で増加しており、例えばわれわれの網羅的測定の結果では、14627ヒトタンパク質がリン酸化修飾をうけており、部位数としては、111000を超えることが分かってきた (Fig. 1)。すなわち、1つのキナーゼは平均200以上のリン酸化部位を修飾していることになる。

さて、がんやリウマチなどでは、発症・進行の直接原因は特定のシグナル伝達経路の異常な活性化

The authors declare no conflict of interest.

^a京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29), ^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia (Vancouver, BC, V6T 1Z4, Canada)

*e-mail: yishihama@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第133年会シンポジウム S29-101 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Identification of Human Phosphoproteins by HAM-MOC-based Phosphoproteomics and Uniprot
More than 70% of human proteins are modified with phosphorylation.

であるとされており、例えば抗がん剤の分野ではがん特異的なキナーゼをターゲットとした分子標的創薬・治療が注目されている。代表的な分子標的薬であるイマチニブの画期的な成功以降、世界規模でがん分子標的薬の開発が行われ、現在では20を超えるがん分子標的治療薬が承認されている。さらに80種程度の低分子化合物がキナーゼを標的とする抗がん剤として臨床開発段階にある。²⁾ これらのキナーゼ阻害薬については、キナーゼ間で類似性の高いATP結合サイトに対する阻害を作用機序とすることが多いので、単一のキナーゼのみを分子標的とすることは難しいが、临床上はむしろ複数標的に対する“マルチターゲット”作用薬の方が優れた成績を上げることも多い。³⁾ これはがん細胞内シグナル伝達ネットワークが非常に複雑であり、かつ個別の細胞によって異なる活性化プロファイルを示すからである。すなわち阻害薬の効果をみるにあたっては、ある特定の分子や経路の変動だけではなく、できるだけ多くの経路への影響をみる必要がある。しかしマルチキナーゼ阻害薬の複雑な作用機序を完全に明らかにすることは容易ではなく、特に開発早期段階では詳細な作用機序は解明されていないことも多い。細胞内シグナル伝達ネットワーク全体を定量的に、しかもハイスループットに俯瞰できる方法の確立が強く求められている。

安定同位体標識-液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)による定量ショットガンプロテオミクスとリン酸化ペプチド濃縮法を組み

合わせた定量リン酸化プロテオミクス手法は、シグナル伝達ネットワークの全体像を俯瞰するのに最も強力なアプローチの1つである。本稿では、近年技術の進展が著しいリン酸化プロテオミクス手法を用いた大規模な細胞内リン酸化動態定量と分子標的薬評価への応用について、われわれの研究を中心に紹介する。

2. 定量リン酸化プロテオミクスの開発

多くの細胞内シグナル伝達経路は細胞膜受容体から転写因子へのリン酸基のリレーによって制御されている。キナーゼはリン酸基転移酵素であり、またキナーゼ自身もリン酸化により活性化される。したがって、キナーゼ触媒部位のリン酸化状態を測定することで、キナーゼ活性をプロファイルすることができる。例えば、Bantscheffらはキナーゼ阻害薬を樹脂表面に固定した担体を用いて、1回のLC-MS/MS測定で約180種のヒト細胞中のキナーゼを同定する技術を報告している。⁴⁾ このキナーゼ親和性樹脂とリン酸化ペプチド濃縮法(後述)を組み合わせることで、イマチニブ処理細胞におけるBCR-ABLやその下流のキナーゼのリン酸化プロファイリングに成功している。しかし、この種のアッセイはキナーゼのみに着目しているため、薬剤のシグナル伝達ネットワークレベルでの影響を評価するには不向きである。定量リン酸化プロテオミクスは、選択的リン酸化ペプチド濃縮法、安定同位体標識法及びLC-MS/MSの組み合わせで構成されており、現在では単独の細胞種から1-3万のリン酸化部位を同定・定量することが可能となってきた。⁵⁻⁷⁾ 特に、選択的リン酸化ペプチド濃縮法として、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(im-mobilized metal ion affinity chromatography; IMAC)⁸⁾や、チタニア(TiO₂)などを用いた酸化金属クロマトグラフィー(metal oxide affinity chromatography; MOAC)⁹⁻¹¹⁾を用いたシステムでは、比較的配列依存性なくセリン/スレオニン/チロシンリン酸化ペプチドを偏りなく同定することができるため、リン酸化プロテオミクスで汎用されている。

Figure 2にリン酸化プロテオーム解析の一般的な流れを示す。試料から抽出したタンパク質をトリプシンなどの消化酵素で断片化処理した後、リン酸化ペプチド濃縮を行い、LC-MS/MS測定を行う。IMAC法では、主にFe³⁺、Ga³⁺、Ti⁴⁺といった金

Fig. 2. Workflow of Phosphoproteomics

属イオンが用いられる。IMACにおいて、非リン酸化酸性ペプチドの金属イオンへの結合は、リン酸化ペプチドの同定数を著しく減少させる。したがって、カルボキシル基をエステル化したり、¹²⁾ 試料溶液中の pH を最適化したりするなど、¹³⁾ リン酸化ペプチドと酸性ペプチドの電荷をうまくコントロールすることで、リン酸化ペプチドに対する選択性を向上させている。一方、MOAC ではチタニア (TiO₂)、ジルコニア (ZrO₂)、アルミナ等が用いられる。IMAC と同様、酸性ペプチドの酸化金属への吸着が問題となるが、当初は 2,5-ジヒドロキシ安息香酸やフタル酸などの芳香族酸性化合物が競合剤として用いられていた。¹⁴⁾ しかし、芳香族系競合剤はその後の LC-MS 測定を妨害し、また濃縮における選択性向上効果も不十分であることから、われわれは様々な親水性化合物をスクリーニングした結果、チタニアに対して乳酸を競合剤として用いることにより、リン酸化ペプチドに対する選択性・回収率が劇

Fig. 3. Principle of HAMMOC Approach

Phosphopeptides are captured while acidic non-phosphopeptides are excluded in the presence of lactic acid on titania beads.

的に向上することを見出した (Fig. 3).¹⁵⁾ この aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography (HAMMOC) 法を用いることにより、世界で初めて細胞抽出物から前分画なしに直接数千個のリン酸化ペプチドを同定することに成功した。その後の濃縮条件等の最適化により、回収率、選択性はさらに向上し、現在は 100 μg の細胞抽出タンパク質から 2-3 回の LC-MS 測定で 5000-14000 個程度のユニークなリン酸化ペプチドが同定可能となっている。

一方、リン酸化プロテオームをプロファイルするためには定性情報だけでは不十分で、その定量は不可欠である。リン酸化プロテオームの定量法としてはプロテオミクスで主に利用されている安定同位体標識法を用いることができる。Stable isotope labeling using amino acid in cell culture (SILAC) 法は細胞培養時に安定同位体標識を行うため、実験誤差を最小限にすることが可能であるが、リン酸化ペプチド定量の際には特に注意が必要である。すなわち、安定同位体標識アルギニンを用いて細胞を培養した場合、アルギニンは生体内で代謝的にプロリンに変換されるため、プロリン含有ペプチドに対しては安定同位体標識プロリンを含むペプチドと未標識のプロリンを含むペプチドに由来する 2 つのピークが生じる。¹⁶⁾ これは定量性を損なわせる大きな要因

であり、特にリン酸化部位周辺にはプロリンが含まれることが多いため、リン酸化プロテオーム解析においてはその影響が顕著にあらわれる。また、SILAC 法では安定同位体アミノ酸で完全にタンパク質を標識するために透析血清の使用が必須である。しかし通常血清培地から透析血清培地に変更することで細胞の状態（プロテオーム・リン酸化プロテオームの発現プロファイル等）や増殖速度を変化させてしまう。¹⁷⁾ そこで透析血清使用に伴う問題及び上述のプロリン変換問題を回避するために、われわれは二重標識 SILAC 法を開発した。¹⁷⁾ 従来 SILAC 法と異なる点は、比較したい 2 つの細胞群に対して 2 種類の安定同位体標識アミノ酸（アルギニン、リシンに対して各 2 種類）で両細胞とも標識し、通常血清を用いて培養する点である（Fig. 4）。当然、非標識ペプチドも検出されるが、質量スペクトル中で標識ペプチドに由来する 2 つのピークにのみ着目し比較することで、通常血清条件下での定量が可能となる。さらに、両細胞とも安定同位体標識アルギニンを用いて培養しているため、両者とも同

じ割合で安定同位体標識アルギニンのプロリン変換が進行することになる。したがって、2 つの標識ペプチドのモノアイソトープピークに着目し、それらの相対比を定量することでプロリン変換の影響を除くことが可能となる。

3. リン酸化プロテオミクスを用いたリン酸化動態定量と分子標的薬評価

分子標的薬評価に定量的リン酸化プロテオミクスを用いたという報告は今までにもいくつか発表されているが、すべて特定の薬剤濃度・処理時間におけるリン酸化状態の定量に限られていた。最近われわれは乳がん治療薬ラパチニブを用い、その薬剤濃度及び 1 時間以内の処理時間依存的なリン酸化シグナル動態の計測について報告した。¹⁸⁾ ラパチニブの直接の標的分子は EGFR1 及び EGFR2（HER2）であり、その他のキナーゼにはほぼ阻害活性を示さない。EGFR1/2 が発現している乳がん細胞 SKBR3 を用い、二重標識 SILAC 法と HAMMOC 法によって、1, 5, 10 及び 60 分間ラパチニブで処理した乳がん細胞のリン酸化プロテオーム（4953 リン酸化ペプチド、1548 リン酸化タンパク）を時系列に沿ってプロファイルした（Fig. 5）。その結果、全体の 5-7% に相当するリン酸化ペプチドが 2 倍以上変化し、薬剤標的分子 EGFR やその下流の因子（ERK キナーゼ、転写因子 JUN など）のリン酸化が濃度及び時間依存的に抑制される過程を捉えることができ、ラパチニブのシグナル伝達ネットワークレベルでの作用機構の全体像を明らかにした。また、個々の分子に注目し、EGFR2 のリン酸化ダイナミクスデータからラパチニブ処理によって EGFR2 の 1050 番台のセリン/スレオニンのリン酸化が亢進することを見出した。そこで、この責任キナーゼ同定のため、Human Protein Reference Database (HPRD)¹⁹⁾ に登録されているリン酸化モチーフとそれに対応するキナーゼペア情報から、候補キナーゼを数種抽出した。EGFR2 の特定領域をカバーするペプチドを合成し、候補キナーゼと *in vitro* アッセイを行い、PKA, PKC, CAMKII を第 2 次候補として選別した。この中で PKA については、その活性化状態の指標となるリン酸化部位がラパチニブ処理により亢進しており、さらにラパチニブと PKA 阻害薬（H89）で処理した細胞では EGFR2 の特定領域のリン酸化のみならずチロシンキナーゼ活性が抑

Fig. 4. Double-labeled SILAC Approach with Non-dialyzed Serum

Fig. 5. Quantitation of Lapatinib-induced Phosphorylation Dynamics by HAMMOC-based Phosphoproteomics with Double-labeled SILAC

制されることを確認した。すなわち、われわれが今回新規に同定した EGFR2 のセリン/スレオニンリン酸化部位は、PKA によってリン酸化され、それによりチロシンキナーゼ活性が亢進することが見いだされた。実際の臨床検体でこれらのリン酸化が観測され、ラパチニブ耐性との相関があるかどうかは次の課題である。

次に、ラパチニブのシグナル伝達ネットワークレベルでの全体像を明らかにすべく、タンパク質間相互作用ネットワークデータベース STRING²⁰⁾ を用い、既知ネットワーク上に、リン酸化が 2 倍以上変動した 210 個のタンパク質をマップした。その結果、EGFR1/2 シグナル経路に係わる分子群のみならず、これまで EGFR1/2 経路との関連が示されてい

なかった転写・翻訳に係わる一連の分子群にもラパチニブの影響が認められた。ラパチニブの EGFR1/2 への高選択的阻害活性を考えると、これらの分子群は EGFR1/2 の下流に存在し、なんらかの細胞機能制御に係わっているものと考えられる。

以上、ラパチニブを例に、定量リン酸化プロテオミクスを用いた分子標的薬動態評価について紹介した。誌面の都合で割愛したが、リン酸化動態プロファイルの相似性を利用した解析も行っており、単に測定するだけでなく、その後の解析を独自に工夫することにより、まだまだ多くの情報を抽出できるものを考える。Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)²¹⁾ や STRING²⁰⁾ といった公共バイオインフォマティクス

ツール（データベース）の環境が整ってきており、この分野の今後の発展が期待できる。しかし、リン酸化ネットワークの大部分は未知であり、特に細胞内の生理的条件下におけるキナーゼ-基質ペア情報を大規模に取得することは現在の技術ではまだ難しく、これからの研究に期待したい。

4. おわりに

質量分析の急速な技術発展とその周辺技術の成熟により、プロテオミクスに関する技術開発は目覚ましい勢いで進行している。リン酸化修飾だけでなく、その他の翻訳後修飾についても大規模解析法の開発がますます加速すると思われる。定量プロテオミクスの手法は実験動物にも応用されており、今後培養細胞レベルではなく個体レベルでのリン酸化プロファイルもより加速していこう。一方、リン酸化プロテオミクスで取得できる情報は複数の細胞から生じるリン酸化反応の平均挙動であり、例えばがん幹細胞とその周辺のがん細胞における単一細胞レベルでの挙動を定量するのは困難である。現時点でのリン酸化プロテオミクスの最高感度はわれわれが報告した 10000 細胞でのプロファイルであり、²²⁾ 更なる感度向上にむけた技術開発ブレークスルーが必須である。最近、マスマイトメトリーと同位体タグを複数組み合わせたバーコード質量技術を組み合わせることで、単一種の細胞レベルで数百のパラメーター（リン酸化状態、マーカートンパク質の発現量等）のハイスループット定量も報告されている。²³⁻²⁵⁾ リン酸化プロテオミクスは、個別化医療を実現するためのツールとしても大いに期待できる。

REFERENCES

- 1) Cohen P., *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 596–601 (2000).
- 2) Zhang J., Yang P. L., Gray N. S., *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 28–39 (2009).
- 3) Apsel B., Blair J. A., Gonzalez B., Nazif T. M., Feldman M. E., Aizenstein B., Hoffman R., Williams R. L., Shokat K. M., Knight Z. A., *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 691–699 (2008).
- 4) Bantscheff M., Eberhard D., Abraham Y., Bastuck S., Boesche M., Hobson S., Mathieson T., Perrin J., Raida M., Rau C., Reader V., Sweetman G., Bauer A., Bouwmeester T., Hopf C., Kruse U., Neubauer G., Ramsden N., Rick J., Kuster B., Drewes G., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1035–1044 (2007).
- 5) Olsen J. V., Vermeulen M., Santamaria A., Kumar C., Miller M. L., Jensen L. J., Gnad F., Cox J., Jensen T. S., Nigg E. A., Brunak S., Mann M., *Sci. Signal.*, **3**, ra3 (2010).
- 6) Rigbolt K.T., Prokhorova T. A., Akimov V., Henningsen J., Johansen P. T., Kratchmarova I., Kassem M., Mann M., Olsen J. V., Blagoev B., *Sci. Signal.*, **4**, rs3 (2011).
- 7) Beli P., Lukashchuk N., Wagner S. A., Weinert B. T., Olsen J. V., Baskcomb L., Mann M., Jackson S. P., Choudhary C., *Mol. Cell*, **46**, 212–225 (2012).
- 8) Stensballe A., Andersen S., Jensen O. N., *Proteomics*, **1**, 207–222 (2001).
- 9) Sano A., Nakamura H., *Anal. Sci.*, **20**, 861–864 (2004).
- 10) Kweon H. K., Hakansson K., *Anal. Chem.*, **78**, 1743–1749 (2006).
- 11) Wolschin F., Wienkoop S., Weckwerth W., *Proteomics*, **5**, 4389–4397 (2005).
- 12) Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., White F. M., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 301–305 (2002).
- 13) Kokubu M., Ishihama Y., Sato T., Nagasu T., Oda Y., *Anal. Chem.*, **77**, 5144–5154 (2005).
- 14) Larsen M. R., Thingholm T. E., Jensen O. N., Roepstorff P., Jørgensen T. J., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 873–886 (2005).
- 15) Sugiyama N., Masuda T., Shinoda K., Nakamura A., Tomita M., Ishihama Y., *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1103–1109 (2007).
- 16) Van Hoof D., Pinkse M. W., Oostwaard D. W., Mummery C. L., Heck A. J., Krijgsveld J., *Nat. Methods*, **4**, 677–678 (2007).
- 17) Imami K., Sugiyama N., Tomita M., Ishihama Y., *Mol. Biosyst.*, **6**, 594–602 (2010).
- 18) Imami K., Sugiyama N., Imamura H., Wakabayashi M., Tomita M., Taniguchi M., Ueno T., Toi M., Ishihama Y., *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 1741–1757 (2012).
- 19) Keshava Prasad T. S., Goel R., Kandasamy K., Keerthikumar S., Kumar S., Mathivanan S., Telikicherla D., Raju R., Shafreen B., Venugopal A., Balakrishnan L., Marimuthu A., Banerjee S., Somanathan D. S., Sebastian A., Rani S., Ray S., Harrys Kishore C. J.,

- Kanth S., Ahmed M., Kashyap M. K., Mohmood R., Ramachandra Y. L., Krishna V., Rahiman B. A., Mohan S., Ranganathan P., Ramabadran S., Chaerkady R., Pandey A., *Nucleic Acids Res.*, **37** (Suppl. 1), D767–D772 (2009).
- 20) Franceschini A., Szklarczyk D., Frankild S., Kuhn M., Simonovic M., Roth A., Lin J., Minguez P., Bork P., von Mering C., Jensen J. L., *Nucleic Acids Res.*, **41** (D1), D808–D815 (2013).
- 21) Huang da W., Sherman B. T., Lempicki R. A., *Nat. Protoc.*, **4**, 44–57 (2009).
- 22) Masuda T., Sugiyama N., Tomita M., Ishihama Y., *Anal. Chem.*, **83**, 7698–7703 (2011).
- 23) Bodenmiller B., Zunder E. R., Finck R., Chen T. J., Savig E. S., Bruggner R. V., Simonds E. F., Bendall S. C., Sachs K., Krutzik P. O., Nolan G. P., *Nat. Biotechnol.*, **30**, 858–867 (2012).
- 24) Bendall S. C., Simonds E. F., Qiu P., Amir el-A. D., Krutzik P. O., Finck R., Bruggner R. V., Melamed R., Trejo A., Ornatsky O. I., Balderas R. S., Plevritis S. K., Sachs K., Pe'er D., Tanner S. D., Nolan G. P., *Science*, **332**, 687–696 (2011).
- 25) Bandura D. R., Baranov V. I., Ornatsky O. I., Antonov A., Kinach R., Lou X., Pavlov S., Vorobiev S., Dick J. E., Tanner S. D., *Anal. Chem.*, **81**, 6813–6822 (2009).