

ム解析による大腸癌バイオマーカーの探索とその検証. 第71回日本癌学会, 札幌, 2012年9月19-21日

⑫ 村岡 賢, 久米秀明, 足立 淳, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: A strategy for validation of biomarker candidates combining iTRAQ and SRM/MRM assay in breast cancer tissue samples 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日

⑬ 久家貴寿, 久米秀明, 足立 淳, 星野敢, 松原久裕, 朝長 毅: オミックス技術を駆使した新規大腸癌関連タンパク質の同定. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日

⑭ 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 中山敬一, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日

⑮ 村上達夫, 久家貴寿, 足立 淳, 白水崇, 中山敬一, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: ヒト乳がん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM をベースにした検証法. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日

⑯ 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅 “Proteomic analysis of highly metastatic colorectal cancer cells established from orthotopic metastatic mouse model.” 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19-21日

⑰ 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日

⑱ 橋口一成, 足立 淳, 渡邊史生, 朝長毅: Quantitative proteome and phosphoproteome analyses of chromatin proteins upon oxidative base damage. 第36回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日

⑲ 渡部 亮介, 足立 淳, 朝長 毅: Global quantitative phospho-proteomic analysis on the mTOR-mediated signaling pathway. 第35回日本分子生物学会, 福岡 2012年12月11-14日

⑳ 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日

#### 国際学会

① Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T, Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T “Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network” Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUP) 6<sup>th</sup> congress, Beijing, China, 5-7 May, 2012.

② Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Koder Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based large-scale validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples.” Asia Oceania Human proteome organization 6<sup>th</sup> Congress, Beijing, China, May 5-7, 2012.

③ Adachi J, Kuga T, Shiromizu T, Kume H, Muraoka S, Hashiguchi K, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T “Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling” HUPO2012 11<sup>th</sup> World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.

④ Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Koder Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based systematic validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in breast cancer tissue samples.” HUPO2012 11<sup>th</sup> World

Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.

⑤ Shiromizu T, Adachi J, Tomonaga T  
“Quantitative proteomic profiling of  
orthotopic xenograft mouse model of  
colorectal cancer metastasis.”  
HUPO2012 11<sup>th</sup> World Congress, Boston,  
USA, September 9-13, 2012.

⑥ Adachi J, Higo D, Watanabe S,  
Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T  
“ATP Accessibility Screening (AAS), a  
high-throughput and high-resolution  
kinase analysis platform for signaling  
research” 2<sup>nd</sup> Copenhagen Bioscience  
Conference, Copenhagen, Denmark, 2-5  
December, 2012.

### 3. 知的財産権の出願・登録状況

① 発明の名称：「乳がん治療の予後判定方

法」

発明者：朝長 毅、村岡 賢、村上達夫、  
加藤菊也、宮本泰豪

出願日：2012年5月23日(国内出願)

出願番号：特願 2012-117961 (国内出願)

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

② 発明の名称：「大腸癌治療剤」

発明者：朝長 毅、久家貴寿、久米秀明

出願日：2012年6月15日(国内出願)

出願番号：特願 2012-135619 (国内出願)

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

③ 発明の名称：「大腸がんの判定方法」

発明者：朝長 毅、久米秀明

出願日：2012年12月27日(国内出願)

出願番号：特願 2012-274638(国内出願)

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチド SRM 定量法の開発に関する研究

研究分担者 足立淳 独立行政法人医薬基盤研究所  
プロテオームリサーチプロジェクト プロジェクト研究員

### 研究要旨

キナーゼの活性化は高次構造で制御されており、多くのキナーゼにおいてその高次構造は活性化ループ中のリン酸化修飾により制御されている。したがって、その活性化指標リン酸化修飾はキナーゼの活性化状態のサロゲートマーカーとなる。活性化指標リン酸化修飾を検出する方法としては、リン酸化抗体を用いた免疫学的手法があるが、抗体のレパートリーと性能の問題で制限がある。本研究の目的は、質量解析計を用いた SRM 法で活性化指標リン酸化修飾レベルを定量する技術を開発し、抗体を必要としない全く新しいキナーゼ活性化レベル測定法を確立することである。本法では、キナーゼを酵素消化した後に、活性化指標リン酸化修飾を持つリン酸化ペプチドを SRM 法で定量する。SRM 測定を行うには測定条件パラメータを設定する必要がある。そのパラメータは、SRM 標的リン酸化ペプチドを実際に LC-MS/MS で測定し、得られた MS/MS スペクトル情報から作製する。本年度は、396 種類の活性化型リコンビナントキナーゼの LC-MS/MS 測定を行い、活性化指標リン酸化ペプチドの LC-MS/MS スペクトル情報を取得した。これら成果により、活性化指標リン酸化ペプチドの SRM 測定パラメータの設定が簡便に行えるようになった。

### A. 研究目的

プロテインキナーゼはほとんど全ての細胞内機能の制御に係わっている。キナーゼの機能異常はがんなどの疾患の原因となるため、疾患研究においては時にキナーゼの活性化状態を解析する必要が出てくる。キナーゼの活性化状態は *in vitro* kinase 解析で測定することが可能であるが、煩雑である。そのため、キナーゼの活性化状態を推測するためのサロゲートマーカーが求められる。

キナーゼの酵素活性は高次構造レベルで制御されている。多くのキナーゼにおいて、

その高次構造は活性化ループ中のリン酸化修飾により制御されている。そのため、活性化ループのリン酸化修飾がキナーゼ活性のサロゲートマーカーとなる。活性化指標リン酸化修飾は、一般にリン酸化抗体を用いて検出されているが、抗体のレパートリーと性能の面で限界がある。

本研究では、多数のキナーゼの活性化指標リン酸化修飾レベルを、質量解析計で一度に定量する技術を確立する。リン酸化抗体を必要としない全く新しいキナーゼ活性化レベル測定法を開発することが本研究の目的である。

## B. 研究方法

### <リン酸化ショットガンプロテオミクス>

培養細胞から Phase Transfer Surfactants 法でタンパク質を抽出し、2~6 mg のタンパク質を解析に用いた。タンパク質をトリプシンで消化し、IMAC 法でリン酸化ペプチドを濃縮した後、強陽イオン交換クロマトグラフィーでリン酸化ペプチドを 30 画分に分画した。全ての画分を LTQ Orbitrap Velos などの LC-MS/MS で測定した。測定結果を MaxQuant software で解析することでリン酸化ペプチドの同定を行った。擬陽性率は 1%未満に設定し、リン酸化部位の特定は provability 0.75 以上で行った。

### <活性型リコンビナントキナーゼのリン酸化プロファイリング>

カルナバイオサイエンス社から入手した 396 種類のリコンビナントヒトキナーゼのリン酸化修飾を解析した (図 1)。1 セット 50 種類のキナーゼ各 1 µg ずつを混ぜ、トリプシン消化し、IMAC 法でリン酸化ペプチドを濃縮した。それらを Q-Exactive LC-MS/MS で測定した。測定結果を MaxQuant で解析しリン酸化ペプチドの同定を行った。

## C. 結果

キナーゼの活性化指標リン酸化ペプチドを SRM 測定するためには、まずは標的ペプチド配列を決定し、SRM 測定条件パラメータを設定する必要がある。理論的な標的配列はアミノ酸配列情報から決定することができるが、実際に LC-MS/MS で検出できるかどうかの検証を行った。また、

得られた MS/MS スペクトルは SRM 測定条件パラメータの設定にも用いる。

キナーゼの活性化指標リン酸化ペプチドを実測するために、まずは大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析を行った。HeLa S3、HEK293、MBA-MB231、HCT116 細胞などを用いて 4 回の大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析を行い、それらの結果を集計した。その結果、主要なキナーゼ 230 種類のうち 186 種類のキナーゼに由来するリン酸化ペプチドが同定された (図 2)。活性化指標リン酸化修飾に着目した場合、例えば EGFR シグナルキナーゼ 28 種類中では 14 種類が同定されていた (図 3)。

大規模ショットガンプロテオミクスで同定できなかったキナーゼに関しては、アフィニティー精製したキナーゼあるいは活性型リコンビナントキナーゼの測定で穴埋めする。2 つの方法を比較した結果、活性型リコンビナントキナーゼを用いた方が簡便で感度も優れていた (図 4)。

現在までに、396 種類の活性型リコンビナントキナーゼの LC-MS/MS 測定が終了している。EGFR シグナル関連キナーゼ 28 種類に関して見てみると、24 種類で活性化指標リン酸化ペプチドが同定されていた (図 3)。同定できなかった 4 種類のうちの 3 つはトリプシン消化物の配列が長く、理論的に考えて質量解析計での同定が難しいものであった。これらの結果は、多くのキナーゼについて、活性化指標リン酸化ペプチドを質量解析計で検出できることを実証した。今後、得られた MS/MS スペクトルデータから SRM 測定パラメータを作成しリスト化する。

## D. 考察

活性型リコンビナントキナーゼのリン酸化プロファイリングなどを行い、質量解析計でキナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドを検出できることを実証した。キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドを網羅的に LC-MS/MS で測定した報告はこれまでに無く、本研究はそれらリン酸化ペプチドの LC-MS/MS 検出を大規模に実証する初めての例となる。

得られた活性化指標リン酸化ペプチドの MS/MS スペクトルから SRM 測定パラメータ作製が可能になった。キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドの同定情報、SRM 測定パラメータ情報のリストは完成後、一般公開する。そのリストを参照することで誰でも、キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドを SRM 定量することができるようになる。したがって、本研究は有用な研究リソースを世の中に提供することになる。

活性型リコンビナントキナーゼの解析で同定できた活性化指標リン酸化ペプチドが、大規模リン酸化ショットガン解析では同定できないケースが存在した。細胞内において、キナーゼの活性化レベルは通常低い状態に抑えられており、特定の刺激により活性化する。したがって、LC-MS/MS によるキナーゼ活性化指標リン酸化ペプチド検出を内在性レベルで検証するには、適切な刺激を与えた細胞で調べて行く必要がある。

キナーゼによっては活性化ループの活性化指標リン酸化修飾を検出できない場合もあった。トリプシン消化物のアミノ酸残基数が極端に長い、もしくは短い場合は検出が難しい。その場合は、活性化ループ以外の部位のリン酸化修飾を標的にすることも

考えている。活性化ループ以外のリン酸化修飾でもキナーゼ活性と相関する可能性があるため、そのようなリン酸化修飾を新たな標的として設定する。

## E. 結論

本研究によって、質量解析計でキナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドを測定できることが明らかになった。平成 25 年度の前半中に、キナーゼ活性化指標リン酸化ペプチドの SRM 測定条件パラメータリストを完成させ、抗 EGFR 抗体薬効果予測診断法に応用する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

① Shiromizu, T., Adachi, J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S. & Tomonaga, T. 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).

② Muraoka, S., Kume, H., Adachi, J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T., Ishihama, Y. & Tomonaga, T. 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).

③ Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K. & Tomonaga, T. A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-22 (2012).

④ Muraoka, S., Kume, H., Watanabe, S., Adachi, J., Kuwano, M., Sato, M., Kawasaki, N., Kodera, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Miyamoto, Y., Kato, K., Tomonaga, T. 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).

## 2. 学会発表

### 招待講演

足立 淳、久家貴寿、白水 崇、橋口一成、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉 毅、高田穰、朝長 毅：リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012 年 9 月 6-9 日

### 一般講演

① 村岡 賢、久米秀明、渡邊史生、桑野晶喜、足立 淳、佐藤三佐子、川崎 直子、石濱 泰、石飛真人、稲治英生、小寺義男、宮本泰豪、加藤菊也、朝長 毅：乳癌膜タンパク質の大規模 iTRAQ-shotgun と SRM 解析によるバイオマーカータンパク質の検証. 日本プロテオーム学会 2012 年大会、東京、2012 年 7 月 26-27 日

② 久家貴寿、久米秀明、川崎直子、足立 淳、星野 敢、松原久裕、朝長 毅：大腸癌手術標本の発現解析とインタラクトーム解析による新規癌関連タンパク質の同定. 日本プロテオーム学会 2012 年会、東京、2012 年 7 月 26-27 日

③ 足立 淳、久家貴寿、白水 崇、久米秀明、村岡 賢、橋口一成、鳴海良平、渡邊史夫、桑野晶喜、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉 毅、高田 穰、朝長 毅：リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本プロテオーム学会 2012 年会、東京、2012 年 7 月 26-27 日

④ 村上達夫、久家貴寿、足立 淳、白水 崇、宮本泰豪、加藤菊也、石飛真人、稲治英生、小寺義男、朝長 毅：大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM/MRM によるヒト

乳癌組織の検証法. 日本プロテオーム学会 2012 年会、東京、2012 年 7 月 26-27 日

⑤ 白水 崇、足立 淳、朝長 毅：同所性移植モデルによる大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会、東京、2012 年 7 月 26-27 日

⑥ 川崎直子、平野賢一、原 康洋、足立 淳、渡邊史生、朝長 毅：プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心血管症のバイオマーカー探索. 日本プロテオーム学会 2012 年大会、東京、2012 年 7 月 26 日-27 日

⑦ 足立 淳、久家貴寿、白水 崇、久米秀明、村岡 賢、橋口一成、鳴海良平、渡邊史生、桑野晶喜、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉 毅、高田 穰、朝長 毅：DNA 損傷初期応答シグナル解析から創薬標的の探索へ. 第 10 回北里疾患プロテオーム研究会、神奈川、2012 年 8 月 23 日

⑧ 村岡 賢、久米秀明、足立 淳、宮本泰豪、加藤菊也、小寺義男、朝長 毅：A strategy for validation of biomarker candidates combining iTRAQ and SRM/MRM assay in breast cancer tissue samples 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19-21 日

⑨ 久家貴寿、久米秀明、足立 淳、星野敢、松原久裕、朝長 毅：オミックス技術を駆使した新規大腸癌関連タンパク質の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19-21 日

⑩ 足立 淳、久家貴寿、白水 崇、久米秀明、村岡 賢、中山敬一、井倉 毅、高田 穰、朝長毅：リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19-21 日

⑪ 村上達夫、久家貴寿、足立 淳、白水 崇、中山敬一、宮本泰豪、加藤菊也、小寺義男、朝長 毅：ヒト乳がん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM をベースにした検証法. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19-21 日

⑫ 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅 “Proteomic analysis of highly metastatic colorectal cancer cells established from orthotopic metastatic mouse model.” 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19-21日

⑬ 橋口一成, 足立 淳, 渡邊史生, 朝長 毅 : Quantitative proteome and phosphoproteome analyses of chromatin proteins upon oxidative base damage. 第36回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日

⑭ 渡部 亮介, 足立 淳, 朝長 毅: Global quantitative phospho-proteomic analysis on the mTOR-mediated signaling pathway. 第35回日本分子生物学会、福岡 2012年12月11-14日

#### 国際学会

① Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T, Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M, Tomonaga T “Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network” Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) 6<sup>th</sup> congress, Beijing, China, 5-7 May, 2012.

② Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based large-scale validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples.” Asia Oceania Human proteome organization 6th Congress,

Beijing, China, May 5-7, 2012.

③ Adachi J, Kuga T, Shiromizu T, Kume H, Muraoka S, Hashiguchi K, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M, Tomonaga T “Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling” HUPO2012 11<sup>th</sup> World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.

④ Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based systematic validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in breast cancer tissue samples.” HUPO2012 11<sup>th</sup> World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.

⑤ Shiromizu T, Adachi J, Tomonaga T “Quantitative proteomic profiling of orthotopic xenograft mouse model of colorectal cancer metastasis.” HUPO2012 11<sup>th</sup> World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.

⑥ Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T “ATP Accessibility Screening (AAS), a high-throughput and high-resolution kinase analysis platform for signaling research” 2<sup>nd</sup> Copenhagen Bioscience Conference, Copenhagen, Denmark, 2-5 December, 2012.

04-110 CDK9 CycE1 (TNSM5K)	08-094 AHL (ABL1) [E255K]	09-147 BRAF (T599) [V609E]	08-164 BTK (BTK)	02-156 PI3K (PI3K)	05-108 TIRK1 (TIRK1)	01-140 PKC (PKCCO)	01-160 SGK3 (SGK3)	08-196 ACK (ACK)	07-02 MAP3K14 (MAP3K14)	04-103 CDK2 CycE (G299A)	08-537 ALK (ALK)	02-113 AMPKα1β (AMPKα1β)	05-155 PKC (PKCA)	01-128 PKACB (PKACB)	05-169 ITK (ITK)	05-127 NFK3 (NFK3)	02-137 DRAK1 (DRAK1)	04-161 NBRK2 (NBRK2)	01-135 PKCδ (PKCδ)	
09-112 HIF1α (HIF1α)	04-155 p38 (MAP3K12)	01-101 PKCε (PKCε)	01-136 MAP2K1 (MAP2K1)	08-158 PDGFβ (PDGFβ)	08-165 BTK (BTK)	08-113 DDR1 (DDR1)	05-115 BRSK1 (BRSK1)	07-138 TNIK (TNIK)	04-104 CDK3 CycE (CDK3 CycE)	04-137 CAMK2α (CAMK2α)	02-109 DAPK3 (DAPK3)	02-156 BRAF (BRAF)	08-521 RET (RET)	02-150 TAO3 (TAO3)	08-128 EPH1 (EPH1)	08-001 MAP3K10 (MAP3K10)	08-185 AHL (AHL)	09-141 TGFβ1 (TGFβ1)	01-103 AKT3 (AKT3)	
08-016 HER2 (ERBB2)	02-147 AMPKα1β (AMPKα1β)	05-108 CAMK2 (CAMK2)	08-529 ALK (ALK)	05-114 IKKε (IKKε)	05-156 PKR (PKR)	08-190 RAF1 (RAF1)	09-125 PI3K (PI3K)	05-159 TNIK (TNIK)	01-124 LATS2 (LATS2)	04-434 D3BK4 (D3BK4)	02-054 PIM1 (PIM1)	02-155 CDK2 CycE (CDK2 CycE)	07-135 GPRK6 (GPRK6)	04-152 AHL (AHL)	08-128 EPH1 (EPH1)	08-001 MAP3K10 (MAP3K10)	08-185 AHL (AHL)	09-141 TGFβ1 (TGFβ1)	01-103 AKT3 (AKT3)	
08-152 RON (MST1R)	04-004 CK1ε (CK1ε)	08-194 EGFR (EGFR)	08-121 EPHA2 (EPHA2)	04-156 CAMK1α (CAMK1α)	01-128 CAMK1α (CAMK1α)	02-411 CAMK2δ (CAMK2δ)	09-134 ALK2 (ALK2)	09-134 ALK2 (ALK2)	04-138 HIFK4 (HIFK4)	05-118 MOS (MOS)	08-122 K66E (K66E)	08-122 EPHA3 (EPHA3)	08-157 PDGFRα (PDGFRα)	08-141 RFBP (RFBP)	04-115 PCTAIRE3 (PCTAIRE3)	09-131 ACVR2A (ACVR2A)	08-179 BMY (BMY)	08-179 BMY (BMY)	08-179 BMY (BMY)	
07-119 IRK (MAP4K4)	04-121 MARR2 (MARR2)	08-179 WNSK1 (WNSK1)	08-123 SHK1 (SHK1)	08-133 EGFR1 (EGFR1)	08-119 EPHA1 (EPHA1)	05-157 JNSBR1 (JNSBR1)	01-109 BOCK1 (BOCK1)	04-129 ZAK (ZAK)	07-124 JAK2 (JAK2)	08-167 ERK (ERK)	04-009 CDK8 CycE (CDK8 CycE)	02-139 DCAMK1 (DCAMK1)	05-009 FTBK2 (FTBK2)	08-149 Y5H1 (Y5H1)	02-122 MARR3 (MARR3)	08-107 AMI (AMI)	08-107 AMI (AMI)	08-107 AMI (AMI)	08-107 AMI (AMI)	
08-163 SRK1 (MAP3K8)	08-174 SRK1 (SRK1)	08-531 FYN (FYN)	04-131 FAO2 (FAO2)	07-133 RIT1 (RIT1)	08-508 M9181 (M9181)	04-116 BRSK2 (BRSK2)	09-145 IRAK4 (IRAK4)	07-141 MAP2K1 (MAP2K1)	02-114 MAP2K1 (MAP2K1)	08-504 CK1α (CK1α)	01-127 PKA (PKA)	08-107 TRK (TRK)	05-036 CAMK1δ (CAMK1δ)	01-149 CK1α (CK1α)	05-117 RSK1 (RSK1)	08-133 NFK9 (NFK9)	04-130 PAK3 (PAK3)	08-532 PAK3 (PAK3)	08-127 FGR2 (FGR2)	08-127 FGR2 (FGR2)
08-535 KIT (V360G/D818Y)	07-145 MAP2K5 (MAP2K5)	01-150 RSK2 (RSK2)	09-132 ACVR2B (ACVR2B)	02-110 CAMK2β (CAMK2β)	07-023 PAK1 (PAK1)	08-134 EGFR2 (EGFR2)	05-111 Haspin (Haspin)	01-106 CDK209 (CDK209)	02-143 DMPK2 (DMPK2)	08-535 PKCβ (PKCβ)	04-146 BTK (BTK)	02-128 PASK (PASK)	05-125 NFK1 (NFK1)	05-185 CK2α2β (CK2α2β)	02-123 MARR4 (MARR4)	08-130 EPH3 (EPH3)	08-127 FGR2 (FGR2)	08-127 FGR2 (FGR2)	08-127 FGR2 (FGR2)	
08-139 JER (JER)	05-226 NFK2 (NFK2)	04-111 CHAK1 (CHAK1)	05-125 MGC42108 (MGC42108)	04-135 NCTN1 (NCTN1)	08-526 NCTN1 (NCTN1)	03-107 YSK1 (YSK1)	07-136 YSK1 (YSK1)	04-112 CDK2.6 CycE (CDK2.6 CycE)	01-142 PKK1 (PKK1)	08-172 JNB (JNB)	08-172 MST2 (MST2)	05-108 MAP3K6 (MAP3K6)	02-166 TSSK3 (TSSK3)	02-166 COT (COT)	08-171 R8K4 (R8K4)	08-517 NPM1-ALK1 (NPM1-ALK1)	04-165 COCK2 CycE (COCK2 CycE)	04-165 COCK2 CycE (COCK2 CycE)	04-165 COCK2 CycE (COCK2 CycE)	
08-198 MET (D1219D)	05-180 WNSK2 (WNSK2)	08-180 CKK2 (CKK2)	08-105 PKCα (PKCα)	09-105 PKD3 (PKD3)	04-135 HMPK1 (HMPK1)	04-133 DYRK3 (DYRK3)	05-519 HIF1β (HIF1β)	08-528 EGFR (EGFR)	07-017 MAP3K5 (MAP3K5)	08-513 JAK2 (JAK2)	08-181 JH1/JH2 (JH1/JH2)	02-364 TSSK1 (TSSK1)	08-170 CK1ε (CK1ε)	05-103 PKC (PKC)	01-141 PKC (PKC)	08-106 LTK (LTK)	01-130 PRKN (PRKN)	05-101 AurA (AurA)	05-101 AurA (AurA)	
08-539 ALK (H151 L11528)	09-138 HMPK10 (HMPK10)	04-132 SHK3 (SHK3)	07-130 PKCε (PKCε)	08-541 HMPK1 (HMPK1)	08-510 EGFR (EGFR)	05-133 CK1γ2 (CK1γ2)	05-106 CK1γ2 (CK1γ2)	08-159 RET (RET)	08-522 RET (RET)	08-187 TRKB (TRKB)	09-135 ALK4 (ALK4)	08-199 K660M (K660M)	08-108 LTK (LTK)	02-120 MARR1 (MARR1)	08-171 LYN (LYN)	09-118 MLK4 (MLK4)	01-123 LAT1 (LAT1)	05-101 AurA (AurA)	05-101 AurA (AurA)	
08-126 EPHA7 (EPHA7)	09-139 HMPK2 (HMPK2)	01-131 HMPK2 (HMPK2)	08-080 BTK (BTK)	08-542 EGFR3 (EGFR3)	08-377 ZAP70 (ZAP70)	08-176 SYK (SYK)	08-123 EPHA4 (EPHA4)	08-516 EGFR (EGFR)	08-173 PDH3 (PDH3)	08-109 TYRO3 (TYRO3)	01-137 MRCKB (MRCKB)	08-144 CDK42BPB (CDK42BPB)	01-145 PKS2 (PKS2)	01-112 ADRB2 (ADRB2)	02-108 CaMK4 (CaMK4)	08-182 TTC (TTC)	09-142 TTC (TTC)	09-143 TTC (TTC)	09-143 TTC (TTC)	
08-189 RET (RET)	05-103 AurC (AurC)	04-147 E67 (E67)	08-125 NDR1 (NDR1)	05-128 NFK1 (NFK1)	02-152 PI3K (PI3K)	07-146 MST1 (MST1)	07-146 MST1 (MST1)	07-148 MAP3K7 (MAP3K7)	02-141 MAP3K2 (MAP3K2)	01-129 PKA (PKA)	08-527 EGFR (EGFR)	05-119 PKS1 (PKS1)	01-144 PKS1 (PKS1)	08-169 LTK (LTK)	05-081 MAP3K13 (MAP3K13)	08-129 WNSK3 (WNSK3)	01-102 BRSK1 (BRSK1)	08-129 p70S6K (p70S6K)	08-129 p70S6K (p70S6K)	
08-419 TAK1 (TAK1)	04-148 MET (MET)	08-540 WNSK2 (WNSK2)	08-128 PKCα (PKCα)	08-105 PKD3 (PKD3)	05-173 LTK (LTK)	08-144 JAK1 (JAK1)	07-144 MAP2K4 (MAP2K4)	08-138 PKS2 (PKS2)	08-503 PKCβ (PKCβ)	08-492 AHL (AHL)	09-101 BRK1 (BRK1)	01-138 MST3 (MST3)	02-163 SSTK (SSTK)	02-163 SSTK (SSTK)	02-131 STK11 (STK11)	09-111 DIK (DIK)	09-111 DIK (DIK)	09-111 DIK (DIK)	09-111 DIK (DIK)	
05-177 WEE1 (WEE1)	08-540 MET (MET)	01-148 HMPK2 (HMPK2)	09-128 HMPK2 (HMPK2)	08-125 HMPK2 (HMPK2)	07-142 MAP2K2 (MAP2K2)	08-543 MST1 (MST1)	08-168 HMPK2 (HMPK2)	08-544 HMPK2 (HMPK2)	09-017 HMPK2 (HMPK2)	08-503 PKCβ (PKCβ)	08-492 AHL (AHL)	09-101 BRK1 (BRK1)	01-138 MST3 (MST3)	02-163 SSTK (SSTK)	02-163 SSTK (SSTK)	02-131 STK11 (STK11)	09-111 DIK (DIK)	09-111 DIK (DIK)	09-111 DIK (DIK)	
05-182 WNSK4 (WNSK4)	08-136 MINK (MINK)	05-158 PKD1 (PKD1)	08-153 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)
08-125 EPHA6 (EPHA6)	05-176 MINK (MINK)	08-125 PKD1 (PKD1)	08-153 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)
04-159 NNSK1 (NNSK1)	05-176 MINK (MINK)	08-125 PKD1 (PKD1)	08-153 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)	08-114 MINK (MINK)
04-140 GSK3α (GSK3α)	02-149 GSK3α (GSK3α)	02-149 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)	08-195 GSK3α (GSK3α)

図1. 活性型リコンビナントキナーゼのリスト



Kinase (230) 赤…1か所以上のリン酸化サイト (186)							
ARAF	CSNK1E	CHUK	MAP2K6	PFKFB2	PRKD2		MTOR
PRKAA1	CSNK1G1	IKKKB	MAP2K7	PFKFB3	PRKD3	ZAP70	RPS6KB1
PRKAA2	CSNK1G2	IKKKE	MAP3K9	PFKFB4	PKM2	ABL1	RPS6KB2
PRKAB1	CSNK1G3	ILK	MAP3K10	FFKL	EIF2AK2	AKT1	PAK1
PRKAB2	CSNK2A1	INSR	MAP3K11	PFKM	PLK1	AKT2	PIK3C2A
PRKAG1	CSNK2B	IRAK1	MLK4	FFKP	PXN	AKT3	PIK3C2B
PRKAG2	MAP3K3	IRAK4	MKNK1	PIKFYVE	PTK2B	CAMK1	PIK3C2G
PRKAG3	CSK	LATS1	MKNK2	PIP5K1A	RAF1	PNCK	PIK3G3
MAP3K5	DAPK1	LATS2	MOS	PIP5K1B	RIPK1	CAMK1D	PIK3CA
ATM	MAP3K12	LCK	RPS6KA5	PIP4K2A	RIPK2	CAMK2A	PIK3CB
ATR	EEF2K	LIMK1	RPS6KA4	PIP4K2B	RIPK3	CAMK2B	PIK3CD
AURKB	MAPK3	LIMK2	STK4	PIP4K2C	ROCK1	CAMK2D	PIK3CG
BRAF	MAPK1	STK11	STK3	PIP5K1C	ROCK2	CAMK2G	PIK3R1
BLK	MAPK6	LYN	PKMYT1	PRKACA	RPS6KA3	CAMK4	PIK3R2
PTK6	MAPK4	MAP3K13	MAP3K14	PRKACB	RPS6KA2	GDK1	PIK3R3
BTX	MAPK15	MAP3K15	NLK	PRKACG	RPS6KA6	FRKDC	PIK3R4
BUB1	FER	MAP4K2	MAPK14	PRKAR1A	SGK1	MAPK7	PIK3R5
CAMKK1	FGR	MAPKAPK2	MAPK11	PRKAR1B	SGK2	PTK2	PIK3R6
CAMKK2	FRK	MAPKAPK3	MAPK13	PRKAR2A	SGK3	GSK3A	SYK
MYLK3	FYN	MAPKAPK5	MAPK12	PRKAR2B	MYLK2	GSK3B	YES1
CDK2	GCK	MARK1	RPS6KA1	PRKCA	MYLK	JAK1	
CDK4	EIF2AK4	MARK2	PAK2	PRKCB	SRC	JAK2	
CDK6	ADRBK1	MARK3	PAK3	PRKCD	MAP3K7	JAK3	
GDK7	HCK	MARK4	PDK1	PRKCE	TAOK1	MAPK8	
CDK8	H1PK2	MAP2K1	PDK2	PRKCG	TAOK2	MAPK9	
CHEK1	HK1	MAP3K2	PDK3	PRKCH	TAOK3	MAPK10	
CHEK2	HK2	MAP3K3	PDK4	PRCKI	TBK1	MAP2K2	
CSNK1A1	HK3	MAP3K4	FDPK1	PRCKQ	TESK1	MAP2K5	
CSNK1A1L	MAP4K1	MAP3K6	EIF2AK3	PRCKZ	TESK2	MAP3K1	
CSNK1D	EIF2AK1	MAP2K4	PFKFB1	PRKD1	WEE1	MAP2K3	

灰色：同定

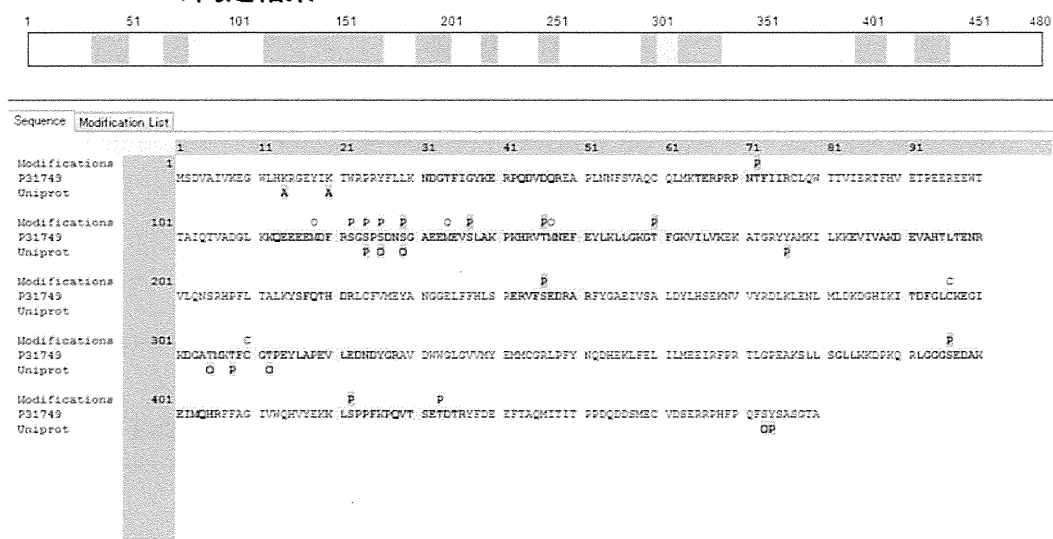
図2. 大規模リン酸化ショットガンプロテーム解析で同定されたキナーゼ

大規模リン酸化ショットガン解析		活性型リコンビナントキナーゼの解析	
ABL1	Y393	ABL1	Y393
AKT1	T308	AKT1	T308
AKT2	T309	AKT2	T309
AKT3	T305	AKT3	T305
CAMK1	T177	CAMK1	T177
CAMK1D	T180	CAMK1D	T180
CAMK4	T200	CAMK4	T200
CDK1	T161	CDK1	T161
GSK3A	Y279	GSK3A	Y279
GSK3B	Y216	GSK3B	Y216
JAK1	Y1034, 1035	JAK1	Y1034, 1035
JAK2	Y1007, 1008	JAK2	Y1007, 1008
JAK3	Y980, 981	JAK3	Y980, 981
MAP2K2	S222, 226	MAP2K2	S222, 226
MAP2K3	S218	MAP2K3	S218
MAP2K5	S311	MAP2K5	S311
MAPK10	T221, Y223	MAPK10	T221, Y223
MAPK7	Y220	MAPK7	Y220
MAPK8	T183, Y185	MAPK8	T183, Y185
MAPK9	T183, Y185	MAPK9	T183, Y185
PAK1	T423	PAK1	T423
PNCK	T171	PNCK	T171
PRKDC	T3950	PRKDC	T3950
PTK2	Y576, 577	PTK2	Y576, 577
RPS6KB1	T252	RPS6KB1	T252
RPS6KB2	T228	RPS6KB2	T228
SYK	Y525, 526	SYK	Y525, 526
YES1	Y426	YES1	Y426

灰色：同定

図3. 大規模リン酸化ショットガンプロテオーム解析あるいは活性型リコンビナントキナーゼ解析で同定された EGFR シグナル関連キナーゼの活性化指標リン酸化ペプチド

## FLAG-Akt1 の同定結果



## 活性型リコンビナント Akt1 の同定結果

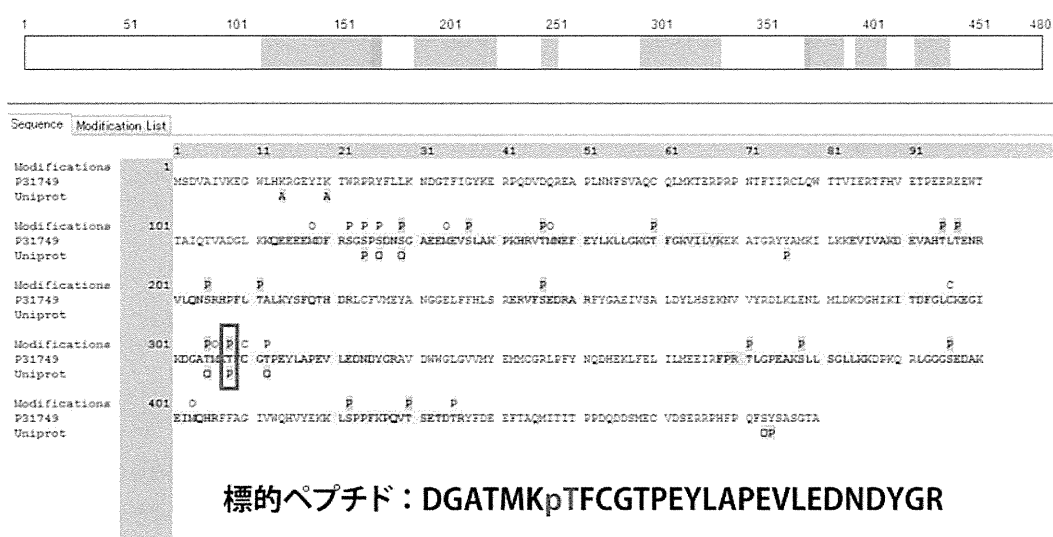


図4. アフィニティー精製 FLAG-Akt1 と活性型リコンビナント Akt1 の同定結果  
 FLAG-Akt1 を培養細胞に遺伝子導入し、FLAG 抗体でアフィニティー精製した。活性型リコンビナント Akt1 は企業から提供を受けた。それぞれ、トリプシン消化した後、IMAC 法でリン酸化ペプチドを精製し、LTQ-Orbitrap Velos でショットガン解析した。配色されたアミノ酸配列は同定されたペプチド配列を意味する。アミノ酸配列の上側に示された文字は同定されたアミノ酸修飾を意味し、下側は既知の修飾情報を意味する。枠で囲まれた Thr は Akt1 の活性化指標リン酸化修飾サイトであり、活性型リコンビナント Akt1 では活性化指標リン酸化ペプチドが同定された。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に用いる臨床検体の収集（実施責任者）

研究分担者 松原久裕 千葉大学大学院医学研究院  
先端応用外科学 教授

研究要旨

抗 EGFR 抗体薬効果予測法の検証に用いる臨床検体の収集に関して実施責任を負う。

A. 研究目的

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法で抗 EGFR 抗体薬の効果予測が可能かどうかを検証する際に用いる臨床検体を収集する。臨床検体の収集は千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査委員会で承認されたプロトコル（課題名：消化管腫瘍における遺伝子・蛋白動態解析研究）に従って行う。

B. 研究方法

千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科を受診する者のうち、検査結果から消化管腫瘍と診断された者の外科的切除標本を収集する。

研究全般にあたり、平成 17 年 4 月 1 日施行の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。

<研究対象となる個人の人権の擁護>

試料提供に同ずるか否かは対象者の自由意思であり、試料提供しない場合でも不利益を受けることはない。いったん同意した場合でも不利益を受けることなく、いつでも撤回することができる。これらを明文化した説明書を用いて説明することで、対象

者の人権擁護に配慮する。

<対象者に理解を求め同意を得る方法>

患者本人に対し文書を用いて以下の項目を説明し、自由意思に基づく文書による同意を受ける。

1. 研究概要
2. 研究の意義・目的
3. 研究の方法
4. 費用について
5. 個人情報の保護
6. 予測される結果について、遺伝子解析結果・研究計画の開示について
7. 研究成果の公表について
8. 試料などの他の研究への利用について
9. 研究協力することによる利益と不利益
10. 遺伝カウンセリングについて
11. 問い合わせ等の連絡先

<個人情報の保護の方法>

患者の個人情報が外部に洩れることのないように厳重に管理する。試料は個人情報管理者及び分担管理者を設け、連結可能匿名化することにより研究者に患者の特定ができないようする。

### C. 研究結果

約一年間の間に約 70 の大腸癌切除標本を収集した。その間、倫理面への配慮は確実になされており、患者に不利益を与える問題は一切起きていない。

### D. 考察と結論

今後も倫理面への配慮を確実に実行しながら試料収集を進める。収集した試料を用いて抗 EGFR 抗体薬の効果予測法を確立することで、患者や社会に還元することができるかと期待している。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kajiwara T, Matsushita K, Itoga S, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Habara Y, Matsuo M, Nomura F.(2013) SAP155-mediated c-myc suppressor far-upstream element-binding protein-interacting repressor splicing variants are activated in colon cancer tissues. *Cancer Sci.*104(2):149-156.

Takeshita N, Hoshino I, Mori M, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Komatsu A, Jitsukawa M, Matsubara H.(2013) Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.*108(3): 644-652.

Akutsu Y., Uesato M., Shuto K., Kono T., Hoshino I., Horibe D., Sazuka T., Takeshita N., Maruyama T., Isozaki Y., Akanuma N., Matsubara H. (2012) The Overall Prevalence of Metastasis in T1 Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Analysis of 295 Patients. *Ann. Surg.*(in press.)

Suganami A, Toyota T, Okazaki S, Saito K, Miyamoto K, Akutsu Y, Kawahira H, Aoki A, Muraki Y, Madono T, Hayashi H, Matsubara H, Omatsu T, Shirasawa H, Tamura Y.(2012) Preparation and characterization of phospholipid-conjugated indocyanine green as a near-infrared probe. *Bioorg Med Chem*

*Lett.*22(24): 7481-7485.

Saito K, Katsuno T, Nakagawa T, Saito M, Sazuka S, Sato T, Matsumura T, Arai M, Miyauchi H, Matsubara H, Yokosuka O.(2012) Predictive factors of response to intravenous ciclosporin in severe ulcerative colitis: the development of a novel prediction formula. *Aliment Pharmacol Ther.*36(8): 744-754.

Takeshita N, Mori M, Kano M, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Miyazawa Y, Matsubara H. (2012) miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1. *Int. J. Oncol.* 41(5):1653-61.

Kono K, Iinuma H, Akutsu Y, Tanaka H, Hayashi N, Uchikado Y, Noguchi T, Fujii H, Okinaka K, Fukushima R, Matsubara H, Ohira M, Baba H, Natsugoe S, Kitano S, Takeda K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y. (2012) Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with three peptides derived from novel cancer-testis antigens. *J. Transl. Med.*10:141

Isozaki Y, Hoshino I, Nohata N, Kinoshita T, Akutsu Y, Hanari N, Mori M, Yoneyama Y, Akanuma N, Takeshita N, Maruyama T, Seki N, Nishino N, Yoshida M, Matsubara H. (2012) Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-375 induced by histone acetylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 41(3):985-94.

Matsushita K, Kajiwara T, Tamura M, Satoh M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Yoshimoto R, Ito A, Kubo S, Natsume T, Levens D, Yoshida M, Nomura F. (2012) SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor serves as a molecular switch for c-myc gene expression. *Mol. Cancer Res.* 10(6):787-99.

Obul J, Itoga S, Abliz M, Sato K, Ishige T, Utsuno E, Matsushita K, Matsubara H, Nomura F. (2012) High-resolution melting analyses for gene scanning of APC, MLH1, MSH2, and MSH6 associated with hereditary colorectal cancer. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 16(5):406-11.

Aoyagi T, Shuto K, Okazumi S, Hayano K, Satoh A, Saitoh H, Shimada H, Nabeya Y, Kazama T, Matsubara H. (2012) Apparent diffusion coefficient correlation with oesophageal tumour stroma and angiogenesis. *Eur. Radiol.* 22(6):1172-7.

Akutsu Y., Yasuda S., Nagata M., Izumi Y., Okazumi S., Shimada H., Nakatani Y., Tsujii H., Kamada T., Yamada S., Matsubara H. (2012) A phase I/II clinical trial of preoperative short-course carbon-ion radiotherapy for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *J. Surg. Oncol.* 105(8):750-55.

Akutsu Y, Shuto K, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Shiratori T, Isozaki Y, Akanuma N, Uno T, Matsubara H. (2012) The number of pathologic lymph nodes involved is still a significant prognostic factor even after neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 105(8):756-60.

Usui A, Hoshino I, Akutsu Y, Sakata H, Nishimori T, Murakami K, Kano M, Shuto K, Matsubara H. (2012) The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 118(13):3387-96.

## 2. 学会発表

松原久裕. (2013) 千葉大学バイオバンクの立ち上げ. : 千葉大学 COE スタートアップシンポジウム「戦略的臨床検体活用による消化器癌研究拠点」特別シンポジウム. 2013.3.5. 千葉

松原久裕. (2013) 食道癌の最新治療開発. :

第31回開腹術後管理研究会, 講演. 2013.3.1. 和歌山

松原久裕. (2012) 消化器外科: 食道癌の外科治療 右開胸食道癌 3 領域郭清における低侵襲化. : 第1回国際協力型腫瘍外科学指導者コース 手術手技合同ビデオカンファレンス, 講演. 2012.11.17. 筑波

松原久裕. (2012) 食道がん治療の breakthrough をめざして. : 第59回北日本放射線腫瘍学研究会, 特別講演. 2012.11.15. 仙台

松原久裕, 星野敢, 阿久津泰典, 首藤潔彦, 河野世章, 上里昌也, 郡司久, 佐塚哲太郎, 栃木透, 會田直弘. (2012) 食道疾患のエキスパートとなるための当科の教育システムと課題. : 第66回日本食道学会学術集会, シンポジウム. 2012.6.21. 長野

松原久裕. (2012) 食道癌を中心とした食道疾患治療における今後の展望. : 第66回日本食道学会学術集会, 特別セッション. 2012.6.21. 長野

松原久裕. (2012) 食道癌における縦隔リンパ節郭清の工夫. : 第112回日本外科学会定期学術集会, 特別ビデオセッション. 2012.4.13. 千葉

## F. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ PCT 国際出願 PCT/JP2012/076259 (2013.4.11.公開済)  
「リポソーム複合体」

発明者: 岡本芳晴, 田村裕, 菅波晃子, 林秀樹, 真殿智行, 松原久裕, 豊田太郎.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に用いる臨床検体の収集（実施者）

研究分担者 星野敢 千葉大学医学部附属病院  
消化器外科学 助教

研究要旨

キナーゼ活性化 SRM 法を用いた抗 EGFR 抗体薬効果予測法の検証に用いる臨床検体を収集する。

A. 研究目的

キナーゼ活性化レベル測定 SRM 法で EGFR 抗体薬の効果予測が可能かどうかを検証するために、臨床検体を収集する。タンパク質解析などに使用することを考慮し、外科的切除後に迅速に凍結保存する。

B. 研究方法

千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科を受診する者のうち、検査結果から消化管腫瘍と診断された者の外科的切除標本を収集する。

研究全般にあたり、平成 17 年 4 月 1 日施行の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、千葉大学大学院医学研究院生命倫理審査委員会で承認されたプロトコルに従う（課題名：消化管腫瘍における遺伝子・蛋白動態解析研究、詳細は松原久裕の分担報告書を参照）。

切除標本の保存条件はタンパク質の安定性やキナーゼの活性化指標リン酸化修飾の状態などに影響を与える可能性が有る。キナーゼの分解や脱リン酸化などを可能な限り防ぐ事を目的に、切除後は生理食塩水を

含ませたガーゼに包んだ状態で低温下

（4℃）に置き、1～2時間以内に約 5x5x5 mm の組織片を-80℃で凍結保存する。

また、切除標本の保存条件がキナーゼの活性化指標リン酸化修飾に与える影響を調べるために、同一切除標本から取った組織片を、異なる時間経過後に凍結保存したものを収集する。

C. 研究結果

約一年間の間に約 70 症例の大腸癌切除標本（癌部および周辺非癌部組織）を収集した。そのうち、38 症例は 1 時間以内に凍結保存した。セツキシマブもしくはパニツムマブが投与された症例は 6 例であった。

また、切除直後に凍結保存した検体と、2～4 時間後に凍結保存した検体のセットを 2 セット収集した。

D. 考察と結論

これまで、手術切除標本の解析では保存条件があまり考慮されていない例が多かった。本研究では、できる限り摘出後 1～2 時間以内に凍結保存することを心がけた。

本研究で収集した検体は、切除から保存までの時間を記録しているため、今後解析が進むにつれてキナーゼ活性化レベル測定 SRM 法に最適な保存条件が明らかになってくるものと思われる。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Hoshino I, Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. Surg Today. Epub 2012 Nov 6.
2. Akutsu Y, Uesato M, Shuto K, Kono T, Hoshino I, Horibe D, Sazuka T, Takeshita N, Maruyama T, Isozaki Y, Akanuma N, Matsubara H. The Overall Prevalence of Metastasis in T1 Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Analysis of 295 Patients. Ann Surg. 2012 Oct 26.
3. Akutsu Y, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Murakami K, Fujishiro T, Imanishi S, Endo S, Toyozumi T, Matsubara H. Are additional trace elements necessary in total parenteral nutrition for patients with esophageal cancer receiving Cisplatin-based chemotherapy? Biol Trace Elem Res. 2012 Dec;150(1-3):109-15.
4. Takeshita N, Mori M, Kano M, Hoshino I, Akutsu Y, Hanari N, Yoneyama Y, Ikeda N, Isozaki Y, Maruyama T, Akanuma N, Miyazawa Y, Matsubara H. miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1. Int J Oncol. 2012 Nov;41(5):1653-61.
5. Isozaki Y, Hoshino I, Nohata N, Kinoshita T, Akutsu Y, Hanari N, Mori M, Yoneyama Y, Akanuma N, Takeshita N, Maruyama T, Seki N, Nishino N, Yoshida M, Matsubara H. Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-375 induced by histone acetylation in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2012 Sep;41(3):985-94.
6. Akanuma N, Hoshino I, Akutsu Y, Shuto K, Shiratori T, Kono T, Uesato M, Sato A, Isozaki Y, Maruyama T, Takeshita N, Matsubara H. Primary esophageal adenocarcinoma arising from heterotopic gastric mucosa: report of a case. Surg Today. Epub 2012 Jun 17.
7. Akutsu Y, Shuto K, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Shiratori T, Miyazawa Y, Isozaki Y, Akanuma N, Matsubara H. A phase 1/11 study of second-line chemotherapy with fractionated docetaxel and nedaplatin for 5-FU/cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma.

Hepatogastroenterology. 2012  
Oct;59(119):2095-8.

8. Akutsu Y, Shuto K, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Shiratori T, Isozaki Y, Akanuma N, Uno T, Matsubara H. The number of pathologic lymph nodes involved is still a significant prognostic factor even after neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma. J Surg Oncol. 2012 Jun 15;105(8):756-60.
9. Usui A, Hoshino I, Akutsu Y, Sakata H, Nishimori T, Murakami K, Kano M, Shuto K, Matsubara H. The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma. Cancer. 2012 Jul 1;118(13):3387-96.

#### 学会発表

1. 星野敢, 丸山 哲郎, 阿久津 泰典, 羽成 直行, 森 幹人, 村上 健太郎, 遠藤 悟史, 赤沼 直毅, 磯崎 由佳, 竹下 伸由, 松原 久裕, ICG リポソームを用いた、近赤外光審査腹腔鏡の有用性の基礎的検討, 第25回日本内視鏡外科学会総会
2. 星野敢, 阿久津 泰典, 首藤 潔彦, 河野 世章, 上里 昌也, 成島 一夫, 今西 俊介, 竹下 修由, 豊住 武司, 松原 久裕,

外科医の教育 消化器外科エキスパート育成のための当科の教育システムと課題, 第74回日本臨床外科学会総会

3. 星野敢, 豊住 武司, 佐藤 麻美, 阿久津 泰典, 首藤 潔彦, 河野 世章, 上里 昌也, 成島 一夫, 今西 俊介, 竹下 修由, 松原 久裕, 当科における食道内分泌腫瘍術前化学療法は有効か?, 第50回日本癌治療学術集会
4. 星野敢, 阿久津 泰典, 小松 亜樹, 羽成 直行, 森 幹人, 米山 泰生, 池田 憲政, 赤沼 直毅, 磯崎 由佳, 丸山 哲郎, 竹下 修由, Wei Qin, Gulbostan Yusup, 鈴木 孝禎, 松原 久裕, 食道扁平上皮癌細胞株におけるヒストン脱メチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果の検討, 第66回日本食道学会学術集会
5. 星野敢, 竹下 修由, 松原 久裕, 消化器がん検診における新しい診断法の展開 新規バイオマーカーとしての血中 circulating micro RNA の有用性, JDDW2012

6. 星野敢, 阿久津 泰典, 羽成 直行, 森 幹人, 米山 泰生, 池田 憲政, 赤沼 直毅, 磯崎 由佳, 丸山 哲郎, 竹下 修由, 鈴木 孝禎, 松原 久裕食道扁平上皮癌細胞株におけるヒストン脱メチル化酵素阻害剤の抗腫瘍効果の検討(Antitumor effects of histone demethylase inhibition on esophageal squamous cell carcinoma), 第72回日本癌学会学術総会



研究成果の刊行に関する一覧表

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
久家貴寿 足立淳 朝長毅	A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples.	J Proteome Res	11	5311-5322	2012
足立淳 朝長毅	A strategy for SRM-based verification of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples.	J Proteome Res	11	4201-4210	2012

## A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples

Ryohei Narumi,<sup>#,†</sup> Tatsuo Murakami,<sup>#,†</sup> Takahisa Kuga,<sup>†</sup> Jun Adachi,<sup>†</sup> Takashi Shiromizu,<sup>†</sup> Satoshi Muraoka,<sup>†</sup> Hideaki Kume,<sup>†</sup> Yoshio Kodera,<sup>‡,§</sup> Masaki Matsumoto,<sup>||</sup> Keiichi Nakayama,<sup>||</sup> Yasuhide Miyamoto,<sup>⊥</sup> Makoto Ishitobi,<sup>¶</sup> Hideo Inaji,<sup>¶</sup> Kikuya Kato,<sup>∇</sup> and Takeshi Tomonaga<sup>\*,†,§</sup>

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

<sup>‡</sup>Laboratory of Biomolecular Dynamics, Department of Physics, Kitasato University School of Science, Kanagawa, Japan

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

<sup>||</sup>Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University Fukuoka, Japan

<sup>⊥</sup>Department of Immunology, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka, Japan

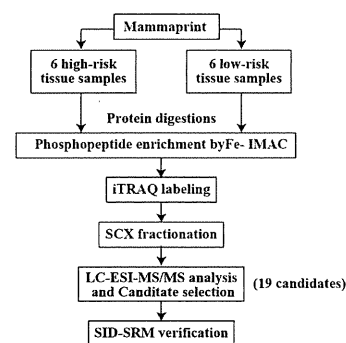
<sup>¶</sup>Department of Breast and Endocrine Surgery, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka, Japan

<sup>∇</sup>Research Institute, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka, Japan

### Supporting Information

**ABSTRACT:** Protein phosphorylation is a key mechanism of cellular signaling pathways and aberrant phosphorylation has been implicated in a number of human diseases. Thus, approaches in phosphoproteomics can contribute to the identification of key biomarkers to assess disease pathogenesis and drug targets. Moreover, careful validation of large-scale phosphoproteome analysis, which is lacking in the current protein-based biomarker discovery, significantly increases the value of identified biomarkers. Here, we performed large-scale differential phosphoproteome analysis using IMAC coupled with the isobaric tag for relative quantification (iTRAQ) technique and subsequent validation by selected/multiple reaction monitoring (SRM/MRM) of human breast cancer tissues in high- and low-risk recurrence groups. We identified 8309 phosphorylation sites on 3401 proteins, of which 3766 phosphopeptides (1927 phosphoproteins) were able to be quantified and 133 phosphopeptides (117 phosphoproteins) were differentially expressed between the two groups. Among them, 19 phosphopeptides were selected for further verification and 15 were successfully quantified by SRM using stable isotope peptides as a reference. The ratio of phosphopeptides between high- and low-risk groups quantified by SRM was well correlated with iTRAQ-based quantification with a few exceptions. These results suggest that large-scale phosphoproteome quantification coupled with SRM-based validation is a powerful tool for biomarker discovery using clinical samples.

**KEYWORDS:** phosphoproteome, iTRAQ, SRM, mammaprint, breast cancer tissue



### INTRODUCTION

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, inflammation, and metabolic disorders.<sup>1–4</sup> Recent advances in proteomics, especially phosphopeptide enrichment strategies<sup>5</sup> and improved isotope labeling,<sup>6,7</sup> enabled not only the identification of up to several thousands of site-specific phosphorylation events within one large-scale analysis<sup>8–18</sup> but also accurate quantification of the phosphopeptides/proteins.<sup>19–22</sup> Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is a widely used affinity-based technique for the enrichment of phosphopeptides prior to MS analysis. Metal ions are chelated to nitrilotriacetic acid- or iminodiacetic acid-coated beads, forming a stationary phase to which negatively charged phosphopeptides in a mobile phase can bind.<sup>9</sup> Isotope labeling techniques are classified into two groups, metabolic labeling and chemical

labeling; representative examples of each label are stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)<sup>6</sup> and isobaric tag for relative and absolute quantification (iTRAQ), respectively.

This large-scale phosphoproteome analysis has recently been applied to biomarker discovery using cell culture and tumor model mice. Zanivan et al. analyzed the phosphoproteome of tumor tissues of melanoma model mice and identified more than 5600 phosphorylation sites on 2250 proteins, which included many hits from pathways important in melanoma.<sup>23</sup> Despite such a large effort to generate a list of biomarker candidates, extensive validation by other methods is needed for application as a biomarker. Currently, the most commonly used approach for verification is Western blotting and sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); however, antibody

Received: June 18, 2012

Published: September 17, 2012

reagents of sufficient specificity and sensitivity for the assays are generally not available, especially for phosphoproteins. Also, the high cost and long development time required to generate high-quality reagents are limiting factors; therefore, the development of an alternate method for verification with high reproducibility and throughput is needed to improve the success rate of approved biomarkers.<sup>24</sup>

A new mass spectrometry-based analytical platform called selected reaction monitoring (SRM) or multiple reaction monitoring (MRM) is a very sensitive technique for the quantification of targeted proteins and peptides, which makes it possible to verify biomarker candidate proteins.<sup>25</sup> Suitable sets of precursor and fragment ion masses for a given peptide, called SRM transitions, constitute definitive mass spectrometry assays that identify peptides and the corresponding proteins. More recently, SRM using stable isotope peptides has been adapted to measure the concentrations of candidate protein biomarkers in cell lysates as well as human plasma and serum.<sup>26–29</sup> Consequently, SRM technology shows potential to bridge the gap between the generation of candidate lists and their verification in biological specimens.

In this study, we applied large-scale phosphoproteome analysis and SRM-based quantitation to develop a strategy for the systematic discovery and validation of biomarkers using tissue samples. We first identified differentially expressed phosphopeptides, using IMAC coupled with the iTRAQ technique, between high- and low-risk recurrence groups of breast cancer predicted by MammaPrint, an FDA-approved breast cancer recurrence assay. The identified phosphopeptides were validated by the SRM method, which can find biomarkers of breast cancer, augmenting MammaPrint. This systematic approach has enormous potential for the discovery of bona fide disease biomarkers.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Human Tissue Samples

Tumor tissue samples were obtained from 12 patients with breast cancer at Osaka Medical Center for Cancer & Cardiovascular Diseases. Information about the 12 patients is summarized in Supporting Information Table S1. Tissue samples were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The patients were classified into good (low-risk) or poor (high-risk) prognosis groups using MammaPrint, as described previously.<sup>30</sup> Written informed consent was obtained from each patient before surgery. The protocol was approved by the ethics committees of the Proteome Research Center, National Institute of Biomedical Innovation and the Osaka Medical Center for Cancer & Cardiovascular Diseases.

### Protein Extraction and Digestion

Protein extraction and proteolytic digestion were performed using a phase-transfer surfactant protocol.<sup>31</sup> Tissue samples or pellets of cultured cells were homogenized by sonication in a lysis buffer [12 mM sodium deoxycholate, 12 mM sodium *N*-lauroylsarcosinate, 50 mM ammonium bicarbonate, and PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)]. Protein concentration was determined by a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A sample of 2 mg (for iTRAQ) or 500  $\mu\text{g}$  (for SRM) of extracted proteins was reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT), alkylated with 50 mM iodoacetamide (IAA), and diluted by 5 times with 50 mM ammonium bicarbonate solution, and sequentially digested by 1:100 (w/w)

LysC (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) for 8 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and 1:100 (w/w) trypsin (proteomics grade; Roche) for 12 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . An equal volume of an organic solvent, ethyl acetate, was added to the digested samples; the mixtures were acidified by 1% trifluoroacetic acid (TFA) and vortexed to transfer the detergents to the organic phase. After centrifugation, the aqueous phase containing peptides was collected.

### Enrichment of Phosphopeptides

Phosphopeptide enrichment was performed using immobilized Fe (III) affinity chromatography [Fe-IMAC], as described previously.<sup>32</sup> The Fe-IMAC resin was prepared from Probond (Nickel-Chelating Resin; (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)) by substituting  $\text{Ni}^{2+}$  on the resin with  $\text{Fe}^{3+}$ .  $\text{Ni}^{2+}$  was released from Probond upon treatment with 50 mM EDTA-2Na, and then  $\text{Fe}^{3+}$  was chelated to ion-free resin upon incubation with 100 mM  $\text{FeCl}_3$  in 0.1% acetic acid. Fe-IMAC resin was packed into an open column for large-scale enrichment or on an Empore C18 disk in a 200- $\mu\text{L}$  pipet tip for small-scale enrichment.<sup>33</sup> After equilibration of the resin with loading solution (60% acetonitrile/0.1% TFA), peptide mixture was loaded onto the IMAC column (200  $\mu\text{g}$  total peptides per 100  $\mu\text{L}$  resin). After washing with loading solution (9 times volume of IMAC resin) and 0.1% TFA (3 times volume of IMAC resin), phosphopeptides were eluted by 1% phosphoric acid (2 times volume of IMAC resin).

### iTRAQ Analysis

**iTRAQ Labeling.** Enriched phosphopeptides were labeled with isobaric tags for relative and absolute quantification reagents (iTRAQ 4 plex; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Phosphopeptide mixtures desalted with C18 Stage-Tips were incubated in iTRAQ reagents for 1 h. iTRAQ 115, 116, and 117 were used for labeling individual samples, and iTRAQ 114 was used as the reference sample, a mixture of aliquots of all samples. The reaction was terminated by the addition of an equal volume of distilled water. The labeled samples were combined, acidified by TFA, and desalted with C18-Stage Tips. Four sets of iTRAQ experiments were performed to compare the phosphorylation profiles of 12 tissue samples

**Strong Cation Exchange Chromatography (SCX).** The labeled peptides were fractionated using an HPLC system (Shimadzu Prominence UFLC) fitted with an SCX column (50 mm  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , ZORBAX 300SCX; Agilent Technology). The mobile phases consisted of buffers A [25% acetonitrile and 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3)] and B [25% acetonitrile, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3), and 1 M KCl]. The labeled peptides were dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of buffer A and separated at a flow rate of 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  using a four-step linear gradient: 0% B for 30 min, 0–10% B in 15 min, 10–25% B in 10 min, 25–40% B in 5 min, and 40–100% B in 5 min, and then 100% B for 10 min. Thirty fractions were collected and desalted with C18-Stage Tips.

**LC–MS/MS Analysis.** Fractionated peptides were analyzed by an LTQ–Orbitrap XL or Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a nanoLC interface (AMR, Tokyo, Japan), a nanoHPLC system (Michrom Paradigm MS2), and an HTC-PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). The analytical column was made in-house by packing L-column2 C18 particles [Chemical Evaluation and Research Institute (CERI), Japan] into a self-pulled needle (200 mm length  $\times$  100  $\mu\text{m}$  inner diameter). The mobile phases consisted of buffers A (0.1% formic

acid and 2% acetonitrile) and B (0.1% formic acid and 90% acetonitrile). Samples dissolved in buffer A were loaded onto a trap column (0.3 × 5 mm, L-column ODS; CERI). The nanoLC gradient was delivered at 500 nL/min and consisted of a linear gradient of buffer B developed from 5 to 30% B in 135 min. A spray voltage of 2000 V was applied.

Full MS scans were performed using the orbitrap mass analyzer (scan range 350–1500  $m/z$ , with 30000 fwhm resolution at 400  $m/z$ ). The three (LTQ XL) or five (LTQ Velos) most intense precursor ions were selected for the MS/MS scans, which were performed using collision-induced dissociation (CID) and higher energy collision-induced dissociation (HCD, 7500 fwhm resolution at 400  $m/z$ ) for each precursor ion. The dynamic exclusion option was implemented with a repeat count of 1 and exclusion duration of 60 s. The values of automated gain control (AGC) were set to  $5.00 \times 10^5$  for full MS,  $1.00 \times 10^4$  for CID MS/MS, and  $5.00 \times 10^4$  for HCD MS/MS. The normalized collision energy values were set to 35% for CID and 50% for HCD.

The CID and HCD raw spectra were extracted and searched separately against the human IPI database (version 3.67) combined with the reverse-decoy database using Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) and Mascot v2.3. The precursor mass tolerance was set to 3 ppm, and fragment ion mass tolerance was set to 0.6 Da for CID and 0.01 Da for HCD. The search parameters allowed one missed cleavage for trypsin, fixed modifications (carbamidomethylation at cysteine and iTRAQ labeling at lysine and the N-terminal residue), and variable modifications (oxidation at methionine, iTRAQ labeling at tyrosine, and phosphorylation at serine, threonine, and tyrosine). In the workflow of Proteome Discoverer 1.3, following the Mascot search, the phosphorylated sites on the identified peptides were assigned again using the PhosphoRS algorithm, which calculated the possibility of the phosphorylated site from the spectra matching the identified peptides.<sup>34</sup> The score threshold for peptide identification was set at 1% false-discovery rate (FDR) and 75% phosphoRS site probability. Peptides identified at a threshold with 5% FDR were also accepted in the case that a peptide with the same sequence was identified at a threshold with 1% FDR in any other three iTRAQ experiments.

The iTRAQ quantitation values were automatically calculated on the basis of the intensity of the iTRAQ reporter ions in the HCD scans using Proteome Discoverer. Quantitation of peptides identified from CID scans was performed using the reporter ion information extracted from the HCD spectra of the same precursor peptide. In the case that peptides with the same sequence were identified repeatedly from different precursor peptides in the same iTRAQ experiment, the median of their quantitation values was calculated. For comparison among 4 sets of iTRAQ experiments, iTRAQ quantitation values of individual samples (iTRAQ 115, 116, and 117) were normalized with the values of the reference sample (iTRAQ 114) in each iTRAQ experiment.

#### SRM Analysis

**Stable Isotope-Labeled Peptides.** For SRM measurement of the 19 targeted phosphopeptides, stable isotope-labeled peptides (SI peptides, crude grade) were synthesized (Thermo Fisher Scientific, Ulm, Germany). A single lysine, arginine, or alanine was replaced by isotope-labeled lysine ( $^{13}\text{C}_6$ , 98%;  $^{15}\text{N}_2$ , 98%), arginine ( $^{13}\text{C}_6$ , 98%;  $^{15}\text{N}_4$ , 98%), or alanine ( $^{13}\text{C}_3$ , 98%;  $^{15}\text{N}_1$ , 98%). The SI peptides were dissolved

in distilled water at a concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . A mixture of these SI peptides was added to each sample during the period between tryptic digestion and detergent extraction processes in the PTS protocol.

**Setting SRM Transition.** First, the mixture of SI peptides was analyzed by LC-MS/MS using LTQ-Orbitrap XL (CID mode), and an msf file was generated using Proteome Discoverer and Mascot. The msf file was opened with Pinpoint software (version 2.3.0; Thermo Scientific), and a list of MS/MS fragment ions derived from SI peptides was generated. Four MS/MS fragment ions were selected for SRM transitions of each targeted peptide based on the following criteria:  $y$ -ion series, strong ion intensity, at least 2 amino acids in length, and no signature of neutral loss.

**LC-SRM.** Protein extracts were digested, spiked with the SI peptides, and subjected to phospho-enrichment with IMAC. The enriched phosphopeptides dissolved in 2% acetonitrile solution containing 0.1% TFA and 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EDTA were analyzed by a TSQ-Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with the LC system mentioned above. The parameters of the instrument were set as follows: 0.002  $m/z$  scan width, 0.7 fwhm Q1 resolution, 1 s cycle time, and 1.8 mTorr gas pressure. The S-lens voltage was set to a normalized value determined using polytyrosine and angiotensin II as references. Collision energy (CE) was optimized for every SRM transition around the theoretical value calculated according to the following formulas:  $\text{CE} = 0.044(m/z) + 5.5$  for doubly charged precursor ions and  $\text{CE} = 0.051(m/z) + 0.55$  for triply charged precursor ions. If the theoretical value was over 35 eV, the value was set to 35 eV. The nanoLC gradient was delivered at 300 nL/min and consisted of a linear gradient of mobile phase B developed from 5 to 23% B in 45 min. A spray voltage of 1800 V was applied. Data were acquired in time-scheduled SRM mode (retention time window: 8 min). Targeted phosphopeptides were quantified using Pinpoint. The peak area in the chromatogram of each SRM transition was calculated, and the values of endogenous targeted peptides were normalized to those of the corresponding SI peptides. SRM transition peak with more than 3 times the standard deviation of the average value of the blanks was used for quantitation. We checked that ratios among the peak areas of individual SRM transitions for each targeted phosphopeptide were comparable to those of the corresponding SI peptide.

#### Western Blot Analysis

Proteins were separated by electrophoresis on 5–20% gradient gels (DRC, Tokyo, Japan) and transferred to an Immobilon-P Transfer membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ) (Millipore, Bedford, MA, USA) in a tank-transfer apparatus. The membrane was blocked with Immuno Block (DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan). Anti-Mucin-1 antibody (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), diluted 1:1000 in blocking buffer, was used as the primary antibody. Goat anti-Armenian Hamster IgG horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA), diluted 1:5000 in blocking buffer, was used as the secondary antibody. Antigens on membranes were detected with enhanced chemiluminescence detection reagents (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.).