

## 論文の内容の要旨

### Identification and quantitation of nonphospho- and phosphopeptides after LPS stimulation by mass spectrometry using metabolic labeling

代謝標識を用いた質量分析による LPS 刺激後の非リン酸化とリン酸化ペプチドの同定と定量

指導教員 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

分子細胞生物学専攻

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

羅 紋眞

生体内の種々の機能の多くはタンパク質レベルで制御されており、病気の発症のメカニズムやその病態の把握においても、疾患特異的なタンパク質を解析するプロテオーム解析が重要である。プロテオーム解析法の一つに質量分析 (Mass Spectrometry, MS) を用いる方法がある。MS は、プロテアーゼ等を用いて得られるペプチドの分子量や MS/MS によって生成されるペプチドのフラグメントイオンから配列の解析を行うことによって、タンパク質の同定や定量、翻訳後修飾の解明が可能のため、盛んに利用されている。

翻訳後修飾の一つであるリン酸化は細胞内情報伝達や遺伝子発現、細胞周期、アポトーシスなど細胞内の多くの過程を可逆的に制御している。タンパク質のリン酸化について調べることは生命現象を理解する上で重要な研究の一つである。これまでにタンパク質のリン酸化について調べる様々な手法が開発されてきている。しかし実サンプルで新規リン酸化部位を見出すのは容易ではない。

一方、前処理の過程や MS でのイオン化の過程等で生じるばらつきを補正する目的で、MS による定量解析では様々な手法が開発されている。この実験で用いた代謝標識法では 2 つのサンプルうち、一方のサンプルを安定同位体元素で置換した培地中で細胞を培養することで、その細胞が産生するすべてのタンパク質が安定同位体標識されることを利用した。すなわち、安定同位体ラベルされたタンパク質と非標識タンパク質を混合して測定すると、安定同位体によって増加した質量差を有するピークペアが観測され、この強度比から相対的な存在比が

得られる。

今回の研究で、リン酸化ペプチドの濃縮、MS の条件、代謝標識を用いた定量解析の仕組みでリン酸化部位の同定、リン酸化の変動と定量解析を同時におこなう手法を確立した (Figure 1)。

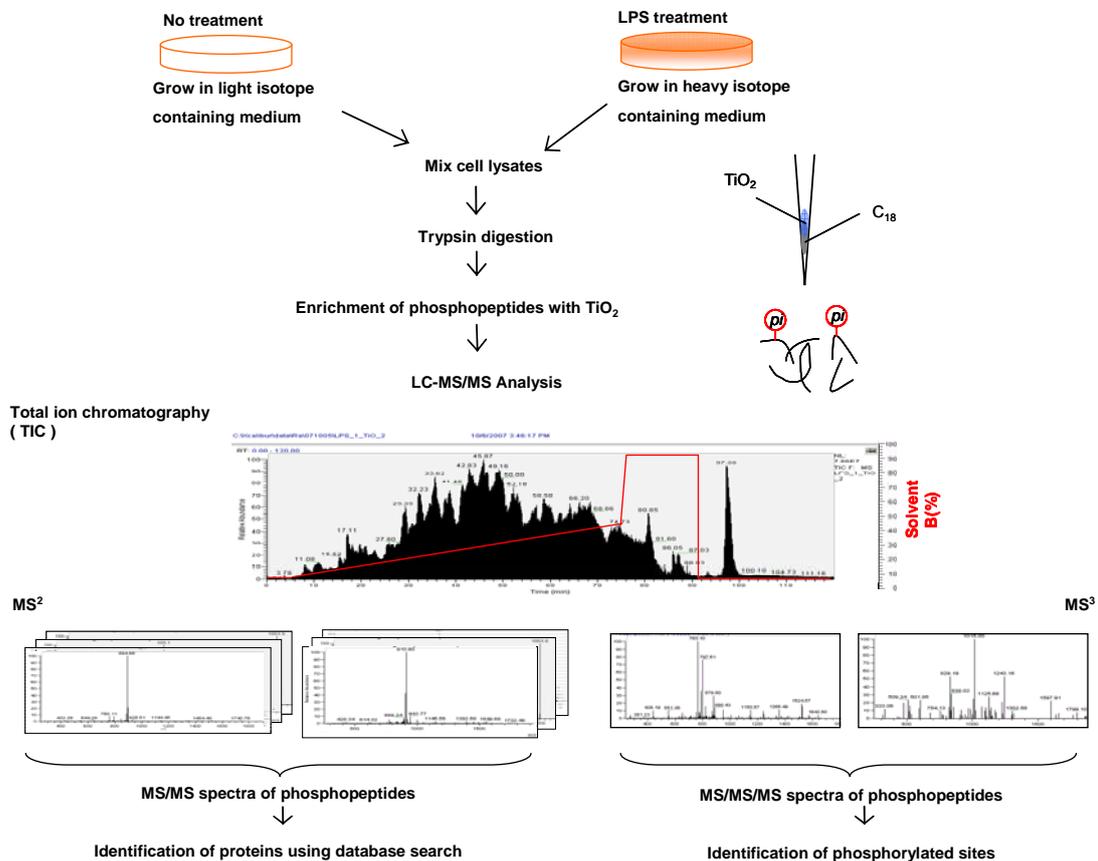


Figure 1. Schema of the strategy used for identification of phosphorylated proteins

この方法を用いて、炎症細胞 model として、マクロファージに分化させた THP-1 細胞で LPS(Lipopolysaccharide)刺激後、cytosolic と membrane 画分を代謝標識を用いた質量分析による様々なタンパク質の同定やリン酸化修飾の解析を行った。

リン酸化タンパク質を網羅的に調べることは、タンパク質を同定することに比べて困難である。なぜなら細胞内ではリン酸化されるタンパク質よりも、されないタンパク質の方が多いのでリン酸化されないペプチドをできるだけ排除する必要がある。様々なリン酸化ペプチドの濃縮方法が報告されているが、まだ完全ではない。今回我々は酸化チタンを用いて、酸性アミノ酸基とリン酸基との区別をするために、TFA(trifluoroacetic acid)などの強酸を用い、疎水的作用を減らすために有機溶媒濃度を 80%に高めることによって市販品より簡単な方法で精製効率を高めた。この手法の有効性を確かめるため、リン酸化ペプチドを濃縮したあと、CIP(calf intestine phosphatase)で反応させたものを MALDI-TOF MS で確認した結果、ほとんどのピークが脱リン酸化されることを確認した(Figure 2)。

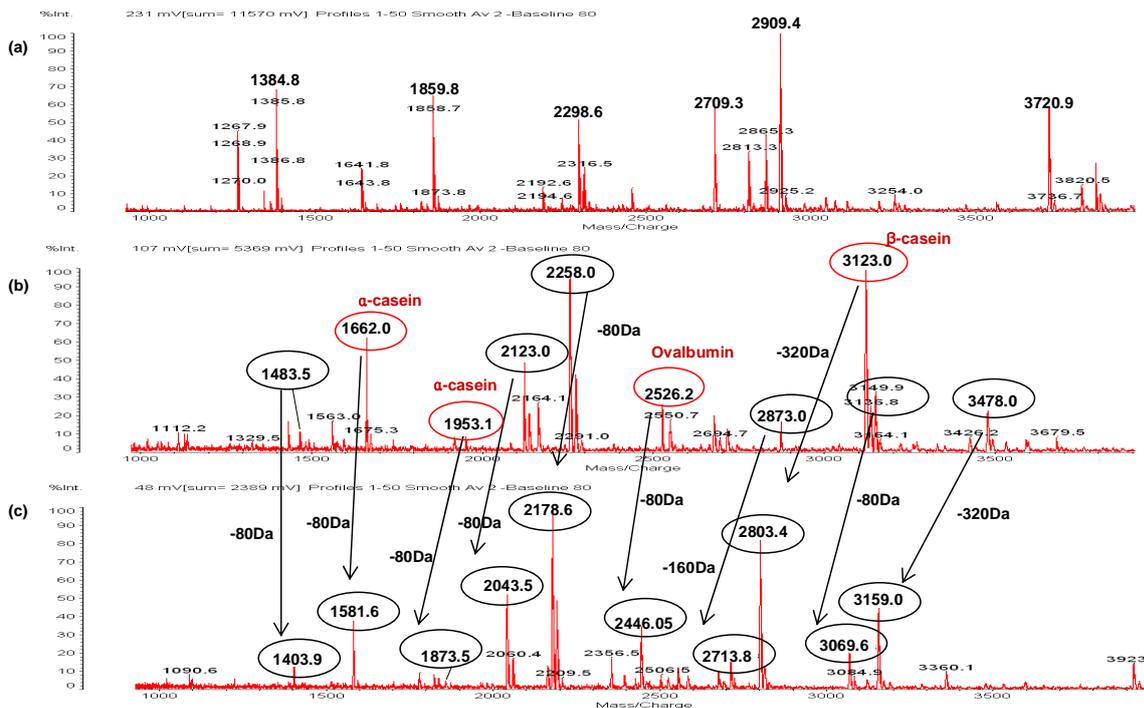
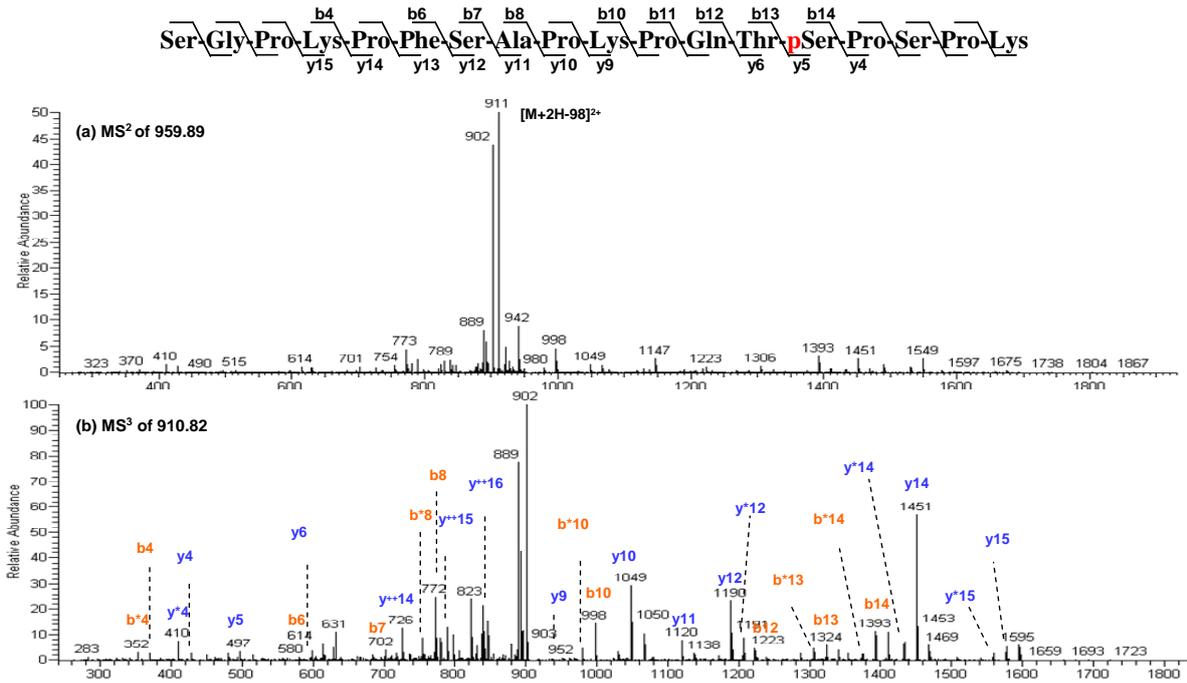


Figure 2. MALDI-TOF MS spectra (a) In-solution digested membrane fraction from THP-1 cells contains 10% of OVA,  $\alpha$ -, and  $\beta$ -casein as control, respectively. (b) Purified phosphopeptides after elution from TiO<sub>2</sub>. (c) Alkaline phosphatase treatment of peptides. The -80Da or multiples of -80Da mass shift of mass spectral peaks due to the loss of phosphate moiety after the dephosphorylation

リン酸化ペプチドの 97~99%を占めるリン酸化セリン・スレオニン酸基を含んだペプチドをプロテオミクスで汎用されているイオントラップ型装置で MS/MS を行うとリン酸基が脱離したイオンが非常に強く検出され、他のフラグメントイオンの強度が弱いため、同定が難しくなる。そのうえ検索エンジンの仕組みを考えても、リン酸基の有無を考慮させる条件で検索すると誤った結果を招く可能性が増える。そこで我々 MS/MS を行った後さらに Neutral loss scan(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 98Da)に相当するペプチドを選択的に MS/MS/MS を行うという手法を用いることによって、信頼性の高いリン酸化ペプチド部位の同定ができた(Figure 3)。

また、Adenylyl cyclase associated protein1(CAP1) の 293~311 の残基 SGPKPFSAPKPQ**TSP**SK の 3つのリン酸化基サイト、306-Threonine、307-Serine と 309-Serine を同時に区別しながら同定できた。さらに、Protein transport protein Sec61 beta subunit の場合、PGTPSGTNGV**SSGR**SPSK の 12-Serine リン酸基と 18-Serine リン酸基も今回の研究で同時に同定できた。

今回の解析で 3つのリン酸化ペプチドを新たに同定することができた。Amphiphysin の 240-255 の残基から AFTIQGAP**p**SDSGPLR の 249-serine、Leukocyte common antigen precursor の 969-981 の残基から NRN**p**SNVIPYDYNR の 972-serine、Adenylyl cyclase associated protein1(CAP1) の 178-217 の残基から HVDWVK**a**pYLSIWTELQAYIK の 185-Tyrosine のリン酸化ペプチド部位を同定することができた。



これまでのリン酸化ペプチドの変動解析ではリン酸化ペプチドだけの変動解析が一般的であった。しかし、これでは細胞内でのリン酸化の割合は決定できない。つまり 100%リン酸化されるわけではなく、同じペプチド鎖でもリン酸化されているものと、されていないものが混在している。そこでリン酸化ペプチドのみではなく、非リン酸化ペプチドも同時に同定することによってリン酸化ペプチドの割合の変動解析ができた。このリン酸化の割合の変動解析によって今まではなかった個々のペプチドにおけるリン酸化の変動割合を得ることが可能になった。

特に、Adenylylcyclase associated protein1(CAP1)の場合、N末端は adenylyl cyclase のC末端と結合するほか、CAP1 のC末端はアクチンと結合して、LPS によって誘発された TNF- $\alpha$  生産において、アクチン細胞骨格の重要性が報告されている。今回の研究で同じ残基からの 3 つの異なるリン酸化されたサイトと今まで報告がなかった 1 つのリン酸化されたサイトがこの研究において観察されたことから、LPS 刺激で、生体内の各リン酸化部位での役割が異なっているという重要な事実が明らかになった。(Figure 4)。

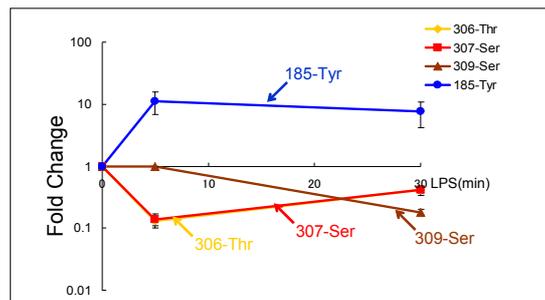


Figure4. An activation profile of three singly-phosphopeptides SGPKPFSAPKQTSPSPK and HVDWVYKAYLSIWTEHQAYIK from Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1) upon LPS stimulation.

今回の研究で、5min と 30min の LPS 刺激後、THP-1 細胞におけるリン酸化の変動解析を行った結果、下記の結果を得た(Table 1)。

Table1. Number of identified phosphopeptides and phosphorylation ratio changed

	cytosol+membrane sup. 9,000 × g centrifugation	cytosol fraction sup.100,000 × g centrifugation	membrane fraction ppt.100,000 × g centrifugation
<b>5min</b>	30(12)	61(22)	49(12)
<b>30min</b>	ND*	29(10)	20(3)

( ) ; number of phosphopeptides that phosphorylation ratio changed.  
Peptide pairs were chosen more than  $\sim 10^5$  of MS intensity .  
ND\* ; not analyzed in this study

重要な5つのリン酸化の変動を表した結果、LPS によるリン酸化の変動は早い時間で起こることが分かった(Figure 5)。時間によるリン酸化の変動は LPS 刺激における細胞内情報伝達について様々な可能性が予想される。

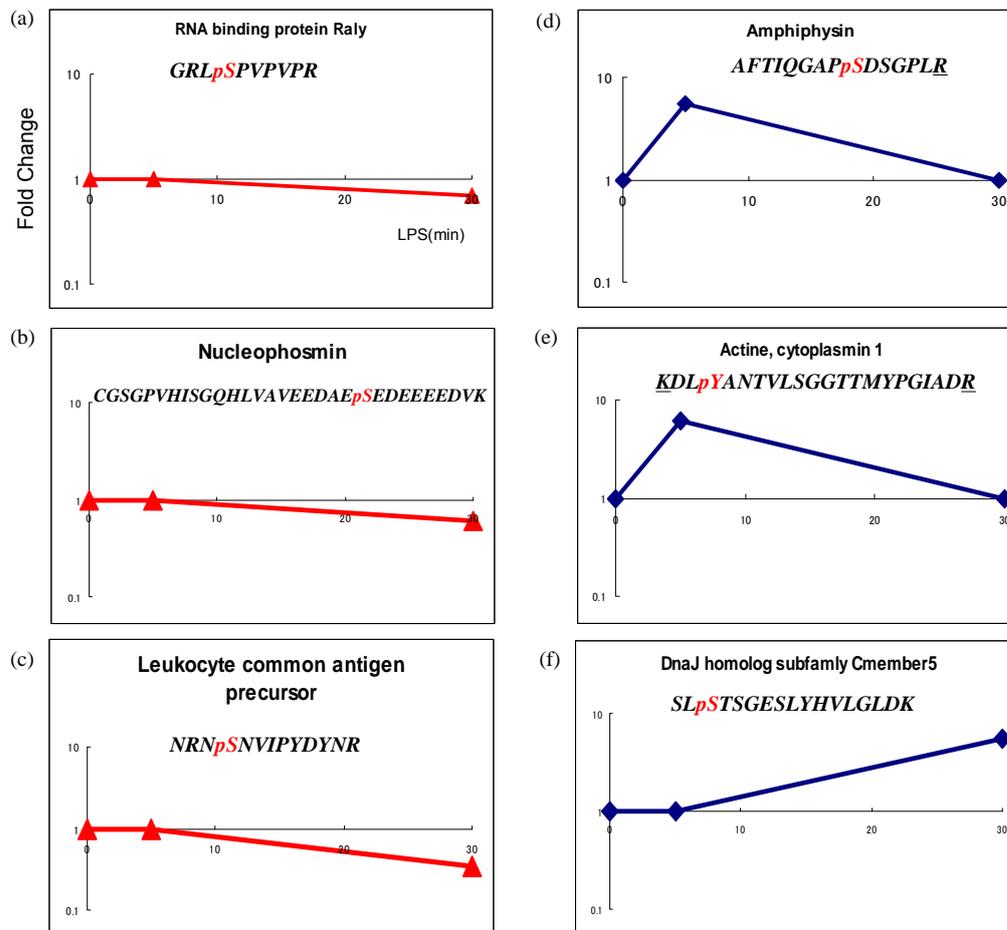


Figure 5. An activation profile upon LPS stimulation. (a) RNA binding protein Raly, (b) Nucleophosmin, (c) Leukocyte common antigen precursor, (d) Amphiphysin, (e) Actine, cytoplasmic 1, and (f) DnaJ homolog subfamily C member 5.

さらに、LPS の刺激によるタンパク質の解析では同定された 74 個の cytosolic protein、95 個 の membrane protein の中、27 個の cytosolic proteins と 39 個の membrane protein に 2 倍以上の変動がみられた。

Table2. Number of identified proteins with LPS for 24hrs.

<b>cytosol fraction</b>	<b>membrane fraction</b>
sup.100,000 × g centrifugation	ppt.100,000 × g centrifugation
74(27)	95(39)

( ) ; number of proteins that differentially ratio changed.  
ratio was chosen > 2.0 or <0.5.

この方法はタンパク質のリン酸化解析に非常に有効であると思われ、これまでリン酸化修飾の報告がないタンパク質の同定やリン酸化修飾が予測されていないアミノ酸部位におけるリン酸化の同定も可能であると考えている。本研究の結果から、今後この手法がリン酸化変動解析に有効な方法となりうることを確信している。

さらに新たにリン酸化の変動割合を得ることが可能になったことは非常に重要でリン酸化の割合の変動解析によって生体内のリン酸化の役割の研究に役に立つと考えている。また、LPS(Lipopolysaccharide)研究は TLR4(Toll-like receptor4)と関連して多く研究されている。しかしプロテオミクス手法で網羅的な解析の報告は少ない。この研究による網羅的な LPS 作用におけるタンパク質の変動解析とリン酸化ペプチドの変動解析で炎症細胞におけるリン酸化の細胞内情報伝達についてさらに詳細に考察できると考えている。