

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

タンパク質マイクロアレイ等を用いたリン酸化タンパク質定量

研究分担者 山田哲司 国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野 分野長  
研究協力者 増田万里 国立がんセンター研究所創薬臨床研究分野主任研究員

研究要旨

がんの個別化医療の実現のためには、特定の治療薬の効果や副作用を治療開始前に予測し、投与が適切あるいは不適切な症例を選定する必要がある。本研究課題ではこのような個別化医療のためのコンパニオン診断薬の開発を最終的な目標として、分子標的治療薬が標的とするリン酸化タンパク質のプロファイリングを行い、シグナルネットワークの変化を網羅的に捉える基盤技術の開発を行うことを目的とする。本研究分担者らは逆相担体がコートされたガラススライドに高密度にタンパク質検体を微量定量スポットする独自のタンパク質マイクロアレイ技術を開発し、血清・血漿タンパク質の定量解析が可能であることを示してきた。本法は従来のイムブロット法などに比べ格段に感度が高く、微量なタンパク質検体でも可能なことから、生検組織などの臨床検体に応用が可能と考えられる。本分担研究では、分子標的治療薬のコンパニオンバイオマーカーを開発する基盤技術として、タンパク質マイクロアレイを用いた網羅的なリン酸化タンパク質のプロファイリングを行うことで、シグナルネットワークの変化を捉える方法の分担開発を行う。平成24年度はタンパク質マイクロアレイを用いたリン酸化タンパク質の解析技術を確立した。タンパク質のリン酸化は非常に不安定であり、検体の抽出法や保存法に独自の工夫を加えることにより安定した結果が得られるようになった。今後、既存あるいは新規の分子標的治療薬の作用によって変化するタンパク質リン酸化プロファイルを網羅的に解析することで、分子標的治療薬が標的とするシグナル伝達経路を特定し、薬剤の作用を予測できるリン酸化タンパク質を特定する計画である。

A. 研究目的

特定のシグナル伝達分子を標的としたがん分子標的治療薬の開発が進み、効果をあげている。さらに効果が期待できる可能性の高い患者をあらかじめバイオマーカーを用いて絞り込むことであれば、より個々の症例に適した薬剤を選択する最適化医療が期待されている。このようなコンパニオン診断薬の開発は2011年に欧州医薬品審査庁(EMA, European Medicines Agency)および米食品医薬品局(FDA, Food and Drug Administration)が発表したガイドランスで、薬剤開発の初期段階より開始されることが推奨されており、今後増加することが予測される。

細胞内のシグナル伝達はタンパク質のリン酸

化によって制御されていることが多く、今日臨床で用いられている分子標的治療薬の多くはリン酸化酵素を標的としている。細胞におけるタンパク質のリン酸化を網羅的に把握する方法としては、従来リン酸化ペプチドやリン酸化タンパク質を精製し、質量分析法にて網羅的に解析する手法が用いられてきたが、網羅性が充分ではなく、見出されるリン酸化の殆どはリン酸化酵素の基質のリン酸化が殆どを占め、リン酸化酵素自体のリン酸化を観察することは多くの場合、不可能であった。分子標的治療薬の標的となるリン酸化酵素の活性化を明らかにするためには、新たなリン酸化タンパク質の解析方法の開発が必要であると考えられる。

本研究分担者らはガラス基板上に細胞や組織

のタンパク抽出液を高密度にアレイ化し、蛍光色素と独自の増感技術を用いて抗体との反応を検出する逆相マイクロアレイ法を開発し、血清や血漿タンパク質の高感度な定量を可能にできた(Matsubara, et al., Mol Cell Proteomics 9: 695-704, 2010)。

本分担研究では、この技術をリン酸化タンパク質の解析に応用し、コンパニオンバイオマーカーの探索技術として確立することを目的として基礎的な検討をおこなう。

## B. 研究方法

1. 細胞培養：次表に示す8種類のがん由来の95種類の培養細胞を10% fetal calf serum (FCS)の存在下で通常に培養したものと、FCSを除き17時間培養したものを用意した。Epidermal growth factor (EGF)受容体遺伝子の増幅のあるA431細胞を200 ng/mlのEGFで10分間刺激したものと、刺激していないものを用意した(表1)。

2. タンパク質抽出：培養細胞をスクレールで収集し、-80°Cで保存した。RIPA buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL)に phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific)と protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO)を加えてもので、タンパク質を抽出し、Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)にて定量した。

3. 高密度タンパク質アレイの作成とシグナル検出：タンパク質抽出液は4-6段階に倍々希釈し、逆相コートガラススライド (ProteoChip lass slides Proteogen, Seoul, Korea)へ4重複にロボットスポッター(Genex Arrayer; Kaken Geneqs Inc, Chiba, Japan)を用いてアレイ化した。抗リン酸化Shc抗体を用いてハイブリダイゼーションを行った。

従来報告しているタンパク質アレイの増感法(Murakoshi, et al., Cancer Sci. 102: 630-8, 2011)を用いて蛍光シグナル得、通常の遺伝子マイクロアレイ用の蛍光スキャナーInnoScan

700 (Innopsys, Carbonne, France)で画像を取得した。

$\gamma$ -tubulinを内部コントロールにおき、Mapix software (Innopsys)で蛍光シグナルの共同を用いて相対的定量を行った。

(倫理面への配慮)

本年度は培養細胞を用いた研究に限定しており、「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」等の対象外である。

## C. 結果

逆相コートガラススライド ProteoChip は自家蛍光を発せず、高感度な蛍光シグナルの検出が可能であった。細胞抽出液の希釈に応じて蛍光シグナルが減弱し、定量性があることが示された(図1)。

EGFで10分間刺激したA431細胞では10倍以上のShcタンパク質のリン酸化の亢進が検出され、mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナル伝達経路の活性化が起きていることが確かめられた(図2)。

## D. 考察

今回開発した逆相タンパク質アレイ (Reverse Phase Protein Array; RPPA) によるリン酸化タンパク質の定量解析法は多くのリン酸化部位特異的な抗体ライブラリーと組み合わせることで網羅的なリン酸化プロファイルに可能であり、コンパニオン診断薬開発のためのシグナル伝達ネットワーク解析の強力な基盤となるものと考えられる。今後、分子標的薬剤の処理前後で細胞株におけるリン酸化プロファイルの変化の検出や微小な臨床組織検体を用いた基盤の最適化を進める必要がある。

## E. 結論

ガラス基板上に細胞や組織のタンパク抽出液をアレイ化し、蛍光色素と独自の増感技術を用いて抗体との反応を検出する逆相マイクロアレイ法をリン酸化タンパク質の発現解析に応用し、ウエスタン法に必要とされる1/10,000

以下の微量な試料でリン酸化タンパク質を網羅的かつハイスループットに解析できる基盤を確立した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Makuuchi, Y., Honda, K., Osaka, Y., Kato, K., Kojima, T., Daiko, H., Igaki, H., Ito, Y., Hoshino, S., Tachibana, S., Watanabe, T., Furuta, K., Sekine, S., Umaki, T., Watabe, Y., Miura, N., Ono, M., Tsuchida, A. & Yamada, T. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci.*, in press.
2. Ohtomo, R., Mori, T., Shibata, S., Tsuta, K., Maeshima, AM., Akazawa, C., Watabe, Y., Honda, K., Yamada, T., Yoshimoto, S., Asai, M., Okano, H., Kanai, Y. & Tsuda, H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol.*, in press.
3. Fukushima, S., Yoshida, A., Honda, K., Maeshima, AM., Narita, Y., Yamada, T., Shibui, S., & Tsuda H. Immuno-histochemical actinin-4 expression in infiltrating gliomas: association with WHO grade and differentiation. *Brain Tumor Pathol.*, in press.
4. Yoneyama, T., Ohtsuki, S., Ono, M., Ohmine, K., Uchida, Y., Yamada, T., Tachikawa, M. & Terasaki, T. Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated  $\alpha$ -fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J. Proteome Res.* **12**(2),

753-62 (2013).

5. Honda, K., Ono, M., Shitashige, M., Masuda, M., Kamita, M., Miura, N., & Yamada, T. Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **43**(2), 103-9 (2013).

### G-2. 学会発表

1. Ono M, Kamita M, Yamada T.: A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. Feb. 21-25, 2013, Hyatt Regency Maui, Maui, HI.
2. Masuda M, Honda K, Yamada T.: Pathway-based phosphoprotein profiling by high-density protein array. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. Feb. 21-25, 2013, Hyatt Regency Maui, Maui, HI.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

表 1.

Cell line	Cancer Type	Total #
Hepatocellular Carcinoma	Hep3B, Hep3B2.1-7, Alexander, HepG2, HepG2/C3A, Huh-1, JHH1, JHH2, JHH4, JHH5, JHH7, Kim1, SK-Hep1, SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475, HLE, HLF, Huh-7, Huh-6 cl5,	23
Ovarian Cancer	CaOV3, TYK-nu CP-n, TYK-nu, ES-2, KURAMOCHI, OV-90, OVCAR-3, OVKATE, OVMANA, OVSAHO, OVTOKO, RMUG-S, SK-OV-2, TOV112D, OVISE, TOV21G	16
Gastric Cancer	AZ521, HGC27, HSC39, HSC43, HSC44, HSC45, HSC58, HSC59, MKN45, NUGC3, NUGC4, Okajima, TGBc11TK13KatoIII, HSC60,	15
Colon Cancer	Colo320, DLD, HCT116, HCT8, LOVO, SW48, SW480, SW948, WiDr	9
Pancreatic Cancer	AsPC1, BXPC3, Capan1, Capan2, HPAC, MiaPaca1, MiaPaca2, Panc1, MPanc96,	9
Lung Cancer	A549, DMS53, EBC1, H1688, H69AR, LK2, Lu165, SBC5	8
Osteosarcoma (OS)	HsOS-1, Hu09N2, MG63, MNNG/HOS, NOS1, MuO3N1, SaOS2, U2	8
Oral Squamous Cell Carcinoma	Ca9-22, HO-1-u-1, HSC-4, KOSC-2, KOSC-3, SAS, SKN-3	7
		95

图 1.

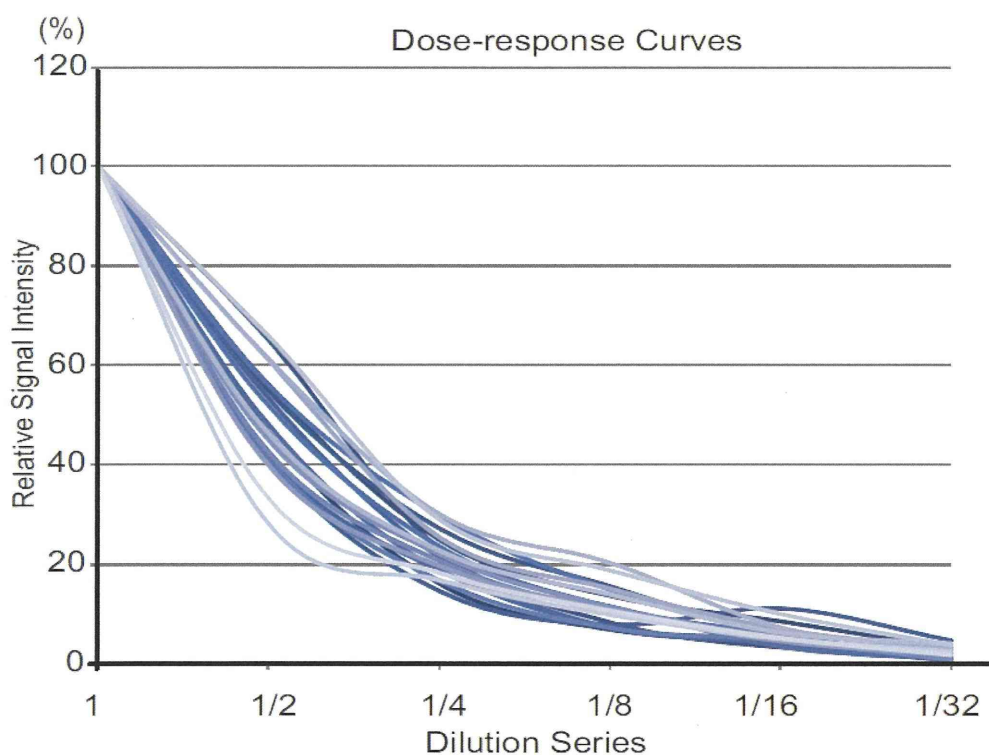
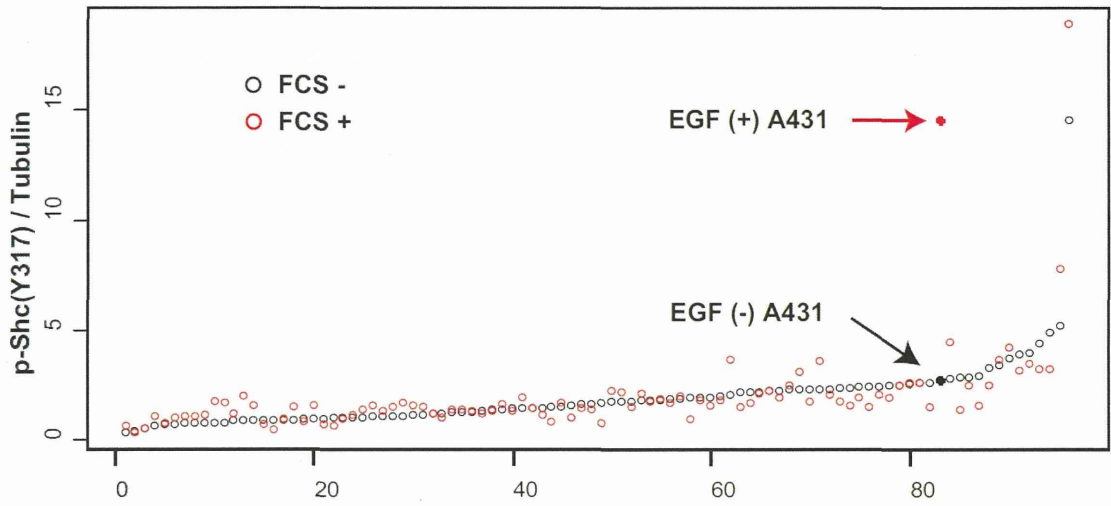


Figure 2



難治がんの創薬バイオマーカー探索研究

研究分担者 中山敬一 九州大学生体防御医学研究所 主幹教授

研究要旨

生体内において、ほとんどのタンパク質は多種多様な翻訳後修飾を受けることでその機能を制御されている。特にタンパク質のリン酸化は増殖シグナルなどの細胞内シグナル伝達において決定的な役割を担う可逆的な翻訳後修飾であり、細胞の状況に応じてダイナミックに変化することが知られている。近年、細胞内シグナル伝達において様々な経路が相互作用することによって生じるシグナルの波形パターンが最終的なアウトプットを生み出す可能性が示唆されている。したがって、シグナル伝達機構の本質を理解するためには、その波形パターンに内包される情報のデコードが重要な課題となっている。シグナル伝達を最も定量的に計測する手段として、細胞内リン酸化を網羅的に多点で定量することが極めて重要である。このような観点から、われわれはリン酸化を正確かつ大規模に定量できる手法の開発を行ってきた。本年度は、前年度開発した Phospho-mTRAQ 法を補完する方法論としてノンターゲット定量アプローチである SWATH 法を利用した Phospho-SWATH 法の構築を行い、リン酸化ペプチドを大規模かつ多点での定量に成功した。

A. 研究目的

これまでに mTRAQ 法を利用したリン酸化ペプチドの内部標準化、3 連 4 重極型質量分析計による MRM 解析を高感度に行うための最適パラメーターの予測アルゴリズムの開発、さらには HPLC 保持時間の相対位置情報化などの要素技術開発を行い、大規模にリン酸化 MRM 解析を実行可能なプラットフォームの構築に成功した。

昨年度は、これまで開発してきた要素技術をつなぐ情報処理技術の開発を行い、完全に実用可能 Phospho-MRM 法のための解析プラットフォームの構築を行った。Phospho-mTRAQ 法は非常に高感度であり、mTRAQ 標識を施した内部標準を利用しているため、その定量精度は極めて高いという特徴を有する。その反面、MRM メソッド構築における手間と、一度に分析できる成分数に限界があるため、全体を網羅的に計測することが困難であった。本年度は Phospho-mTRAQ 法のこれらの欠点を補完する技術として

Phospho-SWATH 法を確立し、より網羅的に多検体に対してリン酸化情報を定量計測するシステムの構築を目指す。

B 研究方法

SWATH 法は 25 unit 単位で Q1 ウィンドウをスイッチさせることで全成分の MS/MS スペクトルを全質量領域に渡って取得する手法であり、得られたデータには理論的に全てのイオンの MS/MS シグナルのクロマトグラムが含まれている。SWATH 法においては得られるデータから各成分（ここではリン酸化ペプチド）のクロマトグラムを抽出する必要がある。そこで、大量に精製したリン酸化ペプチド（同定効率を上げるために適宜分画を施す）を対象に SWATH 法による測定と同条件で LC-MS/MS（データ依存分析）を行い、SWATH データを解析するためのリン酸化ペプチドライブラリー構築を行う。次に、各種パラメーターを最適化することでリン酸化ペプチドの大規模定量に利用できるよう改善し、実際にリン酸化ペプ

チドの定量情報が取得できるか検証する。

(倫理面への配慮)

本研究においてはヒトサンプルを扱っておらず、特に倫理面に関する問題点はない。

## C. 研究結果

### 1. リン酸化ペプチドの高効率大規模同定

われわれはこれまでに金属イオンキレートクロマトグラフィー(IMAC)を用いてリン酸化ペプチドを高純度で精製できる方法を確立している。本方法をより効率的に行うためにゲル濾過や分取型 SDS-PAGE (Gelfree 法)を用いてタンパク質レベルでの事前分画を行い、各分画を酵素消化後、リン酸化ペプチドを精製した。得られたリン酸化ペプチドに対して SWATH 法での測定と同様のグラジエント条件 (1 測定 120 min) でデータ依存分析を行った。また、各試料には既に開発している保持時間マーカーをスパイクすることで保持時間情報を元にしたピーク検出の精度向上を図った。得られたデータは MASCOT および ProteinPilot によるデータベース検索によってリン酸化ペプチドの配列を同定した。同定されたリン酸化ペプチドの情報は新たに作成した Phospho-SWATH 用事前情報データベースに格納した。

### 2. Phospho-SWATH 法の実施

定量計測に用いるサンプルは少量のタンパク質量であることが本方法のメリットである。そこで 200  $\mu\text{g}$  相当の前細胞抽出液をメタノールクロロフォルム沈殿後、酵素消化し、得られた消化物を 100  $\mu\text{l}$  の IMAC ビーズを充填したチップカラムに導入し精製を行った。本チップカラムは C18 メンブランをフリットとして使用しているため、精製後、脱塩処理までを単一カラムで実施できるため微量検体の処理に向いている。得られたリン酸化ペプチドを SWATH 法によるデータ取得を行った。SWATH 法はグラジエント条件や SWATH の測定パラメーターを詳細に検討しより、効率

よくリン酸化ペプチドの定量に適した条件を設定した。

リン酸化ペプチドデータベースから、任意のタンパク質のリン酸化ペプチドの情報をダウンロードして、PeakView (ABSciex の SWATH 解析用ソフトウェア)に読み込ませることで SWATH データから目的リン酸化ペプチドの抽出クロマトグラムを得ることができた。検証実験として HeLa 細胞への EGF 刺激後のリン酸化の変化を追跡したところ、EGF 受容体や MAP キナーゼのリン酸化の経時変化を正確に捉えることに成功した。

## D. 考察

本年度は phospho-MRM 法の欠点を補完する手法として新たに phospho-SWATH 法を構築した。Phospho-SWATH 法は現時点では内部標準を使用していないため、絶対定量は出来ていないが、MRM 測定メソッドを作成することなく簡便に定量情報の取得が可能であることが大きな利点である。また、リン酸化ペプチドの同定作業は事前に一度だけ大規模に行えば良く、量を得ることが困難な試料 (臨床検体) に関してはモデル細胞 (培養細胞) を用いて事前情報を取得しておけば、実際の検体に関しては少量で定量実施が可能となり、今後のバイオマーカー探索などへの応用に向けて大きなメリットがある。

現時点では得られた SWATH データとリン酸化データベースに格納されたデータのヒモ付には質量分析メーカー提供のソフトウェアを利用しているため、リン酸化ペプチド解析に特有の問題が多数生じており、実用面では未だ不完全である。今後、Phospho-SWATH をより実用化するためのソフトウェアの独自開発が必須であると思われる。

## E. 結論

新規リン酸化定量プロテオーム解析法である Phospho-SWATH 法を開発した。さらに、実際に Phospho-SWATH 法を用いて、EGF 刺激に伴う大規模なリン酸化の定量情報取得に

成功した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S.W., Nakayama, K.I., Nakayama, K. & Lo, K.W. Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene* **31**, 1975-1987 (2012).
2. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Oyamada, K., Moroishi, T. & Nakayama, K.I. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis. *J. Proteome Res.* (2012).
3. Suzuki, S., Fukasawa, H., Misaki, T., Togawa, A., Ohashi, N., Kitagawa, K., Kotake, Y., Liu, N., Niida, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Yamamoto, T. & Kitagawa, M. The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> mice. *PLoS One* **7**, e36249 (2012).
4. Liu, N., Matsumoto, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Suzuki, S., Shirasawa, S., Nakayama, K.I., Nakanishi, M., Niida, H. & Kitagawa, M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBO J.* **31**, 2365-77 (2012).
5. Chan, C.H., Li, C.F., Yang, W.L., Gao, Y., Lee, S.W., Feng, Z., Huang, H.Y., Tsai, K.K., Flores, L.G., Shao, Y., Hazle, J.D., Yu, D., Wei, W., Sarbassov, D., Hung, M.C., Nakayama, K.I. & Lin, H.K. The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis. *Cell* **149**, 1098-111 (2012).
6. Fukushima, H., Matsumoto, A., Inuzuka, H., Zhai, B., Lau, A.W., Wan, L., Gao, D., Shaik, S., Yuan, M., Gygi, S.P., Jimi, E., Asara, J.M., Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Wei, W. SCF(Fbw7) modulates the NFkappaB signaling pathway by targeting NFkappaB2 for ubiquitination and destruction. *Cell Rep.* **1**, 434-43 (2012).
7. Ellman, M.B., Kim, J.S., An, H.S., Kroin, J.S., Li, X., Chen, D., Yan, D., Buechter, D.D., Nakayama, K., Liu, B., Morgan, S. & Im, H.J. The pathophysiologic role of the protein kinase Cdelta pathway in the intervertebral discs of rabbits and mice: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Arthritis Rheum.* **64**, 1950-1959 (2012).
8. Grim, J.E., Knoblaugh, S.E., Guthrie, K.A., Hagar, A., Swanger, J., Hespelt, J., Delrow, J.J., Small, T., Grady, W.M., Nakayama, K.I. & Clurman, B.E. Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2160-67 (2012).
9. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* **32**(15):1921-32.(2012).
10. Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Tanaka, F., Sato, T., Toh, H., Sudo, T., Iwaya, T., Tanaka, Y., Onoyama, I., Kuwano, H., Nakayama, K.I. & Mori, M. Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **41**, 253-9 (2012).
11. Kita, Y., Nishiyama, M. & Nakayama, K.I. Identification of CHD7(S) as a novel



- splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7(L). *Genes Cells* **17**, 536-47 (2012).
12. Hoshi, H., Hao, W., Fujita, Y., Funayama, A., Miyauchi, Y., Hashimoto, K., Miyamoto, K., Iwasaki, R., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyamoto, H., Yoshida, S., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Kawamoto, T., Sano, M., Fukuda, K., Ohsawa, I., Ohta, S., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Toyama, Y. & Miyamoto, T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2015-23 (2012).
  13. Okita, Y., Matsumoto, A., Yumimoto, K., Isoshita, R. & Nakayama, K.I. Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation. *Genes Cells* **17**, 768-77 (2012).
  14. Tateishi, Y., Matsumoto, A., Kanie, T., Hara, E., Nakayama, K. & Nakayama, K.I. Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 285-92 (2012).
  15. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Koder, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K. & Tomonaga, T. A strategy for large-scale phospho-proteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-5322 (2012).
  16. Cremasco, V., Decker, C.E., Stumpo, D., Blackshear, P.J., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Lupu, T.S., Graham, D.B., Novack, D.V. & Faccio, R. Protein kinase C-delta deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 2452-63 (2012).
  17. Saita, S., Shirane, M. & Nakayama, K.I. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy. *Nature Commun.* **4**, 1410 (2013).
  18. Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K.I. & Fukada, Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* **152**, 1106-18 (2013).
  19. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A. & Nakayama, K.I. Ablation of fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* **23**, 347-61 (2013).
  20. Reavie, L., Buckley, S.M., Loizou, E., Takeishi, S., Aranda-Orgilles, B., Ndiaye-Lobry, D., Abdel-Wahab, O., Ibrahim, S., Nakayama, K.I. & Aifantis, I. Regulation of c-Myc ubiquitination controls chronic myelogenous leukemia initiation and progression. *Cancer Cell* **23**, 362-75 (2013).
  21. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J.*, in press. (2013).
- G-2. 学会発表**
1. 中山敬一: ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. 基生研研究会「モデル生物・非モデル生物のプロテオミクスが拓く生物学」. (招待講演) 岡崎.5/14 (2012).

2. Nakayama, K.I.: Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. 10th Stem Cell Research Symposium. (Invited speaker) Awaji.5/31 (2012).
3. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く医学研究の新地平：もうウェスタンブロットティングは要らない?!. 第 55 回日本腎臓学会学術総会. (招待講演) 横浜.6/1 (2012).
4. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平：もうウェスタンブロットティングは要らない?!. 疾患関連創薬バイオマーカー探索研究. (招待講演) 東京.6/21 (2012).
5. 中山敬一: 次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平：もうウェスタンブロットティングは要らない?!. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会. (招聘講演) 豊中.6/29 (2012).
6. 幡野敦, 松本雅記, 中山敬一: 定量的リン酸化プロテオミクスによる Calcineurin の網羅的基質探索. 第 10 回日本プロテオーム学会. 東京.7/26 (2012).
7. 松本雅記: 定量プロテオミクスのための試料調製. 第 10 回日本プロテオーム学会. (教育講演) 東京.7/26 (2012).
8. 中山敬一, 松本雅記, 押川清孝, 松崎芙美子: ヒトプロテオーム絶対定量プロジェクト: 網羅的ターゲットプロテオミクスの開発と応用. 第 10 回日本プロテオーム学会. (シンポジウム) 東京.7/26 (2012).
9. 中山敬一: プロテオームと疾患研究. ヒトプロテオゲノミクスの現状とロードマップによる推進: エピゲノムとプロテオームの統合によるヒトの生命と病気の解明. (シンポジウム) 東京.7/28 (2012).
10. Nakayama, K.I.: Comprehensive and unbiased identification of substrates for ubiquitin ligases by differential proteomics analysis. HUPO 2012 11th World Congress. (Invited speaker) Boston, MA.9/12 (2012).
11. 中山敬一: G0 期維持機構の解明: 癌幹細胞を撲滅できるか?. 第 71 回日本癌学会学術総会. (シンポジウム) 札幌.9/19 (2012).
12. 松本雅記, 松崎芙美子, 高見知代, 小山田浩二, 中山敬一: 情報基盤プロテオミクスによるヒトプロテオームの絶対定量. 第 5 回定量生物学の会年会. (招待講演) 東京.11/24 (2012).
13. 喜多泰之, 西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリングタンパク質 CHD7 の新規スプライシングバリエーションの発見とその機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/11 (2012).
14. 渡邊心也, 杉本のぞみ, 松本雅記, 中山敬一, 藤田雅俊: プロテオミクスアプローチを用いた新規 GRWD1 結合タンパク質の網羅的同定による GRWD1 の機能解明. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/11 (2012).
15. 中山敬一: 正常幹細胞と癌幹細胞における G0 期維持機構: "G0 期追出し療法"による癌根治の可能性. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/11 (2012).
16. 橋本寛, 松崎芙美子, 細田将太郎, 大西隆史, 中山敬一, 白根道子: Protrudin が関与する遺伝性痙性対麻痺の病態メカニズム. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/12 (2012).
17. 細田将太郎, 清水誠之, 石谷太, 中山敬一, 白根道子: 新規 FKBP38 結合タンパク質 ANKMY2 はソニックヘッジホッグシグナル伝達を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
18. 磯下理恵子, 小野山一郎, 鈴木淳史, 松本有樹修, 富田謙吾, 片桐秀樹, 尾池雄一, 中山啓子, 中山敬一: Fbxw7 はマウスの肝臓において脂質代謝及び細胞分化決定を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/13 (2012).
19. 諸石寿朗, 西山正章, 岩井一宏, 中山敬一: ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝

- 制御と肝がん. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/13 (2012).
20. 中津海洋一, 松本雅記, 小山田浩二, 中山敬一: mTOR と転写をつなぐ新規分子 FOXK1 の発見とがん進展における促進作用. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
  21. 足達俊吾, 穂本真佐江, 田中利好, 日置雄策, 村上裕, 菅裕明, 松本雅記, 中山敬一, 堀本勝久, 家村俊一郎, 夏目徹: 質量分析計による RNA 制御因子の同定法の開発とその応用. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/13 (2012).
  22. 大西隆史, 橋本寛, 細田將太郎, 中山敬一, 白根道子: 神経特異的な protrudin 新規アイソフォームの発現機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
  23. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝: F-box タンパク質によるユビキチン化を介した CRY タンパク質の安定性制御. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/14 (2012).
  24. 沖田康孝, 松本有樹修, 弓本佳苗, 磯下理恵子, 中山敬一: Fbxw7 の発現抑制は iPS 細胞形成を促進する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
  25. 山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 弓本佳苗, 押川清孝, 中山敬一: MDM2 による RNA ヘリカーゼ DDX24 の非分解的制御機構の解明. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
  26. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 小野山一郎, 森正樹, 三森功士, 中山敬一: 宿主 Fbxw7 が癌転移を抑制する. 第 35 回日本分子生物学会年会. (ワークショップ) 福岡.12/14 (2012).
  27. 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一: Fbxw7 阻害は静止期を破綻させることにより白血病幹細胞を根絶する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡.12/14 (2012).
  28. 諸石寿朗, 西山正章, 山内隆好, 武田有紀子, 岩井一宏, 中山敬一: 生体における鉄代謝制御の中心をなす FBXL5-IRP2 系の発見. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
  29. Matsumoto, M., Matsuzaki, F., Oshikawa, K., Oyamada, K., Goshima, N., Natsume, T., Nakayama, K.I.: Accurate and absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
  30. Kuroda, S., Yugi, K., Kubota, H., Soga, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I.: Unbiased identification of global network for signaling and metabolism from trans-omic data. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/15 (2012).
  31. 平野有沙, 恒松良佑, 松本雅記, 尾山大明, 秦裕子, ランジャコーンシリパンダーリン, 中山敬一, 深田吉孝: 時計タンパク質 CRY の安定化を担う新規ユビキチンリガーゼの同定. 第 85 回日本生化学会大会. (口頭発表) 福岡.12/16 (2012).
  32. 中山敬一, 西山正章, 諸石寿朗: ユビキチン化による鉄代謝制御機構とその破綻. 第 85 回日本生化学会大会. (シンポジウム) 福岡.12/16 (2012).
  33. 中山敬一: ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出. 戦略的創造研究推進事業 (CREST)「生命システムの動作原理と基盤技術」研究領域・平成 24 年度公開シンポジウム. (シンポジウム) 東京.2/25 (2013).
  34. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K.I.: MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase DDX24 to regulate pre-rRNA processing. Post-GCOE Symposium & Retreat on Cell-fate decision: Function

and dysfunction in homeostasis. (Oral)  
Singapore.3/4 (2013).

35. Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I.,  
Naka, K., Hirao, A., Nakayama, K.I.:  
Ablation of Fbxw7 eliminates  
leukemia-initiating cells by preventing  
quiescence. Post-GCOE Symposium &  
Retreat on Cell-fate decision: Function  
and dysfunction in homeostasis. (Oral)  
Singapore.3/4 (2013).
36. Yamamura, S., Yumimoto, K., Nakayama,  
K.I.: Fbxw7-dependent ubiquitylation  
mediates the degradation of SOX9.  
Post-GCOE Symposium & Retreat on  
Cell-fate decision: Function and  
dysfunction in homeostasis. (Oral)  
Singapore.3/5 (2013).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
平野 久	プロテオミクス	高山光男 早川滋雄 瀧浪欣彦 和田芳直	現代質量分析学	化学同人	京都	2012	293-304
同 上	On-membrane identification of gel-resolved proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS)	Tschesche, H.	Modern Methods in Protein Chemistry	Walter De Gruyter	Berlin	2012	113-126
平野 久 木村弥生	LC/MS/MSによる疾患プロテオーム解析	日本分析化学会	試料分析講座タンパク質分析	丸善出版	東京	2012	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
朝長 毅	Identification of missing proteins in the neXtProt database and unregistered phosphopeptides in the PhosphoSitePlus database as part of the chromosome-centric human proteome project.	J. Proteome Res.	In press		2013
同 上	In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein list.	J. Proteome Res.	12	208-13	2013

朝長 毅	A Strategy for large-scale phospho-proteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples.	J. Proteome Res	11	5311-22	2012
同 上	A strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples.	J. Proteome Res.	11	4201-10	2012
仲 哲治	CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells.	Int J Cancer.	In press		2012
同 上	Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer.	Int. J. Cancer.	132	472-84	2013
同 上	Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma.	PLoS One	7	e41994	2012
同 上	Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris.	Pigment Cell Melanoma Res.	25	219-30	2012
同 上	Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts.	Exp. Dermatol.	21	331-6	2012

仲 哲司	Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis.	Inflamm. Bowel Dis.	18	2169-79	2012
同 上	Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer.	Tumour Biol.	33	1141-9	2012
同 上	潰瘍性大腸炎の疾患活動性マーカーとしての血清ロイシンリッチアルファ2グリコプロテイン	Intestine	17	107-109	2013
角田慎一	Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer	Pharmazie	67	253-255	2012
同 上	Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	421	140-4	2012
同 上	Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis.	Neurosci.Lett.	534	85-9	2013
鎌田春彦	抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術	薬学雑誌	132	473-477	2012

平野 久	The $\delta 2$ glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites.	Proc. Natl. Acad. Sci.	110	E948-957	2013
同 上	The interaction of kinesin-1 with its adaptor protein JIP1 can be regulated via proteins binding to the JIP1-PTB domain.	BMC Cell Biology	14	12	2013
同 上	Differential proteome analysis of serum proteins associated with the development of type 2 diabetes mellitus in the KK- $A^y$ mouse model using the iTRAQ technique.	J. Proteomics	84C	40-51	2013
同 上	Phos-tag アガロースおよび質量分析装置を用いたリン酸化ペプチドのショットガン分析	生物物理化学	56	S25-28	2012
同 上	二次元 Phos-tag 親和性電気泳動	生物物理化学	56	S21-24	2012
山田哲司	Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy.	Cancer Sci.	In press		2013



山田哲司	SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis.	Mod Pathol.	In press		2013
同 上	Immuno-histochemical actinin-4 expression in infiltrating gliomas: association with WHO grade and differentiation., in press.	Brain Tumor Pathol.	In press		2013
同 上	Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated $\alpha$ -fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis.	J. Proteome Res.	12	753-62	2013
同 上	Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine.	Jpn. J. Clin. Oncol.	43	103-9	2013
中山敬一	Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry.	Oncogene	31	1975-87	2012
同 上	Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis.	J. Proteome Res.	In press		2012
同 上	The amelioration of renal damage in Skp2-deficient mice canceled by p27 Kip1 deficiency in Skp2 <sup>-/-</sup> p27 <sup>-/-</sup> mice.	PLoS One	7	e36249	2012

中山敬一	Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling.	EMBO J.	31	2365-77	2012
同 上	The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis.	Cell	149	1098-111	2012
同 上	SCF(Fbw7) modulates the NFkappaB signaling pathway by targeting NFkappaB2 for ubiquitination and destruction.	Cell Rep.	1	434-43	2012
同 上	The pathophysiologic role of the protein kinase Cdelta pathway in the intervertebral discs of rabbits and mice: in vitro, ex vivo, and in vivo studies.	Arthritis Rheum.	64	1950-59	2012
同 上	Fbw7 and p53 cooperatively suppress advanced and chromosomally unstable intestinal cancer.	Mol. Cell. Biol.	32	2160-67	2012
同 上	Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch.	Oncogene	32	1921-32	2012
同 上	Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.	Int. J. Oncol.	41	253-9	2012

中山 敬一	Identification of CHD7(S) as a novel splicing variant of CHD7 with functions similar and antagonistic to those of the full-length CHD7(L).	Genes Cells	17	536-7	2012
同 上	Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis.	J. Bone Miner. Res.	27	2015-23	2012
同 上	Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation.	Genes Cells	17	768-777	2012
同 上	Development of mice without Cip/Kip CDK inhibitors.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	427	285-92	2012
同 上	Protein kinase C-delta deficiency perturbs bone homeostasis by selective uncoupling of cathepsin K secretion and ruffled border formation in osteoclasts.	J. Bone Miner. Res.	27	2452-63	2012
同 上	Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy.	Nature Commun.	4	1410	2013
同 上	FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes.	Cell	152	1106-18	2013

# Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project

Takashi Shiromizu,<sup>†</sup> Jun Adachi,<sup>†</sup> Shio Watanabe,<sup>†</sup> Tatsuo Murakami,<sup>†</sup> Takahisa Kuga,<sup>†</sup> Satoshi Muraoka,<sup>†</sup> and Takeshi Tomonaga<sup>\*,†,‡</sup>

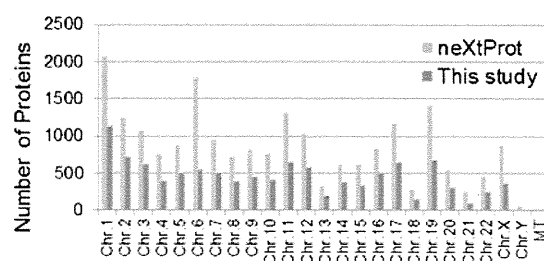
<sup>†</sup>Laboratory of Proteome Research, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan

<sup>‡</sup>Clinical Proteomics Research Center, Chiba University Hospital, Chiba, Japan

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The Chromosome-Centric Human Proteome Project (C-HPP) is an international effort for creating an annotated proteomic catalog for each chromosome. The first step of the C-HPP project is to find evidence of expression of all proteins encoded on each chromosome. C-HPP also prioritizes particular protein subsets, such as those with post-translational modifications (PTMs) and those found in low abundance. As participants in C-HPP, we integrated proteomic and phosphoproteomic analysis results from chromosome-independent biomarker discovery research to create a chromosome-based list of proteins and phosphorylation sites. Data were integrated from five independent colorectal cancer (CRC) samples (three types of clinical tissue and two types of cell lines) and lead to the identification of 11,278 proteins, including 8,305 phosphoproteins and 28,205 phosphorylation sites; all of these were categorized on a chromosome-by-chromosome basis. In total, 3,033 “missing proteins”, i.e., proteins that currently lack evidence by mass spectrometry, in the neXtProt database and 12,852 unknown phosphorylation sites not registered in the PhosphoSitePlus database were identified. Our in-depth phosphoproteomic study represents a significant contribution to C-HPP. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium with the data set identifier PXD000089

**KEYWORDS:** Chromosome-Centric Human Proteome Project, missing protein, phosphopeptide, IMAC, colorectal cancer, FASP, neXtProt, PhosphoSitePlus



## INTRODUCTION

The Chromosome-Centric Human Proteome Project (C-HPP) is a worldwide effort by proteomics researchers to create expression profiles of the approximately 20,000 genes encoded on all human chromosomes and build a database.<sup>1</sup> Protein expression patterns are closely associated with the location of the gene on a chromosome and are correlated with diseases associated with chromosomal abnormalities. Therefore, a comprehensive understanding of the protein expression profile of each chromosome is critical for biological studies and clinical research. The initial aim of C-HPP was to identify at least one protein isoform for every gene encoded by the human genome. Proteins not detected by antibody or proteomic analysis using mass spectrometry are called “missing proteins”.<sup>2</sup> Currently, there are about 6,000 missing proteins among all of the proteins in the neXtProt database.<sup>3</sup> One reason why missing proteins are undetectable is that protein expression differs significantly between tissue and cell types. Although the number of proteins that can be identified in a single analysis has greatly increased due to recent advances in mass spectrometric techniques, complete expression profiles of all proteins will require the integration and analysis of data from a wide variety of samples.

C-HPP also aims to map specific protein variations such as post-translational modifications (PTMs), alternative splicing, and protease-processed variants.<sup>2</sup> Protein phosphorylation is a key regulator of cellular signal transduction processes, and its deregulation is involved in the onset and progression of various human diseases such as cancer and inflammatory and metabolic disorders.<sup>4–7</sup> Recent advances in proteomics, especially phosphopeptide enrichment strategies such as immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) and TiO<sub>2</sub> affinity chromatography,<sup>8</sup> have enabled the identification of up to several thousands of site-specific phosphorylation events within one large-scale analysis.<sup>9–19</sup>

As participants in C-HPP, we have integrated proteomic and phosphoproteomic analysis data from human colorectal cancer tissue and cell lines and created a chromosome-based list of identified proteins. Newly detected proteins and phosphorylated peptides were identified from the neXtProt and PhosphoSitePlus databases.

Special Issue: Chromosome-centric Human Proteome Project

Received: August 30, 2012