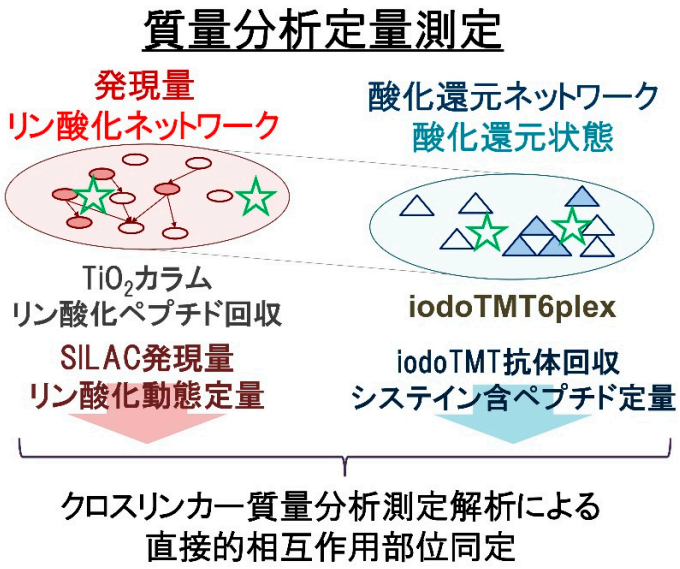
113　翻訳後修飾の動的多層制御に基づく革新的定量解析	新木　和孝

【目的】タンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質機能や活性の制御を通して生命現象の恒常性維持に重要な役割を果たしている。プロテオミクス分野では近年、測定機器の精度向上や周辺技術の進展により、発現量や翻訳後修飾などのタンパク質関連情報の定量法が開発されてきている。しかしながら、複数の翻訳後修飾の連関性やクロストークに関する計測はこれまでほとんど行われていなかった。そこで本研究では、代表的翻訳後修飾であるリン酸化と酸化修飾の動的なクロストークをとらえるための定量解析系の構築と、直接的なクロストークを検出するための相互作用同定技術の開発を進めた。

【方法】リン酸化修飾状態の定量解析にはチタンカラム等を用いたリン酸化ペプチド回収技術を利用し、酸化還元状態の定量化には、還元状態と可逆的酸化状態のシステイン残基を安定同位体型の質量の異なる isobaric ラベル体でそれぞれ修飾することにより定量化を行った。また、システイン残基を介した相互作用部位同定手法の構築を試みた。

【結果】本研究により、定量化計測法の高度化とともに、レドックス反応性の高いシステイン残基を中心とする相互作用部位の同定につながる実験系の構築に成功した。これらの技術は、システイン残基を介したタンパク質間のクロストークを中心に、シグナル伝達経路を検証する上でも有用性の高いツールと考えられる。

プロテオミクス定量技術に基づく翻訳後修飾間の連関性解析



113. 翻訳後修飾の動的多層制御に基づく革新的定量解析

新木　和孝

産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター システム数理統合チーム

Key words：プロテオミクス，翻訳後修飾，リン酸化，酸化還元

緒　言

タンパク質の翻訳後修飾は、リン酸化修飾を代表として、細胞の増殖の調節や酵素の活性、細胞内シグナル伝達などに関わっており、細胞内の恒常性（プロテオスタシス）を維持する上でも重要な役割を果たしている。このような翻訳後修飾は、遺伝子解析ではなく、タンパク質を直接解析する必要があるため、質量分析測定（プロテオミクス）技術が、翻訳後修飾を大規模に解析するに際して大きな役割を果たしている［1，2］。

現在プロテオミクスの分野では、測定機器の精度や感度の向上と技術進展により、定性解析から定量解析に向けた動きがあり、発現量や翻訳後修飾を含めたタンパク質関連情報の定量法が開発されてきている。ショットガンプロテオミクスによる手法として、スペクトルカウントやペプチドイオン強度情報をもとにした定量法、SILAC（stable isotope labeling with amino acid in cell culture）などを利用した *in vivo* 標識法、non-isobaric や isobaric タグ試薬による *in vitro* 標識法などが考案され、実用化されている［3］。

翻訳後修飾の中でも、近年特に活性酸素（Reactive Oxygen Species：ROS）の発生による酸化ストレスが、多岐に渡る生命現象や疾患とも密接に関わっていることに注目が集まっている。例えば、生活習慣に起因する動脈硬化や糖尿病等の疾患、加齢に伴う生体機能の低下や神経変性疾患、さらにはがん発生の原因（酸化修飾）とも密接に関与していることが知られている［4］。生物学的にも重要な役割を果たしている多くの生体因子の活性が、その活性中心付近などに存在する酸化還元反応性の高いシステイン残基の酸化還元状態で制御されていることが報告されている。例えば、シグナル伝達に関与する因子として AMPK、ASK1、HIF、KEAP、JNK、NFκB、PTEN、p53、Src、代謝に関わる GAPDH、PKM なども、その活性中心近傍のシステイン残基の酸化還元状態の変化に応じて、その活性が制御されている。さらに、ROS 自体がシグナル仲介分子であり、シグナル伝達と密接に関係していることも明らかになっている［5］。このような酸化ストレスによる生体への影響を検出するに際して、これまでの技術では、蛍光・化学発光プローブといったマクロの酸化還元状態の検出であったり、対象を絞った細胞内因子の酸化状態を検出することが多く、生体内で起きている可逆的な生体応答反応を大規模に定量検出することが困難であった。

また、これまでの研究では、複数の翻訳後修飾の連関性やクロストークに関して、体系的に計測定量する研究が余りされていない。そこで本研究では、酸化修飾とリン酸化シグナルネットワークの動的なクロストークをとらえるための定量解析系の構築と同時に、直接的なクロストークを検出するためのタンパク質間相互作用同定技術の開発を進めた。

方　法

これまでの研究で、チタンカラム等を用いたリン酸化ペプチド回収技術を確立しており、一度の測定において 10,000 サイト程度の細胞内リン酸化部位の同定が可能になっている。また、細胞内レドックス状態の網羅的定量方法に関して、システイン残基の還元状態と可逆的酸化状態の量比を定量する実験系を確立してきた［6］。システイン残基は、ROS への反応性が高いチオール基（-SH）をもち、酸化ストレスの惹起時にチオール基に可逆的・不可逆的翻訳後修飾が生じる。よって、システイン残基の還元状態と可逆的酸化状態の量比を定量することによって、細胞内の酸化還元状態を評価することが可能である。還元状態と可逆的酸化状態のシステイン残基を、安定同位体型の質量の異なるラベル体

で別々に修飾し、質量分析測定技術を用いてそれぞれのシステイン残基を区別しながら、その存在量を同時定量することが可能である（図 1）。

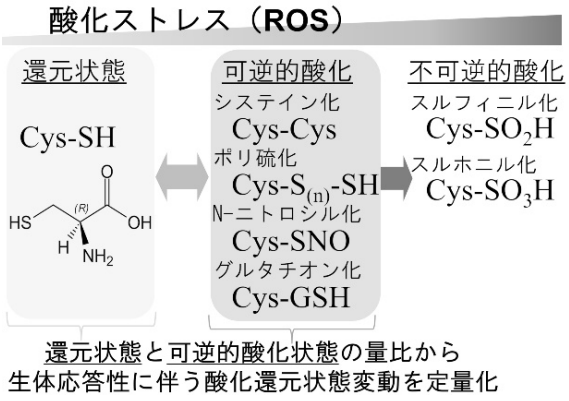


図 1. システイン残基の可逆的酸化還元状態の定量化

可逆的酸化状態と還元状態にあるシステイン残基の量を定量化することにより、生体応答に伴う細胞内酸化還元状態変動を定量化する。

具体的には、異なる質量をもつリポーター部位とバランサー部位とを組み合わせて同一の質量をもたせた isobaric 試薬により標識する。Isobaric タグ法においては、標識後のペプチド質量は全て同一となり、MS スペクトルにおいて単一のピークとして検出される。このペプチドは衝突誘起解離によって、リポーターとバランサーとのあいだが切断され、MS/MS スペクトルの低質量領域に、質量が 1 Da ずつ異なるリポーターイオンが検出される。これらのシグナルの強度を測定することによって、試料のあいだの相対量比を示すことが可能である。IodoTMT（Iodoacetyl Tandem Mass Tag）と呼ばれる試薬は、システイン残基を修飾するチオール反応基とともに、6 種類のレポーターが用意されている（図 2）。

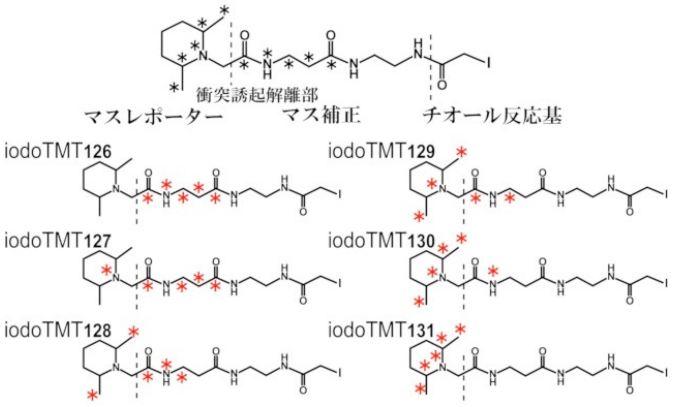


図 2. システイン残基をターゲットにしたアイソバリック（同位体異性体）標識タグ

システイン残基を修飾するチオール反応基とともに、6 種類の同位体異性体標識タグが用意されている。

この技術を用いて、酸化ストレス H_2O_2 や還元ストレス DTT を施した細胞のシステイン残基の酸化還元状態を定量解析した。ストレス条件ごとに、異なる質量をもつ安定同位体型ラベル剤でシステイン残基を修飾し、その後、iodoTMT に対する抗体でシステイン残基を含むペプチドを精製回収し、それらを質量分析測定で見分けて定量測定した。細胞回収時には、強酸である TCA（トリクロロ酢酸）沈殿を行い、細胞内酸化還元状態を固定した状態で酸化還元状態の定量解析を行った（図 3）。

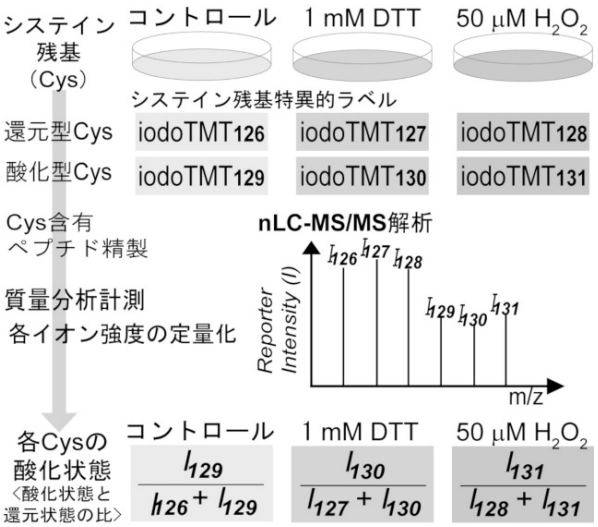


図 3. システイン残基の酸化還元状態の定量化法

還元型と酸化型システイン残基を分子量の異なる iodoTMT で修飾し、MS/MS により検出されるマスレポーターの強度比で、還元型と酸化型の量比を定量した。

結果と考察

HEK293T 細胞を用い、未処理細胞をコントロールとして、酸化ストレス 50 μM H_2O_2、還元ストレス 1 mM DTT を添加し、5 分後の酸化還元状態変動を解析した。以前の論文発表時においては、計 1,700 程度のシステイン残基を同定し、そのうち定量化(n≧3)に利用できたシステイン残基は 540 残基ほどであった。今回、精製条件や測定解析条件などの再検討を行った結果、質量分析測定で 4,000 程度のシステイン残基の同定と、1,000 程度のシステイン残基の酸化還元状態定量が一度に可能になった。

これらのシステイン残基の酸化状態を検証した結果、未処理細胞においては平均 24.4%が酸化状態にあり、DTT 添加 5 min 後では平均 20.4%、H_2O_2 添加 5 min 後では平均 22.9%の酸化状態であった。この結果からも観察されている通り、DTT 処理によって、システイン残基の多くはより還元的な状態に移行していた。一方、H_2O_2 処理においては、予想外にも、有意差を伴って酸化状態に移行したペプチドが極めて少なく、H_2O_2 特異的ともいえるレドックス反応性の高いタンパク質群が酸化状態に移行していた（図 4)。これは、レドックスセンサーなどを用いたマクロの酸化還元状態定量だけではなく、個別システイン残基の状態を定量化することが、生体応答の正確な理解に必須と考えられた。

また本研究での課題でもある、異なる翻訳後修飾間の連関性を直接的に捉えるために、レドックス反応性の高いタンパク質を中心とする相互作用解析技術も構築中である。その技術の一つとして、DVSF と呼ばれるシステイン残基同士を固定化する試薬を用いた酸化還元（レドックス）カスケード検出法の考案を行っている［7, 8］。クロスリンカーにより架橋されたタンパク質分子を同定するだけでなく、クロスリンカーにより修飾された結合部位を同定し、タンパク質間相互作用のトポロジーや反応部位情報を得ることが可能になりつつある。この技術を用いることで、システイン残基を介したシグナル伝達の直接的なクロストークの同定につなげることが可能になると考えている。

本研究で開発した手法を用いて、細胞内の酸化状態といったプロテオスタシス状態を観察する上で、有用性の高いツールになることが考えられる。今後は、本手法をさらに発展させ、細胞内の酸化プロファイル状態を基礎とした、疾患メカニズム解析や創薬への基礎技術として活用していく予定である。

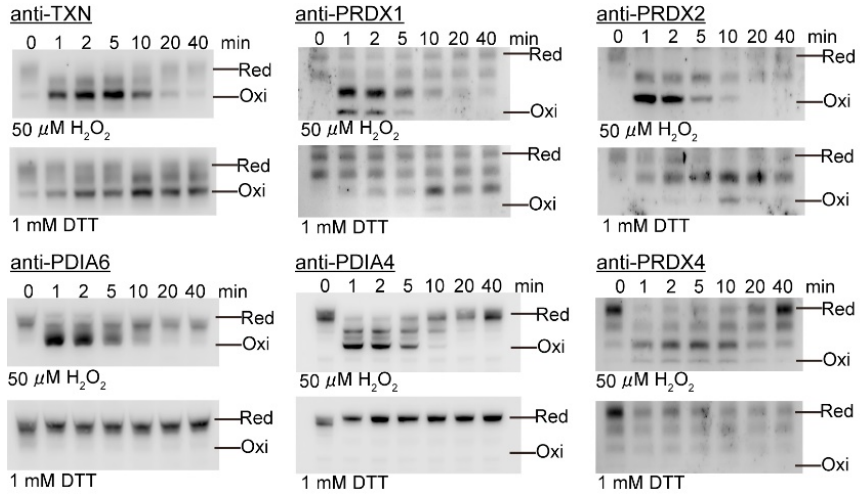


図 4. 細胞内レドックス関連酵素の酸化還元状態の追跡

TCA沈殿により各サンプルを回収後、還元型システイン残基のみをPEG-2000-maleimideにて修飾した。還元型システイン残基が存在するほど分子量サイズが大きくなることを利用し、ストレス条件下での各レドックス関連酵素の酸化還元状態を追跡した。図中に示すRedが完全に還元した状態、Oxiが完全に酸化状態にあることを示している。いずれのタンパク質も、内在性抗体を用いて検出した。TXNはthioredoxinを示している。酸化ストレス（H_2O_2）処理後の時間経過を観察すると、いずれの酸化還元酵素も酸化状態に移行後、元の還元状態に戻る傾向が観察された。還元ストレス（DTT）処理においては、thioredoxinやPRDX1は酸化状態に移行し、一方でPDIA6やPDIA4とは還元状態のまま留まることが観察された。このことからも、個別の酸化還元状態を観察することが、生体内の応答を適切に理解する上で重要であることが考えられた。この結果と同等の酸化還元状態の変化が、質量分析測定による定量結果からも観察された。

謝　辞

最後になりましたが、本研究課題に助成いただいた上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek M-C, Yates JR. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. Chem Rev. 2013 Apr 10;113(4):2343–2394. PMID: 23438204 DOI: 10.1021/cr3003533

2） Riley NM, Coon JJ. Phosphoproteomics in the Age of Rapid and Deep Proteome Profiling. Anal Chem. 2016 Jan 5;88(1):74–94. PMID: 26539879 DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04123

3） Gillet LC, Leitner A, Aebersold R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. Annu Rev Anal Chem. 2016 Jun 12;9(1):449–472. PMID: 27049628 DOI: 10.1146/annurev-anchem-071015-041535

4） Mittler R. ROS Are Good. Trends Plant Sci. 2017 Jan 5;22(1):11–19. PMID: 27666517 DOI: 10.1016/j.tplants.2016.08.002

5） Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Jun;15(6):411–21. PMID: 24854789 DOI: 10.1038/nprot.2017.040

6) Araki K, Kusano H, Sasaki N, Tanaka R, Hatta T, Fukui K, Natsume T. Redox Sensitivities of Global Cellular Cysteine Residues under Reductive and Oxidative Stress. J Proteome Res. 2016 Aug 5;15(8):2548–2559. PMID: 27350002 DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00087

7) Araki K, Ushioda R, Kusano H, Tanaka R, Hatta T, Fukui K, Nagata K, Natsume T. A crosslinker-based identification of redox relay targets. Anal Biochem. 2017 Mar 1;520(1):22–26. PMID: 28048978 DOI: 10.1016/j.ab.2016.12.025

8) Araki K, Suenaga A, Kusano H, Tanaka R, Hatta T, Natsume T, Fukui K. Functional profiling of asymmetrically-organized human CCT/TRiC chaperonin. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Dec 9;481(3–4):232–238. PMID: 27806916 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.120