

プロテオミクスによるキナーゼ基質同定法および  
チロシンホスファターゼ大規模解析法  
の開発に関する研究

2021

新苗 智也



# 目次

略語表.....	1
緒言.....	3
第一章 キナーゼ生理的基質同定法の開発.....	5
第一節 序.....	5
第二節 BioID によるキナーゼ相互作用タンパク質同定.....	7
第三節 キナーゼ摂動リン酸化プロテオームプロファイリング.....	17
第四節 リン酸化モチーフ解析に関する検討.....	20
第五節 基質候補に対するリン酸化モチーフ解析.....	30
第六節 CK2 と PKA 基質リン酸化部位周辺におけるミスセンス変異.....	36
第七節 結語.....	38
第二章 非加水分解性リン酸化チロシンミミック体を用いたチロシンホスファターゼ濃縮に 関する研究.....	41
第一節 序.....	41
第二節 1 アミノ酸置換による PTP 濃縮への影響に関する評価.....	43
第三節 F <sub>2</sub> Pmp プローブと組換え PTP 間の解離定数の測定.....	46
第四節 細胞抽出物に対する F <sub>2</sub> Pmp プローブのプルダウンに関する大規模研究.....	52
第五節 PTP の pY 基質指向性情報と F <sub>2</sub> Pmp プローブによる PTP 濃縮.....	64
第六節 PTP 活性と F <sub>2</sub> Pmp プローブへの結合.....	68
第七節 結語.....	74
結論.....	75
実験の部.....	77
引用文献.....	87
発表論文.....	95
謝辞.....	97



## 略語表

AP-MS : Affinity-purification mass spectrometry

アフィニティー精製質量分析法

ATP : Adenosine triphosphate

アデノシン三リン酸

AUC : Area under curve

曲線下面積

BioID: Proximity-dependent biotin identification

近接依存性ビオチン標識法

BirA : Biotin ligase

ビオチンリガーゼ

CK2 : Casein kinase 2

カゼインキナーゼ 2

DMSO : Dimethyl sulfoxide

ジメチルスルホキシド

DTT : Dithiothreitol

ジチオトレイトール

EGF : Epidermal growth factor

上皮成長因子

ERK1 : Extracellular signal-regulated kinase 1

細胞外シグナル調節キナーゼ 1

F<sub>2</sub>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

FBS : Fetal bovine serum

ウシ胎児血清

GO : Gene ontology

遺伝子オントロジー

LC/MS/MS : Liquid chromatography tandem mass spectrometry

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計

MS : Mass spectrometry/mass spectrometer

質量分析法/質量分析計

PBS : Phosphate buffer saline  
リン酸塩緩衝生理食塩水

PEG : Polyethylene glycol  
ポリエチレングリコール

PKA : Protein kinase A  
プロテインキナーゼ A

PPI : Protein-protein interaction  
タンパク質間相互作用

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

PWM : Position weight matrix  
ポジションウェイトマトリックス

ROC curve : Receiver operating characteristic curve  
受信者動作特性曲線

SH2 : Src homology 2  
Src ホモロジー 2

StageTip : Stop-and-go extraction tip  
ステージ・チップ

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

TSAP : Thermosensitive alkaline phosphatase  
熱失活性アルカリホスファターゼ

## 緒言

「生体制御機構としてのタンパク質の可逆的リン酸化修飾の発見」により、Fisher、Krebbs らは 1993 年にノーベル医学生理学賞を受賞した。タンパク質の可逆的リン酸化修飾は、翻訳後修飾の一種であり、プロテインキナーゼ（以下、キナーゼ）およびプロテインホスファターゼ（以下、ホスファターゼ）を介して行われる（図 0.1）。真核細胞では、タンパク質のセリン（S）、スレオニン（T）およびチロシン（Y）へのリン酸化修飾が知られており、ヒトにおいては 70%以上のタンパク質がリン酸化を受ける<sup>1,2</sup>。リン酸化修飾は、酵素活性やタンパク質局在などの調節を通じて、様々な細胞機能において重要な役割を果たしており、ヒトにおいては約 500 種のキナーゼ、約 200 種のホスファターゼによって厳密に制御されている<sup>3,4</sup>。その破綻はがん、免疫疾患および代謝疾患など種々の疾患の一因となるため、キナーゼ・ホスファターゼは有力な創薬標的・薬効マーカー候補となりうる<sup>5,6</sup>。例えば、チロシンキナーゼの過剰発現や、遺伝子変異による恒常的な活性の獲得は、がん組織において広く見られる。そのため、2000 年代から、BCR-ABL を標的とする慢性骨髄性白血病治療薬 imatinib を皮切りに、キナーゼに対する多様な分子標的薬が開発されてきた。このように、一部のキナーゼに対する阻害薬が上市されているものの、細胞内リン酸化ネットワークにはいまだに不明な点が多い。細胞内リン酸化ネットワークを理解する上で、キナーゼ・ホスファターゼの発現量、活性および基質に関する情報は不可欠であり、それらをプロファイリングするための汎用的な手法が必要である。キナーゼの発現量や活性を包括的にプロファイリングする手法は開発されているものの、キナーゼの生理的基質の大規模同定法は確立されていない<sup>6,7</sup>。また、ホスファターゼに関しては、長らくの間ハウスキーピング酵素であると考えられており、シグナル伝達における重要性があまり認識されてこなかった<sup>8</sup>。そのため、発現量や活性の大規模解析法といったホスファターゼ自体のプロファイリングを行うための手法すら存在せず、技術的な開発の余地が大きい。以上のように、リン酸化ネットワーク全体のプロファイリングに必要な基盤技術は未だに確立されていない。

ヒト細胞内にタンパク質をコードする遺伝子は約 2 万種存在するとされている。これらのタンパク質は更にリン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾が施され、生体内で機能する<sup>9</sup>。組織、細胞などのある状態におけるタンパク質の総体をプロテオーム、プロテオームを解析する学問分野やその測定技術をプロテオミクスと呼ぶ。プロテオミクスにおいて最も汎用されている手法がショットガンプロテオミクスであり、タン

タンパク質混合物をプロテアーゼによりペプチド断片化後に液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) によってペプチドイオンのアミノ酸配列情報を取得する。

タンパク質のリン酸化修飾の網羅的解析法はリン酸化プロテオミクスと呼ばれる。リン酸化されたペプチドの存在量は非リン酸化ペプチドと比べて数百分の一程度しかないため、通常のショットガンプロテオミクスをそのまま適用するのは困難である。そこで、LC/MS/MS 解析前にリン酸化ペプチドを選択的に濃縮する手法が開発され、それによりリン酸化ペプチドの同定効率は飛躍的に向上した。

以上のように、プロテオミクスはタンパク質やタンパク質翻訳後修飾の大規模解析を可能にする。

以上の背景を踏まえて、本研究では、リン酸化ネットワークを理解する上で不可欠な情報（発現量・活性・基質）を取得するために、プロテオミクスを用いたキナーゼ基質同定法（第一章）およびチロシンホスファターゼ大規模解析法（第二章）の開発を行った。

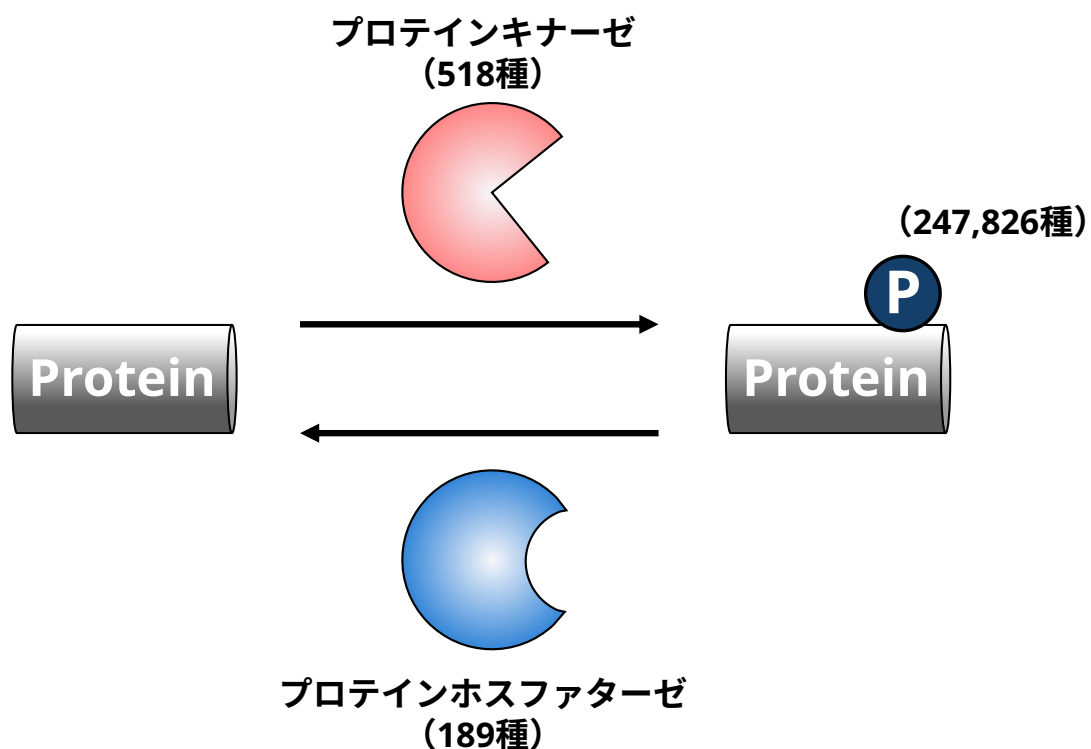


図 0.1 タンパク質の可逆的リン酸化修飾

括弧内の数字はヒトにおいて知られているプロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼおよびリン酸化部位の数を表す<sup>3, 4, 10</sup>。



# 第一章

## キナーゼ生理的基質同定法の開発

### 第一節 序

タンパク質のリン酸化は、細胞内のシグナル伝達において重要な役割を果たし、細胞の増殖や分化など、様々な生命現象を制御している。MSに基づくリン酸化プロテオミクスにより、一度の測定で数千のリン酸化部位を同定することが可能となった<sup>11-13</sup>。しかし、膨大なリン酸化部位情報が公共データベースに蓄積されているにも関わらず<sup>10,14-16</sup>、キナーゼと基質の関係は *in vitro* (試験管内)、*in vivo* (生体内) ともにほとんど分かっていない<sup>7</sup>。

*In vitro* キナーゼアッセイは、キナーゼの基質を同定するために最も広く用いられている手法の一つである<sup>17-21</sup>。著者の所属する研究グループは最近、ヒト細胞から抽出したタンパク質を用いて *in vitro* キナーゼ反応を行い、その後リン酸化ペプチドを濃縮して LC/MS/MS で分析し、385 種のキナーゼに対して合計 198,536 種の基質を同定した<sup>22,23</sup>。しかしこの手法では、細胞内の生理的条件が考慮されていないため、内在性キナーゼ基質の同定には至っていない。一方、薬物処理<sup>24,25</sup> や特定のキナーゼのノックダウン/ノックアウト<sup>26,27</sup> により、生細胞内のキナーゼ活性を人為的に制御し、リン酸化レベルの変化を *in vivo* で評価することが可能である。しかし、これらの方法は下流のキナーゼにも間接的に影響を与えるため、直接的な基質の同定に支障をきたすことになる<sup>28</sup>。そこで、著者の所属する研究グループらは、細胞内における直接的な基質を同定するために、生細胞を用いたキナーゼ摂動リン酸化プロテオミクスに加えて、*in vitro* の基質情報やリン酸化モチーフ情報を利用した手法を開発し、Protein kinase A (PKA)、Spleen tyrosine kinase (SYK)、Abelson tyrosine kinase (ABL) の内在性基質候補を同定した<sup>29-31</sup>。しかし、これらの *in vitro* 基質情報とキナーゼ摂動によるリン酸化プロテオームプロファイリングを併用する方法では、標的キナーゼと類似したモチーフをリン酸化する下流キナーゼの基質を区別することができない。そこで、キナーゼ-タンパク質間相互作用情報を追加することで、内在性基質をより確実に同定することができるのではないかと考えた。実際、情報学的解析により、タンパク質間相互作用 (PPI) に基づくネットワークとキナーゼ特異的なリン酸化モチーフを用いることで、基質特異性の予測が向上することが示されている<sup>32-34</sup>。しかし、これらの研究は、アフィニティー精製質量分析法 (AP-MS) や酵母ツー

ハイブリッド法などの従来法で測定した PPI を集めた公共データベースに依存している。一般に、キナーゼと基質の相互作用は一過性で不安定であり、AP-MS 等の従来法ではキナーゼ-基質複合体を捉えることはできないとされている。この問題を克服するために、ATP と  $Mg^{2+}$  の非存在下でキナーゼ-基質複合体を安定化させて免疫沈降し、その後 ATP と  $Mg^{2+}$  を含むバッファーで複合体を解離させる AP-MS 法が報告されている<sup>35</sup>。ただしこの方法では、*in vitro* 条件下でのキナーゼ相互作用タンパク質を同定することができるが、生細胞内における標的キナーゼの内在性基質を同定することはいまだに困難である。

近年、キナーゼ-基質相互作用を含む一過性の不安定な相互作用を捉えるために、近接依存性ビオチン標識法 (BioID)<sup>36</sup> や engineered ascorbate peroxidase (APEX)<sup>37</sup> などの近接標識法が開発されている<sup>38-40</sup>。BioID は、変異型ビオチンリガーゼ (BirA\*) を融合したタンパク質の近傍 (~10 nm) のタンパク質をビオチン標識し、ストレプトアビジンプルダウンと LC/MS/MS によってビオチン化タンパク質を捕捉・同定するものである。このように、BioID は細胞内のキナーゼ-基質相互作用のような一過性・不安定な相互作用を網羅的に捉えるインタラクトーム解析に適しているが、一過性・不安定な相互作用タンパク質のみならず、近傍のタンパク質も捉える点に留意する必要がある。

本研究の目的は、内在性キナーゼと基質の関係を系統的に解析するための汎用的なワークフローを確立することである。この目的のために、BioID を用いたキナーゼインタラクトーム解析により内在性基質を捕捉し、他の 2 つの独立した解析、すなわちキナーゼ摂動リン酸化プロテオーム解析とリン酸化モチーフ解析を組み合わせ、基質と非基質近傍タンパク質を識別し、内在性基質を同定することを検討した。

## 第二節 BioID によるキナーゼ相互作用タンパク質同定

キナーゼと相互作用するタンパク質を同定するために、まず、BioID 実験を行った (図 1.1)。CK2 および PKA は機能、局在や基質が比較的良好に研究されているため、それらを標的キナーゼとして選択した<sup>7</sup>。

BirA\*融合キナーゼ (BirAk) をそれぞれ HEK293T 細胞にトランスフェクションし、BirA\*融合 GFP (BirAg) をトランスフェクションした細胞、およびネガティブコントロールとしてトランスフェクションしていない (No BirA\*) 細胞を使用した。ビオチンの標識時間については、多くの先行研究<sup>38,40</sup>に倣って 24 時間を採用した。最初に、BirAk のビオチンリガーゼ活性およびキナーゼ活性に関する評価を行った。ストレプトアビジンブロッキングによりビオチン化タンパク質を確認したところ、BirAk または BirAg を発現させた細胞ではビオチン化タンパク質が確認されたが、トランスフェクションしていない No BirA\*ではシグナルが検出されなかった (図 1.2A)。この結果から、BirAk がビオチンリガーゼ活性を有することが確認された。次に、BirAk のキナーゼ活性を確認するために、免疫沈降した BirAk または組換えキナーゼと合成ペプチド基質を用いて、*in vitro* キナーゼ反応を行った。免疫沈降した BirAk と組換えキナーゼによってリン酸化されたペプチド基質の強度は高い相関を示し、BirAk がキナーゼ活性を有することが示された (図 1.2B)。

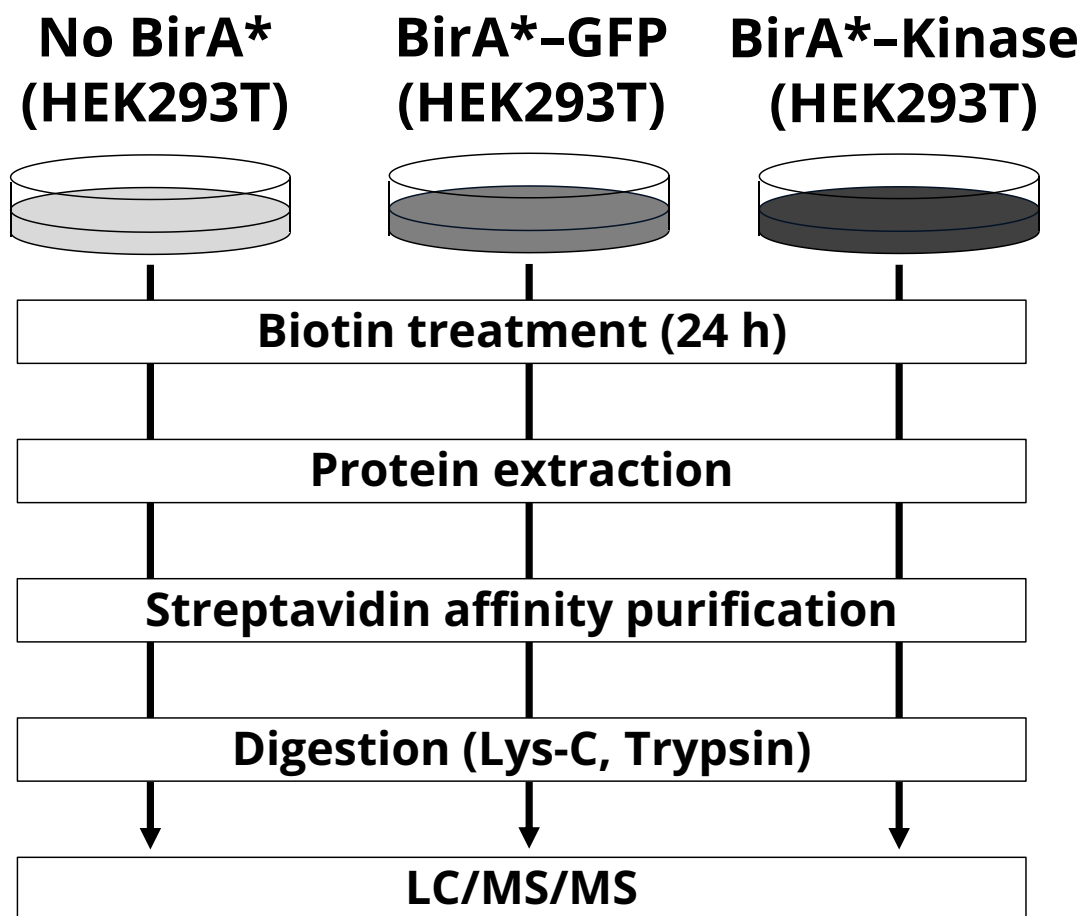
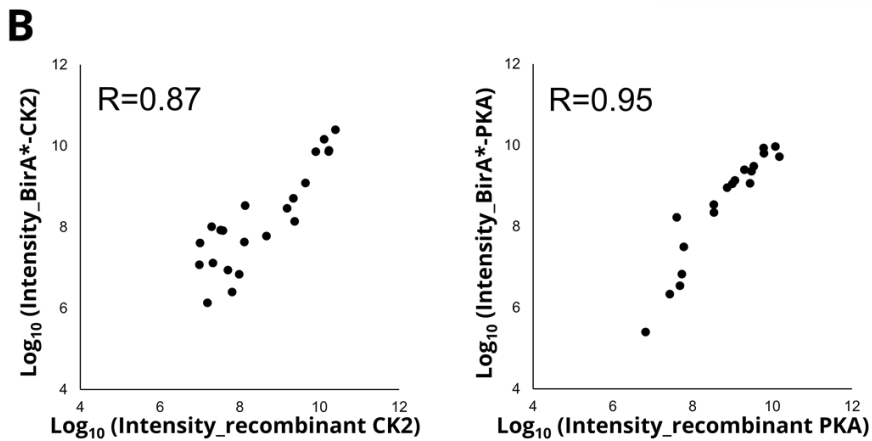
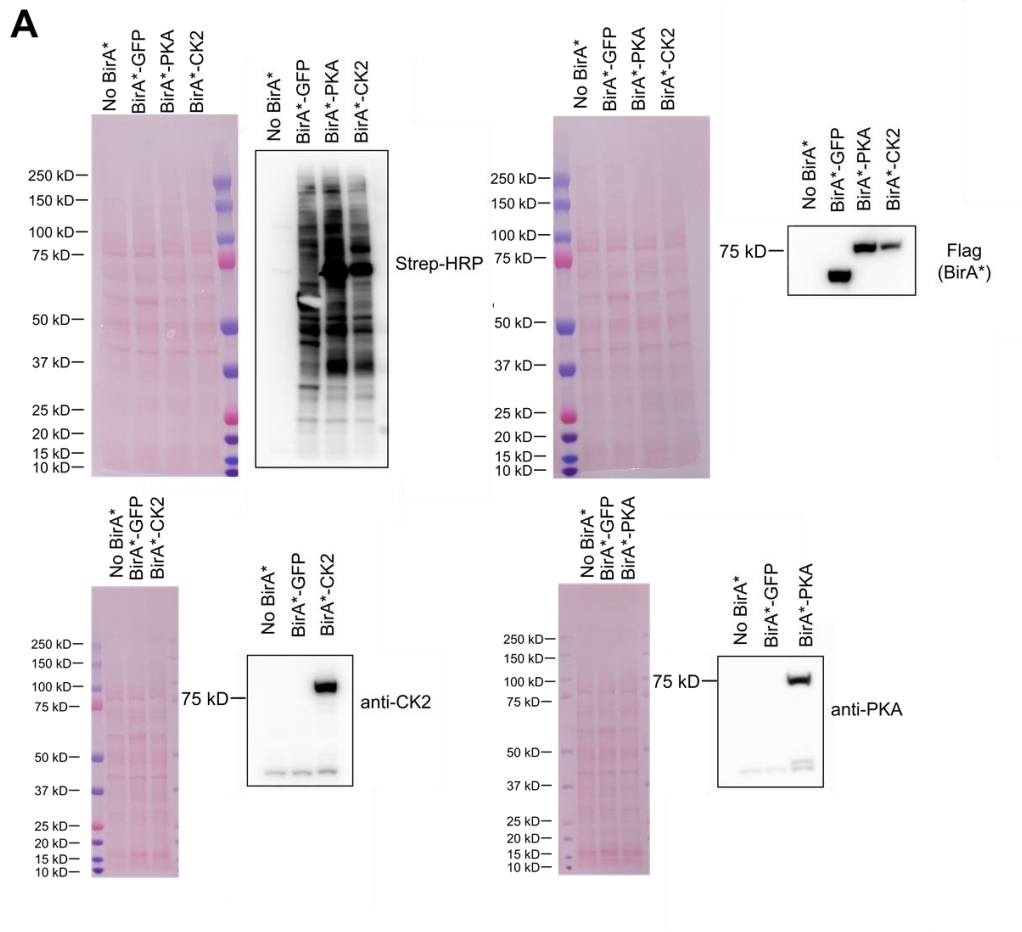


図 1.1 BioID を用いたキナーゼ相互作用タンパク質同定のワークフロー



## 図 1.2 BioID 実験条件の検証

(A) ウェスタンブロッティングによるビオチン化および BirAk の発現の検証

(B) BirAk のキナーゼ活性の検証。各点はリン酸化ペプチドを表す。x 軸は、免疫沈降した BirAk によってリン酸化されたペプチドの強度から、コントロール (BirAg) の対応するペプチドの強度を引いた値を示す。y 軸は組換えキナーゼによってリン酸化されたペプチドの強度を示す。

続いて CK2 および PKA のインタラクトーム解析を行った。トランスフェクションおよびビオチン添加後、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで濃縮し、酵素消化によりペプチド断片化後、LC/MS/MS で分析し、ラベルフリー定量法<sup>41</sup>を用いてタンパク質定量を行った。その結果、BirA\*-CK2 発現細胞では 1,713 種、BirA\*-PKA 発現細胞では 1,678 種のタンパク質が、それぞれ 3 回の反復実験のうち少なくとも 2 回で定量された。以降の解析ではそれらのタンパク質群を対象とした。今回の BioID 実験に適したコントロール試料を選択するために、2 種類の試料を評価した。図 1.3 および図 1.4 に示すように、定量されたタンパク質を、BirAk 試料とコントロール試料の間の有意性と強度比に基づいてボルケーノプロットにより評価した。BirA\*-CK2 については、既知の相互作用タンパク質は両コントロール試料との間でより高い BirAk/コントロール比を示したが、BirA\*-PKA については、BirA\*-GFP は既知の相互作用タンパク質である PRKAR2A などについて高い BirAk/コントロール比を示さなかった。既知の基質についても同様の傾向が見られた。これらの結果を踏まえ、以下の解析では、非トランスフェクション細胞 (No BirA\*) をコントロール試料として採用することとした。

キナーゼ相互作用タンパク質を抽出するためにカットオフ値 (BirAk/No BirA\* 比 2 倍以上、 $p$ -value  $< 0.05$ ) を適用した結果、CK2 および PKA の相互作用タンパク質としてそれぞれ 407 種および 370 種のタンパク質を同定した。その中には、各キナーゼとヘテロマー複合体を形成する CSNK2B と PRKAR2A がキナーゼ相互作用タンパク質として含まれていた (図 1.3A)。このことより、BirA\*融合キナーゼが生体内でヘテロマー複合体を形成し、内在性キナーゼと同様に機能していることが示唆された。

BioID で得られた結果の妥当性をさらに評価するために、CK2 あるいは PKA と相互作用するタンパク質 (各  $n = 407$ ,  $n = 370$ ) を PPI データベースである STRING<sup>42</sup> にマッピングした。その結果、265 種のタンパク質 (67%に相当、 $p$ -value  $< 10^{-16}$ ) と 230 種のタンパク質 (63%に相当、 $p$ -value  $< 10^{-16}$ ) が単一の大きなネットワーク (つまり、任意のタンパク質のペアが直接または間接的に繋がっている) を形成しており (図 1.5)、今回の BioID 実験が、標的キナーゼの近傍にあるタンパク質群を捉えていることが示された。最後に、キナーゼと相互作用するタンパク質群に対して、Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行った (表 1.1)。その結果、“RNA processing” と “apoptosis” に関連する GO タームが CK2 相互作用タンパク質に濃縮されており、CK2 ファミリーの既知の機能と一致していた<sup>43,44</sup>。PKA と相互作用するタンパク質については、PKA の既知の機能と一致する “cell-cell adhesion” が濃縮されていた<sup>45</sup>。

これらの結果から、本データは **CK2** および **PKA** の相互作用プロテオーム（インタラクトーム）の有用な情報源であり、安定および一過的な相互作用タンパク質群が含まれていることが示唆された。

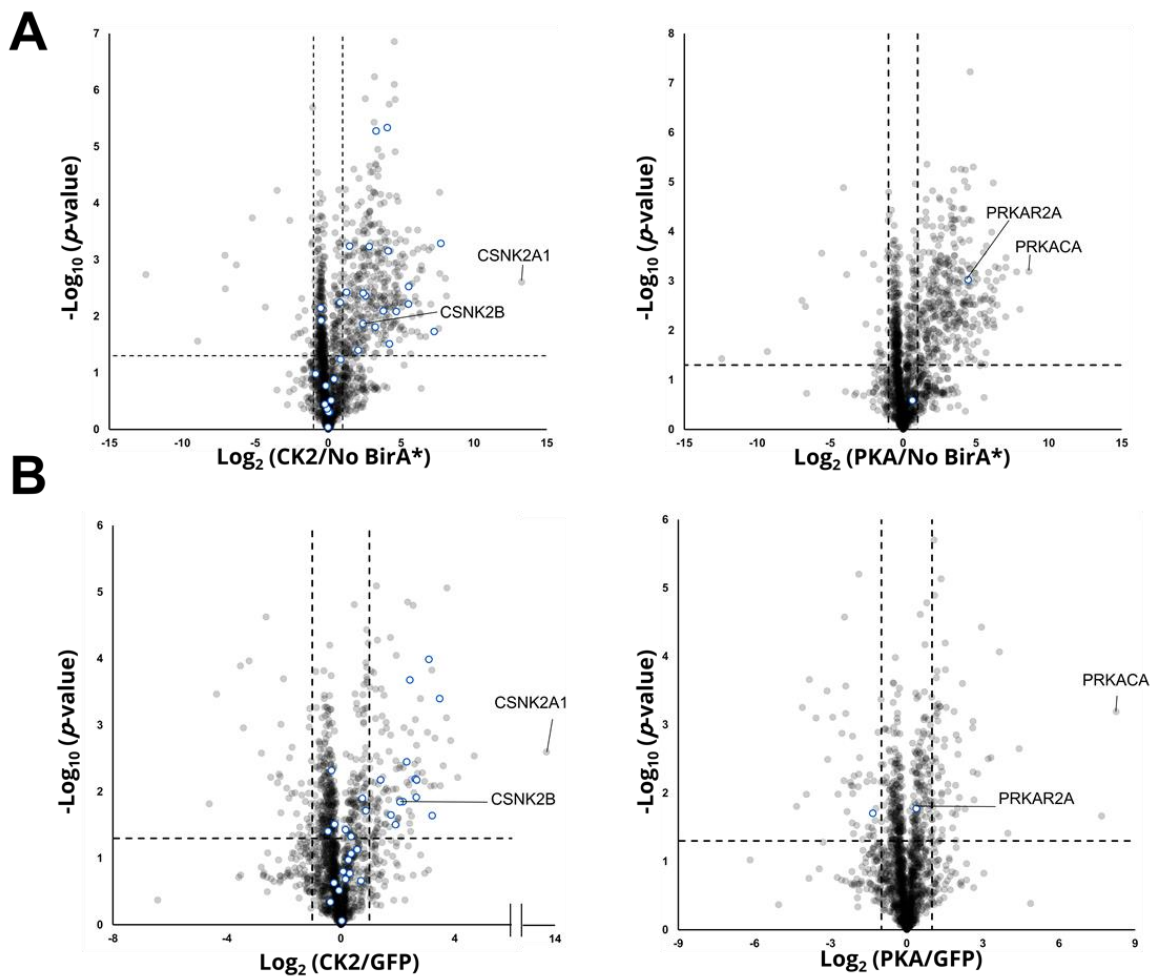


図 1.3 BioID におけるボルケーノプロットでの既知の相互作用タンパク質のプロファイル

各タンパク質について、コントロールに対する BirAk の比率 ( $\log_2(\text{BirAk}/\text{control})$ ) と  $-\log_{10}(p\text{-value})$  (Welch の t 検定) をプロットした。青色は CK2 または PKA の既知の相互作用タンパク質を示す<sup>46</sup>。(A) コントロール: No BirA\* (B) コントロール: BirAg



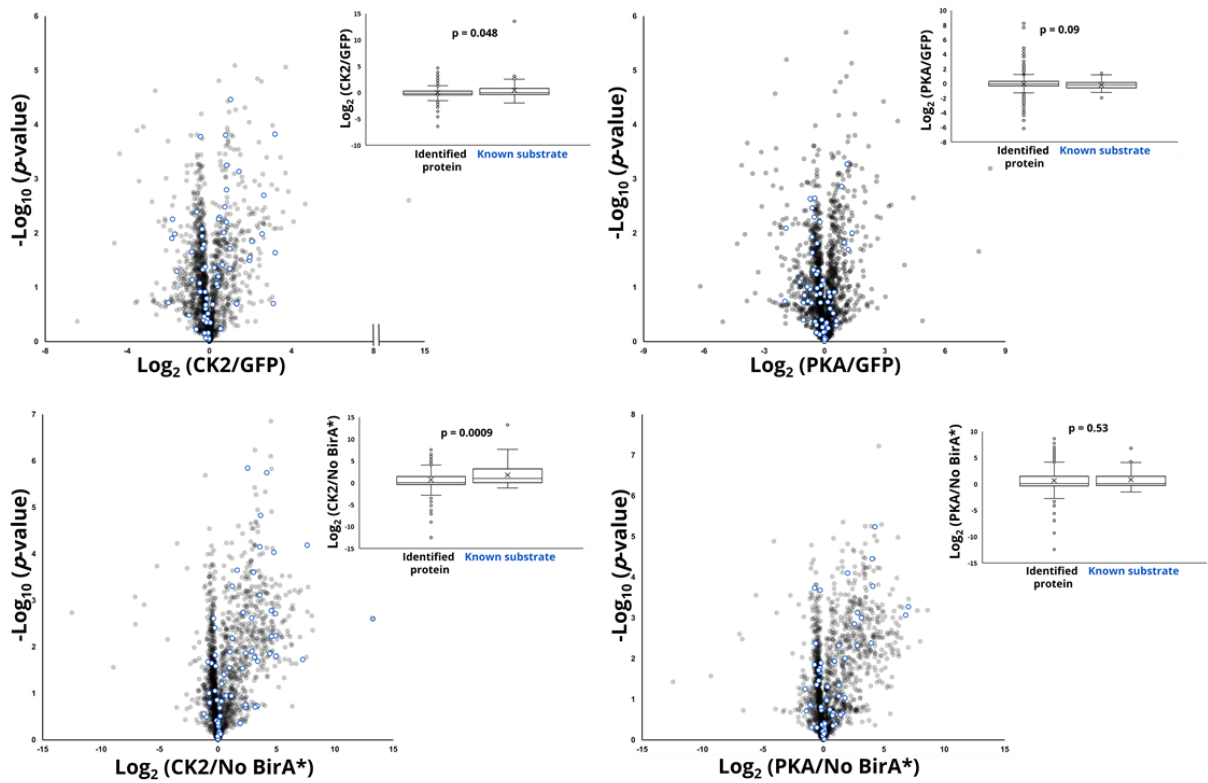
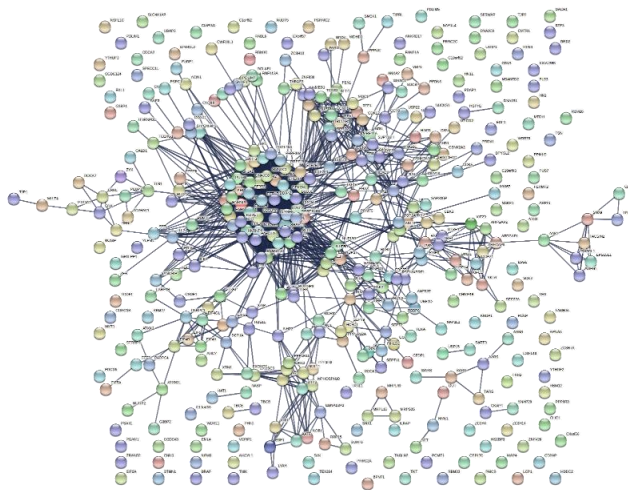
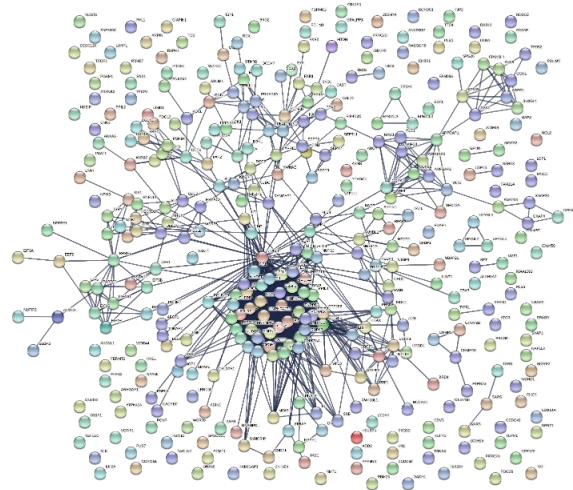


図 1.4 BioID におけるボルケーノプロットでの既知の基質タンパク質のプロファイル  
 各タンパク質について、コントロールに対する BirAk の比率 ( $\log_2(\text{BirAk}/\text{control})$ )  
 と  $-\log_{10}(p\text{-value})$  (Welch の t 検定) をプロットした。青色は CK2 または PKA の既  
 知の基質タンパク質<sup>10</sup>を示す。箱ひげ図は定量された全てのタンパク質と、標的キナ  
 ーゼの既知基質タンパク質の比率 ( $\text{BirAk}/\text{control}$ ) を示す。

**CK2**



**PKA**



**図 1.5 相互作用するタンパク質の PPI ネットワーク**

PPI ネットワーク解析は STRING を用いて行い、PPI ネットワーク (スコア=0.9) を使用した。

表 1.1 キナーゼ相互作用タンパク質群に有意に濃縮されていた GO ターム

CK2	
Term	<i>p</i> value
GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	2.3E-07
GO:0006397~mRNA processing	4.3E-06
GO:0098609~cell-cell adhesion	2.0E-05
GO:0007265~Ras protein signal transduction	1.5E-03
GO:0006366~transcription from RNA polymerase II promoter	2.1E-03
GO:0006369~termination of RNA polymerase II transcription	2.1E-03
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	2.3E-03
GO:0031124~mRNA 3'-end processing	3.2E-03
GO:0000387~spliceosomal snRNP assembly	4.4E-03
GO:0006368~transcription elongation from RNA polymerase II promoter	4.7E-03
GO:0008380~RNA splicing	8.0E-03
GO:0006406~mRNA export from nucleus	8.3E-03
GO:1901796~regulation of signal transduction by p53 class mediator	9.9E-03
GO:0006334~nucleosome assembly	1.1E-02
GO:0048025~negative regulation of mRNA splicing, via spliceosome	1.5E-02
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	1.6E-02
GO:0007049~cell cycle	1.8E-02
GO:0032968~positive regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	1.9E-02
GO:0000380~alternative mRNA splicing, via spliceosome	1.9E-02
GO:0043086~negative regulation of catalytic activity	2.4E-02
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	1.6E-02
GO:0007049~cell cycle	1.8E-02
GO:0032968~positive regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	1.9E-02
GO:0000380~alternative mRNA splicing, via spliceosome	1.9E-02
GO:0043086~negative regulation of catalytic activity	2.4E-02
GO:0045727~positive regulation of translation	2.4E-02
GO:0006405~RNA export from nucleus	2.8E-02
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3.4E-02
GO:0016567~protein ubiquitination	3.5E-02
GO:0000381~regulation of alternative mRNA splicing, via spliceosome	3.6E-02
GO:0043388~positive regulation of DNA binding	4.0E-02
GO:0006915~apoptotic process	4.5E-02
GO:0007067~mitotic nuclear division	4.7E-02
GO:0006396~RNA processing	4.8E-02

## PKA

Term	<i>p</i> -value
GO:0098609~cell-cell adhesion	2.09E-10
GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	3.00E-04
GO:0006397~mRNA processing	8.94E-04
GO:0007265~Ras protein signal transduction	2.74E-03
GO:0032968~positive regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	8.35E-03
GO:0006930~substrate-dependent cell migration, cell extension	2.09E-02
GO:0007049~cell cycle	2.39E-02
GO:0000387~spliceosomal snRNP assembly	2.54E-02
GO:0043547~positive regulation of GTPase activity	2.57E-02
GO:0007275~multicellular organism development	3.20E-02
GO:0043388~positive regulation of DNA binding	3.21E-02
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	3.76E-02
GO:0007179~transforming growth factor beta receptor signaling pathway	4.12E-02

### 第三節 キナーゼ摂動リン酸化プロテオームプロファイリング

次に、CK2 および PKA によって制御されるリン酸化部位を特定するために、キナーゼ活性変動に基づくリン酸化プロファイリングを試みた (図 1.6)。HEK293T 細胞を CK2 阻害薬 CX-4945 (別名シルミタセルチブ) <sup>47</sup>、または PKA 活性化薬フォルスコリン <sup>48</sup> で処理した。タンパク質抽出および酵素消化の後、ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー<sup>49</sup> によりリン酸化ペプチドを濃縮し、Tandem Mass Tag (TMT) 試薬で標識して LC/MS/MS で分析した。その後の解析ではモノリン酸化ペプチドの定量結果のみを用いた。その結果、CX-4945 およびフォルスコリン処理細胞からそれぞれ 7,188 および 7,087 種のリン酸化部位が定量された。定量リン酸化部位において、TOP2A (S1377) や LIG1 (S66) など既知の CK2 基質のリン酸化の減少、STMN1 (S16)、NDE1 (S306)、FLNA (S2152) など既知の PKA 基質のリン酸化の増加が確認され、本実験の結果の妥当性が支持された (図 1.7A)。さらに、CK2 の酸性指向性リン酸化モチーフおよび PKA の塩基性指向性リン酸化モチーフは、変動したリン酸化部位の周辺配列に濃縮されており (図 1.7B)、本実験で得られたデータが CK2 および PKA の基質候補を多く含んでいることが示唆された。

キナーゼ摂動リン酸化プロテオミクスで得られた結果を BioID 実験の結果と組み合わせるために、定量されたリン酸化部位をキナーゼ相互作用タンパク質にマッピングした。その結果、981 種と 772 種のリン酸化部位が、それぞれ CK2 および PKA と相互作用する 265 種および 230 種のタンパク質に帰属された (図 1.7A)。さらに、キナーゼ相互作用タンパク質と、キナーゼ摂動薬によって変動したリン酸化部位の間に有意な相関は認められなかった (図 1.7C)。この結果から、これらの手法の選択性は直交しており、両法を組み合わせることは内在性基質同定に有効であることが示された。最終的に、カットオフ値を平均 2 倍変化 ( $n = 3$ )、 $p$ -value  $< 0.05$  として、制御されたリン酸化部位を抽出した結果、CK2 および PKA 基質候補として、それぞれ 62 種および 44 種のリン酸化部位が同定された。

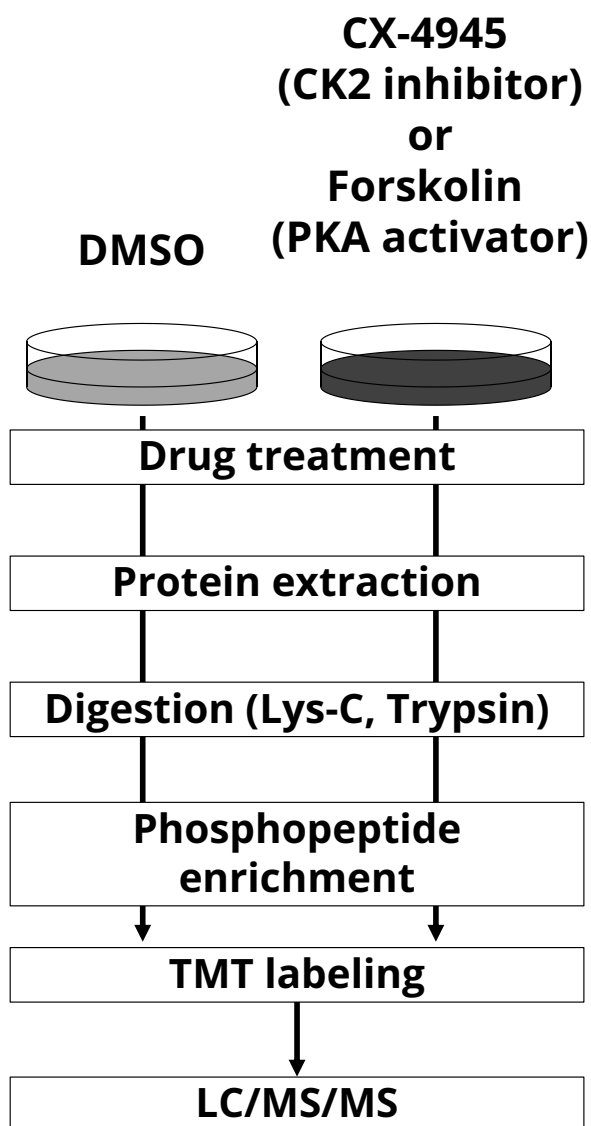


図 1.6 標的キナーゼ阻害薬/活性化薬存在下でのリン酸化変動をプロファイルする定量的リン酸化プロテオミクスのワークフロー

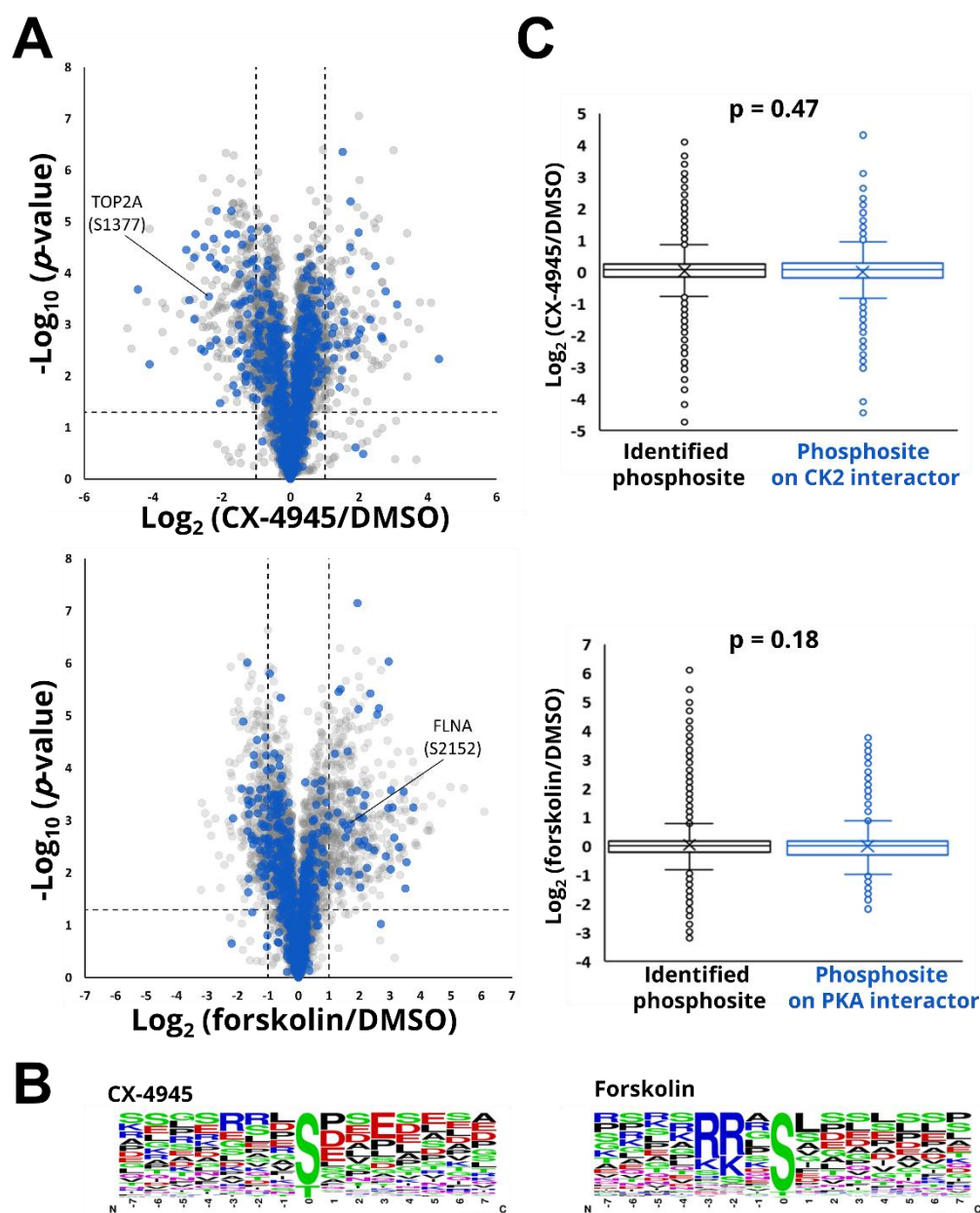


図 1.7 CX-4945 またはフォルスコリン処理による HEK293T 細胞のリン酸化の変動

(A) 各薬物処理のボルケーノプロット。各点はリン酸化部位を表す。青色は、標的キナーゼと相互作用するタンパク質上のリン酸化部位を示す。

(B) 薬物処理により変動したリン酸化部位のモチーフ解析。CK2 阻害により 2 倍以上存在量が低下したリン酸化部位（三回の反復実験の平均値、 $p\text{-value} < 0.05$ ）、PKA 活性化により 2 倍以上存在量が増加したリン酸化部位（三回の反復実験の平均値、 $p\text{-value} < 0.05$ ）。アミノ酸頻度プロットは WebLogo (v. 2.8.2) で可視化した<sup>50</sup>。

(C) 定量された全てのリン酸化部位と、標的キナーゼと相互作用するタンパク質上のリン酸化部位の変動比の箱ひげ図。グラフ中の  $p\text{-value}$  は Welch の t 検定を用いて算出した。

## 第四節 リン酸化モチーフ解析に関する検討

キナーゼ摂動リン酸化プロテオーム解析では、標的キナーゼの下流キナーゼの活性変動や、薬物のオフターゲット効果により、直接および間接的に制御されるリン酸化部位が同定される。キナーゼ基質同定において、キナーゼのリン酸化モチーフは直接的な基質を同定するための有用な予測因子であることが示されている<sup>29</sup>。

Position Weight Matrix (PWM)<sup>51</sup>は、あるキナーゼが標的とするリン酸化部位周辺の配列の特徴を表す。ここで、行列の列はリン酸化部位からの相対的な位置を表し、行はアミノ酸を表している。行列の値は、あるアミノ酸がある位置に出現する確率を $\log_2$ 変換したものである。これらの確率は推定基質を予測するために使用され、PWMスコアはそれら配列の基質としての確からしさを表す。(実験の部参照)。この手法は、いくつかのキナーゼ基質予測手法に実装され、*in vivo*でのキナーゼ基質探索に応用されている。

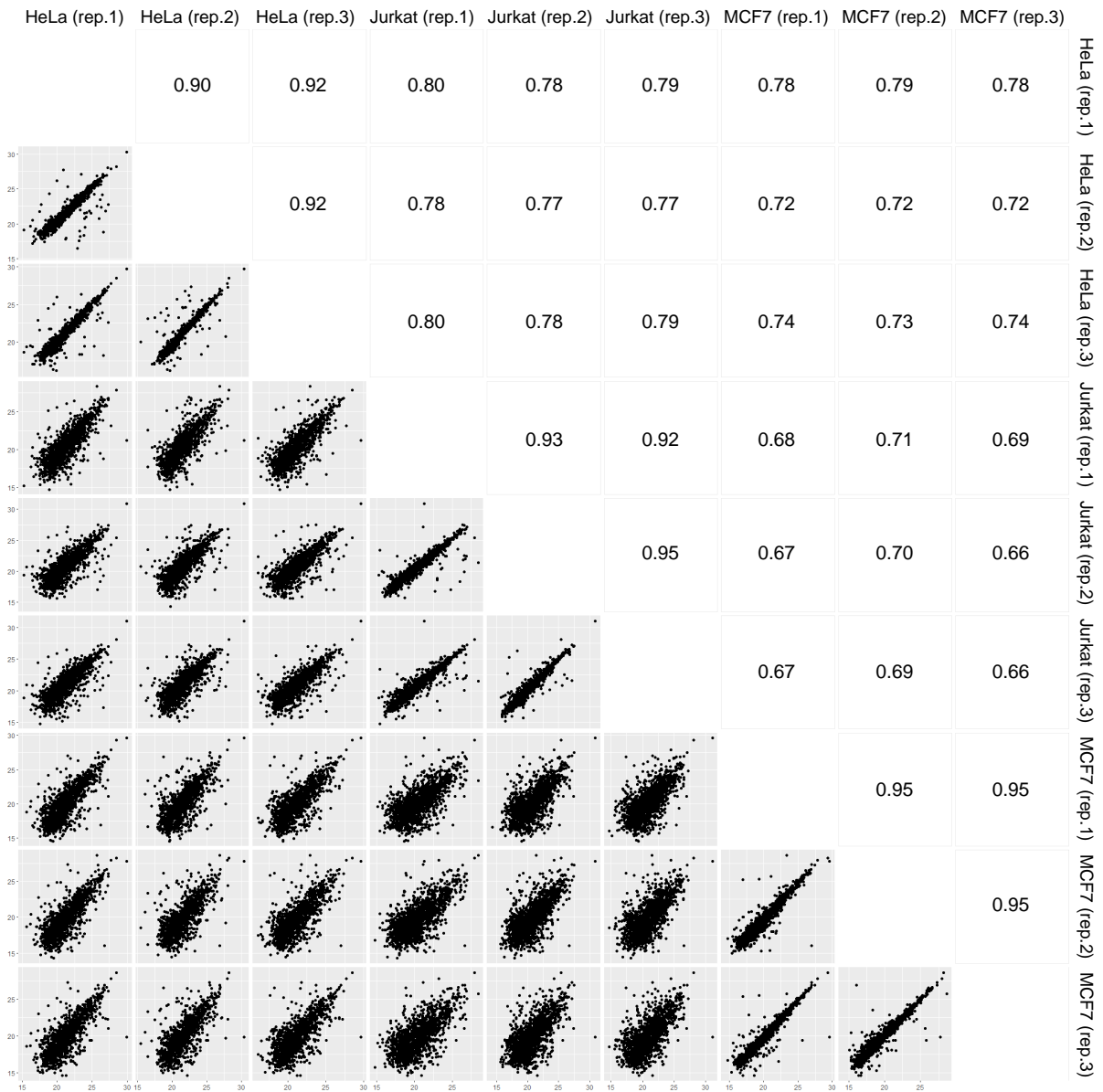
PWM作成には基となる基質情報(トレーニングセット)が必要であり、細胞抽出タンパク質に対して*in vitro*キナーゼ反応を行うことで得られる基質情報は非常に有用である。しかし、異なる細胞由来の抽出タンパク質を用いる場合、発現タンパク質プロファイルが異なる。そのため、獲得される*in vitro*基質情報は用いた細胞抽出タンパク質によって異なるが、それらがPWMに与える影響は分かっていない。

本節では、細胞抽出タンパク質を用いて得られた*in vitro*基質由来のPWMが、*in vitro*基質の取得の際に用いた細胞種に依存的かどうかを評価した。一般的に使用され、発現タンパク質プロファイルが異なることが知られる3種の細胞株(HeLa, MCF7, Jurkat)を選択した<sup>52</sup>。そして、*in vitro*キナーゼ反応には、基質に対する特異性が異なる3種のキナーゼ(CK2:酸性指向性、PKA:塩基性指向性、ERK1:プロリン指向性)を選択した。まず、各細胞からタンパク質を抽出した。次に、TSAPをタンパク質に添加し、内在性のリン酸化部位を脱リン酸化させた後、加熱によりTSAPを不活性化させた。その後、組換えキナーゼを添加してキナーゼ反応を行い、試料を消化し、ペプチドを得た。リン酸化ペプチドはヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィーによって濃縮し、LC/MS/MSにより分析した<sup>49</sup>。組換えキナーゼの代わりに蒸留水を添加したコントロール試料(キナーゼ(-))で同定されたリン酸化ペプチドを、各キナーゼと反応した試料(キナーゼ(+))で同定されたものから除外し、*in vitro*キナーゼ反応によってリン酸化されたペプチドの最終リスト(*in vitro*基質)を決定した。異なる細胞抽出タンパク質由来の*in vitro*基質のプロファイルが異なることを確認するために、*in vitro*基質のシグナル強度をプロットした(図1.8)。三回の反復実験間のシグナル強度の相関はいずれも高く( $0.89 < R < 0.98$ )、異なる細胞株間の

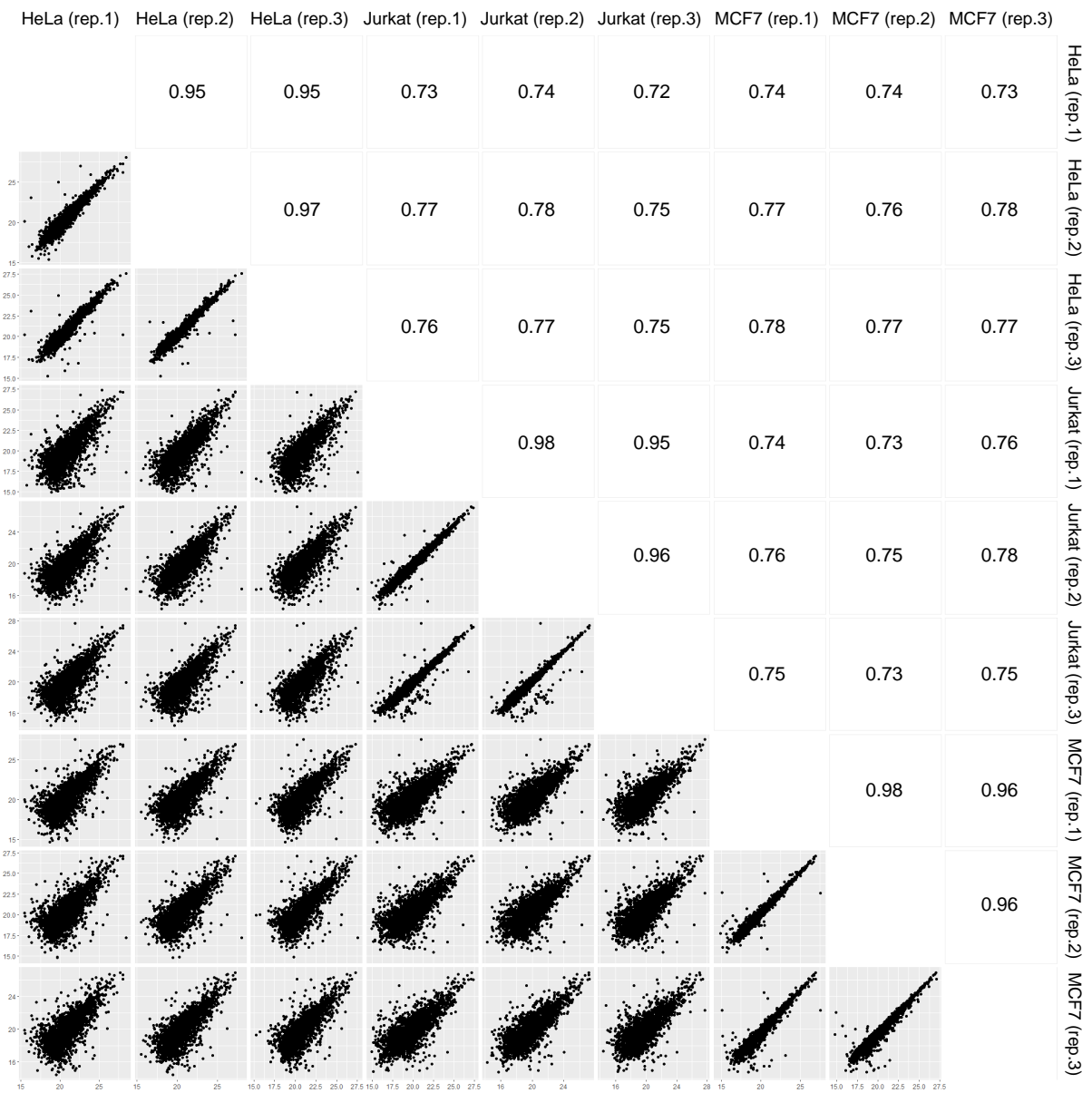


シグナル強度の相関は、いずれのキナーゼでも低い値 ( $0.66 < R < 0.80$ ) を示した。続いて、この違いが各細胞におけるタンパク質の発現量の違いによるものかどうかを評価した。2種の細胞株間におけるタンパク質または *in vitro* 基質の強度比をプロットしたところ、タンパク質と *in vitro* 基質の間の強度比は正に相関していた(図 1.9)。以上より、各細胞におけるタンパク質発現量が *in vitro* 基質情報に偏りをかけていることが示された。

# A



# B



C

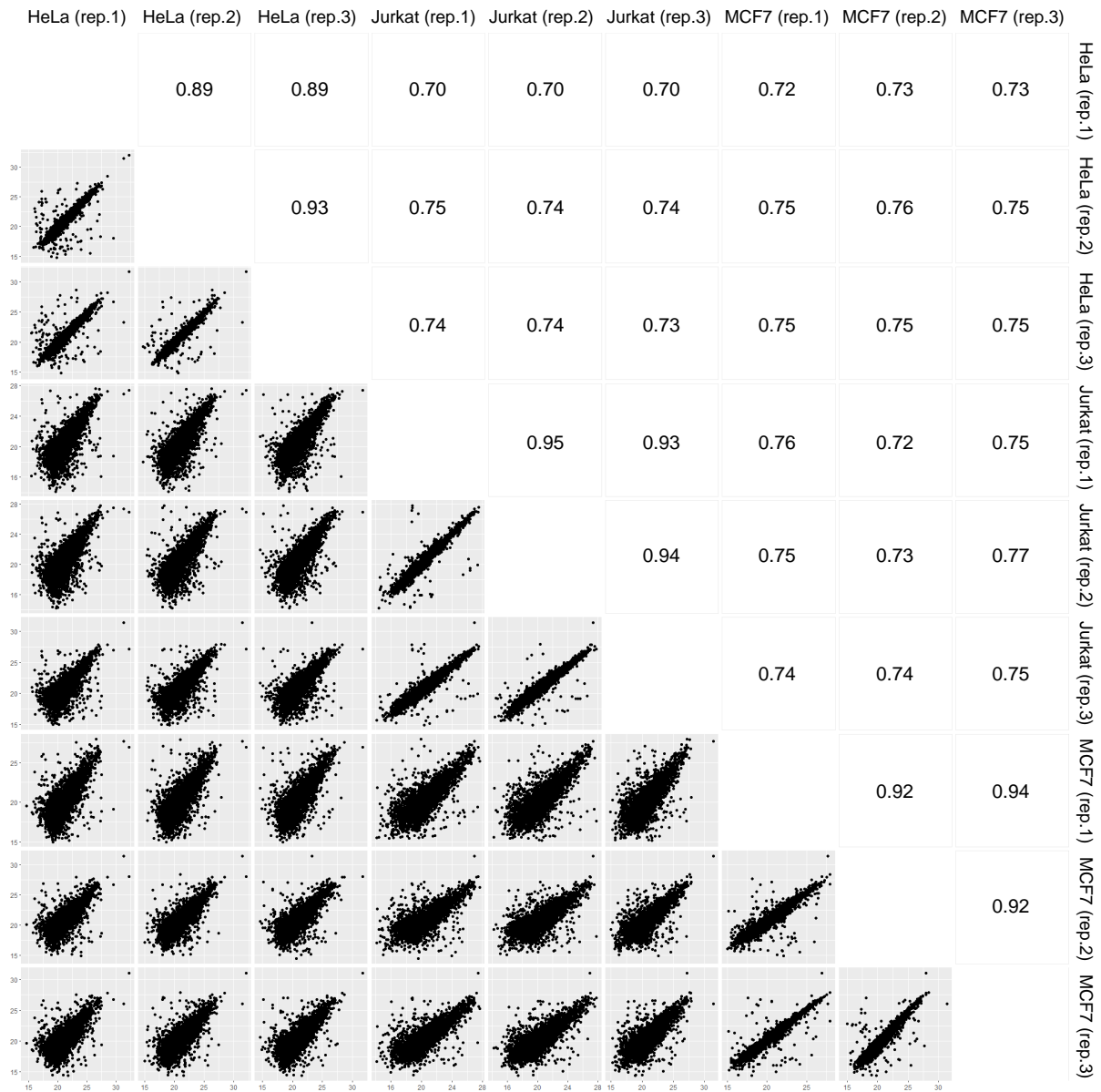


図 1.8 各細胞由来の *in vitro* 基質の強度の相関

各細胞抽出タンパク質に対して *in vitro* キナーゼ反応を行って得られたリン酸化部位について、強度 ( $\log_2$ ) のピアソン相関係数を算出した。

(A) CK2 (B) ERK1 (C) PKA

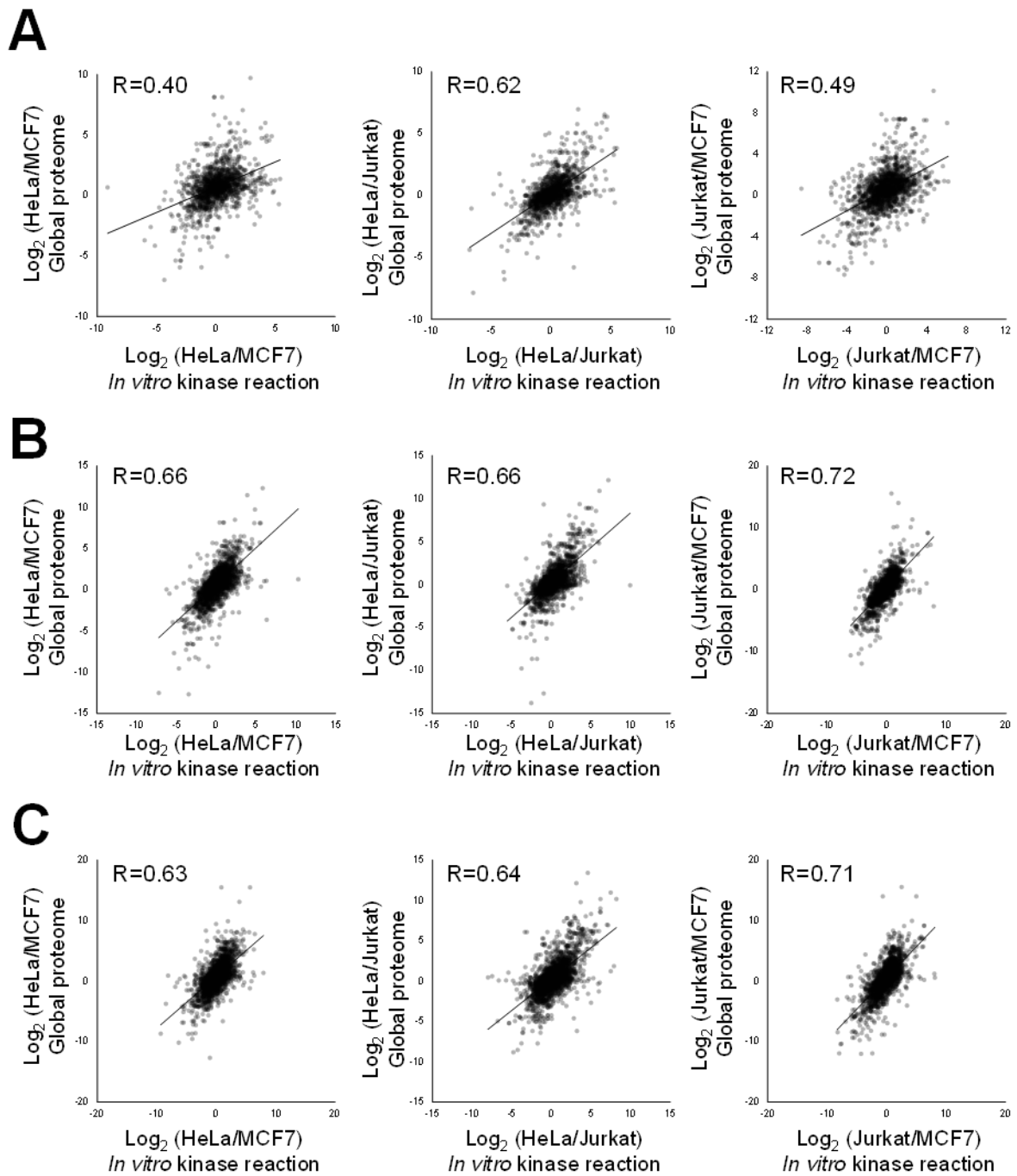


図 1.9 タンパク質発現量比と *in vitro* 基質存在量比の相関

各細胞間のタンパク質発現量比と、そのタンパク質上の *in vitro* 基質の存在量比を比較した。グラフ中の相関係数はピアソン相関係数により算出した。

(A) CK2 (B) ERK1 (C) PKA

次に、キナーゼ基質予測の性能に関して評価を行った。本評価に関しては、スレオニン基質は数が少なかったため、セリン基質のみを対象とした。各細胞由来間の *in vitro* 基質を存在量比に基づいて3つのクラスに分類（存在量比  $> 2$ 、 $2 >$  存在量比  $> 1/2$ 、存在量比  $< 1/2$ ）し（図 1.10A）、各クラスごとに400種または1000種の *in vitro* 基質をトレーニングセットとして無作為に抽出した後、PWM を作成した（図 1.10B）。各クラス由来 PWM のキナーゼ基質予測における性能を評価するために、Receiver Operatorating Characteristic (ROC) 曲線解析を行った。テストセットとしては、公共のデータベース PhosphoSitePlus より各キナーゼの既知基質情報を200種ずつ無作為に抽出 (Positive data set) し、ヒトプロテオームから無作為に抽出したセリン周辺配列200種 (Negative data set) と合わせて用い、それらテストセットに対して、各クラス由来 PWM を用いて PWM スコアを算出した。その結果、各クラスから作成された PWM は同程度の AUC を示した（図 1.11）。この傾向はいずれのキナーゼ、細胞株間においても確認された。以上より、細胞株間での *in vitro* 基質の存在量の違いによる影響を、PWM に基づくキナーゼ基質の予測は受けないことが示された。また、この傾向は異なる *in vitro* 基質数からなるトレーニングセットを用いても確認された（図 1.11）。さらに、トレーニングセットとなる *in vitro* 基質数を増やすことで、基質予測の性能が向上するということが明らかとなった（図 1.12）。

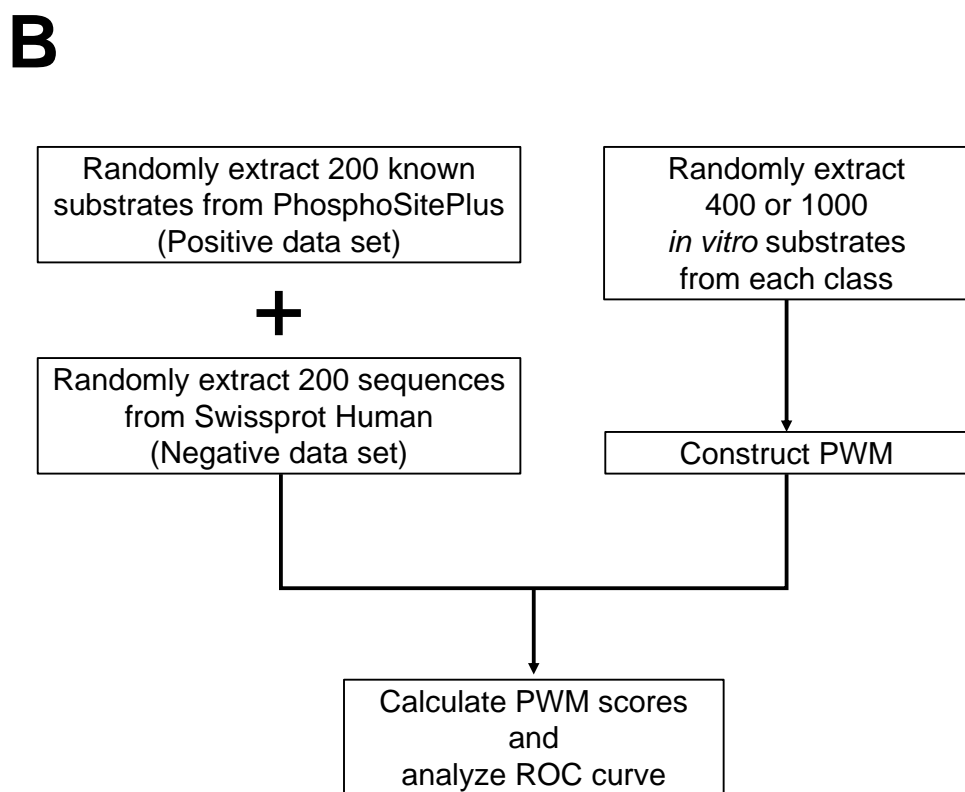
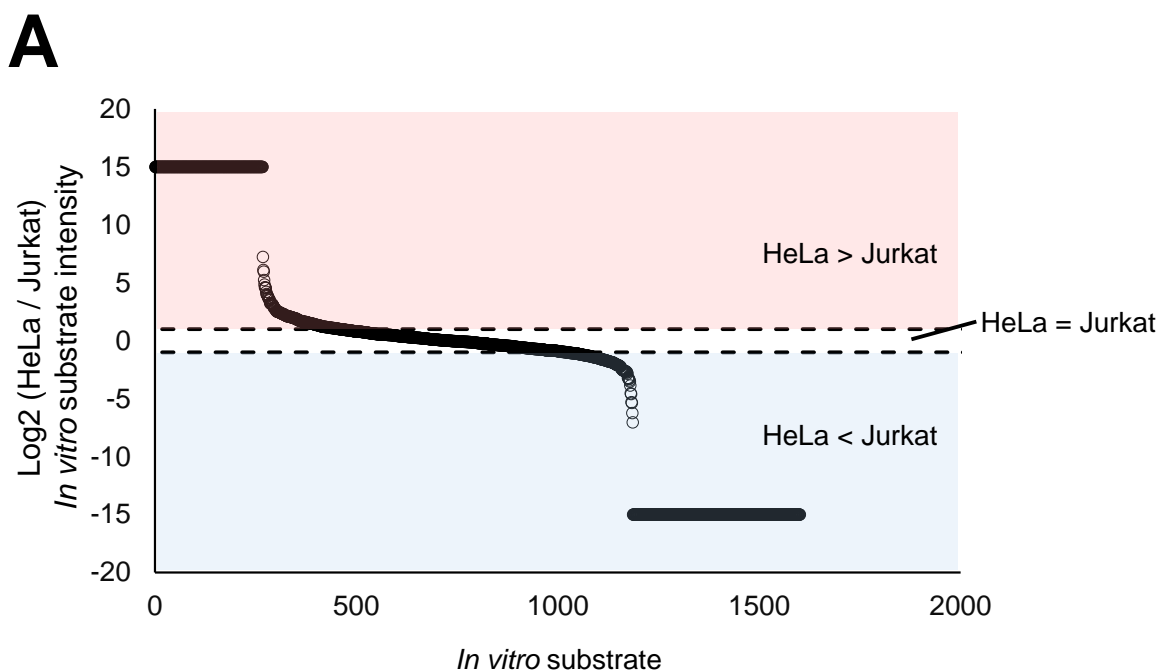


図 1.10 各細胞由来 PWM のキナーゼ基質予測精度評価

(A) *in vitro* 基質の存在量比に基づくクラス分けの一例 (B) ワークフロー

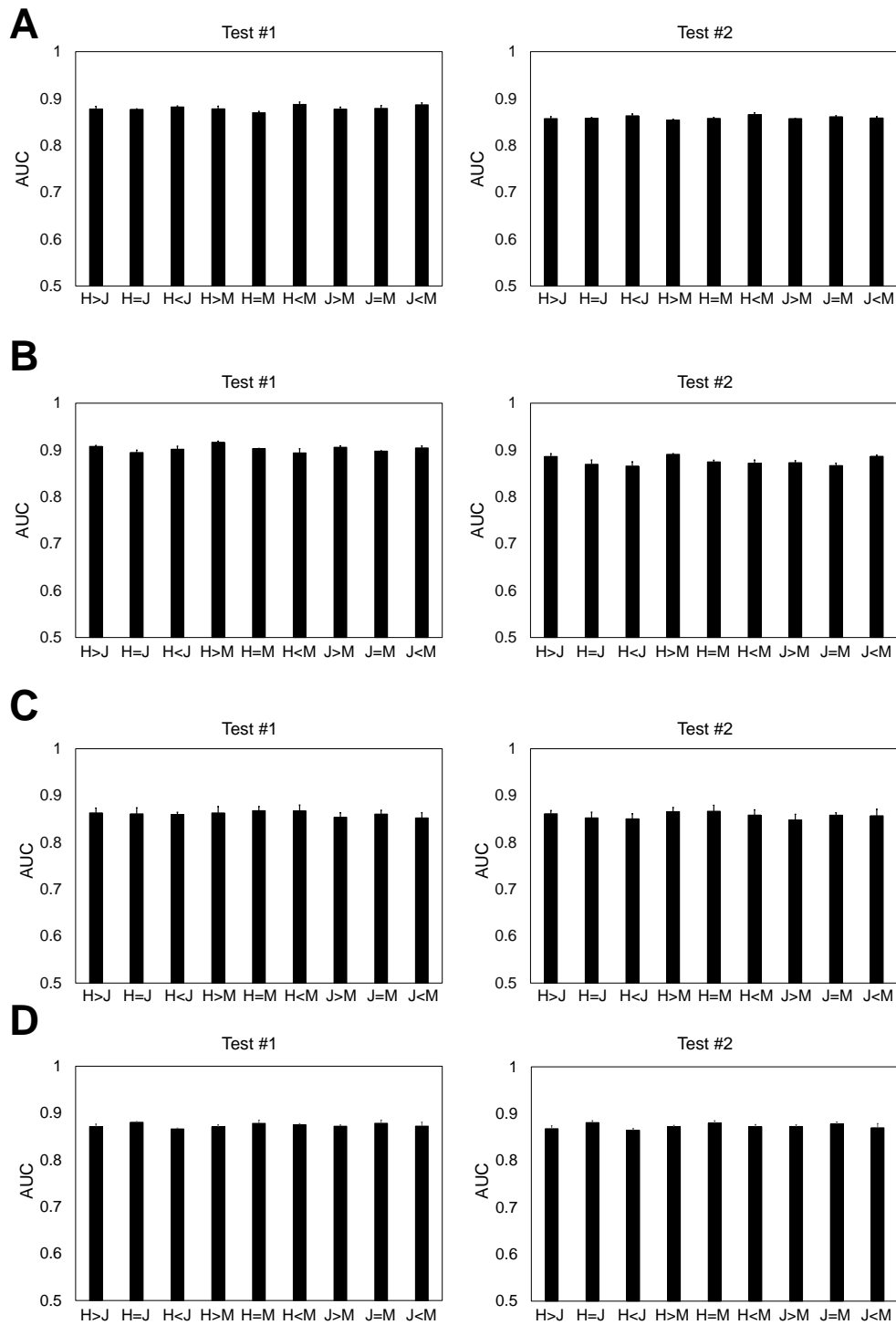


図 1.11 各細胞由来 PWM のキナーゼ基質予測における ROC 曲線解析

クラスごとのキナーゼ基質予測精度を比較した (n = 2)。HeLa を H、Jurkat を J、MCF7 を M として表記した。(A) CK2 (B) ERK1 (C) PKA (400 種の *in vitro* 基質由来) (D) PKA (1000 種の *in vitro* 基質由来)



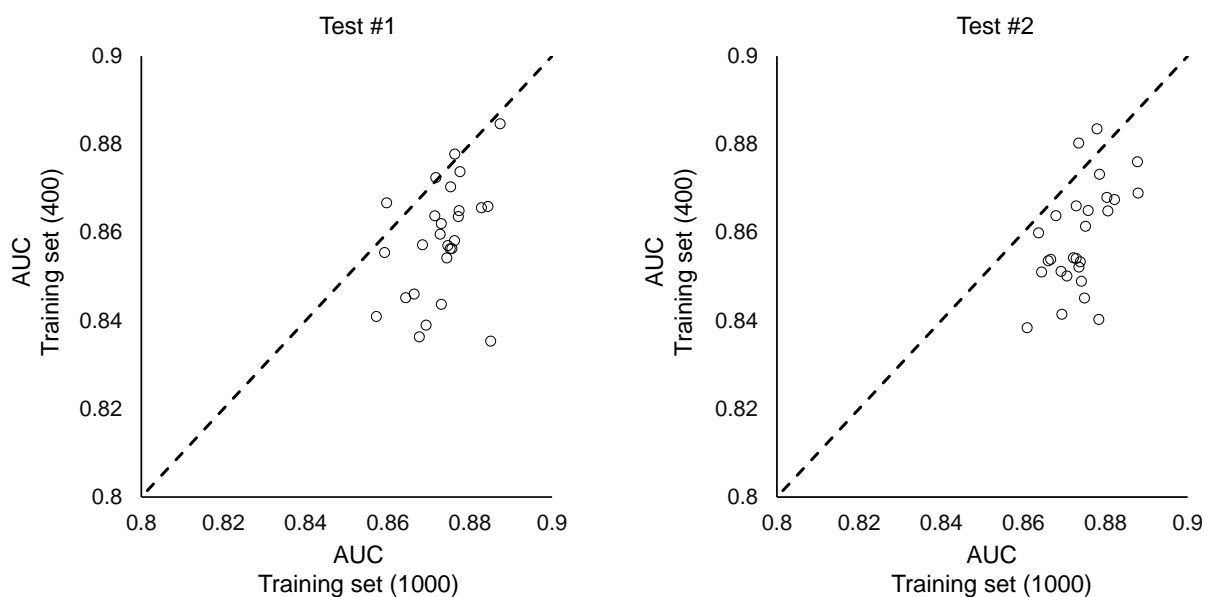


図 1.12 トレーニングセットの *in vitro* 基質数とキナーゼ基質予測

## 第五節 基質候補に対するリン酸化モチーフ解析

本節では、CK2 および PKA によって直接的に制御される部位を同定するために、第三節で同定された基質候補に対してリン酸化モチーフ解析を行った。

リン酸化モチーフ解析における基質予測精度を向上させるために、本研究および以前の研究<sup>23</sup>で HeLa 細胞抽出タンパク質を用いて同定された数千の *in vitro* 基質を基に PWM を構築し (図 1.13)、基質候補の PWM スコアを算出、CK2 および PKA のリン酸化モチーフに合致するリン酸化部位を選定した (図 1.14)。図 1.13 に示すように、一部のリン酸化部位は、BioID とキナーゼ摂動リン酸化プロテオミクスで設定した基準を満たしたにも関わらず、低い PWM スコアを示した。この結果から、リン酸化モチーフ解析がキナーゼインタラクトームとキナーゼ摂動リン酸化プロテオミクスの両方に直交性を有していることが示された。さらに、PWM のトレーニングセットとして大規模な *in vitro* 基質情報を用いたため、*in vitro* 基質の数が制限されていれば棄却されたいくつものリン酸化部位がより高い PWM スコアを示し、基質として同定された (図 1.15)。最終的に、24 種の CK2 基質と 35 種の PKA 基質が同定され (PWM スコア > 2、図 1.16、表 1.2)、CK2 については TOP2A (S1377)、PKA については FLNA (S2152) および STMN1 (S16) のような既知基質が含まれていた。このような既知の基質タンパク質は AP-MS では同定されておらず<sup>46</sup>、これら基質タンパク質が CK2 または PKA と一過性で不安定な相互作用をしていることが示唆された。なお、AP-MS において CK2 に関しては 5 つの基質タンパク質 (CDC5L, CEP170, SAP30BP, TCOF1, THRAP3) のみが相互作用タンパク質として検出され、PKA に関しては今回の基質タンパク質のいずれも相互作用タンパク質として検出されていなかった<sup>46</sup>。そのため、他の基質タンパク質は BioID によってのみ同定することができる一過性および不安定な相互作用タンパク質であることが示唆された。

続いて、同定基質群の妥当性を検証するために、GO エンリッチメント解析を行った。その結果、RNA スプライシング関連タンパク質が CK2 基質として同定されており、これは CK2 が RNA スプライシング関連キナーゼであることと一致している<sup>53</sup>。一方、細胞接着関連タンパク質が PKA 基質として同定されており、これは PKA が細胞-細胞接着経路に関与することから予想できる結果である<sup>45</sup>。以上より、本研究において同定された基質群が妥当性を有していると考えられた。

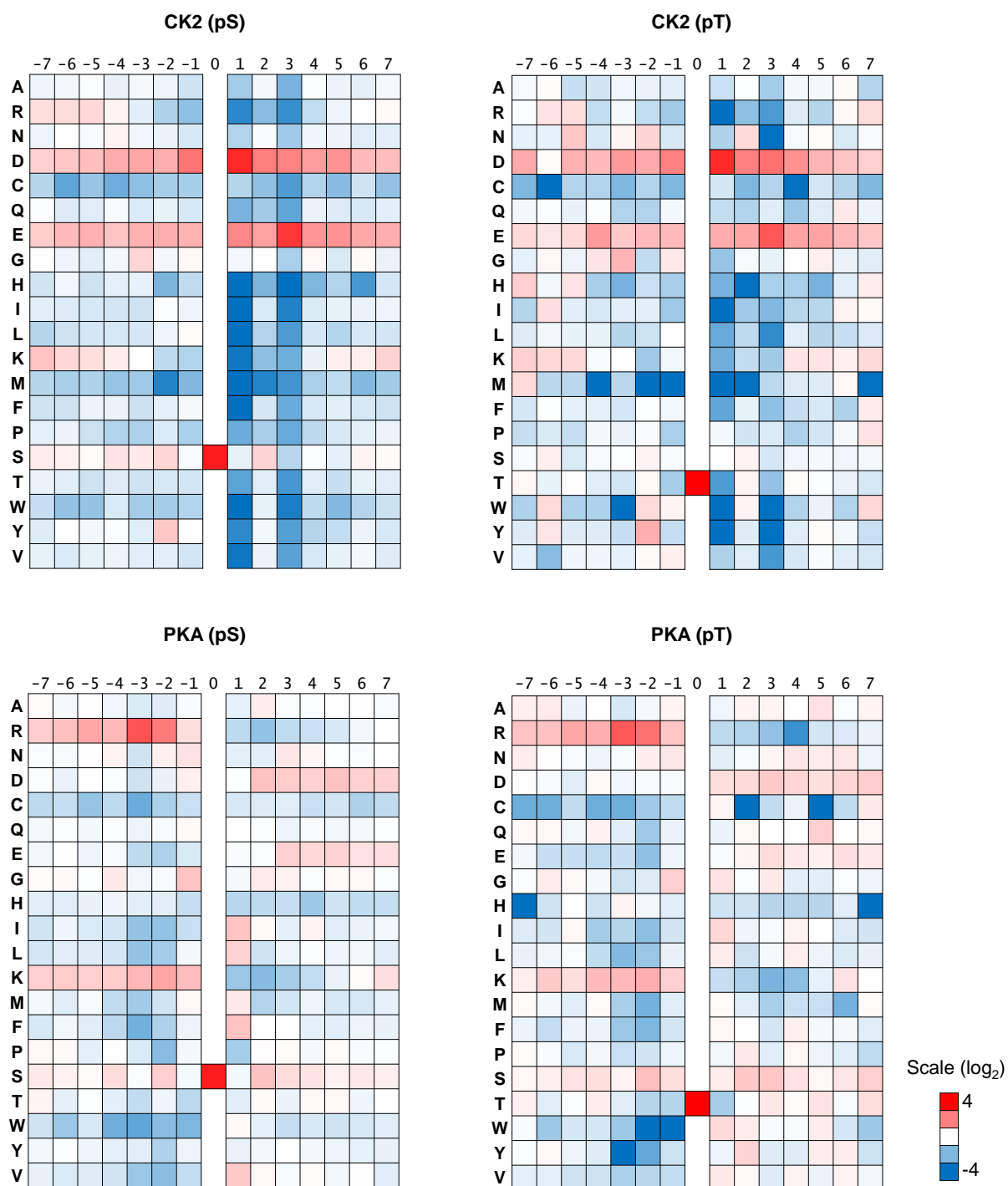
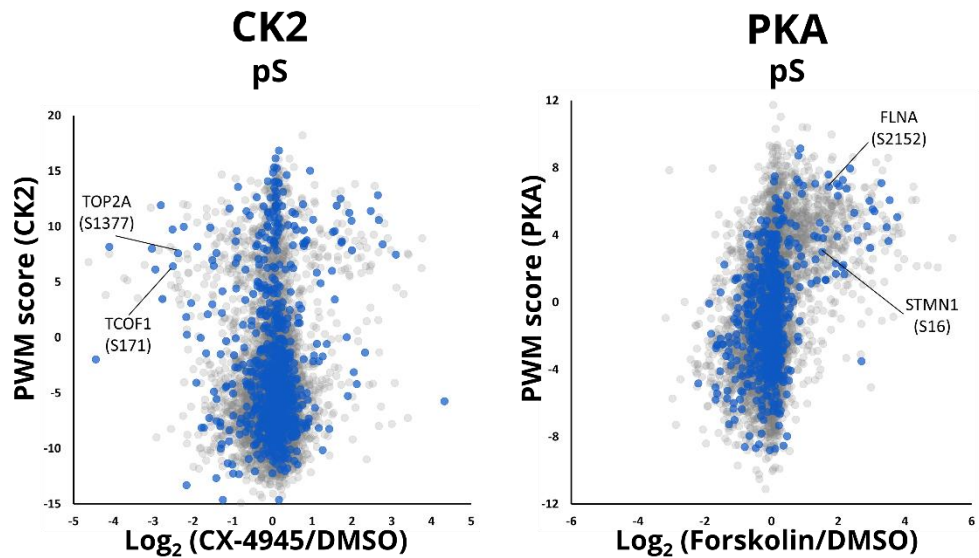
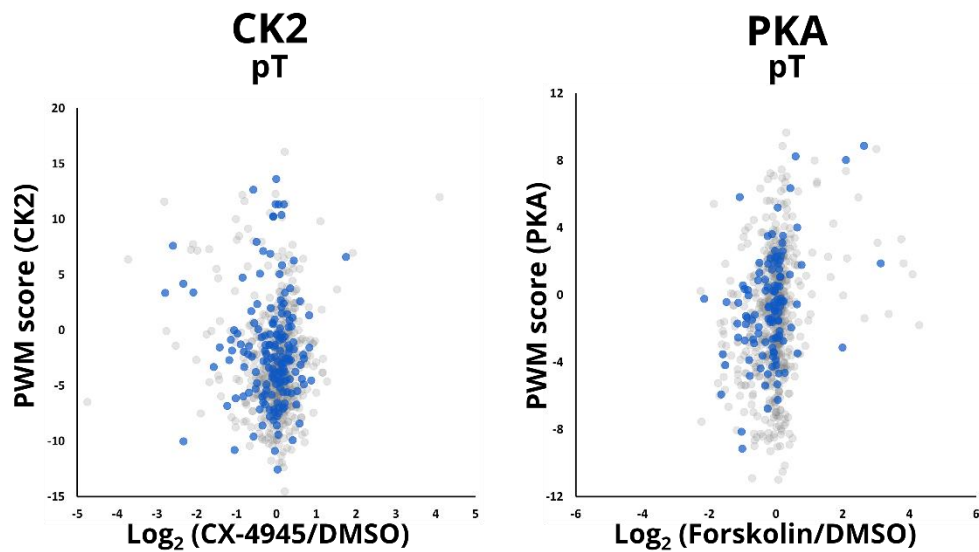


図 1.13 CK2 基質と PKA 基質の PWM

**A****B**

**図 1.14 標的キナーゼによってリン酸化される部位の同定**

阻害薬または活性化薬を処理した細胞で定量されたリン酸化部位の変動比と PWM スコアの分布である。青色は、標的キナーゼと相互作用するタンパク質上のリン酸化部位を示す。(A) pS (B) pT

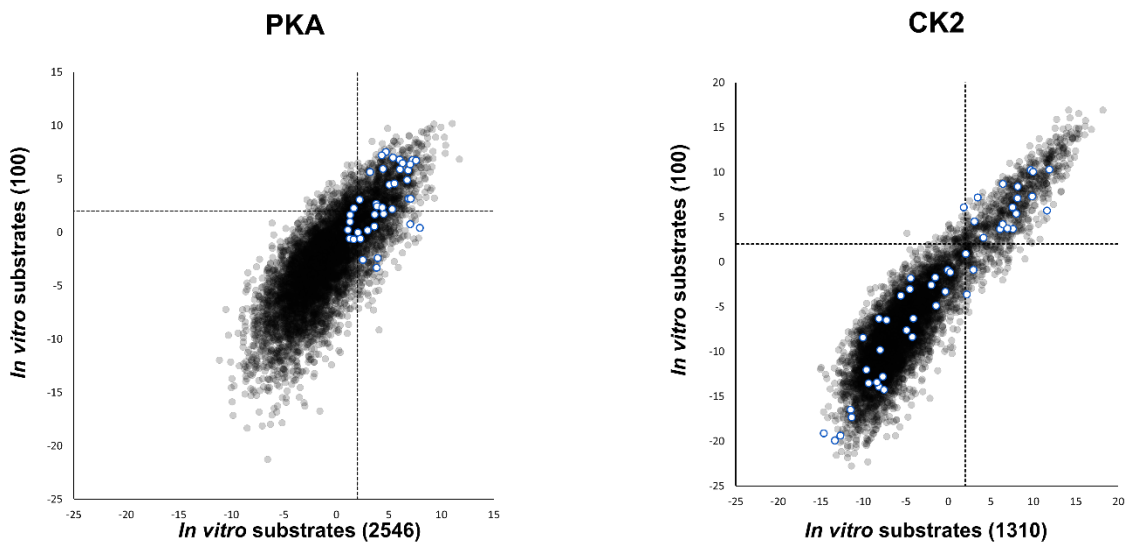


図 1.15 異なるトレーニングデータセットサイズに基づいて計算された PWM スコアの比較

青色はキナーゼインタラクトームおよびキナーゼ摂動リン酸化プロテオームにおける基準を満たしたリン酸化部位を示す。点線は今回の PWM スコアのカットオフ基準 (PWM スコア >2) を示す。x、y 軸の括弧内の数字は、トレーニングセットの基質の数を示す。

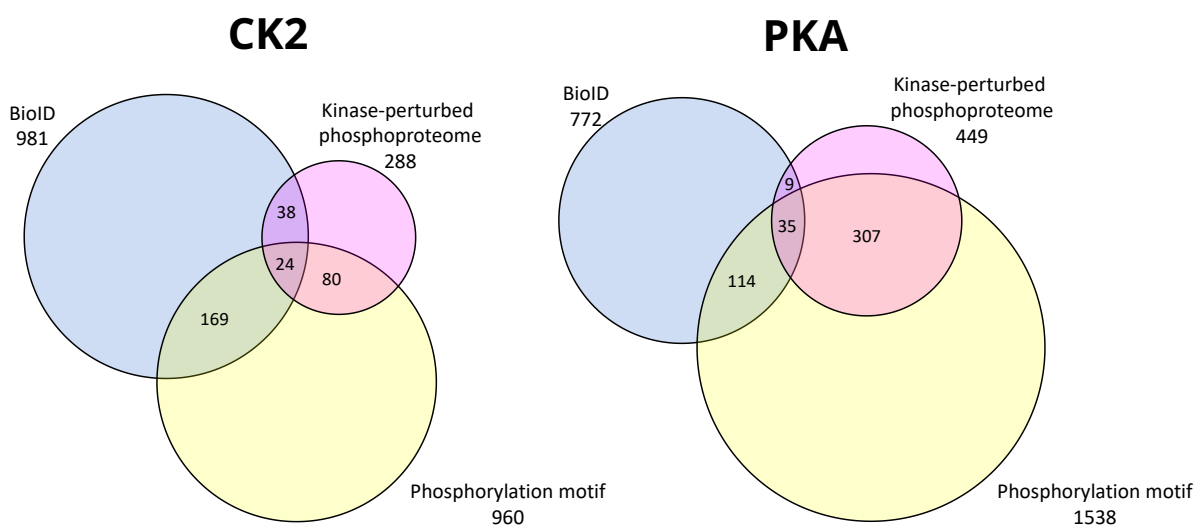


図 1.16 3つのフィルターを満たしたリン酸化部位の重なりを示すベン図

表 1.2 同定基質

CK2 同定基質

Gene name	Protein description	Sequence	P-site
ANLN	Anillin	ASNQQPLSGGEEKSC	54
CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	VLPAQISDAELQEV	303
CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	RARLGEASDSELADA	1112
EIF5B	Eukaryotic translation initiation factor 5B	KPGPNIESGNEDDDA	214
FERMT2	Fermitin family homolog 2	KKKLLDDQSEDALEL	159
NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	DIDNKEQSELDQDL	10
NUFIP2	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	EISLKNLSSDEATNP	112
PARG	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase	SKNSCQDSEADEETS	316
PPP6R3	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	QQFDDGGSDDEDIWE	617
RBM10	RNA-binding protein 10	IHRRAHLSENELEAL	797
RBM33	RNA-binding protein 33	AADEDWDSELEDDL	41
SAP30BP	SAP30-binding protein	EEKGGLVSDAYGEDD	43
SART1	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	GRGRRRVSEVEEKE	448
SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	DQLFDDESDPFVCLK	25
SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1	RSIREKQSDDEVYAP	451
TCOF1	Treacle protein	SANTTLVSETEEEGS	171
TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha	KPQKSVVSDLEADDV	1377
THRAP3	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	IKEKGSFSDTGLGDG	379
WASHC2A	WASH complex subunit 2A	EAPLLFSDEEKEA	728
WASHC2A	WASH complex subunit 2A	KTQKGLFSDEEDED	539
CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	PALGFYDTSEENYQA	227
FXR2	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	DVSTASETESEKREE	455
TCOF1	Treacle protein	NTTLVSETEEEGSVP	173
UPF3B	Regulator of nonsense transcripts 3B	KFLESYATDNEKMTS	169

## PKA 同定基質

Gene name	Protein description	Sequence	P-site
ABLIM1	Actin-binding LIM protein 1	PDMKRRSSGREEDDE	587
ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	TEDRKKASLVALPEQ	400
ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	ATTQKKPSISITTES	863
ACIN1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	QKEGRRASHTLLPSH	561
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	NLKGPRISAPNVDFN	5448
ARFGAP1	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1	TSTERRSSDSWEVWG	361
CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	KSTQKRKSFTSLYKD	958
SPECC1L	Cytospin-A	IERSRKGSSGNASEV	384
EPS15L1	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	VSLAERGSFGAMDDP	593
FLNA	Filamin-A	TRRRRAPSVANVGSH	2152
FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	GPRGGKSSISSVLKD	464
HAUS6	HAUS augmin-like complex subunit 6	SIGERKRSLSPLIKF	906
HECTD1	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1	SSRKGSSSSVCSVAS	1386
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	SYAGGRGSYDGLGGP	379
CAST	Calpastatin	DKKKEKSLTPAVPV	133
MAP4	Microtubule-associated protein 4	TGTGKCSLPAEEDS	636
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	ASQSRKRSLATMDSF	1814
NCK1	Cytoplasmic protein NCK1	GKVKRKPSPDASAP	85
PPP1R10	Serine/threonine-protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	RKGRKRKSVTWPEEG	398
PRRC2A	Protein PRRC2A	WRQRRKQSSSEISLA	456
PRDX2	Peroxiredoxin-2	ADVTRRLSEYGVLLK	112
RAPH1	Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1	HPEPKRPSVDSLVSF	996
RPAP3	RNA polymerase II-associated protein 3	GTTSKKNSSQDDLFP	480
SLK	STE20-like serine/threonine-protein kinase	IPASKRASSDLIAS	340
SNX1	Sorting nexin-1	FAVKRRFSDFLGLYE	188
RBM17	Splicing factor 45	ERERRKRSMGGAIA	169
STMN1	Stathmin	KELEKRASGQAFELI	16
STMN1	Stathmin	PPKKKDLSEELIQQK	46
TAB1	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	_MAAQRRLSLQSEQQ	7
TRIM28	Transcription intermediary factor 1-beta	MRKVPRVSLERLDDL	489
WASHC2A	WASH complex subunit 2A	PSSEHRRSHGLESVP	996
YTHDC2	3'-5' RNA helicase YTHDC2	RSNNSRKSSADTEFS	1201
YTHDC2	3'-5' RNA helicase YTHDC2	SNNSRKSSADTEFSD	1202
CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	QGERRRRTLPLPNE	644
FLNA	Filamin-A	SGDARRLTVSSSLQES	2336

Sequence : リン酸化部位を中心とした周辺配列

P-site : タンパク質 N 末端を 1 とした際の基質部位の位置

## 第六節 CK2 と PKA 基質リン酸化部位周辺におけるミスセンス変異

基質周辺のアミノ酸置換がキナーゼと基質の関係に影響を与えうることは知られている<sup>54,55</sup>。本節では、同定した CK2 および PKA の推定直接基質について、がんにおけるキナーゼと基質の関係を評価した<sup>56,57</sup>。前節で同定した基質リン酸化部位を中心として 7 残基以内に生じるアミノ酸配列変異情報を、がんゲノムデータベース cBioPortal<sup>58,59</sup> から抽出した (図 1.17A)。その結果、24 種の CK2 基質から 80 種のミスセンス変異、35 種の PKA 基質から 139 種のミスセンス変異が抽出された。これらの変異を含む基質配列について、PWM スコアからキナーゼによるリン酸化指向性を予測し、野生型配列と比較した (図 1.17B)。それらの中から、CK2 基質である PP6R3 について、変異によってリン酸化が減少する可能性がある、あるいは変化がないものを選び、合成ペプチド基質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行った (図 1.17C)。その結果、活性が低下すると予測される変異ペプチド基質ではリン酸化率低下がみられたが、活性が変化しないと予測される変異ペプチド基質ではリン酸化率に変化がなかった。以上より、本研究において同定した基質の中に、がんにおいて、CK2 や PKA によるリン酸化反応に影響を与える変異を周辺に有するものが含まれることが示された。これらの変異を持つがん細胞では下流のシグナル伝達ネットワークに影響を与えることが予想されるため、その際に本研究による同定基質情報は重要となると考えられる。



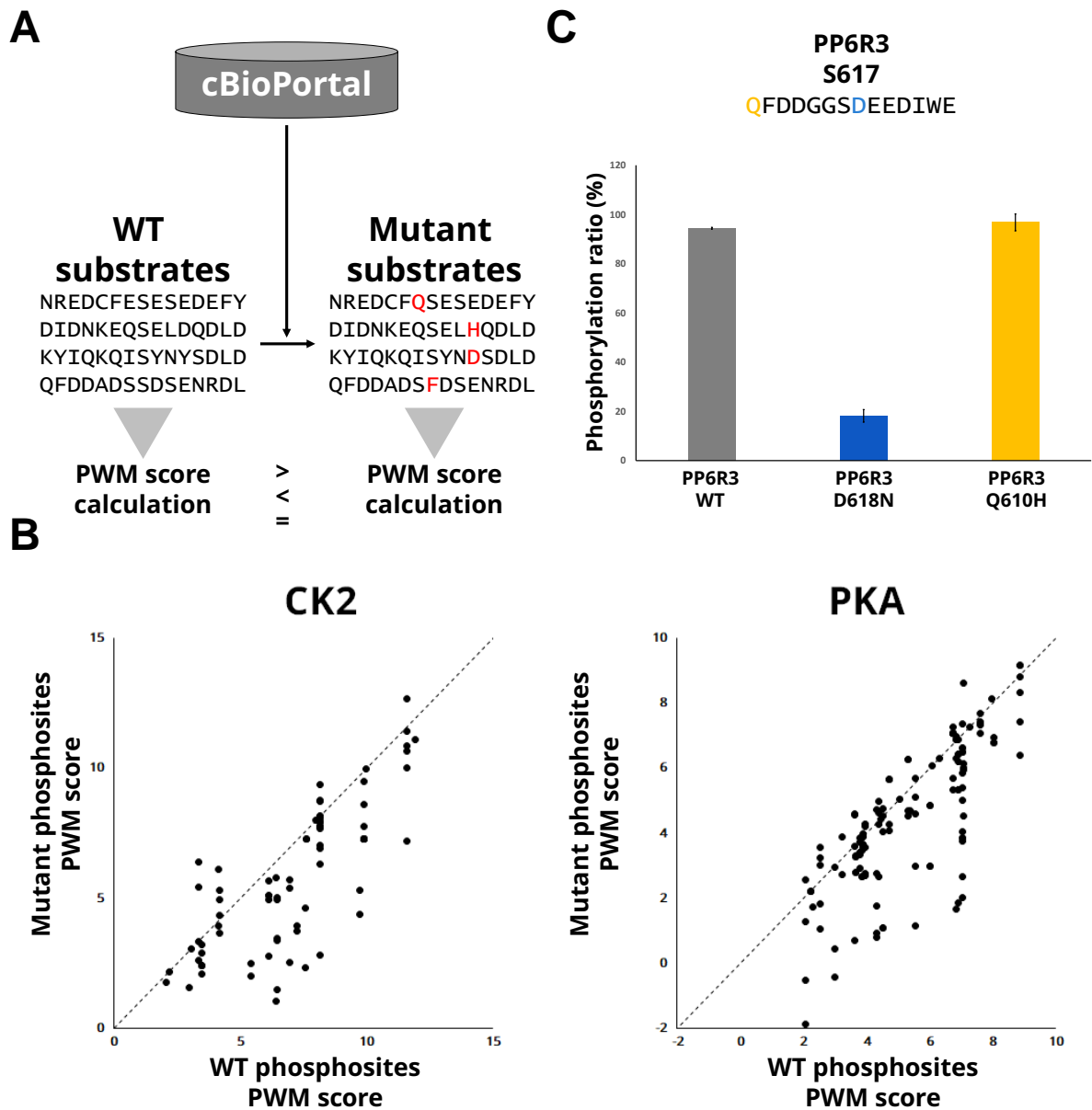


図 1.17 基質周辺のアミノ酸置換がキナーゼと基質の関係に与える影響

(A) 基質のアミノ酸置換の影響を評価するためのワークフロー

(B) 野生型と変異型配列の PWM スコアの比較。

(C) PP6R3 (S617)

## 第七節 結語

本章では、内在性キナーゼ基質を同定するための汎用的なワークフローの確立するために、近接依存性ビオチン標識、キナーゼ摂動リン酸化プロテオミクスおよびリン酸化モチーフ解析の3つのアプローチを組み合わせた手法を検討した。本アプローチは、近接依存性ビオチン標識により得られたキナーゼインタラクトームから、基質と非基質近傍タンパク質を識別し、既知基質だけでなく新規基質をも同定することができた。本研究はこのアプローチを用いてキナーゼ基質同定を行った初めての例である。

さらに、今回のアプローチには多くの利点がある。まず、BioIDは従来のAP-MSでは見つけることができなかつた一過性の不安定な相互作用タンパク質を同定することが可能である。第二に、リン酸化モチーフ解析は、*in vitro* キナーゼアッセイで得られた基質自体に対してではなく、リン酸化モチーフに対して一致度を評価するため、あらゆる配列に適用することが可能である。また、本章で用いたアプローチは、あらゆるキナーゼへの汎用性があると考えられる。

本研究ではBioIDを用いて、AP-MS<sup>46</sup>では検出されなかつた新しい相互作用タンパク質候補を同定し、それらの新しい相互作用タンパク質候補から、17種の新規CK2基質と35種の新規PKA基質を同定した。一般に、基質はキナーゼによりリン酸化された後、キナーゼとすぐに解離するため、AP-MSでは基質タンパク質を捉えることができない<sup>35,60</sup>。そこで、内在性キナーゼの基質を同定するためには、近接依存性標識が最適なアプローチであると考えられた。BIOGRIDのような公共のPPIデータベースは、有用な情報源となりうるが<sup>60</sup>、BIOGRIDのデータはAP-MSや酵母ツーハイブリッド法などの従来法で得られたものであり、キナーゼインタラクトームの情報源としては乏しいと考えられる。

近接依存性ビオチン標識法には、APEXやTurboIDなど様々なものがある<sup>61</sup>。APEXは標識時間が短く、数分単位でのインタラクトームの継時変化を捉えることが可能である点では強力だが、細胞毒性のあるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を使用する必要がある。TurboIDはAPEXには劣るが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を使用せず、BioIDよりも標識時間が短いため、本研究の目的により適していると考えられる。また、BioIDの実験において、どのようなコントロール試料を使用すべきかについて、多くの議論がなされている<sup>61</sup>。本研究では、2種類のコントロール試料を用意し、比較した。その結果、BirA\*-GFPコントロールでは既知の相互作用タンパク質を同定できず、No BirA\*コントロールでは非基質近傍のタンパク質が多くなることが明らかとなった。そのため、キナーゼインタラクトームと直交性を有する追加のフィルターが必要となるが、本研究ではキナーゼ摂動リ

ン酸化プロテオーム解析とリン酸化モチーフ解析が、キナーゼインタラクトーム解析における非基質近傍タンパク質を減らすために有効であることを見出した。

本研究では、特異性の高いキナーゼ阻害薬または活性化薬を用いて、キナーゼ摂動リン酸化プロテオームプロファイルを取得した<sup>62,63</sup>。特異的阻害薬や活性化薬がないキナーゼの場合、標的キナーゼの遺伝子をノックダウン、ノックアウトや過剰発現させることも選択肢となるが、これらの方法は標的キナーゼの発現量だけでなく、細胞全体の発現タンパク質プロファイルを変化させることに留意しておく必要がある<sup>28</sup>。

リン酸化モチーフの解析は、本研究の戦略において重要なステップである。PWMのトレーニングセットとなる *in vitro* 基質を得るための細胞種の違いは、PWMによるキナーゼ基質予測に影響を与えないということが示された。また、PWMスコアはトレーニングセットとなる *in vitro* 基質数に依存し、*in vitro* 基質数が少ない場合、キナーゼ基質予測の性能が低下した。

今回同定された基質を、公共データベースである PhosphoSitePlus<sup>10</sup> の既知基質と比較した。その結果、PhosphoSitePlus と本研究の両方に含まれる基質は3つのみであった。既知基質の多くは、BioID 実験やキナーゼ摂動リン酸化プロテオミクスにおいて定量されていなかった。これは、LC/MS/MS でのランダムサンプリングや HEK293T 細胞において発現量が少ないことが原因であると考えられる。また、PhosphoSitePlus に登録されているキナーゼと基質の関係は、本研究のような複数のフィルターを通して同定されてきたものだけではなく、必ずしも生理的条件下で成立するものとは限らないため、重なりが限られたのではないかと考えられる。

キナーゼ基質情報は、細胞内リン酸化ネットワークを理解する上で不可欠である。本章では、同定基質群に関して、発がん性変異がリン酸化シグナルに影響を与えうることを示し、キナーゼ基質情報の重要性を示した。しかし生理的なキナーゼ基質をハイスループットに同定する方法はまだないため、本手法は内在性キナーゼ基質の大規模探索に有用であり、その問題を克服するための一歩になると期待される。



## 第二章

# 非加水分解性リン酸化チロシンミミック体を用いた チロシンホスファターゼ濃縮に関する研究

### 第一節 序

チロシンリン酸化は細胞内においてプロテインチロシンホスファターゼ (PTP) とプロテインチロシンキナーゼによって厳密に制御され、がんを含む様々な疾患と密接にかかわっている<sup>64,65</sup>。PTP はヒトにおいて 100 種以上存在するとされ、その中で活性中心に触媒となるシステイン残基を有するクラス 1 の PTP が最も大きなグループを構成している<sup>66</sup>。また、このクラス 1 の PTP は、チロシンだけでなくセリンスレオニンも基質とする 63 種の dual-specificity PTP (DUSP) と 37 種のチロシン特異的な classical PTP に大別される。さらに classical PTP は 20 種の受容体型 PTP と 17 種の非膜貫通型 PTP に分けられる。

酵素の発現量・活性状態を包括的にプロファイリングするための手法は重要であり、これまでにキナーゼやセリンスレオニンホスファターゼの包括的濃縮法が開発されてきた<sup>6,67</sup>。キナーゼの包括的解析では、汎キナーゼ阻害薬固定化樹脂をプローブとして用いた濃縮法 (Kinobeads) が知られている<sup>6</sup>。この手法はキナーゼ活性に依存してキナーゼを濃縮するため、本手法を用いて Klaeger らは 200 種以上のキナーゼを定量し、臨床で利用されているキナーゼ阻害薬の標的探索を行った<sup>62</sup>。また、Lyons らは、汎セリンスレオニンホスファターゼ阻害薬であるマイクロシチン LR を固定化した樹脂を用いて、セリンスレオニンホスファターゼ濃縮法を開発した<sup>67</sup>。PTP に関しては、Karisch らは活性部位中の高度に保存された配列に対する抗体を用いて、酵素消化後の PTP のペプチド断片を濃縮する手法を開発した<sup>68</sup>。しかし、この手法では酸化型の PTP のみを認識可能であるという制限や、エピトープの保存性が低い PTP の濃縮に関する課題がある。また、タンパク質レベルで濃縮する際には PTP を変性する必要がある。

PTP に結合するプローブは、いくつか開発されている。Kumar らは  $\alpha$ -Bromobenzylphosphonate (BBP) プローブ、Liu らは phenyl vinyl sulfonate (PVSN) と phenyl vinyl sulfone (PVS) プローブを作製し、PTP に不可逆的に結合することを示している<sup>69,70</sup>。また、Kalesh らは非天然アミノ酸 2-FMPT を含むペプチド型プロ

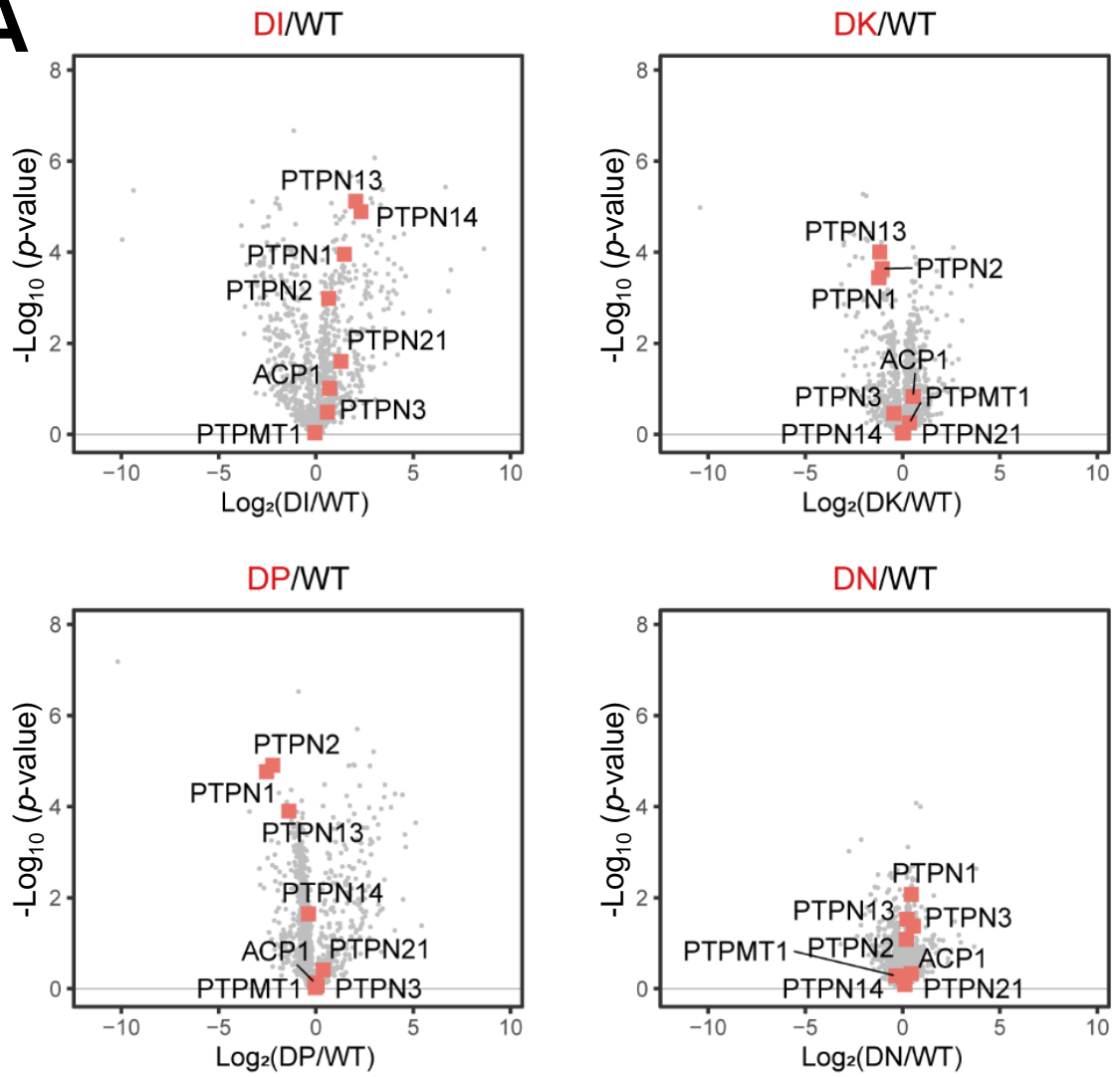
ープを作製し、プローブが PTP にプローブ配列依存的かつ活性依存的に結合することを示した<sup>71</sup>。しかし、これらの報告ではプローブが一部の組換え PTP や細胞抽出物中の内在性 PTP に結合することが示されているものの、細胞抽出物から内在性 PTP を濃縮可能であるかどうかについては示されていない。また、これらのプローブにはオフターゲット (PTP 以外の結合したタンパク質) が存在するが、それらについても十分な考察がされていない<sup>72</sup>。

本研究では、非加水分解性リン酸化チロシンアナログ体である F<sub>2</sub>Pmp に着目した。F<sub>2</sub>Pmp を含むペプチドは PTP に対して高い親和性を示し、生細胞や細胞抽出物中の PTP を検出するために利用されてきた<sup>73-75</sup>。著者の所属する研究グループは最近 F<sub>2</sub>Pmp を用いたタンパク質レベルでの PTP 濃縮法を開発し、PTPN1、PTPN2、PTPN13、さらには SH2 ドメイン含有タンパク質 (RASA1, PIK3R1, PIK3R2) を F<sub>2</sub>Pmp 依存的に濃縮することに成功した<sup>76</sup>。この手法では、F<sub>2</sub>Pmp がリン酸化チロシンと異なり、ホスファターゼによる脱リン酸化を受けないため、細胞抽出物からの内在性 PTP 濃縮が可能であることが示された。

本研究では、ホスファターゼの包括的濃縮法の開発を目指し、系統的なプローブ配列のデザインおよびプローブ配列と濃縮される PTP の相関に関して、より詳細な検討を行った。さらに、F<sub>2</sub>Pmp プローブによる濃縮と、試料の種類や PTP 活性との相関に関して評価した。

## 第二節 1 アミノ酸置換による PTP 濃縮への影響に関する評価

著者の所属する研究グループの先行研究では、EGDND- F<sub>2</sub>Pmp -IIPLP プローブ (PDGFRB プローブ) により、PTPN1、PTPN2 が選択的に濃縮された<sup>76</sup>。本研究では、ペプチドプローブのアミノ酸配列が、PTP に対する濃縮選択性にどのような影響を与えるのかを調べるため、PDGFRB プローブの F<sub>2</sub>Pmp の-1 の位置のアミノ酸を置換したペプチドプローブを 4 種合成した。また、SGSG ペプチドをリンカーとした先行研究に対し、今回はより親水性の高い PEG2 リンカーを採用し、N 末端にビオチンを結合させた。合成した F<sub>2</sub>Pmp プローブをストレプトアビジン樹脂に固定化し、HEK293T 細胞抽出物とインキュベートした。樹脂洗浄の後、プローブに結合したタンパク質を溶出し、消化した後、LC/MS/MS 測定に供した。SGSG リンカープローブを用いた以前の結果と比較すると、PEG2 リンカーを用いることにより、非膜貫通型 PTP (PTPN3, PTPN13, PTPN14, PTPN21) や、PTPMT1、LMWPTP を検出することに成功した。また、F<sub>2</sub>Pmp の-1 の位置の D を I に置換すると、いくつかの PTP とプローブの相互作用が顕著に増加した (図 2.1A)。一方、D を K または P に置換すると、いくつかの PTP はプローブとの相互作用が著しく減少し、N に置換しても濃縮される PTP に大きな影響はなかった (図 2.1A)。これらの結果は、プローブ配列のわずかな違いが PTP に対する選択性を決定的に変えていることを示している。同様の結果は、SH2 ドメイン含有タンパク質でも観察された (図 2.1B)。

**A**



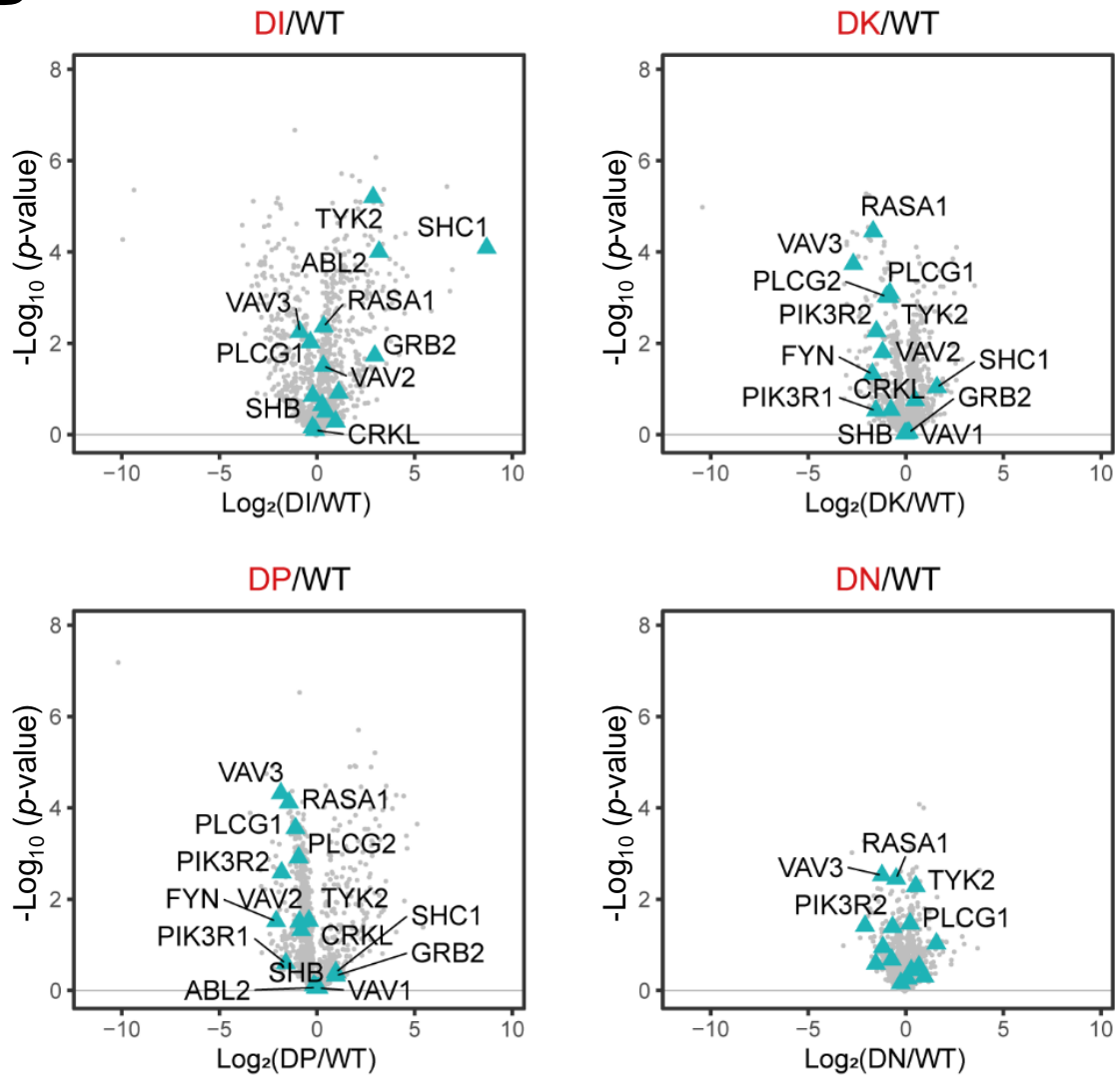
**B**

図 2.1 1 アミノ酸置換による PTP および SH2 ドメイン含有タンパク質濃縮の変化

x 軸は、アミノ酸置換での濃縮比の変動を示す。y 軸は、アミノ酸置換での濃縮比の変動の  $p$ -value を示す。(A) PTP は赤い点で示す。(B) SH2 ドメイン含有タンパク質は青い点で示す。

### 第三節 F<sub>2</sub>Pmp プローブと組換え PTP 間の解離定数の測定

前節の結果を受けて、より多様なプローブ配列と PTP の関係性を調べるために、表 2.1 に示す 17 種のペプチド型 F<sub>2</sub>Pmp プローブを合成した (N 末に PEG2 リンカーを介してビオチンを結合させた)。17 種のうち、10 種はヒト細胞内に存在する pY 部位である。4 種は PDGFRB Y1021 の-1 のポジションのアミノ酸を置換したものである。また、DIDOI (Y1016) は多くの PTP と結合するとの報告があり、選定した<sup>77</sup>。他には F<sub>2</sub>Pmp のみからなるプローブ、または F<sub>2</sub>Pmp を含み 3 残基からなるプローブを合成した。これらのプローブ配列は、PhosphoSitePlus に登録されている pY 部位周辺の特異的モチーフ上位 10 のうち 8 つを含んでおり、さらにこれら 8 つのモチーフを持つ pY 部位は、PhosphoSitePlus に登録された全 pY 部位の約半分であった (表 2.2、図 2.2)<sup>10</sup>。

表 2.1 本研究で使した F<sub>2</sub>Pmp プローブ

Name	Sequence	Reference
P1	F <sub>2</sub> Pmp	
P2	D-F <sub>2</sub> Pmp-I	
P3	GSAAP- F <sub>2</sub> Pmp -LKTKF	STAT3 (Y705)
P4	GFKRS- F <sub>2</sub> Pmp -EEHIP	INSR (Y1355)
P5	GFLTE- F <sub>2</sub> Pmp -VATRW	MAPK1 (Y187)
P6	KQKPK- F <sub>2</sub> Pmp -QVRWK	CSF1R (Y546)
P7	VSFNP- F <sub>2</sub> Pmp -EPELA	SYK (Y323)
P8	HVKDL- F <sub>2</sub> Pmp -LIPLS	DIDO1 (Y1160)
P9	VDADE- F <sub>2</sub> Pmp -LIPQQ	EGFR (Y1016)
P10	FDNLY- F <sub>2</sub> Pmp -WDQDP	ERBB2 (Y1222)
P11	IEDNE- F <sub>2</sub> Pmp -TAREG	SRC (Y419)
P12	STEPQ- F <sub>2</sub> Pmp -QPGEN	SRC (Y530)
P13	EGDND- F <sub>2</sub> Pmp -IIPLP	PDGFRB (Y1021)
P14	EGDNK- F <sub>2</sub> Pmp -IIPLP	PDGFRB (Y1021)_D1020K
P15	EGDNN- F <sub>2</sub> Pmp -IIPLP	PDGFRB (Y1021)_D1020N
P16	EGDNP- F <sub>2</sub> Pmp -IIPLP	PDGFRB (Y1021)_D1020P
P17	EGDNI- F <sub>2</sub> Pmp -IIPLP	PDGFRB (Y1021)_D1020I

表 2.2 PhosphoSitePlus に登録されている pY 部位周辺の特異的なモチーフ

	motif	fold.increase
1	.... <b>E</b> .. <b>Y</b> .....	1.25
2	..... <b>YE</b> .....	1.35
3	..... <b>DY</b> .....	1.48
4	..... <b>EY</b> .....	1.32
5	..... <b>KY</b> .....	1.22
6	..... <b>Y</b> ... <b>K</b> ...	1.36
7	.... <b>K</b> .. <b>Y</b> .....	1.35
8	.... <b>R</b> .. <b>Y</b> .....	1.28
9	.... <b>D</b> .. <b>Y</b> .....	1.39
10	.... <b>S</b> .. <b>Y</b> .....	1.20
11	..... <b>Y</b> .... <b>K</b> ..	1.41
12	..... <b>RY</b> .....	1.27
13	..... <b>Y</b> .... <b>R</b> ..	1.37
14	.... <b>G</b> .. <b>Y</b> .....	1.18

本研究で使用したプローブ中に含まれているモチーフは青字で示す。

fold. increase : Background データに対する Foreground データにおけるモチーフ含有率の増倍比

pY sequence in PhosphoSite Plus (36820)

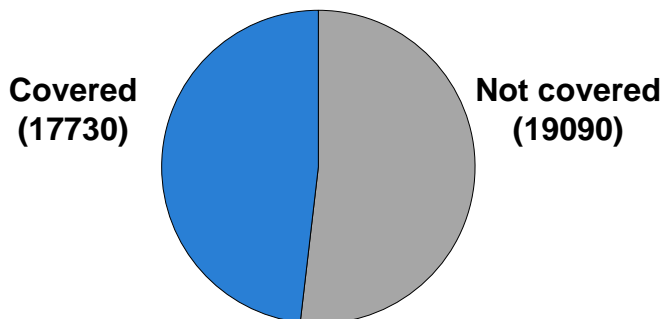


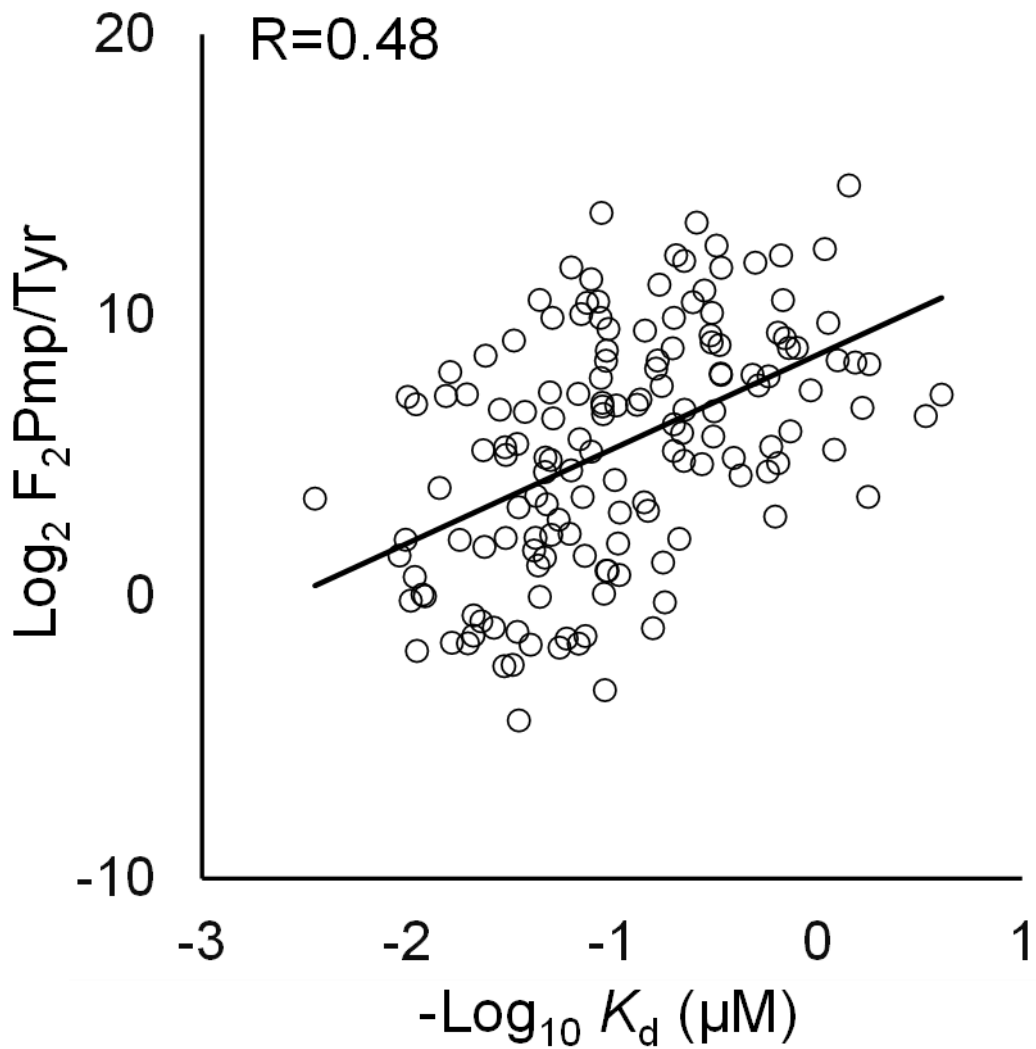
図 2.2 PhosphoSitePlus に登録される全 pY 部位における、表 2.2 で青字で示したモチーフを有する pY 部位の割合

F<sub>2</sub>Pmp ペプチドプローブと PTP 間の結合をより定量的に評価するために、Sharma らが開発した手法を用いて F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP 間の解離定数  $K_d$  を測定した<sup>78</sup>。すなわち、F<sub>2</sub>Pmp プローブをストレプトアビジン樹脂に固定した後、組換え PTP11 種混合物 (classical PTP10 種、DUSP1 種) を加えインキュベートした。一回目のインキュベート後、上清画分を新たな F<sub>2</sub>Pmp プローブ固定化樹脂と再度インキュベートし、二回のプルダウンにおける結合 PTP 量の変化から F<sub>2</sub>Pmp ペプチドプローブ・PTP 複合体の  $K_d$  を算出した。その結果、F<sub>2</sub>Pmp ペプチドプローブ・PTPN1 複合体の  $K_d$  値は数百 nM ~ 数  $\mu$ M であった。この結果は既報の PTPN1 と F<sub>2</sub>Pmp プローブとの解離定数とも一致している<sup>79</sup>。また、チロシンプローブをコントロールとして用いたプルダウンの結果と比較すると、 $K_d$  の逆対数と F<sub>2</sub>Pmp / Y 比の対数の間には正の相関が観測され、F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP の結合が F<sub>2</sub>Pmp 依存的であることが示された (図 2.3)。

多くの PTP はプローブ配列によって大きく異なる  $K_d$  値を示した。例えば、**P9**、**P10**、**P17** に対して多くの PTP は  $K_d$  値 10  $\mu$ M 以下の結合強度を示す一方で、**P4** や **P3** に対してはあまり強い結合を示さなかった (図 2.4A)。また、第二節の細胞抽出物を用いたプルダウンと同様に、多くの PTP は **P17** の 1 アミノ酸置換したプローブである **P13**~**P16** と比較して、**P17** により強く結合した。さらに、いずれの PTP も F<sub>2</sub>Pmp 単体 (**P1**) に対しては結合せず、**P2** に対しては弱い結合を示した。

各 F<sub>2</sub>Pmp プローブの PTP への結合選択性を評価した。その結果、多くの F<sub>2</sub>Pmp プローブが PTPN1、PTPN2、PTPN7 および PTPN13 に対して選択的に結合することが示された (図 2.4B)。一方で、他の PTP への選択性は F<sub>2</sub>Pmp プローブ間で違いが見られ、**P3** は PTPN4 を好む傾向が見られた。また **P17** は、その 1 アミノ酸置換体である **P13**、**P14**、**P15**、**P16** と異なり、PTPRG への選択性が非常に強かった。さらに、**P14** は他の 1 アミノ酸置換したプローブ 4 種と比較して、DUSP3 に対して強い選択性を示した。これらは、F<sub>2</sub>Pmp プローブの PTP への選択性が 1 アミノ酸レベルで影響を受けるということを示している。また、クラスター解析においても、1 アミノ酸置換の F<sub>2</sub>Pmp プローブ同士が近くに分類されず、1 アミノ酸の違いが PTP との結合選択性に大きな変化を及ぼすことが示された。

DUSP3 は classical PTP と大きく異なるプローブ配列選択性を示していた。これは、classical PTP と DUSP に対する F<sub>2</sub>Pmp プローブの結合選択性の違いを示している可能性が考えられる。



**図 2.3 PTP と F<sub>2</sub>Pmp プローブ間の結合強度と濃縮率の比較**

x 軸は、各 F<sub>2</sub>Pmp プローブ・PTP 複合体間の解離定数 ( $-\log_{10}$ ) を示す。y 軸は、各プローブによるプルダウンにより同定されたタンパク質の濃縮率 (F<sub>2</sub>Pmp プローブ / Y プローブ) を  $\log_2$  スケールで示す。グラフ中の相関係数はピアソン相関係数により算出した。

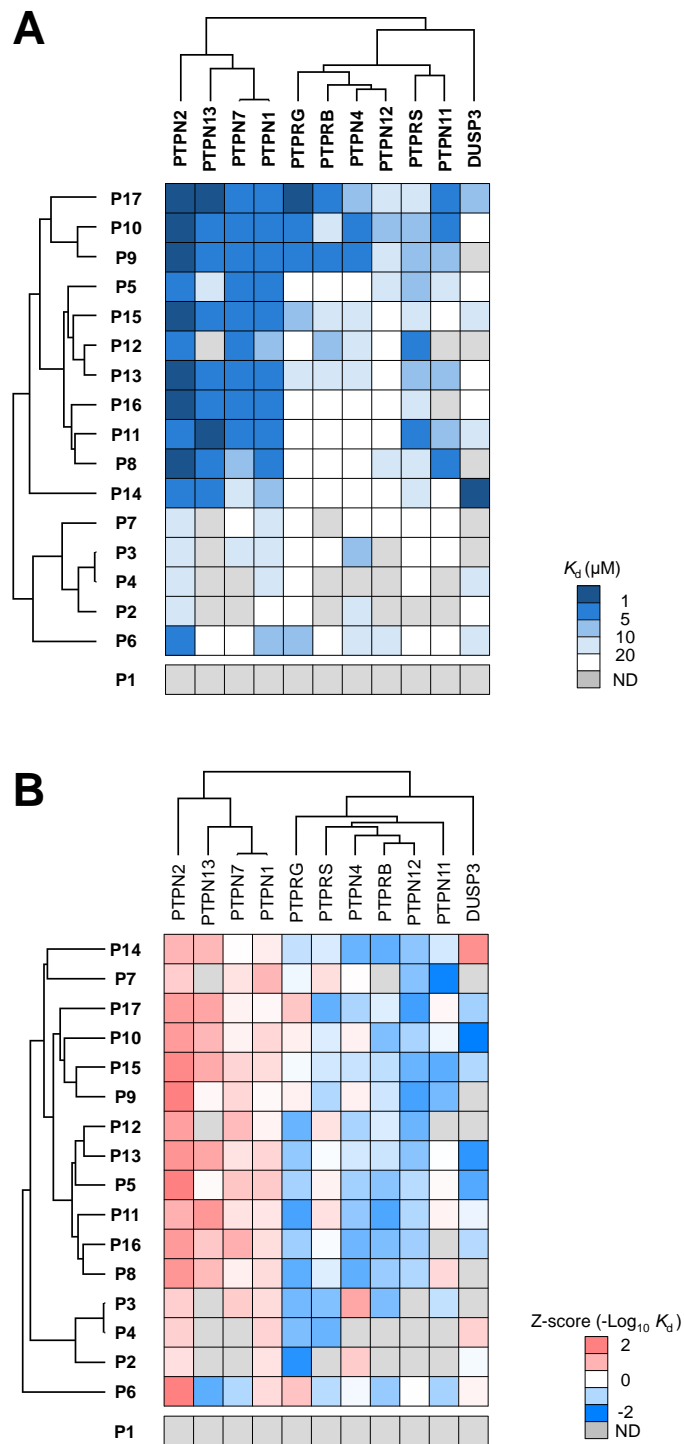


図 2.4 F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP 間の結合強度および結合選択性

(A) 全 16 種の F<sub>2</sub>Pmp プローブと全 11 種の PTP 間の解離定数をヒートマップで示す。PTP と F<sub>2</sub>Pmp プローブは解離定数に基づいてクラスタリングされた。

(B) A における解離定数 ( $-\log_{10}$ ) を各 F<sub>2</sub>Pmp プローブごとに正規化した値 (結合選択性) をヒートマップで示す。PTP と F<sub>2</sub>Pmp プローブは結合選択性に基づいてクラスタリングされた。

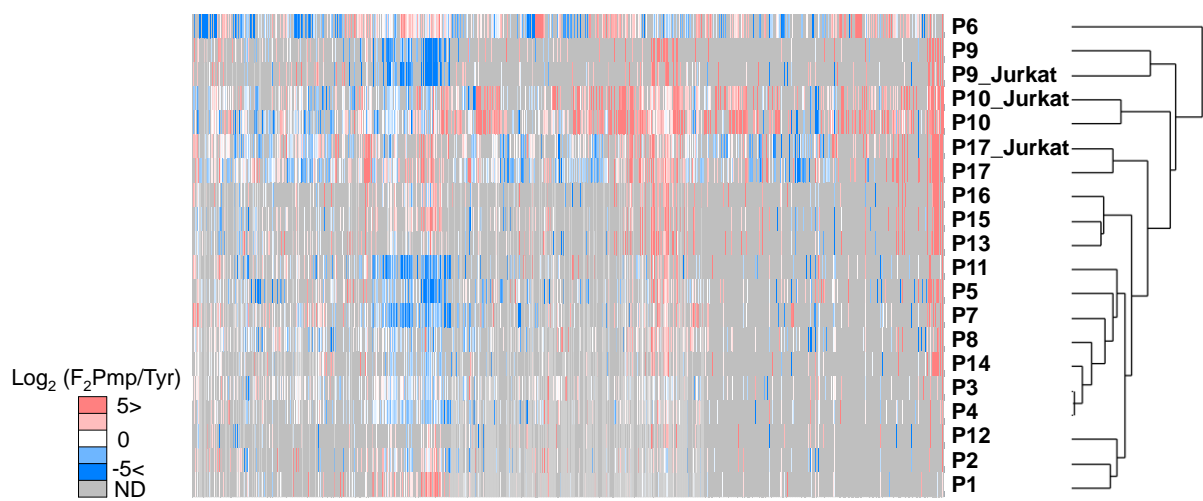
## 第四節 細胞抽出物に対する F<sub>2</sub>Pmp プローブのプルダウンに関する大規模研究

第三節では F<sub>2</sub>Pmp プローブが多くの PTP に  $K_d$  値数百 nM ~ 数  $\mu$ M の結合強度でプローブ配列依存的に結合することを確認した。本節では、内在性 PTP が細胞抽出物からもプローブ配列依存的に濃縮されるかについて評価した。N 末端に PEG2 リンカーを介したビオチンを有する F<sub>2</sub>Pmp ペプチドプローブをストレプトアビジン樹脂に結合させ、HEK293T 細胞抽出物または Jurkat 細胞抽出物とインキュベートした。樹脂洗浄の後、プローブに結合したタンパク質を溶出し、消化した後、LC/MS/MS 測定に供した。非特異的相互作用タンパク質から、F<sub>2</sub>Pmp 特異的相互作用タンパク質を識別するために、コントロールプローブとして、F<sub>2</sub>Pmp をチロシンに置換したペプチドプローブを用いた。

今回の 17 種のプローブと 2 種類の細胞抽出物を用いた計 20 通りのプルダウン実験から、合計 5,507 種のタンパク質が定量され、そのうち 3,178 種のタンパク質がいずれかのプルダウン実験で F<sub>2</sub>Pmp 依存的な相互作用タンパク質として濃縮 (fold change > 2,  $p$ -value < 0.05) されていた (図 2.6)。ヒトホスファターゼ 260 種<sup>80</sup>のうち、93 種がいずれかの F<sub>2</sub>Pmp プローブによって捕捉され、そのうち 49 種が F<sub>2</sub>Pmp 依存的に濃縮されていた (図 2.7A)。Classical PTP については、ヒトゲノムにコードされている 37 種のうち 14 種が濃縮されていた (図 2.7B)。これらの中には、これまで濃縮できていなかった受容体型 PTP (PTPRF, PTPRK, PTPRS, PTPRZ1) も含まれていた<sup>76</sup>。さらに図 2.7 に示すように、P1 以外の全ての F<sub>2</sub>Pmp プローブで PTPN1 と PTPN2 は濃縮されていたが、その他の classical PTP に対する濃縮プロファイルはプローブごとに大きく異なっていた。例えば、P9 や P10 は PTPN4 や PTPN11 など様々な classical PTP を濃縮したが、P12、P4 や P7 は PTPN1 と PTPN2 のみが濃縮可能であった。また、第二節同様、P13~P17 は 1 アミノ酸置換効果により、PTP に対する濃縮プロファイルが大きく異なった。すなわち、P13 では 5 種の classical PTP (PTPN1, PTPN2, PTPN13, PTPRF, PTPRK) が濃縮されたが、P16 では PTPN1 と PTPN2 のみが濃縮された。さらに、P13 と P15 の比較では、P13 では濃縮できなかった PTPN9 が P15 では可能であり、逆に PTPRK は P13 のみで濃縮可能であった。最も多くの classical PTP を濃縮可能であったプローブは P17 で、12 種の classical PTP が濃縮可能であった。これは P17 が多くの組換え PTP に対して強い結合を示したことと一致する (図 2.4A)。P13 のプローブ配列の一部を有する P2 は PTPN1、PTPN2 のみを濃縮し、P1 ではいずれの classical PTP も濃縮されな



かった。以上より、細胞抽出物からの PTP 濃縮においてもプローブ配列の寄与が示された。



**図 2.6 F<sub>2</sub>Pmp プローブによる細胞抽出物に対するプルダウン**

各 F<sub>2</sub>Pmp プローブによる細胞抽出物に対する濃縮率(F<sub>2</sub>Pmp プローブ/Y プローブ)を log<sub>2</sub> スケールで示す。プルダウン条件 (プローブと細胞種) は濃縮率に基づいてクラスタリングされた。

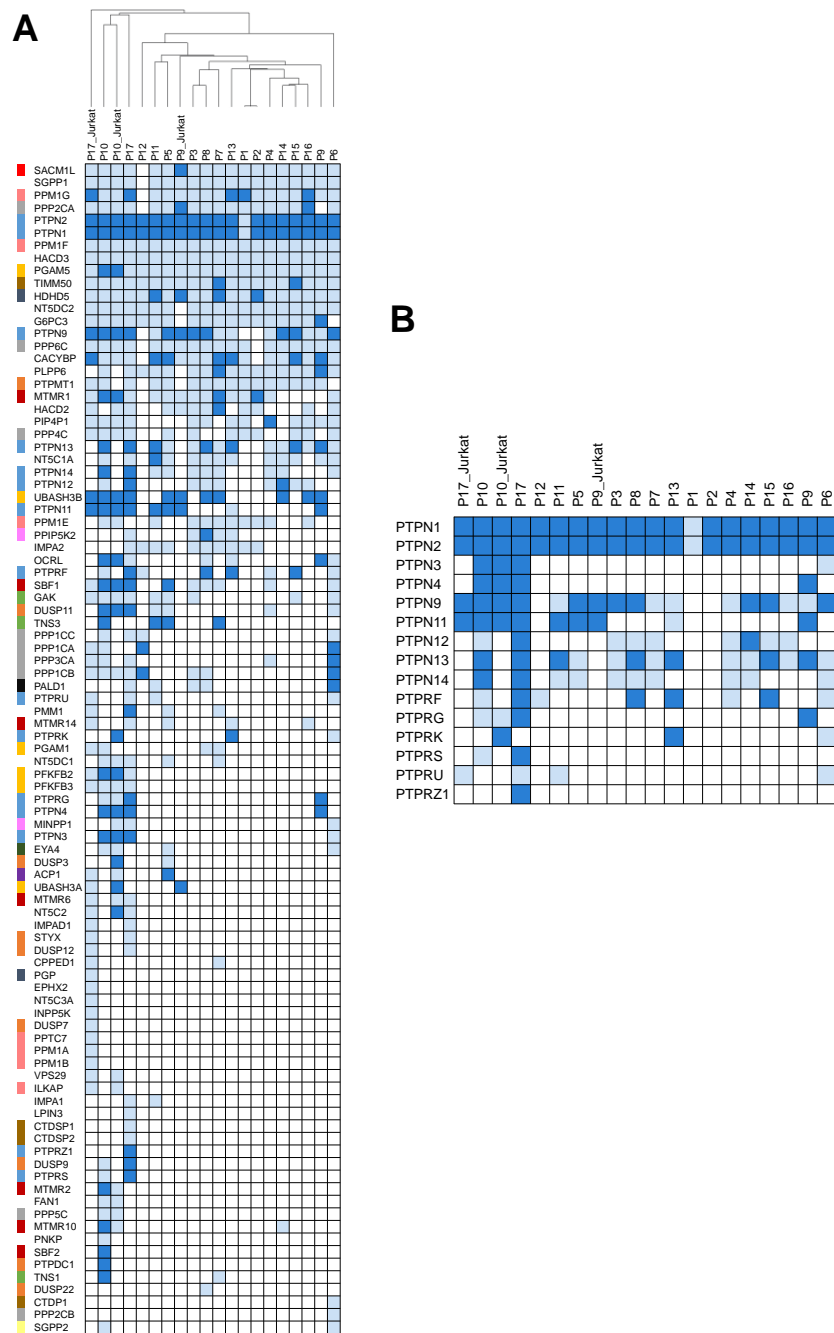


図 2.7 F<sub>2</sub>Pmp プローブによるホスファターゼの濃縮プロフィール

各 F<sub>2</sub>Pmp プローブにより細胞抽出物から濃縮されたホスファターゼをヒートマップで示す。濃縮されたホスファターゼのセルは濃い青色、濃縮はされなかったが同定はされたホスファターゼのセルは淡い青色、同定されなかったホスファターゼのセルは白色で示す。プルダウン条件（プローブと細胞種）およびホスファターゼは濃縮プロフィールに基づいてクラスタリングされた。また、ホスファターゼはファミリーごとに色分けを行っている<sup>3</sup>。(A) ヒトホスファターゼ (B) classical PTP

今回の 20 通りのプルダウン実験において、classical PTP 以外の PTP<sup>66</sup> では、DUSP3、DUSP11 や UBASH3B など 16 種がいずれかの F<sub>2</sub>Pmp プローブによって濃縮されていた。また、PTP 以外のホスファターゼでは、PPP ファミリーの PPP1CA や PPP3CA、TIMM50、HDHD5、PGAM5 など 19 種がいずれかのプローブによって濃縮可能であった。PTP 以外の濃縮されたホスファターゼに関して、一部のホスファターゼは *in vitro* においてチロシンホスファターゼ活性を示すこと (TIMM50)<sup>81</sup> や、PTP とホスファターゼドメインの類似性が高いこと (PGAM5, HDHD5)<sup>3</sup> が知られており、そのため F<sub>2</sub>Pmp プローブによって濃縮された可能性が考えられる。その他の PTP 以外のホスファターゼがなぜ濃縮されてきたのかは更なる検証が必要ではあるが、これらは、F<sub>2</sub>Pmp プローブが、PTP 以外のホスファターゼを濃縮できる可能性があることを示している。次にホスファターゼファミリー間における濃縮の傾向の違いを評価したところ、classical PTP は他のホスファターゼファミリーよりも F<sub>2</sub>Pmp 依存的に強く濃縮される傾向が示された (図 2.8)。PTP 以外のホスファターゼファミリーだけでなく、他の PTP ファミリーと比較して classical PTP がより濃縮される一つの可能性としては、pY への基質特異性や PTP ドメインの大きさが異なる<sup>66</sup> ことなどが考えられる。以上のように F<sub>2</sub>Pmp プローブは様々なホスファターゼを濃縮可能であったが、classical PTP をより濃縮する傾向があるということが示された。

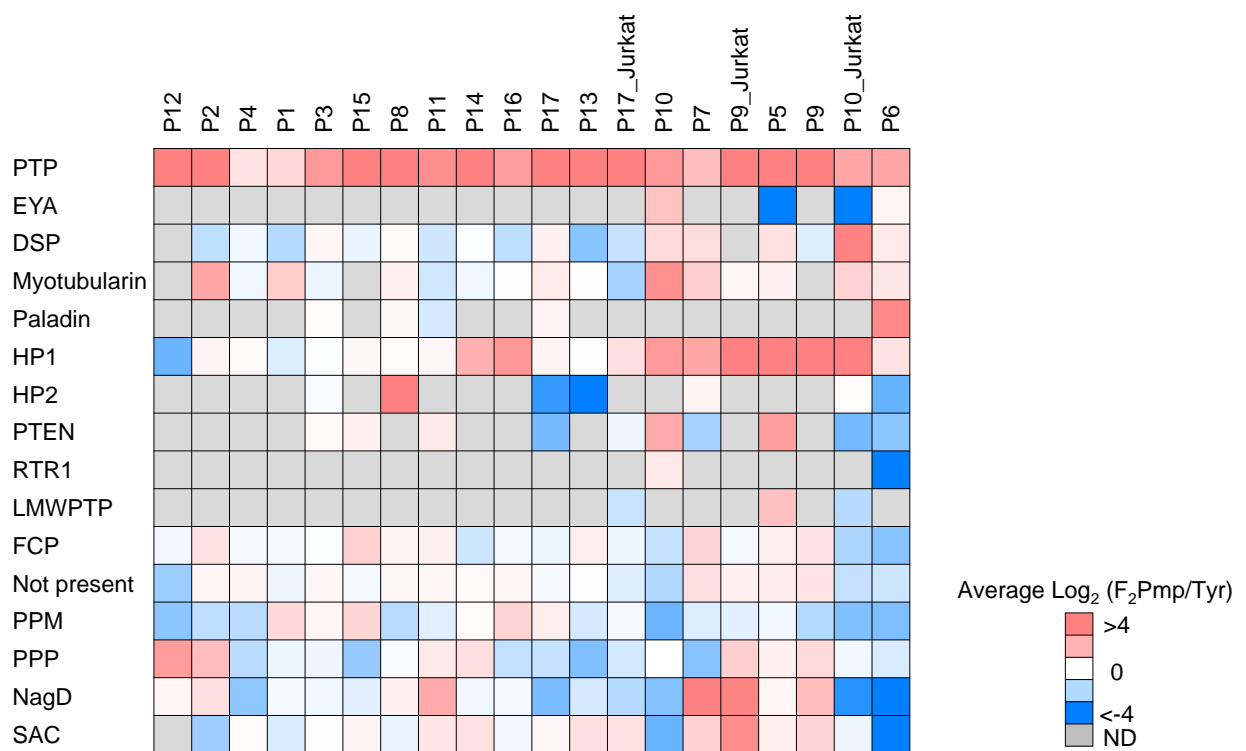


図 2.8 F<sub>2</sub>Pmp プローブによるホスファターゼファミリーの濃縮率プロファイル

各ホスファターゼファミリーごとの濃縮率 (F<sub>2</sub>Pmp プローブ/Y プローブ) を log<sub>2</sub> スケールにてヒートマップで示す。ホスファターゼファミリーの分類は先行文献に基づいている<sup>3</sup>。

ホスファターゼ以外で F<sub>2</sub>Pmp プローブによって濃縮されるタンパク質群としては、SH2 ドメイン含有タンパク質があげられる<sup>76,82</sup>。SH2 ドメインは pY 部位に対して周辺配列依存的に結合することが知られており<sup>83-86</sup>、実際に今回のプルダウン実験においても SH2 ドメイン含有タンパク質は F<sub>2</sub>Pmp プローブ配列依存的に濃縮されてきた (図 2.9)。そこで、SH2 ドメインを濃縮した F<sub>2</sub>Pmp プローブについて、その配列が SH2 ドメインを認識する既知の pY モチーフ配列と一致しているかを評価したところ<sup>84</sup>、CRKL や VAV2 などの pY-X-X-P モチーフを有する SH2 ドメイン含有タンパク質は F<sub>2</sub>Pmp -X-X-P プローブでよく濃縮されていた。一方、異なる pY モチーフを有する SH2 ドメイン含有タンパク質である PIK3R1 や YES など、F<sub>2</sub>Pmp -X-X-P プローブに対する指向性を示した。これが、pY プローブを用いたプルダウン実験でも同様の結果が得られるのか、それとも F<sub>2</sub>Pmp 特有の現象であるかは、更なる実験が必要であると考えられる。また、先行研究<sup>84</sup>において SH2 ドメインは pY 部位の C 末側のアミノ酸配列を認識し特異的に結合していたが、F<sub>2</sub>Pmp においても C 末側に F<sub>2</sub>Pmp -(L/I)-(L/I)-P を有する P8~P17 はよく似た SH2 ドメイン含有タンパク質濃縮プロファイルを示し、クラスター解析でも近傍に位置した。一方で、ホスファターゼの濃縮プロファイルに基づくクラスター解析 (図 2.7A) では、同様の傾向は見られず、F<sub>2</sub>Pmp プローブ配列において SH2 ドメインとホスファターゼがそれぞれ認識する部分が異なるということが示された。

ホスファターゼ、SH2 ドメイン含有タンパク質以外で F<sub>2</sub>Pmp プローブにより濃縮されたタンパク質としては、GO エンリッチメント解析の結果、RNA や DNA などの核酸に結合するタンパク質が多くみられた (図 2.10)。これは pY ペプチドを用いたプルダウン実験における報告<sup>86</sup>とも一致しており、RNA などのリン酸基と結合するタンパク質の部位が、F<sub>2</sub>Pmp をリン酸基として誤認識して濃縮された可能性が考えられる。また、PKM や PRKCD も多くの F<sub>2</sub>Pmp プローブによって濃縮されてきた。PKM や PRKCD は pY ペプチドに結合することが知られており<sup>87,88</sup>、そのため F<sub>2</sub>Pmp プローブにより同様に濃縮されてきたと考えられる。

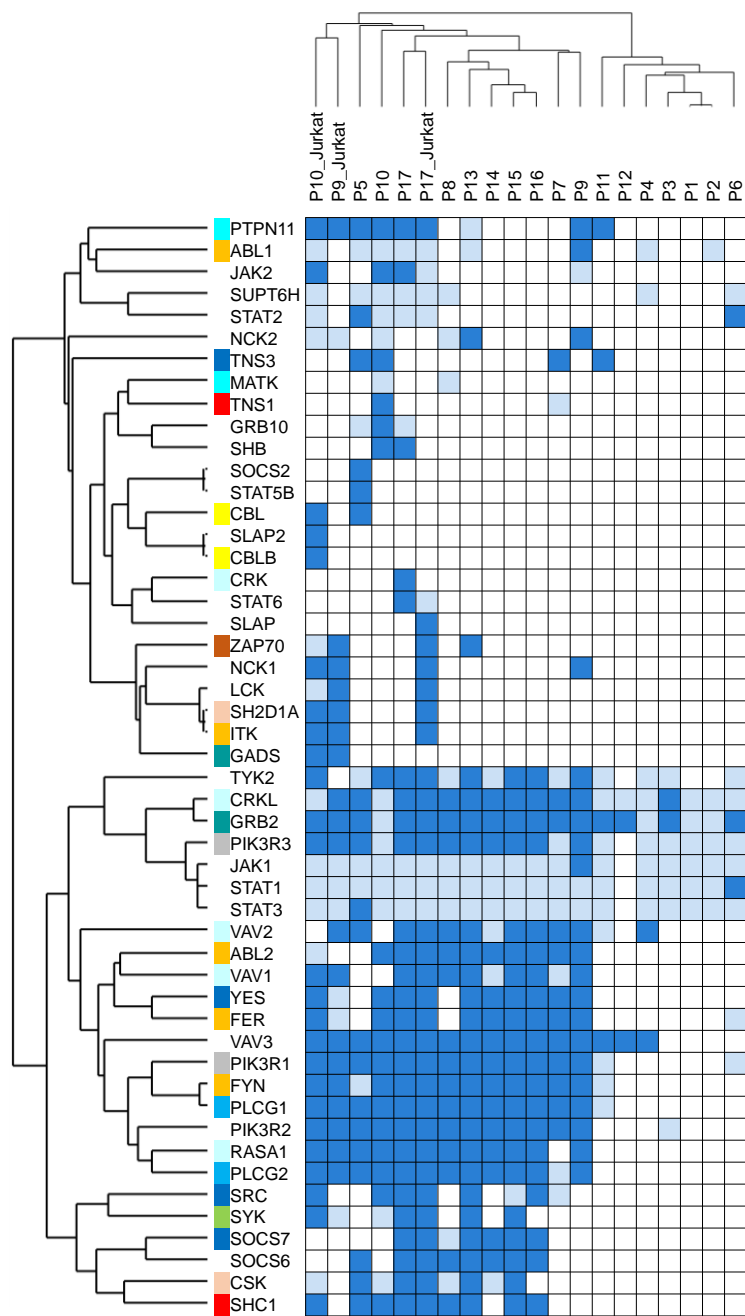
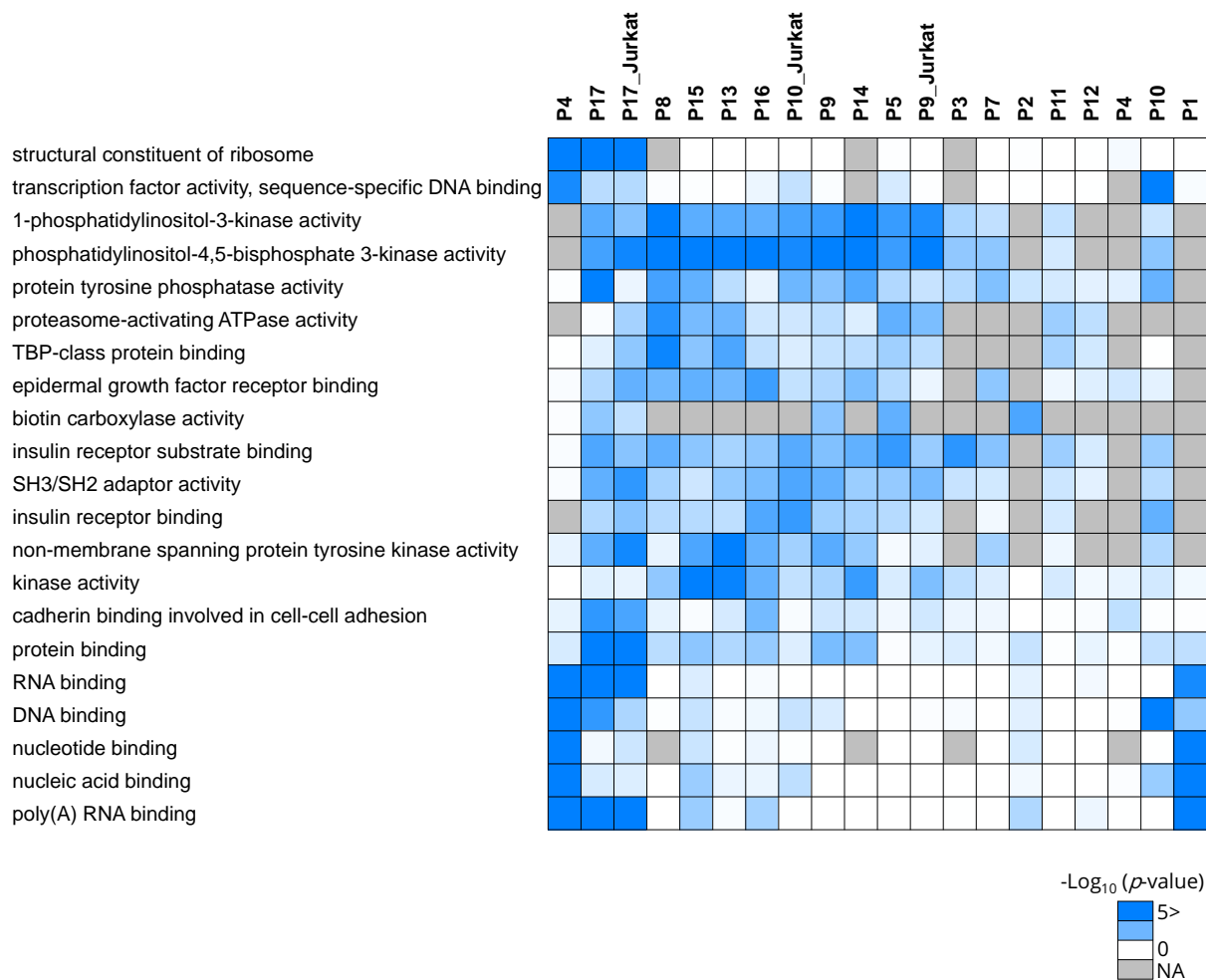


図 2.9 F<sub>2</sub>Pmp プローブによる SH2 ドメイン含有タンパク質の濃縮プロファイル

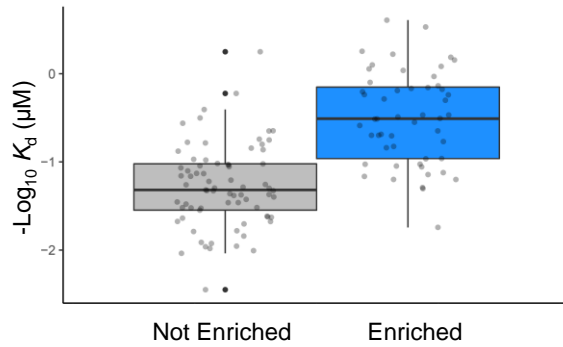
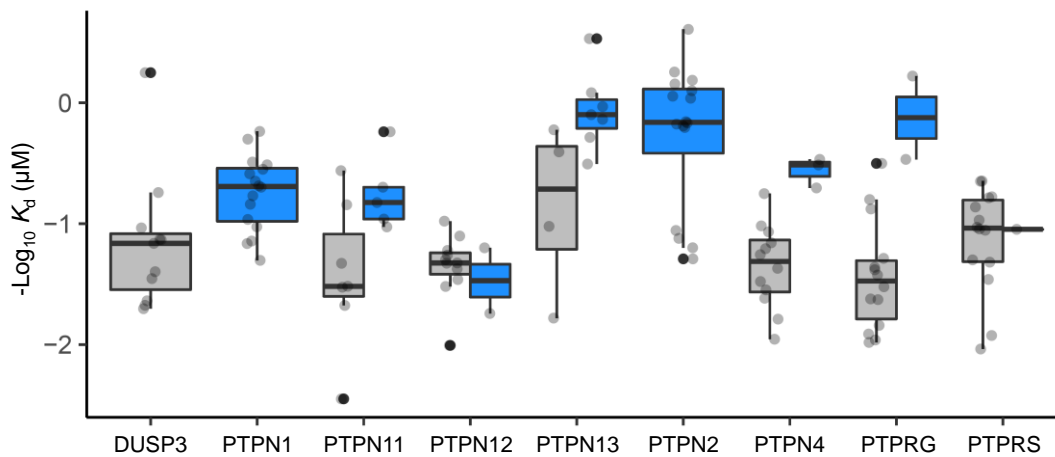
各 F<sub>2</sub>Pmp プローブにより細胞抽出物から濃縮された SH2 ドメイン含有タンパク質をヒートマップで示す。濃縮された SH2 ドメイン含有タンパク質のセルは濃い青色、濃縮はされなかったが同定はされた SH2 ドメイン含有タンパク質のセルは淡い青色、同定されなかった SH2 ドメイン含有タンパク質のセルは白色で示す。プルダウン条件（プローブと細胞種）および SH2 ドメイン含有タンパク質は濃縮プロファイルに基づいてクラスタリングされた。SH2 ドメイン含有タンパク質を pY ペプチドへの配列指向性に基づいて色分けを行っている<sup>84</sup>。



**図 2.10 F<sub>2</sub>Pmp プローブにより濃縮されたタンパク質の GO エンリッチメント解析**  
 各 F<sub>2</sub>Pmp プローブにより濃縮されたタンパク質群を GO エンリッチメント解析 (Molecular Function) して得られた GO タームについて *p*-value ( $-\log_{10}$ ) を示す。Foreground データセットには濃縮されたタンパク質、Background データセットには全定量タンパク質を用い、最小タンパク質数 2 の設定で DAVID を用いて解析した。その後、二つ以上の F<sub>2</sub>Pmp プローブで *p*-value < 0.001 を示した GO タームのみ抽出した。

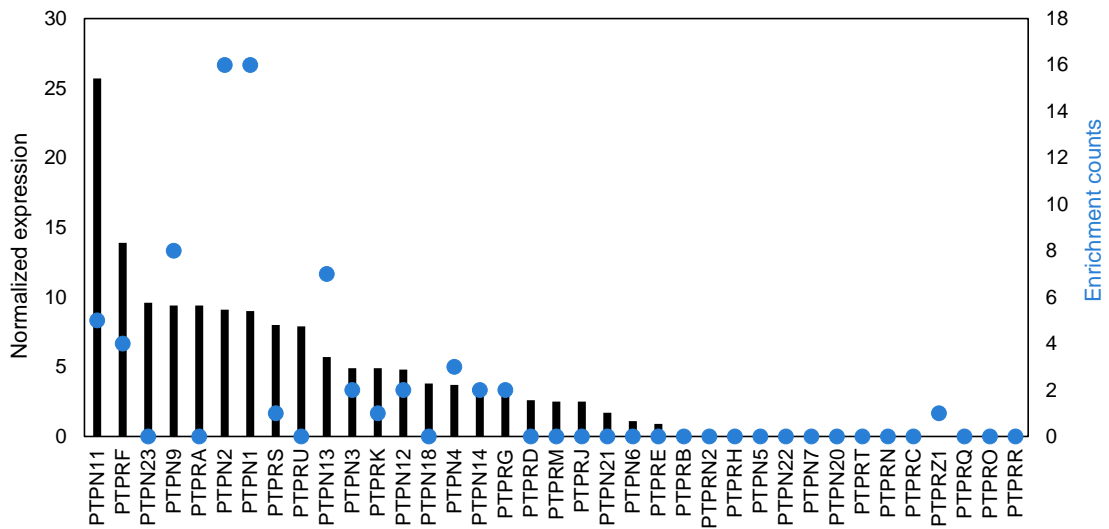
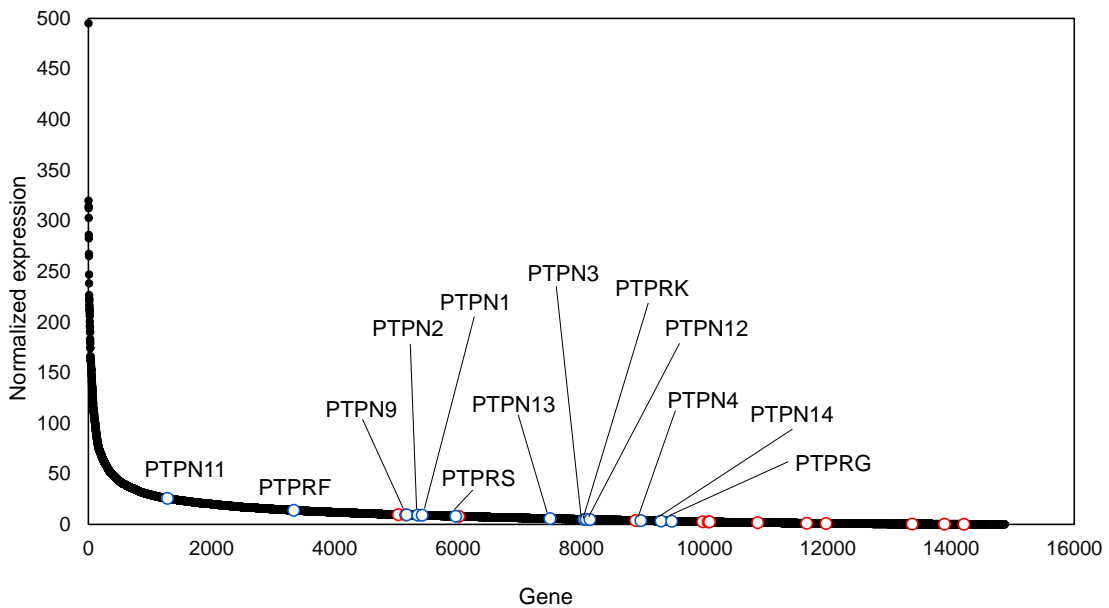


続いて、細胞抽出物からの濃縮の能否に基づいて F<sub>2</sub>Pmp ペプチドプローブ・PTP 複合体を分類し、それぞれについて F<sub>2</sub>Pmp ペプチドプローブ・PTP 複合体間の  $K_d$  値の分布を評価した。その結果、細胞抽出物から濃縮したプローブと PTP 複合体間の  $K_d$  値は、濃縮しなかったプローブと PTP 複合体間の  $K_d$  値と比べて、より小さくなる傾向が見られた (図 2.11)。次に、細胞内における PTP の存在量が F<sub>2</sub>Pmp プローブによる濃縮に影響を与える可能性について評価した。まず、HEK293 細胞における classical PTP の mRNA 発現量と HEK293T 細胞抽出物から濃縮可能であった F<sub>2</sub>Pmp プローブの数の相関を評価した (図 2.12A)。その結果、発現量の非常に低い PTPN6 や PTPRJ などは濃縮されず、濃縮頻度が発現量の影響を受けることが示唆された。また、HEK293T 細胞抽出物を用いたプルダウン実験と Jurkat 細胞抽出物を用いたプルダウン実験では PTP の濃縮プロファイルが異なった (図 2.7B)。例えば、PTPN4、PTPN13 や PTPRG は **P9** によって HEK293T 細胞抽出物からは濃縮可能であったが、Jurkat 細胞抽出物からは濃縮されなかった。Human Protein Atlas によると、HEK293 細胞と比較して Jurkat 細胞では PTPRG と PTPN13 の発現量が少なく、以上からも濃縮における発現量の影響が示唆された。一方で、HEK293T 細胞において頻繁に濃縮された PTPN2、PTPN9 や PTPN13 と比較して、PTPN11 や PTPN12 などはより多く発現している。一つの可能性として、これは第三節で示したように、PTPN2 や PTPN13 が多くの F<sub>2</sub>Pmp プローブに対して強く結合したため、頻繁に濃縮されたと考えられる。以上を総合すると、classical PTP は、F<sub>2</sub>Pmp プローブの配列・タンパク質存在量の両方に依存して細胞抽出物から濃縮されることが示された。また、今回の 17 種の F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン実験では、RNA シーケンス解析で検出された HEK293 細胞中の PTP23 種のうち 13 種が細胞内発現量に偏りなく濃縮された (図 2.12B)。さらに、RNA シーケンス解析で検出されなかった PTPRZ1 も濃縮され、これらの結果から、F<sub>2</sub>Pmp プローブは PTP を包括的に濃縮可能であるということが示された。

**A****B**

**図 2.11 F<sub>2</sub>Pmp プローブによる HEK293T 細胞抽出物からの PTP の濃縮と結合強度の比較**

(A, B) y 軸は、各 F<sub>2</sub>Pmp プローブ・PTP 複合体間の解離定数の逆対数 ( $-\log_{10}$ ) を示す。HEK293T 細胞抽出物から濃縮した F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP のペアは”Enriched” (青色)、濃縮しなかった F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP のペアは”Not Enriched” (灰色) とした。B ではそれらを各 PTP について表した。

**A****B**

**図 2.12 F<sub>2</sub>Pmp プローブによる PTP の濃縮と HEK293 細胞中での発現量**

(A) 各 classical PTP が F<sub>2</sub>Pmp プローブにより細胞抽出物から濃縮された頻度を青い点で示す。各 classical PTP の HEK293 細胞中での発現量 (<https://www.proteinatlas.org/>) を棒グラフで示す。

(B) HEK293 細胞中での発現量 (<https://www.proteinatlas.org/>) を黒い点で示す。F<sub>2</sub>Pmp プローブにより細胞抽出物から濃縮された classical PTP を青い点、濃縮されなかった classical PTP を赤い点で示す。

## 第五節 PTP の pY 基質指向性情報と F<sub>2</sub>Pmp プローブによる PTP 濃縮

これまでに、PTP が pY 部位周辺の配列依存的に基質を脱リン酸化することは、様々な方法で評価、確認されてきた<sup>77,89,90</sup>。これらの知見より、基質配列指向性情報は、F<sub>2</sub>Pmp プローブを用いたプルダウン実験において濃縮される PTP と相関があるのではないかと仮説をたてた。Palma らによって取得された classical PTP の *in vitro* 基質情報<sup>77</sup>をもとに、PWM を作成し、PWM スコアを算出した (図 2.13)。PWM<sup>51</sup> はある PTP が基質とする pY 部位近傍のアミノ酸の出現確率を表している。ここで、行列の列は pY 部位からの相対的な位置を表し、行はアミノ酸を表している。行列の値は、あるアミノ酸がある位置に出現する確率を log<sub>2</sub> 変換したものである。これらの確率は、推定基質を予測するために使用され、PWM スコアはそれら配列の pY 基質としての確からしさを表す。

まず、組換え PTP を用いたプルダウン実験で得られた  $K_d$  値と PWM スコアの関係性を評価した。その結果、PWM スコアが  $K_d$  値の逆対数と正の相関があることが示された ( $R=0.44$ ) (図 2.14)。次に、細胞抽出物を用いたプルダウン実験に関して評価したところ、濃縮された PTP と F<sub>2</sub>Pmp プローブのペアでは PWM スコアがより高くなる傾向が見られた (図 2.15)。以上より、上記の仮説を肯定する結果として、PTP の pY 基質情報は F<sub>2</sub>Pmp プローブによる PTP 濃縮と相関があることが示された。また、これらの結果より、pY のミミック体として用いている F<sub>2</sub>Pmp の妥当性が支持された。

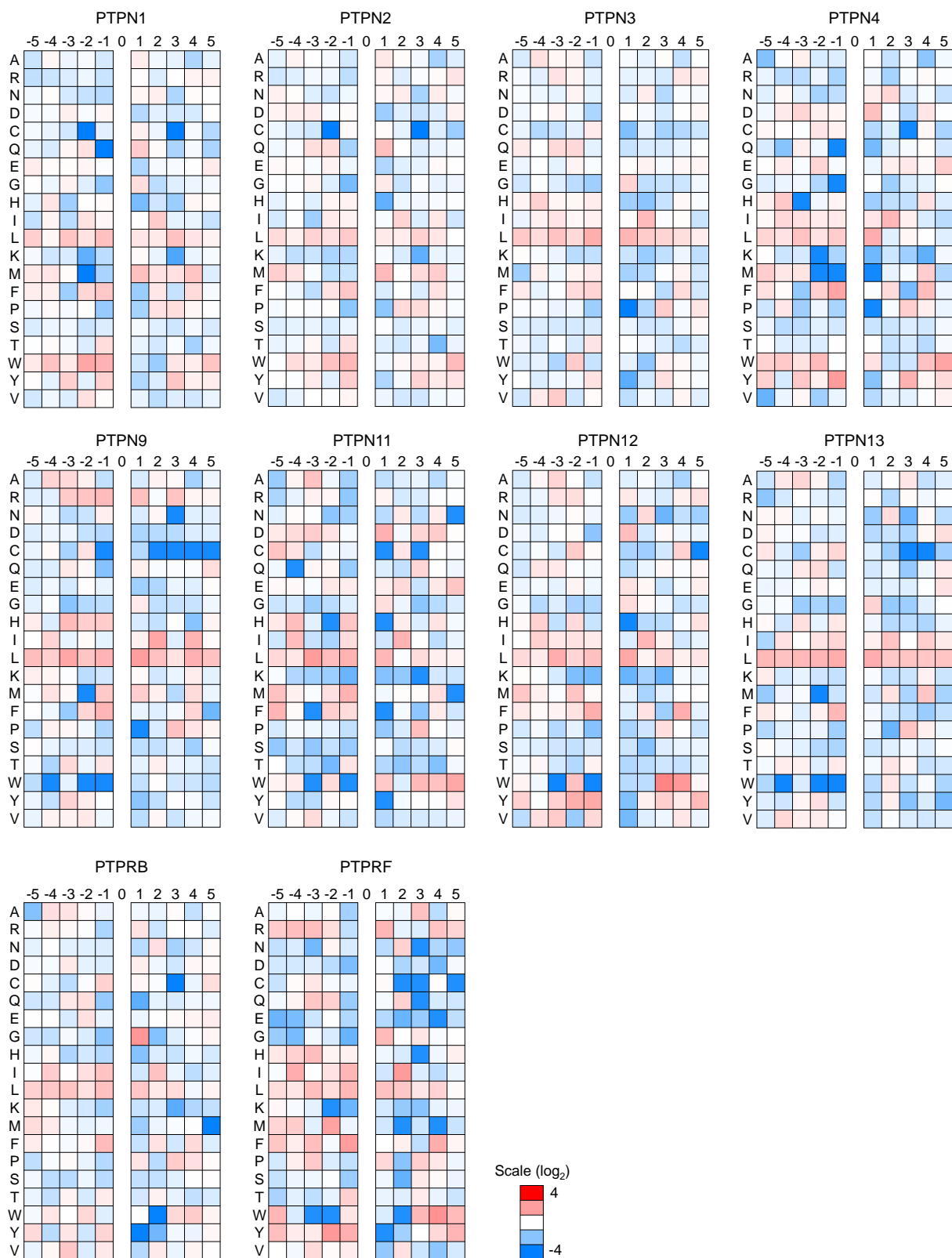


図 2.13 各 PTP の PWM

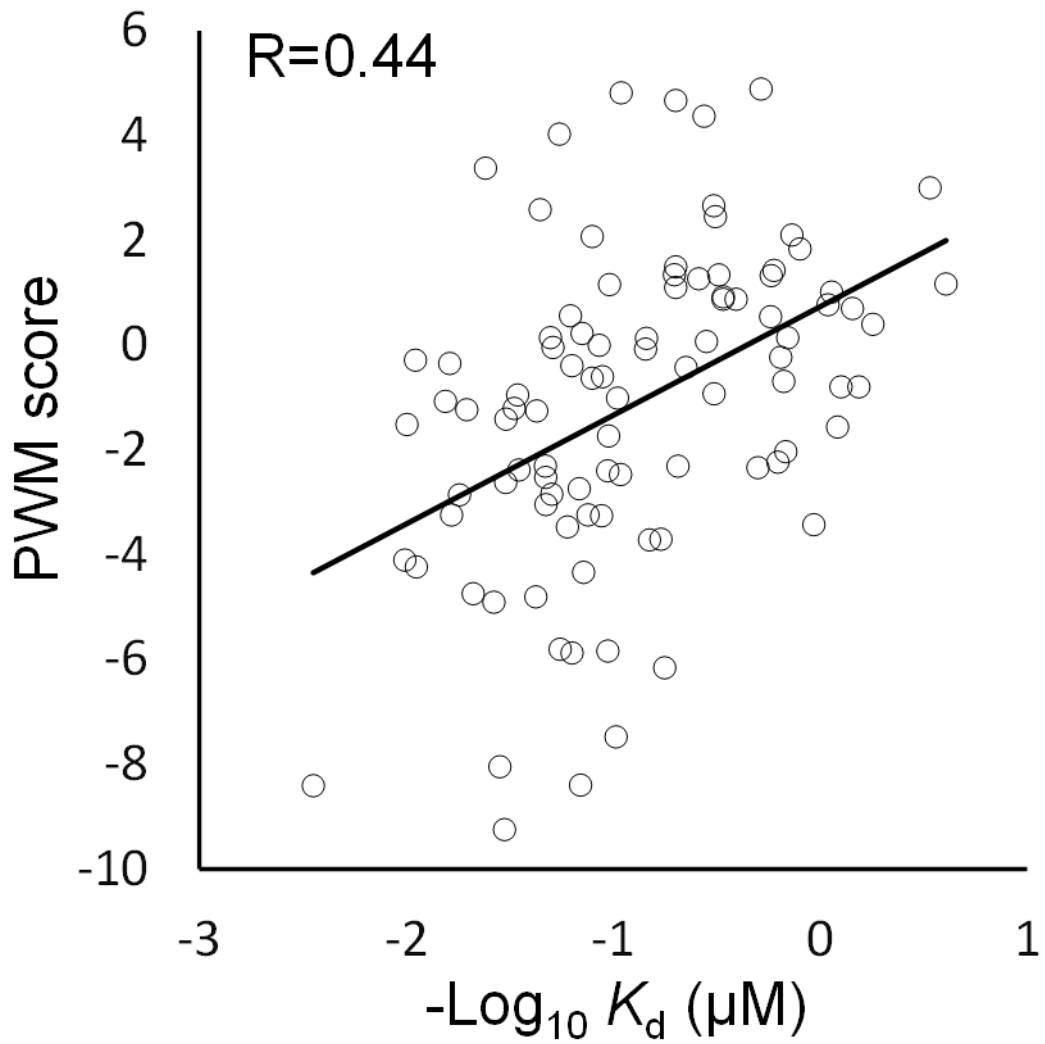
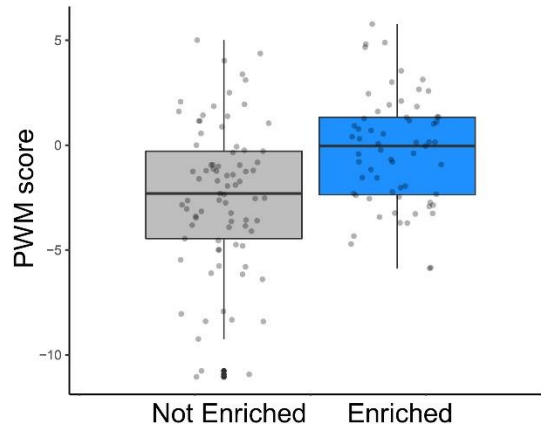
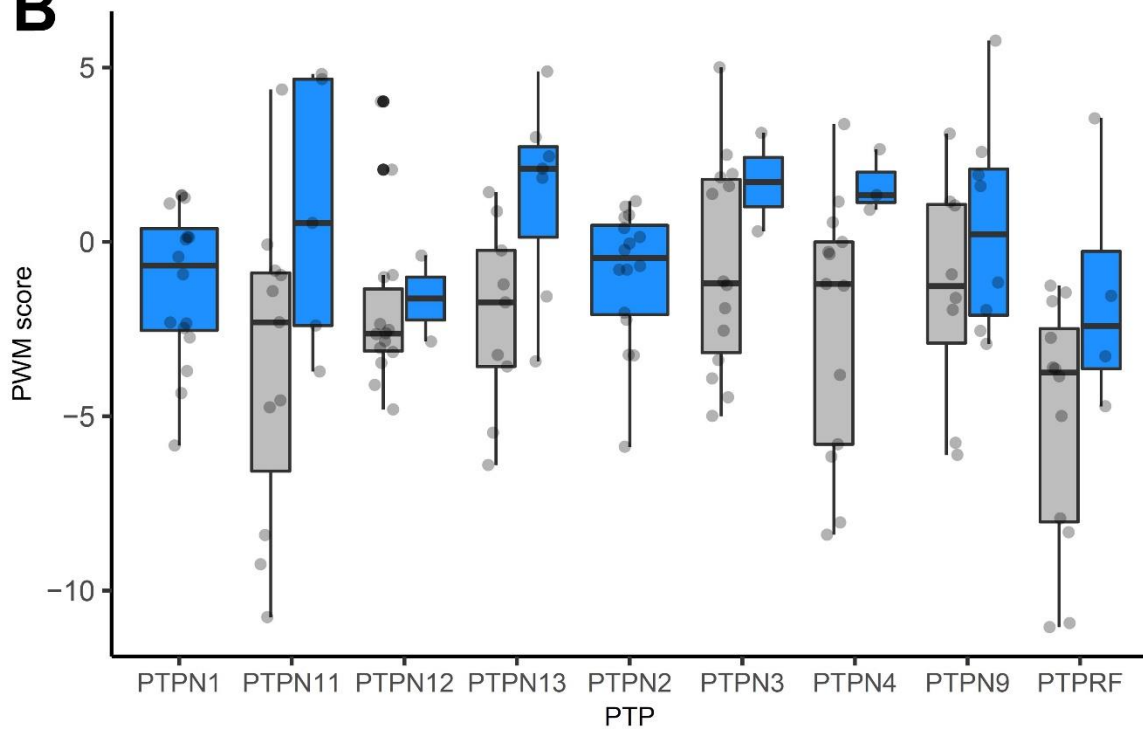


図 2.14 PTP と  $F_2Pmp$  プローブ間の結合強度と PWM スコアの比較

x 軸は、各  $F_2Pmp$  プローブ・PTP 複合体間の解離定数の逆対数 ( $-\log_{10}$ ) を示す。y 軸は、各  $F_2Pmp$  プローブと PTP の間の PWM スコアを示す。グラフ中の相関係数はピアソン相関係数により算出した。

**A****B**

**図 2.15 F<sub>2</sub>Pmp プローブによる HEK293T 細胞抽出物からの PTP の濃縮と PWM スコアの比較**

(A, B) y 軸は、各 F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP の間の PWM スコアを示す。HEK293T 細胞抽出物から濃縮した F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP のペアは”Enriched” (青色)、濃縮しなかった F<sub>2</sub>Pmp プローブと PTP のペアは”Not Enriched” (灰色) とした。B ではそれらを各 PTP について表した。

## 第六節 PTP 活性と F<sub>2</sub>Pmp プローブへの結合

次に、F<sub>2</sub>Pmp プローブが PTP 阻害薬によって競合阻害された PTP を識別するかに関して評価を行った。オルトバナジン酸はリン酸ミミック体として PTP に可逆的に結合し、活性を阻害する<sup>91</sup>。HEK293T 細胞抽出物に対してオルトバナジン酸 (1.5 mM) を処理し、その後 **P9** を用いてプルダウン実験を行った。その結果、オルトバナジン酸処理により、**P9** に F<sub>2</sub>Pmp 依存的に結合することが分かっている 6 種の classical PTP を含む (図 2.7B)、7 種の classical PTP が有意に減少していた。以上より、classical PTP の活性部位が内在性基質と競合的に阻害されることによる脱リン酸化活性の低下を、F<sub>2</sub>Pmp プローブは識別することが示された (図 2.16)。

PTP は細胞内において局所的に発生する活性酸素種により活性中心のシステイン残基が一過的に酸化され、不活性型になる<sup>92</sup>。例えば、EGFR の活性化は活性酸素種の急激な増加と PTPN1 の不活性化を引き起こすことがよく知られている<sup>93,94</sup>。そのため、酸化による PTP の不活性化を検出することは重要であり、Kumar や Kalesh らは、作製した PTP プローブが、*in vitro* において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により PTP に反応しなくなることを確認している<sup>71,95</sup>。そこで、F<sub>2</sub>Pmp プローブも酸化による PTP の活性状態を識別するかに関して評価を行った。先行文献と同様に 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 5 分間処理した PTPN1 と無処理の PTPN1 をそれぞれ用意し、それぞれを **P9** とインキュベーション後、濃縮量を比較した。また、インプットの一部を酵素消化し、LC/MS/MS 解析を行った。その結果、インプットでは PTPN1 強度は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群とコントロールで差が見られなかったものの、プルダウン試料においては H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理群で PTPN1 強度が有意に減少した (図 2.17)。以上より、F<sub>2</sub>Pmp プローブは酸化により不活性化した PTP を識別することが示された。



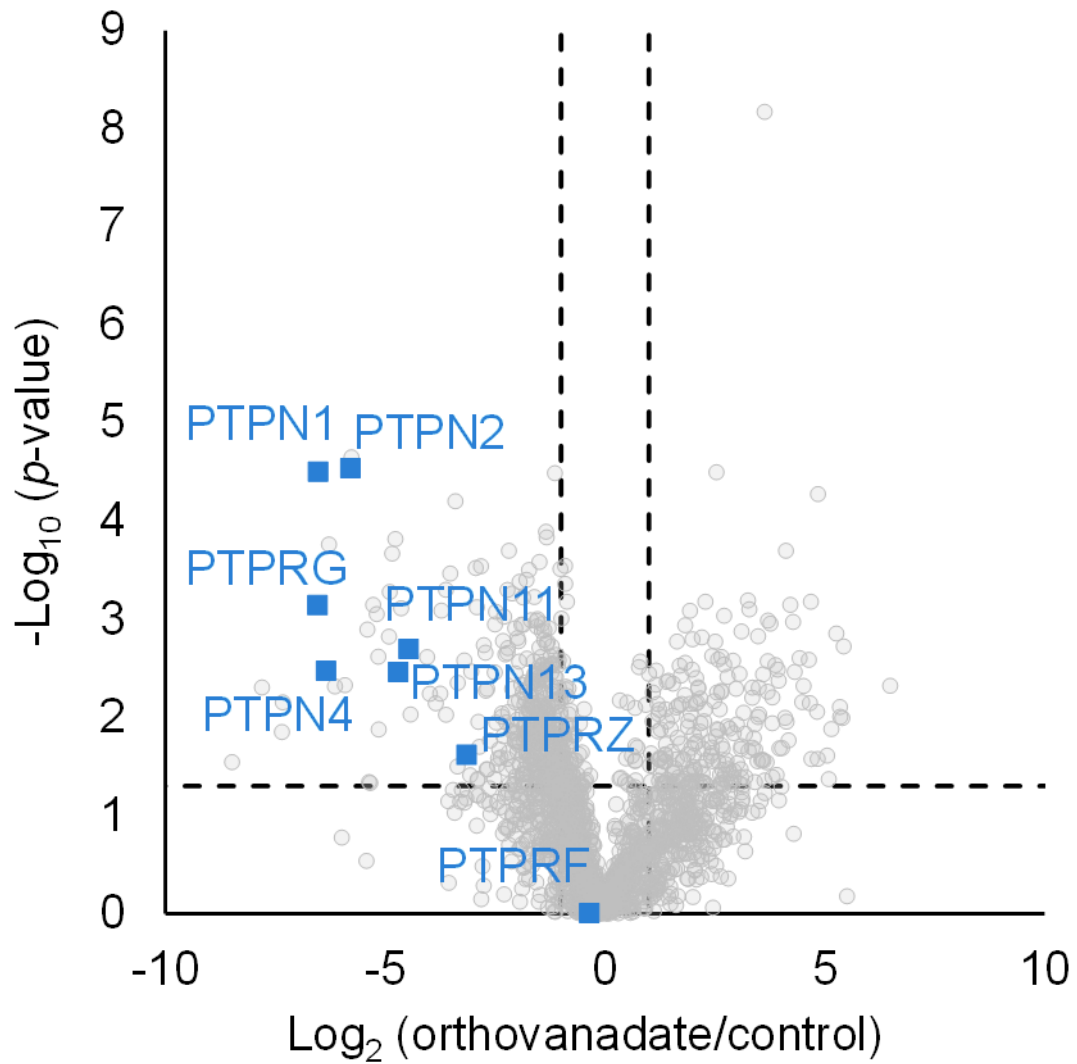
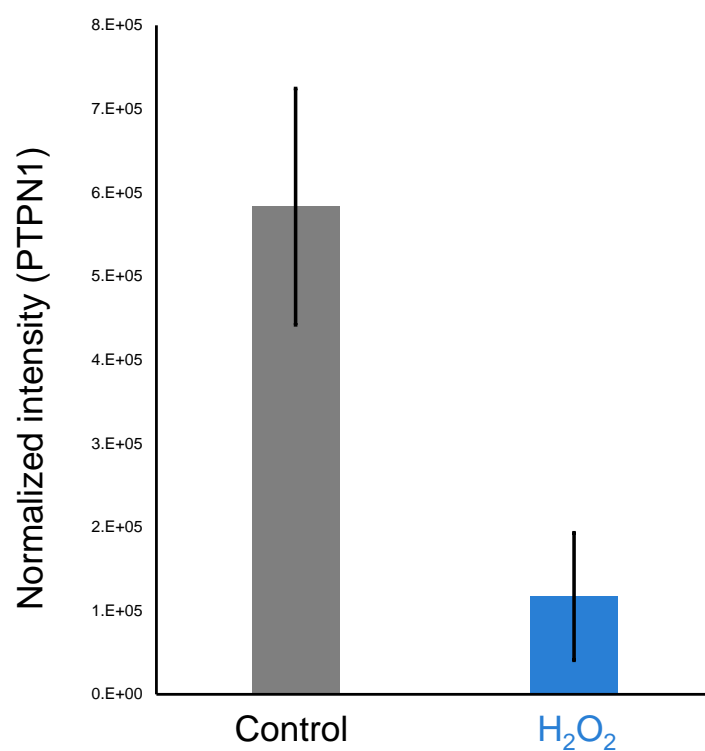


図 2.16 オルトバナジン酸による競合阻害と F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン

x 軸は、オルトバナジン酸添加有無での濃縮比を示す。y 軸は、オルトバナジン酸添加有無における *p*-value を示す。Classical PTP は青い点で示す。



**図 2.17 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化と F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理有無における normalized PTPN1 intensity (プルダウンされた PTPN1 強度をインプットの PTPN1 強度で正規化したもの) を示す。

続いて、PTP の細胞内での活性変動評価に F<sub>2</sub>Pmp プローブを用いた。本実験では、安定同位体標識を施した HeLa 細胞に対して、2 分、10 分または 20 分間 EGF を投与した (図 2.18)。無処理細胞の抽出物と、各 EGF 処理細胞の抽出物を混合した後、P9 によりプルダウン、酵素消化、LC/MS/MS 測定を行った。その結果、448 種のタンパク質が定量された。また、チロシンプローブをコントロールとしたプルダウン実験をもとに、F<sub>2</sub>Pmp 依存的に濃縮されたかどうかを評価したところ、82 種のタンパク質が抽出され、そのうち 24 種のタンパク質が EGF 刺激により有意に濃縮量が変動していた (図 2.19AB)。この 24 種のタンパク質群の中には 3 種の PTP (PTPN1, PTPN2, PTPN11) が含まれていた。PTPN1 の濃縮量は、先行文献と同様に、EGF 投与 2 分後に減少し、その後増加する傾向が見られた (図 2.19C)。さらに、PTPN2 も PTPN1 と同様の挙動を示しており、PTPN2 も EGF 刺激依存的に活性が変動することが示された。また、PTPN11 も EGF 刺激依存的な濃縮量の変動を示した。しかし、PTPN11 は PTP ドメインと 2 つの SH2 ドメインからなるため、本プローブと PTPN11 の結合しているドメインの推定が難しく、濃縮量の変動が PTP 活性を反映しているかどうかは更なる検証が必要である。また、PTPRF は F<sub>2</sub>Pmp 依存的に濃縮されたものの、濃縮量の有意な変動は見られず、EGF 刺激において活性変動は確認されなかった。PTP 以外のタンパク質に関しては、RASA1 や PI3K 複合体などの SH2 ドメイン関連のタンパク質が EGF 刺激後に一時的に濃縮量が減少した。EGF 刺激では、チロシンキナーゼの活性化に伴い、細胞内における pY 部位の存在量が一時的に増加する<sup>96</sup>。それら pY 部位に SH2 ドメインは結合し、複合体を形成することで下流にシグナルを伝達する。そのため、一つの可能性として、EGF 刺激により細胞抽出物中で F<sub>2</sub>Pmp プローブが結合可能な SH2 ドメインの量が増加したため、SH2 ドメイン含有タンパク質の濃縮量が増加したと考えられる。また、ATP 合成酵素 (ATP5MF, ATP5F1C) の濃縮量が EGF 刺激後に増加する傾向も見られた。EGF 刺激は ATP 合成を促進することが知られており、EGF 刺激に伴う活性状態の変動などにより濃縮量が増加した可能性が考えられる<sup>97,98</sup>。

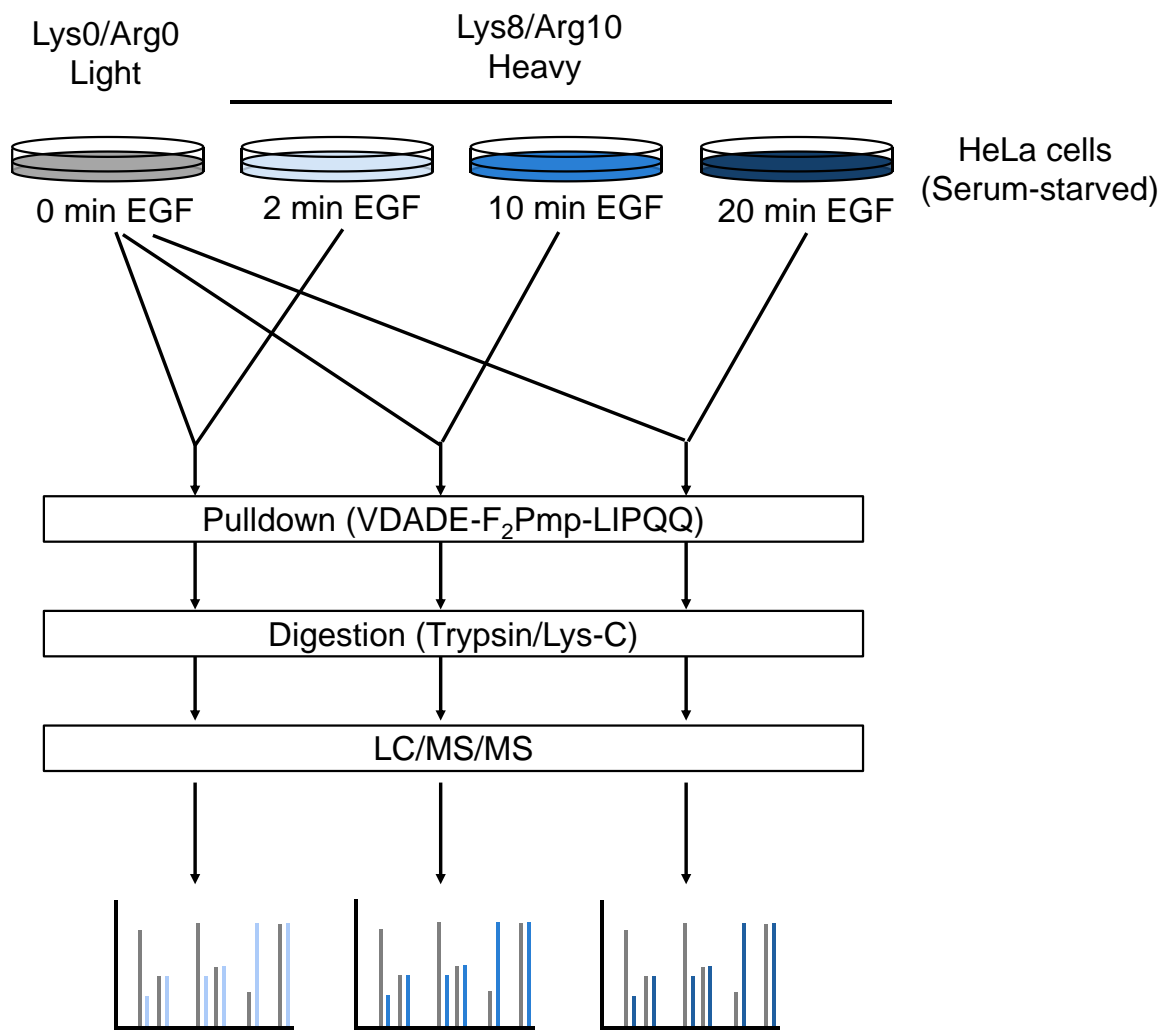


図 2.18 EGF 刺激と F<sub>2</sub>Pmp プロープによるプルダウンのワークフロー

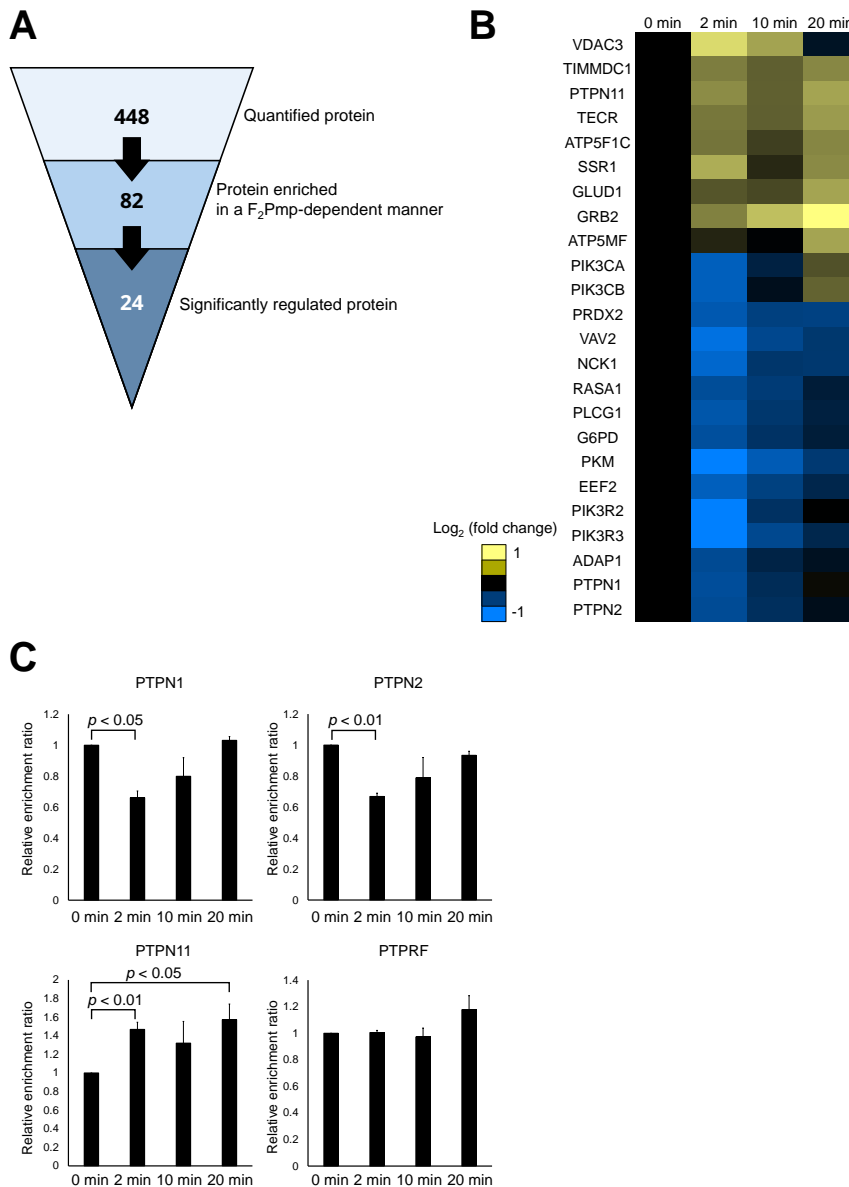


図 2.19 EGF 刺激と  $F_2Pmp$  プローブによるプルダウン

(A) 結果の概要。Quantified proteins: 定量された全タンパク質、Proteins enriched in a  $F_2Pmp$ -dependent manner:  $F_2Pmp$  依存的に濃縮されたタンパク質、Significantly regulated proteins: EGF 刺激により、無刺激と比べて有意に濃縮量に変動したタンパク質 ( $\log_2$  (H/L 比)  $> 0.5$  または  $< -0.5$ 、かつ  $p$ -value  $< 0.05$ )

(B)  $F_2Pmp$  依存的に濃縮かつ、有意に変動したタンパク質の各 EGF 刺激時間における濃縮プロファイルを示す。

(C) 非 EGF 処理試料と比較した際の、各 EGF 刺激時間における PTP の濃縮量を示す。 $p$ -value は 1 標本  $t$  検定で算出した。

## 第七節 結語

本章では、ホスファターゼの包括的濃縮法の開発を目指し、プローブ配列と濃縮される PTP の相関や、F<sub>2</sub>Pmp プローブによる濃縮と PTP 活性との相関に関して評価した。本研究は F<sub>2</sub>Pmp プローブが PTP にプローブ配列依存的かつ PTP 活性依存的に結合することを示し、classical PTP 包括的濃縮を達成した。さらに、本研究は初めてタンパク質レベルの classical PTP 包括的濃縮に成功した例であり、本研究の示すインパクトは大きい。

本研究では、F<sub>2</sub>Pmp プローブ配列を系統的にデザインし、配列多様性を増大させることで、classical PTP の包括的濃縮が可能であるだけでなく、一部のセリンスレオニンホスファターゼなども濃縮できるということを示した。これらの結果は、プローブ配列の最適化や、pS や pT の非加水分解性アナログ体の利用により、ヒトホスファターゼの包括的濃縮が可能になることへの期待を抱かせるものである。

また、F<sub>2</sub>Pmp は pY のミミック体として使用されるが、pY とは結合距離などに違いがある<sup>99</sup>。そのため、PTP の pY 基質への指向性情報を F<sub>2</sub>Pmp プローブに利用できるのかは不明であった。本研究では F<sub>2</sub>Pmp プローブによる PTP 濃縮の大規模情報を取得することにより、これまでは行えなかった PTP の pY 基質指向性情報との相関の詳細な解析を可能とし、その相関を明らかにした。本研究により、F<sub>2</sub>Pmp プローブ配列の効率的な設計が可能になったと考えられる。

また、本手法ではタンパク質レベルでの濃縮が可能であり、オルトバナジン酸による競合阻害を検出することが可能であった。そのため、本手法は Kinobeads 法のように、阻害薬の PTP への結合プロファイルの取得に応用可能であると考えられる。

これまで、チロシンキナーゼに関しては外的刺激などに応じて活性が変動し、下流のリン酸化シグナルを制御することがよく知られている<sup>100</sup>。一方で、PTP に関しては少数の報告に留まっている<sup>92,101,102</sup>。本研究では、EGF 刺激において、既知の PTPN1 だけでなく PTPN2 も活性が変動することを示した。この結果は、細胞内のリン酸化シグナルはキナーゼだけでなく、ホスファターゼによっても厳密に制御されているということを更に支持するものである。そして、F<sub>2</sub>Pmp プローブはそれら PTP の活性変動を包括的に捉えることができる有用なプローブであると期待される。

## 結論

本研究では、リン酸化ネットワークの完全理解に向けて、プロテオミクスを用いたキナーゼ基質同定法およびチロシンホスファターゼ大規模解析法の開発を行い、以下の知見を得た。

第一章では、近接依存性ビオチン標識、キナーゼ摂動リン酸化プロテオミクス、リン酸化モチーフ解析の3つのアプローチが直交的に働くことを示し、内在性キナーゼ基質を同定した。また、トレーニングセットに着目して、リン酸化モチーフ解析によるキナーゼ基質予測に関する考察を行った。さらに、基質同定に留まらず、同定された基質周辺でのがんに関連するアミノ酸変異の影響を評価した。

第二章では、チロシンホスファターゼの大規模解析に向けて、非加水分解性リン酸化チロシンミミックアミノ酸を含んだペプチドプローブによるチロシンホスファターゼ濃縮法の開発を行った。その中でチロシンホスファターゼはプローブ配列およびチロシンホスファターゼ活性依存的に濃縮されることを示し、チロシンホスファターゼの大規模濃縮法の開発に成功した。さらに、EGF刺激を行った細胞を用いて、細胞内チロシンホスファターゼの活性変動を検出可能であることを示した。

リン酸化プロテオミクスの発展によりリン酸化部位の大規模定量が可能となり、リン酸化が様々な生命現象に深く関わっていることが明らかとなってきた。しかし、それらリン酸化の制御がどのキナーゼ・ホスファターゼによってどのようになされているのかということについては未知のものがほとんどである。現在までに明らかとなっているキナーゼ・ホスファターゼ関連の僅かな情報でさえ生命科学や医療の進歩に大きく寄与していることから、リン酸化ネットワーク全体の理解は様々な疾患要因の解明、創薬、診断や個別化医療に資する重要な基盤となると考えられる。第一章および第二章で示した手法が、リン酸化ネットワークの未知の領域を照らすための一助となることが期待される。





## 実験の部

### 細胞培養

HeLa、HEK293T および MCF7 細胞は 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、100 U/mL ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン (Fujifilm Wako, Osaka, Japan) を添加した DMEM 培地 (Fujifilm Wako) にて、5 %CO<sub>2</sub> を含む 37 °C 条件下で培養した。Jurkat 細胞には RPMI 1640 培地 (Fujifilm Wako) を使用した。

SILAC 標識において、light 標識試料には [<sup>12</sup>C<sub>6</sub>, <sup>14</sup>N<sub>4</sub>]-Arg (+0) と [<sup>12</sup>C<sub>6</sub>, <sup>14</sup>N<sub>2</sub>]-Lys (+0)、heavy 試料には [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>]-Arg (+10) と [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Lys (+8) を使用した。SILAC 条件では、通常の DMEM からリジンとアルギニンを除いたカスタム培地 (Thermo Fisher Scientific) に、各標識試料アミノ酸、10 % FBS、100 U/mL ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン (Thermo Fisher Scientific) および 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Fujifilm Wako) を添加した培養液を調製した。

### BirA\*キナーゼ発現ベクターのクローニング

pDEST-pcDNA5-BirA\*-FLAG N-term および pDEST-pcDNA5-BirA-FLAG-GFP は Anne-Claude Gingras 博士 (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute at Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada) より分与いただいた。エントリークローン pENTR221 CK2A1 および pENTR221 PRKACA は、それぞれ DNAFORM、または文部科学省/AMED のナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて理研 BRC から購入した。CK2A1 または PRKACA コード配列は、LR clonase 2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて Gateway システムでデスティネーションベクター pDEST-pcDNA5-BirA\*-FLAG N-term にクローニングし、目的のものを得た。すべてのコンストラクトの配列は、サンガー法 (Genewiz, South Plainfield, NJ, USA) で確認した。

### BioID

キナーゼインタラクトーム実験では、HEK293T 細胞に 45  $\mu$ L 1.0 mg/mL polyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA, USA) と 15  $\mu$ g プラスミドをトランスフェクションして 24 時間培養し、ネガティブコントロールとして HEK293T 細胞に 45  $\mu$ L 1.0 mg/mL polyethylenimine をトランスフェクションして 24 時間培養

した。その後、50  $\mu$ M ビオチン (Fujifilm Wako) を含む培養液で 24 時間培養し、洗浄後、氷冷した PBS で細胞を回収した。

#### 薬物処理

HEK293T 細胞を DMSO、10  $\mu$ M CX-4945 (ApexBio, Houston, TX, USA) または 50  $\mu$ M forskolin (Fujifilm Wako) で 1 時間処理した。

#### EGF 処理

低血清培地 (0.1% FBS) にて 24 時間培養した HeLa 細胞に対し、150 ng/mL EGF を 2 分、10 分または 20 分間添加した。その後、氷冷した PBS にて細胞を洗浄、回収した。

#### ビオチン化タンパク質同定のための試料調製

氷冷した PBS で細胞を洗浄、回収した。タンパク質を RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.2)、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.1% SDS、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1% デオキシコール酸ナトリウム (Fujifilm Wako) ) に抽出し、300  $\mu$ g の Streptavidin magnetic beads (Thermo Fisher Scientific) と 4  $^{\circ}$ C で 3 時間転倒混和をした。転倒混和後、磁気ビーズを RIPA バッファーで 3 回、50 mM 重炭酸アンモニウムバッファーで 3 回洗浄し、200  $\mu$ L の 50 mM 重炭酸アンモニウムバッファーに懸濁させた。捕捉したタンパク質を 10 mM DTT で 30 分間還元し、暗所で 50 mM ヨードアセトアミドで 30 分間アルキル化し、Lys-C (Fujifilm Wako) (w/w 1:100) で 3 時間、続いてトリプシン (Promega, Madison, MI, USA) 消化 (w/w 1:100) を磁気ビーズ上で 37  $^{\circ}$ C にて一晩消化した。このペプチドを SDB-XC (GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いた StageTip<sup>103</sup> で脱塩し、LC/MS/MS により分析した。

#### リン酸化プロテオーム解析のための試料調製

氷冷した PBS で細胞を洗浄、回収した。タンパク質は、PTS 溶液<sup>104</sup> (12 mM デオキシコール酸ナトリウム (Fujifilm Wako)、12 mM *N*-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (Fujifilm Wako)、100 mM Tris-HCl (pH 9.0)、プロテインホスファターゼ阻害剤カクテル 1、2 (Sigma-Aldrich)、プロテアーゼ阻害剤カクテル) を用いて抽出された。タンパク質量は BCA タンパク質定量キットで測定し、10 mM DTT で 30 分間還元した後、暗所で 50 mM ヨードアセトアミドで 30 分間アルキル化した。還元およびアルキル化後、タンパク質を Lys-C (w/w 1:100) で 3 時間消化し、続いてトリプシン消化 (w/w 1:100) を 37  $^{\circ}$ C で一晩行った。その後、SDB-XC StageTip を

用いてペプチドを脱塩した。100 µg のペプチド消化物から TiO<sub>2</sub> ベースのヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー (HAMMOC) <sup>49</sup> によりリン酸化ペプチドを濃縮し、0.5 %ピペリジンで溶出した。リン酸化ペプチドを TMT (Thermo Fisher Scientific) で標識し、SDB-XC StageTips で脱塩し、塩基性 pH <sup>103</sup> で分画し、LC/MS/MS により分析した。

#### ウェスタンブロット

HEK293T 細胞を RIPA バッファーで溶解した。遠心分離 (16,000 g、30 分、4 °C) 後の上清を、2-メルカプトエタノールを含む LiDS サンプルバッファー (Thermo Fisher Scientific) に再懸濁させた。このタンパク質試料を 4-12%勾配の SDS-ポリアクリルアミドゲル (Thermo Fisher Scientific) にロードし、電気泳動で分離した。タンパク質を PVDF メンブレン (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) へと転写後、Ponceau S (Beacle, Kyoto, Japan) により染色した。メンブレンを 5% (w/v) BSA で TBS-Tween 中にてブロッキングし、1 時間または一晩転倒混和した。その後、メンブレンは TBS-Tween で 3 回洗浄し、ECL 試薬 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて抗体結合部位を検出した。Flag tag、PKA および CK2 の一次抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から購入した。HRP 標識ストレプトアビジンは Thermo Fisher Scientific から購入した。

#### 免疫沈降

氷冷した PBS で細胞を洗浄、回収した。プロテインホスファターゼ阻害剤カクテル 1、2 およびプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む細胞破碎液 (1% NP-40、150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl, pH 7.5) で HEK293T 細胞からタンパク質を抽出した。細胞溶解液を抗 FLAG M2 磁気ビーズ (Sigma-Aldrich) と共に 1 時間転倒混和した。

#### 合成ペプチドを用いた *in vitro* キナーゼアッセイ

合成ペプチド (SynPeptide, Shanghai, China) (各 10 pmol) の混合物を、100 µL のキナーゼ反応バッファー (40 mM Tris-HCl pH 7.5、20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP) 中で各組み換えキナーゼ (Carna Biosciences, Kobe, Japan) または免疫沈降物 0.5 µg と 37 °C で 3 時間反応させ、10 µL 10 % トリフルオロ酢酸を加えて反応を停止させた。その後、SDB-XC StageTip を用いてペプチドを脱塩し、LC/MS/MS により分析した。

#### 細胞抽出物を用いた *in vitro* キナーゼ反応

氷冷した PBS で細胞を洗浄、回収した。細胞から PTS 溶液でタンパク質を抽出し、アミコンウルトラ 10K (Merck Millipore) を用いて 14,000 g で限外ろ過を行い、40 mM Tris-HCl (pH7.5) へと置換した。タンパク質量は BCA タンパク質定量キットを用いて測定し、タンパク質を 100  $\mu$ g ずつに分割した。タンパク質を TSAP で脱リン酸化し、75 °C で 1 時間加熱した後、組換えキナーゼと反応させ、還元およびアルキル化後、50 mM 重炭酸アンモニウムバッファーにて二倍希釈し、Lys-C (w/w 1:100) とトリプシン (w/w 1:100) で消化を行った。その後、ペプチド消化物から HAMMOC でリン酸化ペプチドを濃縮し、SDB-XC StageTips で脱塩し、LC/MS/MS により分析した。

### ペプチド合成

ペプチドの合成は、Novasyn TGR 樹脂 (Merck Millipore) を用い、固相合成した。Fmoc-F<sub>2</sub>Pmp はペプチド研究所 (Osaka, Japan) から購入した。その他の Fmoc アミノ酸は渡辺化学 (Hiroshima, Japan) または Merck Millipore から購入した。伸長反応の終了後、トリフルオロ酢酸/チオアニソール/*m*-クレゾール/エタンジチオール/H<sub>2</sub>O (80:5:5:5:5) で室温 3 時間処理し、樹脂からの切り出しと脱保護を行った。その後、高速液体クロマトグラフィーにてペプチドの精製を行った。

### ペプチドプルダウン (細胞抽出物)

ペプチドプローブは N 末端にビオチン化 PEG2 リンカー、C 末端にアミド修飾を施して合成した。1 プルダウン実験あたり、18  $\mu$ L のストレプトアビジンアガロース樹脂を、160 nmol のペプチドプローブを含む細胞破碎液 (1 % (v/v) Nonidet P-40、150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、プロテアーゼ阻害剤カクテル) 中にて室温条件下で 2 時間転倒混和した。細胞は細胞破碎液で破碎後、遠心分離 (15,800 g、30 分、4 °C) を行い、得られた上清を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、タンパク質 3 mg とプローブ固定化樹脂とを細胞破碎液中にて 4 °C で 4 時間転倒混和した。その後、樹脂を細胞破碎液にて 3 回、100 mM Tris-HCl (pH9.0) にて 1 回洗浄した。その後 10 mM DTT を含む PTS 溶液中にて樹脂を加熱し、結合タンパク質を溶出させ、PTS 法に従って消化した。

### ペプチドプルダウン (組換え PTP)

ペプチドプローブ固定化樹脂を 11 種の組換え PTP 混合物 (各 1.5 pmol) と細胞破碎液中にて 4 °C で 4 時間転倒混和した。その後、上清画分に対して新たなペプチドプローブ固定化樹脂を用いて再度 4 °C で 4 時間転倒混和した。各樹脂の洗浄、結

合タンパク質の溶出に関してはペプチドプルダウン（細胞抽出物）の項目に記した手法と同様に行った。

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理

組換え PTPN1 (0.5 pmol) を 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含んだ細胞破碎液中にて 25 °C で 5 分間攪拌した。攪拌後、アミコンウルトラ 10K を用いて細胞破碎液の交換を 5 回行った。その後、試料を半分に分け、一方をペプチドプルダウンに供し、もう一方はそのまま消化して LC/MS/MS で測定を行った。

### オルトバナジン酸処理

HEK293T 細胞抽出物に 1.5 mM オルトバナジン酸を添加後、4 °C で 1 時間転倒混和させた。

### NanoLC/MS/MS 分析

全ての NanoLC/MS/MS 分析は、Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific)、Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) または timsTOF Pro (Bruker) に Ultimate 3000 ポンプ (Thermo Fisher Scientific) および HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) を接続して実施した。カラムは Reprosil-C18 AQ (粒子径 3 μm または 1.9 μm) (Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany) を充填した自家製ニードルカラム (長さ 150 mm x 100 μm ID, 6 μm opening) を用いた。移動相には、(A) 0.5% 酢酸、(B) 0.5% 酢酸/80%アセトニトリルを用い、流速は 500 nL/min に設定した。移動相は、5-40%B で 20 分、40-100%B で 1 分のショートグラジエント、あるいは 5-10%B で 5 分、10-40%B で 60 分 (ミディアムグラジエント) または 100 分 (ロンググラジエント)、40-100%B で 5 分のグラジエントを採用した。

BioID 試料および *in vitro* キナーゼ反応によって得られたリン酸化ペプチドについては、Orbitrap Fusion Lumos を用いて測定した。MS1 スペクトルは *m/z* 300-1500 の範囲にて Orbitrap を用いて分解能 120,000 で取得し、その後の MS2 スペクトルは Orbitrap を用いて分解能 15,000 で取得した。MS1 および MS2 の Automatic gain control はそれぞれ 4e5、5e4 に設定した。HCD は 30 に設定した。

TMT 標識試料については、Orbitrap Fusion Lumos を用いて、SPS-MS3<sup>105</sup> を実施した。MS1 スペクトルは *m/z* 375-1500 の範囲にて Orbitrap で分解能 120,000、MS2 スペクトルは Ion Trap で Turbo モード、MS3 スペクトルは Orbitrap で分解能 15,000 にて取得した。MS1、MS2 および MS3 の Automatic gain control はそれぞれ 4e5、1e4 および 5e4 に設定した。CID は 35 に設定した。

合成ペプチド試料の場合、Q Exactive を用いて測定した。MS1 スペクトルは  $m/z$  300-1500 の範囲にて Orbitrap を用いて分解能 70,000 で取得し、MS2 スペクトルは Orbitrap を用いて分解能 17,500 にて取得した。MS1 および MS2 の Automatic gain control はそれぞれ  $3e6$ 、 $1e5$  に設定した。HCD は 27 に設定した。

細胞抽出物を用いた F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン実験では、Orbitrap Fusion Lumos を用いて、FAIMS によるイオン分離を CV = -40, -60, -80 で行いながら測定した。MS1 スペクトルは Orbitrap で  $m/z$  300-1500 の範囲にて分解能 120,000 で取得し、その後の MS/MS スキャンは Iontrap で Scan Rate = Rapid で取得した。MS1 および MS2 の Automatic gain control は 100 % に設定した。HCD は 30 に設定した。

組換え PTP を用いた F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン実験では、timsTOF Pro を用い、PASEF number は 10、Ramp time および Accumulation time は 100 ms、Duty cycle は 100 %、Scan range of 1/K0 は  $0.6-1.5 \text{ V} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ 、Target value for PASEF-MS/MS scan は 24,000、Scan range of  $m/z$  は 100-1700  $m/z$  に設定して測定した。

#### データベース検索

LC/MS/MS を用いたプロテオーム解析では、MaxQuant v1.6.17.0<sup>106</sup> を用いてデータベース検索を行った。合成ペプチド試料以外のペプチドとタンパク質は、SwissProt ヒトタンパク質データベース（2020年8月、20,368タンパク質）に対して Andromeda を用いた自動データベース検索により、プリカーサ質量許容値をファーストサーチでは 20 ppm、メインサーチでは 4.5 ppm、フラグメントイオン質量許容値を 20 ppm として同定した。消化酵素条件は Trypsin/P とし、最大二つの未切断部位を許容した。システインのカルバミドメチル化は固定修飾とした。メチオニン酸化とタンパク質の N 末端でのアセチル化は可変修飾とした。リン酸化プロテオームデータの際は、セリン、スレオニンおよびチロシン残基のリン酸化を可変修飾に追加した。False discovery rate は Peptide-spectrum match およびタンパク質についてそれぞれ算出し、1%未満とした。

BioID 試料ではキナーゼごとに、BirAk とコントロール 2 種の間で Match between run を行った。リン酸化ペプチド試料に関しては、キナーゼごとに、キナーゼ (+) 試料とキナーゼ (-) 試料間で Match between run を行った。F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン実験では、各 F<sub>2</sub>Pmp プローブとそれに対応するチロシンプローブ間においてのみ Match between run を行った。FAIMS を用いて取得した生データは FAIMS MzXML Generator ( <https://github.com/coongroup/FAIMS-MzXML->

Generator) を用いて CV ごとに MzXML ファイルを分割した後、MaxQuant にて解析した。

### データ解析

BioID 試料および細胞抽出物からの F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン試料（ラベルフリー）については、MaxQuant を使用して MS1 の各ペプチドのピーク面積を定量化した。欠損値は、Perseus v1.6.2.3 を用いて質量分析計の検出限界付近の値を代入した<sup>107</sup>。BirA\*キナーゼ群と対照群、あるいは F<sub>2</sub>Pmp プローブ群とチロシンプローブ群を比較する Welch の t 検定（両側）を実施した。以降の解析では、Majority protein IDs に記載されたタンパク質のうち、先頭のタンパク質を使用した。

細胞抽出物からの F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン試料（SILAC）については、MaxQuant を使用して MS1 の各ペプチドのピーク面積を定量化した。以降の解析では、Majority protein IDs に記載されたタンパク質のうち、先頭のタンパク質を使用した。各 EGF 投与時間における濃縮量の変動について、Ratio H/L normalized を用いて Perseus にて 1 標本 t 検定を行った。

TMT 標識試料については、MS3 におけるレポーターイオンのピーク強度を MaxQuant にて定量化した。欠損値は、Perseus を用いて質量分析計の検出限界付近の値を代入した。薬物処理群とコントロール群を比較する Welch の t 検定（両側）を行った。以下の解析では、Leading proteins に記載されたタンパク質のうち、先頭のタンパク質を使用した。

リン酸化ペプチド試料については、MaxQuant を使用して MS1 の各ペプチドのピーク面積を定量化した。以下の解析では、リン酸化部位の局在確率が 0.75 以上のリン酸化ペプチドのみを用いた。また、定量値はモノリン酸化ペプチド由来の情報のみを用いた。

合成ペプチドについては、MS1 における各ペプチドのピーク面積を MaxQuant で定量化し、以下のようにリン酸化率を算出した。

$$\text{Phosphorylation ratio (\%)} = \left(1 - \frac{\text{peak area}_{\text{Nonphosphopeptide (w/kinase)}}}{\text{peak area}_{\text{Nonphosphopeptide (w/o kinase)}}}\right) \times 100$$

組換え PTP の F<sub>2</sub>Pmp プローブによるプルダウン試料については、MaxQuant を使用して MS1 の各ペプチドのピーク面積を定量化した。その後の解析については、データ解析（解離定数の算出）項に記す。

PPI ネットワーク解析は、STRING version 11.0<sup>42</sup> を用いて行い、最も信頼性の高い PPI ネットワーク（スコア = 0.9）を使用した。

GO エンリッチメント解析は Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) version 6.8<sup>108,109</sup> を用いて実施した。Background データは、同一測定における全同定タンパク質とした。

クラスター解析は Perseus を用いてデフォルト設定のまま行った。

### PWM スコア

PWM の作成および PWM スコアの計算は、以下のように、今村らが以前に報告した通りに行った<sup>29</sup>。

第一章では CK2、ERK1 または PKA の *in vitro* 基質から位置  $i$  に残基  $x$  が観測される確率は以下のように計算される。

$$p(x, i) = \frac{f_{x,i} + c(x)}{N + \varepsilon}$$

$$c(x) = p(x) \cdot \varepsilon$$

ここで、 $f_{x,i}$  は  $i$  の位置におけるアミノ酸  $x$  の出現回数、 $N$  は全基質配列総数、 $\varepsilon$  は擬似カウント、 $p(x)$  はヒトプロテオーム中のアミノ酸  $x$  の出現確率を表す。擬似カウント  $\varepsilon$  の値として配列総数の平方根 ( $\sqrt{N}$ ) を用いた。続いて、 $p(x)$  を Background 確率とし、以下のように PWM における各要素  $w_{x,i}$  を算出し、PWM を抽出した。

$$w_{x,i} = \log_2 \frac{p(x, i)}{p(x)}$$

各キナーゼ/基質ペアに関する PWM スコアは以下の式を用いて計算した。ここで、 $q_i$  は  $q$  の  $i$  番目のアミノ酸を表す。

$$\lambda = \sum_{i=1}^l W_{q_i, i}$$

第一章では、各リン酸化部位の周囲にある  $\pm 7$  残基を使用して PWM スコアを計算した。

第二章では、チロシンホスファターゼの *in vitro* 基質情報は先行研究から入手した。Background データは先行研究で用いられた全 pY 配列、基質データは先行研究内で PTP が value > 2 で結合した pY 配列とした。PWM の作成および PWM スコアの計算は、第一章と同様に行った。本章では、各リン酸化部位の周囲  $\pm 5$  残基を使用して PWM スコアを計算した。

### 解離定数の算出

プルダウン 1 回目または 2 回目のどちらで、三回の反復実験のうち二回以上定量された PTP のみを以下の解析に採用し、欠損値は同一の測定内の他の PTP の中で最小



の強度を代入した。解離定数  $K_d$  の算出は Sharma らが以前に報告した通り<sup>78</sup> に行い、以下の式を用いた。

$$r = \frac{\text{Intensity (pulldown 1st)}}{\text{Intensity (pulldown 2nd)}}$$

$$K_d = \frac{[\text{Peptide}] \times r}{1 - r}$$

また、三回の反復実験のうち、一回でも  $r$  が 1 より大きい PTP に関しては  $K_d$  値の算出対象から除外した。

### pY 部位周辺のモチーフ解析

モチーフ抽出には rmotifx (min.seq=1,000、 $p$ -value cutoff=1e-6) を用いた。Background データは SwissProt ヒトタンパク質データベース (2017\_04) 中のチロシン残基周辺のアミノ酸配列、Foreground データは PhosphoSitePlus に登録されている全 pY 配列を用いた。



## 引用文献

1. Olsen, J. V. et al. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* 3, ra3 (2010).
2. Sharma, K. et al. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep.* 8, 1583–1594 (2014).
3. Chen, M. J., Dixon, J. E. & Manning, G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci. Signal.* 10, (2017).
4. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934 (2002).
5. Vainonen, J. P., Momeny, M. & Westermarck, J. Druggable cancer phosphatases. *Sci. Transl. Med.* 13, (2021).
6. Bantscheff, M. et al. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 25, 1035–1044 (2007).
7. Needham, E. J., Parker, B. L., Burykin, T., James, D. E. & Humphrey, S. J. Illuminating the dark phosphoproteome. *Sci. Signal.* 12, (2019).
8. Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J.* 280, 346–378 (2013).
9. Aebersold, R. et al. How many human proteoforms are there? *Nat. Chem. Biol.* 14, 206–214 (2018).
10. Hornbeck, P. V. et al. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 43, D512–20 (2015).
11. Humphrey, S. J., Azimifar, S. B. & Mann, M. High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nat. Biotechnol.* 33, 990–995 (2015).
12. Bekker-Jensen, D. B. et al. Rapid and site-specific deep phosphoproteome profiling by data-independent acquisition without the need for spectral libraries. *Nat. Commun.* 11, 787 (2020).
13. Sugiyama, N. Mass Spectrometry-Based Discovery of Kinome Substrates. *Mass Spectrom.* 9, A0082 (2020).
14. Ochoa, D. et al. The functional landscape of the human phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* 38, 365–373 (2020).
15. Dinkel, H. et al. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites--update 2011. *Nucleic Acids Res.* 39, D261–7 (2011).
16. Keshava Prasad, T. S. et al. Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic Acids Res.* 37, D767–72 (2009).
17. Knebel, A., Morrice, N. & Cohen, P. A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta. *EMBO J.* 20, 4360–4369 (2001).
18. Ptacek, J. et al. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679–684 (2005).

19. Wang, C. et al. Determination of CK2 specificity and substrates by proteome-derived peptide libraries. *J. Proteome Res.* 12, 3813–3821 (2013).
20. Newman, R. H. et al. Construction of human activity-based phosphorylation networks. *Mol. Syst. Biol.* 9, 655 (2013).
21. Sugiyama, N. & Ishihama, Y. Large-scale profiling of protein kinases for cellular signaling studies by mass spectrometry and other techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130, 264–272 (2016).
22. Sugiyama, N., Imamura, H. & Ishihama, Y. Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. *Sci. Rep.* 9, 10503 (2019).
23. Imamura, H., Sugiyama, N., Wakabayashi, M. & Ishihama, Y. Large-Scale Identification of Phosphorylation Sites for Profiling Protein Kinase Selectivity. *Journal of Proteome Research* vol. 13 3410–3419 (2014).
24. Imami, K. et al. Temporal profiling of lapatinib-suppressed phosphorylation signals in EGFR/HER2 pathways. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1741–1757 (2012).
25. Pan, C., Olsen, J. V., Daub, H. & Mann, M. Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 2796–2808 (2009).
26. Kim, J.-Y. et al. Dissection of TBK1 signaling via phosphoproteomics in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12414–12419 (2013).
27. Chen, Z. et al. Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics. *Nat. Commun.* 10, 104 (2019).
28. Bodenmiller, B. et al. Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast. *Sci. Signal.* 3, rs4 (2010).
29. Imamura, H. et al. Identifications of Putative PKA Substrates with Quantitative Phosphoproteomics and Primary-Sequence-Based Scoring. *J. Proteome Res.* 16, 1825–1830 (2017).
30. Xue, L. et al. Sensitive kinase assay linked with phosphoproteomics for identifying direct kinase substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5615–5620 (2012).
31. Arrington, J., Xue, L., Wang, W.-H., Geahlen, R. L. & Tao, W. A. Identification of the Direct Substrates of the ABL Kinase via Kinase Assay Linked Phosphoproteomics with Multiple Drug Treatments. *J. Proteome Res.* 18, 1679–1690 (2019).
32. Linding, R. et al. Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129, 1415–1426 (2007).
33. Yachie, N., Saito, R., Sugiyama, N., Tomita, M. & Ishihama, Y. Integrative features of the yeast phosphoproteome and protein-protein interaction map. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1001064 (2011).
34. Wagih, O., Sugiyama, N., Ishihama, Y. & Beltrao, P. Uncovering Phosphorylation-Based Specificities through Functional Interaction Networks. *Mol. Cell. Proteomics* 15, 236–245 (2016).
35. Amano, M. et al. A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase. *PLoS One* 5, e8704 (2010).

36. Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 196, 801–810 (2012).
37. Rhee, H.-W. et al. Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* 339, 1328–1331 (2013).
38. Cutler, J. A. et al. Differential signaling through p190 and p210 BCR-ABL fusion proteins revealed by interactome and phosphoproteome analysis. *Leukemia* 31, 1513–1524 (2017).
39. Liu, X. et al. An AP-MS- and BioID-compatible MAC-tag enables comprehensive mapping of protein interactions and subcellular localizations. *Nat. Commun.* 9, 1188 (2018).
40. Méant, A. et al. Proteomic Analysis Reveals a Role for RSK in p120-catenin Phosphorylation and Melanoma Cell-Cell Adhesion. *Mol. Cell. Proteomics* 19, 50–64 (2020).
41. Cox, J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2513–2526 (2014).
42. 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).
43. Lehnert, S., Götz, C., Kartarius, S., Schäfer, B. & Montenarh, M. Protein kinase CK2 interacts with the splicing factor hPrp3p. *Oncogene* 27, 2390–2400 (2008).
44. Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J* 369, 1–15 (2003).
45. Whittard, J. D. & Akiyama, S. K. Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J. Cell Sci.* 114, 3265–3272 (2001).
46. Buljan, M. et al. Kinase Interaction Network Expands Functional and Disease Roles of Human Kinases. *Mol. Cell* 79, 504–520.e9 (2020).
47. Siddiqui-Jain, A. et al. CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res.* 70, 10288–10298 (2010).
48. Seamon, K. B., Daly, J. W., Metzger, H., de Souza, N. J. & Reden, J. Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. *J. Med. Chem.* 26, 436–439 (1983).
49. Sugiyama, N. et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1103–1109 (2007).
50. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190 (2004).
51. Wasserman, W. W. & Sandelin, A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* 5, 276–287 (2004).
52. Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J. & Mann, M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.014050 (2012).

53. Trembley, J. H. et al. Activation of pre-mRNA splicing by human RNPS1 is regulated by CK2 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1446–1457 (2005).
54. Wagih, O., Reimand, J. & Bader, G. D. MIMP: predicting the impact of mutations on kinase-substrate phosphorylation. *Nat. Methods* 12, 531–533 (2015).
55. Reimand, J., Wagih, O. & Bader, G. D. The mutational landscape of phosphorylation signaling in cancer. *Sci. Rep.* 3, 2651 (2013).
56. Caretta, A. & Mucignat-Caretta, C. Protein kinase a in cancer. *Cancers* 3, 913–926 (2011).
57. Chua, M. M. J. et al. CK2 in Cancer: Cellular and Biochemical Mechanisms and Potential Therapeutic Target. *Pharmaceuticals* 10, (2017).
58. Gao, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 6, 11 (2013).
59. Cerami, E. et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2, 401–404 (2012).
60. Oughtred, R. et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci.* 30, 187–200 (2021).
61. Samavarchi-Tehrani, P., Samson, R. & Gingras, A.-C. Proximity Dependent Biotinylation: Key Enzymes and Adaptation to Proteomics Approaches. *Mol. Cell. Proteomics* 19, 757–773 (2020).
62. Klaeger, S. et al. The target landscape of clinical kinase drugs. *Science* 358, (2017).
63. Schmitt, J. M. & Stork, P. J. S. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol. Cell* 9, 85–94 (2002).
64. Julien, S. G., Dubé, N., Hardy, S. & Tremblay, M. L. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat. Rev. Cancer* 11, 35–49 (2011).
65. Saraon, P. et al. Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene* 40, 4079–4093 (2021).
66. Alonso, A. & Pulido, R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J.* 283, 2197–2201 (2016).
67. Lyons, S. P. et al. A Quantitative Chemical Proteomic Strategy for Profiling Phosphoprotein Phosphatases from Yeast to Humans. *Mol. Cell. Proteomics* 17, 2448–2461 (2018).
68. Karisch, R. et al. Global proteomic assessment of the classical protein-tyrosine phosphatome and 'Redoxome'. *Cell* 146, 826–840 (2011).
69. Liu, S. et al. Aryl vinyl sulfonates and sulfones as active site-directed and mechanism-based probes for protein tyrosine phosphatases. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8251–8260 (2008).
70. Kumar, S. et al. Activity-based probes for protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7943–7948 (2004).
71. Kalesh, K. A. et al. Peptide-based activity-based probes (ABPs) for target-specific profiling of protein tyrosine phosphatases (PTPs). *Chem. Commun.* 46, 589–591 (2010).
72. Casey, G. R. & Stains, C. I. Interrogating Protein Phosphatases with Chemical Activity Probes. *Chemistry* 24, 7810–7824 (2018).

73. 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).
74. Meyer, C., Hoeger, B., Chatterjee, J. & Köhn, M. Azide-alkyne cycloaddition-mediated cyclization of phosphonopeptides and their evaluation as PTP1B binders and enrichment tools. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 2848–2853 (2015).
75. Meyer, C. et al. Development of Accessible Peptidic Tool Compounds To Study the Phosphatase PTP1B in Intact Cells. *ACS Chemical Biology* vol. 9 769–776 (2014).
76. Tsumagari, K., Niinae, T., Otaka, A. & Ishihama, Y. Peptide probes containing a non-hydrolyzable phosphotyrosine-mimetic residue for enrichment of protein tyrosine phosphatases. *Proteomics* e2100144 (2021).
77. Palma, A. et al. Both Intrinsic Substrate Preference and Network Context Contribute to Substrate Selection of Classical Tyrosine Phosphatases. *J. Biol. Chem.* 292, 4942–4952 (2017).
78. Sharma, K. et al. Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts. *Nat. Methods* 6, 741–744 (2009).
79. Zhang, Y. L. et al. Thermodynamic study of ligand binding to protein-tyrosine phosphatase 1B and its substrate-trapping mutants. *J. Biol. Chem.* 275, 34205–34212 (2000).
80. Damle, N. P. & Köhn, M. The human DEPhOosphorylation Database DEPOD: 2019 update. *Database* 2019, (2019).
81. Guo, Y. et al. Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 24813–24825 (2004).
82. Burke, T. R., Jr et al. Nonhydrolyzable phosphotyrosyl mimetics for the preparation of phosphatase-resistant SH2 domain inhibitors. *Biochemistry* 33, 6490–6494 (1994).
83. Schulze, W. X., Deng, L. & Mann, M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* 1, 2005.0008 (2005).
84. Tinti, M. et al. The SH2 domain interaction landscape. *Cell Rep.* 3, 1293–1305 (2013).
85. Lundby, A. et al. Oncogenic Mutations Rewire Signaling Pathways by Switching Protein Recruitment to Phosphotyrosine Sites. *Cell* 179, 543–560.e26 (2019).
86. Hanke, S. & Mann, M. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 519–534 (2009).
87. Benes, C. H. et al. The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* 121, 271–280 (2005).
88. Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Wu, N., Asara, J. M. & Cantley, L. C. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452, 181–186 (2008).
89. Huang, C.-F. & Mrksich, M. Profiling Protein Tyrosine Phosphatase Specificity with Self-Assembled Monolayers for Matrix-Assisted Laser

- Desorption/Ionization Mass Spectrometry and Peptide Arrays. *ACS Comb. Sci.* 21, 760–769 (2019).
90. Selner, N. G. et al. Diverse levels of sequence selectivity and catalytic efficiency of protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry* 53, 397–412 (2014).
  91. Irving, E. & Stoker, A. W. Vanadium Compounds as PTP Inhibitors. *Molecules* 22, (2017).
  92. Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A. & Böhmer, F.-D. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *J. Biochem.* 150, 345–356 (2011).
  93. Londhe, A. D. et al. Regulation of PTP1B activation through disruption of redox-complex formation. *Nat. Chem. Biol.* 16, 122–125 (2020).
  94. Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. & Rhee, S. G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366–15372 (1998).
  95. Kumar, S. et al. Global analysis of protein tyrosine phosphatase activity with ultra-sensitive fluorescent probes. *J. Proteome Res.* 5, 1898–1905 (2006).
  96. Olsen, J. V. et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635–648 (2006).
  97. Talha, S. & Harel, L. Early effect of growth factors (EGF + insulin) upon ATP turnover in 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 149, 471–481 (1983).
  98. Emmerson, K. & Roehrig, K. Epidermal growth factor (EGF) stimulation of ATP citrate lyase activity in isolated rat hepatocytes is age dependent. *Comp. Biochem. Physiol. B* 103, 663–667 (1992).
  99. Makukhin, N. & Ciulli, A. Recent advances in synthetic and medicinal chemistry of phosphotyrosine and phosphonate-based phosphotyrosine analogues. *RSC Med Chem* 12, 8–23 (2020).
  100. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134 (2010).
  101. Barr, A. J. et al. Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* 136, 352–363 (2009).
  102. Coles, C. H. et al. Proteoglycan-specific molecular switch for RPTP $\alpha$  clustering and neuronal extension. *Science* 332, 484–488 (2011).
  103. 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).
  104. Masuda, T., Tomita, M. & Ishihama, Y. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *J. Proteome Res.* 7, 731–740 (2008).
  105. McAlister, G. C. et al. MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cell line proteomes. *Anal. Chem.* 86, 7150–7158 (2014).
  106. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372 (2008).
  107. Tyanova, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740 (2016).



108. 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).
109. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13 (2009).



## 発表論文

### 第1章：

1. Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs

Tomoya Niinae, Koshi Imami, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama

2021年6月27日発行 *Molecular & Cellular Proteomics* (2021) 20 巻 論文番号 100119

doi: 10.1016/j.mcpro.2021.100119. に掲載

### 第2章：

2. Peptide probes containing a non-hydrolyzable phosphotyrosine-mimetic residue for enrichment of protein tyrosine phosphatases

Kazuya Tsumagari, Tomoya Niinae, Akira Otaka, Yasushi Ishihama

2021年10月29日発行 *Proteomics* (2021) 論文番号 e2100144

doi: 10.1002/pmic.202100144. に掲載

### その他：

3. Identifications of Putative PKA Substrates with Quantitative Phosphoproteomics and Primary-Sequence-Based Scoring

Haruna Imamura, Omar Wagih, Tomoya Niinae, Naoyuki Sugiyama, Pedro Beltrao, Yasushi Ishihama

2017年3月15日発行 *Journal of Proteome Research*(2017)第16巻4号1825~1830 頁

doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00087. に掲載

4. 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* (2021) 第296巻100673

doi: 10.1016/j.jbc.2021.100673. に掲載

5. Biotinylation-based proximity labelling proteomics: basics, applications and technical considerations

Tomoya Niinae, Yasushi Ishihama, Koshi Imami

2021年12月28日発行 *Journal of Biochemistry* (2021) 第170巻5号569~576 頁

doi: 10.1093/jb/mvab123. に掲載



## 謝辞

本研究を行うに当たり、終始ご指導を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野 石濱泰 教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行を基礎から指導して頂きました、京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野 杉山直幸 准教授、今見考志 特任講師、吉沢明康 特定助教、小形公亮 特定助教、並びに京都大学薬学研究科 創薬プロテオミクス分野 金尾英佑 助教に深く感謝申し上げます。

さらに、日々の研究において御討議を頂き大変お世話になり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 製剤機能解析学分野 田畑剛 氏、金子（今村）春菜 博士、高橋知里 博士、津曲和哉 博士、京都大学大学院薬学研究科 製剤機能解析学分野の卒業生並びに在学生の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究を行うに当たり、ペプチド合成に関するご指導をいただいた京都薬科大学 薬品化学分野 大石真也 教授、京都大学大学院薬学研究科ケモゲノミクス・薬品有機製造学分野 大野浩章 教授、並びに大野研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

研究生生活を過ごすに当たり、藤多仁生奨学金の給付により経済的支援をして下さった故藤多哲朗 名誉教授、ご遺族並びにご関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究の一部は JSPS 特別研究員奨励費（21J15068）の援助を受けて行ったものであり、感謝致します。

最後に、これまでの研究生生活を支えてくれた家族に心より感謝致します。