

200809011A

**厚生労働科学研究費補助金**

**創薬基盤推進研究事業**

**重層的・定量的トキシコモディフィコム解析を用いた  
安全性バイオマーカーの探索に関する研究**

**平成20年度 総括研究報告書**

**研究代表者 足立 淳**

**平成 21(2009)年 4月**

## 目 次

### I. 総括研究報告

重層的・定量的トキシコモディフィコム解析を用いた  
安全性バイオマーカーの探索に関する研究

足立 淳

----- 1

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

重層的・定量的トキシコモディフィコム解析を用いた  
安全性バイオマーカーの探索に関する研究

研究代表者 足立淳 京都大学地球環境学堂 助教

研究要旨

安定同位体標識アミノ酸による培養細胞内蛋白質標識法を用いたプロテオーム解析の定量精度の確認、解析対象であるリン酸化・アセチル化・システイン酸化の蛋白質修飾のうち、リン酸化ペプチドの効果的な MS/MS 同定、アセチル化リジンプロテオーム解析法の検討を行った。蛋白質の定量精度については、1.5 倍以上の変動を検出可能であることを確認した。リン酸化ペプチドの同定については、濃縮されたリン酸化ペプチドをエレクトロスプレーイオン化法によってイオン化後に電荷当たり質量( $m/z$ )で分離して MS/MS 解析する気相分離法を採用することで 400 個以上の蛋白質のリン酸化を同定可能な分析系を確立した。アセチル化リジンプロテオーム解析については、アセチル化リジン抗体を用いてペプチドの濃縮を行ったが、十分に濃縮されなかったため、他の抗体の使用、免疫沈降のさらなる条件検討が必要である。

A. 研究目的

毒性物質・薬剤の標的因子、作用メカニズムの解明のため、2次元ゲルや、安定同位体標識技術を用いたショットガン式定量技術を用いたプロテオーム解析が幅広く取り入れられている。既存研究の多くは蛋白質の“量”の変化を検出することに主眼が置いてきたが、“量”の変化はトランスクリプトーム解析でも検出可能な場合が多い一方で、“質”の変化、例えば分子標的薬の受容体拮抗によるリン酸化阻害のような、標的因子の“質”（翻訳後修飾）を変化させる例はプロテオーム解析でのみ測定可能である。このような“質”の変化をプロテオームレベルで捉えて、毒性作用との関連を見いだすために、本研究ではシステイン酸化・リジンアセチル化・リン酸化解析の3種類の蛋白質翻訳後修飾について、毒性物質の影響を定量する解

析システムを構築し、毒性物質や薬剤によって変化する蛋白質の翻訳後修飾を同定し、システイン酸化・リジンアセチル化・リン酸化の3枚の修飾変化マップを重ねた重層翻訳後修飾マップを作成し、安全性バイオマーカーや毒性シグナルネットワークを推定することを研究目的とする。本年度は蛋白質を定量する基盤技術である、安定同位体標識アミノ酸による培養細胞内蛋白質標識法

（SILAC法：Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture法）を用いた蛋白質の定量精度の確認、リン酸化ペプチドの効果的な MS/MS 同定、アセチル化リジンプロテオーム解析法の確立を目的とした。

B. 研究方法

SILAC法による定量精度の測定



HepG2 細胞の培地中に通常のアルギニンとリジンもしくは $^{13}\text{C}_6$ -アルギニンと $^{13}\text{C}_6$ -リジンを添加し、細胞に取り込ませる。5 世代継体培養すると、細胞内蛋白質のアルギニンとリジンがほぼ完全に置換される。定量の正確性を確かめるために軽い細胞と重い細胞を同一の条件で培養し、軽い細胞と重い細胞を等量混合し、蛋白質を還元アルキル化、トリプシンで断片化し、断片化されたペプチドを LC-MS/MS に供した。トリプシン断片化ペプチドは C 末端にアルギニンもしくはリジンを含むので、軽い細胞と重い細胞由来のペプチドは質量差 6 を有する。それぞれの細胞に由来する同一配列ペプチドのピークは同時に質量差 6 を有するペアピークとして検出される。そこでペアピークのピーク面積比からペプチド量の比較定量を行い定量性を評価した。なお LC-MS/MS の測定は、ペプチドを 0.5% 酢酸、5% アセトニトリルで溶解させて LC (Hitachi nano LC)-MS/MS (Waters QToF ultima) で分析した。カラムは ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ 3  $\mu\text{m}$  resin (Dr. Maisch GmbH) を長さ 10 cm 内径 50  $\mu\text{m}$  のヒューズドシリカチューブにバックしたものを使用し、移動相は A: 2% アセトニトリル、0.5% 酢酸、B: 98% アセトニトリル、0.5% 酢酸によるリニアグラジエント (流速 200 nl/min、測定時間 85 分) であった。MS 及び MS/MS 測定は MS1 秒、第 1MS/MS~第 5MS/MS 各 1 秒の合計 6 秒の自動測定 (Data dependent analysis) で行い、 $m/z$  300-1600 のレンジもしくは 300-600、600-750、750-1600 の 3 分割したレンジで MS 測定した。データ処理は解析ソフト Mascot Server と Mascot Distiller を用いて行った。

#### リン酸化ペプチドの同定

上述の SILAC 法でラベルした HepG2 細胞を等量混合し、細胞溶解し、細胞質画分を調製した。細胞質画分を定法に従いリシルエンドペプチダーゼ C とトリプシンで消化した後、ペプチドを固相抽出した。酸化チタンビーズ (GL Science 社製) にリン酸化ペプチドを選択的に結合させた。なお

選択性を高めるエンハンサーとして 25% 酪酸を用いた。その後、5% アンモニアと 0.5% ピペリジンでリン酸化ペプチドを溶出し、C18 Stagetip で脱塩濃縮して LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS の設定、データ解析方法は上述の通りである。

#### アセチル化リジンプロテオーム解析法

A549 細胞にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤である、trichostatin A 0.3  $\mu\text{M}$  (TSA; class I/II HDAC inhibitor) と sirtinol 50  $\mu\text{M}$  (class III HDAC inhibitor) を 24 時間曝露後、細胞溶解し、核画分と細胞質画分を調製した。まず各画分を 4 種類の抗アセチルリジン抗体 (Immunochem Pharmaceuticals, Santacruz Biotech, Upstate, Cell Signaling Technology 社製) を用いてウェスタンブロットティングを行った。続いて、細胞質画分をリシルエンドペプチダーゼ C とトリプシンで消化し、消化ペプチドを固相抽出した後、4 種類の抗アセチルリジン抗体を用いて免疫沈降法によりリジンアセチル化ペプチドを濃縮した。濃縮したアセチル化ペプチドを 0.5% トリフルオロ酢酸で溶出し、C18 Stagetip で脱塩濃縮して LC-MS/MS に供した。LC-MS/MS の設定、データ解析方法は上述の通りである。

#### (倫理面への配慮)

本研究ではサンプルとして培養細胞を用いるため、人権・動物愛護に関する問題には抵触しません。

### C. 研究結果

#### SILAC 法による定量精度の測定

HepG2 細胞の培地中に $^{12}\text{C}_6$ アルギニンと $^{12}\text{C}_6$ リジンもしくは $^{13}\text{C}_6$ アルギニンと $^{13}\text{C}_6$ リジンを添加し、5 世代継体培養後、細胞内蛋白質のアルギニンとリジンがほぼ完全に置換されたことを質量分析計を用いて確認した。次に定量精度の測定のために、 $^{12}\text{C}$  アミノ酸を用いて培養した「軽い」

細胞と  $^{13}\text{C}$  アミノ酸を用いた「重い」細胞を等量混合し、蛋白質を断片化し、LC-MS/MS に供し、軽い細胞と重い細胞由来のペプチド（質量差 6）を比較定量した。その結果、シグナル強度の相対比は 1.5 倍以内であり、SILAC 細胞を用いた定量系では 1.5 倍以上の変動を検出できることを確認した（図 1）。

### リン酸化ペプチドの同定

リン酸化ペプチドの濃縮については酸化チタンビーズを用いた濃縮時に、酪酸をエンハンサーとして用いることで、同定ペプチド数当たり 98% 以上まで濃縮できることが確認された。次に、MS/MS 自動測定モード（Data dependent analysis）でリン酸化ペプチドを同定するに際して、同定率の向上が課題であったため、MS/MS スペクトラ取得に関わる各種パラメーターの調整、打ち込みサンプル量の増大による効果の検証を行った。まず用いた細胞質画分の初期サンプル量を 1 mg から 3 mg に増やすことで、同定蛋白質数を平均 50 個から 257 個にまで増加させることができた。上記実験は MS ( $m/Z$  300-1600) 1 秒、第 1MS/MS～第 5MS/MS 各 1 秒の合計 6 秒の自動測定（Data dependent analysis）で行ったが、MS スペクトル上のピーク数が多いため、ピーク強度は十分強いにも関わらず MS/MS 測定されなかったピークも多数観察された。そこで  $m/Z$  300-600、600-750、750-1600 の 3 分割したレンジで MS 測定と MS/MS 測定を行う気相分離法を採用した結果、平均 400 個以上のリン酸化蛋白質を同定することが可能になった。

### アセチル化リジンプロテオーム解析法

アセチル化リジン抗体を用いて、アセチル化リジンを含むペプチドもしくは蛋白質を濃縮し、同定するという本研究の戦略の鍵はアセチル化リジン抗体の性能にある。そこで、抗体性能の確認のため、A549 細胞にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を曝露させて、細胞内のアセチル化

リジン濃度を高めた状態で、核蛋白質、細胞質蛋白質を回収し、ウェスタンブロッティング法を行ったところ、用いた 4 種の抗体全てで核・細胞質蛋白質サンプルから複数のバンドが検出された。次に、細胞質蛋白質を消化したペプチドを 4 種の抗体を用いて免疫沈降法で濃縮し、LC-MS/MS で同定を試みたが、アセチル化リジンを含むペプチドは検出されなかった。

### D. 考察

SILAC 法は実験の初期段階で曝露群と非曝露群を混合し、その後の操作過程による影響を受けないため、極めて優れた定量精度を持つ。さらに、曝露群と対照群の細胞を入れ替えるスワップ実験をすることによって、さらなる定量精度の向上が期待される。また蛋白質の翻訳後修飾サイトの同定は、通常非修飾ペプチド配列の同定と比較して、擬陽性確率が高まるが、SILAC 法を用いた場合、同一配列の「軽い」ペプチドと「重い」ペプチドが偶然同一配列のペプチドに誤同定される確率は極めて低く、また MS/MS スペクトルを比較することで、 $y$  イオン、 $b$  イオンシリーズの判別がよくなるため ( $y$  イオンシリーズのみがリジンもしくはアルジニンを含むため、質量差を有する)、擬陽性確率を減らすことができる。この SILAC 法のメリットは次年度以降の研究において大きく貢献すると期待される。

リン酸化プロテオーム解析については、サンプル量と、分画数を増やすことで、効果的に同定数が増加することが明らかになった。本年度立ち上げた解析方法を用いて、次年度以降実際に化合物の影響を解析する予定である。

アセチル化リジンプロテオーム解析において、アセチル化リジンペプチドが同定されなかった原因について、抗体価の不足、ペプチドと蛋白質の抗体への結合力の相違、サンプル量の不足等考えられる。次年度は、抗アセチル化リジン抗体によって蛋白質レベルでの免疫沈降を行う、他の抗体の

使用、サンプル量増加による効果を検討する計画である。

#### E. 結論

本研究の基盤技術となる、SILAC法を用いた精度の良いプロテオーム定量系を構築し、それを用いたリン酸化ペプチドの同定・定量系を構築した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Jun Adachi, Keishi Kihara and Tomonari Matsuda,  
Unbiased quantification of oxidative modifications  
of cysteine thiols by double labeling approach using  
isotope amino acids and affinity Tags (DLIAA).

日本環境変異原学会第37回大会 (2008.12. 沖  
縄)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

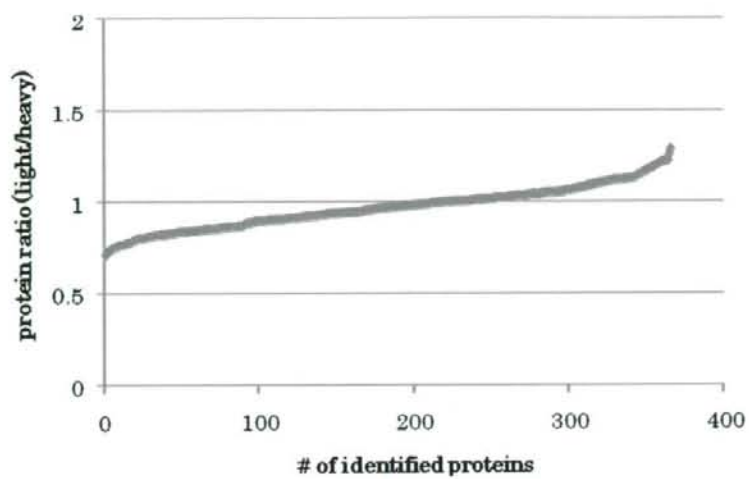


図1 SILAC 法による蛋白質の定量精度