

3次元マイクロアレイ—乳癌の診断と治療効果予測への 臨床応用を目指して

松本光代^{1,2}, 畠山 篤¹, 坂本宙子³, 山口ゆり⁴,
笹野公伸⁵, 八重樫伸生², 林 慎一¹

¹東北大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

²東北大学大学院医学系研究科 婦人科学

³オリンパス株式会社バイオメディカル開発部

⁴埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所

⁵東北大学大学院医学系研究科 病理診断学

Three-dimensional Microarray for the Prediction of Response to Hormonal Therapy in Breast Cancer

Mitsuyo MATSUMOTO^{1,2}, Atsushi HATAKEYAMA¹, Hiroko SAKAMOTO³, Yuri YAMAGUCHI⁴,
Hironobu SASANO⁵, Nobuo YAEGASHI² and Shin-ichi HAYASHI¹

¹Department of Medical Technology, School of Health Sciences, Tohoku University

²Department of Gynecology, School of Medicine, Tohoku University

³Biomedical Business Incubation Division, Olympus Co.

⁴Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center
Department of Pathology, School of Medicine, Tohoku University

Key words: Breast cancer, Estrogen, and Microarray

Estrogen signaling plays crucial roles in genesis and malignant progression of breast cancer. Therefore, it is the most important molecular target for diagnosis and therapy of breast cancer. So far, we investigated the estrogen signaling pathway in breast cancer cells using estrogen-responsive DNA microarray. In this study, we assessed the performance of new microarray technology, 3-dimensional (3D) microarray, to analyze estrogen signaling in clinical specimens for the future clinical application. 3D-microarray fixes DNA probes on PamChip, the steric microindentation platform. Therefore, 3D microarray is able to fix DNA probes on wide surface area, and thus it has many advantages such as high sensitivity and reproducibility, in comparison with conventional microarray. Furthermore, this system enables short time and automatic analysis from small samples such as biopsy specimens. First we analyzed the estrogen-responsive expression profile in breast cancer tissue using PamChip fixed DNA probes of estrogen-responsive genes, which previously we had identified. The clustering analysis of the results, this array Chip was able to classify the genes distinctly into ER-positive tissue or -negative tissue. Thereafter, we explored to find the minimum amount of the samples in RNA extraction that can keep reproducibility of the result. In

this 3D microarray system, it was proved that the 1×10^4 cells were enough to obtain the reproducibility of the analysis. These results indicate 3D-microarray will be a promising tool which clinically applicable for diagnosis from small amount of biopsy specimens.

はじめに

これまでの基礎研究の知見から、エストロゲンによる乳癌の発生・進展には、エストロゲンによって発現変動した遺伝子群による細胞の増殖促進、浸潤・転移能の獲得、抗アポトーシス作用、血管新生の促進作用¹⁾などが深く関与すると考えられている。その為、乳癌の治療にはエストロゲンシグナルをブロックするという戦略が有効と考えられ、古くは卵巣摘除、現在では各種ホルモン療法が積極的に行われ、実際に著効を示している。なかでも抗エストロゲン剤であるタモキシフェン (TAM) は二十数年来使用されてきた代表的なホルモン療法剤である²⁾³⁾。また近年、新たに登場した第三世代のアロマターゼ阻害薬 (AI) 等、より奏効性の高い新規ホルモン療法が実用化されている³⁾⁴⁾。現在のところ、これらホルモン療法の適応はER発現の有無、およびERの標的遺伝子であるプロゲステロン受容体 (PgR) の有無が重要な判断指標となっている。ホルモン療法がERを標的としたものであることから、これはきわめて順当な効果予測因子といえる。しかしながら、実際にはER陽性例の30~40%でこの治療が奏効しないことが知られており⁵⁾、また一方、一部ではあるもののER陰性ながら抗エストロゲン剤が奏効した例があることも知られている。さらに、ヒト乳癌患者の10~30%に過剰発現が認められるヒト上皮細胞増殖因子受容体 type 2 (Her 2/neu) の有無によるTAMとAIの有効性に違いがあるといった臨床上の所見は、個々の患者におけるER活性化の多様性や個性の存在を示しており、より有効なホルモン療法の適応、あるいは他の分子標的治療法との使い分けおよび併用といった可能性を示唆している⁶⁾。しかしながら、このような新たな展開に、既存の診断因子・予後因子だけでは適切な対応ができないのは明らかである。そこで、

我々は各種ホルモン療法の高精度奏効性予測等の臨床応用と、乳癌におけるエストロゲンシグナル経路の解明を目指して、エストロゲン応答性に着目したマイクロアレイ解析を広範に行い、このような目的に最適な遺伝子サブセットを同定し⁷⁾、診断用チップを開発することを目的とした研究を行っている⁸⁾⁹⁾。

これまでの、多くの癌研究は特定の遺伝子群の発現を解析することで、患者の層別化治療における奏効性や予後が予測可能であることを示唆し、1回のhybridizationで同時に多種類の遺伝子を解析可能なマイクロアレイは、その臨床応用が期待されている道具の1つである。しかしながら、実際にはhybridizationに時間がかかること(10時間)、比較的煩雑な操作のため、実験者の手技が結果の再現性・信頼性に影響を与えがちであるなどの理由から、臨床での応用はまだ困難な状況にある。

そこで我々は本研究において新しいタイプのマイクロアレイプラットフォームである3次元(3D)マイクロアレイに臨床応用への可能性を求めた。3Dマイクロアレイシステムの最大の特徴は遺伝子捕捉のためのプローブを固相化する基板に、従来のスライドガラスやシリコンなどの平面基板ではなく、三次元構造を持つフロースルー型多孔質膜を採用していることにある(図1)。この多孔質膜にオリゴDNAプローブをスポットすることで、膜表面だけでなく多孔質膜内にも立体的にプローブ分子が固相化され、検出時にスポット当たりのプローブ分子密度を高めることができる。さらに、この膜にサンプル溶液を強制的に繰り返し透過させることで、hybridization時のサンプルとプローブの会合機会を高め、効率のよいhybridization反応を実現し、従来の1/10程度の反応時間(約100分間)で結果を得ることができる。加えて、3Dマイクロアレイシステムでは、サ

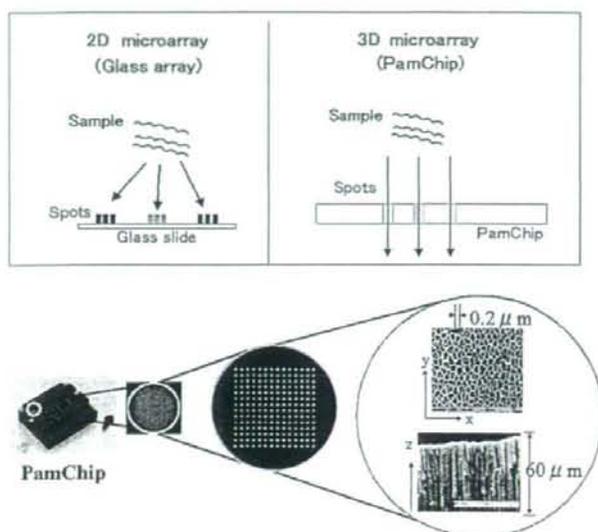


図1. 3Dマイクロアレイの基板構造

サンプル溶液を PamChip に滴下するだけの簡単な操作で hybridization からシグナル検出・解析までの工程を、あらかじめ設定した反応条件に従って1台の装置でほぼ自動的に実施することができ、簡便な操作性と同時に、実験者の手技の習熟度に因われない高い再現性を実現している¹²⁾。また、アレイ解析を臨床診断に応用するにあたり、必要サンプル量の微量化は非常に重要である。たとえば針生検サンプルのような微量な検体でも解析可能となれば、術前検査にも応用可能となる。3Dマイクロアレイでは三次元構造基板と工程の自動化のメリットをいかし、hybridization 反応後に、アレイ上で酵素による蛍光シグナル増幅を実施することで、従来の1/100~1/1,000程度のサンプル量でも(標識核酸: 10~50 ng)、アレイ解析を実施することが可能となった¹²⁾。

しかしながら、アレイ自体の精度は上がったが、total RNA 抽出時の必要な組織または細胞といったサンプル量、およびそのサンプル量に起因したアレイの再現性は現在確認されていない。本稿では、total RNA 抽出に用いる細胞量が与える

その後のアレイの再現性に注目し、エストロゲン応答遺伝子サブセットを載せた PamChip を用いて、3次元マイクロアレイシステムの臨床応用への可能性を検討した。

材料および方法

1. 細胞と細胞培養

ヒト乳癌細胞 MCF-7 は 10% FCS (Tissue Culture Biologicals, Turala, CA) およびペニシリン/ストレプトマイシン (BIBCO, MD, USA) 添加 RPMI 1640 培地 (GIBCO, NY, USA) で、5% CO₂, 37°C に調製した CO₂ インキュベーターで培養した。

2. 組織からの RNA 抽出

-80°C にて保存された乳癌手術摘出検体を乳鉢に液体窒素と共に入れ、粉々になるまですりつぶした。RNA 抽出は ISOGEN (Nippon gene, Tokyo, Japan) を用い、後述の通り行った。乳鉢ですりつぶした検体に ISOGEN を 1 ml 加え、5分間室温で静置後、0.2 ml のクロロホルムを添加した。よく懸濁後、3分間室温で静置し、高速遠心

(12,000 g, 4°C, 15 分間) をかけた。遠心後、上清を回収し、0.6 ml のクロロホルムを添加、再びよく懸濁後、3 分間室温で静置したのち、高速遠心 (12,000 g, 4°C, 15 分間) を行った。上清を回収後、等量のイソプロパノールを加え、高速遠心を行うことで、RNA を濃縮した。また DNA 残渣を除くため DNase I 処理を行った。なお、本研究では乳癌手術検体を用いた実験は全て埼玉県立がんセンターにて行い、乳癌手術検体は、埼玉県立がんセンターにおいてインフォームドコンセント後、同意が得られたもののみを使用し、機関の倫理委員会が定めた手続きに従ったものである。

3. 培養細胞の RNA 抽出

MCF-7 細胞を培養皿に播種後、約 80% コンフルエントになるまで培養した。細胞数は 1% トリプシン/EDTA で細胞を剥がし、トリパンブルーで染色後、血球計算板にて計測し、 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 および 1×10^8 cells 懸濁液を調製した。RNA 抽出は RNeasy キット (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。まず、遠心 (300 g, 5 分間) にて細胞を沈澱として得、そこに 350 μ l の RLT buffer (含 1% 2-メルカプトエタノール) を加え、1 分間 vortex をかけた。70% エタノールを 350 μ l 添加後、全量を RNeasy ミニスピナラムに添加し、遠心を行った。RW1 をカラムに 700 μ l 添加し、遠心した。さらに RPE buffer を添加後遠心、この作業を 2 回繰り返した後、30 μ l の RNase・DNase free 水を添加し、遠心後の flow-through を total RNA 溶液として回収した。また、この時の total RNA 濃度はナノドロップ (NanoDrop Technologies Inc., DE, USA) を用いて測定した。

4. マイクロアレイに用いる RNA の合成 (cDNA の合成・aRNA の合成)

細胞から抽出した (組織; 2 μ g, 培養細胞 10-1,000 ng) total RNA より、MessageAmp™ aRNA kit (Ambion, Austin, TX) を用い、取扱説明書にしたがって蛍光標識 aRNA の合成を行った。aRNA 溶液は Fragmentation Reagent (Ambion, Austin, TX, USA) を用いて、70°C で 15 分間処理することで断片化した。断片化 aRNA

の溶液を Microcon YM-30 (MILLIPORE, MA, USA) を用いて RNase・DNase free 水に置換した後、ディネーチャー処理 (95°C, 15 分間) を行った。なお、aRNA 濃度はナノドロップを用いて測定した。

5. 3次元マイクロアレイとその解析

アレイの基板である PamChip (OLYMPUS, Tokyo, Japan) は、林らが同定した乳癌におけるエストロゲン応答遺伝子群を固着してあるものを使用した¹¹⁾。ディネーチャー処理後の 50 ng の aRNA 溶液 (37.5 μ l) に 7.5 μ l の 20×SSPE (0.2 M sodium phosphate, 3.0 M NaCl, 0.02 M EDTA, pH 7.4) と 5 μ l の 10% SDS を添加したものを PamChip に全量 (50 μ l) 添加し、hybridization を行った。Hybridization は 3次元マイクロアレイシステム機器の FD10 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて 40°C で 150 cycle 溶液を駆動しながら行った。また、アレイ画像解析も FD10 によって行われた。クラスター解析は Michael Eisen ら¹²⁾ の cluster と tree view の software によって行われた。

結果および考察

1. 組織検体を用いた 3D マイクロアレイ解析

まず、我々は PamChip に載せたエストロゲン応答遺伝子の動向を調べるため、エストロゲン受容体 (ER) 陽性および陰性検体、各 2 例の乳癌組織から得た RNA を用いて 3D マイクロアレイ解析を行った。約 40 mg の乳癌手術後標品を、乳鉢を用いてすりつぶした後、ISOGEN によって RNA を抽出したところ、total RNA は各約 8.8 μ g 回収された。このうち各検体、2 μ g の total RNA から aRNA を合成し、3D マイクロアレイ画像解析後、さらに 4 検体の各遺伝子の輝度平均値をコントロールとして用い、その遺伝子発現比をクラスター解析したところ、図 2 に示すように ER の陽性検体では遺伝子発現が高いものが多く、陰性のものでは低いものが多く、2つの系統に分類された。よって、本アレイシステムは、個々の乳癌患者におけるエストロゲン感受性の把握に役立つかもしれない。しかしながら、これらは各

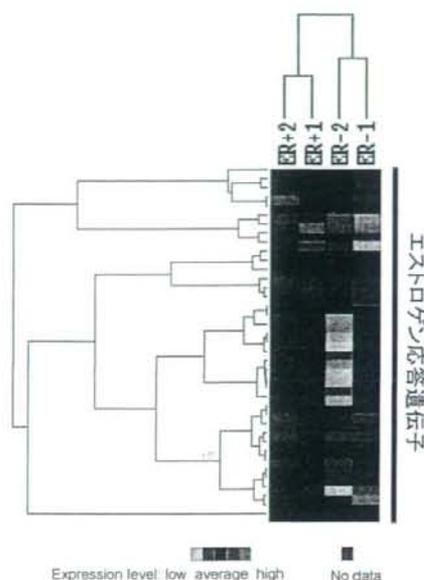


図2. エストロゲン受容体陽性および陰性乳癌組織を用いた3Dマイクロアレイ解析結果に基づくクラスター解析。エストロゲン受容体(ER)陽性および陰性乳癌組織、各2検体からISOGENを用いてRNA抽出後、エストロゲン応答遺伝子を搭載したチップを用いて、3Dマイクロアレイ解析を行った。ER陽性検体と陰性検体は2つのクラスターへと分類された。

2検体だけの解析結果であり、今後更なる検討が必要である。また、今後、針生検といった微量検体におけるマイクロアレイ解析に耐えられるRNA抽出が可能であれば、患者への侵襲を少なくできるだけでなく、患者個々に最適な治療および予後の診断、さらには予防診断といった今後の医療現場における診断法となり得る可能性を持つ。

2. 3Dマイクロアレイ解析限界の検討

そこで、我々は供用検体の少量化を探るため、マイクロアレイにおいて安定した解析結果の得られる細胞量とtotal RNA量を検討した。ISOGENによるRNA抽出は検体が大きい時には良い方法であるが、微小検体からのRNA抽出では、抽出作

表1. 細胞数における抽出total RNA量

細胞数	抽出 Total RNA 量 (μg)	260/280
1×10^1 cells	0.048	3.96
1×10^2 cells	0.277	1.60
1×10^3 cells	0.255	1.56
1×10^4 cells	0.249	2.04
1×10^5 cells	2.421	2.02

業の途中でエタノール沈殿法を用いるため、RNAの損失が起こるため適さない。従って、検討におけるRNA抽出は核酸吸着カラムを用いた、RNeasy mini kitによって行った。10倍の段階希釈によって細胞数を $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ 個まで設定し、total RNAの抽出を行ったところ、その回収量は当然のことながら細胞数に比例して減少した(表1)。また、一見10個の細胞からもaRNA合成に足るRNAが得られたように見えるが、その純度(260 nm/280 nm比)は細胞数 1×10^4 個以下で悪くなった。従って、total RNAの調整は細胞数 1×10^4 個以上からが望ましいと考えられた。乳癌検査で施行されるCore needle biopsyでの組織採取量はおよそ20 mgであり、FNA(Fine Needle Aspiration)法では数ミリグラムと予想され、今回の検討の際のMCF-7細胞数 1×10^4 個は0.6 mg以下だったので本法によるRNA抽出量は3Dマイクロアレイ解析に充分耐えうるだろうと思われる。実際、3検体ではあるが、本法によってRNA抽出を行ったところ、0.22~0.36 μg のtotal RNAが得られたことを確認している。

また、合成開始時のtotal RNA量が異なるとaRNA増幅率が変わりマイクロアレイ解析結果に再現性が得られなくなってしまうのではないかと考え、次にaRNA合成時に用いる、total RNAの量について検討した。細胞数 1×10^5 個の細胞から抽出したtotal RNAの10, 100および1,000 ngを開始材料としてaRNA合成を行い、エストロゲン応答遺伝子を載せたPamChipを用いて3Dマイクロアレイシステムによる解析を行った。その結果、100および1,000 ngではaRNAの増幅率に差はほとんどなく、少なくとも100 ng以上1,000

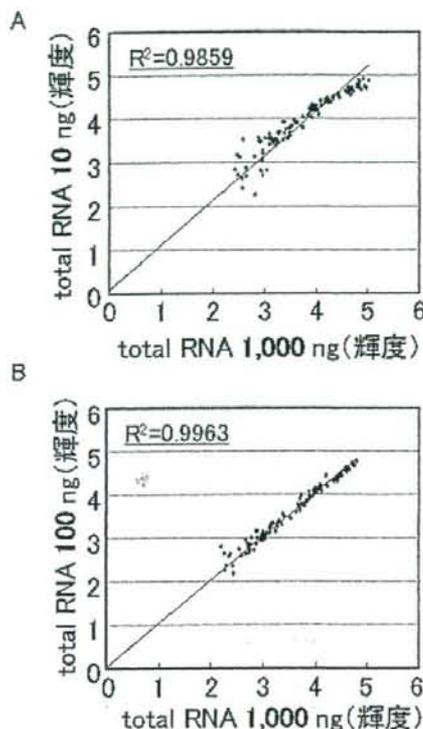


図3. aRNA合成時に用いるtotal RNA量がアレイ結果の再現性に及ぼす影響 MCF-7細胞数 1×10^4 個からRNeasy mini kitを用いて抽出したtotal RNA量を10~1,000 ngまで10倍の段階希釈し、aRNA合成に用いた。合成したaRNAを3Dマイクロアレイ解析し、(A)10 ngと1,000 ngのときの再現性、(B)100 ngと1,000 ngのときの再現性を比較した。

ng以下のtotal RNAからaRNAを合成すれば、3Dマイクロアレイ解析結果に確実に再現性を得られることが判明した(図3)。

そこで、細胞数 1×10^4 個から抽出したtotal RNAと細胞数 1×10^5 個の細胞から抽出したtotal RNAの100 ngからの3Dマイクロアレイ解析を行ったところ、図4に示すように、決定係数0.9678と高い相関を示したものの、若干の再現性を失った。このことは、マイクロアレイにおけ

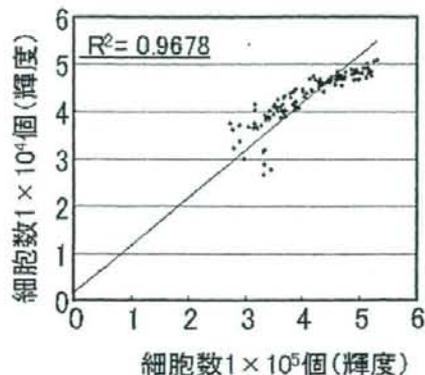


図4. Total RNA抽出時に用いる細胞量がアレイ結果の再現性に及ぼす影響 MCF-7細胞の 1×10^4 個と 1×10^5 個から、それぞれRNeasy mini kitによってRNA抽出を行った。その後、各検体をもとに3Dマイクロアレイ解析までを行い、RNA抽出に用いる細胞量によるアレイの再現性への影響をみた。

る再現性のkey pointがtotal RNAの抽出作業にあることを示した。しかしながら、これは厳しく追求した場合であり、実際の臨床応用を含む研究に用いるには十分な再現性が確保された系であるといえる。

本研究から、針生検といった微量な検体からもマイクロアレイ解析に用いることの可能なmRNAの抽出が行えることが示唆され、さらに3Dマイクロアレイシステムによるhybridization反応以後の自動化によって、結果に高い再現性が得られることが確認された。

近年、ますます発展してきた医療技術や製薬剤の普及のもと、施行される医療は複雑となり、患者個々に対応した治療法が求められている。したがって患者から最小の侵襲でいかに多くの正確で有用な情報を得られるかは今後きわめて重要である。マイクロアレイは一度に多くの遺伝子の発現状況を調べることのできる手法であり、研究レベルでは広範に用いられるようになって来た。ここで示したような3Dマイクロアレイシステムを用いることで微量な細胞からの解析が可能と考えら

れ、組織採取の際の患者への侵襲を少なくできるだけでなく、患者個々に最適な治療選択および予後診断、さらには予防のための検査といった今後の医療現場における新しい検査法となり得る可能性が考えられる。

おわりに

3Dマイクロアレイを用いる際、aRNAの調製に用いるtotal RNA量は100 ng以上1,000 ng以下であることが望ましい。また、RNA抽出時の細胞数は 1×10^4 cells以上あることが望ましく、これは乳癌検査で施行されるCore needle biopsyでの組織採取量からも十分に3Dマイクロアレイ解析が許容となるmRNA量が抽出可能であることを示唆した。

マイクロアレイの高感度化、すなわち少量検体からの解析は、検体採取の際の患者への侵襲を少なくできる。本研究の更なる発展によって3Dマイクロアレイ利用による、患者個々の遺伝情報に基づいた疾患の予防、治療への貢献を期待する。

文 献

- 1) Elkin, M., Cohen, I., Zcharia, E., Orgel, A., Guatta-Rangini, Z., Peretz, T., Vlodaysky, I., Kleinman, H.K.: Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer, *Cancer Res.*, **63**, 8821-8826, 2003
- 2) Early Breast Cancer Trialists Group: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials, *Lancet*, **351**, 1461-1467, 1998
- 3) Gradishar, W.J.: Tamoxifen-What next?, *Oncologist*, **9**, 378-384, 2004
- 4) Strasser-Weippl, K., Goss, E.: Advances in adjuvant hormonal therapy for postmenopausal women, *J. Clin. Oncol.*, **23**, 1751-1759, 2005
- 5) Pujol, P., Daures, J.P., Thezenas, S., Guilleux, F., Rouanet, P., Grenier, J.: Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast cancer carcinoma during the menstrual cycle and menopause, *Cancer*, **83**, 698-705, 1998
- 6) Zhu, L., Chow, L.W., Loo, W.T., Guan, X.Y., Toi, M.: Her 2/neu expression predicts the response to antiaromatase neoadjuvant therapy in primary breast cancer: subgroup analysis from celecoxib antiaromatase neoadjuvant trial, *Clin. Cancer Res.*, **10**, 4639-44, 2004
- 7) Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R., Hayashi, S.: Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes, *J. Mol. Endocrinol.*, **29**, 175-192, 2002
- 8) Hayashi, S.: Prediction of hormone sensitivity by DNA microarray, *Biomed. Pharmacother.*, **58**, 1-9, 2004
- 9) Hayashi, S., Yamaguchi, Y.: Estrogen signaling and prediction of endocrine therapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **56**, 27-31, 2005
- 10) Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Suemasu, K., Higashi, Y., Okazaki, T., Nakachi, K., Fujita, T., Hayashi, S.: Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes, *Cancer Science*, **95**, 496-502, 2004
- 11) Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D.: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 14863-14868, 1998
- 12) 坂本宙子, 林 慎一: 三次元マイクロアレイ, *医学のあゆみ*, **218**, 741-742, 2006

Successive and Selective Release of Phosphorylated Peptides Captured by Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography

Yutaka Kyono,^{†,‡} Naoyuki Sugiyama,^{†,§} Koshi Imami,[†] Masaru Tomita,^{†,§} and Yasushi Ishihama^{*,†,||}

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0017, Japan, GL Sciences, Inc., 237-2 Sayamagahara, Iruna, Saitama 358-0032, Japan, Human Metabolome Technologies, Inc., Kakuganji, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan, and PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Sanbancho Bldg., 5-Sanbancho, Chiyodaku, Tokyo 102-0075, Japan

Received April 22, 2008

Abstract: We developed a novel approach to enlarge phosphoproteome coverage using successive elution of phosphopeptides with various buffers in series from a single microcolumn packed with hydroxy acid-modified metal oxides, such as titania and zirconia. Elution conditions were investigated to maximize the recovery of phosphopeptides from three standard phosphoproteins. Secondary amines, such as piperidine and pyrrolidine, provided better efficiency than the conventional conditions using ammonium hydroxide and phosphate buffers. Furthermore, elution with these secondary amines provided unique phosphopeptides that were not eluted under the conventional conditions in the analysis of HeLa cell lysates. On the basis of these results, we fractionated phosphopeptides captured by a single metal oxide microcolumn using successive elution with 5% ammonium hydroxide solution, 5% piperidine solution and 5% pyrrolidine solution in series. We identified 1803 nonredundant phosphopeptides from 100 μ g of HeLa cells, which represented a 1.6-fold increase in phosphopeptide number and a 1.9-fold increase in total peak area of phosphopeptides in comparison with the results obtained under the conventional conditions. Since this approach is applicable to any single tip-based protocol without coupling with other enrichment methods, this simple strategy can be easily incorporated as an option into existing protocols for phosphopeptide enrichment, and would be suitable for high-throughput analysis in a parallel format.

Keywords: phosphoproteome • hydroxy acid modified-metal oxide chromatography • phosphopeptide • pyrrolidine • piperidine • titania • zirconia

Introduction

Reversible phosphorylation of serine, threonine and tyrosine regulates a variety of biological processes, such as intercellular

communication, cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis.^{1,2} Characterization of phosphorylation status is therefore crucial for the elucidation of signal transduction pathways, as well as for an understanding of the mechanisms of disease and drug actions.

Recent advances in mass spectrometry-based proteomics coupled with phosphopeptide enrichment methods allow the simultaneous identification of thousands of phosphorylation sites.^{3–5} The most widely used approaches for phosphopeptide enrichment are immobilized metal affinity chromatography (IMAC)^{6–8} and metal oxide chromatography (MOC).^{9–16} In both cases, however, nonphosphorylated peptides containing multiple acidic residues bind to the chromatographic beads, disturbing the identification of phosphopeptides.⁷

Neutralizing the carboxyl groups by *O*-methyl esterification has been shown to enhance the specificity of phosphopeptide binding in IMAC,^{17,18} while optimized pH together with optimized organic solvent content provided improved results without *O*-methylation in IMAC.⁸ Alternatively, significant improvement was obtained in MOC with titania when benzoic acid derivatives such as 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and phthalic acid were used in the sample loading buffer to eliminate acidic nonphosphopeptides.¹⁹ Although these methods provide wider coverage of the phosphoproteome in combination with prefractionation based on SCX, SDS-PAGE and protein IMAC, it is necessary to combine two or more phosphopeptide enrichment methods for evaluation of proteome-wide phosphorylation, as different phosphopeptide enrichment methods are likely to have distinct preferences for particular properties of phosphopeptides.^{20,21}

Recently, we found that aliphatic hydroxy acids such as lactic acid and 3-hydroxypropanoic acid work more efficiently and more specifically than aromatic modifiers such as DHB and phthalic acid in titania and zirconia MOC.²² In this aliphatic hydroxy acid-modified MOC (HAMMOC) mode, no prefractionation was necessary, and more than 1000 unique phosphorylation sites were identified in highly complex cellular extracts from less than 100 μ g of nonstimulated HeLa cells.²³ This observation was recently confirmed by another group.²⁴ We also modified the physicochemical properties of titania beads by calcination at 800 °C and the resultant rutile-form titania showed a completely different preference for multiply phosphorylated and hydrophobic peptides.²⁵

* To whom correspondence should be addressed. Yasushi Ishihama, E-mail: y-ishi@rck.keio.ac.jp; phone, +81-235-29-0571; fax, +81-235-29-0536.

[†] Keio University.

[‡] GL Sciences, Inc.

[§] Human Metabolome Technologies, Inc.

^{||} PRESTO.

Table 1. Identification and Quantification of Phosphopeptides Captured by HAMMOC with Different Elution Conditions*

resin	elution buffer	conc. (%)	pH	no. of Identified Peptides (avg.)		relative peak area (%)		ratio (%)
				phosphopeptide	nonphosphopeptide	phosphopeptide	nonphosphopeptide	
Titania	ammonium hydroxide	0.5	11.4	9	1	100.0	0.7	99.3
		5.0	12.1	15	0	151.9	0.8	99.5
		10.0	12.6	12	2	101.4	4.8	95.5
	piperidine	0.5	11.9	14	4	120.3	6.0	95.2
		5.0	12.5	14	3	171.7	2.8	98.4
		10.0	12.8	17	3	139.0	6.3	95.6
	pyrrolidine	0.5	12.1	14	2	157.1	1.4	99.1
		5.0	12.9	14	2	182.3	2.7	98.5
		10.0	13.0	17	2	90.6	3.7	96.1
	piperazine	0.5	11.3	13	1	137.3	1.7	98.8
	methylamine	0.5	12.0	10	1	114.1	1.4	98.8
	dimethylamine	0.5	11.9	12	1	122.4	1.2	99.0
	trimethylamine	0.5	11.4	7	0	79.4	0.4	99.5
	triethylamine	0.5	11.9	14	3	92.0	4.7	95.2
	sodium hydroxide	0.5	12.1	4	0	20.7	0.0	100.0
disodium hydrogenphosphate	5.0	11.4	5	0	22.9	0.0	100.0	
Zirconia	ammonium hydroxide	0.5	11.4	9	3	100.0	0.7	99.3
		5.0	12.1	14	2	126.3	1.2	99.1
		10.0	12.6	17	8	108.2	21.5	83.4
	piperidine	0.5	11.9	13	3	159.4	2.1	98.7
		5.0	12.5	16	1	160.0	1.1	99.3
		10.0	12.8	17	5	102.2	6.6	93.9
	pyrrolidine	0.5	12.1	8	1	130.4	0.7	99.4
		5.0	12.9	14	2	225.2	3.9	98.3
		10.0	13.0	14	6	86.7	7.6	91.9
	piperazine	0.5	11.3	8	2	105.6	1.0	99.1
	methylamine	0.5	12.0	11	0	141.6	0.1	100.0
	dimethylamine	0.5	11.9	13	0	159.7	0.0	100.0
	trimethylamine	0.5	11.4	8	1	85.5	0.5	99.4
	triethylamine	0.5	11.9	13	5	96.4	10.6	90.1
	sodium hydroxide	0.5	12.1	10	0	65.4	0.0	100.0
disodium hydrogenphosphate	5.0	11.4	7	0	34.2	0.0	100.0	

*Tryptic digests of α -casein, fetuin and phosvitin (2.5 μ g each) were purified using titania and zirconia HAMMOC (triplicate analyses for each condition). The eluted fractions were analyzed by nanoLC-MS/MS using QSTAR. The total peak area obtained by 0.5% ammonium hydroxide elution was used as a control and the relative peak areas were calculated for other elution conditions.

During the above studies aimed at optimizing HAMMOC, we found that titania and zirconia have, in general, stronger affinity for phosphopeptides than does IMAC, and few phosphopeptides were observed in the flow-through fractions, but the recoveries of phosphopeptides varied from a few percent to 100%.²² It appears that phosphopeptides remain captured in metal oxide resins even after the elution steps.

A variety of reagents have been used to release phosphopeptides trapped by titania, such as sodium borate with sodium chloride,⁹ potassium phosphate,¹⁰ ammonium bicarbonate,^{11,19,26} ammonium bicarbonate with acetonitrile,²⁶ ammonium hydroxide,^{19,26} potassium phosphate with ammonium hydroxide,²⁷ the combination of ammonium bicarbonate, phosphate, orthovanadate, and fluoride,^{28,29} and triethylammonium bicarbonate followed by ammonium hydroxide.³⁰ However, only a limited number of phosphopeptides from standard phosphoproteins have been examined under these elution conditions, and to our knowledge, no group has compared elution conditions using complex samples such as cell lysates. It would, therefore, be difficult to extrapolate the elution conditions based on these small-scale experiments to large-scale phosphoproteome studies.

In this study, we examined various kinds of elution buffers in HAMMOC using phosphopeptides from not only standard phosphoproteins, but also complex cell lysates. On the basis of the results, we developed an approach based on successive

and selective elution to enlarge the phosphoproteome coverage by HAMMOC. In addition, we proposed a characterization method for elution selectivity, using seven descriptors based on the physicochemical properties of phosphopeptides identified by each enrichment method.

Experimental Procedures

Materials. Titania (titanium dioxide, particle size: 10 μ m) was obtained from GL Sciences (Tokyo, Japan). Zirconia (zirconium dioxide, particle size: 10 μ m) was from ZirChrom Separations (Anoka, MN). C2 and C18 Empore disks were from 3 M (St. Paul, MN). Bovine α -casein, bovine fetuin, chicken phosvitin, and PHOS-Select Iron affinity gel were from Sigma (St. Louis, MO). 3-Hydroxypropanoic acid (HPA) was obtained from Tokyo Kasei (Tokyo, Japan). Modified trypsin was from Promega (Madison, WI). MS-grade Lys-C, DL-lactic acid, and all other chemicals were purchased from Wako (Osaka, Japan). Water was obtained from a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA).

Preparation of Standard Phosphoprotein Mixtures. α -Casein, fetuin, and phosvitin were individually reduced with dithiothreitol (DTT), alkylated with iodoacetamide, and digested with Lys-C, followed by dilution and trypsin digestion, as described.³¹ These digested samples were desalted using StageTips with C18 Empore disk membranes.³² The eluates were mixed and the concentration was adjusted to 0.5 mg/mL for each protein with 0.1% TFA and 80% acetonitrile.

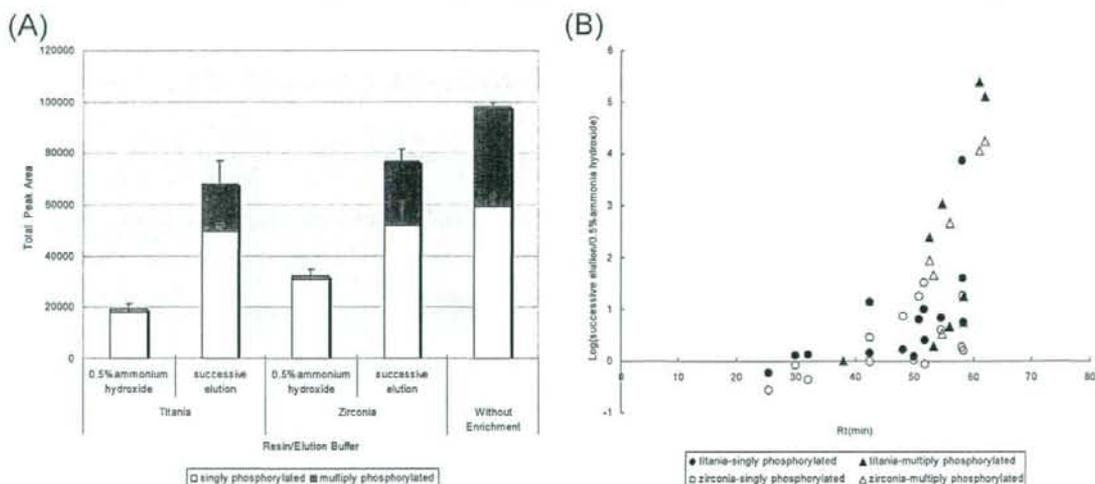


Figure 1. Successive elution of phosphopeptides from the standard phosphoprotein mixture. Tryptic digests of α -casein, fetuin and phosphovitin (2.5 μ g each) were purified using lactic acid-modified titania and HPA-modified zirconia HAMMOC tips. The bound phosphopeptides in HAMMOC tips were released by successive elution with three buffers, 5% ammonium hydroxide buffer, 5% piperidine buffer, and 5% pyrrolidine buffer, in series. (A) Total peak area of identified phosphopeptides. Averaged values based on triplicate analyses were used. (B) Dependence of peak area ratio between 0.5% ammonium hydroxide elution and the successive elution on the retention times in LC-MS analysis for 22 phosphopeptides identified by titania and zirconia HAMMOC. Closed circle, singly phosphorylated peptides by titania HAMMOC; closed triangle, multiply phosphorylated peptides by titania HAMMOC; open circle, singly phosphorylated peptides by zirconia HAMMOC; open triangle, multiply phosphorylated peptides by zirconia HAMMOC.

Preparation of HeLa Cell Cytoplasmic Fractions. HeLa cells were prepared as described previously.²² The cell pellet was dissolved in 100 mM Tris buffer (pH 8.0), and protein phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2 (Sigma) and protease inhibitors (Sigma) were added. After homogenization with a Dounce homogenizer (10 strokes), the resultant solution was centrifuged at 1500g for 10 min, and the supernatant was digested and desalted as shown above. The total protein concentration was adjusted to 1.0 mg/mL with 0.1% TFA and 80% acetonitrile.

Enrichment of Phosphopeptides from Standard Phosphoprotein Digests Using HAMMOC Tips. Phosphopeptide enrichment was performed according to the protocol described previously,²² except for the elution conditions. Briefly, C2-StageTips packed with metal oxide bulk beads (1 mg beads/10 μ L pipet tip) were equilibrated with 0.1% TFA and 80% acetonitrile including aliphatic hydroxy acids as selectivity chelating enhancers (solution A). As the chelating enhancers, lactic acid at the concentration of 300 mg/mL and HPA at 100 mg/mL were used for tips with titania and zirconia, respectively. A 15 μ L aliquot of the digested standard phosphoprotein solution was mixed with solution A, and loaded onto the HAMMOC tip, followed by successive washing with solution A and solution B (0.1% TFA in 80% acetonitrile). Various amines and other salts, such as ammonium hydroxide, methylamine, dimethylamine, trimethylamine, pyrrolidine, piperidine, piperazine, sodium hydroxide, and disodium hydrogen phosphate, at different pH values and concentrations were employed to elute the bound phosphopeptides. In the case of multiple elution, three elution solutions (5% ammonium hydroxide, 5% piperidine, and 5% pyrrolidine) were used successively in this order. Note that no organic solvent was added to these elution buffers. The fractions were immediately acidified, and were desalted using C18 StageTips.²³ A Tomy CC-105 vacuum

evaporator (Tokyo, Japan) was used to concentrate the sample. After dissolving the phosphopeptides with solution A, nanoLC-MS/MS analysis was performed.

Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). IMAC was performed according to the procedure described by Kokubu et al.,⁶ with some modifications as follows. PHOS-Select gel (IMAC-Fe³⁺ type, 30 μ L) was loaded onto a 200 μ L pipet tip packed with C2 Empore disk instead of C18 disk. Sample solutions in 0.1% TFA and 80% acetonitrile were diluted 5 times with Milli-Q water and then loaded onto the IMAC/C2 tips. The tips were washed with 0.3% TFA; then, 50% acetonitrile and 0.5% ammonium hydroxide were used for eluting bound phosphopeptides. The fractions were worked up for nanoLC-MS/MS analysis as described above.

NanoLC-MS System. NanoLC-MS/MS analyses were conducted using a QSTAR XL mass spectrometer (AB/MDS-Sciex, Toronto, Canada) equipped with an Agilent 1100 nanoflow pump (Waldbron, Germany) and an HTC-PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland), or an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a Dionex Ultimate3000 pump (Germering, Germany) and the HTC-PAL autosampler. ReproSil C18 materials (3 μ m, Dr. Maich, Ammerbuch, Germany) were packed into a self-pulled needle (150 mm length \times 100 μ m i.d., 6 μ m opening) with a nitrogen-pressurized column loader cell (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) to prepare an analytical column needle with "stone-arch" frit.³³ The injection volume was 5 μ L and the flow rate was 500 nL/min. The mobile phases consisted of (A) 0.5% acetic acid and (B) 0.5% acetic acid in 80% acetonitrile. Two gradient conditions were employed, that is, 5–30% B in 20 min, 30–100% B in 5 min and 100% B for 10 min for the standard phosphoprotein digests, and 5–10% B in 5 min, 10–40% B in 60 min, 40–100% B in 5 min and 100% B

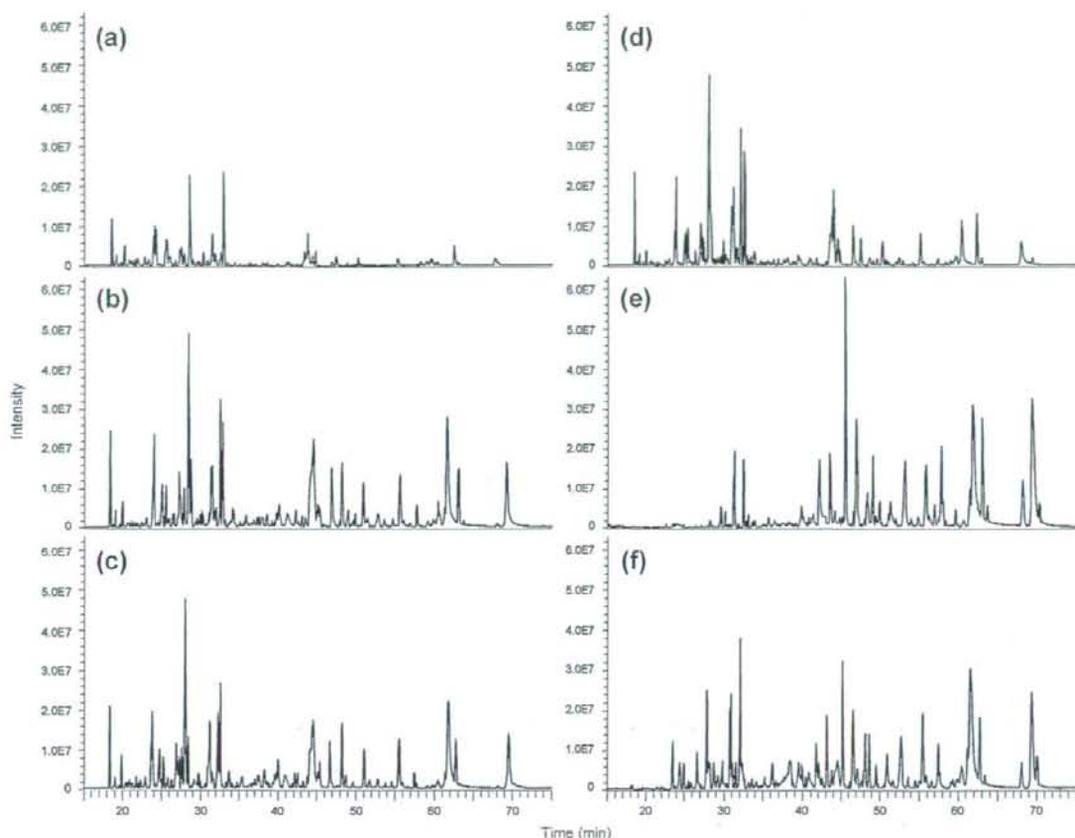


Figure 2. Comparison of base peak chromatograms of HeLa cell extract, obtained by titania-HAMMOC under six different elution conditions. Elution with (a) 0.5% ammonium hydroxide, (b) 0.5% piperidine, (c) 0.5% pyrrolidine, (d) 5% ammonium hydroxide, (e) 5% piperidine, and (f) 5% pyrrolidine. The elution procedures as well as LC-MS conditions are described in the Experimental Procedures.

Table 2. Overlap Analysis between Phosphopeptides in HeLa Cell Lysates Obtained by Titania HAMMOC with Six Different Elution Conditions*

	0.5% ammonium hydroxide	0.5% piperidine	0.5% pyrrolidine	5% ammonium hydroxide	5% piperidine	5% pyrrolidine
0.5% ammonium hydroxide	100	38.4	39.0	43.5	10.8	21.0
0.5% piperidine	38.4	100	48.8	49.0	23.9	35.9
0.5% pyrrolidine	39.0	48.8	100	48.0	17.0	29.8
5% ammonium hydroxide	43.5	49.0	48.0	100	19.1	30.0
5% piperidine	10.8	23.9	17.0	19.1	100	36.9
5% pyrrolidine	21.0	35.9	29.8	30.0	36.9	100

* The overlap percentages between systems A and B were calculated using the following equation: $Overlap(\%) = (A \cap B / A \cup B) \times 100$.

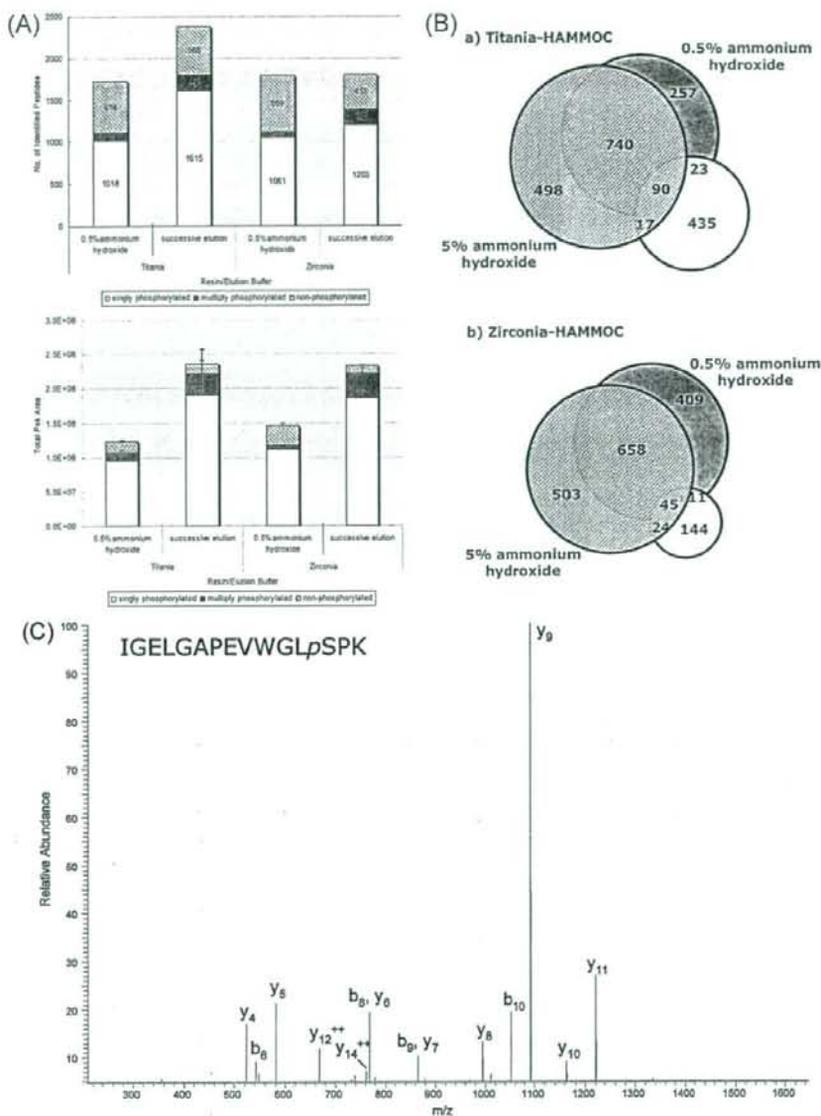


Figure 3. Successive elution of phosphopeptides from HeLa cell lysates in HAMMOC. (A) Comparison of the number of identified peptides and total peak area upon 0.5% ammonium hydroxide elution with that upon successive elution in titania and zirconia HAMMOC. Triplicate analyses were carried out and the merged results were described for the peptide number, whereas averaged values were employed for the peak area. (B) Venn diagrams showing the numbers of identified phosphopeptides obtained by 0.5% ammonium hydroxide elution and the successive elution. The eluates were separately collected and analyzed by LC-MS in the successive elution mode. (C) Example of an MS/MS spectrum assigned to IGE LGAPEVWGLpSPK from NF- κ B-activating protein (NKAP_HUMAN). The precursor ion (m/z 816.903539, 2+) was isolated at 57.7 min and fragmented by collision-induced dissociation (CID) in the linear ion trap. Fragment ions containing the N-(b-type ions) or C-(y-type ions) terminus are labeled. The ion score of 70 was obtained for this spectrum.

for 10 min for the HeLa lysates. A spray voltage of 2400 V was applied. The MS scan range was m/z 350–1400 (QSTAR) or 300–1500 (LTQ-Orbitrap). For QSTAR experiments, MS scans were performed for 1 s to select three intense peaks, and subsequently three MS/MS scans were performed for 0.55 s each. An information-dependent acquisition function was activated for 2 min to exclude the previously scanned parent

ions. The CID energy was automatically adjusted by rolling CID function. For LTQ-Orbitrap, the top 10 precursor ions were selected in MS scan by Orbitrap with $R = 60\,000$ for subsequent MS/MS scans by ion trap in the automated gain control (AGC) mode where AGC values of 5.00×10^5 and 1.00×10^4 were set for full MS and MS/MS, respectively. The normalized CID was set to be 35.0.

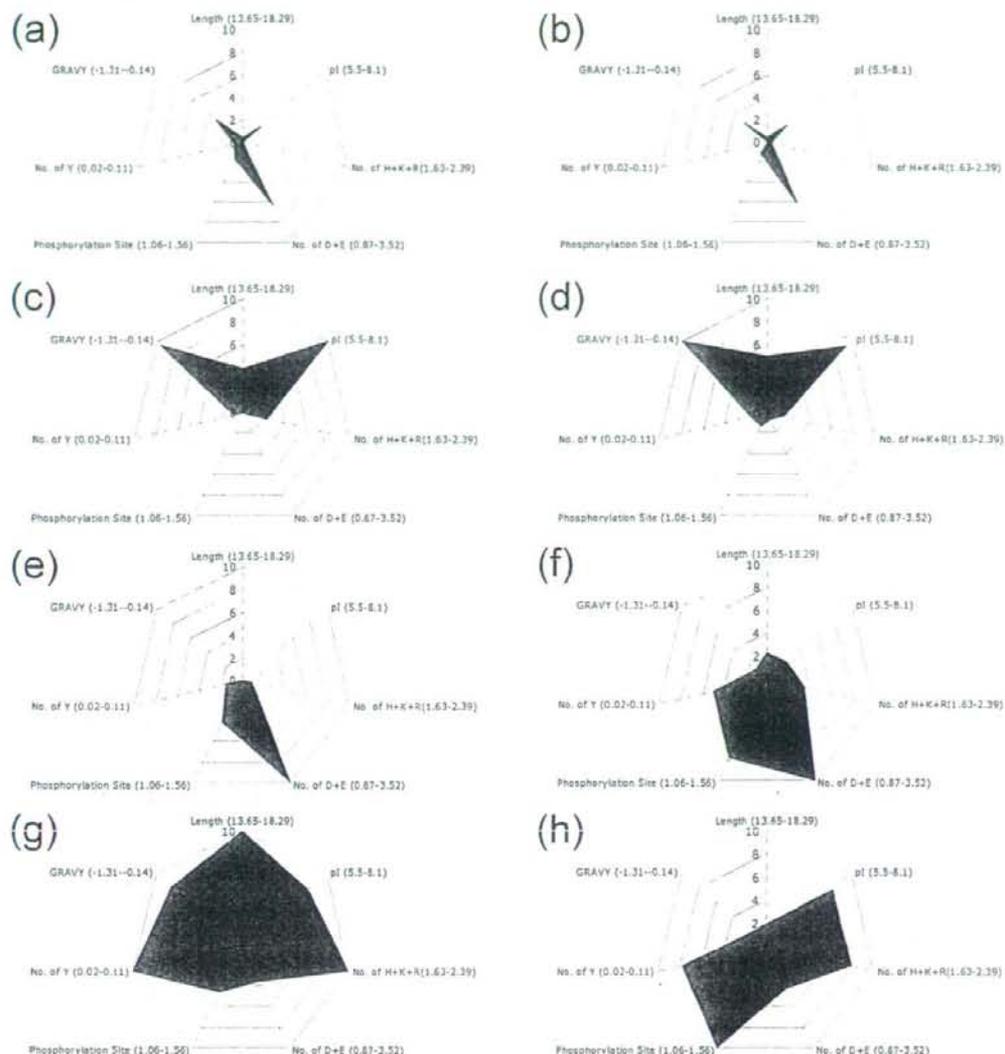


Figure 4. Heptagonal radar graphs for characterization of eight different enrichment methods using phosphopeptides exclusively obtained by each method: (a) titania with ammonia hydroxide elution, (b) zirconia with ammonium hydroxide elution, (c) titania with piperidine and pyrrolidine elution, (d) zirconia with piperidine and pyrrolidine elution, (e) titania with phosphate elution, (f) zirconia with phosphate elution, (g) rutile titania with ammonium hydroxide elution, and (h) IMAC with ammonium hydroxide elution. The descriptors are the length of peptide expressed in terms of the number of amino acid residues (length), the isoelectric points of peptides (pI), the total number of histidine, lysine, and arginine residues per peptide (No. of H+K+R), the number of aspartic acid and glutamic acid residues per peptide (No. of D+E), the averaged number of phosphorylation sites per peptide (phosphorylation site), the averaged number of phosphotyrosine residues per peptide (No. of Y) and the GRAVY score³⁷ indicating the hydrophobicity of peptides (GRAVY). The maximum and minimum values of each descriptor are shown on each axis. The data set used for this calculation corresponds to the shaded parts of the Venn diagrams shown in Supplemental Figure 5 in Supporting Information.

Database Searching. Mass Navigator v1.2 (Mitsui Knowledge Industry, Tokyo, Japan) was used to create peak lists on the basis of the recorded fragmentation spectra. Peptides and proteins were identified by means of automated database searching using Mascot v2.1 (Matrix Science, London) against UniProt/Swiss-Prot release 54.8 (24-Jan-2008) with a precursor mass tolerance of 0.25 Da (QSTAR) or 3 ppm (LTQ-Orbitrap), a fragment ion mass tolerance of 0.25 Da (QSTAR) or 0.8 Da

(LTQ-Orbitrap) and strict trypsin specificity³⁴ allowing for up to 2 missed cleavages. Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification, and methionine oxidation and phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine were allowed as variable modifications.

Peptides were considered identified if the Mascot score was over the 95% confidence limit based on the 'identity' score of each peptide and at least three successive y- or b-ions with

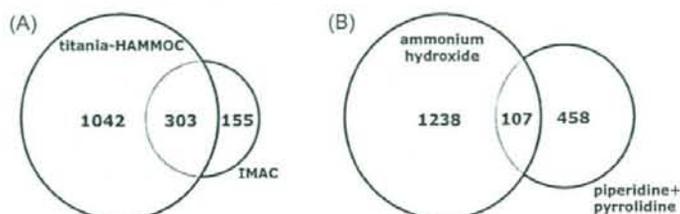


Figure 5. The numbers of identified phosphopeptides obtained (A) by the combination of IMAC with titania-HAMMOC and (B) by the successive elution method with titania HAMMOC. HeLa cell lysates (100 μ g) were examined with each method (IMAC, titania HAMMOC with 5% ammonium hydroxide, and titania HAMMOC with successive elution). Triplicate analyses was performed for each method and the obtained results were merged.

two and more y -, b - and/or precursor-origin neutral loss ions were observed, based on an error-tolerant peptide sequence tag concept.³⁵ A randomized decoy database created by a Mascot Perl program was employed to estimate the false-positive rate for identified peptides within these criteria. Note that most sulfated peptides can be discriminated from phosphopeptides because of the ultrahigh accuracy of the Orbitrap instrument that we used.³⁶

Phosphorylated sites were unambiguously determined when y - or b -ions between which the phosphorylated residue exists were observed in the peak lists of the fragment ions. This step was automatically performed using an in-house Perl script 'PhosPep Analyzer' by comparing the original peak lists with the theoretical m/z values of y - or b -ions from Mascot output files.

The total peak area of phosphopeptides and nonphosphopeptides were calculated using the nonlabel quantitation function of Mass Navigator.

Results and Discussion

First, we investigated the influence of various alkaline buffers (pH 11–13) on the elution of phosphopeptides in the standard phosphoprotein mixture. The results obtained with 0.5% ammonium hydroxide elution, which has been used in our standard protocol^{22,23} as well as by others,¹⁹ were used as a control, and the relative peak areas were calculated for other elution buffers. We used 8 different amines: ammonium hydroxide, piperidine, pyrrolidine, piperazine, methylamine, dimethylamine, trimethylamine and triethylamine. The obtained results are summarized in Table 1. Pyrrolidine gave the best results in titania HAMMOC, whereas piperidine and dimethylamine were superior to others in zirconia HAMMOC. Kweon et al. also reported that 0.5% piperidine gave better results than ammonium hydroxide buffers in zirconia chromatography.¹⁵ These results suggested that secondary monoamines generally gave better results than other amines, and no clear pH dependence was observed. To confirm the pH effect, we also examined sodium hydroxide (pH 12.1) and disodium hydrogen phosphate (pH 11.4) and found that elution with both buffers resulted in lower recovery in both titania and zirconia HAMMOC, indicating the pH of the elution buffer is not the primary factor that controls the recovery. Next, we increased the concentration of piperidine, pyrrolidine and ammonium hydroxide. The maximum recovery was obtained with 5% elution buffers; an increase to 10% did not yield further improvement in any of these cases. Regarding multiply phosphorylated peptides, the content generally increased as the recovery increased (Supplemental Figure 1 in Supporting

Information). Interestingly, we found that the peak profiles of total ion current (TIC) chromatograms of the eluates with 0.5–10% ammonium hydroxide were similar to those of the eluates with 0.5% piperidine and 0.5% pyrrolidine, while 5% piperidine and pyrrolidine elution gave different peak profiles in TIC from those in the case of 5% ammonium hydroxide elution (Supplemental Figure 2 in Supporting Information). Therefore, to maximize the recovery of each phosphopeptide, we eluted these phosphopeptides using successive loading with the three buffers, 5% ammonium hydroxide, 5% piperidine, and 5% pyrrolidine, in series. The results are shown in Figure 1. Both in titania and zirconia HAMMOC, this successive elution approach significantly improved the recovery, especially for hydrophobic phosphopeptides and multiply phosphorylated peptides. Since this phosphoprotein mixture contains only a small number of phosphopeptides, we applied this approach to the more complex HeLa cell lysate. To address the characteristics of phosphopeptides eluted under each condition, elution buffers such as ammonium hydroxide, piperidine and pyrrolidine buffers at 0.5% and 5% concentrations were individually examined. As observed in the standard phosphoprotein mixture, 5% piperidine and 5% pyrrolidine provided different peak profiles in their base peak chromatograms (BPCs) from other conditions in titania HAMMOC (Figure 2). This was confirmed by overlap analysis as summarized in Table 2; that is, the overlaps between 0.5% ammonium hydroxide, 5% ammonium hydroxide, 0.5% piperidine and 0.5% pyrrolidine were in the range of 38–49%, whereas the overlaps between 5% piperidine and the other four buffers (except 5% pyrrolidine buffer) were in the range of 11–24% and the overlaps between 5% pyrrolidine and the other four buffers (except 5% piperidine buffer) were in the range of 21–36%. These results showed that 5% piperidine and 5% pyrrolidine each gave a unique selectivity in phosphopeptide identification. On the other hand, similar profiles were obtained for all elution buffers in zirconia HAMMOC, though the averaged peak intensities were different (see Supplemental Figure 3 and Supplemental Table 1 in Supporting Information).

To maximize coverage of the phosphoproteome by titania HAMMOC, we examined the fractionation obtained with successive loading of different elution buffers onto a single titania tip. On the basis of the results in Table 2, we selected 5% ammonium hydroxide, 5% piperidine and 5% pyrrolidine for phosphopeptide fractionation. Because the peptide content in the second and third fractions were expected to be relatively smaller than in the first fraction, these fractions were combined. In total, 1803 unique phosphopeptides were successfully identified by this fractionation approach and the gain from use

of the combined fraction was more than 450 peptides in titania HAMMOC, whereas 1385 phosphopeptides were identified in total and only 155 phosphopeptides were uniquely identified in the combined fraction in zirconia HAMMOC (Figure 3, Supplemental Table 2 in Supporting Information) with the false-positive rate of 1.15% for merged LC-MS results. We also confirmed that replicate elution with 5% ammonium hydroxide did not provide a significant gain in the second fractions (Supplemental Figure 4 in Supporting Information), indicating that the elution with 5% piperidine and 5% pyrrolidine provided phosphopeptides that were not eluted with 5% ammonium hydroxide. Although phosphopeptide enrichment approaches reported so far are generally complementary, it is important to understand the difference between each method quantitatively in order to maximize the phosphoproteome coverage with minimum effort. We selected 7 different properties to describe the characteristics of each method, as shown in Figure 4. The heptagonal radar graphs indicate that phosphopeptides uniquely identified by 5% piperidine–5% pyrrolidine elution are more hydrophobic and less acidic in both titania and zirconia HAMMOC than those in the case of 0.5% ammonium hydroxide elution, whereas other properties, including the length of peptides, are almost identical with those in the case of 0.5% ammonium hydroxide elution. Phosphopeptides exclusively eluted with the phosphate buffer have more acidic and more hydrophilic properties. Interestingly, we did not find any distinct difference between titania and zirconia HAMMOC under the three different elution conditions, except that the recoveries were quite different, especially for piperidine–pyrrolidine buffers. Nevertheless, the combination of titania and zirconia HAMMOC resulted in wider coverage than replicate analysis using either HAMMOC alone.^{22,23} Similar profiles were observed for the rutile form of titania and IMAC, where more basic, less acidic, and more phosphorylated peptides were observed. The unique features of rutile-titania are that longer and more hydrophobic peptides can be identified. The problem with this system arises from contamination with nonphosphopeptides, although direct coupling with LC-MS systems was possible because no modifiers are needed in rutile-titania chromatography.²⁵ For IMAC, as reported by other groups,^{20,21,27} more phosphorylated peptides were observed and this would seem to be the most suitable system for complementary usage with titania or zirconia HAMMOC. However, the overlap between IMAC and titania-HAMMOC–5% ammonium hydroxide elution was larger than that between titania HAMMOC with 5% ammonium hydroxide and titania HAMMOC with 5% piperidine–5% pyrrolidine (Figure 5). In addition, the gain by IMAC was smaller than that by titania-HAMMOC with 5% piperidine–5% pyrrolidine. Although the unique feature of IMAC is still complementarity to titania-HAMMOC, the first choice to enlarge the extent of phosphoproteome identification was to use another elution condition (5% piperidine–5% pyrrolidine) in titania HAMMOC, rather than the recently reported SIMAC strategy, where IMAC was used as a first filter to capture multiply phosphorylated peptides and the flow-through fraction was loaded onto titania.²¹ Since our approach based on successive and selective elution allows flexible addition of other elution buffers with different selectivity, or changing the combination of elution buffers and the elution order, this simple strategy could be easily incorporated into existing protocols for phosphopeptide enrichment as an option, and would be suitable for high-throughput analysis in a parallel format.

Data Availability. All MSMS spectra are available free in Keio Univ. Peptide database (<http://peptide.iab.keio.ac.jp/phospho/jpr>).

Acknowledgment. We thank Sumiko Ohnuma and Yasuyuki Igarashi for their technical assistance. This work was partly supported by research funds from Yamagata Prefecture and Tsuruoka City.

Supporting Information Available: Tables of overlap analysis between phosphopeptides in HeLa cell lysates obtained with zirconia-HAMMOC and lists of identified phosphopeptides by titania and zirconia HAMMOC for HeLa cells. Figures of phosphorylation distribution of phosphopeptides captured by HAMMOC with different elution conditions, comparison of total ion current chromatograms obtained with titania-HAMMOC of the tryptic digests of phosphoprotein mixture under three conditions, comparison of base peak chromatograms obtained by zirconia-HAMMOC of the HeLa cell extract under six different elution conditions, duplicate elution of phosphopeptides from the HeLa cell lysates in HAMMOC with 5% ammonium hydroxide, and the data sets used for calculation of the heptagonal radar graphs. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Hunter, T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000, 100 (1), 113–27.
- Blume-Jensen, P.; Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001, 411 (6835), 355–65.
- Beausoleil, S. A.; Jedrychowski, M.; Schwartz, D.; Elias, J. E.; Villen, J.; Li, J.; Cohn, M. A.; Cantley, L. C.; Gygi, S. P. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101 (33), 12130–5.
- Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnani, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 2006, 127 (3), 635–48.
- Chi, A.; Huttenhower, C.; Geer, L. Y.; Coon, J. J.; Syka, J. E.; Bai, D. L.; Shabanowitz, J.; Burke, D. J.; Troyanskaya, O. G.; Hunt, D. F. Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104 (7), 2193–8.
- Stensballe, A.; Andersen, S.; Jensen, O. N. Characterization of phosphoproteins from electrophoretic gels by nanoscale Fe(III) affinity chromatography with off-line mass spectrometry analysis. *Proteomics* 2001, 1 (2), 207–22.
- Haydon, C. E.; Evers, P. A.; Aveline-Wolf, L. D.; Resing, K. A.; Maller, J. L.; Ahn, N. G. Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* 2003, 2 (10), 1055–67.
- Kokubu, M.; Ishihama, Y.; Sato, T.; Nagasu, T.; Oda, Y. Specificity of immobilized metal affinity-based IMAC/C18 tip enrichment of phosphopeptides for protein phosphorylation analysis. *Anal. Chem.* 2005, 77 (16), 5144–54.
- Ikeguchi, Y.; Nakamura, H. Determination of organic phosphates by column-switching high performance anion-exchange chromatography using on-line preconcentration on titania. *Anal. Sci.* 1997, 13 (6), 479–483.
- Kuroda, I.; Shintani, Y.; Motokawa, M.; Abe, S.; Furuno, M. Phosphopeptide-selective column-switching RP-HPLC with a titania precolumn. *Anal. Sci.* 2004, 20 (9), 1313–9.
- Pinkse, M. W.; Uitto, P. M.; Hilhorst, M. J.; Ooms, B.; Heck, A. J. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal. Chem.* 2004, 76 (14), 3935–43.
- Sano, A.; Nakamura, H. Chemo-affinity of titania for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides. *Anal. Sci.* 2004, 20 (3), 565–6.
- Sano, A.; Nakamura, H. Titania as a chemo-affinity support for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides: application to the characterization of phosphorylation sites in proteins by combination with protease digestion and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* 2004, 20 (5), 861–4.
- Wolschin, F.; Wienkoop, S.; Weckwerth, W. Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using

- metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC). *Proteomics* 2005, 5 (17), 4389–97.
- (15) Kweon, H. K.; Hakansson, K. Selective zirconium dioxide-based enrichment of phosphorylated peptides for mass spectrometric analysis. *Anal. Chem.* 2006, 78 (6), 1743–9.
- (16) Ishihama, Y.; Mann, M. Development of nanoLC-MS/MS systems for proteomics. *Chromatography* 2003, 24 (Suppl.1), 12–3.
- (17) Ficarro, S. B.; McClelland, M. L.; Stukenberg, P. T.; Burke, D. J.; Ross, M. M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; White, F. M. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20 (3), 301–5.
- (18) Ndassa, Y. M.; Orsi, C.; Marto, J. A.; Chen, S.; Ross, M. M. Improved immobilized metal affinity chromatography for large-scale phosphoproteomics applications. *J. Proteome Res.* 2006, 5 (10), 2789–99.
- (19) Larsen, M. R.; Thingholm, T. E.; Jensen, O. N.; Roepstorff, P.; Jorgensen, T. J. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4 (7), 873–86.
- (20) Bodenmiller, B.; Mueller, L. N.; Mueller, M.; Domon, B.; Aebersold, R. Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. *Nat. Methods* 2007, 4 (3), 231–7.
- (21) Thingholm, T. E.; Jensen, O. N.; Robinson, P. J.; Larsen, M. R. SIMAC (Sequential Elution from IMAC), a phosphoproteomic strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol. Cell. Proteomics* 2008, 7, 661–71.
- (22) Sugiyama, N.; Masuda, T.; Shinoda, K.; Nakamura, A.; Tomita, M.; Ishihama, Y. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6 (6), 1103–9.
- (23) Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protocols* 2007, 2 (8), 1896–1906.
- (24) Jensen, S. S.; Larsen, M. R. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21 (22), 3635–45.
- (25) Imami, K.; Sugiyama, N.; Kyono, Y.; Tomita, M.; Ishihama, Y. Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. *Anal. Sci.* 2008, 24 (1), 161–6.
- (26) Cantin, G. T.; Shock, T. R.; Park, S. K.; Madhani, H. D.; Yates, J. R. 3rd, Optimizing TiO₂-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007, 79 (12), 4666–73.
- (27) Wilson-Grady, J. T.; Villen, J.; Gygi, S. P. Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J. Proteome Res.* 2008, 7 (3), 1088–97.
- (28) Mohammed, S.; Kraiczek, K.; Pinkse, M. W.; Lemeer, S.; Benschop, J. J.; Heck, A. J. Chip-based enrichment and nanoLC-MS/MS analysis of phosphopeptides from whole lysates. *J. Proteome Res.* 2008, 7 (2), 687–97.
- (29) Pinkse, M. W.; Mohammed, S.; Gouw, J. W.; van Breukelen, B.; Vos, H. R.; Heck, A. J. Highly robust, automated, and sensitive online TiO₂-based phosphoproteomics applied to study endogenous phosphorylation in *Drosophila melanogaster*. *J. Proteome Res.* 2008, 7 (2), 687–97.
- (30) Simon, E. S.; Young, M.; Chan, A.; Bao, Z. Q.; Andrews, P. C. Improved enrichment strategies for phosphorylated peptides on titanium dioxide using methyl esterification and pH gradient elution. *Anal. Biochem.* 2008, 377, 234–42.
- (31) Saito, H.; Oda, Y.; Sato, T.; Kuromitsu, I.; Ishihama, Y. Multiplexed two-dimensional liquid chromatography for MALDI and nano-electrospray ionization mass spectrometry in proteomics. *J. Proteome Res.* 2006, 5 (7), 1803–7.
- (32) Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nano-electrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* 2003, 75 (3), 663–70.
- (33) Ishihama, Y.; Rappsilber, J.; Andersen, J. S.; Mann, M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J. Chromatogr., A* 2002, 979 (1–2), 233–9.
- (34) Olsen, J. V.; Ong, S. E.; Mann, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* 2004, 3 (6), 608–14.
- (35) Mann, M.; Wilm, M. Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal. Chem.* 1994, 66 (24), 4390–9.
- (36) Bossio, R. E.; Marshall, A. G. Baseline resolution of isobaric phosphorylated and sulfated peptides and nucleotides by electrospray ionization FTICR ms: another step toward mass spectrometry-based proteomics. *Anal. Chem.* 2002, 74 (7), 1674–9.
- (37) Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982, 157 (1), 105–32.

PR800305Y

Pharma VISION NEWS

No. 12
(Nov. 2008)

Index

◆ 巻頭言 薬学研究ビジョン部会の活動をふり返って	鈴木 洋史 (東京大学医学部附属病院薬剤部)	1
◆ 薬学研究最前線 (1) Beyond Antibody という研究領域 杉村 和久、吉永 圭介、久保田 俊也、北本 祥、横口 周平 (鹿児島大学工学部)		2
(2) アルツハイマー病治療薬開発の最前線 -Development of therapeutics for Alzheimer's disease; an update- 富田 泰輔 (東京大学大学院薬学系研究科 臨床薬学教室)		8
(3) 医薬品・化粧品におけるナノマテリアルの安全評価 吉岡 靖雄 ¹ 、吉川 友章 ^{2,3} 、角田 慎一 ³ (1, 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター) (2, 大阪大学大学院薬学系研究科 付属創薬教育センター) (3, (独)医療基盤研究所 基盤的研究部 創薬プロテオミクスプロジェクト)		14
(4) 「ヒト胎児肝細胞におけるCYP3A発現変動とES細胞研究」 松永 民秀、大森 栄 (信州大学医学部附属病院)		19
(5) メディシナルケミストから見たFragment-Based Drug Discovery 田中 大輔 (大日本住友製薬株式会社 化学研究所)		24
(6) シグナル伝達プロテオームの最前線 石濱 泰 ^{1,2} 、杉山 直幸 ^{1,3} (1, 慶應義塾大学先端生命科学研究所) (2, (独)科学技術振興機構) (3, ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社)		29
◆ 薬学研究ビジョン部会からのお知らせ		35
◆ 編集後記	長瀬 博 (北里大学薬学部)	36



薬学研究最前線

シグナル伝達プロテオームの最前線

石濱 泰^{1,2}、杉山 直幸^{1,3} (1慶應大・先端生命研、²JST さきがけ、³HMT)

1. はじめに

近年、質量分析計 (MS) およびその周辺技術の急速な高性能化により、プロテオミクスはめざましい発展を見せている。最新の分析装置を用いれば、例えば、ヒト由来培養細胞で 1 μ g 程度の試料量があれば、約 2 時間の LC-MS 測定で、千種前後のタンパク質を恒常的に同定することができる。更に前分画法と組み合わせることにより、数千から一万タンパク質の網羅的発現解析を比較的簡単に行うことができるようになってきた。しかし、ゲノム配列解析や DNA マイクロアレイ測定との「網羅性」と比較すると依然としてプロテオミクスでカバーできる測定対象範囲は限られており、特に翻訳後修飾や細胞内局在、タンパク質相互作用なども含めたタンパク質の網羅的解析となると、上述のタンパク質発現解析のようにはいかないため、何らかの方法で選択的にタンパク質を濃縮あるいは分画して試料の複雑性やダイナミックレンジの幅を軽減してから、LC-MS 測定を行う必要がある。一方で、これら翻訳後修飾などの情報はプロテオミクスでのみ取得できるものであり、この分野の研究者は必要な技術開発を続けながらこれらの研究課題に取り組んでいる。筆者らは、中でも翻訳後修飾の最も一般的な修飾の一つであるタンパク質リン酸化に注目し、その網羅的解析のための技術開発を中心に研究を進めてきた。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おり、リン酸化によりそのタンパク質の機能制御が行われている例も多い。特に細胞内シグナル伝達ネットワークにおいては、タンパク質キナーゼとその基質分子が中心的な役割を果たしている。増殖に関わるシグナル分子 (タンパク質) が oncogene 産物であることがわかってきた 80 年代前半から多くの研究が行われ、様々な実験技術の発展とともに現在でも世界中で精力的に研究が行われている。今世紀に入ってから分子標的薬といわれるシグナル分子キナーゼを標的とした阻害剤も

次々と上市され、抗癌剤を用いた治療にも大きな変化が起きている。しかし、細胞内シグナル伝達ネットワークは非常に複雑な制御システムを有しており、まだまだ多くの未知の部分が残されている。今日の分子標的薬の問題点である副作用や薬効の個人差といった原因のひとつには、この細胞内シグナル伝達ネットワークの複雑さが関与していると考えられる。このような複雑なネットワークを理解するには、個々の構成分子を一つひとつ調べていくのではなく、ネットワーク全体を一度に俯瞰できる方法が必須であり、プロテオミクスはまさにこれに適した方法であるといえる。

以下、筆者らが行ってきたプロテオミクスの手法を用いた網羅的タンパク質リン酸化解析法の開発について紹介する。また、この方法で得られた結果に基づいて、シグナル分子であるキナーゼとその基質の全体像や分子標的薬の評価システムとしての可能性についても述べる。

2. リン酸化ペプチド濃縮

MS を用いたプロテオミクスでは、タンパク質のままでは感度の点で不利であり、アミノ酸配列情報も取得できないため、トリプシンなどのプロテアーゼを用いてペプチドに切断してから MS 測定を行う。二次元電気泳動などのタンパク質レベルでの分離法を用いないショットガンプロテオミクスでは、複雑なタンパク質混合物のトリプシン消化物を、マイクロ化して感度を向上させたナノ LC とオンライン接続したタンデム MS (nanoLC-MS/MS) で直接測定する。このため、例えばヒト細胞試料の場合、その測定対象分子種数は優に 300 万を越え、そのダイナミックレンジは 10^6 以上となる¹。リン酸化部位を含むペプチド (リン酸化ペプチド) は、このままの状態では大量に含まれる非リン酸化ペプチドに完全にマスクされてしまい、まったく検出されない。したがって、トリプシン切断後に選択的にリン酸化

ペプチドのみを濃縮することが必須となる(図1)。

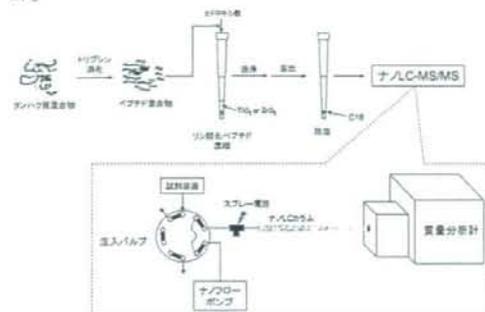


図1 HAMMOC法を用いたリン酸化プロテオミクス測定システム

リン酸化チロシン含有ペプチドの場合には、リン酸化チロシン抗体による濃縮が可能であるが、全リン酸化ペプチドの90%以上を占めると考えられるリン酸化セリン、リン酸化スレオニンに対する特異性の高い抗体は今のところ存在しない。現在最も一般的なのは、リン酸基と鉄(III)・ガリウム(III)などの金属イオンとの親和性を利用した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(immobilized metal affinity chromatography, IMAC) またはチタニア、ジルコニアなどの酸化金属との親和性を利用した酸化金属クロマトグラフィー(metal oxide chromatography, MOC)を用いるものである。これらの化学的親和性を利用する方法は、リン酸化チロシン抗体ほどの特異性はないため、細胞全抽出物由来のペプチド混合物からリン酸化ペプチドを濃縮してくる際に必ず混入してくる非リン酸化ペプチドを除去する工夫が必要となる。この非リン酸化ペプチドは主として酸性ペプチドであり、親和性はリン酸化ペプチドよりは小さいが試料溶液中に大量に存在するために、結果としてリン酸化ペプチド濃縮の選択性を下げる原因となっていた。IMACでは、カルボン酸をメチルエステル化したり²、pHを最適化してリン酸基をイオン化させたままカルボン酸のみを中性化することにより、非リン酸化ペプチドのIMAC樹脂に対する親和性を弱める試みが行われたが³、エステル化反応の反応率がばらついたり、リン酸基とカルボン酸基のpKa値がペプチドによって異なり、リン酸化ペプチド

濃縮の選択性を大きく改善することは難しかった。そこで、タンデムMS内で、リン酸基特異的に生じるニュートラルロス反応を利用してリン酸化ペプチドに対する検出の選択性を上げたり⁴、ホスファターゼによる脱リン酸化反応を利用して、検索対象タンパク質範囲を限定させる必要があった⁵。一方、チタニアを用いたMOCでは、最初のリン酸化ペプチド濃縮に関する報告以来⁶、筆者らも含めていくつかのグループが、カゼインなどのリン酸化タンパク質の標準消化試料についてリン酸化ペプチドの濃縮が可能であることを示したが、細胞抽出物のような複雑な試料についての適用例の報告はなかった⁷⁻⁹。数年前、Larsenらは、2,5-ジヒドロキシ安息香酸やフタル酸といった芳香族カルボン酸を試料溶液中に共存させておくことにより、チタニアMOCにおけるリン酸化ペプチドの濃縮選択性が向上することを報告した¹⁰。しかし、これらの芳香族カルボン酸は、ペプチドと逆相クロマトグラフィーにおける保持時間が重なり、LC-MS測定の大きな障害となっていた。また、細胞抽出物の消化ペプチド混合物から直接リン酸化ペプチドを濃縮するには、その選択性は不十分であった。一方、谷らは、乳酸などのアリファティックなヒドロキシ酸がチタニアやジルコニアと安定な五員環キレート形成し、強く保持されることを報告していた¹¹。筆者らはこれに注目し、これらの親水性ヒドロキシ酸の酸化金属に対する親和性がリン酸基より弱く、酸性ペプチド中のカルボン酸や上記の芳香族カルボン酸よりも強ければ、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直接濃縮できると考えた。また、ヒドロキシ酸は十分に親水性であり、LC-MS測定前に通常の脱塩処理で除去可能であることから、LC-MS測定に及ぼす影響も最小限にできると考えた。数種の親水性ヒドロキシ酸をスクリーニングしたところ、(図2)に示すように、チタニアには乳酸が、ジルコニアには3-ヒドロキシプロピオン酸が修飾剤として最適の親和性を有しており、従来の芳香族カルボン酸を共存させたチタニアMOCやIMAC法よりも高い選択性でリン酸化ペプチドを濃縮できることがわかった¹²。

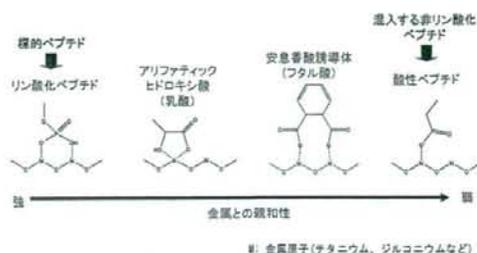


図2 酸化金属担体とペプチドおよびヒドロキシ酸の推定相互作用様式

これらの方法は、世界で初めての細胞抽出物からリン酸化ペプチドを直接大量に濃縮できる方法であり、HAMMOC法(Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography)と名づけた。(図3)は細胞全抽出物からのリン酸化ペプチド直接濃縮について、各方法を比較したものである。

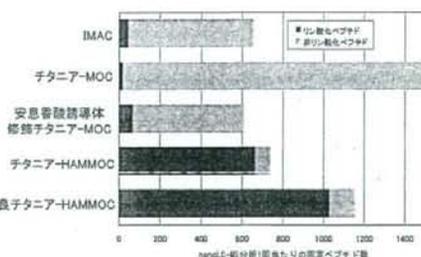


図3 HeLa細胞からのリン酸化ペプチドの濃縮
試料: 50 μ g HeLa細胞抽出物

乳酸修飾チタニアや3-ヒドロキシプロピオン酸修飾ジルコニアを用いたHAMMOC法とハイブリッド型イオントラップ-オービトラップ超高精度質量分析計を用いたnanoLC-MSMS法を組み合わせるにより、50 μ g程度の細胞抽出タンパク質試料から、1回のLC-MS分析で500個程度のリン酸化サイトを同定することが可能となった。その後、チタニア樹脂の焼成温度の最適化、表面の化学処理などの最適化を行ったところ、1回のLC-MS分析で1000個以上のリン酸化サイト同定が恒常的に可能となった。現在、これはリン酸化ペプチド濃縮キットとして市販されている。

上記のチタニアの最適化過程において、筆者らは入手可能な様々なチタニアを用いて、リン酸化ペプチド濃縮における性能を調べた。いずれのものについてもリン酸化ペプチドに対する親和性を示したが、ヒドロキシ酸に対する親和性との相対的な関係は一定ではなく、800°C以上で焼成したルチル型結晶のチタニアについては、ヒドロキシ酸非共存下でもリン酸化ペプチド濃縮の選択性がある程度高いことを見出した。この性質を利用し、チタニア-C18の二相カラムを用いた全自動リン酸化ペプチド濃縮・分析システムも開発している¹³。

Bodenmillerらはシヨウジョウバエの細胞抽出液を用い、IMACやチタニアMOCなど3種類の代表的なリン酸化ペプチド濃縮法の比較を行い、現状では1つの方法でカバーできるリン酸化ペプチドは限定されているため複数の方法を相補的に使うのが望ましいと報告している¹⁴。しかし試料量が限られている場合などでは複数の方法を用いることは難しく、単一の方法で、より広い範囲のリン酸化ペプチドを同定できる方法が求められる。最近、筆者らはHAMMOC法において溶出条件の最適化を行っている過程で、ピペリジンやピロリジンなどの環状アミンを用いた溶出溶液がその濃度によって異なる溶出選択性を示すことを見出し、この性質を用いて溶出ステップでリン酸化ペプチドを分画することにより、その回収率および同定数を大幅に向上させることに成功した¹⁵。現在では、例えばヒト子宮ガン由来HeLa細胞から抽出したタンパク質試料100 μ gから、3,000以上のリン酸化サイトを同定することが恒常的に可能となっている。

さて、筆者らの研究室では昨年8月より、先に示した方法開発の過程やヒト由来培養細胞株を用いた他の研究プロジェクトを行いながら、得られたリン酸化サイト情報を蓄積してきた。現在最もよく使われている公共データベースの一つであるUniProt Knowledgebase/Swiss-Prot (以下SwissProt)に登録されているリン酸化サイトと比較した結果を(図4)に示す。