

エクストドメインシェディング、リシンアシル化、
およびホスファターゼ大規模解析のための
プロテオミクス基盤技術の開発

2021

津 曲 和 哉

目次

略語表.....	3
緒言.....	6
第一章 ショットガンプロテオミクスによるエクストドメインシェディング大規模解析.....	10
第一節 序.....	10
第二節 ターミノミクスによる大規模シェディング切断部位同定.....	15
第三節 BB-94 による細胞株選択的なシェディングの抑制.....	25
第四節 遊離が減少した膜タンパク質のトポロジー解析およびそれらの切断部位の位置解析.....	27
第五節 シェディングの生理機能解析.....	33
第六節 シェディングの細胞株特異性.....	35
第七節 Position weight matrix スコアリングによる責任シェダーゼ予測.....	38
第八節 Syndecan-1 は複数のシェダーゼによる切断を受ける.....	49
第九節 <i>In vitro</i> 実験による切断部位および PWM スコアの評価.....	51
第十節 結語.....	54
第二章 アシル化ペプチド濃縮技術の開発.....	56
第一節 序.....	56
第二節 KDAC 選択性に依存したアシル化ペプチド濃縮手法の概念実証実験.....	59
第三節 生体内アシル化部位解析への応用.....	61
第四節 結語.....	64
第三章 非加水分解性リン酸化チロシン模倣体を用いたホスファターゼ濃縮のためのペプチドプローブの開発.....	65
第一節 序.....	65
第二節 F ₂ Pmp プローブを用いたプルダウンによる PTP 濃縮の検討.....	68
第三節 リン酸化チロシンプローブと比較した F ₂ Pmp プローブの評価.....	74
第四節 結語.....	77

結 論.....	78
実験の部.....	79
材料.....	79
装置および測定条件.....	80
実験手法.....	83
発表論文.....	92
謝 辞.....	94
参考文献.....	95

略語表

ACN	: acetonitrile アセトニトリル
ADAM	: a disintegrin and metalloprotease ディスインテグリンとメタロプロテアーゼ
APP	: amyloid precursor protein アミロイド前駆体タンパク質
BACE1	: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 アミロイド前駆体タンパク質 β 部位切断酵素 1
CAA	: 2-chloroacetamide 2-クロロアセトアミド
CID	: collision-induced dissociation 衝突誘起解離
DMSO	: dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド
DTT	: dithiothreitol ジチオトレイトール
F ₂ Pmp	: 4-[difluoro(phosphono)methyl]-L-phenylalanine 4-ジフルオロ(ホスホノ)メチル-L-フェニルアラニン
FDR	: false discovery rate 偽陽性率
HCD	: higher-energy collisional dissociation 高エネルギー衝突解離
HDAC	: histone deacetylase ヒストン脱アセチル化酵素
HEPES	: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

		2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸
HPLC	: high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IAA	: 2-iodoacetamide	2-ヨードアセトアミド
KDAC	: lysine deacylase	リシン脱アシル化酵素
LC/MS/MS	: liquid chromatography/tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析
MeOH	: methanol	メタノール
MMP	: matrix metalloprotease	マトリックスメタロプロテアーゼ
NHS	: <i>N</i> -hydroxysuccinimide	<i>N</i> -ヒドロキシコハク酸イミド
PBS	: phosphate-buffered saline	リン酸塩緩衝液
PMA	: phorbol 12-myristate 13-acetate	ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (ホルボールエステル)
PSM	: peptide-spectrum match	ペプチドスペクトルマッチ
PTK	: protein tyrosine kinase	タンパク質チロシンキナーゼ
PTM	: post-translational modification	翻訳後修飾
PTP	: protein tyrosine phosphatase	タンパク質チロシンホスファターゼ
PTS	: phase transfer surfactant	

	相間移動溶解剤
RIP	: regulated intramembrane proteolysis 調節性細胞膜内タンパク質切断
RTK	: receptor tyrosine kinase 受容体型チロシンキナーゼ
SCX	: strong cation exchange 強陽イオン交換
SDC	: sodium deoxycholate デオキシコール酸ナトリウム
SH2	: Src homology 2 Src ホモロジー2
SIRT	: sirtuin サーチュイン
SLS	: sodium <i>N</i> -lauroylsarcosinate <i>N</i> -ラウロイルサルコシン酸ナトリウム
StageTip	: stop-and-go-extraction tip ステージチップ
TCEP	: tris(2-carboxyethyl)phosphine トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン
TFA	: trifluoroacetic acid トリフルオロ酢酸
TM	: transmembrane region 膜貫通領域
TMT	: tandem mass tag タンデムマスタグ
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane トリスヒドロキシメチルアミノメタン

緒 言

タンパク質は生命現象の主要な担い手である。すべての細胞が同じゲノムを保有することに対して、タンパク質はその機能を必要とする細胞のみにおいて選択的に発現する。細胞、組織、個体などの生物学的な系で発現するタンパク質総体はプロテオームと呼ばれ、例えばある疾病の患者と健常者のプロテオームを定量的に比較することは、その疾病を特徴付ける分子システムの理解に繋がることが期待される。このような、プロテオームを対象とした包括的・系統的な研究や、その学問領域をプロテオミクスと呼ぶ。最も汎用的なプロテオミクスの手法は、プロテオーム試料をトリプシン等のプロテアーゼでペプチドに消化した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とタンデム質量分析 (MS/MS) を組み合わせた LC/MS/MS により網羅的に測定する、いわゆるショットガンプロテオミクスである (図 1)。近年の質量分析装置の目覚ましい高感度化と高速化は、ヒト細胞のような複雑な試料についても、核酸に対する次世代シーケンサー (NGS) に匹敵する網羅性でのタンパク質の同定と定量を可能にしつつある^{1,2}。さらに、近年の個別化医療の普及に伴って、プロテオミクスの臨床診断への応用も目指されている³。

今世紀に入りヒトゲノムが解読され、約 2 万のヒトタンパク質コード遺伝子が同定された^{4,7}。この数は、線虫が保有する遺伝子数と同程度であり⁸、遺伝子の数が生物の複雑さを規定するわけではないことが推測される。一方、ヒトゲノムに対して、ヒトプロテオームははるかに複雑であり、ヒトタンパク質種の総数を数百万と推定する報告もある^{4,9}。ヒトの複雑なプロテオームはどのように構成されるのであろうか。タンパク質の一次配列の変化をもたらす主要な要因として、DNA 配列の一塩基多型 (coding single-nucleotide polymorphisms, cSNPs) や、選択的スプライシングが挙げられる。SNPs のデータベースである dbSNP には、~13.5 万もの検証済 cSNP が登録されている⁴。また、NGS を用いた解析によると、~93%もの遺伝子がスプライシングを受けるとされる^{4,10}。さらに、mRNA からタンパク質に翻訳されると、N 末端や C 末端、あるいは特定のアミノ酸側鎖に翻訳後修飾と呼ばれる様々な化学修飾が

施される。翻訳後修飾の多くは酵素によって厳密に制御され、例えばセリン、スレオニン、チロシン残基に施されるリン酸化修飾は、様々な刺激に応じてダイナミックに変動し、タンパク質機能を制御する^{11,12}。一方、プロテアーゼによる切断のように不可逆的に施される修飾や^{13,14}、細胞内環境に応じて非酵素的に施される翻訳後修飾も存在する^{15,16}。これらの様々な要因から成るそれぞれのタンパク質種はプロテオフォームと呼ばれ¹⁷、例えばヒストンタンパク質の1種である histone H3 のプロテオフォームは 250 以上に及ぶと推定される^{4,18}。このように翻訳後修飾は遺伝子産物に対して指数関数的にプロテオフォームを増加させ、プロテオームを著しく複雑にする。

MS を用いたプロテオミクスによって、多くの翻訳後修飾部位が同定されている¹⁹。歴史的にも、MS による最初のタンパク質研究の一つは精製タンパク質上の翻訳後修飾のマッピングであった^{19,20}。ショットガンプロテオミクスでは、タンパク質を短いペプチド断片に消化して解析を行うため、未消化タンパク質を解析する場合と比較して、翻訳後修飾の詳細な部位の同定や定量を行いやすい利点がある。さらに、特定の修飾部位に対する抗体を用いた手法とは異なり、新規な修飾部位の同定も可能である²¹⁻²⁵。近年、生命現象を分子システムとして捉え、数学、統計学および情報学的手法を駆使して動的な生命現象の特性を理解するシステム生物学が揺籃期にある。翻訳後修飾はタンパク質機能を直接制御するため、プロテオームを対象としたシステム生物学においては特に重要な因子とされ、例えば代謝酵素群の可逆的リン酸化修飾の変動を俯瞰することで、代謝制御の分子システムを理解しようとする試みなどが報告されている^{26,27}。しかし、タンパク質の網羅的同定・定量を目的とした解析と比較して、翻訳後修飾を対象とした網羅的解析はより困難である。その理由として、第一に、タンパク質の同定を目的とした解析では、酵素消化によって生成された複数のペプチドをタンパク質同定に利用できることに対して、翻訳後修飾の解析のためには特定の修飾を受けたペプチド自身を同定する必要がある。次に、修飾部位の同定のためには、それ以外の部位に修飾を受けている可能性を完全に否定するのに必要十分なプロダクトイオンピークが MS/MS スペクトル上で検出されている必要がある。さらに、一般的に修飾ペプチドは非修飾ペプチドよりも存在量が少ない。そのため、翻訳後修飾を対象とした研究では、測定前に目的とする修飾ペプチドを濃縮する必要がある (図 1)。

例えば、リン酸化ペプチドの濃縮には、リン酸基と親和性を持つ酸化金属や金属イオンを固定相とするクロマトグラフィーが用いられる²⁸。化学的な相互作用による濃縮が難しい修飾については、抗体による免疫沈降がペプチド濃縮の主な手法となる。例えばリシンアセチル化修飾について、この手法によって大規模な修飾部位の同定が成されている²⁹。しかし、抗体を用いた手法では、ペプチド配列に対する濃縮選択性や濃縮率が抗体の性能に依存するため、そのバイアスを避けることができない。さらに、近年アセチル化以外のアシル化修飾、例えばスクシニル化やミリストイル化等も見出されているが^{21,22,30,31}、ペプチド濃縮に適用可能な抗体がない修飾の解析には抗体による免疫沈降を応用することはできない。エクトドメインシェディングと呼ばれる膜タンパク質の細胞外領域の切断のように、対象となるアミノ酸やその周辺配列に共通性がないため、その基質のみを特異的に濃縮することが難しい翻訳後修飾も存在する。また、翻訳後修飾の情報と合わせて、それらを制御する因子の情報も重要である。例えば、可逆的リン酸化修飾を制御するプロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼの活性異常は、がんをはじめとした様々な重篤な疾患を引き起こす^{32,33}。キナーゼの網羅的解析においては、それと特異的に結合する阻害化合物を固定化した担体を利用したクロマトグラフィーによりキナーゼを濃縮する手法が知られ、LC/MS/MS測定により200以上ものキナーゼを一斉に同定することが可能である³⁴。一方、ホスファターゼのプロテオーム規模での解析の報告は、キナーゼと比較して少ない。ホスファターゼの濃縮法も、アシル化修飾の解析と同様に抗体を用いた免疫沈降が主な手法であり³⁵、技術的な開発の余地が大きい。

以上の背景を踏まえて、本研究ではプロテオミクスにおいて技術的に未成熟であるエクトドメインシェディング（第一章）やリシンアシル化（第二章）に注目し、シェディングによって制御されるプロテオームの網羅的解析（シェディングプロテオミクス）や、アシル化修飾の大規模解析（アシロミクス）のための基盤技術を開発し、生体試料への応用を行った。また、可逆的リン酸化修飾を制御する因子であるタンパク質ホスファターゼをプロテオーム規模で解析するための基盤技術開発を行った（第三章）。

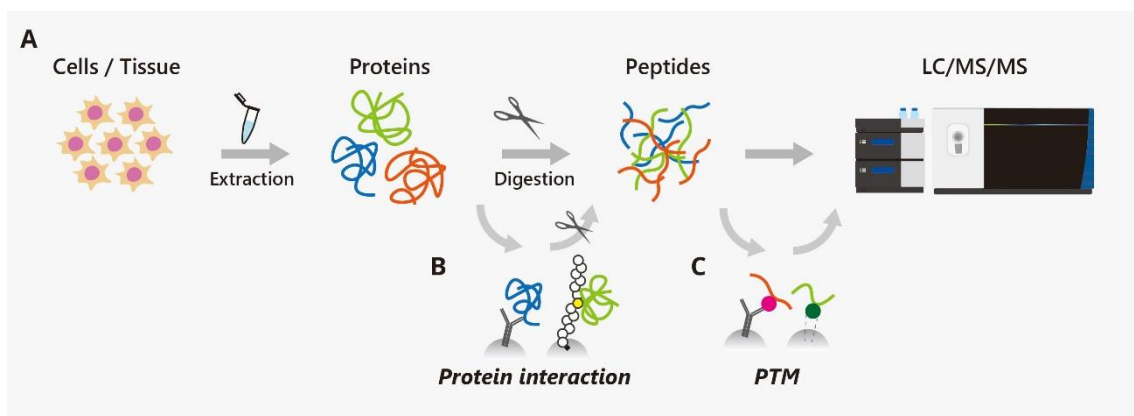


図 1 ショットガンプロテオミクスのワークフロー

(A) 一般的なショットガンプロテオミクスのワークフロー。細胞あるいは組織試料から抽出したタンパク質をトリプシン等の消化酵素によりペプチド断片へと消化し、LC/MS/MS に供する。

(B-C) 目的に応じて、免疫沈降や、化合物あるいはペプチド型プローブ等との相互作用によるタンパク質濃縮操作 (B) や、静電的相互作用あるいは免疫沈降等によるクロマトグラフィーによる翻訳後修飾 (PTM) ペプチド濃縮操作 (C) を組み込む。

第一章

ショットガンプロテオミクスによる エクストドメインシェディング大規模解析

第一節 序

細胞増殖因子やサイトカイン、これらに対する受容体、あるいは細胞接着因子など、細胞表面に存在する多くの膜タンパク質は、プロテアーゼによる切断を受け、その細胞外領域を遊離させる。このプロセスはエクストドメインシェディング (シェディング) と呼ばれ、膜タンパク質の機能や存在量を厳密に制御する^{13,14,36}。シェディングは多くの場合、膜貫通領域内での更なるタンパク質分解 (regulated intramembrane proteolysis, RIP) を引き起こし、細胞内領域が細胞質に放出される。その結果、これら二つのプロセスにより、双方向へのシグナル伝達が可能となる³⁶⁻³⁸。シェディングを担うプロテアーゼは、シェダーゼと呼ばれる。複数のシェダーゼが1つの基質タンパク質を異なる部位で切断した場合、遊離した切断産物は異なる配列を持つため、異なる生物学的機能を持つことがある³⁹。例えば amyloid precursor protein (APP) の場合、a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) と beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) が主な責任シェダーゼとして知られているが、BACE1 による切断のみがアルツハイマー病の発症に寄与する⁴⁰。したがって、シェディングの生理的役割を理解するためには、切断部位の同定が必須である。しかし、シェディング基質の多くについて、その切断部位は不明である。

LC/MS/MS によるショットガンプロテオミクスは、翻訳後修飾部位の同定など、様々なプロテオフォームの解析に用いられる。シェディング基質を解析する場合、細胞膜画分タンパク質よりも培養上清画分に含まれるタンパク質を解析対象とする方が、試料の複雑性がより低いために望ましい。また、切断を受けた基質は RIP により更に切断を受けるため、培養上清タンパク質の方が安定である。例えば著者らは、多くの膜タンパク質が糖鎖修飾を持つことに注目し、培養上清タンパク質の消化物から

糖鎖修飾ペプチドを濃縮し、プロテオミクスにより 18 種のメタロプロテアーゼ基質を同定した⁴¹。しかしこの研究では、詳細な切断部位の同定には至らなかった。この理由として、一般的なショットガンプロテオミクスのワークフローにおけるデータベースサーチでは、用いた消化酵素の特異性に合致した N 末端および C 末端の両方を持つペプチドのみが考慮されることが挙げられる。シェディングによる切断末端を含むペプチドの同定のためには、消化酵素の特異性に合致しない N 末端、あるいは C 末端を保有するペプチドを考慮したサーチ、すなわちセミスペシフィックサーチ (semi-specific search; 図 2) を行う必要がある。また、タンパク質消化物中には目的とするタンパク質末端ペプチド以外のペプチド (内部ペプチド) が多く存在するため、効率的な大規模解析のためにはタンパク質末端ペプチドの濃縮操作が必要である。以上を踏まえると、培養上清タンパク質消化物からタンパク質末端ペプチドを濃縮し、LC/MS/MS およびセミスペシフィックサーチによる解析を行うことが最も理想的なシェディング基質切断部位の網羅的解析法であると考えられる。

これまでに複数のタンパク質末端ペプチドの濃縮法が報告されており、特に代表的な手法として TAILS (terminal amine isotopic labeling of substrates) 法⁴²が挙げられる。Prudova らはこの手法により、組換え MMP-2 および MMP-9 による切断部位の網羅的解析を行い、それぞれについて 201 および 19 の切断部位を同定した⁴³。しかし、生細胞中の内因性シェダーゼによる基質切断について、その切断部位同定の大規模解析を行うには、依然多くの障害がある。第一に、一般に TAILS 法をはじめとした末端ペプチド濃縮法は、複数の化学反応を含む複雑な行程から成り、大量の試料が必要とされる。第二に、培養上清中のタンパク質は、細胞抽出物から得られるタンパク質と比較して極めて量が少ないため、末端ペプチド濃縮のために十分な試料量を調製することが困難である。第三に、カルボキシ基を効率よく化学的に修飾することが難しいため、既存の手法によるタンパク質 C 末端ペプチド濃縮は N 末端ペプチド濃縮と比較して濃縮効率が大きく劣り、特に困難である³⁹。

著者の所属する研究グループで最近開発された N 末端濃縮法は、化学修飾行程を一切含まないため、高感度なタンパク質 N 末端解析が可能である⁴⁴。この手法では、タンパク質をトリプシンの代わりに TrypN を用いて消化し、N 末端ペプチドを

低pH条件下での強陽イオン交換クロマトグラフィー (SCX) により単離する (図 3)。また、タンパク質トリプシン消化物中の C 末端ペプチドは、SCX において保持が弱いために内部ペプチドと比較して早く溶出されることが報告されている (図 3)⁴⁵⁻⁴⁷。これを応用することで、N 末端ペプチド濃縮と同程度に効率的な C 末端ペプチド濃縮を行うことが可能であることが当研究グループによって見出された。本章では、これらのタンパク質 N 末端、および C 末端由来のペプチド濃縮法を応用した網羅的タンパク質末端解析 (ターミノミクス) によるシェディング基質切断部位の大規模同定を行った。

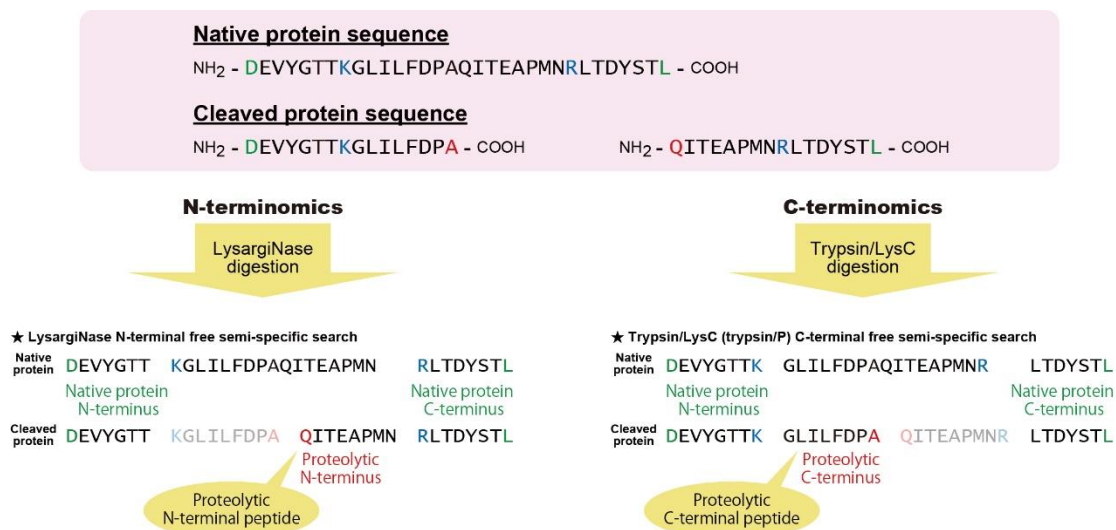


図 2 セミスペシフィックサーチによる末端ペプチドと切断部位の同定例

一般的なショットガンプロテオミクスでは、N 末端と C 末端の両方が用いた消化酵素の特異性と合致するペプチドのみが考慮される。例えば、一般的な TrypN 特異的サーチにおいて、タンパク質本来の N 末端（緑色）は TrypN の特異性（K/R の N 末端側で切断、青色）と合致しないが、このタンパク質 N 末端ペプチドは同定される。N-ターミナルフリーセミスペシフィックサーチでは、N 末端が TrypN の特異性と合致しない（赤色）ペプチドを合わせて同定することができる。同様に、トリプシン/LysC（K/R の C 末端側で切断、青色）特異的サーチにおいて、タンパク質本来の C 末端（緑色）は、トリプシン/LysC の特異性と合致しないが、trypsin/LysC 特異的サーチにおいて同定される。C-ターミナルフリーセミスペシフィックサーチでは、C 末端が trypsin/LysC の特異性と一致しない末端（赤色）を持つペプチドを合わせて同定することができる。

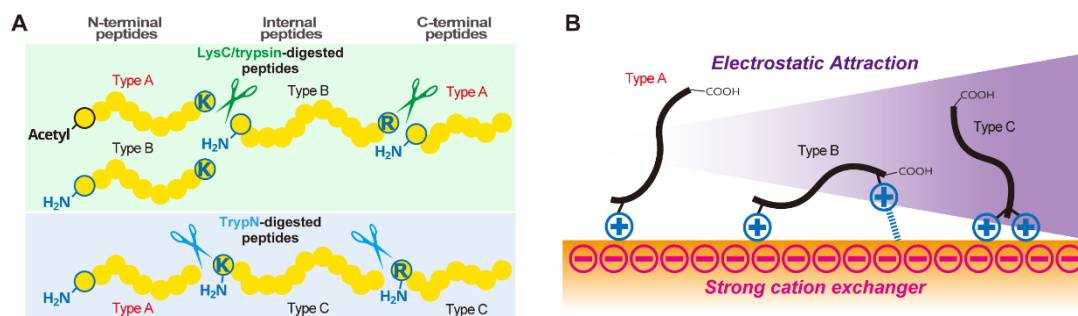


図 3 SCX によるタンパク質末端ペプチド濃縮

(A) TrypN 消化物中の内部ペプチド（非末端ペプチド）および C 末端ペプチドは、ペプチド N 末端、およびリシンあるいはアルギニンによる計+2 の電荷を持つ（Type C）。一方、タンパク質 N 末端ペプチドは、リシンおよびアルギニンを含まないため計+1 の電荷を持つ（Type A）。同様に、トリプシン消化物の場合、内部ペプチドはペプチド N 末端およびリシンあるいはアルギニンによる計+2 の電荷を持ち（Type B）、アセチル化タンパク質 N 末端ペプチドとタンパク質 C 末端ペプチドは計+1 の電荷を持つ（Type A）。

(B) 低 pH 条件下での SCX では、ペプチドは Type A、Type B、Type C の順番に溶出されることを利用し、タンパク質末端ペプチドを単離する。ただし、トリプシン消化ペプチドにおいて、タンパク質 C 末端ペプチドとアセチル化 N 末端ペプチドは同様の電荷を持つため（Type A）、本原理による C 末端ペプチド濃縮ではアセチル化タンパク質 N 末端ペプチドも同時に濃縮される。

第二節 ターミノミクスによる大規模シェディング切断部位同定

細胞にホルボールエステル (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 処理を行うことで、主に ADAM17 を活性化し、一部の膜タンパク質のシェディングを一過的に活性化することができる¹³。また、多くのシェディングは ADAM プロテアーゼファミリーを中心としたメタロプロテアーゼ群によって担われることが知られている¹³。そこで、効率的かつ定量的なシェディング基質切断部位の大規模同定を目的として、PMA 刺激を施した 10 種のヒト由来細胞株の培養上清について、広域メタロプロテアーゼ阻害薬 BB-94 処理により減少するタンパク質末端を探索した (図 4A, B)。各条件について $N=3$ の試料調製を行い、1 試料あたりそれぞれ 10 μg の培養上清タンパク質に由来する消化物を末端ペプチド濃縮に供した。すなわち、計 1.2 mg (10 μg \times 繰り返し 3 回 \times 2 条件 (BB-94 の有無) \times 10 種細胞株 \times 2 解析 (N 末端解析と C 末端解析)) のタンパク質を使用した。精度の高い定量を行うため、tandem mass tag (TMT) 標識を採用し、各細胞株について BB-94 処理を行った場合と行わなかった場合の試料を混合して、一括して LC/MS/MS 測定を行った (図 4C, D, 図 5)。

MaxQuant⁴⁸を用いたセミスペシフィックサーチ (図 2) により、ペプチドの同定を行った。図 3 に示すように、C 末端ペプチド濃縮において、アセチル化 N 末端ペプチドも同時に濃縮される。シェディング基質の切断末端は非修飾であるため、この N 末端アセチル化ペプチドは同定リストから排除した。その結果、6,181 の N 末端ペプチドおよび 6,694 の C 末端ペプチドを同定した (図 4E)。これらのうち、用いた消化酵素、すなわちトリプシン/LysC あるいは TrypN の特異性に合致しない末端を保有するペプチドは、細胞内因性プロテアーゼによる切断に由来すると考えられる。本研究では、このような末端ペプチドを”proteolytic peptide”と定義する。同定された N 末端および C 末端ペプチドには、それぞれ 5,952 および 5,848 の proteolytic peptide が含まれていた。これらの proteolytic peptide のうち、832 の N 末端ペプチドおよび 674 の C 末端ペプチドが膜タンパク質由来であった。

図 6 および図 7 に、N 末端ペプチドおよび C 末端ペプチドの定量再現性を示す。それぞれの条件におけるピアソン相関係数は、 $R > 0.93$ (平均 0.98) および $R > 0.97$ (平均 0.99) であり、良好な定量再現性を示した。図 8 および図 9 に、N 末端

ペプチドおよび C 末端ペプチドの定量結果をボルケーノプロットにより示す。Proteolytic peptide のうち、363 の N 末端ペプチドおよび 476 の C 末端ペプチドが、メタロプロテアーゼ阻害薬 BB-94 処理により有意に減少した (図 4E)。また、これらのうち、249 の N 末端ペプチドおよび 245 の C 末端ペプチドが膜タンパク質由来であった。その結果、広域メタロプロテアーゼ阻害薬処理により切断が減少したのは計 489 の膜タンパク質切断部位であった。5 つの膜タンパク質切断部位が N 末端解析および C 末端解析の両方から同定された。

図 4F に示すように、同定された切断部位を含むタンパク質末端において、シェディング基質候補となり得る膜タンパク質由来のものはわずか 12.8%であり、質量分析による大規模解析の難しさを示唆した。しかし、本研究では同定および定量についてどちらも優れた結果が得られた。また、解析が困難とされてきた C 末端についても、N 末端と同程度の効率的な大規模解析を行うことに成功した。以上から、本研究で採用したワークフローは、膜タンパク質切断部位の大規模解析の優れた手法であることが示された。

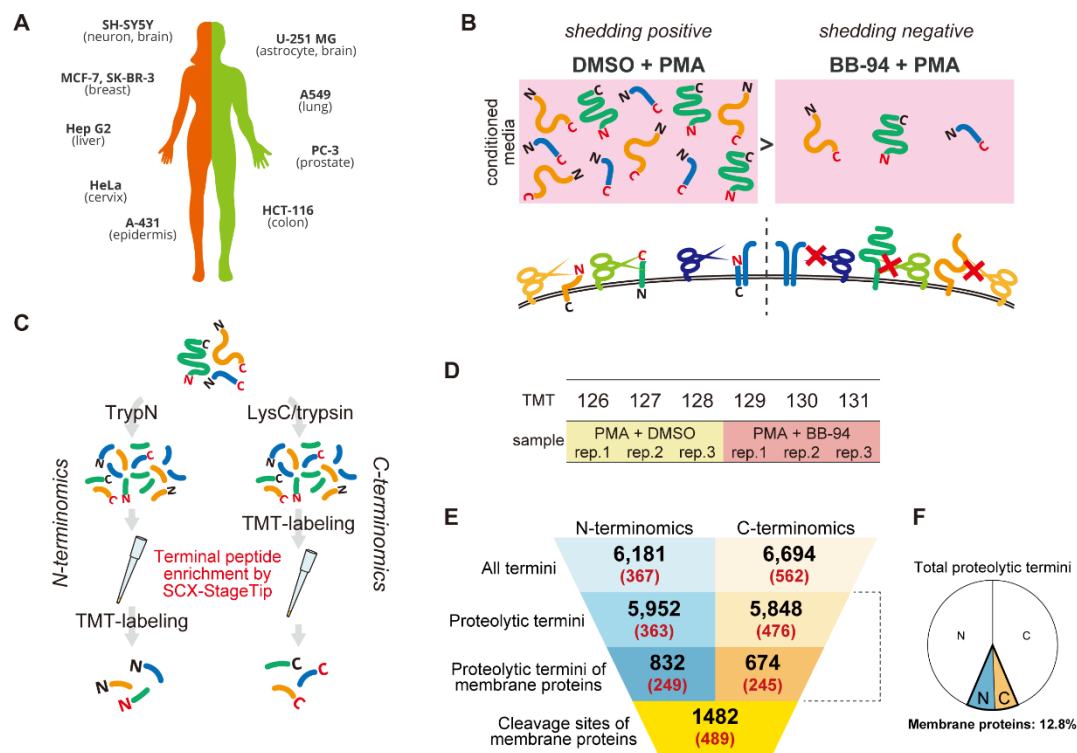


図 4 定量的末端プロテオミクスによるシェディング基質切断部位同定の概要

(A) 解析を行った 10 種のヒト由来細胞株の一覧。

(B) 培養上清タンパク質試料調製の概要。DMSO あるいは BB-94 と、PMA を含んだ培地を用いて 1 時間培養上清を調製した ($N=3$)。

(C) 試料調製のワークフロー。タンパク質試料を、TrypN あるいはトリプシンおよび LysC によって消化した。C 末端解析では C 末端ペプチド濃縮前に TMT 標識を行った。N 末端解析では、N 末端ペプチド濃縮後に TMT 標識を行った。より詳細なワークフローを図 5 に示す。

(D) 阻害薬処理無し試料 (PMA + DMSO) および阻害薬処理あり試料 (PMA + BB-94) を、それぞれ示された TMT チャンネルで標識した。

(E) 結果の概要。括弧で囲まれた赤字の値は BB-94 処理によって有意に減少した末端ペプチドあるいは切断部位の値を表す。All termini: 定量された全 N 末端あるいは C 末端ペプチドの数 (タンパク質本来の末端 + proteolytic peptide)、proteolytic termini: 細胞内因性プロテアーゼによる切断に由来する末端ペプチド (proteolytic peptide) の数、proteolytic termini on membrane proteins: 膜タンパク質に由来する

proteolytic peptide の数、cleavage sites of membrane proteins : N 末端および C 末端解析によって同定された膜タンパク質上の切断部位の合計数。

(F) 同定された proteolytic peptide のうち、膜タンパク質に由来したものの割合。

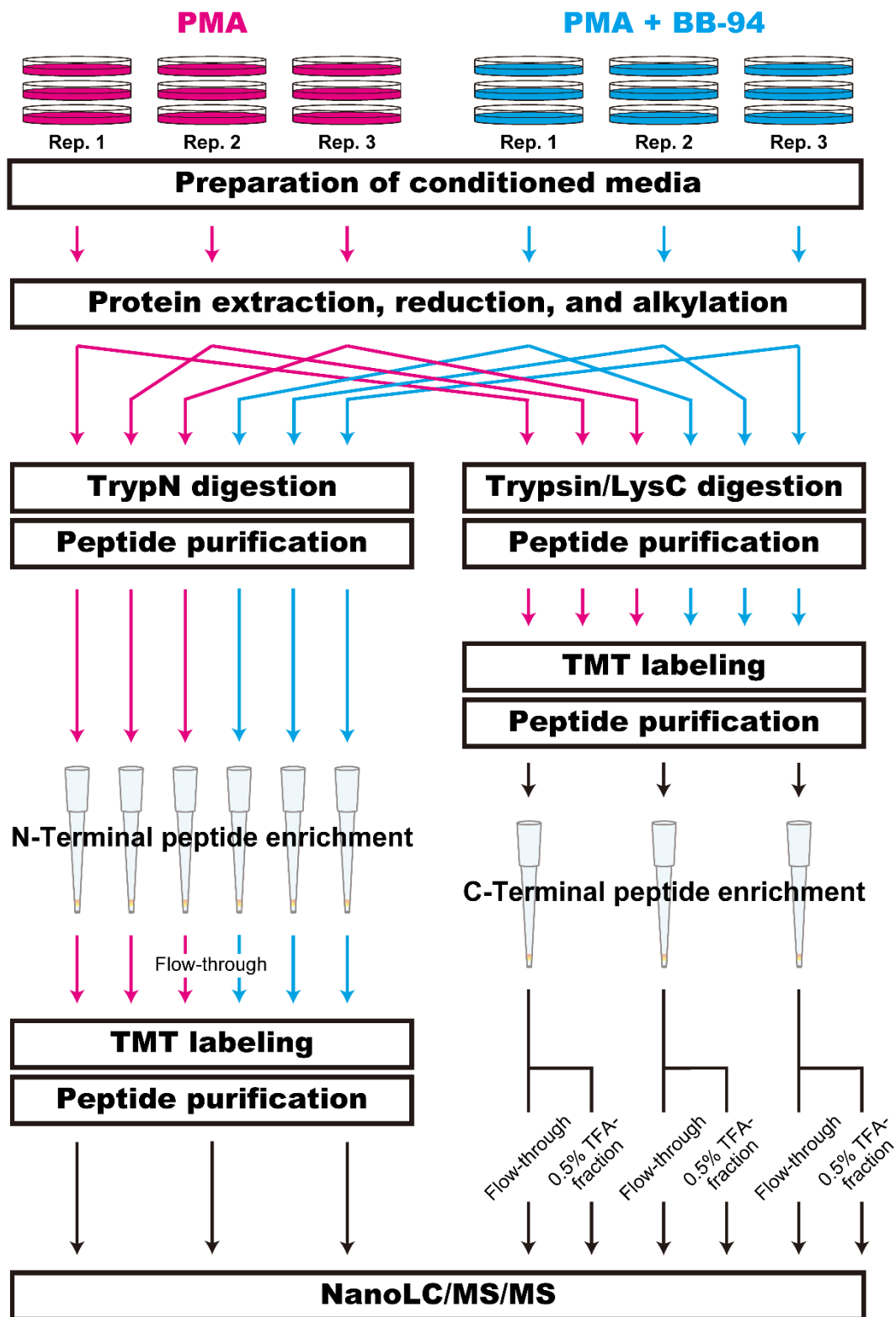


図 5 ワークフローの詳細

3枚の15 cm ディッシュから得られた培養上清を混合し、1 試料とした。N 末端解析では、試料を TrypN で消化し、N 末端ペプチドを濃縮した後に、TMT 標識し、3 回の LC/MS/MS による測定を行った。TMT 標識は SCX におけるペプチドの保持挙動を変化させるため、N 末端解析においては、N 末端ペプチド濃縮後に TMT 標識を行った。C 末端解析では、試料をトリプシンおよび LysC で消化した後、TMT 標識し、3 つの SCX-StageTips を用いて C 末端ペプチドの濃縮を行った。本 C 末端解析ワークフローでは、C 末端ペプチド濃縮における素通り画分と 0.5%TFA 溶出画分の 2 つの画分を測定した。N 末端ペプチド濃縮と比較して C 末端ペプチド濃縮の濃縮効率劣るが、2 つの画分を測定することで、N 末端ペプチドと同程度の C 末端ペプチドの同定・定量が可能となる。

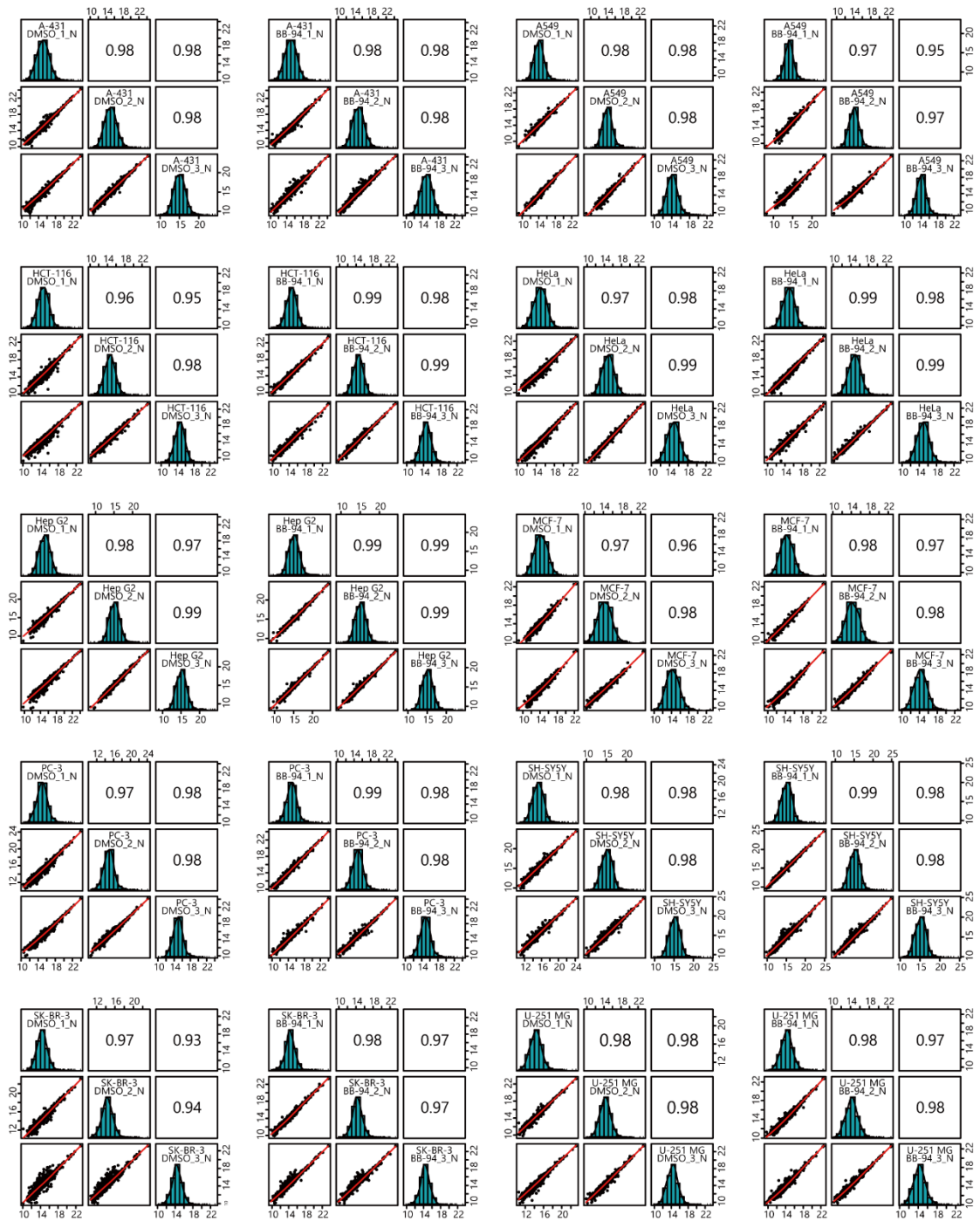


図 6 N末端解析の定量再現性

それぞれの細胞株について、正規化された TMT レポーター強度 (\log_2) のピアソン相関係数を算出した。

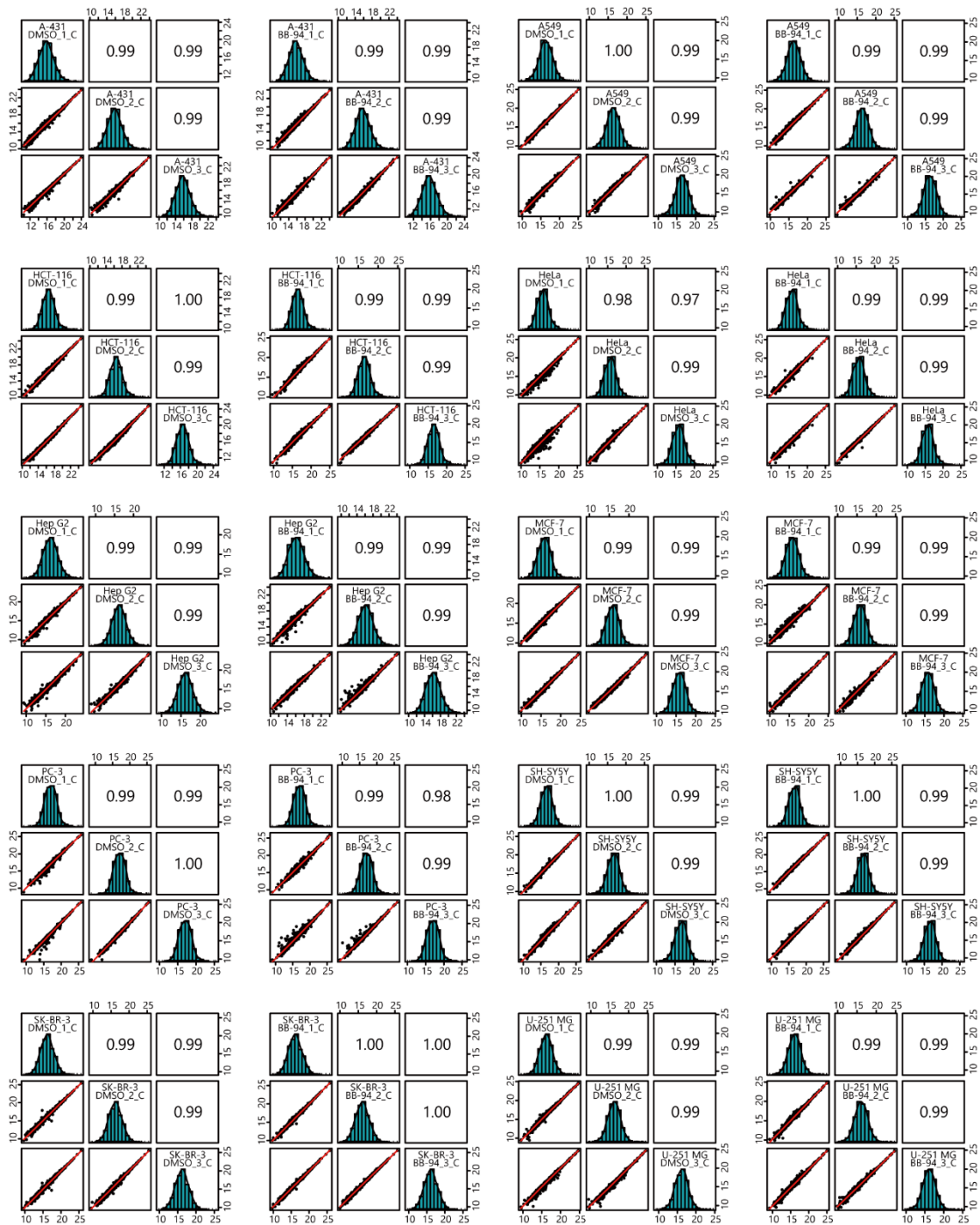


図 7 C末端解析の定量再現性

それぞれの細胞株について、正規化された TMT レポーター強度 (\log_2) のピアソン相関係数を算出した。

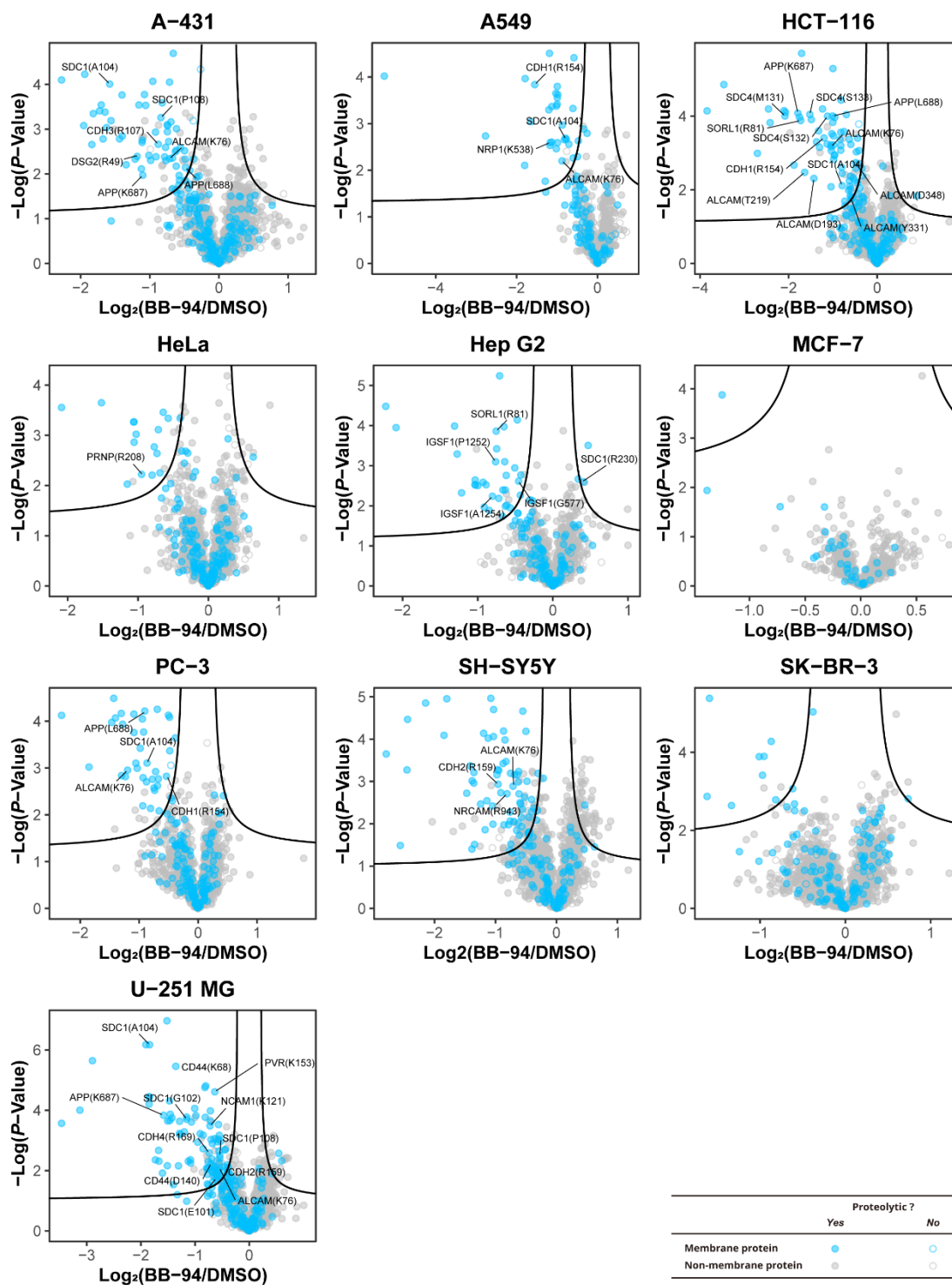


図 8 N 末端解析における細胞株ごとのボルケーノプロット

N 末端ペプチドの定量結果を表すボルケーノプロット。曲線は、 $q\text{-value} = 0.05$ を示す。

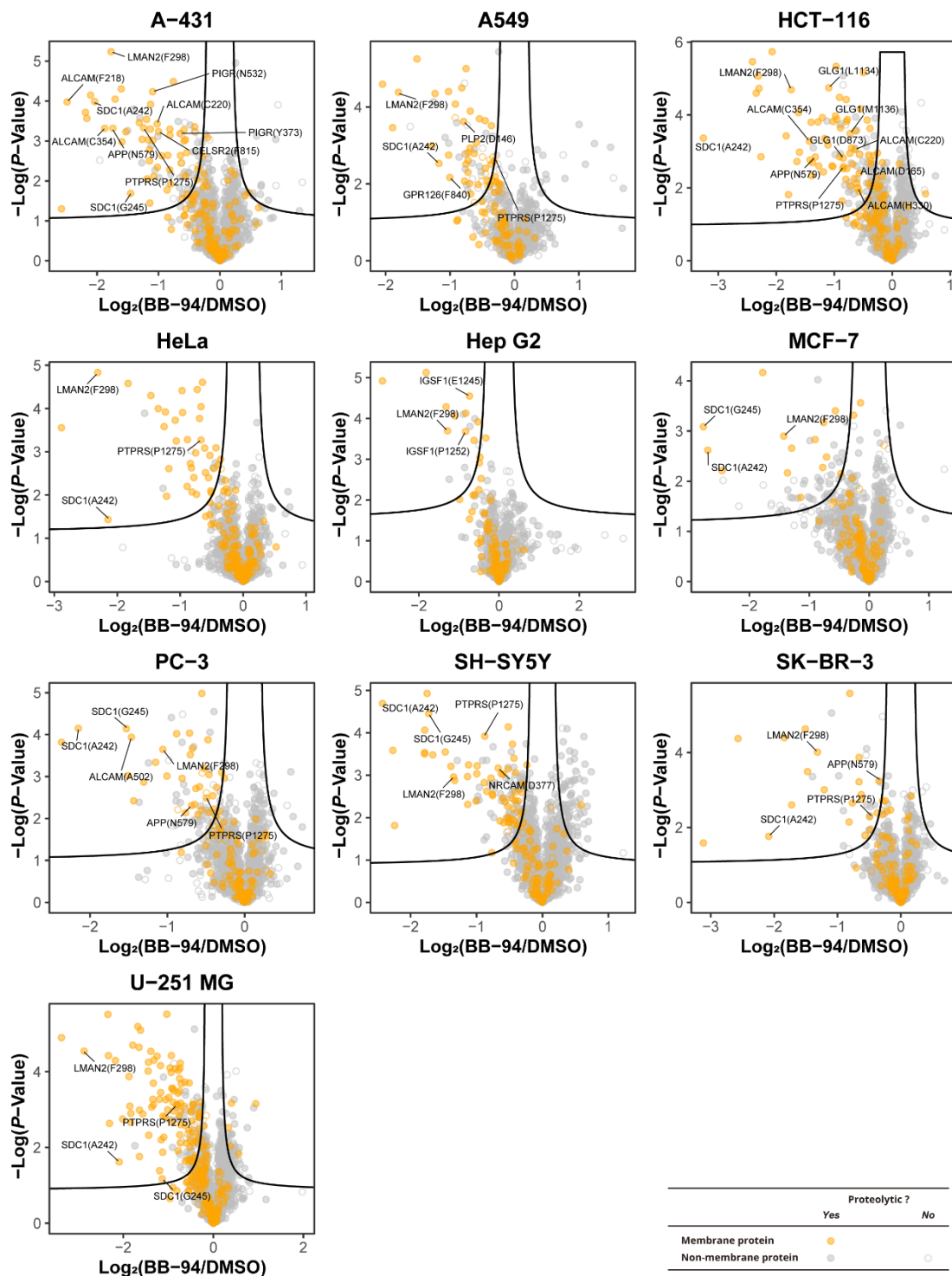


図 9 C末端解析における細胞株ごとのボルケーノプロット

C末端ペプチドの定量結果を表すボルケーノプロット。曲線は、 q -value = 0.05 を示す。

第三節 BB-94 による細胞株選択的なシェディングの抑制

培養上清への遊離が減少した proteolytic peptide の数は、細胞株により異なっていた (図 10A)。U-251 MG 細胞から同定された proteolytic peptide の数が最も多く、また MCF-7 からは同定された proteolytic peptide の数は最も少なかった。Proteolytic peptide が減少したタンパク質の細胞内局在を調べるため、Gene Ontology (GO) term エンリッチメント解析を行った (図 10B)。その結果、“plasma membrane”や、“cell surface”などの膜タンパク質を想起させる GO term が多く濃縮された。また、BB-94 処理による影響を膜タンパク質と非膜タンパク質の間で比較すると、SK-BR-3 細胞の N 末端解析の結果を除いて、膜タンパク質由来の proteolytic peptide は有意に減少していた (図 10C, D)。以上の結果から、BB-94 処理は幅広い膜タンパク質の切断を選択的に抑制することが示された。

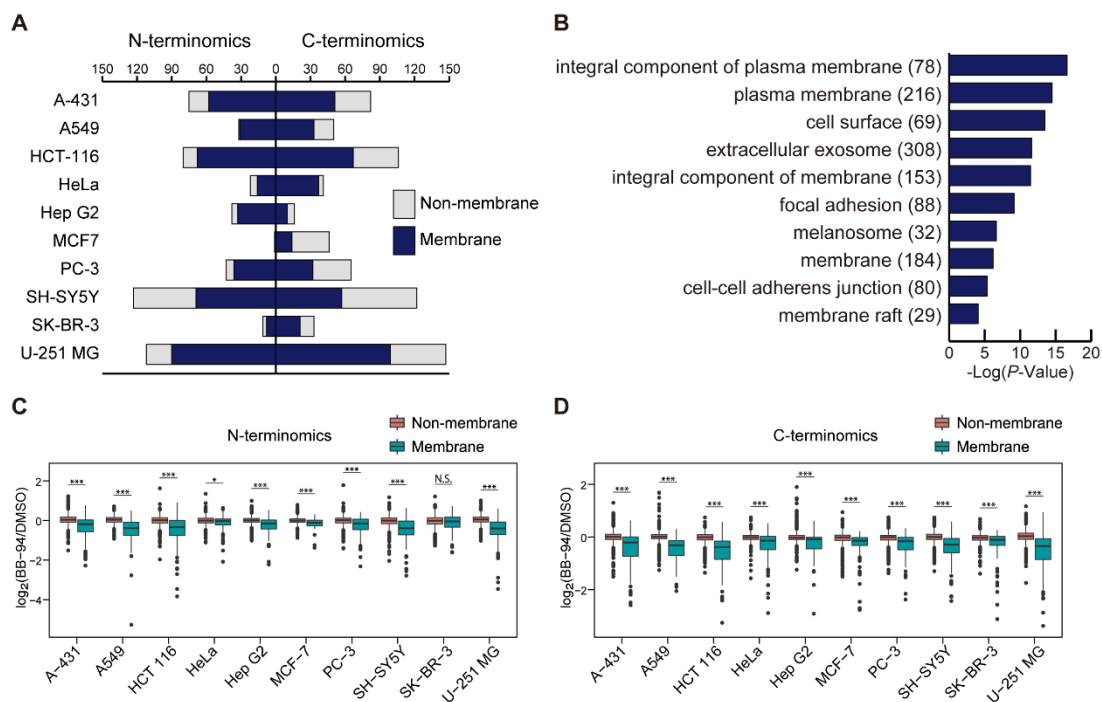


図 10 BB-94 処理によって変動した proteolytic peptide の概要

(A) BB-94 処理で有意に減少した膜タンパク質由来 proteolytic peptide および非膜タンパク質由来 proteolytic peptide の数。

(B) GO term cellular components のエンリッチメント解析の結果。有意な上位 10 の GO term を Bonferroni 法によって補正した p -value とともに示す。括弧内の数字はタンパク質数を示す。

(C, D) Proteolytic peptide の比率 (BB-94/DMSO) を、それぞれの細胞株における膜タンパク質と非膜タンパク質の間で比較した。 p -value は Wilcoxon の順位和検定によって算出し、Bonferroni 法によって補正した。***: $p < 0.005$, **: $p < 0.001$, *: $p < 0.05$, N.S.: not significant.

第四節 遊離が減少した膜タンパク質のトポロジー解析およびそれらの切断部位の位置解析

BB-94 処理により切断が減少した膜タンパク質切断部位には、シグナルペプチド配列の切断部位に相当するものが含まれていると考えられる (図 11A)。UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) に収載されているシグナルペプチド配列切断部位の周辺配列を調べてみたところ、代表的なシグナルペプチダーゼの認識モチーフ AxA が認められた (図 11B)。BB-94 処理により減少したこれらの切断がメタロプロテアーゼによるのか、あるいはシグナルペプチダーゼによるのかは特定できなかったため、予測シグナルペプチド切断部位 ± 5 残基に位置した 56 切断部位を除外し、残り 433 部位を以降の解析に供した。

UniProtKB のアノテーション情報を基に、BB-94 処理で切断が減少した膜タンパク質のトポロジー解析を行った。その結果、N 末端が細胞外領域に存在する I 型一回膜貫通タンパク質 (single-pass type I membrane proteins) が最も多く (378 部位、87.3%)、続いて GPI アンカー型タンパク質 (21 部位、4.8%)、C 末端が細胞外領域に存在する II 型一回膜貫通タンパク質 (single-pass type II membrane proteins ; 17 部位、3.9%)、複数回膜貫通タンパク質 (10 部位、2.3%) が含まれていた (図 12A)。

I 型、II 型一回膜貫通タンパク質および GPI アンカー型膜タンパク質に由来する計 416 切断部位の位置について解析を行った結果、394 切断部位 (94.7%) が細胞外領域に位置していた (図 12B)。このことから BB-94 によって確かにエクストドメインシェディングが阻害されていることが裏付けられた。特に、細胞外領域上の切断部位のうち、174 切断部位 (44.2%) が細胞膜から 200 アミノ酸残基の範囲内に位置していた。一方、BB-94 処理により減少した切断部位のうち、15 部位は膜貫通領域内に位置しており (図 12B, C)、そのなかには γ -セクレターゼによる APP の γ -切断部位も含まれていた (図 13)⁴⁹。 γ -セクレターゼによる膜タンパク質切断は、シェディングに引き続いて起こることから、本データセットにはシェディングの下流のイベントによる切断部位も含まれていることが示唆された。 γ -セクレターゼは、最初に細胞膜-細胞質境界で基質を切断し、その後複数回の連続的なトリペプチドまたはテトラペプチドのトリミングを行うことが報告されている⁴⁹。そのため、 γ -セクレターゼに

よる切断で生成される最終的なタンパク質末端は、本結果のように細胞外領域側に位置する傾向があると推測される (図 12C)。

同定された 7 種の複数回膜貫通タンパク質上の計 10 切断部位について、TMHMM Server (v2.0; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) を用いてその部位が細胞外領域あるいは細胞内領域のどちらに位置するのかを調べた。その結果、4 種のタンパク質 (PLP2、GPR126、IGSF1、CELSR2) の細胞外領域に 7 部位がマッピングされた。これらのうち、CELSR2 (F815↓L816) (図 14A) の例のように、6 つの部位は、1 つのみの膜貫通領域に隣接する細胞外領域に局在した。これらの切断は、一回膜貫通タンパク質のシェディングと同様に、細胞外領域を遊離させると考えられる。一方、GPCR126 (F 840↓T841) の切断部位 (図 14B) は、2 つの膜貫通領域に挟まれた細胞外領域に位置した。すなわち、この切断のみによって、細胞外領域が培養上清に遊離することはない。この部位は、C末端に切断部位を持つペプチドによって同定されており、このペプチドが由来したシェディング産物は、F 840 よりも N末端側での別の切断と組み合わせて培養上清に遊離したと考えられる。

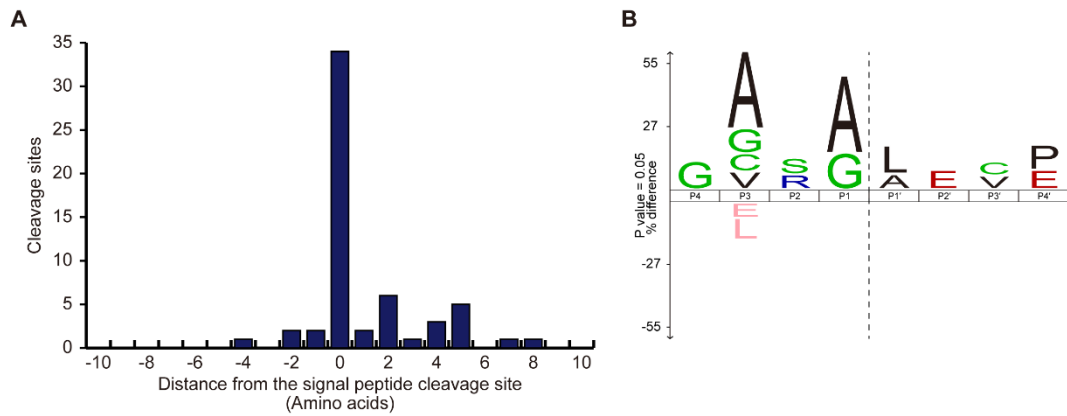


図 11 シグナルペプチド配列周辺の切断部位

(A) UniProtKB に収載されるシグナルペプチド切断部位から同定された切断部位までの距離（アミノ酸残基数）の分布。

(B) 予測シグナルペプチド切断部位近傍に位置した切断部位周囲のアミノ酸配列ロゴ。文字（アミノ酸）が大きいほど、その位置にて高い頻度で現れることを示す。IceLogo (<https://iomics.ugent.be/icelogoserver/>) を用いて作成した (p -value = 0.05)。破線は切断部位を示す。

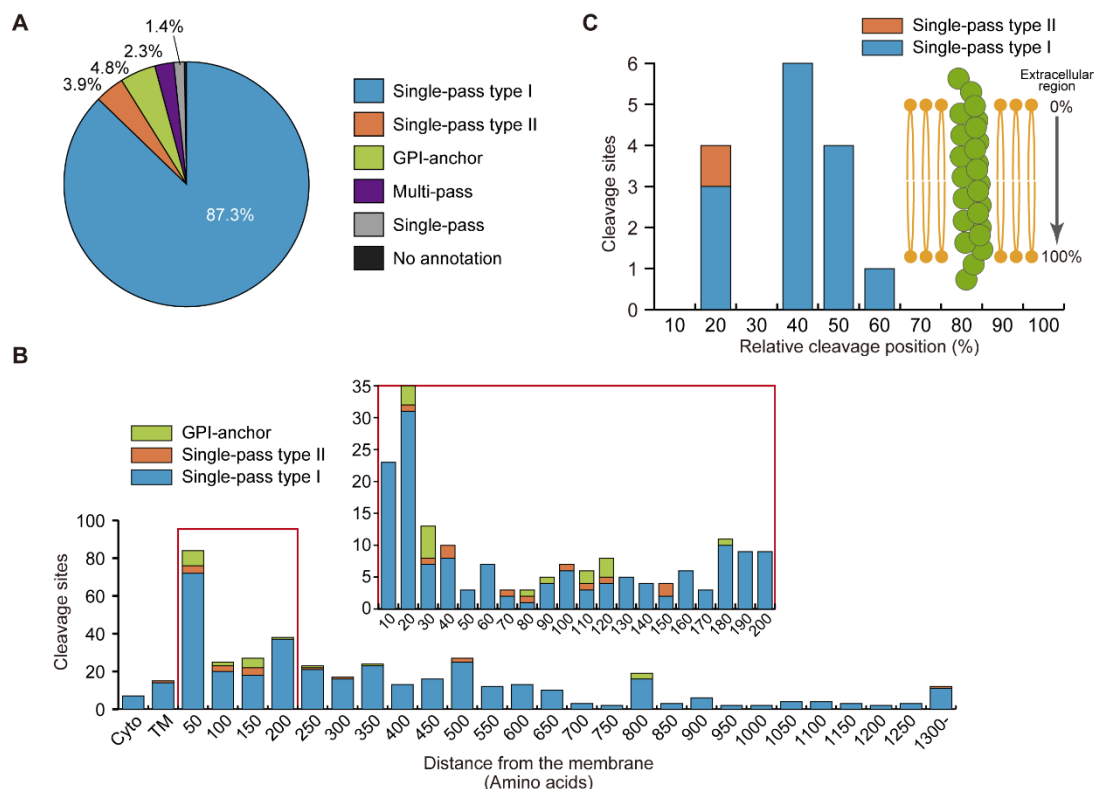


図 12 切断が減少した膜タンパク質のトポロジー解析および切断部位の位置解析

(A) BB-94 処理により切断が減少した膜タンパク質トポロジーの割合。膜タンパク質のカテゴリーは、UniProt の表記法に従った。

(B) I 型、II 型一回膜貫通タンパク質および GPI アンカー型タンパク質について、膜貫通領域または GPI アンカーサイトから切断部位までの距離（アミノ酸残基数）の分布を示した。赤枠で囲まれた部分について上部に詳細を示した。TM：膜貫通領域、Cyto：細胞内領域。

(C) I 型、II 型一回膜貫通タンパク質の膜貫通領域内における切断部位の相対的な位置。値は、細胞外領域から切断部位までのアミノ酸数を、膜貫通領域全体のアミノ酸残基数で除した。

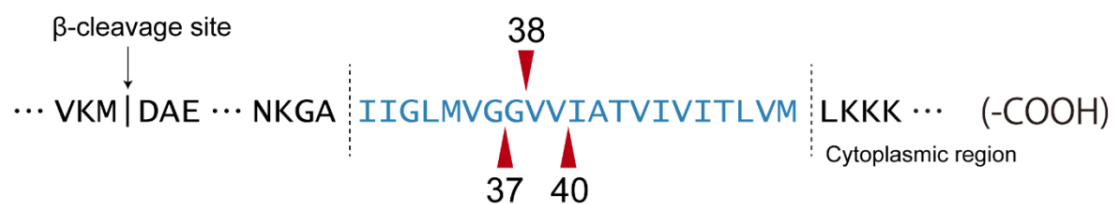


図 13 BB-94 処理で減少した APP の γ -切断部位

APP の細胞膜貫通領域内の切断部位。細胞膜貫通領域を青色で示す。矢頭は同定された切断部位を示し、数字は生成されるアミロイド β ペプチドの長さ（アミノ酸残基数）を示す。

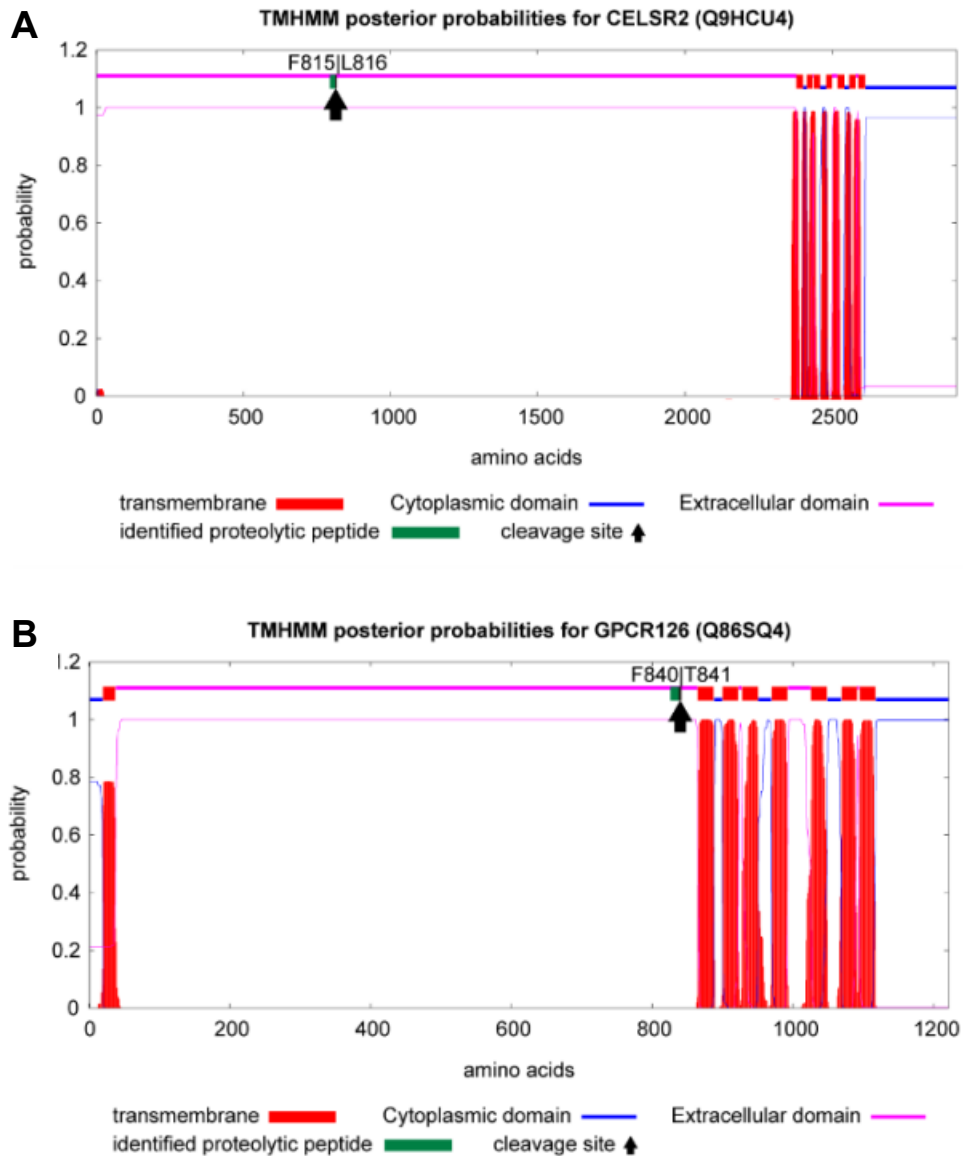


図 14 複数回膜貫通タンパク質切断部位の例

(A) CELSR2 および (B) GPCR126 について、TMHMM Server を用いて細胞外領域、細胞内領域、細胞膜貫通領域を予測した。同定されたタンパク質の proteolytic peptide と切断部位を併せて示す。

第五節 シェディングの生理機能解析

シェディング基質タンパク質の生理機能の理解のため、第四節において細胞外領域に切断部位が同定された 119 のシェディング基質タンパク質について、GO term エンリッチメント解析⁵⁰を行った (図 15)。その結果、その多くが細胞接着因子であり、この傾向は過去の報告と一致した⁴¹。加えて、細胞遊走に関わるタンパク質が多く含まれることが分かった。同定されたシェディング基質には、そのシェディングが細胞遊走に重要な役割を果たす CD44 が含まれていた⁵¹。また、受容体やチロシンキナーゼおよびホスファターゼなどのシグナル伝達に関わるタンパク質群が含まれていた。すなわち、シェディングは膜タンパク質の不可逆的な切断を通じて、細胞接着、細胞遊走、あるいはシグナル伝達などの重要な生体イベントを強く制御していることが示唆された。

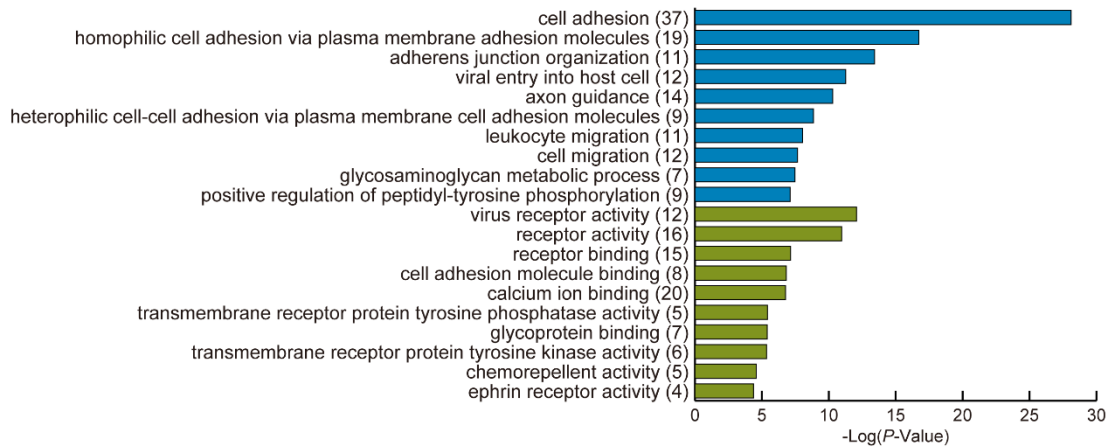


図 15 シェディング基質の GO term エンリッチメント解析

シェディング基質タンパク質について、GO term biological processes (青色) と molecular function (緑色) のエンリッチメント解析を行った。有意な上位 10 term について、Bonferroni 法によって補正した p -value を示す。括弧内の数字はタンパク質数を示す。

第六節 シェディングの細胞株特異性

多くのシェディング基質について、タンパク質あたり 1 箇所の切断部位が同定された (図 16A)。一方、NrCAM タンパク質上には計 65 もの切断部位が同定され、シェディングを含むタンパク質分解は、膨大な数のプロテオフォーム生成に寄与し、ヒトプロテオームの複雑性に大きく貢献し得ることが示された。多くのシェディング基質は、切断部位レベルおよびタンパク質レベルの両方で一種類の細胞株でのみ同定された (図 16B, C)。このことは、シェディングが個々の細胞株の生理機能に応じて行われていることを示唆する。興味深いことに、全ての細胞株で共通して同定されたシェディング基質は VIP36 のみであり、全て同じ部位 (F298↓L299) で切断を受けていた。過去の研究にて VIP36 がシェディング基質となることは報告されており (図 16D)⁵²、切断部位と予測されるアミノ酸残基に置換を施した VIP36 のシェディング感受性をウエスタンブロットによって評価する系により、VIP36 の切断部位の同定が試みられたが、詳細な切断部位の同定には至らなかった。本研究で同定された VIP36 切断部位は、この先行研究において切断部位が予測された範囲に含まれ、本研究のデータセットの信頼性を裏付けた。一方、36 種のタンパク質については、細胞株ごとに異なる部位で切断されていた (図 16E)。そのうち、5 タンパク質では BB-94 処理によって遊離が上昇した切断部位が観測された。この一例として、syndecan-1 について後に考察する。図 16F に、1 つの細胞株のみで特異的に同定されたシェディング基質タンパク質の割合を示す。アストロサイトーマ由来である U-251 MG 細胞では、最も多くのシェディング基質が同定され、そのうち 24 タンパク質が U-251 MG 細胞特異的に同定された。これらの U-251 MG 細胞特異的な基質の機能を調べるために、STRING データベース (<https://string-db.org/>)⁵³ を用いて、これらの基質タンパク質のタンパク質間相互作用を調べたところ、同サイズのランダムなタンパク質セットで予想されるよりも有意 (p -value = $6.13e-11$) に多くの相互作用が見られた (図 16G)。興味深いことに、エンリッチメント解析の結果、これらの U-251 MG 細胞に特異的な基質は、軸索の発生や誘導など、アストロサイトの機能よりも神経細胞の典型的な機能に関連していた (図 16H)。このことは、シェディングが中枢神経系の異なる細胞タイプ間のコミュニケーションに貢献していることを示唆する。

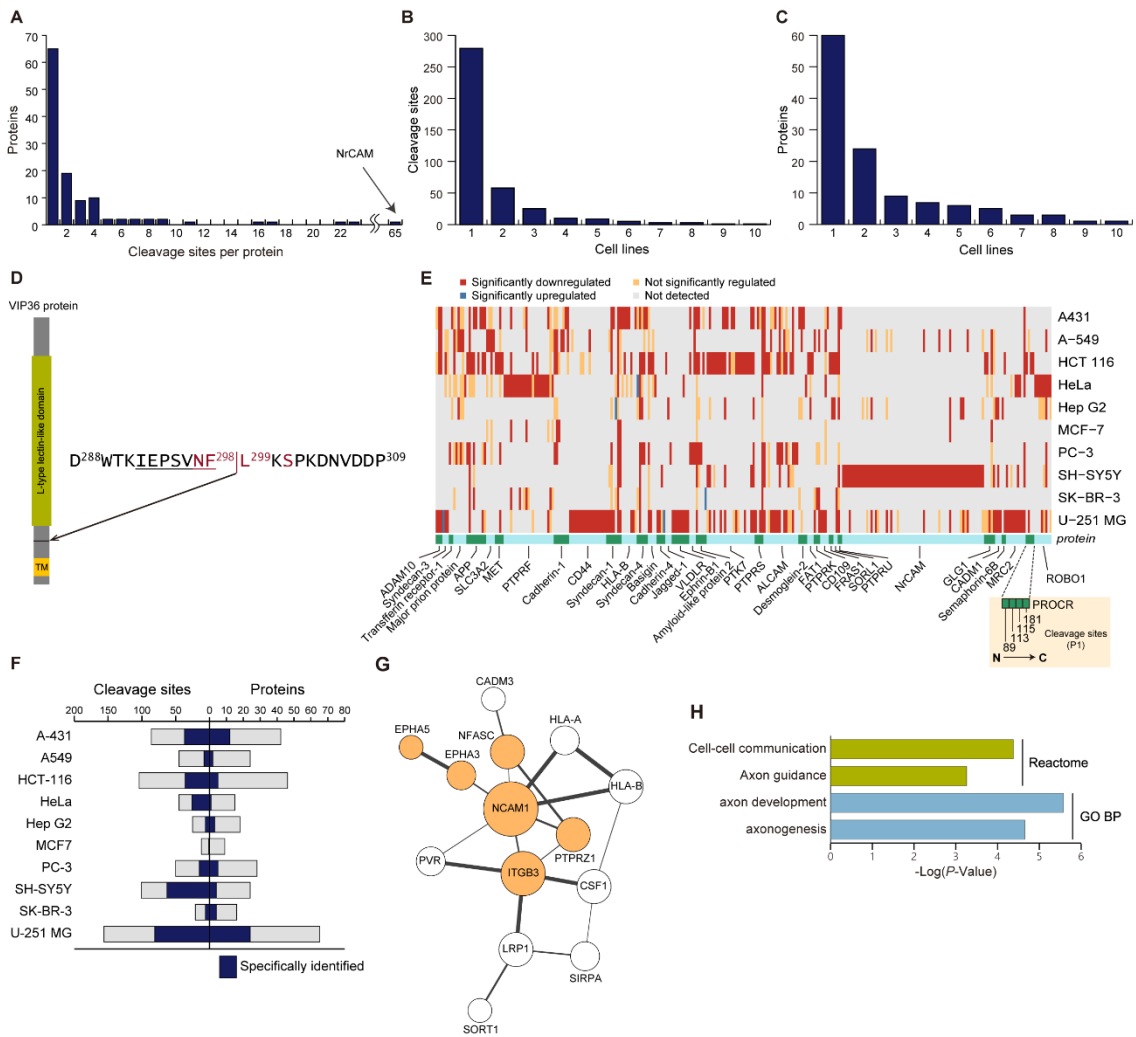


図 16 シェディングの細胞株特異性

(A) I 型および II 型一回膜貫通タンパク質および GPI アンカー型タンパク質のタンパク質あたりの切断部位の数。

(B, C) シェディング基質が同定された細胞株数。切断部位レベル (B) およびタンパク質レベル (C) についてそれぞれ示す。

(D) VIP36 の切断部位。先の研究にて、切断に必須であるとされたアミノ酸残基を赤色で示す。また、下線は本研究で同定された proteolytic peptide の配列を示す。TM : 細胞膜貫通領域。

(E) 異なる細胞株において異なる部位での切断を受けた膜タンパク質 (36 タンパク質) をヒートマップで示す。灰色、黄色、赤色、青色のセルは、それぞれ切断部位を示す。PROCR の例で示すように、N 末端から C 末端に向かって切断部位が並べられ

ている。下部に、タンパク質の境界を視覚化するために緑と水色のセルを交互に配置した。

(F) それぞれの細胞株における切断部位の数。各細胞株で特異的に同定された切断部位の数を紺色で示す。

(G, H) U-251 MG 細胞で特異的に同定されたシェディング基質タンパク質の相互作用ネットワーク (G)。相互作用のないタンパク質は図から除外した。有意に濃縮された Reactome (<https://reactome.org/>) および GO term について、Benjamini 補正された p -value を (H) に示す。これらの有意な Reactome あるいは GO term を持つタンパク質を (G) においてオレンジ色で示す。すべての解析は STRING (v11) で行った。ネットワークは Cytoscape (v3.8.0) を用いて可視化した。ノードの大きさは直接のコネクション数を反映し、エッジの線幅はスコアを反映する。

第七節 Position weight matrix スコアリングによる責任シェダーゼ予測

上述のように、本研究の結果にはメタロプロテアーゼによる切断の下流にある切断部位も含まれた。そこで、メタロプロテアーゼによる直接の切断部位を見出すために、MEROPS プロテアーゼデータベース (<https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>) の基質情報を用いて、position weight matrix (PWM) スコアリング⁵⁴による各切断部位の責任シェダーゼ予測を行った。ADAM17 と ADAM10 は主要なシェダーゼであるが、その切断部位に関する研究が比較的少ないため、MEROPS に登録されている基質切断部位情報は他のメタロプロテアーゼに比べて非常に少ない。そこで、MEROPS 登録基質に *in vitro* の基質情報⁵⁵を加えることで、ADAM10 と ADAM17 についてそれぞれ計 225 および 381 の切断部位情報を得た。さらに、Lichtenthaler らの総説¹⁴においてカノニカルシェダーゼあるいはパートタイムシェダーゼとして紹介されており、かつ MEROPS 登録基質の数が 100 以上ある 14 のシェダーゼ (matrix metalloprotease (MMP)-2、-3、-7、-8、-9、-12、-13、MT1-MMP、legumain、meprin β 、cathepsin S、cathepsin L、furin、proprotein convertase subtilisin/kexin 7 (PCSK7)) を選択し、計 16 のシェダーゼを対象とした。

各シェダーゼについて、基質配列の PWM を作成した (図 17, 図 18A)。Meprin β を除くほとんどのメタロプロテアーゼは、P1'位置 (切断部位の 1 アミノ酸下流) では Leu や Ile など、また P3 (切断部位の 3 アミノ酸上流) では Pro などの疎水性残基を好む傾向があり、これらの傾向は過去の報告と一致した^{55,56}。ADAM10 は、P1'において Tyr、Trp、Phe などの嵩高い疎水性残基を好む特徴があり、作成した PWM にはこの構造的な違いが反映されていた⁵⁷。Furin と PCSK7 は、P4-P1 に RxxR または RxKR の切断モチーフを示した⁵⁸。Legumain は P1 に Asp/Asn への、また meprin β は P1'に酸性残基への嗜好性を示した。

計 6000 以上 (16 シェダーゼ \times 378 切断部位) のシェダーゼ-基質関係を基に、PWM スコアを算出した (図 18B)。クラスター解析の結果、メタロプロテアーゼ群に高いスコアを示す 86 の切断部位からなる”メタロプロテアーゼ基質クラスター”を見出した (図 18B, C, 表 1)。このクラスターには、ADAM10 による APP 切断部位 (α サイト) や VIP36 の切断部位 (図 16D) も含まれていた。また、furin と PCSK7

が切断する RxxR モチーフが関連するクラスターも見出された (図 18B, D)。Furin や PCSK7 は主にプロプロテインコンバーターゼとして機能し、稀にシェダーゼとして機能するパートタイムシェダーゼとして知られる¹⁴。しかし、これらはセリンプロテアーゼであることから、BB-94 処理によるこれらの切断の減少は、BB-94 による直接的な阻害によるものではないと推測される。Furin や PCSK7 による切断がメタロプロテアーゼ依存的なシェディングの後に起こるとすれば、BB-94 処理によって RxxR モチーフにおける切断が抑制された可能性が考えられる。

メタロプロテアーゼ基質クラスター、RxxR クラスター、残りの切断部位について、細胞膜貫通部位から切断部位までの距離を比較すると、メタロプロテアーゼクラスターに属する切断部位は細胞表面に近い領域に位置していることがわかった (図 18E)。さらに、膜近傍の切断部位 (図 12B の 200 アミノ酸未満) には、メタロプロテアーゼ基質クラスターの切断部位が有意に多く含まれた (p -value = 2.5×10^{-3})。



図 17 各シェダーゼの基質 PWM

基質切断部位±4 アミノ酸残基の各位置について表す。大きい値ほど、高い頻度でそのアミノ酸が基質配列のその位置に存在することを示す。

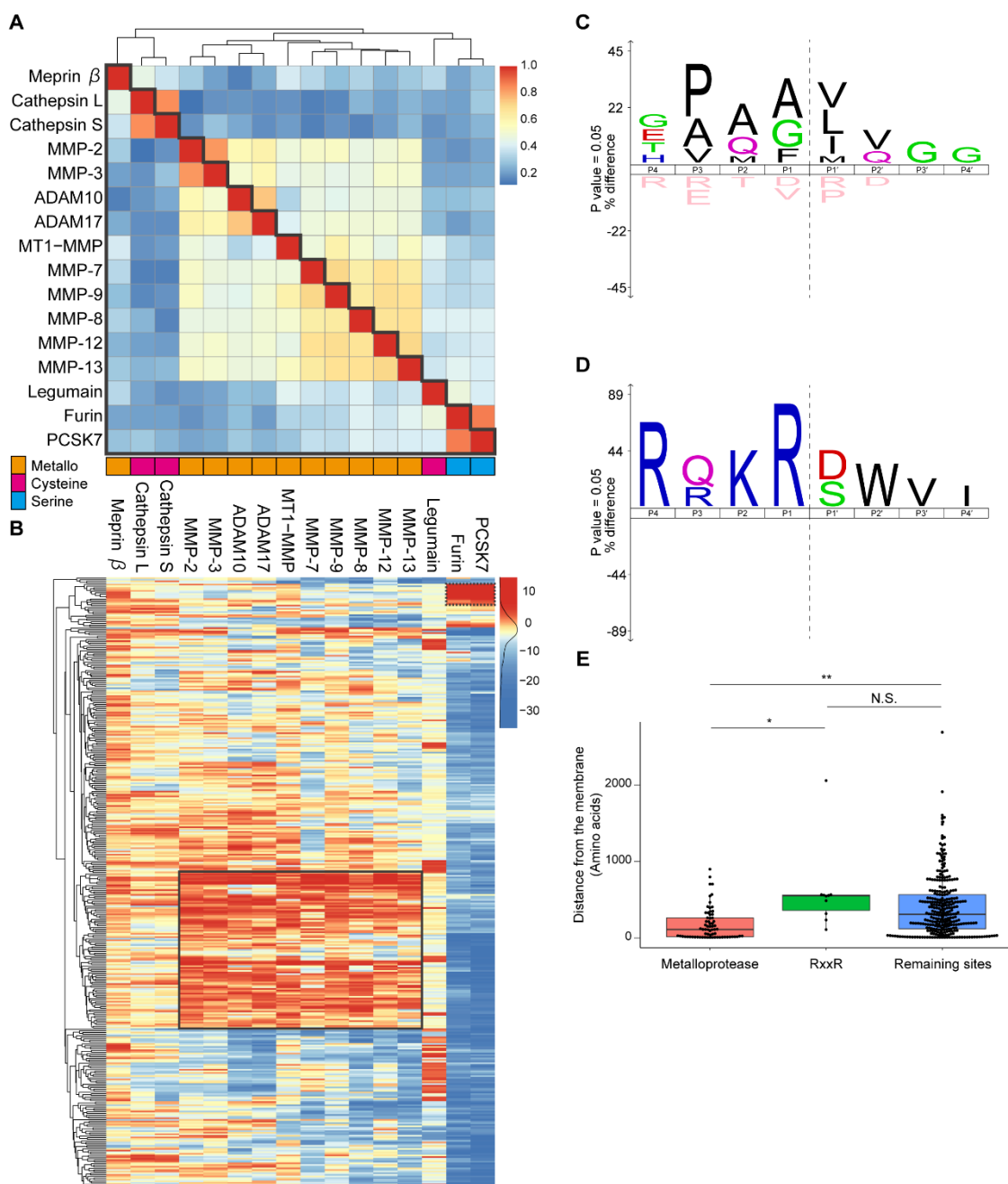


図 18 BB-94 処理で遊離が減少したシェディング基質切断部位の PWM スコアリング

(A) 図 17 に示した 16 種類のシェダーゼの PWM 間のコサイン類似度をヒートマップで示す。シェダーゼは、コサイン距離 (1-コサイン類似度) に基づいてクラスタリングされた。

(B) PWM スコアの階層的クラスター解析。メタロプロテアーゼに対して高いスコアを得た切断部位のクラスター（メタロプロテアーゼ基質クラスター）と、furin と PCSK7 に対して高いスコアを得たクラスター（RxxR クラスター）を、それぞれ実線および破線で示す。

(C, D) メタロプロテアーゼ基質クラスター (C) と RxxR クラスター (D) の切断部位周辺配列のシーケンスロゴ。文字（アミノ酸）が大きいほど、その位置にて高い頻度で現れることを示す。IceLogo (<https://iomics.ugent.be/icelogoserver/>) を用いて作成した (p -value = 0.05)。破線は切断部位を示す。

(E) 細胞膜貫通領域または GPI アンカー部位から切断部位までの距離を、メタロプロテアーゼ基質クラスター、RxxR クラスター、および残りの切断部位の間で比較した。 p -value を Wilcoxon の順位和検定により算出し、Bonferroni 補正を行った。*: $p = 1.26 \times 10^{-7}$, **: $p = 8.82 \times 10^{-4}$, N.S.: not significant.

表 1 メタロプロテアーゼクラスターに属する切断部位

UniProt accession ^(a)	Gene name ^(a)	Protein name ^(a)	Cleavage window ^(a)	P1 ^(a)	ADAM10 PWM score ^(b)	ADAM17 PWM score ^(b)
P55283	CDH4	Cadherin-4	TIGA ↓ VAAA	724	5.10	8.23
Q9H3T3	SEMA6B	Semaphorin-6B	GPGR ↓ LTPA	55	3.64	2.35
P04156	PRNP	Major prion protein	GAAA ↓ AGAV	117	4.54	5.51
P04156	PRNP	Major prion protein	AAAG ↓ AVVG	119	3.74	4.51
P04156	PRNP	Major prion protein	AGAA ↓ AAGA	116	4.24	4.67
P04156	PRNP	Major prion protein	AAGA ↓ VVGG	120	6.91	9.05
P55291	CDH15	Cadherin-15	GAAA ↓ LLAG	594	8.07	6.95
Q96NY8	PVRL4	Nectin-4	DPQE ↓ DSGK	337	-6.80	-4.09
P18827	SDC1	Syndecan-1	GPKE ↓ GEAV	101	-6.35	-5.73
P98172	EFNB1	Ephrin-B1	GASG ↓ GSSG	224	-0.33	-2.67
		Receptor-type				
P10586	PTPRF	tyrosine-protein phosphatase F	GPFQ ↓ EVDG	364	-4.41	-2.74
		Inactive tyrosine-				
Q13308	PTK7	protein kinase 7	VPEE ↓ SEGP	689	-6.23	-1.29
		Inactive tyrosine-				
Q13308	PTK7	protein kinase 7	HPAS ↓ EAEI	136	-6.89	-4.66
		HLA class I				
		histocompatibility				
P30466	HLA-B	antigen, B-18 alpha chain	ISVG ↓ YVDG	50	2.44	-0.77
		Amyloid beta A4				
P05067	APP	protein	HHQK ↓ LVFF	687	6.61	1.80
P22223	CDH3	Cadherin-3	EVQR ↓ LTVT	348	2.66	3.67

P0C7U0	ELFN1	Protein ELFN1	YAAE ↓ VVGP	258	2.81	7.02
P09603	CSF1	Macrophage colony-stimulating factor 1	KAFL ↓ LVQD	87	5.31	4.01
P04156	PRNP	Major prion protein	HMAG ↓ AAAA	114	3.98	5.00
Q5ZPR3	CD276	CD276 antigen	VSLQ ↓ VAAP	137	3.27	5.51
Q8WVN6	SECTM1	Secreted and transmembrane protein 1	GAEP ↓ QSAP	138	1.12	-0.59
P05067	APP	Amyloid beta A4 protein	VLAN ↓ MISE	579	2.09	0.35
O60462	NRP2	Neuropilin-2	PISA ↓ FAGE	806	3.02	2.37
P29317	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	QVQA ↓ LTQE	509	3.96	3.43
Q13308	PTK7	Inactive tyrosine-protein kinase 7	TPAG ↓ SIEA	488	2.16	1.41
Q9BRK3	MXRA8	Matrix-remodeling-associated protein 8	AAAG ↓ SSVV	33	1.45	1.31
P98172	EFNB1	Ephrin-B1	ASGG ↓ SSGD	225	0.27	-0.01
O75056	SDC3	Syndecan-3	GSSA ↓ AQLP	371	0.53	0.62
Q14126	DSG2	Desmoglein-2	VLEG ↓ MVEE	279	-2.71	-3.98
Q7Z5N4	SDK1	Protein sidekick-1	AVSA ↓ QVEA	1998	1.79	-1.62
P27824	CANX	Calnexin	VVGQ ↓ MIEA	472	0.93	-0.12
P16422	EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule	DVAY ↓ YFEK	214	0.56	-1.84
P09758	TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	DAAY ↓ YFER	224	-0.05	-1.47
P55287	CDH11	Cadherin-11	NAEA ↓ YILN	608	2.10	3.07

P18827	SDC1	Syndecan-1	EGEA ↓ VVLP	104	-0.61	3.95
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	FVPY ↓ LIKV	817	2.38	3.18
Q9Y6N7	ROBO1	Roundabout homolog 1	VIPF ↓ LVPG	841	1.12	0.81
Q8N126	CADM3	Cell adhesion molecule 3	PTAM ↓ IRPD	236	1.10	2.31
P30480	HLA-B;HLA- A	HLA class I histocompatibility antigen,B-7 alpha chain	TLQS ↓ MYGC	121	-1.28	-1.22
P22223	CDH3	Cadherin-3	EPVC ↓ VYTA	460	-1.00	2.00
P04626	ERBB2	Receptor tyrosine- protein kinase erbB-2	TACP ↓ YNYL	300	2.36	-1.11
Q13740	ALCAM	CD166 antigen	EADE ↓ ISDE	513	-4.86	-1.57
Q9Y6N7	ROBO1	Roundabout homolog 1	PQPA ↓ IFWR	381	-2.50	-2.20
Q6YHK3	CD109	CD109 antigen	PSEA ↓ ISLS	1330	-1.14	1.18
Q08174	PCDH1	Protocadherin-1	NAEL ↓ VYSL	541	0.24	4.81
Q9Y624	F11R	Junctional adhesion molecule A	TSNA ↓ VRME	226	-1.04	0.15
P78504	JAG1	Protein jagged-1 Receptor-type	HPCY ↓ NSGT	792	1.70	-0.26
P10586	PTPRF	tyrosine-protein phosphatase F	QPNT ↓ EYSF	1071	-8.26	-4.91
P16070	CD44	CD44 antigen	DIYP ↓ SNPT	170	-3.85	-4.47

		Receptor-type				
Q15262-2	PTPRK	tyrosine-protein phosphatase kappa	PDPA ↓ KQTD	745	-5.87	-4.31
Q92896	GLG1	Golgi apparatus protein 1	SDLA ↓ MQVM	1135	-3.57	-1.88
Q13308	PTK7	Inactive tyrosine- protein kinase 7	NSCN ↓ IKHT	671	-6.94	-1.51
P98155	VLDLR	Very low-density lipoprotein receptor	ICIN ↓ LKGG	412	-0.49	-2.39
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	LIIN ↓ IMSE	107	-2.44	-3.91
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	APQN ↓ LVLS	369	2.19	1.59
		Receptor-type				
Q13332	PTPRS	tyrosine-protein phosphatase S	DPQP ↓ IVDG	1275	5.02	4.15
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	HPNG ↓ ILTE	980	0.61	0.51
P12830	CDH1	Cadherin-1	GAAG ↓ VCRK	693	-7.43	-0.27
P22223	CDH3	Cadherin-3	DPAG ↓ WLAM	484	-0.57	1.40
P18827	SDC1	Syndecan-1	ATGA ↓ SQGL	242	0.99	3.08
		HLA class I				
P30480	HLA-C	histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain	DLRS ↓ WTAA	156	-3.91	1.61
Q14574	DSC3	Desmocollin-3	TPAA ↓ QYVR	475	2.20	0.76
Q14517	FAT1	Protocadherin Fat 1	PPFF ↓ FTIV	3477	2.92	2.73
P32926	DSG3	Desmoglein-3	TPMF ↓ LLSR	209	3.29	3.82

Q13740	ALCAM	CD166 antigen	NVSA ↓ ISIP	502	2.41	4.33
Q92896	GLG1	Golgi apparatus protein 1	LAMQ ↓ VMTS	1137	2.46	3.50
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	PAMA ↓ SRQV	1158	1.61	4.36
Q14210	LY6D	Lymphocyte antigen 6D	PSYT ↓ LQGQ	72	0.27	-0.23
P35613	BSG	Basigin	EPMG ↓ TANI	211	-0.01	2.09
P58658	EVA1C	Protein eva-1 homolog C	DPSG ↓ SKVL	294	-2.14	-0.98
P10586	PTPRF	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F	TPAQ ↓ QQEE	1254	-0.07	-4.15
Q12907	LMAN2	Vesicular integral- membrane protein VIP36	SVNF ↓ LKSP	298	3.04	3.67
P18827	SDC1	Syndecan-1	ASQG ↓ LLDR	245	0.55	-1.12
P35052	GPC1	Glypican-1	HPQL ↓ LLPD	182	3.64	0.73
Q14126	DSG2	Desmoglein-2	EIQF ↓ LISD	570	5.13	4.76
P15151	PVR	Poliovirus receptor	EVQK ↓ VQLT	153	1.30	3.26
Q14210	LY6D	Lymphocyte antigen 6D	LQGQ ↓ VSSG	76	0.94	3.05
P98172	EFNB1	Ephrin-B1	GPGA ↓ SGGs	222	1.06	2.28
P78504	JAG1	Protein jagged-1	AVAE ↓ VRVQ	1054	-1.10	3.13
Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	EVSG ↓ TQTT	702	-1.68	0.85
P05067	APP	Amyloid beta A4 protein	ELLP ↓ VNGE	608	1.35	3.06

Q92823	NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	TPEG↓VPSA	950	-0.12	3.10
P30508	HLA-C	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain	EPRF↓IAVG	46	0.07	4.02
P30480	HLA-C	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain	EPRF↓ISVG	46	-1.41	2.74
Q08174	PCDH1	Protocadherin-1	KKYF↓LQTT	457	-0.81	-2.64
P08581	MET	Hepatocyte growth factor receptor	GFMF↓LTDQ	228	6.58	1.36

図 18B のメタロプロテアーゼクラスターに属する切断部位を示す。クラスターと同じ順番で切断部位は並べられている。

(a) UniProtKB のアクセッション、遺伝子名、タンパク質名、切断部位周辺配列、P1 (切断部位の1つ上流) のアミノ酸残基。切断部位を"↓"で示す。

(b) 図 18B に示す ADAM10 および ADAM17 の PWM スコア。

第八節 Syndecan-1 は複数のシェダーゼによる切断を受ける

PWM スコアリングの対象となった 378 部位のうち、13 タンパク質上の計 18 切断部位が MEROPS 登録基質切断部位として確認された。更なる検証のため、そのうちのひとつである syndecan-1 タンパク質に着目し、本解析における定量結果と、MEROPS に登録されている責任シェダーゼの発現プロファイルを細胞株間で比較した。シェダーゼの発現プロファイルとして、使用した 10 種類の細胞株のうち HCT-116 以外の 9 種類について、The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) から mRNA 発現プロファイルを入手した。

本研究の解析結果では、syndecan-1 の R230↓N231、A242↓S243、G245↓L246 の 3 つの切断部位が MEROPS 登録基質として確認された (図 19A-C)⁵⁹。G245↓L246 は、この切断部位の MEROPS 登録責任シェダーゼである MT-MMP1 および MMP-7 に対して高い PWM スコア (>2) を示した (図 19C)。A242↓S243 は、MEROPS に基質として登録があるが、責任シェダーゼは不明であった。本解析においては、ADAM17、MMP-9、および MMP-12 に対して特に高いスコア (>2) を示した。この切断部位 (A242↓S243) を持つ proteolytic peptide は、解析した全細胞株で同定・定量され、Hep G2 以外の 9 つの細胞株で有意に減少していた (図 19B)。また、これら 2 つの減少した切断部位に加えて、興味深いことに、plasmin が介在すると報告される R230↓N231 の切断が Hep G2 においてのみ BB-94 処理によって上昇していた (図 19A)⁵⁹。Plasmin は Hep G2 細胞でのみ発現することを踏まえると (図 19A)、Hep G2 細胞における R230↓N231 の切断は plasmin が担うと考えられる。さらに、この R230↓N231 切断部位を含む proteolytic peptide 上に、メタロプロテアーゼ依存的な 2 つの切断部位 (A242↓S243 および G245↓L246) が確認された (図 19D)。この proteolytic peptide (231-248) は、Hep G2 細胞で主に分泌されていた (図 19E)。以上の結果から、BB-94 による syndecan-1 の 2 つの部位での切断 (A242↓S243 および G245↓L246) の抑制により、plasmin による切断部位 (R230↓N231) を含む proteolytic peptide の遊離が上昇したと推定された。

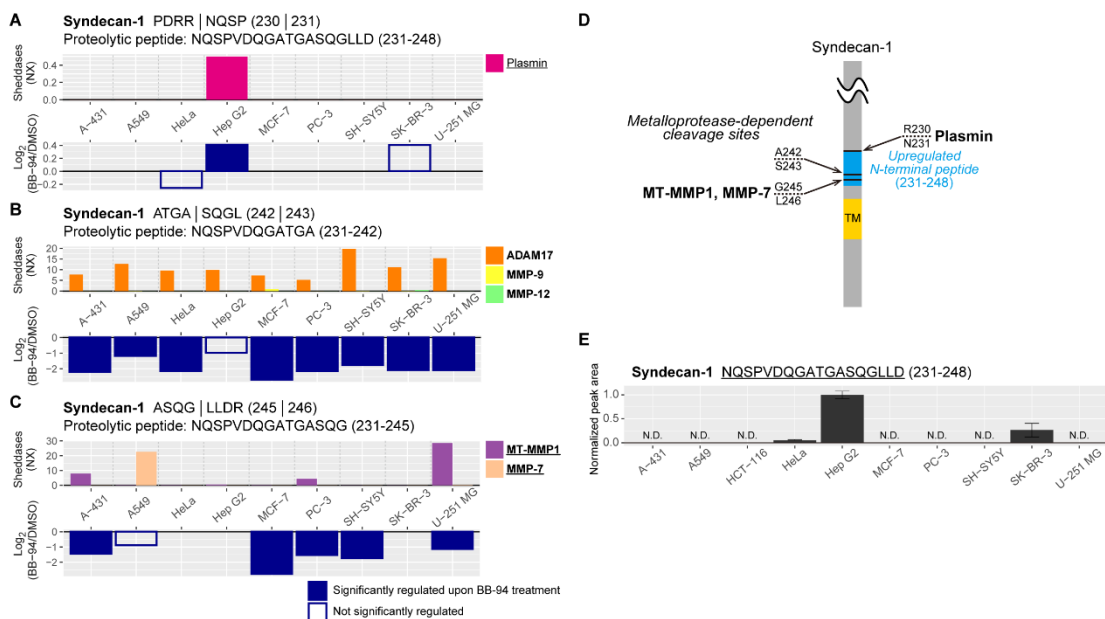


図 19 Syndecan-1 切断部位の定量結果および責任シェダーゼ発現プロファイル

(A-C) MEROPS に登録されている syndecan-1 の切断部位について、本研究における解析結果と、MEROPS に登録されている責任シェダーゼの mRNA の発現プロファイルを示す。シェダーゼの mRNA 発現プロファイルは、The Human Protein Atlas から入手した。ただし、HCT-116 における発現プロファイルは入手できなかったため、残りの 9 種類の細胞株における値のみを示す。グラフ右側に示す凡例において、PWM スコアが 2 以上のシェダーゼ名を太字で示す。また、下線は MEROPS において責任シェダーゼとして登録されていることを示す。NX: normalized expression.

(D) Hep G2 細胞における syndecan-1 切断部位。BB-94 処理によって上昇した proteolytic peptide を青で示す。R230↓N231 における切断は plasmin が、また R245↓L246 における切断は MT-MMP1 あるいは MMP-7 が担う。R242↓S243 における切断は報告があるが、その責任シェダーゼは不明である。TM: 細胞膜貫通領域。

(E) 各細胞株における syndecan-1 タンパク質の proteolytic peptide (231-NQSPVDQGATGASQGLLD-248) の LC/MS/MS 測定におけるピーク面積 ($N = 3$)。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。N.D.: not detected.

第九節 *In vitro* 実験による切断部位および PWM スコアの評価

PWM スコアリングに基づく責任シェダーゼ予測の正確さを実証するため、ペプチド基質と組換えシェダーゼを用いた *in vitro* 実験を行った。PWM スコアが比較的高い6つの切断部位-シェダーゼのペアを選択し、これらのうち3つずつの切断部位を含む2つのペプチド基質を合成した (図 20A)。実験の結果、全ての部位が対応するシェダーゼによって切断された (図 20B-H)。Legumain は、D/N の C 末端側で基質を切断することが知られている (図 17)⁶⁰。Legumain を用いた実験では、予想された生成物に加えて、PGEDGTLIDPQPIVD、GRRKRSAAL、GTLIDPQPIVD などのペプチドが同定されたことから、legumain が substrate peptide-2 を他の D においても切断したことが確認された。Substrate peptide-1 と meprin β の反応では、予想された生成物である DDVSLMFKNAPTSPDRVFNT よりも短い DDVSLMFKN ペプチドが多く確認された (図 20C)。Substrate peptide-1 配列上における meprin β の PWM スコアを網羅的に算出すると、MFKN \downarrow APTS におけるスコアが高く、複数の部位で meprin β が substrate peptide-1 を切断したために主要な生成物が DDVSLMFKN となったと推測された (図 20I)。また、2 番目に高いスコア (PTDD \downarrow DVSL) に対応する DVSLMFKN ペプチドも検出されており、以上の実験結果は PWM スコアリングによる責任シェダーゼ予測の精度の高さを裏付けた。

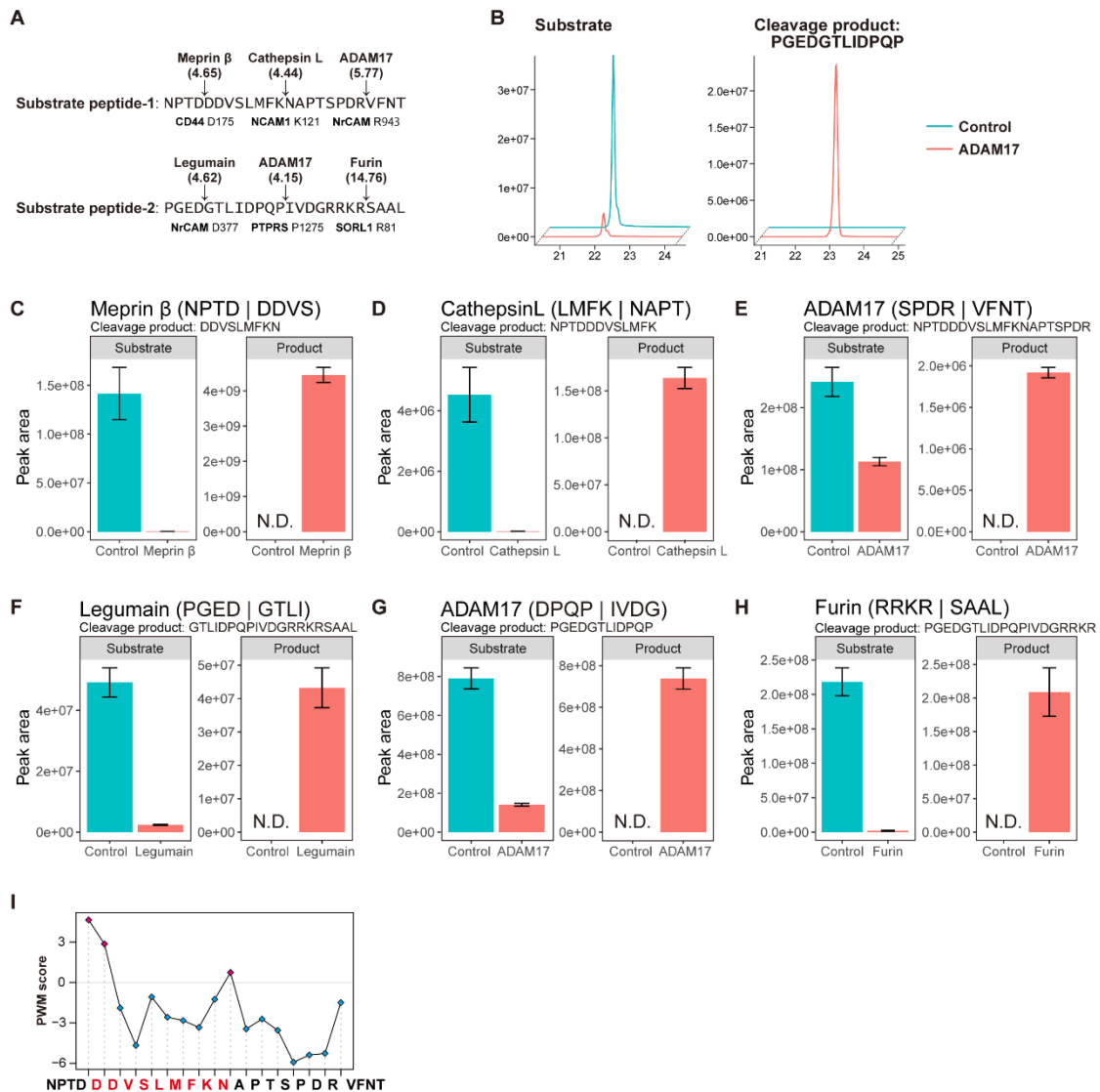


図 20 同定された切断部位の *in vitro* 実験による検証

(A) 合成した基質ペプチドの配列。基質は、各切断部位周囲の ± 4 残基とした。3つの基質配列を連結し、24残基のペプチドとして合成した。矢印は、シェダーゼと対応する切断部位を示す。括弧内の数字はPWMスコアを示す。配列の下に、由来する基質タンパク質名およびP1アミノ酸残基番号を示す。

(B) 実験結果の例として、ADAM17とsubstrate peptide-2の反応について、基質および生成物のLC/MS測定による抽出イオンクロマトグラムを示す。

(C-H) 各反応について、基質および生成物のピーク面積を示す ($N=3$)。エラーバーは平均値の標準誤差を示す。N.D.: not detected.

(l) Substrate peptide-1 の各位置における meprin β の PWM スコア。Meprin β による切断の定量化に用いた生成物のアミノ酸配列を赤色で示す。

第十節 結語

本章では、SCX クロマトグラフィーを用いたタンパク質末端ペプチド濃縮と高分解能質量分析測定を組み合わせることで、細胞培養上清中の膜タンパク質に由来する何千ものタンパク質末端を、少ない試料量で再現性よく定量解析できることを示した。試料調製ワークフローは、安定同位体タグ標識やチップ型カラムを用いた SCX クロマトグラフィーなど、ショットガンプロテオミクスにおいて一般的に用いられるシンプルな手順で構成されているため、上清中のシェディング基質を目的とした研究だけでなく、細胞や組織の解析にも応用可能な実用的なプラットフォームとなると期待される。

シェディングは細胞表面付近で起こることが、プロテオームスケールで示された。また、シェディングは、タンパク質チロシンキナーゼ/ホスファターゼや受容体など、シグナル伝達の主要なタンパク質を標的としていた。特筆すべき結果として、アミノ酸置換とウエスタンブロットを組み合わせた手法では十分に解明できなかった VIP36 の詳細な切断部位の同定に成功し⁵²、さらにこの切断部位は、解析に供した 10 種類の細胞株で共通して同定された唯一の切断部位であった。U-251 MG 細胞に特異的なシェディング基質の機能に着目したところ、放出されたタンパク質には、その細胞株そのものではなく、むしろ周囲の細胞にとって重要な機能を持つものが多かった。この結果は、シェディングが細胞間のコミュニケーションに重要な役割を果たすことを裏付けた。今回同定された基質タンパク質の多くについては以前からシェディングの対象となることが知られていたが、本研究により初めて詳細な切断部位が明らかになった。

本章で得たシェディング基質データセットには、メタロプロテアーゼ依存的なシェディングの下流のイベントによって生成された切断部位も含まれていた。また、遊離した基質ペプチド断片は、細胞外エンドペプチダーゼやエキソペプチダーゼによってさらに切断される可能性がある。そこで、PWM スコアリングにより切断部位の責任シェダーゼ予測を行った。その結果、メタロプロテアーゼ群に対して高いスコアを示した切断部位のクラスターを見出した。さらに、6 つの切断部位について、高いスコアを示したシェダーゼにより実際にその配列が切断されることを *in vitro* 実験に

より確認した。以上のことから、PWM スコアによるシェディング基質評価により正確な基質予測が可能であることが示された。

本研究は、複数の細胞株においてプロテオームスケールで内因性シェダーゼによる基質切断部位を俯瞰した初めての研究であり、得られたデータセットは、シェディングに関する仮説主導型の研究を支える有用なリソースとなる。細胞は、異なる細胞外刺激に応じて異なった基質を選択的にシェディングすることが知られる。しかし、シェディングがどのようにして特異的に行われるのかは、依然として謎である。ほとんどのシェディングは ADAM10 と ADAM17 によって行われており、これらのシェダーゼは多くの基質を共有している^{13,61}。また、シェダーゼの基質配列におけるモチーフ等は知られておらず、共通性が低い。そのため、シェダーゼが標的を特定する基本的なメカニズムの理解が非常に困難である。本章で示したストラテジーは、切断部位レベルでのシェディングの変化を系統的に明らかにすることを可能にし、シェディングの制御機構の解明に一助を成すと期待される。

第二章

リシンアシル化ペプチド濃縮技術の開発

第一節 序

リシン残基のアセチル化修飾は、真核生物の核内のタンパク質上に頻繁に見られる。特に、ヒストンのリシンアセチル化は、遺伝子発現の制御において重要な役割を果たすことが知られている⁶²。2009年、Choudharyらは細胞内のリシンアセチル化タンパク質についての初めての大規模解析を実施し、リシンアセチル化修飾はヒストンタンパク質のみならず、転写因子や代謝酵素などの細胞機能の根幹に関わるタンパク質群に広く存在することを明らかにした⁶³。さらに、ホルミル化、マロニル化、スクシニル化、ブチル化、プロピオニル化、グルタリル化など、他のアシル基によるリシン側鎖の修飾も近年報告されている^{21-24,30,64}。一般に、これらのアシル化は、リシンアシル基転移酵素 (KAT) およびリシン脱アシル化酵素 (KDAC) によって酵素的に制御されている。特に、KDACであるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) とサーチュイン (SIRT) は、アシル基の種類に対して異なる選択性を持っていることが知られている。例えば、SIRT5はマロニル基、スクシニル基、グルタリル基などの中程度の長さのアシル基を基質とする一方、SIRT6とHDAC8はミリストイル基のような長いアシル基を基質とする^{31,65}。近年の研究から、リシンアシル化が関連する代謝、細胞シグナル、老化などの生理現象の制御には、特にKDACが重要な役割を果たすことが示されている^{62,66}。そのため、アシル化によって制御される生理機能理解のためには、アシル化部位の知識に加えて、基質とそれを制御するKDACの関係情報が重要である。

アシル化を対象としたプロテオミクス (アシロミクス) には、LC/MS/MS測定の前にはあらかじめアシル化ペプチドを濃縮することが不可欠である。アシル化ペプチド濃縮には、免疫沈降法が主に用いられる。例えば、Lundbyらは、抗アセチル化リシン抗体を用いた免疫沈降法により、ラット組織中ののべ15,000以上のアセチル化部位を同定した²⁹。しかし、免疫沈降法は、対応する抗体のないアシル化修飾解析に

用いることはできない。また、抗体のアシル化部位周辺配列への偏りを避けることも難しい。さらに、抗体の使用にはコストの高さも問題となる。そのため、抗体を必要としないアシル化修飾ペプチド濃縮法が必要とされている。

本章では、KDAC と基質の関係に基づきアシル化ペプチドを選択し濃縮する新規のアシロミクス法を確立した (図 21)。化学的にアシル化されたモデルタンパク質試料に対してこの手法が有効であることを実証し、さらに HeLa 細胞核画分のアシル化部位を同定することに成功した。

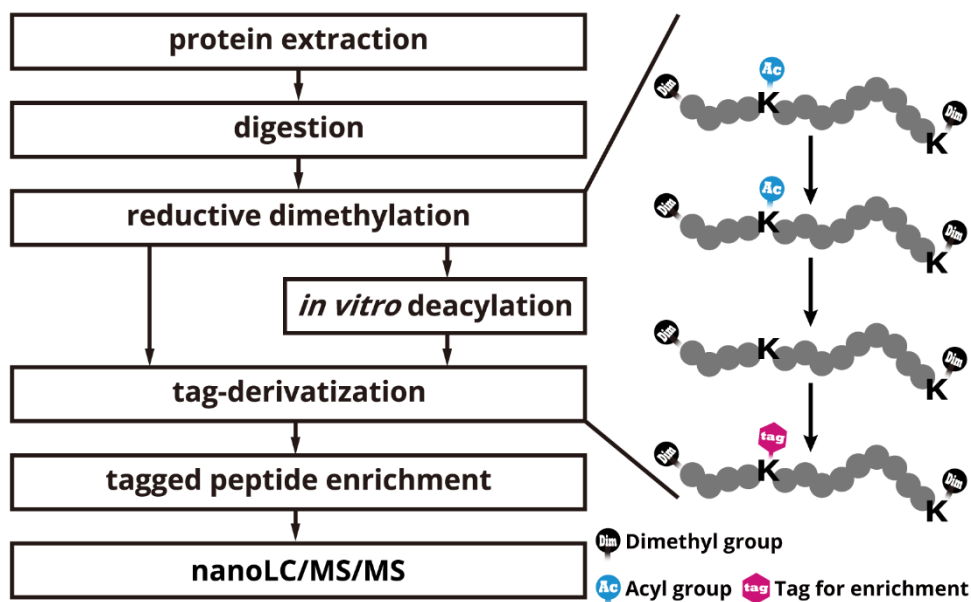


図 21 KDAC による脱アシル化および NHS タグを用いたリシンアシル化ペプチド濃縮によるリシンアシルロミクスのワークフロー

まず、ペプチド N 末端およびリシン側鎖の一級アミノ基を還元的ジメチル化により化学的に保護する。次に、*in vitro* KDAC 反応によって、リシン側鎖のアシル化を脱修飾する。その後、脱修飾したリシンを、フルオラスタグまたはビオチンタグのような *N*-hydroxysuccinimide (NHS) タグで修飾する。最後に、フルオラスアフィニティークロマトグラフィーあるいはビオチン-アビジンアフィニティークロマトグラフィーのような、タグ特異的なアフィニティークロマトグラフィーによってタグ化ペプチドを濃縮し、LC/MS/MS によって同定する。

第二節 KDAC 選択性に依存したアシル化ペプチド濃縮手法の概念実証実験

最初に、化学的にアセチル化を施した試料を用いて、概念実証実験を行った。HeLa 細胞抽出タンパク質の N 末端およびリシン側鎖の一級アミノ基を無水酢酸によってアセチル化し、トリプシン、GluC、あるいはキモトリプシンのいずれかで消化した後に、HDAC1、HDAC2、HDAC6、SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT7 のいずれかを用いて脱アセチル化した。脱アセチル化ペプチドの濃縮には、フルオラスアフィニティークロマトグラフィー⁶⁷を用いた。コントロール試料 (KDAC 処理なし) から同定されたタグ化ペプチドは除外した。その結果、用いた KDAC に応じて、異なるタグ化ペプチドおよびタグ化部位が同定された (図 22A)。HDAC2、SIRT1-SIRT3 を用いた場合、それぞれ 31 および約 400 のタグ化部位が同定された。一方、HDAC1、HDAC6 および SIRT7 を用いた場合ではわずかなタグ化ペプチドしか同定されなかった。HDAC2 および SIRT1-SIRT3 を用いて同定された部位とその周辺配列を比較すると、異なる部位が同定されていることが確認された (図 22B-F)。この結果は、利用した KDAC の基質配列選択性に応じてアシル化ペプチドが濃縮されたことを示唆している。さらに、この手法が異なるアシル化修飾にも応用可能なことを確認するため、化学的スクシニル化を施したモデル試料を調製した。脱スクシニル化酵素として知られる SIRT5⁶⁵を用いて *in vitro* 脱アシル化を行ったところ、304 のタグ化ペプチド上の 305 のタグ化部位を同定することができた (図 22G)。以上の結果から、本手法では KDAC の基質選択性に基づいてリシンアシル化ペプチドの濃縮が可能であることが実証された。

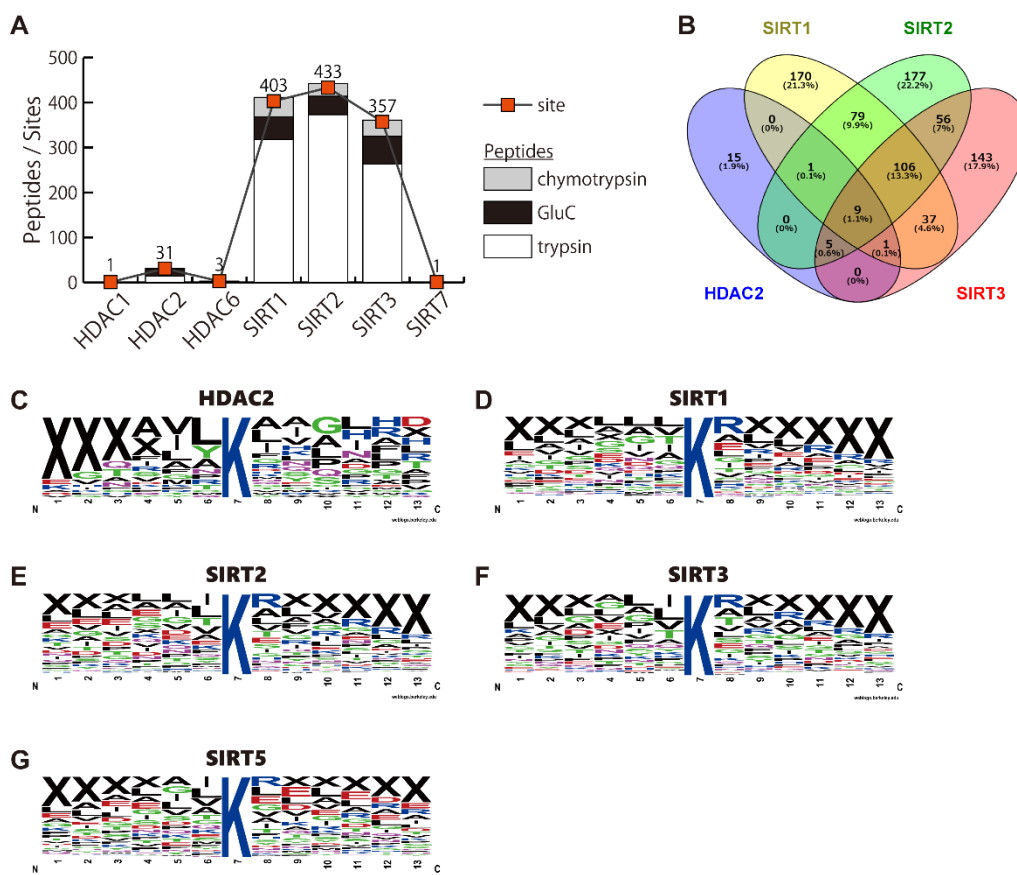


図 22 化学的にアシル化されたモデル試料を用いた KDAC 依存的リシン脱アシル化ペプチド濃縮の実証

HeLa 細胞から抽出したタンパク質を化学的にアセチル化 (A-F) またはスクシニル化 (G) し、モデル試料として使用した。

(A) 各リシン脱アセチル化酵素を用いて同定されたタグ化ペプチドおよびタグ化部位の数。数字は、同定されたタグ化部位の数を示す。

(B) SIRT1-SIRT3 および HDAC2 の間で同定されたタグ化部位の比較。

(C-G) リシン脱アセチル化酵素 (C, HDAC2; D-F, SIRT1-3) および脱スクシニル化酵素 (G, SIRT5) ごとに同定されたタグ部位の周辺アミノ酸配列ロゴ。タグ化リシン残基のアライメントは消化ペプチドレベルで行われているため、ペプチド末端外の情報のない残基は X で示されている。

第三節 生体内アシル化部位解析への応用

KDAC 阻害薬で処理した HeLa 細胞の核画分には、ヒストンタンパク質のアセチル化部位が豊富に存在することから、本章で開発した手法による細胞内因性的のアシル化部位の同定を試みた。アシル化ペプチドを正確に同定するために、一級アミノ基に対する還元的ジメチル化反応を用いた安定同位体標識を行った。すなわち、抽出したタンパク質消化物を二等分し、 $^{12}\text{CH}_2\text{O}$ (light) あるいは $^{13}\text{CD}_2\text{O}$ (heavy) を用いてジメチル化反応⁶⁸を行った。“Heavy”標識されたペプチドのみを SIRT1– SIRT3 のカクテルを用いて脱アシル化し、“light”標識ペプチドと“heavy”標識ペプチドを混合した。脱アシル化されたペプチドに、TCEP 等の還元剤によって切断可能な SS ビオチンタグを施し、ストレプトアビジンビーズを用いてタグ化ペプチド濃縮した。その結果、11 種類のタグ化ペプチドに由来する、ヒストンタンパク質 N 末端近傍の計 14 のタグ化部位が確認された (表 2)。同定されたタグ付きペプチドのマスマスペクトルの例を図 23A-D に示す。これらのペプチドは KDAC 処理された“heavy”標識体としてのみ検出されたことから、KDAC 処理に依存して濃縮されたアシル化ペプチドであることが確認された。一方、“light”と“heavy”のシグナル強度が同程度に検出されたペプチドも確認された (図 23E)。このようなペプチドは、還元的ジメチル化反応が不十分なために誤ってタグ化されて同定されたものであると推測された。

誤同定されたタグ化ペプチドのような目的外のペプチドの混入を減らすことは、効率的な解析のために重要である。また、KDAC により脱アシル化されたペプチドを効率的に濃縮することは、アシル化部位の同定数の向上に繋がる。還元的ジメチル化反応および脱アシル化されたペプチドの濃縮のより良い条件を見出すことで、より大規模な解析へと本手法を応用することができるようになると期待される。

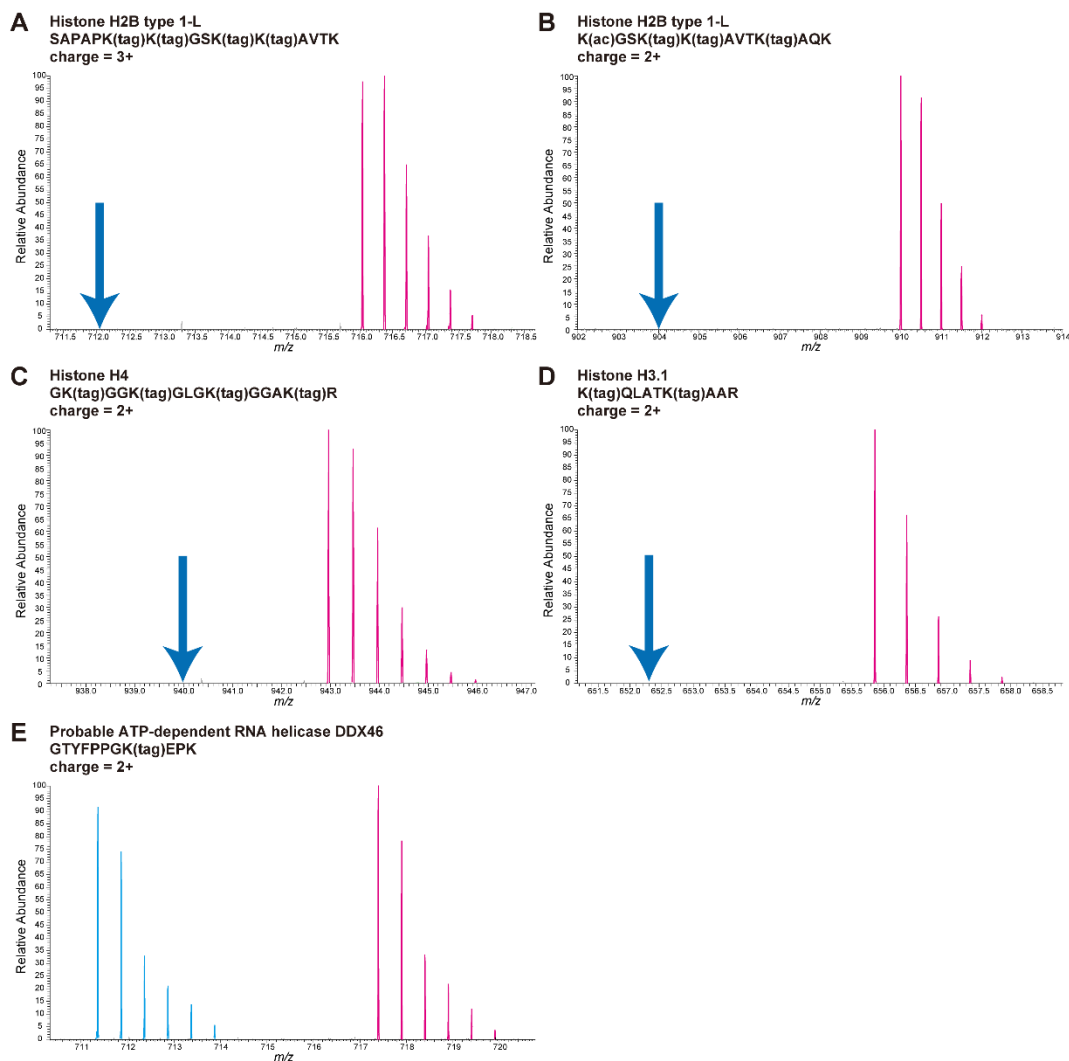


図 23 同定されたタグ化ペプチドのマスペクトル

(A-D) 同定されたタグ化ペプチドのマスペクトル。タグ化ペプチドは”heavy”標 (マゼンタ色) されたペプチドに相当するピークでのみ検出された。矢印は”light”標識ペプチドに相当する m/z を示す。

(E) 一級アミノ基保護のための還元的ジメチル化反応が不十分なために、アシル化ペプチドとして誤同定されたタグ化ペプチドのマスペクトルの例。このようなペプチドは、”light” (青色) と ”heavy” (マゼンタ色) のシグナル強度が等しいことに基づいて区別される。

表 2 同定された HeLa 細胞核画分由来アシル化部位

UniProt Accession ^(a)	Protein name ^(a)	Position ^(a)	Sequence window ^(b)	Peptide ^(c)	Localization probability ^(d)	Score ^(d)
P62805	Histone H4	6	_MSGRG K GKGLG	GK _{Tag} G K GK _{Tag} GLG K _{Tag} G G AK _{Tag} R	1	260.98
P62805	Histone H4	9	GRGKGG K GKGLKGG	GK _{Tag} G K GK _{Tag} GLG K _{Tag} G G AK _{Tag} R	1	260.98
P62805	Histone H4	13	GGKGLG K GGAKRH	GK _{Tag} G K GK _{Tag} GLG K _{Tag} G G AK _{Tag} R	1	260.98
P62805	Histone H4	17	LGKGG A KRHRKVL	GK _{Tag} G K GK _{Tag} GLG K _{Tag} G G AK _{Tag} R	1	260.98
P68431	Histone H3.1	19	GGKAPR K QLATKA	K _{Tag} Q L ATK _{Tag} AA R	1	177.7
P68431	Histone H3.1	24	RKQLAT K AARKSA	K _{Tag} Q L ATK _{Tag} AA R	1	177.7
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	13	SAPAP K KGSKKAV	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	1	145.55
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	16	AP K KGSKKAVTKV	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	0.999998	145.55
Q5QNW6	Histone H2B type 2-F	17	PK K GSKKA _{Tag} VTKVQ	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	0.999695	145.55
Q99880	Histone H2B type 1-L	12	KSAPAP K KGSKKA	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	1	145.55
Q99880	Histone H2B type 1-L	13	SAPAP K KGSKKAV	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	1	145.55
Q99880	Histone H2B type 1-L	16	AP K KGSKKAVTKA	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	0.999998	145.55
Q99880	Histone H2B type 1-L	17	PK K GSKKA _{Tag} VTKAQ	SAPAPK _{Tag} K K _{Tag} GS K _{Tag} K _{Tag} AVTK	0.999981	162.49
Q99880	Histone H2B type 1-L	21	SKKAVT K AQKKDG	K _{Acetyl} G S K _{Tag} K _{Tag} A VTK _{Tag} AQK	0.998399	162.49

(a) UniProt のアクセッション番号、タンパク質名、タンパク質上のアミノ酸番号。

(b) 同定されたタグ化部位 (太字) とその周辺配列 (±6 残基)。

(c) タグ化部位が同定されたペプチド配列。タグ修飾部位およびアセチル化修飾部位を添え字で示す。1 つの部位に対して複数のタグ化ペプチドが同定された場合は、最も高いスコアのペプチドを示す。

(d) MaxQuant によるタグ化ペプチドのスコアおよびタグ化部位の局在確率。

第四節 結語

プロテオミクスによりヒストンタンパク質以外にも多くのリシンアセチル化部位が存在することが明らかになった。また、アセチル化以外にも様々なアシル化修飾が存在し、細胞機能の根幹に関わる重要な生命現象に関連することが示されてきた。本章では、抗体を用いずに、KDACの基質選択性に基づいてアシル化ペプチドを濃縮する手法を開発した。化学的にアシル化を施したモデル試料に対して様々なKDACによる濃縮を試みると、それぞれの選択性に応じて異なったペプチドが濃縮された。また、本手法をHeLa細胞核画分に応用して、ヒストンタンパク質上のアシル化部位の同定に成功した。安定同位体標識を組み合わせることで、KDACの選択性に依存せずに濃縮された誤同定タグ化ペプチドを見極めることが可能であった。本手法は、使用するKDACと濃縮される基質ペプチドの対応関係により、アシル化部位と対応するKDAC情報を得ることができる利点を有し、アシル化修飾が関連するシステム生物学研究に貢献すると期待される。また、アシル化によるタンパク質の機能制御には、KDACによる脱アシル化が特に重要な役割を果たすことから、本手法によりアシル化部位情報と合わせて関連するKDAC情報を取得することは、その部位のアシル化修飾が制御する生命現象の分子基盤理解に一助を成すと考えられる。

第三章

非加水分解性リン酸化チロシン模倣体を用いた ホスファターゼ濃縮のためのペプチドプローブの開発

第一節 序

主要なタンパク質翻訳後修飾の一つであるセリン、スレオニン、およびチロシン残基のリン酸化は、プロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼによって可逆的に制御される。チロシン残基のリン酸化は、生理的に特に重要であり、この修飾を制御するキナーゼおよびホスファターゼは、それぞれプロテインチロシンキナーゼ (protein tyrosine kinases, PTKs) およびプロテインチロシンホスファターゼ (protein tyrosine phosphatases, PTPs) と呼ばれる。リン酸化チロシンは、PTK の一種である受容体型チロシンキナーゼタンパク質 (receptor tyrosine kinases, RTKs) に多く認められ、細胞外からの刺激により活性化した RTK は細胞内領域上のチロシンを自己リン酸化し、続いてそれを認識する Src homology 2 (SH2) ドメインを持つアダプタータンパク質群等による複雑な複合体を形成することで、下流のシグナル伝達カスケードを活性化する⁶⁹。

PTK や PTP の発現および活性のプロファイルは、細胞や組織、そして疾患の種類によって様々であり、その情報は関連する疾患の分子標的薬の開発や分子レベルでのメカニズムの理解に必要不可欠である。PTK あるいは PTP を LC/MS/MS により安定に解析するためには測定前の濃縮が必須であり、PTK を含むプロテインキナーゼ群の網羅的解析、すなわちキノミクス (kinomics) のための複数の濃縮法が報告されている⁷⁰⁻⁷²。特に、キナーゼに対する阻害化合物をビーズに結合させ (kinobead と呼ばれる)、これをプローブとして細胞抽出タンパク質からキナーゼを濃縮する手法が知られており、例えば Klaeger らはこの手法により PTK を含む 200 以上のキナーゼを定量した³⁴。一方、PTP については、その高度に保存された共通配列に対する抗体を用いた免疫沈降により濃縮し、LC/MS/MS により大規模に解析した例が報告さ

れている^{35,73}。しかし、用いられる抗体は酸化型の PTP のみを認識する制限があること、またエピトープの保存性が低い PTP は対象とならないことなどの問題がある。先行するキナーゼやリン酸化部位に関するプロテオミクス研究と比較して、PTP を含むホスファターゼについての例は少なく、汎用的なホスファターゼ濃縮のための技術開発が求められている。

先に、有機化学的に合成された複数種の非加水分解性、すなわち酵素的脱リン酸化を受けないリン酸化チロシン模倣体が報告されている^{74,75}。これらを含む合成ペプチドは PTP と強く結合するため、PTP 阻害薬として働く。4-[difluoro(phosphono)methyl]-L-phenylalanine (F₂Pmp, 図 24A) を含むペプチドは、特に強い PTP 阻害活性を示し、生細胞あるいは細胞抽出物中の PTP 検出にも応用されている⁷⁵⁻⁷⁷。上述したキナーゼ濃縮のための kinobead の例のように、標的と強く結合する阻害ペプチドを固定化することでプローブとしてその標的分子を濃縮することができる。そこで本章では、PTP を対象としたホスファターゼの網羅的解析の基盤技術開発を目的として、PTP 濃縮ツールとしての F₂Pmp 含有ペプチドの有用性を評価した。

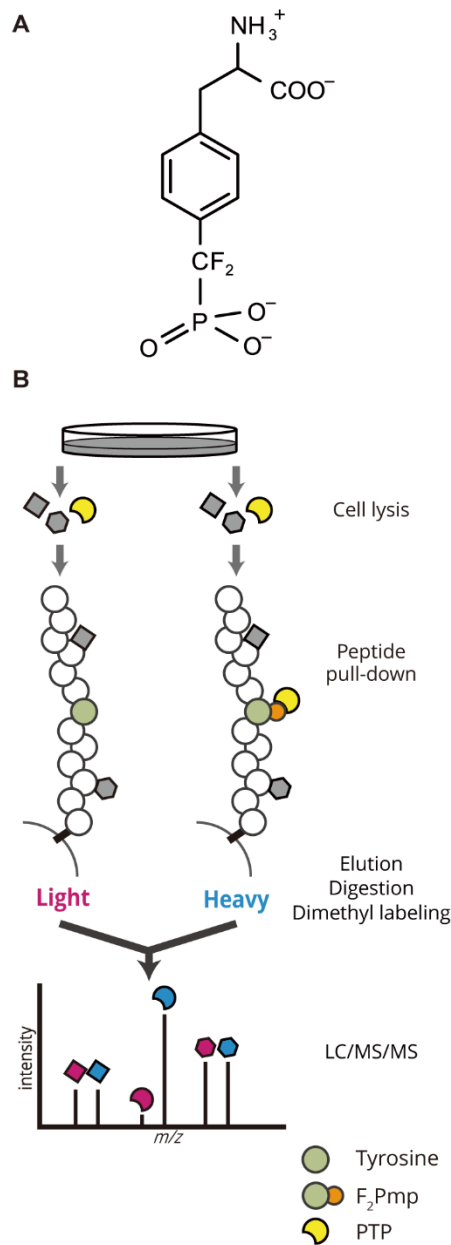


図 24 ペプチド型 F₂Pmp プローブを用いたプルダウンによる PTP 濃縮実験の概要

(A) F₂Pmp の構造。

(B) ワークフローおよび F₂Pmp プローブによる濃縮タンパク質同定の原理。ペプチド型プローブは予めビーズに結合させて使用した。F₂Pmp プローブ、あるいは F₂Pmp をチロシンに置換したコントロールプローブ (Y プローブ) とプルダウンした HEK293T 細胞抽出物由来のタンパク質を、安定同位体を用いた定量的 LC/MS/MS によって解析し、F₂Pmp 依存的に濃縮されたタンパク質を同定した。

第二節 F₂Pmp プローブを用いたプルダウンによる PTP 濃縮の検討

本章で検討したペプチド型 F₂Pmp プローブを用いた PTP 濃縮法の概要を図 24B に示す。全てのプローブは、N 末端ビオチン化修飾を持つ SGSG リンカー配列を含む計 15 アミノ酸残基のペプチドとして合成された。このプローブを、樹脂に固定されたアビジンアナログタンパク質と結合させ、HEK293T 細胞抽出物に対してペプチドプルダウンを行った。6 時間のインキュベーションおよび樹脂洗浄の後、樹脂からプルダウンしたタンパク質群を溶出し、その後 PTS 法⁷⁸に従ってトリプシンと LysC によりペプチドに消化した。F₂Pmp 依存的に結合したタンパク質と、非特異的に結合したタンパク質を区別するため、F₂Pmp をチロシンに置換したプローブ (Y プローブ) を用いて同様の操作による試料を調製してコントロールとした。¹²CH₂O (light) もしくは ¹³CD₂O (heavy) を用いた還元的ジメチル化反応⁶⁸によって、コントロールプローブあるいは F₂Pmp プローブとプルダウンしたタンパク質試料をそれぞれ安定同位体標識し、混合した後に LC/MS/MS によって解析した。

先の研究で、D-F₂Pmp-VPML ペプチドは、チロシンホスファターゼ PTPN1 (PTP1B) に対して強い阻害活性を示した⁷⁵。この結果を受けて、D-F₂Pmp-VPML ペプチドプローブ (表 3、プローブ A) は PTPN1 と強く結合すると予想し、プローブ A によって PTPN1 を濃縮することができるかを調べた。その結果、プローブ A は期待通り PTPN1 を濃縮した (図 25A-C, 図 26A)。これに加えて、PTPN1 と 72% の触媒ドメイン配列の同一性を持つ PTPN2 (TCPTP) を濃縮した⁷⁹ (図 26A)。コントロールの Y プローブによるプルダウンと比較して、F₂Pmp プローブによるプルダウンでは、PTPN1 が約 180 倍、PTPN2 が約 150 倍に濃縮されており、F₂Pmp プローブがこれらの PTP を効率的に濃縮することが確認された。さらに、SH2 ドメインを含む 2 つのタンパク質、phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit α (PIK3R1, p85) および β (PIK3R2, p85) もプローブ A によって濃縮された。これらのタンパク質の濃縮率は、PTPN1 および PTPN2 の濃縮率と同程度であった。また、PIK3R1、PIK3R2、PTPN1 の相互作用タンパク質である phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α および β (PIK3CA および PIK3CB) も共に濃縮された (図 27A)。ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸結合部位を持つ syndecan-

binding protein 1 (SDCBP) も、リン酸基に嗜好性を示すためか、高い濃縮率を示した。

F₂Pmp プローブをさらに評価するために、ヒトの生体内チロシンリン酸化部位に基づいて設計された2つのペプチドプローブを合成した(表 3、プローブ B および C)。ヒト受容体型チロシンキナーゼ ERBB2 の Y1248 に由来する配列を持つプローブ B を使用したところ、プローブ A 使用時とは別の PTP である PTPN13 (PTP-BAS, FAP-1) が、コントロールの Y プローブと比較して平均 16 倍に濃縮された(図 26B)。SH2 ドメイン含有タンパク質である YES1 も同定されたが、その濃縮率は 1 に近かったため、F₂Pmp 特異的に濃縮されたものではないようであった。一方、ヒト血小板由来成長因子受容体 β (PDGF β) の Y1021 に由来する配列を持つプローブ C を使用したところ、プローブ A を使用した場合と同様に、PTPN1 と PTPN2 が一緒に濃縮された(図 26C)。さらに、phospholipase C γ -1 (PLC γ 1) と Ras GTPase-activating protein 1 (RASA1) の 2 つの SH2 ドメインタンパク質が濃縮された。興味深いことに、PLC γ 1 は、プローブ C の配列が由来する PDGFR β タンパク質のリン酸化された Y1021 と結合することが報告されており⁸⁰、F₂Pmp プローブが生理的な相互作用を反映し得ることが示唆された。プローブ B および C のプルダウン実験では、PTP や SH2 ドメイン含有タンパク質の相互作用タンパク質は見つからなかった(図 27B, C)。以上の結果から、F₂Pmp プローブは PTP や SH2 ドメインタンパク質の濃縮に適用できることが示された。

表 3 使用したプローブの一覧

Name	F ₂ Pmp-probe	Control probes (Y-probe/pY-probe)	Reference
Probe A	SGSGD-F ₂ Pmp-VPMLG	SGSGD-Y-VPMLG SGSGD-pY-VPMLG	Artificial sequence tested in Chen <i>et al</i> , 1995 ⁷⁷
Probe B	AENPE-F ₂ Pmp-LGLDV	AENPE-Y-LGLDV AENPE-pY-LGLDV	Human ERBB2 (Y1248)
Probe C	EGDND-F ₂ Pmp-IIPLP	EGDND-Y-IIPLP EGDND-pY-IIPLP	Human PDGF receptor β (Y1021)

3 種類の配列のプローブ (A~C) を合成し、検討した。コントロールとして、F₂Pmp をチロシンに置換したチロシンプローブ (第二節) もしくはリン酸化チロシンに置換したリン酸化チロシンプローブ (第三節) を使用した (図 24)。本文中ではそれぞれを「F₂Pmp プローブ」、「Y プローブ」、「pY プローブ」と表記する。

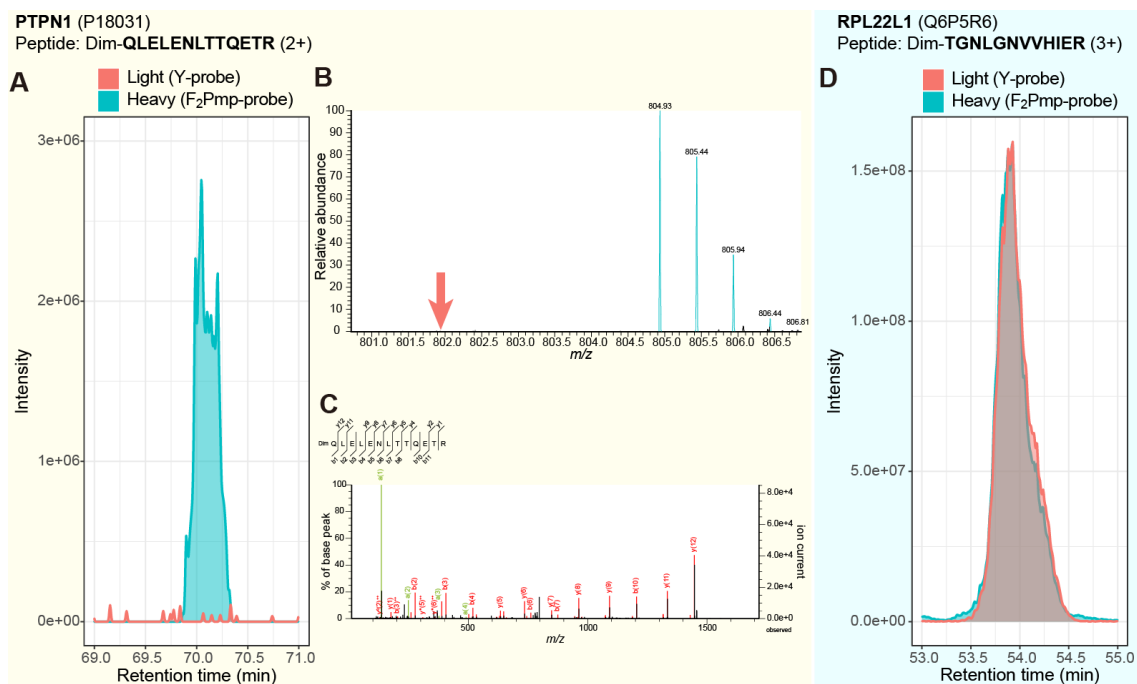


図 25 同定された PTP の例

(A-C) 同定された PTPN1 ペプチドの抽出イオンクロマトグラム (XIC) (A)、MS スペクトル (B)、および MS/MS スペクトル (C)。データベースサーチによる同定では b イオンと y イオンのみを使用され、a イオンは Lorikeet spectrum viewer (<https://github.com/UWPR/Lorikeet>) により割り当てられた。

(D) 非特異的に同定されたペプチドの XIC の例。

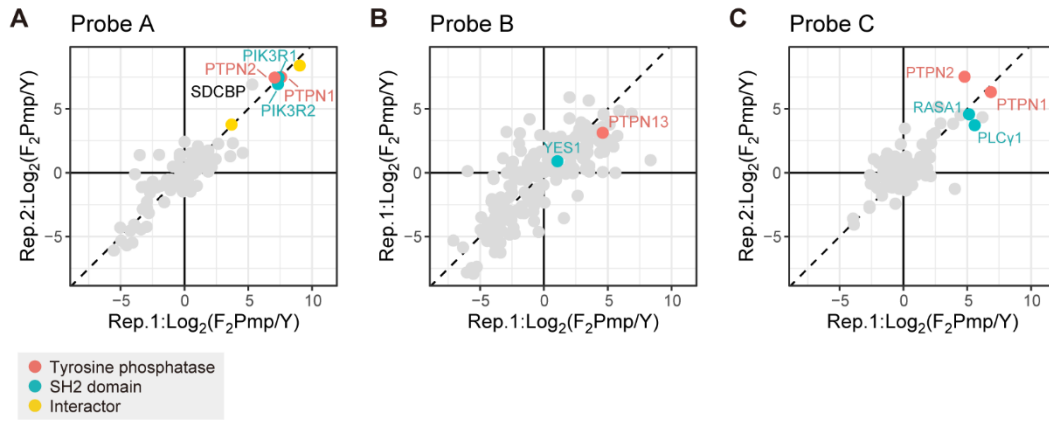


図 26 各プローブによりプルダウンされたタンパク質の濃縮率

各プローブによるプルダウン実験により同定されたタンパク質の濃縮率 (F_2Pmp プローブ/Y プローブ) を \log_2 スケールで示す。各試料は $N=2$ で調製された。x 軸および y 軸は、それぞれ replicate 1 および 2 における結果を示す。破線は、 $y = x$ を表す。なお、同位体ラベルの均一性を確かめるために、A の replicate 2 は heavy と light の安定同位体標識を入れ替えて実験を行った。

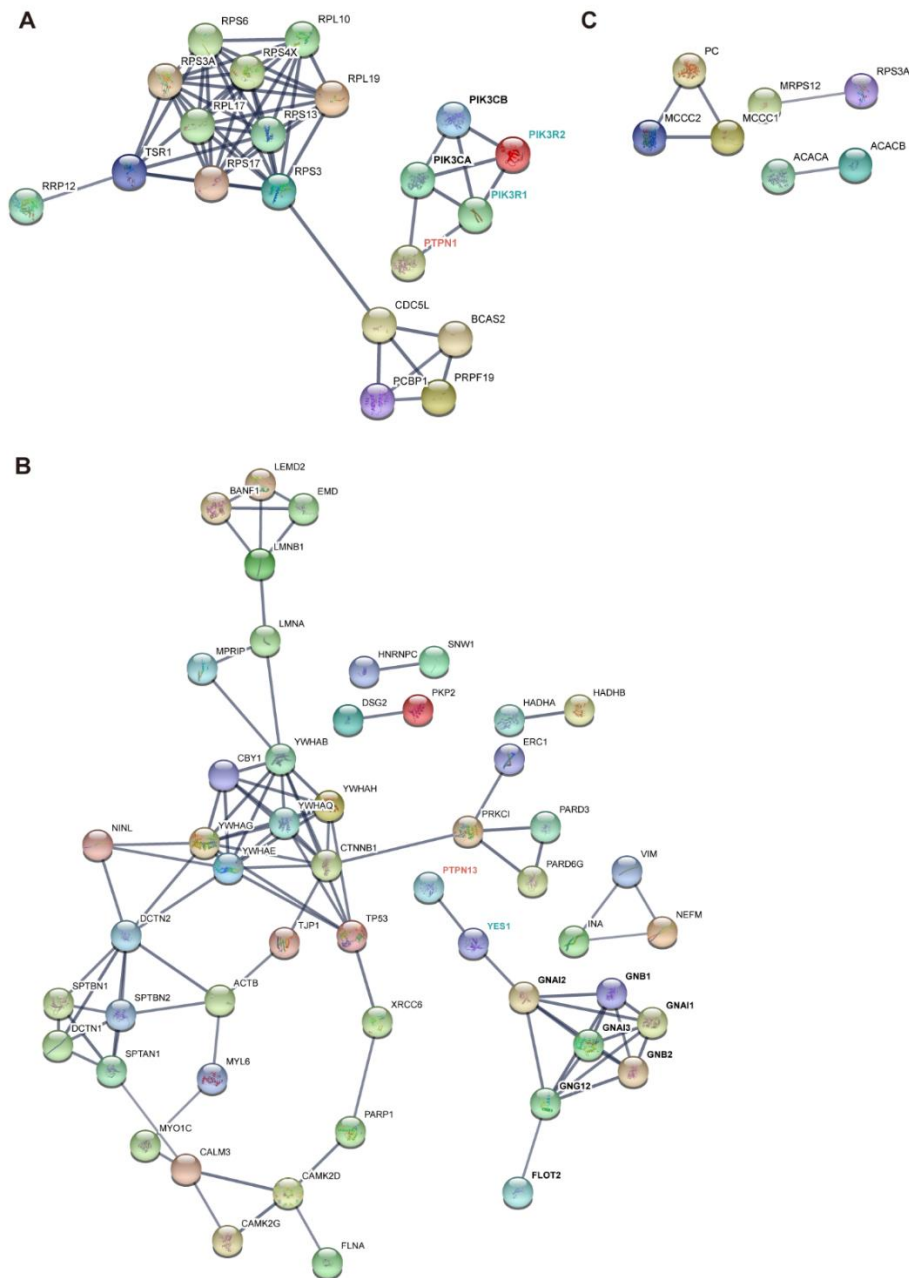


図 27 F₂Pmp プローブによって濃縮されたタンパク質のインタラクトーム

A-C の各実験結果において、2 倍以上の濃縮率を示したタンパク質群を抽出し、STRING (v.11.0) を用いて相互作用タンパク質 (インタラクトーム) を解析した。STRING による解析の活用情報源 (active source) として、“Experiments”および“Database”を選択し、信頼性スコアの閾値は 0.7 (high confidence) とした。

第三節 リン酸化チロシンプローブと比較した F₂Pmp プローブの評価

次に、Y プローブの代わりにコントロールとしてリン酸化チロシン (pY) プローブを使用した (表 3, 図 28)。驚くべきことに、使用したすべてのプローブについて、PTP は F₂Pmp/Y プローブ (図 26) と比較してほぼ同じ濃縮率を示した (図 29)。これは、pY プローブがリン酸基を持つにもかかわらず、Y プローブとして機能していることを示唆した。そこで、pY プローブのリン酸基がプルダウン実験中に内在するホスファターゼによって脱リン酸化されるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、pY プローブを細胞抽出液とインキュベートし、脱リン酸化が起こるかどうかを調べた。その結果、pY プローブを HEK293T 細胞抽出物とインキュベートすると、脱リン酸化されたプローブが増加した (図 29D)。すなわち、F₂Pmp プローブは pY プローブよりも PTP 濃縮の目的において優れていると考えられる。一方、SH2 ドメインを含むタンパク質は、それぞれ異なる挙動を示した。PIK3R1、PIK3R2 (図 29A)、および PLC γ 1 (図 29C) の濃縮率は、コントロールとして pY プローブを用いた場合に低下しており、これらのタンパク質が pY プローブでもプルダウン可能であることが示唆された。RASA1 は、pY プローブと Y プローブをコントロールとした場合でほぼ同じ濃縮率を示し (図 29C)、PTP と同様に F₂Pmp プローブによって特異的に濃縮されていることが示唆された。予想外に、YES1 の濃縮率は pY プローブ使用時に上昇した。このことは、YES1 が pY プローブに最も強く結合したことを示唆する。pY プローブが内在性ホスファターゼによって脱リン酸化されるにも関わらず、多くの SH2 ドメインタンパク質が濃縮されたのは、SH2 ドメインが pY サイトに安定して結合することで、内在性のホスファターゼの pY サイトへのアクセスが阻害され、脱リン酸化が起こらないためであると推測された⁸¹。このことは、過去の大規模研究において、様々な pY ペプチドプローブが SH2 ドメインタンパク質を濃縮したことに対して、ホスファターゼは同定されなかったことから裏付けられる⁸²。

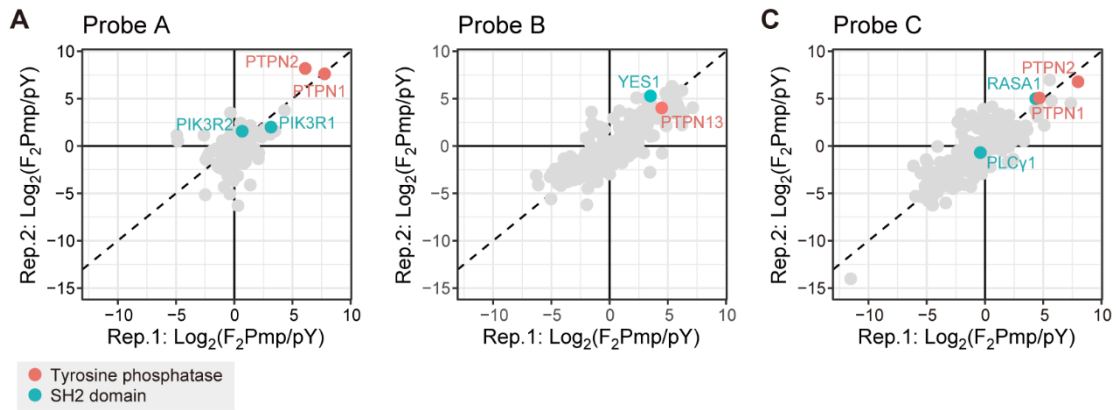


図 28 コントロールとして pY プローブを用いた F₂Pmp プローブのプルダウン

各プローブによるプルダウン実験により同定されたタンパク質の濃縮率 (F₂Pmp プローブ/pY プローブ) を log₂ スケールで示す。各試料は N=2 で調製された。x 軸および y 軸は、それぞれ replicate 1 および 2 における結果を示す。破線は、y = x を表す。

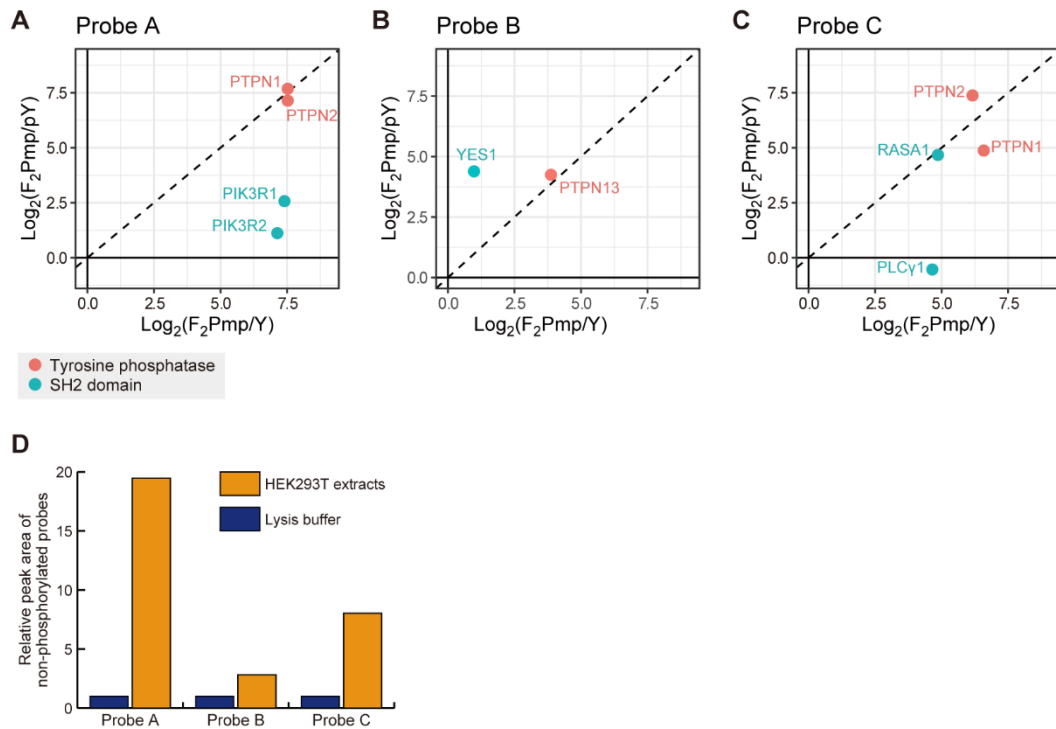


図 29 PTP プローブとしての pY プローブの評価

(A-C) F₂Pmp/Y (図 26) と F₂Pmp/pY (図 28) における濃縮比を各タンパク質について比較した。Replicate 1 と 2 の平均値を示す。

(D) pY プローブを HEK293T 細胞抽出物あるいは溶解バッファーのみとインキュベートし、LC/MS で分析した。非リン酸化型ペプチドプローブの相対的なピーク面積を示す。コントロール試料の面積を 1 とした。

第四節 結語

本章では、F₂Pmp プローブの PTP 濃縮ツールとしての応用性を評価し、F₂Pmp プローブを用いて PTP をプローブ配列依存的に高度かつ再現性よく濃縮できることを明らかにした。また、pY プローブは、ホスファターゼを含む細胞抽出液とのインキュベーション中に脱リン酸化されるために、PTP の濃縮には適していないことを示した。ペプチド型のプローブは、市販の Fmoc-F₂Pmp を用いて、様々な目的に応じた配列を自由に設計・合成できる利点がある。PTP の包括的な濃縮に向けた次のステップとして、他の配列の F₂Pmp プローブを用いることで、今回検出されなかった他の PTP を濃縮することができるかを調べる必要がある。アミノ酸配列を変化させたときの PTP の選択性や濃縮率の変化を系統的に解析することで、効率的なプローブ設計を行うことができるようになることが期待される。また、PTPN12 (PTP-PEST) や PTP-RC (CD45) のように、セリン残基のリン酸化によって厳密に制御される PTP もあり^{83,84}、試薬刺激によって細胞内のリン酸化シグナル伝達を活性化させた後に PTP を濃縮すると、異なる結果が得られる可能性がある。さらに、非加水分解性のセリンやスレオニンのアナログも同様にホスファターゼ濃縮に使用できる可能性もある。このようなリン酸化模倣アミノ酸は、本手法のターゲットを拡大し、PTP だけでなく、プロテインホスファターゼファミリー全体の包括的な検出を可能にするであろう。また、F₂Pmp プローブによるプルダウンでは、SH2 ドメインを持つタンパク質も濃縮された。これは、F₂Pmp が SH2 ドメイン阻害薬であるというこれまでの知見と合致する^{74,85}。さらに、プローブが由来する生体内配列との生理的な相互作用が知られる SH2 ドメインタンパク質の濃縮も確認された。本研究は、F₂Pmp をケミカルプロテオミクスに応用した初めての例であり、PTP や SH2 ドメインタンパク質を標的とした阻害薬としての F₂Pmp ペプチドの再評価に繋がると期待される。

結 論

本研究では、タンパク質翻訳後修飾やその制御因子を対象としたプロテオミクスのための基盤技術開発を行い、以下の知見を得た。

第一章では、エクトドメインシェディング基質の大規模同定を目的として、様々な組織に由来する 10 種のヒト細胞株培養上清タンパク質消化物から末端ペプチドを同定し、489 もの膜タンパク質上の切断部位を同定した。取得した生体内プロテアーゼによるシェディング基質切断部位の数は、当該分野の研究において過去最大であった。第二章では、リシンのアシル化修飾を対象として、抗体を用いることなく修飾ペプチドを濃縮し、定量的 LC/MS/MS によって同定する手法を確立した。この手法では、用いる KDAC の選択性に応じた基質ペプチドが濃縮されるため、KDAC の基質選択性の評価が可能であった。また、本手法を HeLa 細胞の核画分に応用した結果、ヒストンタンパク質上のリシンアシル化部位の同定に至った。第三章では、リン酸化修飾の制御因子であるホスファターゼをプロテオミクスにより解析するための手法を確立した。リン酸化チロシン模倣体である F₂Pmp を含む 3 種類のペプチド型プローブを合成し、HEK293T 細胞抽出物に対するプルダウン実験を行った結果、プローブ配列により異なった PTP や、SH2 ドメインを持つタンパク質が濃縮されることが確認された。

以上、タンパク質翻訳後修飾やその制御因子の解析を目的としたプロテオミクスのための基盤技術確立を行った。翻訳後修飾は、生命現象の主要な因子であるタンパク質を直接制御するため、これを対象とした網羅的解析が可能になることは、生命システムの分子基盤の新たな側面の発見と理解を促進し、疾患の原因解明や創薬、個別化医療の発展に一助を成すと期待される。

実験の部

材料

細胞株

A-431 細胞、A549 細胞、HCT 116 細胞、Hep G2 細胞、MCF7 細胞、PC-3 細胞、および U-251 MG 細胞は、理研細胞材料開発室より入手した。HeLa (S3) 細胞は、ヒューマンサイエンス振興財団より入手した。SK-BR-3 細胞は、American Type Culture Collection より入手した。SH-SY5Y 細胞は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所 瀬原淳子教授より分与いただいた。

試薬

ダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (DMEM)、ロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI-1640)、ダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハム培地 (DMEM/Ham's F-12)、ペニシリン-ストレプトマイシン、カナマイシン、リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS、PBS (+))、ハンクス平衡塩溶液 (HBSS (+))、ジメチルスルホキシド (DMSO)、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、ジチオトレイトール (DTT)、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、クロロアセトアミド (CAA)、ヨードアセトアミド (IAA)、エチレングリコール、デオキシコール酸ナトリウム (SDC)、*N*-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (SLS)、LysC、GluC、ホルボールエステル (PMA)、タマビジンビーズは富士フィルム和光純薬工業より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Life Technologies より購入した。BB-94 は Selleck から購入した。プロテアーゼ阻害薬カクテル、ホスファターゼ阻害剤カクテル、重炭酸トリエチルアンモニウムバッファー (TEAB)、ホルムアルデヒド、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、*N*-ヒドロキシスクシンイミドは Sigma-Aldrich より購入した。トリプシン (シークエンスグレード) はプロメガより購入した。アミコンウルトラ (5k) は Merck より購入した。フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、Bufexamac、2H、2H、3H、3H-ヘプタデカフルオロウンデカン酸、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチル

カルボジイミド (EDC) は東京化成工業株式会社から購入した。Tenovin-6 は Cayman Chemical Company から購入した。組換え脱アシル化酵素および NAD⁺は Enzo Life Sciences から購入した。硫酸化 NHS-SS-ビオチンは Thermo Fisher Scientific から購入した。組換えシェダーゼは R&D システムズから購入した。

装置および測定条件

オートサンプラー	: HTC-PAL (CTC Analytics)
送液ポンプ	: UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
質量分析計	: Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific)、 TripleTOF 5600 (SCIEX)

全ての網羅的ペプチド計測は、オートサンプラーおよび送液ポンプと、上記のいずれかの質量分析計を接続した、オンライン逆相ナノスケール液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析システムによるポジティブモードでのデータ依存的分析によって行われた。6~7 μ L の 0.5% TFA を含む 4% ACN 溶液に溶解したペプチド試料から、オートサンプラーにより 5 μ L を注入し、スプレーニードル (内径 100 μ m、長さ 15 cm) に ReproSil-Pur C18-AQ (粒子径 3 μ m) を充填した自家製分析カラムを用いて HPLC 分離した。移動相には、(A) 0.5% 酢酸、(B) 0.5% 酢酸および 80% ACN を用い、流速 500 nL/分にて、計 21 分 (5-40%B 20 分間、40-99%B 1 分間)、計 90 分 (5-10%B 5 分間、10-40%B 80 分間、40-99%B 5 分間) あるいは計 110 分 (5%B 1 分間、5-10%B (TMT 標識ペプチドの場合 5-15%B) 4 分間、10-40%B (TMT 標識ペプチドの場合 15-40%B) 100 分間、40-99%B 5 分間) のいずれかのグラジエント条件によりペプチドを分離した。21 分のグラジエント条件では、99%B 5 分間のカラム洗浄後、5%B 25 分間の平衡化を行った。その他のグラジエント条件では、99%B 10 分間のカラム洗浄後、5%B 30 分間の平衡化を行った。イオン化のために、TripleTOF 5600 を用いたシステムでは 2,300V、それ以外のシステムでは 2,400V のスプレー電圧を印加

した。実験別の詳細を以下に記す。

タンパク質末端ペプチドの測定には計 150 分のグラジエントを採用した。質量分析には Orbitrap Fusion Lumos を使用した。MS1 スペクトルは、 m/z 375-1500 の範囲にて分解能 120,000 のオービトラップアナライザーにより取得した。各 MS1 スペクトルについて、サイクルタイム 3 秒のトップスピードモード、すなわちサイクルタイムの間可能な限り多くのプリカーサーイオンについて、強度の高い順に四重極により単離し、エネルギー 38 の higher energy collision induced dissociation (HCD) により開裂させ、分解能 50,000 のオービトラップアナライザーにより MS/MS スペクトルを取得した。105 ミリ秒の maximum injection time、 $1e5$ の automatic gain control、および 30 秒間 dynamic exclusion time を設定した。

化学的にアシル化を増加させた試料を用いた概念実証実験では、21 分のグラジエントを採用し、質量分析には TripleTOF 5600 を採用した。MS1 スペクトルは、 m/z 300-1500 の範囲にて 0.25 秒間スキャンし取得した。各 MS1 スペクトルについて、トップ 10 モードにてプレカーサーイオンを選択、四重極により単離し、ローリング衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) 機能により自動決定した値のエネルギーで開裂させ、ハイセンシティブティモードで 0.1 秒間スキャンし MS/MS スペクトルを取得した。12 秒間の dynamic exclusion time を設定した。

HeLa 細胞核画分を用いた実験では、150 分のグラジエントを採用し、質量分析には Orbitrap Fusion Lumos を使用した。MS1 スペクトルは、 m/z 300-1500 の範囲にて分解能 120,000 のオービトラップアナライザーを用いて取得した。各 MS1 スペクトルについて、サイクルタイム 3 秒のトップ - スピードモードにてプリカーサーイオンを選択、四重極により単離し、エネルギー 36 の HCD により開裂させ、分解能 15,000 のオービトラップアナライザーにより MS/MS スペクトルを取得した。50 ミリ秒の maximum injection time、 $1e5$ の automatic gain control、および 20 秒間の dynamic exclusion time を設定した。

F₂Pmp プローブによってプルダウンしたタンパク質の解析には 150 分のグラジエントを採用し、質量分析には Orbitrap Fusion Lumos を使用した。MS1 スペクトルは、 m/z 300-1500 の範囲にて分解能 120,000 のオービトラップアナライザーを用いて取得した。各 MS1 スペクトルについて、サイクルタイム 3 秒のトップスピードモードにてプリカーサーイオンを選択、四重極により単離し、エネルギー36 の HCD により開裂させ、ラピッドモードのイオントラップアナライザーにより MS/MS スペクトルを取得した。35 ミリ秒の maximum injection time、 $1e4$ の automatic gain control および 20 秒間の dynamic exclusion time を設定した。

実験手法

共通部

細胞培養

後述する例外を除いたすべての細胞株は、10 % FBS、100 U/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地にて、5 % CO₂ を含む 37 °C 条件下で培養した。PC-3 細胞には RPMI 培地を、また SH-SY5Y 細胞および U-251 MG 細胞には、非必須アミノ酸を添加した DMEM/Fam's F12 培地を使用した。

PTS 法による酵素消化

Masuda らの手法⁷⁸を基に、以下の通りに行った。12 mM SLS、12 mM SDC、100 mM Tris-HCl (pH 8.5) により構成される PTS 溶液を用いて、細胞試料あるいは精製タンパク質試料を溶解した。次に、10 mM DTT あるいは 10 mM TCEP と、40 mM CAA により還元およびアルキル化した。50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液により 5 倍希釈し、LysC (タンパク質 : 酵素 = 100 : 1 (w/w)) により 37 °C にて 3 時間消化した後、トリプシン (タンパク質 : 酵素 = 100 : 1 (w/w)) を加えて一晩消化した。実験操作に応じた変更がある場合は後述する。

脱塩

SDB-XC StageTip⁸⁶を用いて行った。Buffer B (0.1 % TFA、80 % ACN) による活性化、buffer A (0.1 % TFA、4 % ACN) による平衡化の後にペプチド試料を載せ、buffer A で洗浄の後、buffer B で溶出した。

還元的ジメチル化

Boersema らの手法⁶⁸に変更を加えて行った。基本的に、~25 µg のペプチド試料を 100 mM TEAB 緩衝液 25 µL に溶解し、0.6 M シアン化水素ホウ素ナトリウムおよび 4 % ホルムアルデヒドをそれぞれ 1 µL 添加した。アミノ基の保護を目的とする場合 (第 2

章)、50% ACN を加えた。また、安定同位体を用いた定量的解析の場合、heavy 標識試料には CH₂O の代わりに ¹³CD₂O を使用した。室温にて1時間攪拌し、反応させた後、1% アンモニア水 4 μL を加えて室温にて15分間静置し、10% TFA を加えて酸性にし、脱塩した。実験操作応じた変更がある場合は後述する。

LC/MS/MS 測定データ処理

タンパク質末端ペプチドの同定では、SwissProt (2019年3月) ヒトタンパク質 (アイソフォーム情報を含む) データベースおよびMaxQuant に搭載される混入タンパク質 (contaminants) データベースに対して、MaxQuant (v.1.6.7.0)⁴⁸ を用いて TrypN 消化半特異的 (N末端) あるいはLysC/トリプシン消化半特異的 (C末端) 検索を行った。検索対象ペプチド長は、7アミノ酸以上25アミノ酸以下とした。プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの質量誤差範囲は、それぞれ4.5 ppm、20 ppm とした。MS2 レベルでの TMT-10plex 定量モードを選択し、システインのカルバミドメチル化を固定修飾、またメチオニンの酸化およびタンパク質 N 末端のアセチル化を可変修飾として設定した。アミノ酸配列を逆にしたデコイデータベースに対してサーチを行うことにより、PSM およびタンパク質それぞれの同定結果の FDR を算出し、1%未満とした。得られたペプチドリットから、未消化部位を含まないペプチドのみをデータ解析には使用した。

化学的にアシル化を増加させた試料を用いた概念実証実験におけるペプチドおよびタンパク質の同定は次に記す通りに行った。MSConverter (SCIEX) によってピークリットを作成し、SwissProt (2015年1月) ヒトタンパク質データベースに対して、Mascot サーチエンジン (v.2.5.1) を用いたタンパク質検索を行った。V8、キモトリプシン消化試料のサーチでは、2箇所までの未消化部位を容認し、使用した酵素消化特異的検索を行った。トリプシン消化ペプチド消化試料では、2箇所までの未消化部位を容認した ArgC 消化条件特異的検索を行った。プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの質量誤差範囲は、それぞれ20 ppm、0.1 Da とした。システインのカルバミドメチル化を固定修飾、またメチオニンの酸化、リシンのアセチル化あるいは

スクシニル化、リシンおよびペプチド N 末端のジメチル化、リシンおよびペプチド N 末端のフルオラスタグ化 ($C_{11}F_{17}H_3O$) を可変修飾として設定した。

HeLa 細胞核画分試料のアシル化部位の同定では、MaxQuant (v.1.6.2.10) を用いて行った。SwissProt (2018 年 11 月) ヒトタンパク質 (アイソフォーム情報を含む) データベースおよび MaxQuant に搭載される混入タンパク質 (contaminants) データベースに対して、4 箇所までの未消化部位を容認した LysC/トリプシン消化条件特異的検索を行った。プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの質量誤差範囲は、それぞれ 4.5 ppm、20 ppm とした。システインのカルバミドメチル化を固定修飾、メチオニンの酸化、リシンおよびタンパク質 N 末端のアセチル化、リシンおよびペプチド N 末端のジメチル化 ($[^1H_4, ^{12}C_2]$ および $[^2H_4, ^{13}C_2]$)、リシンおよび N 末端の 3-(カルバミドメチルチオ)プロパノイル化を可変修飾として設定した。上述した手法により、PSM、タンパク質、および PTM サイトそれぞれの同定結果の FDR を算出し、1%未満とした。

F₂Pmp プローブを用いたホスファターゼ濃縮実験では、ProteoWizard (v.3.0.4449) によってピークリストを作成し、SwissProt (2017 年 4 月) ヒトタンパク質データベースに対して、Mascot サーチエンジン (v.2.6.1) を用いた自動検索によりペプチド同定を行った。プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンの質量誤差範囲は、それぞれ 5 ppm および 0.6 Da とし、2 箇所までの未消化部位を許容した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾、またメチオニンの酸化、リシンおよびペプチド N 末端のジメチル化 ($[^1H_4, ^{12}C_2]$ および $[^2H_4, ^{13}C_2]$) を可変修飾として設定した。上述した手法により、PSM およびペプチド同定結果の FDR を算出し、1%未満とした。

ペプチド定量・正規化

安定同位体を用いた還元的ジメチル化による相対定量実験では、積分により算出されたピークエリアを基に相対定量値 (H/L あるいは L/H) を算出し、対数 (\log_2) 変換後に中央値が等しくなるように正規化された。第三章の実験では、定量限界を下回ったことによると考えられた欠損値を Perseus (v.1.6.2.2)⁸⁷ の imputation 機能 (width =

0.3、down shift = 1.8) により正規分布に基づいて補完した。

TMT レポーターイオンの定量値は、各チャンネルのレポーター値の和を、その平均値に揃え、R を用いた trimmed mean of M values (TMM)⁸⁸⁻⁹⁰ 法によって正規化された。

統計解析

Welch の t 検定、並び替え検定、およびボルケーノプロットの作成 ($S_0 = 0.1$ 、 $q = 0.05$) は、Perseus (v.1.6.7.0)⁸⁷ を用いて行った。その他の検定およびピアソン相関係数の算出は、R を用いて行った。

情報学的解析

GO エンリッチメント解析は、DAVID (v.6.8)⁵⁰ を用いて行った。タンパク質相互作用の解析は、STRING (v.11)⁵³ を用いて行った。膜タンパク質の同定は、UniProtKB の情報に基づいた。アミノ酸シークエンスロゴの作成は、IceLogo (v.1.0)⁹¹ あるいは WebLogo⁹² を用いて行った。

第一章 ショットガンプロテオミクスによるエクストドメインシェディング大規模解析

細胞培養上清の調製

最初に細胞を PBS (+) で 3 回洗浄した。10 μ M BB-94 あるいは DMSO による 30 分間の事前阻害薬処理を行った後に、BB-94 あるいは DMSO と、1 μ M PMA を含む HBSS (+) で 1 時間培養し、培養上清回収した。7,180 g にて 30 分間の遠心分離を行い、死細胞を除去した。10 mM PMSF、20 mM EDTA、20 mM EGTA、および既定の 10 分の 1 量のプロテアーゼ阻害剤カクテルを添加し、使用するまで -80°C にて保存した。アミコンウルトラ (5 kDa) を用いて培養上清試料を濃縮し、メタノール・クロロホルムによるタンパク質精製を行った。PTS 溶液にタンパク質試料を再溶解し、

BCA アッセイによりタンパク質濃度を測定した。10 mM DTT および 50 mM CAA による還元およびアルキル化を施した。以降、PTS 法に従って消化および脱塩を行った。ただし、N 末端解析に供する試料は、10 mM CaCl₂ による 10 倍希釈後、TrypN (タンパク質 : 酵素 = 50 : 1 (w/w)) により消化した。

TMT 標識

200 mM HEPES-NaOH (pH 8.5) 5 μ L に溶解した 10 μ g のペプチド試料を等量の ACN に溶解した 0.1 mg NHS-TMT 溶液と混合し、室温にて 1 時間攪拌した。2% ヒドロキシアミンを加えて余剰の TMT を不活性化し、10% TFA を 5 μ L 加えて酸性にした後に遠心濃縮により乾固させ、脱塩を行った。

N 末端ペプチド濃縮

Cation-SR (16G) 2 枚による StageTip を、MeOH 50 μ L、buffer B (共通部 脱塩の項参照) 50 μ L、buffer C (500 mM 酢酸アンモニウム、30% ACN 溶液) 100 μ L、buffer D (2.5% ギ酸、30% ACN) 300 μ L で順に活性化および平衡化した。Buffer D 50 μ L に溶解したペプチド試料を載せ、更に buffer D 50 μ L で洗浄した素通り画分 (計 100 μ L) を N 末端ペプチド濃縮液として回収した。脱塩、TMT 標識および再び脱塩した後に LC/MS/MS に供した。

C 末端ペプチド濃縮

16G サイズの Cation-SR 2 枚による StageTip を、MeOH 50 μ L、buffer B (共通部 脱塩の項参照) 50 μ L、buffer C (N 末端ペプチド濃縮の項参照) 100 μ L、buffer E (0.15% TFA、30% ACN) 300 μ L で順に活性化および平衡化した。Buffer E 50 μ L に溶解したペプチド試料を載せ、更に buffer E 50 μ L で洗浄した素通り画分 (計 100 μ L) を回収した。続いて、buffer F (0.5% TFA、30% ACN) 100 μ L によって溶出した画分を 0.5% TFA 溶出画分として回収した。素通り画分および 0.5% TFA 溶出画分をそれぞれ遠心濃縮により乾固し、個別に LC/MS/MS に供した。

PWM の作成およびスコアリング

シェダーゼの基質切断部位周辺配列は、MEROPS データベース⁹³ および先行研究⁵⁵ から入手した。非天然のアミノ酸を含む配列は除外した。*PWM* の作成および *PWM* スコアの計算は、今村らが以前に報告した通りに行った⁵⁴。各切断部位周辺の±4 残基の *PWM* における値を足し合わせ、*PWM* スコアとした。

In vitro シェダーゼアッセイ

基質配列は、各切断部位周辺の±4 残基とした。3つの基質配列を連結し、24 残基のペプチドとして合成した。組換えシェダーゼを用いた *in vitro* プロテアーゼ反応は、10 pmol の基質ペプチドと 100 ng の組換えシェダーゼを、それぞれのシェダーゼについてメーカーの指示する組成のバッファー30 µL 中で 37 °C にて 3 時間インキュベートすることで行った。その後、TFA で溶液を酸性化することで反応を停止させた。生成物を SDB-XC StageTip で脱塩し、LC/MS/MS により分析した。ピーク面積の定量は Skyline (v20.2) を用いて行った。

第二章 アシル化ペプチド濃縮技術の開発

化学的アシル化を施したモデル試料の調製

HeLa 細胞を PTS 溶液で溶解し、95 °C で 5 分間加熱した。抽出したタンパク質を、10 mM DTT および 50 mM IAA を用いて還元・アルキル化し、メタノール・クロロホルム精製した。この精製タンパク質を 12mM SDC と 12mM SLS を含む 60 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した後、BCA アッセイによりタンパク質量を測定した。タンパク質濃度を 1 µg/µL に調整し、サンプル溶液 50 µL に 100 µmol の無水酢酸または無水コハク酸を含む ACN 200 µL を加えて混合した後、10 °C で 1 時間攪拌し、1 M Tris-HCl (pH 9.0) 200 µL を加えて試薬を不活性化した。ACN を遠心濃縮で除去した後、化学的にアシル化されたタンパク質を PTS 溶液に溶解し、PTS 法に従って、トリプシン (100:1、w/w)、GluC (50:1、w/w)、またはキモトリプシン (100:1、w/w) で消化し、脱塩した。

KDAC 阻害薬処理細胞の調製

2 μ M TSA、20 mM NAM、10 μ M Tenovin-6、1 μ M PCI-24781 および 50 μ M bufexamac を添加した培地にて HeLa 細胞を一晩培養した。ただし、ペニシリン/ストレプトマイシンの代わりにカナマイシン 10 μ g/mL を添加した。PBS により 2 回洗浄した後に回収し、使用するまで -80 °C にて保管した。

細胞分画による核画分の調製

Masuda らの手法⁹⁴に従って調製を行った。KDAC 阻害薬処理を施した HeLa 細胞を、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM NaCl、6.05 M エチレングリコール、12 mM SDC、1.2 mM SLS、およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む MS-compatible (MSC) - RIPA buffer で穏やかに溶解した。400 g にて 10 分間遠心分離を行って得たペレットを、核画分として使用した。

*組換え KDAC を用いた *in vitro* 脱アシル化*

化学的にアシル化を増加させたペプチド試料は 100 μ g、KDAC 阻害薬処理 HeLa 細胞核画分由来ペプチド試料は 400 μ g を使用した。50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、13.7 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM MgCl₂ および 50 mM NAD⁺ を含む溶液にペプチド試料を溶解し、各 KDAC (100:1、w/w) を加え、37 °C にて一晩培養した。TFA を加えて酸性にし、脱塩の後に遠心濃縮により乾固させた。

NHS-フルオラスタグの合成

2H、2H、3H、3H-ヘプタデカフルオロウンデカン酸 26 mg と、NHS 7.2 mg、12 mg EDC、および TEA 5 μ L を ACN 1 mL に溶解させ、10 °C にて一晩激しく攪拌した。遠心濃縮により乾固させ、酢酸エチル 1.1 mL と水 800 μ L を順に加えて激しく攪拌し、15,800 g にて 2 分間遠心分離を行って得られた酢酸エチル相を NHS-フルオラスタグとして遠心濃縮により乾固させた。

ペプチドのフルオラスタグ化とフルオラスタグ化ペプチドの濃縮

100 mM TEAB 30 μ L および ACN 70 μ L から成る溶液にペプチドを溶解させた。上記の手法により合成された NHS-フルオラスタグの 5 分の 1 量を THF に溶解し、ペプチドと混合した。15 °C にて 3 時間攪拌し、その後 TFA により酸性にした後に遠心濃縮により乾固させた。余剰な NHS-フルオラスタグの除去は以下の操作による SCX により除去した。Buffer G (0.2 % TFA を含む 90 % ACN) に再溶解し、予め MeOH、buffer C (N 末端ペプチド濃縮の項参照)、buffer G により活性化および平衡化した Cation-SR に載せた。Buffer G で洗浄した後に、500 mM 酢酸アンモニウム、0.1% アンモニアを含む 40 % ACN を用いて溶出し、TFA により酸性にした後に遠心濃縮により乾固させた。

SDB-XC をフリットとして Fluosil ($C_8F_{13}H_4$) 10 mg を載せた StageTip を、0.1 % TFA を含む 90 % ACN で活性化し、buffer A (脱塩の項参照) で平衡化した。0.1 % TFA を含む 10 % ACN に溶解したペプチドを載せ、0.1% TFA を含む 32 % ACN で洗浄した。80 % ヘキサフルオロイソプロパノールで溶出し、遠心濃縮により乾固させ、LC/MS/MS に供した。

ペプチドの SS-ビオチン化とビオチン化ペプチドの濃縮

ペプチド試料を、20 mM 硫酸化 NHS-SS-ビオチン含む 60 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、室温にて 1 時間攪拌した。TFA により酸性にし、脱塩した。余剰の試薬は、上述したフルオラスタグ試薬の除去と同様の操作による SCX により除去した。予め、0.5 % NP-40 および 0.2 % Tween 20 を含む PBS (PBS-NT) で洗浄したストレプトアビジンビーズを、同溶液に溶解した SS-ビオチン化ペプチドと 1 時間転倒混和させた。その後、PBS-NT で 3 回洗浄し、150 mM NaCl を含む PBS で 3 回洗浄した後に、10 mM TCEP および 40 mM CAA を含む PTS 溶液中で 95 °C の加熱処理を 5 分間行い、上清を回収した。TFA により酸性にし、脱塩の後に LC/MS/MS に供した。

第三章 非加水分解性リン酸化チロシン模倣体を用いたホスファターゼ濃縮のためのペプチドプローブの開発

ペプチドプルダウン

ペプチドプローブは、Synpeptide 社 (上海) により受託合成された。プローブ結合ビーズの調製は、以下の通り行った。アビジンアナログであるタマビジンが結合したビーズを、40 mM ペプチドプローブを含む PBS-0.1% Tween-20 (PBS-T) 溶液中にて、室温条件下で 2 時間転倒混和し、その後 3 回の PBS-T 洗浄を行った。HEK293T 細胞を、1 % NP-40、150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む lysis buffer により破碎した後、20,000 g にて 20 分間の遠心分離を行い、得られた上清を HEK293T 細胞由来タンパク質試料とした。タンパク質濃度を BCA 法により測定し、抽出タンパク質 3 mg を含む lysis buffer とタマビジンビーズを 4 °C にて 4 時間転倒混和させた後、ビーズを lysis buffer で 3 回洗浄した。10 mM TCEP および 50 mM CAA を含む PTS 溶液中にてビーズを加熱し、結合タンパク質を溶出させ、PTS 法に従って消化した。

リン酸化プローブの脱リン酸化および測定

実験操作は、基本的にペプチドプルダウンの項目に記した手法と同様に行った。ただし、酵素消化および同位体標識は省略された。コントロール実験として、HEK293T 細胞抽出タンパク質を含まない lysis buffer を添加した試料を調製した。脱リン酸化を受けたペプチドの定量は、UltiMate 3000RSLCnano および HTC-PAL を接続した Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。ペプチドの網羅的解析を目的とした LC/MS/MS と同様の分析カラムを使用し、LC における分離条件は、5-10 %B 5 分間、10-40 %B 25 分間、40-99 %B 5 分間による 3 段階グラジエントを適用した。

発表論文

第一章

1. Exploring the landscape of ectodomain shedding by quantitative protein terminomics.

Kazuya Tsumagari, Chih-Hsiang Chang, Yasushi Ishihama

2021年3月2日発行 *iScience* 第24巻4号 102259

2. A protocol for analyzing the protein terminome of human cancer cell line culture supernatants.

Kazuya Tsumagari, Chih-Hsiang Chang, Yasushi Ishihama

2021年7月17日発行 *STAR Protocols* 第4巻3号 100682

第二章

3. Acylated peptide enrichment utilizing lysine deacylases for lysine acylomics.

Kazuya Tsumagari, Yasushi Ishihama

2021年7月23日発行 *Biochemical and Biophysical Research Communications*
第563号 60-65頁

第三章

4. Peptide probes containing a non-hydrolyzable phosphotyrosine-mimetic residue as a tool for tyrosine phosphatomics.

投稿中

その他

5. Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation.

Kazuya Tsumagari, Kyoko Shirakabe, Mayu Ogura, Fuminori Sato,

Yasushi Ishihama, Atsuko Sehara-Fujisawa

2017年2月7日発行 *Genes to Cells* 第22巻2号 237-244項

6. Phospholipid flippase ATP11C is endocytosed and downregulated following Ca²⁺-mediated protein kinase C activation.

Hiroyuki Takatsu, Masahito Takayama, Tomoki Naito, Naoto Takada,
Kazuya Tsumagari, Yasushi Ishihama, Kazuhisa Nakayama, Hye-Won Shin
2017年11月10日発行 *Nature Communications* 第8巻 1423

7. The Escherichia coli S2P intramembrane protease RseP regulates ferric citrate uptake by cleaving the sigma factor regulator FecR.

Tatsuhiko Yokoyama, Tomoya Niinae, Kazuya Tsumagari, Koshi Imami, Yasushi Ishihama, Yohei Hizukuri, Yoshinori Akiyama
2021年4月16日発行 *Journal of Biological Chemistry* 第296巻 100673

謝 辞

本論文作成に際し終始ご懇篤なるご指導およびご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻製剤機能解析学分野 石濱泰教授に、謹んで謝意を表します。また、本研究を遂行するに当たり、ご懇切なるご助言とご指導をいただきました京都大学大学院薬学研究科 杉山直幸准教授に深く感謝いたします。さらに、日々の研究において筆者と活発な議論をしていただきました、国立循環器病研究センター プロテオーム系解析室室長 若林真樹博士、京都大学大学院薬学研究科 今見考志博士、高橋知里博士、小形公亮氏、その他の石濱研究室の卒業生ならびに在学生の皆様に深く感謝申し上げます。また、勤務先であるエーザイ・慶應義塾大学 認知症イノベーションラボの皆様には、勤務と学位論文作成の両立にご理解をいただきました。深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、F₂Pmp プローブを合成しご提供していただいた徳島大学 大高章教授に感謝申し上げます。また、SH-SY5Y 細胞をご提供していただいた京都大学 瀬原淳子教授に感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会特別研究員（DC2）による支援を受けて行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

参考文献

1. Meier, F., Geyer, P. E., Virreira Winter, S., Cox, J. & Mann, M. BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes. *Nat. Methods* **15**, 440–448 (2018).
2. Bekker-Jensen, D. B. *et al.* An Optimized Shotgun Strategy for the Rapid Generation of Comprehensive Human Proteomes. *Cell Syst.* **4**, 587-599.e4 (2017).
3. Doll, S., Gnad, F. & Mann, M. The Case for Proteomics and Phospho - Proteomics in Personalized Cancer Medicine. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* **13**, 1800113 (2019).
4. Aebersold, R. *et al.* How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* **14**, 206–214 (2018).
5. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
6. Aken, B. L. *et al.* Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res.* **45**, D635–D642 (2017).
7. Gaudet, P. *et al.* The neXtProt knowledgebase on human proteins: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **45**, D177–D182 (2017).
8. Pennisi, E. The Human Genome. *Science (80-.).* **291**, 1177–1180 (2001).
9. Uhlen, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-.).* **347**, 1260419–1260419 (2015).
10. Wang, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470–476 (2008).
11. Olsen, J. V *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–48 (2006).
12. Humphrey, S. J. *et al.* Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 676–687 (2015).
13. Huovila, A.-P. J., Turner, A. J., Peltto-Huikko, M., Kärkkäinen, I. & Ortiz, R. M.

- Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 413–422 (2005).
14. Lichtenthaler, S. F., Lemberg, M. K. & Fluhrer, R. Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J.* **37**, e99456 (2018).
 15. Weinert, B. T., Moustafa, T., Iesmantavicius, V., Zechner, R. & Choudhary, C. Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT 3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J.* **34**, 2620–2632 (2015).
 16. Wagner, G. R. & Payne, R. M. Widespread and enzyme-independent N ϵ -acetylation and N ϵ -succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **288**, 29036–45 (2013).
 17. Smith, L. M. & Kelleher, N. L. Proteoform: A single term describing protein complexity. *Nature Methods* **10**, 186–187 (2013).
 18. Garcia, B. A., Pesavento, J. J., Mizzen, C. A. & Kelleher, N. L. Pervasive combinatorial modification of histone H3 in human cells. *Nat. Methods* **4**, 487–489 (2007).
 19. Olsen, J. V. & Mann, M. Status of large-scale analysis of posttranslational modifications by mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **12**, 3444–3452 (2013).
 20. Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. & Roepstorff, P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 2730–2733 (1974).
 21. Tan, M. *et al.* Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab.* **19**, 605–617 (2014).
 22. Zhang, Z. *et al.* Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 58–63 (2011).
 23. Chen, Y. *et al.* Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 812–819 (2007).

24. Tan, M. *et al.* Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**, 1016–1028 (2011).
25. Huang, H. *et al.* Lysine benzoylation is a histone mark regulated by SIRT2. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
26. Yugi, K. *et al.* Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep.* **8**, 1171–83 (2014).
27. Kawata, K. *et al.* Trans-omic Analysis Reveals Selective Responses to Induced and Basal Insulin across Signaling, Transcriptional, and Metabolic Networks. *iScience* **7**, 212–229 (2018).
28. Arrington, J. V., Hsu, C. C., Elder, S. G. & Andy Tao, W. Recent advances in phosphoproteomics and application to neurological diseases. *Analyst* **142**, 4373–4387 (2017).
29. Lundby, A. *et al.* Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Rep.* **2**, 419–431 (2012).
30. Peng, C. *et al.* The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, (2011).
31. Jiang, H. *et al.* SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **496**, 110–113 (2013).
32. Zhang, Z.-Y., Dodd, G. T. & Tiganis, T. Protein Tyrosine Phosphatases in Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 661–674 (2015).
33. Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699–711 (2004).
34. Klaeger, S. *et al.* The target landscape of clinical kinase drugs. *Science (80-.)*. **358**, eaan4368 (2017).
35. Tong, J. *et al.* Integrated analysis of proteome, phosphotyrosine-proteome, tyrosine-kinome, and tyrosine-phosphatome in acute myeloid leukemia. *Proteomics* **17**, 1600361 (2017).

36. Weber, S. & Saftig, P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* **139**, 3693–3709 (2012).
37. Beard, H. A., Barniol-Xicota, M., Yang, J. & Verhelst, S. H. L. Discovery of cellular roles of intramembrane proteases. *ACS Chem. Biol.* **14**, 2372–2388 (2019).
38. Reiss, K. & Saftig, P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 126–137 (2009).
39. Niedermaier, S. & Huesgen, P. F. Positional proteomics for identification of secreted proteoforms released by site-specific processing of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1867**, 140138 (2019).
40. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C. & Gleichmann, M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular medicine* **12**, 1–12 (2010).
41. Tsumagari, K. *et al.* Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation. *Genes to Cells* **22**, 237–244 (2017).
42. Kleifeld, O. *et al.* Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat. Biotechnol.* **28**, 281–288 (2010).
43. Prudova, A., auf dem Keller, U., Butler, G. S. & Overall, C. M. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 894–911 (2010).
44. Chang, C.-H., Chang, H.-Y., Rappsilber, J. & Ishihama, Y. Isolation of Acetylated and Unmodified Protein N-Terminal Peptides by Strong Cation Exchange Chromatographic Separation of TrypN-Digested Peptides. *Mol. Cell. Proteomics* **20**, 100003 (2021).
45. Alpert, A. J. *et al.* Peptide orientation affects selectivity in ion-exchange

- chromatography. *Anal. Chem.* **82**, 5253–9 (2010).
46. Helbig, A. O. *et al.* Profiling of N-acetylated protein termini provides in-depth insights into the N-terminal nature of the proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 928–939 (2010).
 47. Gauci, S. *et al.* Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal. Chem.* **81**, 4493–4501 (2009).
 48. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 2301–2319 (2016).
 49. Takami, M. *et al.* γ -Secretase: Successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of β -carboxyl terminal fragment. *J. Neurosci.* **29**, 13042–13052 (2009).
 50. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
 51. Nagano, O. & Saya, H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Science* **95**, 930–935 (2004).
 52. Shirakabe, K., Hattori, S., Seiki, M., Koyasu, S. & Okada, Y. VIP36 protein is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage Raw 264.7 cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 43154–63 (2011).
 53. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
 54. Imamura, H. *et al.* Identifications of putative PKA substrates with quantitative phosphoproteomics and primary-sequence-based scoring. *J. Proteome Res.* **16**, 1825–1830 (2017).
 55. Tucher, J. *et al.* LC-MS based cleavage site profiling of the proteases ADAM10

- and ADAM17 using proteome-derived peptide libraries. *J. Proteome Res.* **13**, 2205–2214 (2014).
56. Eckhard, U. *et al.* Active site specificity profiling of the matrix metalloproteinase family: Proteomic identification of 4300 cleavage sites by nine MMPs explored with structural and synthetic peptide cleavage analyses. *Matrix Biol.* **49**, 37–60 (2016).
 57. Seegar, T. C. M. *et al.* Structural basis for regulated proteolysis by the α -secretase ADAM10. *Cell* **171**, 1638–1648.e7 (2017).
 58. Seidah, N. G., Sadr, M. S., Chrétien, M. & Mbikay, M. The Multifaceted Proprotein Convertases: Their Unique, Redundant, Complementary, and Opposite Functions. *J. Biol. Chem.* **288**, 21473–21481 (2013).
 59. Manon-Jensen, T., Multhaupt, H. A. B. & Couchman, J. R. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J.* **280**, 2320–2331 (2013).
 60. Soh, W. T. *et al.* ExtENDING Proteome Coverage with Legumain as a Highly Specific Digestion Protease. *Anal. Chem.* **92**, 2961–2971 (2020).
 61. Goos, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 146–169 (2010).
 62. Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 536–550 (2014).
 63. Choudhary, C. *et al.* Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science (80-.)*. **325**, 834–840 (2009).
 64. Jiang, T., Zhou, X., Taghizadeh, K., Dong, M. & Dedon, P. C. N-formylation of lysine in histone proteins as a secondary modification arising from oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 60–65 (2007).
 65. Hirshey, M. D. & Zhao, Y. Metabolic regulation by lysine malonylation, succinylation, and glutarylation. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2308–2315 (2015).

66. Narita, T., Weinert, B. T. & Choudhary, C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1** (2018).
doi:10.1038/s41580-018-0081-3
67. Brittain, S. M., Ficarro, S. B., Brock, A. & Peters, E. C. Enrichment and analysis of peptide subsets using fluororous affinity tags and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **23**, 463–468 (2005).
68. Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A. J. R. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* **4**, 484–494 (2009).
69. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
70. Lemeer, S., Zörgiebel, C., Ruprecht, B., Kohl, K. & Kuster, B. Comparing Immobilized Kinase Inhibitors and Covalent ATP Probes for Proteomic Profiling of Kinase Expression and Drug Selectivity. *J. Proteome Res.* **12**, 1723–1731 (2013).
71. Bantscheff, M. *et al.* Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1035–1044 (2007).
72. Ranjitkar, P. *et al.* Affinity-Based Probes Based on Type II Kinase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 19017–19025 (2012).
73. Karisch, R. *et al.* Global Proteomic Assessment of the Classical Protein-Tyrosine Phosphatome and “Redoxome”. *Cell* **146**, 826–840 (2011).
74. Burke, T. R. J. *et al.* Nonhydrolyzable Phosphotyrosyl Mimetics for the Preparation Of Phosphatase-Resistant SH2 Domain Inhibitors. *Biochemistry* **33**, 6490–6494 (1994).
75. Chen, L. *et al.* Why Is Phosphonodifluoromethyl Phenylalanine a More Potent Inhibitory Moiety Than Phosphonomethyl Phenylalanine Toward Protein-Tyrosine Phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 976–984 (1995).

76. Meyer, C. *et al.* Development of accessible peptidic tool compounds to study the phosphatase PTP1B in intact cells. *ACS Chem. Biol.* **9**, 769–776 (2014).
77. Meyer, C., Hoeger, B., Chatterjee, J. & Köhn, M. Azide-alkyne cycloaddition-mediated cyclization of phosphonopeptides and their evaluation as PTP1B binders and enrichment tools. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 2848–2853 (2015).
78. Masuda, T., Saito, N., Tomita, M. & Ishihama, Y. Unbiased quantitation of *Escherichia coli* membrane proteome using phase transfer surfactants. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2770–7 (2009).
79. Tiganis, T. PTP1B and TCPTP - nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *FEBS J.* **280**, 445–458 (2013).
80. Valius, M., Bazenet, C. & Kazlauskas, A. Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor beta subunit and are required for binding of phospholipase C gamma and a 64-kilodalton protein, respectively. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 133–43 (1993).
81. Jadwin, J. A., Curran, T. G., Lafontaine, A. T., White, F. M. & Mayer, B. J. Src homology 2 domains enhance tyrosine phosphorylation in vivo by protecting binding sites in their target proteins from dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **293**, 623–637 (2018).
82. Lundby, A. *et al.* Oncogenic Mutations Rewire Signaling Pathways by Switching Protein Recruitment to Phosphotyrosine Sites. *Cell* **179**, 543-560.e26 (2019).
83. Garton, A. J. & Tonks, N. K. PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *EMBO J.* **13**, 3763–3771 (1994).
84. Wang, Y., Guo, W., Liang, L. & Esselman, W. J. Phosphorylation of CD45 by casein kinase 2. Modulation of activity and mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **274**, 7454–61 (1999).
85. Burke, T. R. *et al.* Cyclic Peptide Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase p85 SH2 Domain Binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1148–1153

- (1994).
86. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2**, 1896–1906 (2007).
 87. Tyanova, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods* **13**, 731–740 (2016).
 88. Eisenberg, E. & Levanon, E. Y. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet.* **19**, 362–365 (2003).
 89. Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* **11**, R25 (2010).
 90. Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M. & Gilad, Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* **18**, 1509–17 (2008).
 91. Colaert, N., Helsens, K., Martens, L., Vandekerckhove, J. & Gevaert, K. Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nature Methods* **6**, 786–787 (2009).
 92. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190 (2004).
 93. Rawlings, N. D. *et al.* The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632 (2018).
 94. Masuda, T., Sugiyama, N., Tomita, M., Ohtsuki, S. & Ishihama, Y. Mass Spectrometry-Compatible Subcellular Fractionation for Proteomics. *J. Proteome Res.* [acs.jproteome.9b00347](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00347) (2019). doi:10.1021/acs.jproteome.9b00347