

質量分析装置によるリン酸化ペプチドの測定法の開発  
および応用に関する研究

保健科学研究科保健科学専攻 研究生

20R101 井野 洋子

研究指導教員 長田 誠 教授

## 論文要旨

### 質量分析装置によるリン酸化ペプチドの測定法の開発および 応用に関する研究

群馬パース大学大学院 保健科学研究科

20R101 井野 洋子

タンパク質のリン酸化は、細胞内シグナル伝達などの重要な生命現象に関わる翻訳後修飾として、古くから研究されてきた。近年は、リン酸化タンパク質/ペプチド濃縮技術と高性能質量分析装置の発展に伴い、リン酸化タンパク質解析（リン酸化プロテオミクス）は世間一般に浸透している。しかし、非リン酸化タンパク質に比べてリン酸化タンパク質の割合は低く、質量分析前のリン酸化ペプチド濃縮操作は必要不可欠である。濃縮操作の精度がリン酸化プロテオミクスの結果に影響を及ぼすことから、サンプルに適した濃縮手法を選択することは大変重要なことである。

私たちは4種類のリン酸化ペプチド濃縮ビーズを比較し、様々なサンプルに対する最適な濃縮方法を調べた。この研究により **Phos-tag** 磁気ビーズを用いた手法は、血清消化物などの非リン酸化ペプチドを多く含むサンプル中からのリン酸化ペプチド濃縮に適していることが明らかとなった。そのため応用実験として、血清同様に非リン酸化ペプチドを多く含む細胞培養上清からの **SARS-CoV-2** のリン酸化ペプチド濃縮に **Phos-tag** 磁気ビーズ手法を活用した。その結果、ヌクレオカプシドタンパク質の **Ser79** のリン酸化が **Pin1** との結合に重要であることを明らかにした。さらに、その相互作用がウイルス粒子の安定性と感染性に寄与している可能性が示唆された。

キーワード：プロテオミクス、リン酸化修飾、**Phos-tag**、**SARS-CoV2**

## Contents (目次)

### 第1章. 序論

1-1. 生体内におけるタンパク質のリン酸化とシグナル伝達系 (P. 1-2)

1-2. リン酸化タンパク質解析の重要性 (P. 2-3)

1-3. リン酸化タンパク質の解析技術 (P. 3)

1-4. リン酸化タンパク質解析技術における課題 (P. 3-4)

1-5. 本研究の目的 (P. 4)

引用文献 (P. 4-8)

### 第2章. 質量分析装置を用いたプロテオミクスのためのリン酸化ペプチド濃縮手法の評価

2-1. 緒言 (P. 9)

2-2. 材料と方法 (P. 10-12)

2-3. 結果 (P. 12-15)

2-4. 考察 (P. 15-18)

2-5. 結語 (P. 18)

図・表 (P. 19-33)

引用文献 (P. 34-37)

### 第3章. Phos-tag 技術を用いたリン酸化ペプチド濃縮法による SARS-CoV-2 のヌクレオカプシドタンパク質の機能的リン酸化解析に関する研究

3-1. 緒言 (P. 38)

3-2. 材料と方法 (P. 39-42)

3-3. 結果 (P. 42-45)

3-4. 考察 (P. 45-49)

3-5. 結語 (P. 49)

図・表 (P. 50-62)

引用文献 (P. 63-68)

### 第4章. 総括 (P. 69)

用語集 (P. 70-74)

## 第 1 章. 序論

### 1-1. 生体内におけるタンパク質のリン酸化とシグナル伝達系

生体内で合成されるタンパク質のほとんどは、翻訳中あるいは翻訳後になんらかの修飾を受ける。同じ遺伝子に由来するタンパク質であっても、修飾の違いにより、その機能や局在などが異なることから、翻訳後の修飾はタンパク質の活性を調節する役割を持つと思われる<sup>(1)</sup>。特に、リン酸化修飾は、細胞内シグナル伝達機構を制御しており、最も広く研究されている翻訳後の修飾として認識されている<sup>(2)</sup>。また、タンパク質のリン酸化修飾は、リン酸化酵素（キナーゼ；kinase）により、ATP からリン酸基が転移される反応で、真核細胞では主にセリン、スレオニンあるいはチロシン残基に生じる<sup>(3)</sup>。リン酸化される主なアミノ酸残基は、セリンが 86.4%、スレオニンが 11.8%、次いでチロシンが 1.8%であることが推定されている<sup>(4)</sup>。一方で、リン酸基の脱離は、脱リン酸化酵素（フォスファターゼ；phosphatase）によって生じる<sup>(5)</sup>。このように、可逆的なリン酸化修飾は、タンパク質分子の機能において、スイッチのオン・オフに例えることができ、細胞内シグナル伝達系において主要な役割を担っている<sup>(6, 7)</sup>。例えば、多くの細胞増殖因子あるいはサイトカイン受容体タンパク質は、チロシンキナーゼ活性を持っており、受容体自身ならびに細胞内の標的タンパク質のチロシン残基をリン酸化することで、細胞内にシグナルを伝達している<sup>(8)</sup>。代表的なシグナル伝達経路として、MAPK（mitogen-activated protein kinase）群があり、3 種類のキナーゼ [MAPK、MAPKK（MAPK kinase）ならびに MAPKKK（MAPK kinase kinase）]によりカスケードを構成している<sup>(9)</sup>。また、EGF（epidermal growth factor）などの細胞増殖因子の刺激により活性化したチロシンキナーゼである EGFR（EGF receptor）は、RAS（rat sarcoma）を活性化する<sup>(10)</sup>。活性化 RAS は MAPKKK をリン酸化し、MAPKKK は、さらに MAPKK（MAPK キナーゼ）を、MAPKK は MAPK をリン酸化する<sup>(9)</sup>。リン酸化 MAPK は転写因子である Elk-1（E26 transformation-specific sequence like-1 protein）などを活性化し、AP-1（activator protein 1）複合体の転写活性を増加させることで、最終的に細胞の増殖と分化を引き起こす<sup>(11)</sup>。また、Protein phosphatase 2A により脱リン酸化された heat shock factor 1 は、細胞増殖やストレス応答に関連する遺伝子の発現を調節することが報告されている<sup>(12)</sup>。その他にも、NF-κB（nuclear factor-kappa B）シグナル系、Smad

(SMA and MAD family) シグナル系あるいは Wnt/ $\beta$  (Wingless and Int-1) -カテニンシグナル系などのようなシグナル伝達系においてもリン酸化修飾は重要な調節機能を担っている<sup>(13-15)</sup>。

## 1-2. リン酸化タンパク質解析の重要性

リン酸化修飾やシグナル伝達経路の異常は、数多くの疾患に関与することが報告されている<sup>(16)</sup>。例えば、関節リウマチでは NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が起こっている<sup>(17)</sup>。また、アルツハイマー病は、キナーゼの一種である GSK-3 $\beta$  により過剰にリン酸化された Tau タンパク質が神経細胞内で蓄積することで引き起こされる<sup>(18)</sup>。そのような数々の疾患の中でも、特にシグナル伝達経路の異常と関連が深いものが、がんであると考えられている<sup>(19)</sup>。がんは、遺伝子変異などの原因により、正常細胞の分化や増殖機構に異常が生じた疾患と考えられている<sup>(20)</sup>。原因となる遺伝子変異の代表例には、RAS 遺伝子変異<sup>(21)</sup>、BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) 遺伝子変異<sup>(22)</sup>あるいは EGFR 遺伝子変異<sup>(23)</sup>などが挙げられる。これら遺伝子変異は、細胞分化や増殖に関与する種々のシグナル伝達経路に変化をもたらし、結果的に細胞の悪性化や異常増殖を引き起こす<sup>(24)</sup>。細胞増殖や分化を誘導する主要なシグナル伝達分子の多くはチロシンキナーゼ群と考えられている<sup>(8)</sup>。よって、肺がんをはじめとする悪性腫瘍細胞の増殖を抑制するチロシンキナーゼ阻害剤は、がん治療のための分子標的薬として期待されており<sup>(25, 26)</sup>、実際、すでに複数のチロシンキナーゼ標的治療薬が各国で承認・使用されている<sup>(27)</sup>。今まで開発されたチロシンキナーゼ標的治療薬は、細胞内のシグナル伝達分子に作用する低分子阻害剤と細胞外のリガンドや膜上受容体に作用するモノクローナル抗体薬に大きく分類できる<sup>(28)</sup>。低分子阻害剤には、EGFR を標的にしたゲフィチニブやエルロチニブ、HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) を標的にしたラパチニブやネラチニブ、ALK (anaplastic lymphoma kinase) および ROS1 (c-ros oncogene 1) を標的にしたクリゾチニブなどがある<sup>(29)</sup>。モノクローナル抗体薬には、EGFR を標的にしたセツキシマブやパニツムマブ、HER2 を標的にしたトラスツズマブ、ペルツズマブなどがある<sup>(28)</sup>。これらの治療薬の標的であるチロシンキナーゼのシグナル伝達制御には、タンパク質のリン酸化修飾が大きな役割を果たす。リン酸化修飾の変化は、タンパク質の安定性や局在に変化を与え、その結果として、シグナル伝達や複合体形成などの細胞内の重要な過程に影響すると考えられる<sup>(30-32)</sup>。よって、タンパク質のリン酸化状態の変化は、がんをはじめとする様々な疾

患の病態と深く関与していることが示唆されている<sup>(33-35)</sup>。したがって、リン酸化タンパク質の網羅的解析（リン酸化プロテオミクス解析）は、種々の疾患に対する原因究明や治療標的の探索において重要であると思われる<sup>(36)</sup>。

### 1-3. リン酸化タンパク質の解析技術

リン酸化タンパク質の解析技術は、電気泳動法により分離後に解析する電気泳動法と、タンパク質をペプチド化した後に質量分析装置で測定するショットガン法に大別可能である<sup>(37)</sup>。電気泳動法に対し、ショットガン法では、金属アフィニティビーズによりリン酸化ペプチドの濃縮を行った後、質量分析装置で測定・同定を行うため、網羅的かつ高速化合物評価系として優れていると考えられている<sup>(38)</sup>。金属アフィニティ精製法においては、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC ; immobilized metal affinity chromatography）といわれる鉄イオンやガリウムイオンなどの金属を使用した手法やヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー（HAMMOC ; hydroxy acid-modified metal oxide chromatography）と呼称される酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）などを用いた手法が使用されている<sup>(39-41)</sup>。HAMMOC法は、IMAC法と同様にリン酸基と金属のアフィニティを利用したリン酸化ペプチド濃縮方法であり、ヒドロキシ酸処理した酸化金属を用いることで、非リン酸化ペプチドの非特異的吸着を低減させることが可能である<sup>(42)</sup>。さらに、近年開発された Phos-tag 法は、亜鉛イオンを結合させることで、網羅的なリン酸化ペプチドの濃縮に使用されている<sup>(43, 44)</sup>。現在、IMAC法、HAMMOC法ならびに Phos-tag法とも、チップフィルターに搭載あるいはカラム充填が可能なビーズとして市販されており、ペプチド溶液と混合することでリン酸化ペプチドを捕捉できる<sup>(45-47)</sup>。また、洗浄後にリン酸緩衝液やアルカリ性溶液で溶出することで、リン酸化ペプチドの精製と濃縮が可能である。現在、これらの濃縮手法と高性能質量分析装置を組み合わせることで、一度の測定で数千種類のリン酸化ペプチドを解析することが可能であり、本法はプロテオミクスの分野において主流となっている<sup>(48)</sup>。

### 1-4. リン酸化タンパク質解析技術における課題

上述したように、質量分析装置と金属アフィニティ精製によるリン酸化ペプチド濃縮技術の融合による解析は、リン酸化プロテオミクス研究領域に大きな飛躍を生み出した<sup>(49)</sup>。しかし、リン酸化タンパク質は、非リン酸化タンパク質に比し、細胞内における存在量が極めて少ないことが予想さ

れるため、質量分析前の濃縮操作が必要不可欠と考えられる<sup>(50)</sup>。したがって、リン酸化ペプチド濃縮操作の効率や精度は、リン酸化プロテオミクス解析において極めて重要であると考えられている<sup>(51)</sup>。そのため、様々な疾患の原因究明や新規治療標的の探索において、リン酸化プロテオミクス解析技術を有効に活用するためには、各種リン酸化ペプチドの濃縮技術の特徴を十分に理解し、試料や目的に応じて使い分けることが必須である<sup>(52, 53)</sup>。

### 1-5.本研究の目的

本研究は、リン酸化プロテオミクス解析に汎用されている種々のリン酸化ペプチド濃縮手法を細胞抽出物や血清などに適用し、得られた結果を基に各濃縮法の有用性を解析・評価することを目的とした。次に、本研究で用いた各濃縮法の中で、リン酸化プロテオミクス解析法に最も適合すると思われる Phos-tag システムを用い、新型コロナウイルス (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2: SARS-CoV-2) のヌクレオカプシドタンパク質 (NP; nucleocapsid protein) の機能的なリン酸化を明らかにするとともに本法の有用性を評価することを目的とした研究を行った。

### 引用文献

1. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol.* 2004,8(1),33-41.
2. Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci.* 2005,30(6),286-90.
3. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.* 2009,139(3),468-84.
4. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006,127(3),635-48.
5. Cohen PT. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* 2002,115(Pt 2),241-56.
6. Graves JD, Krebs EG. Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther.* 1999,82(2-3),111-21.
7. Sugiyama N, Imamura H, Ishihama Y. Large-scale Discovery of Substrates of the Human Kinome. *Sci Rep.* 2019,9(1),10503.
8. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine

- kinases. *Cell*. 2010,141(7),1117-34.
9. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002,12(1),9-18.
  10. Huang L, Fu L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B*. 2015,5(5),390-401.
  11. El-Dahr SS, Dipp S, Baricos WH. Bradykinin stimulates the ERK-->Elk-1-->Fos/AP-1 pathway in mesangial cells. *Am J Physiol*. 1998,275(3),F343-52.
  12. Ueda T, Kohama Y, Sakurai H. IER family proteins are regulators of protein phosphatase PP2A and modulate the phosphorylation status of CDC25A. *Cell Signal*. 2019,55,81-9.
  13. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol*. 2002,30(4),285-96.
  14. Matsuzaki K. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013,24(4),385-99.
  15. Huang H, He X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*. 2008,20(2),119-25.
  16. Bao Z, Zhang B, Li L, et al. Identifying disease-associated signaling pathways through a novel effector gene analysis. *PeerJ*. 2020,8,e9695.
  17. Noort AR, Tak PP, Tas SW. Non-canonical NF-kappaB signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde? *Arthritis Res Ther*. 2015,17(1),15.
  18. Pei JJ, Braak E, Braak H, et al. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999,58(9),1010-9.
  19. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015,5(4).
  20. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog*. 2009,8,5.
  21. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001,93(14),1062-74.
  22. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant



- colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.* 2012,2(3),227-35.
23. Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science.* 2004,305(5687),1163-7.
  24. Santaripa L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012,16(1),103-19.
  25. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers (Basel).* 2020,12(3).
  26. Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011,301(2),H287-96.
  27. Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018,18(12),1249-70.
  28. Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, et al. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018,19(11).
  29. Zhong L, Li Y, Xiong L, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther.* 2021,6(1),201.
  30. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol.* 2016,4,11.
  31. Peck SC. Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* 2006,45(4),512-22.
  32. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, et al. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol.* 2000,20(14),5010-8.
  33. Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell.* 2020,182(3),685-712 e19.

34. Johnson JR, Crosby DC, Hultquist JF, et al. Global post-translational modification profiling of HIV-1-infected cells reveals mechanisms of host cellular pathway remodeling. *Cell Rep.* 2022,39(2),110690.
35. Singh V, Ram M, Kumar R, et al. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J.* 2017,36(1),1-6.
36. Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem.* 2001,268(19),5001-10.
37. 井野 洋子, 木之下 節夫, 平野 久, et al. 共通の内部標準を用いた補正による Pro-Q Diamond 染色リン酸化タンパク質二次元電気泳動スポットの比較定量解析. *電気泳動.* 2015,59(1),1-7.
38. Ruprecht B, Koch H, Medard G, et al. Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns. *Mol Cell Proteomics.* 2015,14(1),205-15.
39. Feng S, Pan C, Jiang X, et al. Fe<sup>3+</sup> immobilized metal affinity chromatography with silica monolithic capillary column for phosphoproteome analysis. *Proteomics.* 2007,7(3),351-60.
40. Imami K, Sugiyama N, Kyono Y, et al. Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. *Anal Sci.* 2008,24(1),161-6.
41. Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, et al. Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Mol Syst Biol.* 2008,4,193.
42. Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics.* 2007,6(6),1103-9.
43. Kinoshita E, Yamada A, Takeda H, et al. Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J Sep Sci.* 2005,28(2),155-62.
44. Nabetani T, Kim YJ, Watanabe M, et al. Improved method of

- phosphopeptides enrichment using biphasic phosphate-binding tag/C18 tip for versatile analysis of phosphorylation dynamics. *Proteomics*. 2009,9(24),5525-33.
45. Kyono Y, Sugiyama N, Imami K, et al. Successive and selective release of phosphorylated peptides captured by hydroxy acid-modified metal oxide chromatography. *J Proteome Res*. 2008,7(10),4585-93.
46. Villen J, Gygi SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2008,3(10),1630-8.
47. Yuan ET, Ino Y, Kawaguchi M, et al. A Phos-tag-based micropipette-tip method for rapid and selective enrichment of phosphopeptides. *Electrophoresis*. 2017,38(19),2447-55.
48. Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Rev Proteomics*. 2011,8(1),81-94.
49. Yang C, Zhong X, Li L. Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics. *Electrophoresis*. 2014,35(24),3418-29.
50. Steen H, Jebanathirajah JA, Rush J, et al. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Mol Cell Proteomics*. 2006,5(1),172-81.
51. Qiu W, Evans CA, Landels A, et al. Phosphopeptide enrichment for phosphoproteomic analysis - A tutorial and review of novel materials. *Anal Chim Acta*. 2020,1129,158-80.
52. Beltran L, Cutillas PR. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids*. 2012,43(3),1009-24.
53. Iliuk AB, Tao WA. Is phosphoproteomics ready for clinical research? *Clin Chim Acta*. 2013,420,23-7.

## 第2章. 質量分析装置を用いたプロテオミクスのためのリン酸化ペプチド濃縮手法の評価

### 2-1. 緒言

質量分析のためのリン酸化ペプチド濃縮には、様々な手法が提案されている<sup>(52)</sup>。その中で、現在、TiO<sub>2</sub> 粒子を用いた HAMMOC 法が汎用されていると思われる<sup>(42, 54)</sup>。また、TiO<sub>2</sub> 粒子を乳酸で前処理することで、本粒子への非リン酸化ペプチドの非特異的結合を低減し、リン酸化ペプチドの濃縮効率を上げることができる<sup>(42)</sup>。よって、TiO<sub>2</sub> 粒子は、リン酸化ペプチド濃縮法の一つである IMAC 法と比較して、ペプチド混合物から選択的にリン酸化ペプチドを濃縮することが可能である<sup>(55, 56)</sup>。一方、近年開発された Phos-tag リガンドは、中性付近の水溶液中でリン酸基を選択的に捕捉可能なアルコキシド架橋型二核金属錯体である<sup>(57, 58)</sup>。また、Phos-tag リガンドは、様々な化合物やビーズ、色素などに結合させることができるため、リン酸化プロテオミクスの様々な技術に応用される<sup>(59)</sup>。例えば、アクリルアミドを結合させた Phos-tag アクリルアミドをポリアクリルアミドゲル電気泳動に適用することでリン酸化タンパク質を分離可能な Phos-tag SDS-PAGE を行うことができる<sup>(60)</sup>。このようなことから、リン酸化ペプチド濃縮技術において、亜鉛イオンを結合した Phos-tag アガロースビーズは IMAC の代用法となりつつある<sup>(59)</sup>。さらに、TiO<sub>2</sub> 粒子や Phos-tag アガロースを用いたチップカラム法は、高速化合物評価系として、網羅的リン酸化プロテオミクス解析に非常に有用であると思われる<sup>(42, 44)</sup>。また、TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズと Phos-tag 磁気ビーズなどの磁気ビーズを基盤とする手法もリン酸化ペプチド濃縮に用いられてきた<sup>(61)</sup>。このように、様々な濃縮手法が開発・応用されている一方で、種々のタンパク質消化物（ペプチド混合物）から、リン酸化ペプチドを濃縮する際、各手法の差異に関する科学的根拠は十分に得られていないと思われる<sup>(62)</sup>。

本研究では、このような背景から、ゲル内消化物または様々なタンパク質溶液消化物からのリン酸化ペプチドの濃縮において、TiO<sub>2</sub> 粒子、TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズ、Phos-tag アガロースあるいは Phos-tag 磁気ビーズを用いた 4 種類の手法の選択性と効率性に関する研究を行った<sup>(63)</sup>。

## 2-2.材料と方法

### 2-2-1 リン酸化オボアルブミンの Phos-tag SDS-PAGE による分離とゲル内消化

まず、アルカリフォスファターゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 処理または未処理のリン酸化オボアルブミン (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を材料とした。この材料を 50  $\mu$ M Phos-tag アクリルアミドを含む 12.5% ポリアクリルアミドゲル (SuperSep Phos-tag; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた電気泳動により分離後、Oriole 蛍光染色 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により検出した。オボアルブミンのバンドは、メスにより切り出し後、キレート溶液 [10 mM EDTA, 50 mM 重炭酸アンモニウム, 50% アセトニトリル (ACN ; acetonitrile) ] に浸漬し、15 分間 37°C でインキュベートした。その後、ゲル片を脱色溶液 (50 mM 重炭酸アンモニウム, 50% ACN) に浸漬し、30 分間 37°C で 2 回、脱色・洗浄した。ゲル片は、乾固後、氷上でトリプシン溶液にて膨潤させ、37°C で 16 時間消化処理を行った。

### 2-2-2 血清と細胞溶解液の溶液中消化

正常ヒト血清 200  $\mu$ L (Kohjin Bio, Saitama, Japan) あるいは HEK293 の細胞溶解液 100  $\mu$ g を 2 M 尿素およびフォスファターゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム水溶液に溶解した。その後、最終濃度 10 mM のジチオトレイトール (DTT ; dithiothreitol) と最終濃度 25 mM のヨードアセトアミド (IAA ; iodoacetamide) により還元アルキル化した。次に、タンパク質溶液にトリプシンを添加し、37°C で 16 時間消化処理を行った。

### 2-2-3 アフィニティビーズによるリン酸化ペプチド濃縮

ゲル内消化物、血清消化物あるいは細胞溶解液消化物は脱塩後、それぞれの手法によりリン酸化ペプチド濃縮処理を行った。実験手順と使用した溶液組成の詳細は図 2-1 と表 2-1 に記した。手順の概要は以下のとおりである。まず、TiO<sub>2</sub> 粒子による濃縮には、Titansphere Phos-TiO Kit (GL Sciences, Tokyo, Japan) の溶液を用い、自作の TiO<sub>2</sub>-C8 チップカラムにて実施した<sup>(64)</sup>。自作の TiO<sub>2</sub>-C8 チップカラムは、200  $\mu$ L 低吸着チップ (D200; Gilson, Middleton, WI, USA) に C8 ディスクフィルター (Empore C8; 3M Corporation, St. Paul, MN, USA) を充填し、その上に 3 mg の TiO<sub>2</sub> 粒子 (GL Sciences) を重層した<sup>(64)</sup>。

TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズによる濃縮には、TiO<sub>2</sub> Mag Sepharose (GE Healthcare) を使用した<sup>(65)</sup>。また、Phos-tag agarose ビーズによる濃縮は、200 μL ピペットチップに C18 ディスクフィルターを充填し、その上に Phos-tag agarose ビーズ (Wako Pure Chemical Industries) 15 μL を重層した Phos-tag agarose-C18 チップカラムで実施した<sup>(44)</sup>。Phos-tag 磁気ビーズによる濃縮は、株式会社ナード研究所または広島大学から提供された Phos-tag 磁気ビーズ 10 μL を用いて実施した<sup>(61)</sup>。

#### 2-2-4 質量分析とタンパク質の同定

濃縮リン酸化ペプチドは、UltiMate 3000 LC system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) に連結した Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) により測定した<sup>(66)</sup>。分析条件は以下の通り行った: Nano HPLC capillary column = 75 μm × 125 mm, C18, 3 μm (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan) ; 移動相 = (A) 0.1% ギ酸, 2% ACN (B) 0.1% ギ酸, 95% ACN。また、ペプチド溶出のグラジエント条件は、オボアルブミンでは 5–41%B for 25 min at a flow rate of 350 nL/min、細胞溶解液および血清では 5–33%B for 115 min at a flow rate of 300 nL/min とした。Proteome Discoverer ソフトウェア (version 2.2, Thermo Fisher Scientific) によってピークリストを作成し、UniProt Knowledgebase (UniProtKB/ SwissProt, version Jul 2014) を用いた MASCOT サーチエンジン (version 2.5.1; Matrix Science, London, UK) または Proteome Discoverer の ptmRS ツールによりペプチドの同定を行った。基本的な検索条件は以下の通りである: trypsin digestion with two missed cleavages permitted; peptide mass tolerance, ±5 ppm; fragment mass tolerance, ±0.05 Da; usual variable modifications, oxidation of methionine, and phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine。ゲル内消化物の場合は、以下の条件を追加した: variable modification, carbamidomethylation of cysteine。さらに、血清消化物の場合は以下の条件を追加した: variable modification, N-terminal carbamylation。細胞溶解液消化物の場合は以下の条件を追加した: variable modification, carbamidomethylation of cysteine and protein N-terminal acetylation/carbamylation。なお、MASCOT database による同定では、偽陽性率 (FDR ; false discovery rate) は 1%未

満、ペプチドスコア $\geq 30$ を信頼できる同定の許容基準として使用した。

Proteome Discovererによる同定では、ptmRS site probability $\geq 75$ を同定基準とした<sup>(67)</sup>。プロテオミクスデータは、jPOST partner repository

(<https://jpostdb.org/>)を介して ProteomeXchange Consortium (PXD026295, <http://www.proteomexchange.org/>)に登録した。リン酸化ペプチドの濃縮効率

は、同定された全ペプチド数の平均 ( $n=3$ ) でリン酸化ペプチド数の平均

( $n=3$ )を割り、100を掛けて算出した。同定されたリン酸化ペプチドのアミノ酸配列に基づく理論分子量 (Mw ; molecular weight) と理論等電点 (pI ; isoelectric point) は、ExPASy Compute pI/Mw ツールを用いて算出した

([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/))<sup>(68)</sup>。リン酸化モチーフ予測は、motif-x algorithm (<https://github.com/omarwagih/rmotifx>)<sup>(69)</sup>と ggseqlogo

(<https://github.com/omarwagih/ggseqlogo>)<sup>(70)</sup>を用いた R パッケージにより行

った。実験手技のばらつきを補うため、それぞれの試料調製法について同じ実験を3回ずつ繰り返して各々分析を行い (technical replicates)、Progenesis

QI for proteomics ソフトウェア (version 2.0; Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)により、質量分析データの定量解析を実施した。濃縮効率の比較における統計解析には GraphPad Prism 7 ソフトウェアを用いた。

## 2-3. 結果

### 2-3-1 ゲル内タンパク質消化物のリン酸化プロテオミクス解析結果の比較

Phos-tag SDS-PAGE は、タンパク質のリン酸化状態を解析する上で重要な手法の一つであると考えられている<sup>(60, 71, 72)</sup>。一般に、Phos-tag SDS-PAGE ゲル中で、標的タンパク質は、リン酸化状態の違いによって移動度が異なる<sup>(60)</sup>。そこで、まず本研究においてはリン酸化オボアルブミンを Phos-tag SDS-PAGE で分離したゲル内消化物 (図 2-2) から、リン酸化ペプチドを濃縮するための手法に関する評価を行った。その結果、Phos-tag アガロースを用いたチップカラム手法では、ゲル内消化物から多くのリン酸化ペプチドを濃縮することができたが、多くの非特異的吸着もみられた (表 2-2 および表 2-3)。しかし、同じチップカラムでも、TiO<sub>2</sub>粒子を用いた手法では、リン酸化ペプチドは1つしか検出されなかった。一方、TiO<sub>2</sub>磁気ビーズと Phos-tag 磁気ビーズを基盤とした手

法では、チップカラムを用いた場合よりも選択的にゲル内消化物からリン酸化ペプチドを濃縮することが可能であった。

### 2-3-2 血清タンパク質消化物のリン酸化プロテオミクス解析結果の比較

一般に、血清消化物においては、リン酸化ペプチドは、非リン酸化ペプチドよりもはるかに少ないため、質量分析で血清中のリン酸化ペプチドを網羅的に解析することは困難であると考えられている<sup>(73)</sup>。そこで、本研究においては、血清消化物から効率的にリン酸化ペプチドを濃縮可能な手法を評価するために、4種類のビーズを用い、血清リン酸化ペプチド濃縮を行った。その結果、4種類全てのビーズにおいて、リン酸化ペプチドの濃縮効率は極めて悪く、かつ非特異的吸着が多いため、同定されたリン酸化ペプチドの数は少なかった（表 2-4）。しかし、同表に示したように Phos-tag アガロース ( $5.9 \pm 0.7\%$ )、TiO<sub>2</sub> 粒子 ( $12.7 \pm 0.6\%$ )、TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズ ( $1.9 \pm 0.2\%$ ) に比し、Phos-tag 磁気ビーズでは比較的高い濃縮効率 ( $16.5 \pm 1.6\%$ ) が得られた。さらに、血清消化物濃縮においては Phos-tag 磁気ビーズは非特異的吸着が比較的少ないことから、血清消化物の初期量を増やすことで、同定されるリン酸化ペプチド数と濃縮効率が増加した（表 2-4）。濃縮のスタートペプチド量を 100  $\mu\text{g}$  から 500  $\mu\text{g}$  に増やすことで、同定されたリン酸化ペプチド数は 34 個から 147 個に増加した。

### 2-3-3 細胞内タンパク質消化物のリン酸化プロテオミクス解析結果の比較

細胞内においては、内在するタンパク質の様々なアミノ酸残基がリン酸化されている可能性がある<sup>(74)</sup>。そこで、本研究においては、全細胞抽出物の網羅的なリン酸化プロテオミクスに適した手法を評価するため、4種類のビーズを用い、細胞溶解液に消化処理を加えた試料のペプチド濃縮を行った。評価基準は、各手法により同定された全ペプチド数とリン酸化ペプチドの数との割合により算出された濃縮効率 (%) に基づいている（表 2-5）<sup>(75)</sup>。実験は、全て 3 回行い、その平均値を用いた。その結果、同定されたリン酸化ペプチド数と濃縮効率は、Phos-tag アガロースでは 2,978 ペプチド（濃縮効率  $82.7 \pm 2.7\%$ ）、TiO<sub>2</sub> 粒子では 2,611 ペプチド（濃縮効率  $91.0 \pm 1.0\%$ ）、Phos-tag 磁気ビーズでは 1,959 ペプチド（濃縮効率  $71.5 \pm 1.7\%$ ）ならびに TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズでは 1,792 ペプチド（濃縮効率  $51.2 \pm 4.0\%$ ）であり、TiO<sub>2</sub> 粒子を使ったチップカラム手法が最も高い濃縮効率と選択性を示すことがわかった（図 2-3）。また、3 回の測



定間で重複検出したリン酸化ペプチド数は、1,707 ペプチド (Phos-tag アガロース)、1,502 ペプチド (TiO<sub>2</sub> 粒子)、1,157 ペプチド (Phos-tag 磁気ビーズ)、860 ペプチド (TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズ) であった (図 2-4)。それぞれの手法で独自に同定されたリン酸化ペプチド数は、Phos-tag アガロースでは 603 ペプチド、TiO<sub>2</sub> 粒子では 297 ペプチド、Phos-tag 磁気ビーズでは 221 ペプチドならびに TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズでは 105 ペプチドであった (図 2-5A)。リン酸化ペプチド同定数においては、Phos-tag アガロースによるチップカラム濃縮法は、他の手法に比し、全細胞抽出物からリン酸化ペプチドを多く同定することが可能であった。一方、磁気ビーズを使った手法では非特異吸着が多く、その結果、質量分析で同定されたリン酸化ペプチド数は少なかった。しかし、リン酸化ペプチド全体を占めるマルチリン酸化ペプチドの割合は Phos-tag 磁気ビーズで、2 リン酸化ペプチドが 25.2%、3 リン酸化ペプチドが 1.8% であり、他の手法に比べて高かった (図 2-5B)。また、本研究で同定されたリン酸化ペプチドのうち、濃縮手法と分子量 (図 2-6A) およびリン酸化モチーフの特徴 (図 2-6B) との間には、特に大きな差はみられなかったが、Phos-tag 磁気ビーズにおいては若干、酸性ペプチド (pI 2-6) の割合が高く、90.1% であった (図 2-6A)。さらに、同定されたリン酸化ペプチドの特性を ptmRS ツールによるスコアリングを行った場合と行わなかった場合で比較した。本ツールは、同定された修飾位置の確からしさを評価するものであり、そのサイトが本当に修飾されている確率を推定した値をスコアとして算出する<sup>(76)</sup>。得られた数値が 75% 以上を示した場合、リン酸化ペプチドが有する特性の信頼度が高いと判断されるため、本研究でもその基準を採用した<sup>(67)</sup>。実際、本ツールのスコアリングを用いた結果では、リン酸化ペプチドの総数と濃縮効率 (%) は、若干低下したものの、ツールを使わなかった結果に比し、大きな差異はみられなかった (図 2-7、表 2-4 ならびに表 2-5)。

#### 2-3-4 TiO<sub>2</sub> および Phos-tag によるリン酸化ペプチド選択性の比較検討

さらに、本研究においては、TiO<sub>2</sub> 粒子および Phos-tag アガロースを用いて細胞溶解液のリン酸化プロテオミクス解析を行った前項 (2-3-3) のデータを用い、2 つのアフィニティ担体で濃縮されるリン酸化ペプチドの比較を行った。その結果、TiO<sub>2</sub> 粒子および Phos-tag アガロースチップカラムを用いた選択的濃

縮手法により、全細胞抽出物から、計 2,326 のリン酸化ペプチドが同定された。そのうち、883 ペプチドが重複しており、それぞれの手法に独自なリン酸化ペプチドは TiO<sub>2</sub> 粒子では 619、Phos-tag アガロースでは 824 であった (図 2-8A)。また、2 つのチップカラム濃縮法で同定されたリン酸化ペプチドには違いがみられたが、その一方、アガロースで 51.7%、TiO<sub>2</sub> 粒子では 58.8%が重複していた。さらに、これらの質量分析データを用いて、比較定量解析を実施した結果、共通して同定された 883 のリン酸化ペプチドのうち、定量値のついた 855 のリン酸化ペプチドの存在量は、両手法間で高い相関がみられた (図 2-8B)。くわえて、両濃縮法の異なるリン酸化ペプチドに選択性を示すために、両手法によって全細胞溶解物から濃縮されたリン酸化ペプチド間の相補性を調べた。すなわち、Phos-tag アガロースにより濃縮されたリン酸化ペプチドをさらに、TiO<sub>2</sub> 粒子によって濃縮した (図 2-9)。その結果、最初の濃縮で同定されたリン酸化ペプチドのうち、平均 78.5%が Phos-tag アガロース特異的であり、ビーズの種類によって濃縮されるリン酸化ペプチドの類似点と相違点が示された。一般に、リン酸基の選択的捕捉は、Phos-tag リガンドでは中性 pH の水溶液中で<sup>(57, 58)</sup>、TiO<sub>2</sub> 粒子は低 pH の水溶液中で行われる<sup>(42)</sup>。この pH 条件の違いが、それぞれの濃縮手法による結果の違いに関与している可能性がある。一方、TiO<sub>2</sub> 粒子でさらに濃縮を行った場合、同定されたリン酸化ペプチドの約 30%が最初の Phos-tag アガロース精製では同定されなかったものであった (図 2-9)。これは、TiO<sub>2</sub> 粒子の高いリン酸化ペプチド濃縮効率が、非特異的吸着を抑制し、低濃度のリン酸化ペプチドの検出に影響を与えていることを示唆している。

## 2-4. 考察

細胞内のシグナル伝達経路に関わるタンパク質のリン酸化修飾を網羅的に解析するリン酸化プロテオミクス解析において、質量分析前のリン酸化ペプチド濃縮は非常に重要で必要不可欠な操作である。そこで本研究では、より効率的なリン酸化プロテオミクス解析を実施するために、試料の種類に応じた最適な濃縮手法を調べることを目的とした。

スピンチップタイプである Phos-tag アガロースと TiO<sub>2</sub> 粒子、磁気ビーズタイプである Phos-tag 磁気ビーズならびに TiO<sub>2</sub> 磁気ビーズの 4 つを使った手法

により、ゲル内消化物、血清消化物および細胞消化物からリン酸化ペプチドを濃縮した。その結果、濃縮効率や濃縮されるリン酸化ペプチドには違いがあり、それぞれのビーズに特異性があることがわかった。また、ゲル内消化物では、**Phos-tag** アガロースを用いたチップカラム手法で多くのリン酸化ペプチドを濃縮したが、非リン酸化ペプチドも多く同定された。しかし、同じチップカラムタイプの  $\text{TiO}_2$  粒子を用いた手法では、リン酸化ペプチドはほとんど濃縮できなかった。一方、 $\text{TiO}_2$  磁気ビーズと **Phos-tag** 磁気ビーズでは、チップカラムを用いた場合よりも選択的にゲル内消化物からリン酸化ペプチドが濃縮可能であった。このような濃縮性能の差異は、4 種類のビーズのリン酸基捕捉位置の違によると考えられる<sup>(58, 61, 77, 78)</sup>。特に、**Phos-tag** アガロースのリン酸基捕捉部位は、架橋したアガロース網の内側と外側の両方に共有結合しているため、繊維状のペプチドがゲル内でからまり、非リン酸化ペプチドの検出につながった可能性がある<sup>(79)</sup>。また、**Phos-tag** 磁気ビーズを用いた手法においては、過剰量の酢酸アニオンを含む洗浄バッファーを使用するため、タンパク質のカルボキシル基と **Phos-tag** リガンドとの非特異的結合を競合的に低減させている可能性がある<sup>(80)</sup>。以上のことから、検証を行った手法の中では磁気ビーズを用いた濃縮法が電気泳動されたリン酸化タンパク質の分析には最も有効であることが示唆された。

次に、血清においては、全体的にリン酸化ペプチド濃縮効率が低い中、**Phos-tag** 磁気ビーズでは比較的高い濃縮効率を示し、血清のリン酸化プロテオミクス解析に適していることが示唆された。血清中には、非リン酸化タンパク質であるアルブミンなどが高い濃度で含まれていることなどから、質量分析によるリン酸化ペプチドの網羅的解析が困難であるとされている<sup>(73)</sup>。我々の知見は、血清や血清同様に非リン酸化タンパク質を高濃度に含有する試料中のリン酸化プロテオミクス解析において、**Phos-tag** 磁気ビーズを用いた方法が有用であることを明らかにした。すでに、リン酸化ペプチドとビーズの比率はリン酸化ペプチドの濃縮効率の重要な決定因子となることが報告されているが<sup>(75)</sup>、血清などのような、リン酸化ペプチドが非常に低濃度であることが予想される複雑な消化物の場合、リン酸化ペプチドとビーズの比率を最適化することは実質的に困難であると思われる<sup>(81)</sup>。一方、**Phos-tag** 磁気ビーズを用いる手法におい

では、非特異的吸着が抑制されているために、非リン酸化ペプチドの割合が非常に高い血清消化物においても効率的にリン酸化ペプチド濃縮が可能であると考えられる。最近、標的分子に対して非常に高い特異性を持つ特殊なビーズ（分子インプリントポリマー；MIPs）が開発され、このビーズにより、磁性酸化チタン表面に高い特異性でリン酸化ペプチド捕捉する技術も報告されている<sup>(82)</sup>。また、本ビーズを用い、血清や尿に含まれるリン酸化リゾチームを選択的に濃縮することにも成功している<sup>(83)</sup>。現在、このビーズは市販されていないが、市販後は **Phos-tag** 磁気ビーズによる手法と組み合わせ、改良型の新規リン酸化ペプチド濃縮技術も開発可能と思われる。本法の応用により、血清中リン酸化ペプチドの網羅的解析に、より良い結果をもたらす可能性がある。

さらに、本研究において、細胞消化物では **Phos-tag** アガロースと  $\text{TiO}_2$  粒子のスピッチップタイプの手法により、含有タンパクのリン酸化に関する良好な解析結果を得ることができた。細胞内では、多くのタンパク質に含まれる様々なアミノ酸残基がリン酸化されていることが推察され<sup>(74)</sup>、リン酸化プロテオミクス解析においても細胞溶解液は頻繁に使用される試料である。このような試料においては、**Phos-tag** アガロースと  $\text{TiO}_2$  粒子の両方を使った手法の活用が推奨される。現在、 $\text{TiO}_2$  粒子上のリン酸塩結合構造はよくわかっていないが、弱酸性条件下ではリン酸塩アニオンがチタンイオンに単座配位している可能性がある<sup>(84)</sup>。無機物である酸化チタンは水にも有機溶媒にも溶けにくいいため、リン酸化ペプチドは表面に露出したチタンイオンにのみ結合する。一方、**Phos-tag** 上の亜鉛イオン二核錯体は、中性 pH において、リン酸ジアニオンの配位部位が 2 つあることがよく知られている。このような  $\text{TiO}_2$  と **Phos-tag** という 2 種類のリン酸捕捉材料の化学的特性が、リン酸化ペプチド濃縮における性能の違いにつながっていると考えられる。一方、2 種類の **Phos-tag** 濃縮ビーズ（アガロースおよび磁気ビーズ）による細胞溶解液消化物からのリン酸化ペプチドの濃縮効率および同定数には、**Phos-tag** リガンドの固定化量の違い（**Phos-tag** 磁気ビーズは  $1.0 \mu\text{mol/mL-bead}$ 、**Phos-tag** アガロースは  $3.0-5.0 \mu\text{mol/mL-bead}$ ）も影響していると考えられる。

以上のことより、上述したビーズにはそれぞれ特異性があることがわかった。このことは異なるビーズを用いた手法を併せて使用することで、リン酸化ペプ

チド同定の網羅性を改善することができることも示している。特に、細胞消化物においては  $\text{TiO}_2$  粒子と Phos-tag アガロースともに良好な結果を得ることができたが、濃縮されたリン酸化ペプチドの大半は重複しておらず、両方の結果を併せることで同定数が増えた。つまり、 $\text{TiO}_2$  粒子と Phos-tag アガロースによるマルチエンリッチメントアプローチがリン酸化プロテオミクス解析の網羅性を向上させるために有効であることを示唆している。したがって、試料量が十分にあり、リン酸化ペプチドを網羅的に解析・同定するための研究においては、 $\text{TiO}_2$  粒子と Phos-tag アガロースの両チップカラムを併用することが望まれる。

## 2-5. 結語

本研究では、細胞抽出物や血清の消化物から、リン酸化ペプチドを濃縮するための4つの手法の選択性ならびに効率性などを評価した。結果として、Phos-tag アガロースを用いたチップカラムは、細胞溶解液中の濃縮において、最も多くのリン酸化ペプチドを同定することが可能であった。一方、ゲル内消化物では、多くの非リン酸化ペプチドも吸着してしまうことがわかった。一方で、Phos-tag 磁気ビーズは、細胞内リン酸化ペプチドの網羅的な同定には不向きであるが、ゲル内消化物および血清消化物については、4手法のうち最適であると考えられた。また、 $\text{TiO}_2$  粒子を用いたチップカラムは、細胞溶解液中の濃縮において、最も高い濃縮率でリン酸化ペプチドを同定することができたが、ゲル内消化物ではほとんどリン酸化ペプチドを濃縮することができず、不向きであると思われた。さらに、 $\text{TiO}_2$  磁気ビーズは、Phos-tag 磁気ビーズ同様に細胞内リン酸化ペプチドの網羅的な同定には向かないが、ゲル内消化物からのリン酸化ペプチド濃縮には適していると考えられた。

さらに、細胞内リン酸化ペプチドの網羅的な解析では、 $\text{TiO}_2$  粒子と Phos-tag アガロースを用いたチップカラムによるリン酸化ペプチドの濃縮と同定の効率は、磁気ビーズを用いた手法より高かった。くわえて、両チップカラムによるマルチエンリッチメントアプローチがリン酸化プロテオミクスの網羅性を向上させるために有効であることが示唆された。以上のことから、質量分析装置を用いたリン酸化プロテオミクスでは、試料の状態に応じて最適な濃縮方法を選択することが重要であると思われた。

表 2-1. リン酸化ペプチド濃縮のための4つの手法で使用する溶液組成

### ***Phos-tag agarose***

#### **[Compositions]**

buffer I	0.1 M Tris-AcOH (pH7.4)
buffer II	0.1 M Tris-AcOH (pH7.4), 20 μM zinc acetate
buffer III	0.1 M Tris-AcOH (pH7.4), 40% ACN
buffer IV	0.1 M Tris-AcOH (pH7.4), 65% ACN
buffer V	25 mM Tris- AcOH (pH7.4), 80% ACN
buffer VI	0.2M sodium dihydrogen phosphate (pH7.5)
Elution buffer	0.1% TFA, 80% ACN

#### **[Procedures]**

##### Equilibration

- 200 μl of buffer I
- 200 μl of buffer II
- 200 μl of buffer I

##### Binding

Lyophilized peptides were dissolved in 200 μl of buffer III and loaded onto the tip

##### Wash

- 200 μl of buffer III
- 200 μl of buffer IV, twice
- 200 μl of buffer V, 5 times

##### Elution from Phos-tag and binding to C18

- 200 μl of buffer VI, 3 times

##### Wash

- 200 μl of 0.1% TFA, 3 times

##### Elution from C18

- 100 μl of elution buffer

### ***TiO<sub>2</sub> particles***

#### **[Compositions]**

solution A	* included in commercial kit
solution B	* included in commercial kit
elution buffer 1	5% ammonium hydroxide buffer
elution buffer 2	5% pyrrolidine buffer

#### **[Procedures]**

##### Equilibration

- 20 μl of solution A
- 20 μl of solution B

##### Binding

Lyophilized peptides were dissolved in 50 μl of 0.1% TFA and diluted with 100 μl of solution B  
Diluted peptides were loaded onto the tip

##### Wash

- 20 μl of solution B
- 20 μl of solution A, twice

##### Elution

- 50 μl of elution buffer 1
- 50 μl of elution buffer 2

(続き)

### ***Phos-tag magnet***

#### **[Compositions]**

wash buffer	0.1 M Bis-Tris-AcOH (pH 7.0), 0.2 M sodium acetate
activation buffer	0.1 M Bis-Tris-AcOH (pH 7.0), 0.1 M zinc acetate
elution buffer	0.1 M sodium phosphate-AcOH (pH7.0)

#### **[Procedures]**

##### Equilibration

100 µl of wash buffer, 30 sec, twice

100 µl of activation buffer, 3 min

100 µl of wash buffer, 30 sec, twice

##### Binding

Lyophilized peptides were dissolved in 20 µl of wash buffer and applied to beads, 3min

##### Wash

500 µl of wash buffer, 30 sec, 5 times

1 ml of distilled water

##### Elution

100 µl of elution buffer, 3 min

### ***TiO<sub>2</sub> magnet***

#### **[Compositions]**

binding buffer	1M glycolic acid, 80% ACN, 5% TFA
wash buffer	80% ACN, 1% TFA
elution buffer	5% ammonium hydroxide solution

#### **[Procedures]**

##### Equilibration

500 µl of binding buffer

##### Binding

Lyophilized peptides were dissolved in 100 µl of binding buffer and applied to beads, 30min

##### Wash

500 µl of binding buffer

500 µl of wash buffer, twice

##### Elution

50 µl of elution buffer, 5min

表 2-2. オボアルブミンのゲル内消化物のリン酸化ペプチド濃縮効率

	The number of peptides identified	The number of phosphopeptides identified	Enrichment efficiency of phosphopeptides (%)
Phos-tag agarose	22.3	8.0	35.8
TiO <sub>2</sub> particles	4.7	0.7	14.3
Phos-tag magnet	4.0	2.7	66.7
TiO <sub>2</sub> magnet	3.7	2.3	63.6



表 2-3. ゲル内消化物から濃縮されたペプチドの検出頻度

Peptide sequence	TiO <sub>2</sub>		Phos-tag	
	particles	magnet	agarose	magnet
<i>Phosphorylated peptides</i>				
EVVG <b>pS</b> AEAGVDAASVSEEFR	2	2	3	2
FDKLPFGFGDSIEAQpr <b>CGpT*pS*</b> VNVHSSLR			1	
FDKLPFGFGD <b>pS</b> IEAQCG <b>pT</b> SVNVHSSLR			1	
FDKLPFGFGD <b>pS</b> IEAQpr <b>CGT</b> SVNVHSSLR		2	3	3
GGLEPINF <b>QpT</b> AADQAR			3	
ISQAVHAAHAEINEAGREVVG <b>pS</b> AEAGVDAASVSEEFR		2	3	1
<b>IpS</b> QAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFR			1	
LPGFGD <b>pS</b> IEAQpr <b>CGT</b> SVNVHSSLR			3	2
LTEWTS <b>pS</b> NVMEER			1	
LTEWTS <b>pS</b> NVoxMEER			3	
VVRFDKLPFGFGD <b>pS</b> IEAQpr <b>CGT</b> SVNVHSSLR			2	
<i>Non-phosphorylated peptides</i>				
AFKDEDTQAMPFR	1		3	
AFKDEDTQAoxMPFR	3	1	3	
DEDTQAMPFR				1
DEDTQAoxMPFR				3
DILNQITKPNDVYSFSLASR			2	
ELYRGGLEPINFQTAADQAR			2	
GGLEPINFQTAADQAR		1	3	
HIATNAVLFFGR			3	
ISQAVHAAHAEINEAGR	2	1	3	
LTEWTSSNVMEER			3	
LTEWTSSNVoxMEER	3		3	
LTEWTSSNVMEERK			1	
LTEWTSSNVoxMEERK			2	
NVLQPSSVDSQTAoxMVLVNAIVFK			3	
TQINKVVR	3		3	
VTEQESKPVQMoxMYQIGLFR			3	
VTEQESKPVQoxMMYQIGLFR			3	
VTEQESKPVQoxMoxMYQIGLFR		1	3	

pS および pT は、リン酸化 Ser および Thr を示す。pS\* または pT\* はあいまいな同定を示す。oxM および prC は、酸化 Met およびプロピオンアミド化 Cys を示す。

表 2-4. 血清消化物の溶液中からのリン酸化ペプチドの濃縮効率 (100, 250, 500  $\mu\text{g}$ )

	The amount of peptides injected ( $\mu\text{g}$ )	The number of peptides identified	The number of phosphopeptides identified	Enrichment efficiency of phosphopeptides (%)
Phos-tag agarose	10 <sup>a</sup>	749 (741)	44 (44)	5.9 (5.9)
TiO <sub>2</sub> particles	10 <sup>a</sup>	196 (201)	25 (23)	12.7 (11.5)
TiO <sub>2</sub> magnet	10 <sup>a</sup>	1,008 (1,005)	19 (19)	1.9 (1.9)
	10 <sup>a</sup>	206 (205)	34 (31)	16.5 (15.1)
Phos-tag magnet	50 <sup>b</sup>	420 (424)	65 (58)	15.5 (13.7)
	125 <sup>b</sup>	583 (534)	113 (91)	19.4 (17.0)
	250 <sup>b</sup>	630 (648)	147 (142)	23.3 (21.9)

括弧内は、Proteome Discoverer の ptmRS ツールで同定されたペプチド数 (ptmRS site probability  $\geq 75$ ) と、リン酸化ペプチド濃縮効率を示す。

<sup>a</sup> 100  $\mu\text{g}$  の溶液中血清消化物から各方法で濃縮されたペプチドの 10% (10  $\mu\text{g}$  に相当) を質量分析した結果。

<sup>b</sup> 100, 250, 500  $\mu\text{g}$  の溶液中血清消化物から各方法で濃縮されたペプチドの 50% (50, 125, 250  $\mu\text{g}$  に相当) を質量分析した結果。

表 2-5. 細胞溶解液消化物からのリン酸化ペプチド濃縮効率

	The number of peptides identified	The number of phosphopeptides identified	Enrichment efficiency of phosphopeptides (%)
Phos-tag agarose	3,601 (3,659)	2,978 (2,693)	82.7 (73.6)
TiO <sub>2</sub> particles	2,868 (2,914)	2,611 (2,378)	91.0 (81.6)
Phos-tag magnet	2,739 (2,781)	1,959 (1,815)	71.5 (65.3)
TiO <sub>2</sub> magnet	3498 (3,562)	1792 (1,598)	51.2 (44.9)

括弧内は、Proteome Discoverer の ptmRS ツールで同定されたペプチド数 (ptmRS site probability  $\geq 75$ ) と、リン酸化ペプチド濃縮効率を示す。

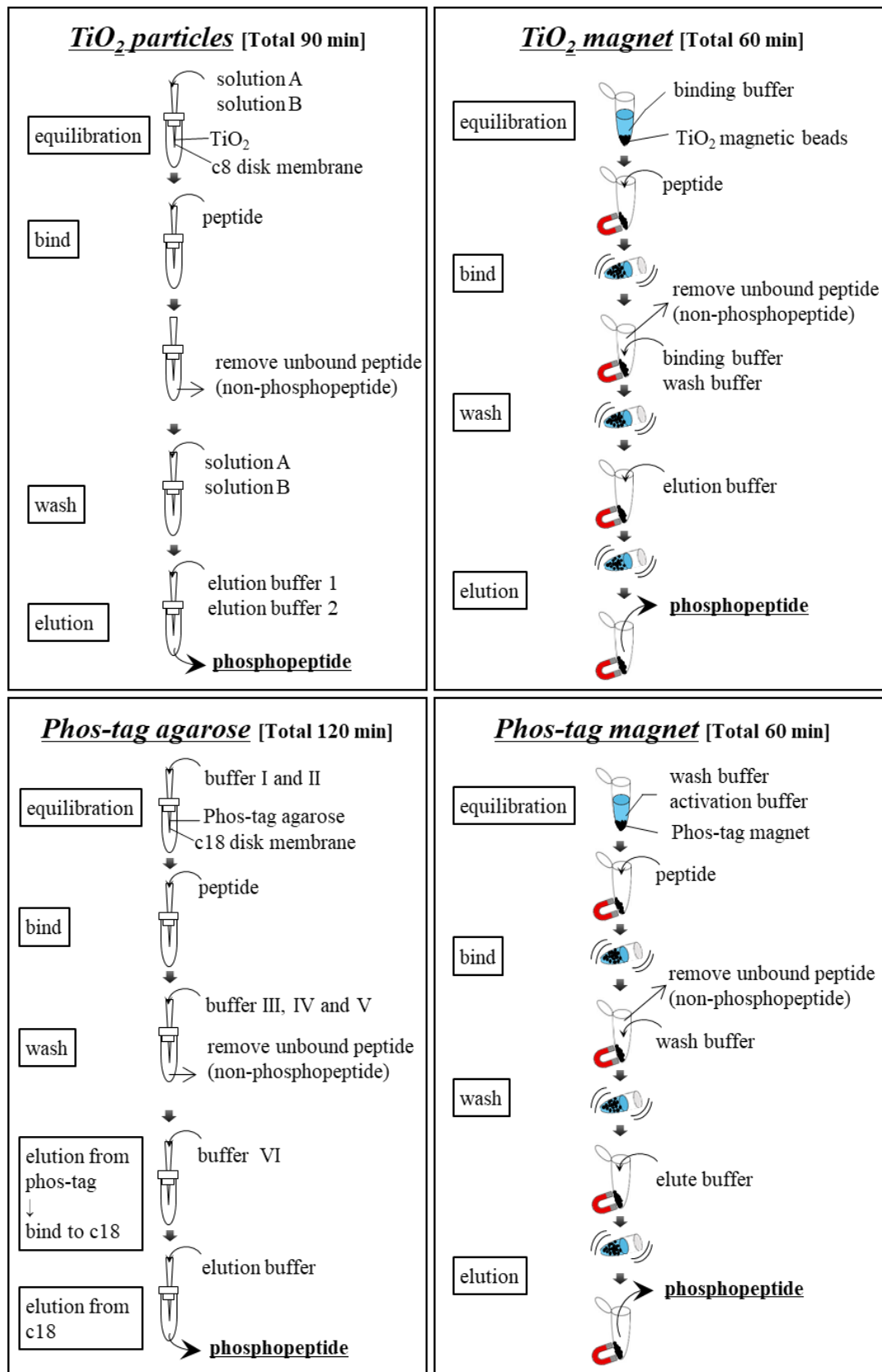


図 2-1. リン酸化ペプチド濃縮のための 4 つの方法の実験ワークフロー。詳細な溶液組成と手順は表 2-1 に示した。

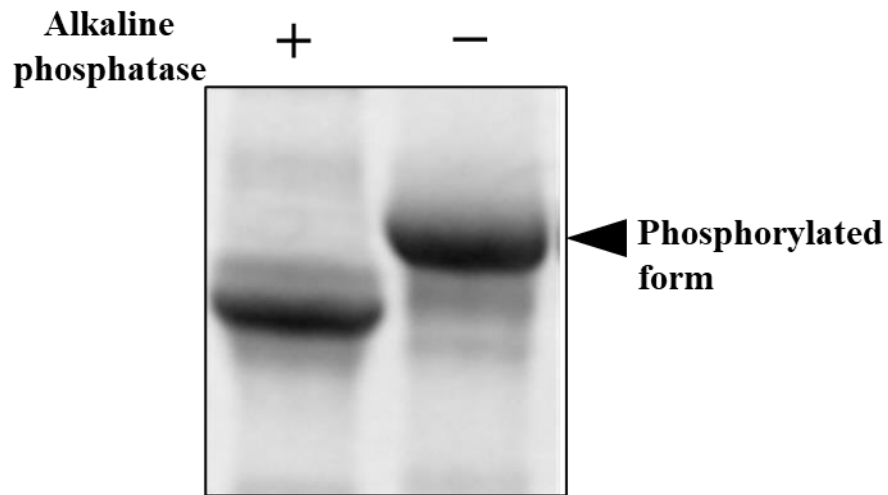


図 2-2.オボアルブミンを Phos-tag SDS-PAGE で分離し、Oriole 染色を行った。  
リン酸化オボアルブミンは、電気泳動前にアルカリフォスファターゼで処理  
(+) または非処理 (-) した。

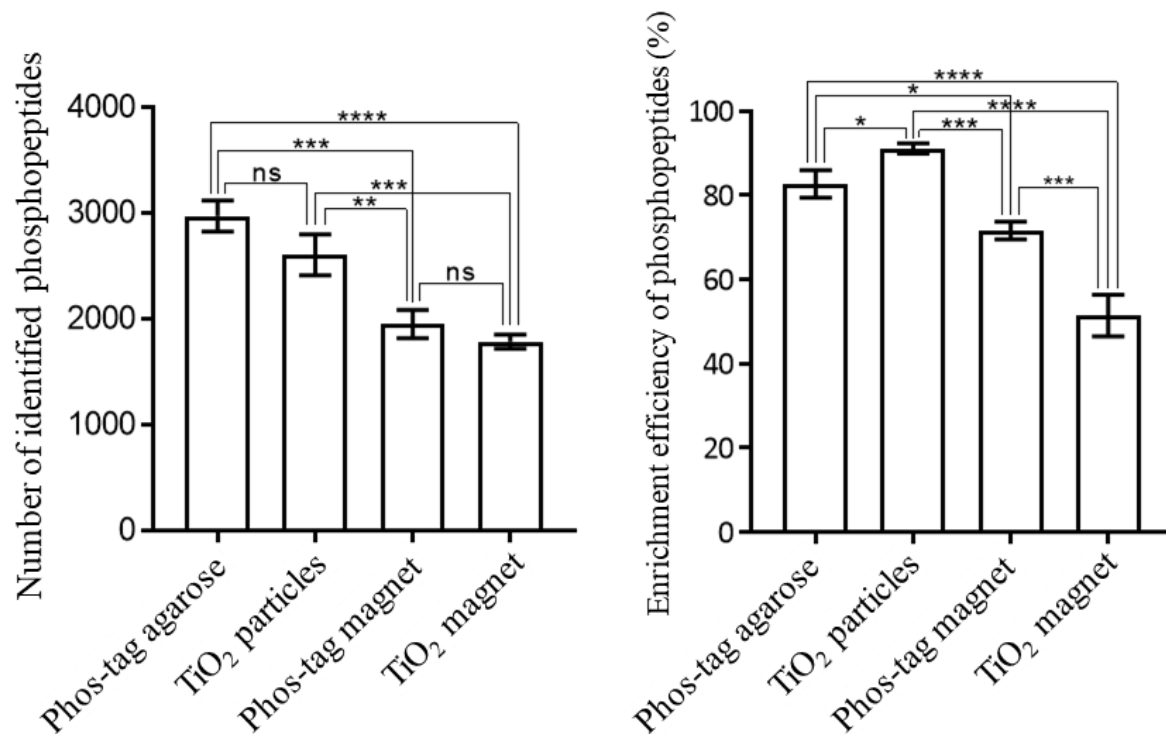


図 2-3. 細胞溶解液消化物からのリン酸化ペプチド濃縮（同定数と効率）。MASCOT を用いた 3 回の反復実験から同定されたリン酸化ペプチドの数と濃縮効率 (%) (ペプチドスコア  $\geq 30$ 、FDR < 1%) を示した。データは、リン酸化ペプチドの平均数 (左) と効率 (右)、標準偏差を示す。データセットの統計学的処理は、One-way ANOVA および Tukey の多重比較検定により行った。ns; not significant, \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ , \*\*\*\*;  $p < 0.0001$ 。

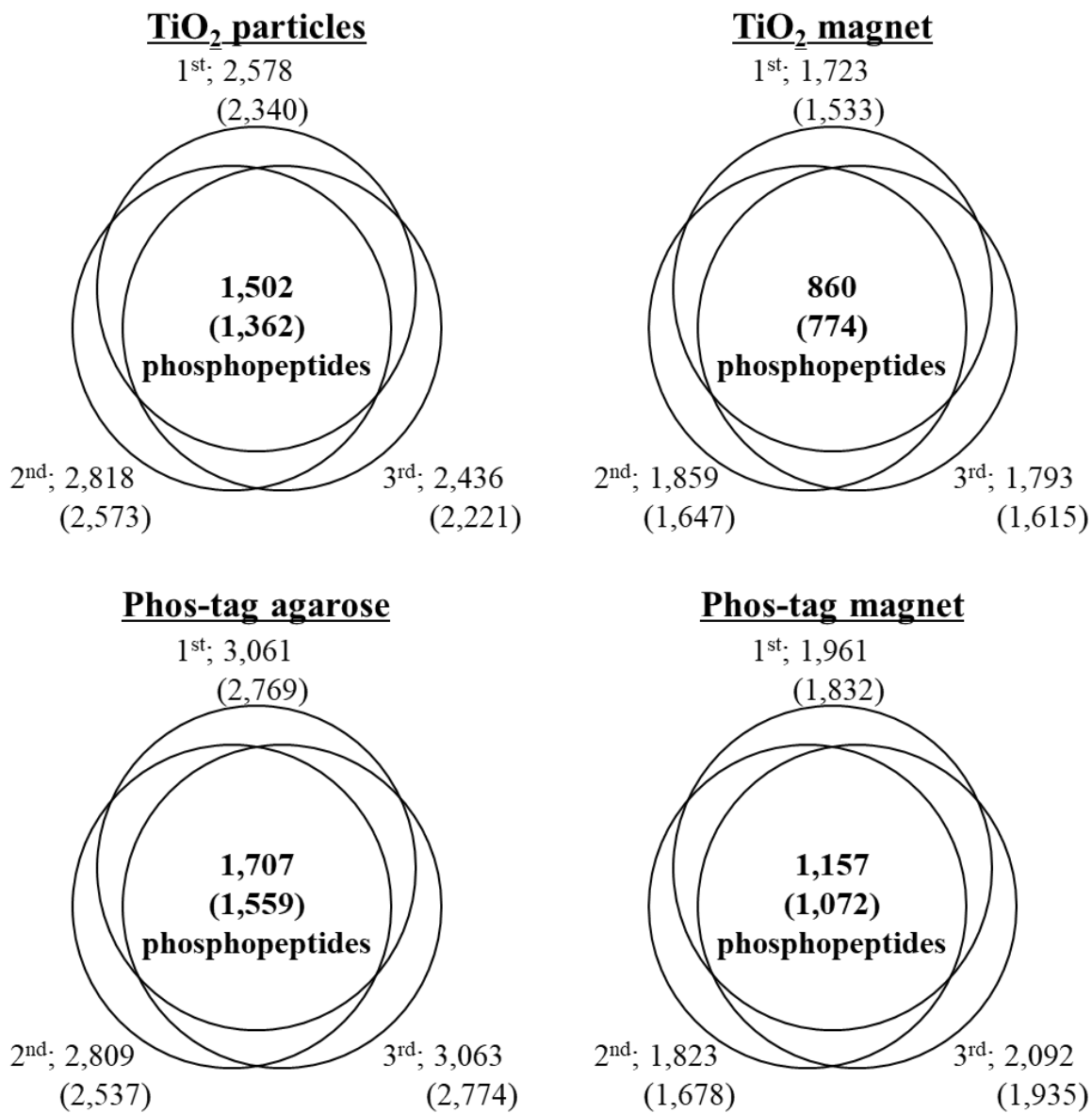


図 2-4. 細胞溶解液の消化物から同定されたリン酸化ペプチドの重複。各濃縮方法について、独立した実験を 3 回実施し、その重複を比較した。括弧内は Proteome Discoverer with ptmRS で同定されたリン酸化ペプチド数。

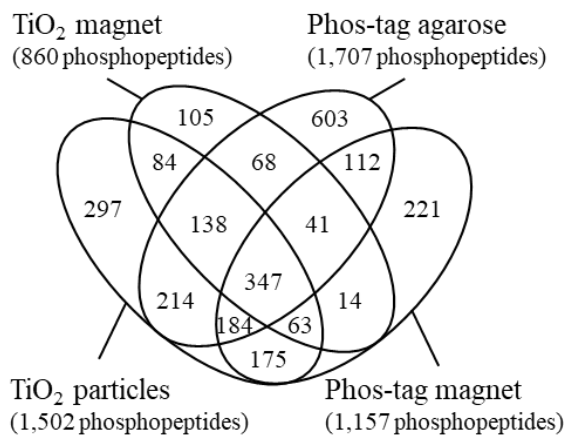
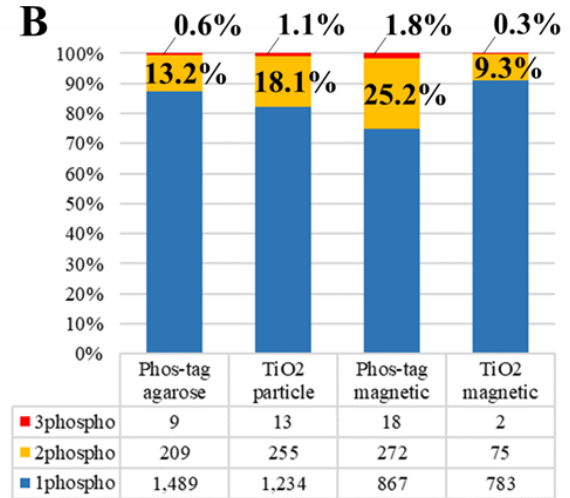
**A****B**

図 2-5. 細胞溶解液消化物からのリン酸化ペプチド濃縮（各方法により同定されたペプチドの重複とリン酸基の数）。（A）各濃縮方法で同定されたリン酸化ペプチドの重複。各方法について、3 回の反復実験を行い、再現良く同定されたリン酸化ペプチド同士を比較した。（B）同定されたマルチリン酸化部位を持つリン酸化ペプチドの数。



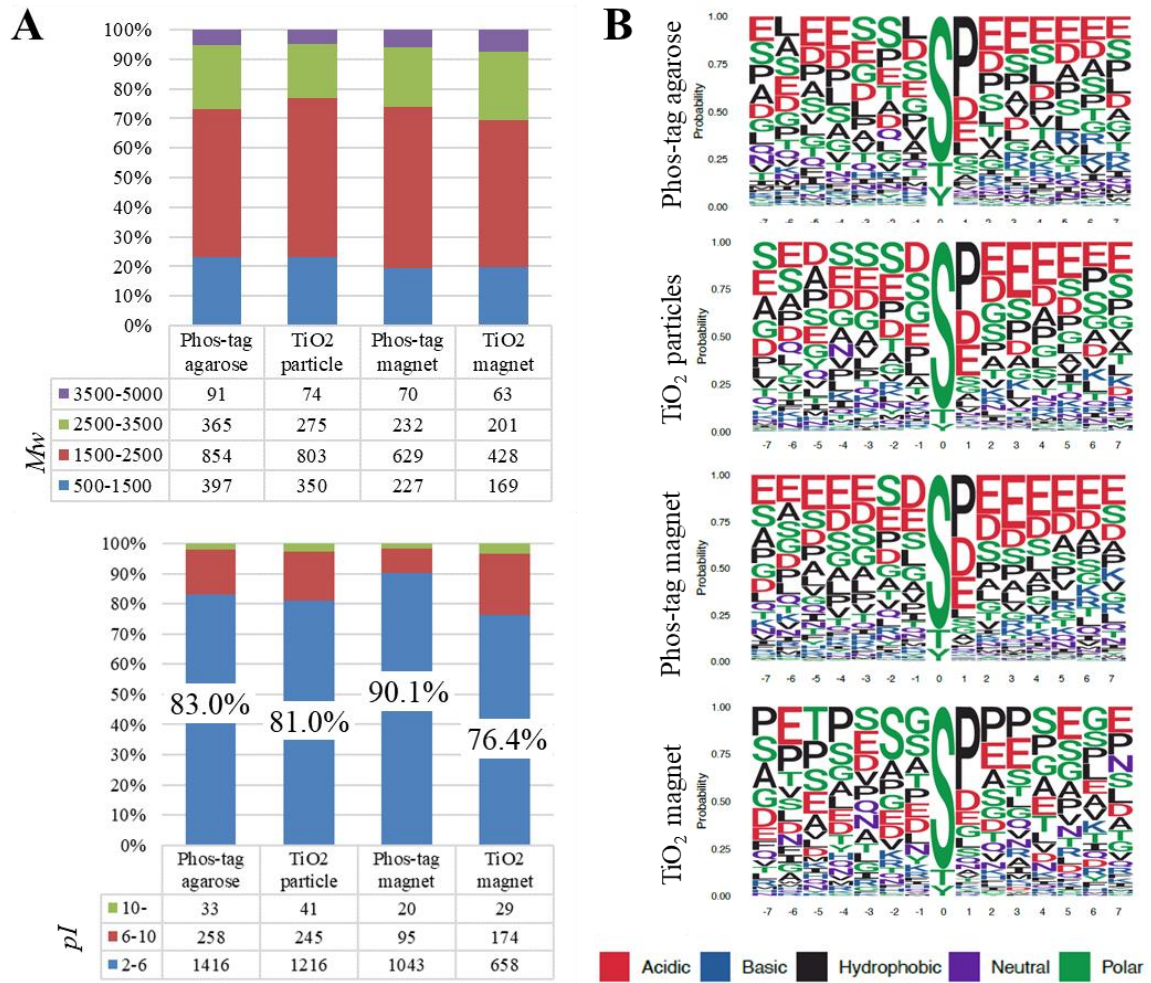


図 2-6. 各方法によって細胞溶解液消化物から同定されたリン酸化ペプチドの特性 (MASCOT)。(A) リン酸化ペプチドの分子量 (Mw) と等電点 (pI) の分布。各リン酸化ペプチドのアミノ酸配列に基づく理論的な Mw と pI は、ExPASy Compute pI/Mw ツールを用いて計算した。(B) motif-x アルゴリズムで予測されたリン酸化部位の配列モチーフ。

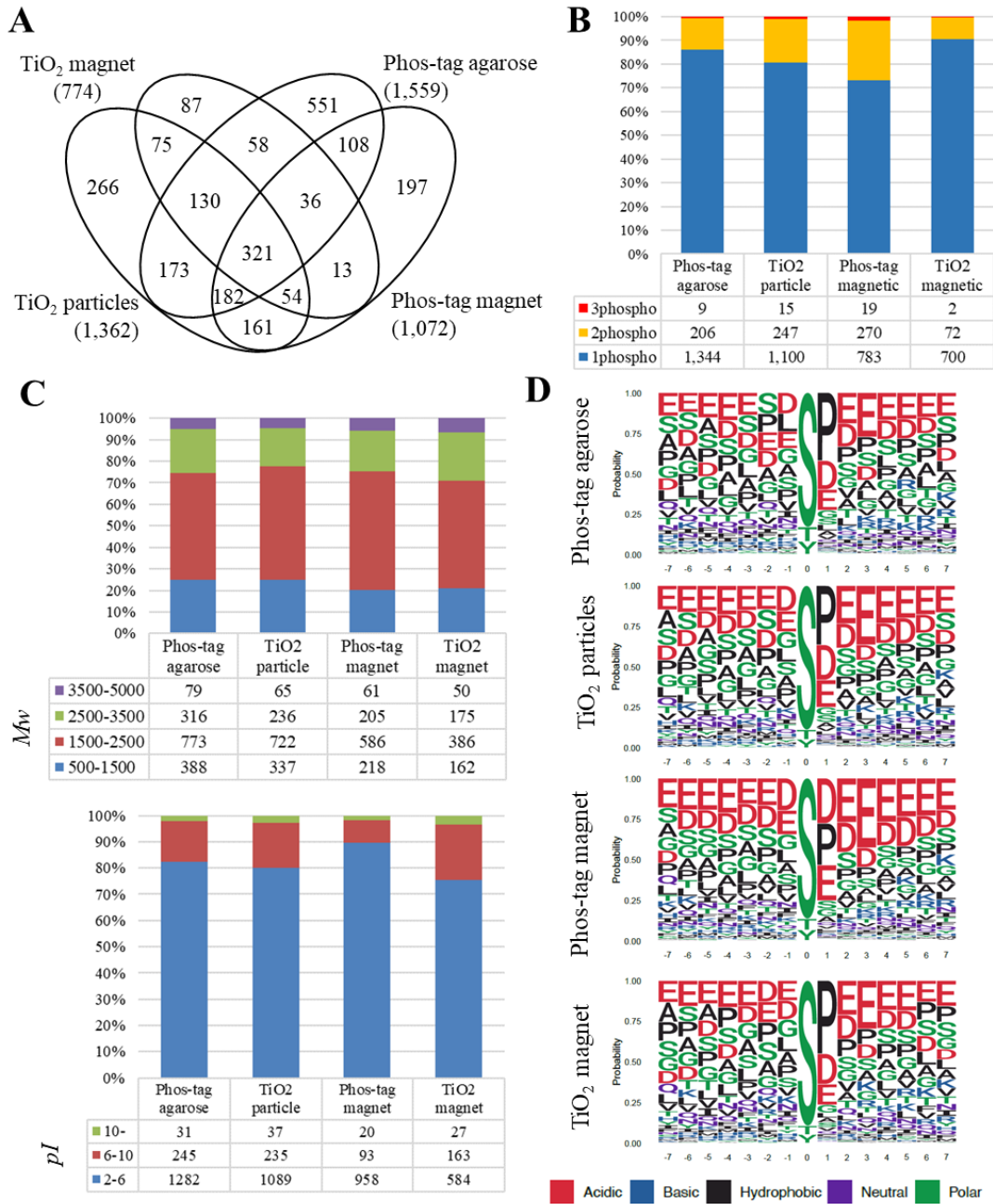


図 2-7. 各方法によって細胞溶解液消化物から同定されたリン酸化ペプチドの特性 (Proteome Discoverer with ptmRS)。(A) 各方法で同定されたリン酸化ペプチドの重複。(B) 1 ペプチド当たりのリン酸基の数。(C) リン酸化ペプチドの分子量 (Mw) と等電点 (pI) の分布。各リン酸化ペプチドのアミノ酸配列に基づく理論上の Mw と pI は、ExPASy Compute pI/Mw ツールを用いて計算した。(D) motif-x アルゴリズムで予測されたリン酸化部位の配列モチーフ。

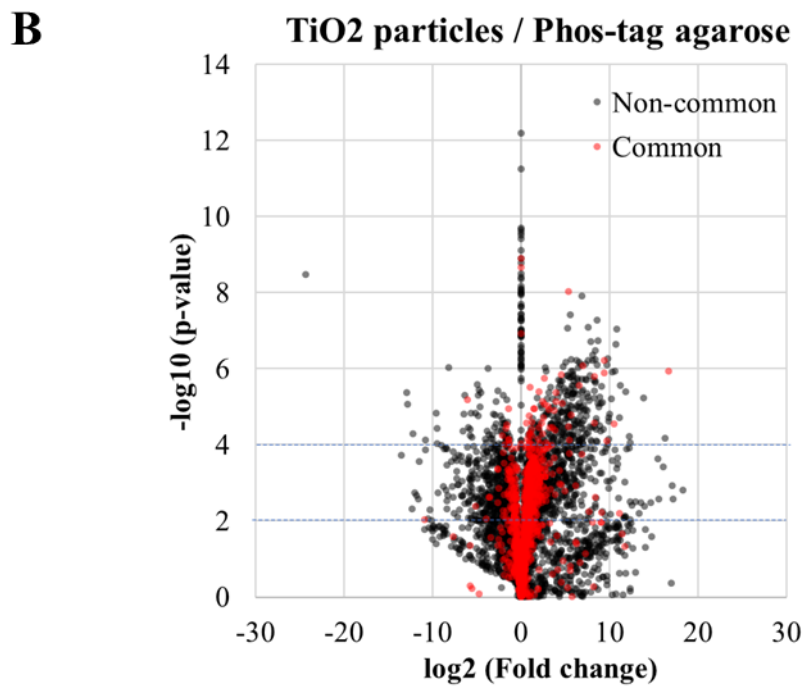
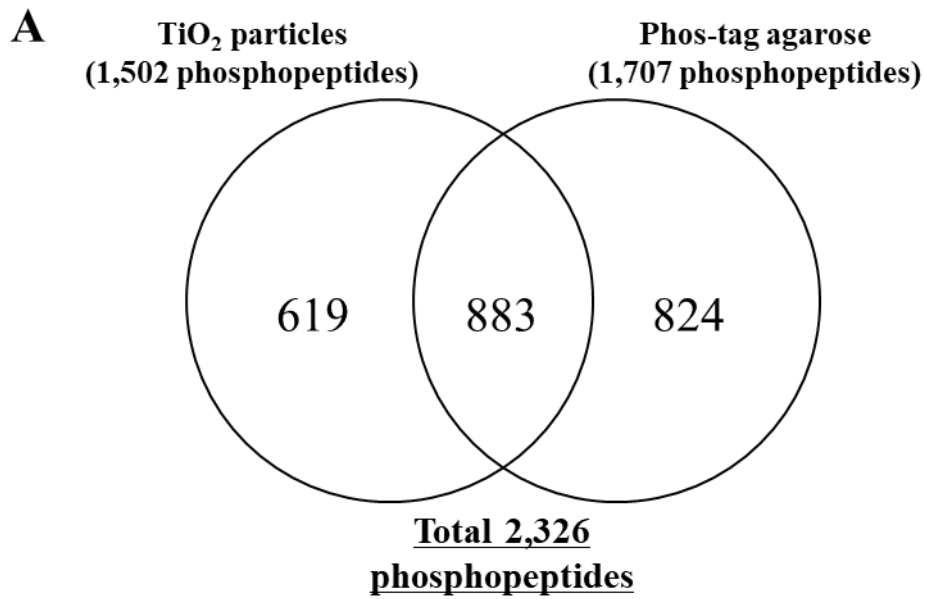


図 2-8. Phos-tag アガロースと TiO<sub>2</sub> 粒子を用いて細胞溶解液消化物から同定されたリン酸化ペプチドの重複。(A) 各手法で再現良く同定されたリン酸化ペプチドの重複。(B) 2 つの方法間のリン酸化ペプチドレベル (存在量) の差を表す Volcano プロット。赤い点は、共通して同定されたリン酸化ペプチド。

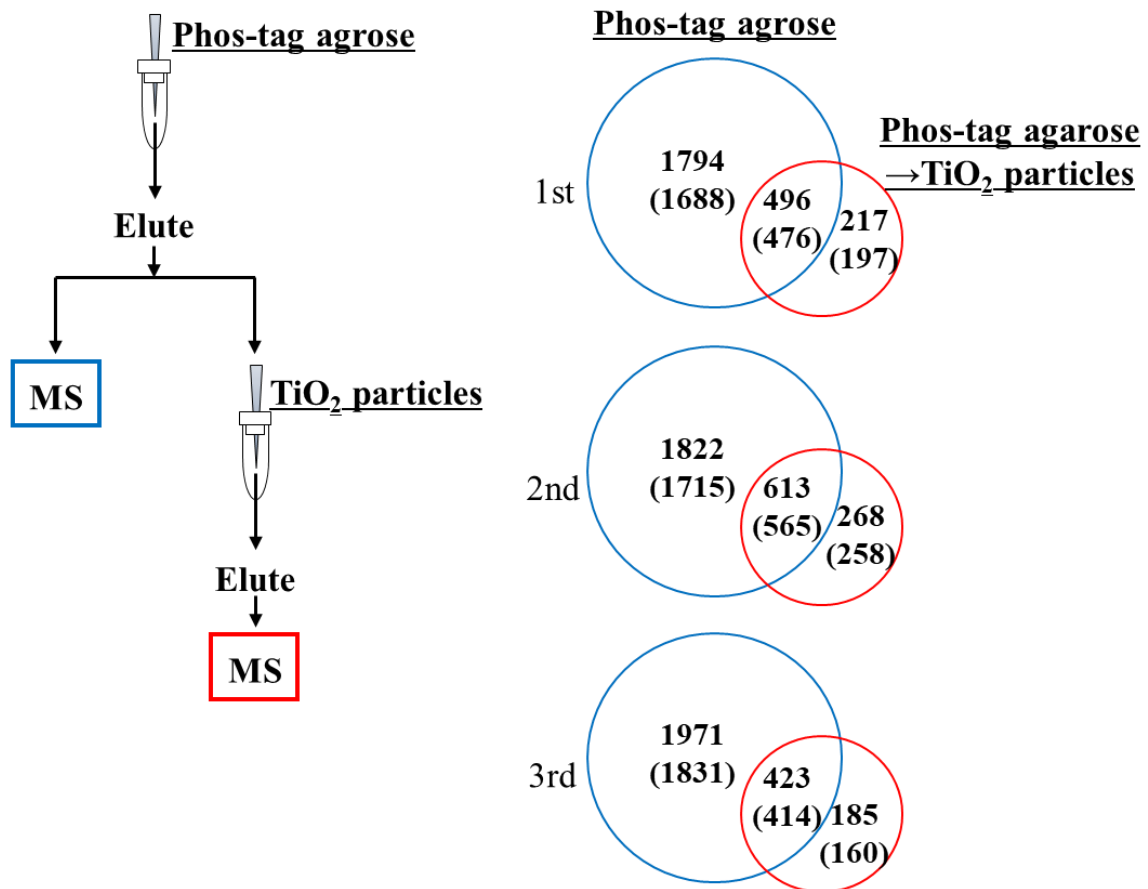


図 2-9. Phos-tag アガロースと TiO<sub>2</sub> 粒子の両方法で濃縮されたリン酸化ペプチドの類似点と相違点の評価。Phos-tag アガロースによるチップカラムを用いた最初の濃縮の後、TiO<sub>2</sub> 粒子によるチップカラムを用いてさらに濃縮を行った。リン酸化ペプチドの濃縮は、独立した 3 回の実験を実施した。括弧内は、Proteome Discoverer with ptmRS を用いて同定したリン酸化ペプチド数を示す。

## 引用文献

42. Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics*. 2007,6(6),1103-9.
44. Nabetani T, Kim YJ, Watanabe M, et al. Improved method of phosphopeptides enrichment using biphasic phosphate-binding tag/C18 tip for versatile analysis of phosphorylation dynamics. *Proteomics*. 2009,9(24),5525-33.
52. Beltran L, Cutillas PR. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids*. 2012,43(3),1009-24.
54. Li JR, Wang JF, Yan YM, et al. Comprehensive Evaluation of Different TiO<sub>2</sub>-Based Phosphopeptide Enrichment and Fractionation Methods for Phosphoproteomics. *Cells-Basel*. 2022,11(13).
55. Aryal UK, Ross ARS. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*. 2010,24(2),219-31.
56. Cantin GT, Shock TR, Park SK, et al. Optimizing TiO<sub>2</sub>-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2007,79(12),4666-73.
57. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim Biophys Acta*. 2015,1854(6),601-8.
58. Kinoshita E, Takahashi M, Takeda H, et al. Recognition of phosphate monoester dianion by an alkoxide-bridged dinuclear zinc(II) complex. *Dalton Trans*. 2004(8),1189-93.
59. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. History of Phos-tag technology for phosphoproteomics. *J Proteomics*. 2022,252,104432.
60. Kimura Y, Nagata K, Suzuki N, et al. Characterization of multiple

- alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics*. 2010,10(21),3884-95.
61. Tsunehiro M, Meki Y, Matsuoka K, et al. A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013,925,86-94.
62. Mann M, Ong SE, Gronborg M, et al. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol*. 2002,20(6),261-8.
63. Ino Y, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, et al. Evaluation of four phosphopeptide enrichment strategies for mass spectrometry-based proteomic analysis. *Proteomics*. 2022,22(7),e2100216.
64. Asano T, Nakamura H, Kawamoto Y, et al. Inhibition of Crmp1 Phosphorylation at Ser522 Ameliorates Motor Function and Neuronal Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice. *eNeuro*. 2022,9(3).
65. Wu FL, Liu Y, Jiang HW, et al. The Ser/Thr Protein Kinase Protein-Protein Interaction Map of *M. tuberculosis*. *Mol Cell Proteomics*. 2017,16(8),1491-506.
66. Kimura Y, Nakai Y, Shin J, et al. Identification of serum prognostic biomarkers of severe COVID-19 using a quantitative proteomic approach. *Sci Rep*. 2021,11(1),20638.
67. Galan A, Horvatic A, Kules J, et al. LC-MS/MS analysis of the dog serum phosphoproteome reveals novel and conserved phosphorylation sites: Phosphoprotein patterns in babesiosis caused by *Babesia canis*, a case study. *PLoS One*. 2018,13(11),e0207245.
68. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*. 1999,112,531-52.
69. Wagih O, Sugiyama N, Ishihama Y, et al. Uncovering Phosphorylation-Based Specificities through Functional Interaction Networks. *Mol Cell Proteomics*. 2016,15(1),236-45.
70. Wagih O. ggseqlogo: a versatile R package for drawing sequence logos.

- Bioinformatics. 2017,33(22),3645-7.
71. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Kubota Y, et al. A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the phosphorylation dynamics of MEK1. *Proteomics*. 2016,16(13),1825-36.
  72. Örd M, Loog M. Detection of Multisite Phosphorylation of Intrinsically Disordered Proteins Using Phos-tag SDS-PAGE. *Methods Mol Biol*. 2020,2141,779-92.
  73. Zheng H, Jia Q. A polymer monolith composed of a perovskite and cucurbit[6]uril hybrid for highly selective enrichment of phosphopeptides prior to mass spectrometric analysis. *Mikrochim Acta*. 2019,187(1),68.
  74. Hornbeck PV, Kornhauser JM, Latham V, et al. 15 years of PhosphoSitePlus(R): integrating post-translationally modified sites, disease variants and isoforms. *Nucleic Acids Res*. 2019,47(D1),D433-D41.
  75. Li QR, Ning ZB, Tang JS, et al. Effect of peptide-to-TiO<sub>2</sub> beads ratio on phosphopeptide enrichment selectivity. *J Proteome Res*. 2009,8(11),5375-81.
  76. Ferries S, Perkins S, Brownridge PJ, et al. Evaluation of Parameters for Confident Phosphorylation Site Localization Using an Orbitrap Fusion Tribrid Mass Spectrometer. *J Proteome Res*. 2017,16(9),3448-59.
  77. Yang XT, Zhang XF, Li YL, et al. TiO<sub>2</sub> with Confined Water Boosts Ultrahigh Selective Enrichment of Phosphorylated Proteins. *Acs Appl Mater Inter*. 2022,14(16),19067-75.
  78. Vilasi A, Fiume I, Pace P, et al. Enrichment specificity of micro and nano-sized titanium and zirconium dioxides particles in phosphopeptide mapping. *J Mass Spectrom*. 2013,48(11),1188-98.
  79. Emiko Kinoshita-Kikuta EK, Tohru Koike. Phos-tag-based phosphate affinity chromatographic techniques. *Journal of Chromatography Open*. 2022,2,100051.
  80. Tsunehiro M, Sasaki K, Kinoshita-Kikuta E, et al. Phos-tag-based micropipette-tip method for analysis of phosphomonoester-type impurities in synthetic oligonucleotides. *J Chromatogr B*. 2020,1151.

81. Zhou W, Ross MM, Tessitore A, et al. An initial characterization of the serum phosphoproteome. *J Proteome Res.* 2009,8(12),5523-31.
82. Awino JK, Gunasekara RW, Zhao Y. Selective Recognition of d-Aldohexoses in Water by Boronic Acid-Functionalized, Molecularly Imprinted Cross-Linked Micelles. *J Am Chem Soc.* 2016,138(31),9759-62.
83. Fang XW, Wang ZD, Sun NAR, et al. Magnetic metal oxide affinity chromatography-based molecularly imprinted approach for effective separation of serous and urinary phosphoprotein biomarker. *Talanta.* 2021,226.
84. Sano A, Nakamura H. Titania as a chemo-affinity support for the column-switching HPLC analysis of phosphopeptides: application to the characterization of phosphorylation sites in proteins by combination with protease digestion and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Sci.* 2004,20(5),861-4.



### 第 3 章.Phos-tag 技術を用いたリン酸化ペプチド濃縮法による

#### SARS-CoV-2 のヌcleoカプシドタンパク質の機能的リン酸化解析に関する研究

##### 3-1. 緒言

ウイルスの細胞内増殖においては、宿主細胞との相互作用が重要であると考えられている<sup>(85-87)</sup>。特に、宿主細胞のプロテインキナーゼによるウイルスタンパク質のリン酸化は、ウイルス-宿主細胞間で生じるタンパク質間相互作用の 1 つであり、ウイルスの活性、細胞内局在あるいは安定性を制御していると考えられている<sup>(88)</sup>。また、ウイルスタンパク質のリン酸化は、細胞内分子との相互作用にも影響を与え、ウイルス感染に伴う細胞機能や病原性に関与することも示唆されている<sup>(85-87)</sup>。このように、感染細胞におけるリン酸化は、ウイルスと宿主細胞とのタンパク質の機能に影響を与えるという点で、重要な翻訳後修飾の一つであり<sup>(89)</sup>、子孫ウイルスの産生能力にも影響を与える可能性がある<sup>(90)</sup>。

周知のごとく、新型コロナウイルス (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SARS-CoV-2) は、出現後パンデミックを引き起こし、人類に対し世界的かつ深刻な健康危機を招いており、当該ウイルスに関する包括的な研究を進める必要があるのは言うまでもない<sup>(91, 92)</sup>。一般に、ウイルスが宿主細胞へ感染後には、宿主細胞内でウイルスゲノムから、種々のタンパク質が翻訳され、これらのタンパク質の一部はリン酸化され、機能を発揮することが示唆されている<sup>(93)</sup>。SARS-CoV-2 においては、ウイルスゲノム RNA と複合体を形成し、ウイルスの転写や複製など、ウイルスのライフサイクルに関与する代表的な構造タンパク質のヌcleoカプシドタンパク質 (nucleocapsid protein, NP) が挙げられる<sup>(94-96)</sup>。よって、当該ウイルスの NP のリン酸化解析は、ウイルスの増殖や複製メカニズムの解明の一端に寄与すると思われる。また、第 2 章での検討から、Phos-tag 磁気ビーズを用いた試料調製法は、血清などの非リン酸化タンパク質を多く含む試料に最も適していることがわかった。そこで、まず、本研究では、SARS-CoV-2 感染細胞の培養上清中におけるタンパク質の網羅的リン酸化解析を行うとともに Phos-tag 磁気ビーズ法による NP タンパク質に関する詳細なリン酸化解析を実施した。

## 3-2.材料と方法

### 3-2-1 細胞培養法

アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来の培養細胞 VeroE6 細胞に TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) を恒常発現させた VeroE6/TMPRSS2 細胞は SARS-CoV-2 の分離・増殖実験に適していることが知られており<sup>(97)</sup>、本研究においても SARS-CoV-2 の感染実験に用いた。VeroE6/TMPRSS2 細胞は、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所の JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 細胞バンクから分譲され、10%FBS 添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した<sup>(98)</sup>。プラスミド導入実験に用いた HEK293A 細胞は、10%FBS 添加 DMEM で、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した<sup>(99)</sup>。

### 3-2-2 ウイルス増殖とウイルスタンパク質溶液の調製

SARS-CoV-2 株 (JPN/TY/WK-521) は国立感染症研究所から提供され、感染実験は横浜市立大学微生物学教室にご協力をいただき実施した。ウイルス力価はプラークアッセイにより測定した。VeroE6/TMPRSS2 細胞に SARS-CoV-2 を 0.05 MOI (感染多重度, multiplicity of infection ; MOI) で、72 時間・室温で感染させた。感染細胞は、PBS で洗浄後、1 mL の 50 mM Tris-HCl (pH7.4) , 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , 1 mM ethylene glycol bis(beta-aminoethylether)-N,N,N,N-tetraacetic acid (EGTA) , 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) , 1 mM DTT に溶解した。溶解液を 30 分間ローテーターにて攪拌し、15,000 rpm、4°C で遠心分離した<sup>(100)</sup>。遠心上清の一部は、アルカリフォスファターゼで処理し、Phos-tag SDS-PAGE と SDS-PAGE に使用した。培養液をコニカルチューブに採取して 17,700×g で遠心分離し、培養上清中に放出されたウイルス粒子を単離した。ウイルス粒子を PBS で洗浄し、8 M 尿素、50 mM 重炭酸アンモニウム、10 mM DTT を含む抽出バッファーに溶解し、60°C、30 分間加熱した。得られたウイルスタンパク質溶液は、Phos-tag 磁気ビーズを用いたリン酸化ペプチド濃縮と、抗 Pin1 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) を用いたイムノブロット解析による Pin1 検出に使用した。

### 3-2-3 Phos-tag SDS-PAGE

Phos-tag SDS-PAGE 用のゲルは、7.5%T (total acrylamide)、1%C (bis-acrylamide for cross-linking)、25 μM Phos-tag acrylamide (Wako Pure Chemical Industries)、50 μM MnCl<sub>2</sub> になるように自作して使用した。

SDS-PAGE には SuperSep Ace 5-20% gradient gel (Wako Pure Chemical Industries) を用いた。電気泳動のランニングバッファーには、25 mM Tris、192mM glycine、0.1% SDS を使用した。細胞溶解液を SDS サンプルバッファーで希釈し、95°Cで5分間加熱した。5  $\mu$ L を電気泳動後、ゲルを 1 mM EDTA を含むランニングバッファーに 20 分間浸し、ゲル中の Phos-tag に配位したマンガンイオンをキレートした後、ランニングバッファーで 10 分間 2 回洗浄した。ゲル内消化 (2-2-1)、リン酸化ペプチド精製 (2-2-3)、質量分析 (2-2-4) については、第 2 章と同じ方法で行った。

### 3-2-4 イムノブロット解析

ゲルで分離したタンパク質は Trans-Blot Turbo Transfer system (Bio-Rad) を用いてポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にエレクトロブロットティングした。PVDF 膜を 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングした後、0.5% スキムミルクで 500 倍希釈した抗 NP マウスモノクローナル抗体 (横浜市立大学微生物学教室より分与<sup>(101)</sup>) によって室温で 16 時間インキュベートした。Tween 20 含有 Tris 緩衝生理食塩水 (TBS-T) による洗浄後、0.5% スキムミルクで 5000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識マウス二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) によって室温で 1 時間インキュベートした。TBS-T による洗浄後、PVDF 膜上のタンパク質は ECL select<sup>™</sup> 試薬 (GE Healthcare) と LAS-4000 mini 化学発光検出装置 (Fujifilm, Tokyo, Japan) によって検出した。

### 3-2-5 Phos-tag 磁気ビーズを用いたリン酸化ペプチドの濃縮と質量分析

ウイルス粒子溶解液のトリプシン消化およびペプチド脱塩は、我々の既報<sup>(102)</sup>にしたがって行い、脱塩したペプチドをリン酸化ペプチドの濃縮に使用した。実験手順は 2 章の通りである。Phos-tag 磁気ビーズは株式会社ナード研究所から提供され、酢酸亜鉛を含む溶液でビーズを活性化した後、洗浄した。試料を添加してインキュベート後、未結合ペプチド (非リン酸化ペプチド) は、洗浄液により除去した。ビーズを洗浄した後、リン酸ナトリウム溶液でリン酸化ペプチドを溶出した。濃縮されたリン酸化ペプチドを脱塩し、質量分析に用いた。

### 3-2-6 質量分析とタンパク質同定

リン酸化ペプチドの質量分析と同定は、基本的に第 2 章 (2-2-4) に記載した条件にしたがって実施し、以下の条件のみ変更した。Nano HPLC capillary column = 75  $\mu$ m  $\times$  180 mm, C18, 3  $\mu$ m (Nikkyo Technos); グラジエント = 2-41% 移動相 B for 45 min; flow rate = 300 nL/min;

MASCOT search engine = version 2.7.0; database = SARS-CoV-2 のリン酸化ペプチドには SARS-CoV-2 amino acid sequences downloaded from the UniProtKD (2021.04) を、ウイルス粒子内の細胞由来タンパク質の同定には、Human amino acid sequences downloaded from the UniProtKD (2020.01) を使用した。リン酸化ペプチドの同定には、 $p < 0.05$  の有意閾値と 25 以上のペプチドスコアを同定基準として採用した。プロテオミクスデータは jPOST partner repository (<https://jpostdb.org/>) を介して ProteomeXchange Consortium (PXD027939, <http://www.proteomexchange.org/>) に登録した。GENETYX ソフトウェア (GENETYX CO., Tokyo, Japan) により、アミノ酸配列アライメントと分子系統解析を行い、相同性を確認した。BioGRID ウェブサイトツール (<https://thebiogrid.org/>)<sup>(103)</sup>を用いて、これまでに報告されている NP 相互作用タンパク質の検索を行った。

### 3-2-7 GST-Pin1 のプルダウン

SARS-CoV-2 NP のオープンリーディングフレームは、N 末端側に Flag-tag を持つ pcDNA 3.1 プラスミドに組み込んだ。Ser79 のコドンを変換してインバーサ PCR によって GCC (Ala) に置換し、NP の非リン酸化性変異体 (S79A) を発現するプラスミドを作製した。このプラスミド配列は制限酵素消化および DNA シーケンスにより確認した。Effectene Transfection Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてプラスミドを HEK 293A 細胞に導入した。GST-tag 付き Pin1 を用いたプルダウンアッセイは、既報<sup>(104)</sup>にしたがって行った。回収した細胞を、プルダウンバッファー (50 mM HEPES (pH 7.4)、200 mM NaCl、10% glycerol、1% TritonX-100、1 mM EDTA、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) に溶解させた。細胞溶解液を GST または GST-Pin1 を含むグルタチオンアガロースビーズに加え、4°C で 4 時間インキュベートした。ビーズに結合したタンパク質はプルダウンバッファーで 2 回洗浄後に 100  $\mu$ L の SDS サンプルバッファーで溶出し、イムノブロット分析による NP 検出に使用した。

### 3-2-8 shRNA レンチウイルスによる Pin1 のノックダウン

Sigma-Aldrich から購入した Pin1 を標的とする shRNA をコードするプラスミド (TRCN000001035 および TRCN0000010577) を、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 293T-レンチ-X 細胞にパッケージングプラスミドと共にトランスフェクションした。培養上清を 0.45- $\mu$ m フィルターを用いてろ過し、VeroE6/TMPRSS2 細胞に添加した後、2

μg/mL ピューロマイシンを用いて選択した。Pin1 のノックダウンは、抗 Pin1 抗体を用いたイムノブロット解析により確認した。

### 3-2-9 定量 RT-PCR とウイルス力価試験

Pin1 ノックダウン細胞およびコントロール細胞に SARS-CoV-2 を MOI 0.05 で感染させ、48 時間後に上清を回収し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて上清から全ウイルス RNA を抽出した。定量 RT-PCR (qRT-PCR) は、SARS-CoV-2 特異的プライマー (5'-AAATTTTGGGACCAGGAAC-3', 5'-TGGCAGCTGTGTAGTCAAC-3', and 5'-FAM-ATGTCGCATTGGCATGGA-BHQ-3')<sup>(105, 106)</sup> と CFX 96 Real-Time PCR system (Bio-Rad)、TaqMan Fast 1-step master mix reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。N2 スタンダード (Nihon Gene Research Laboratories, catalog number JP-NN2-PC) をもとに作成した標準曲線に Ct 値をプロットし、ウイルス RNA 量を算出した。ウイルス力価は、96 ウェルプレートの VeroE6/TMPRSS2 細胞を用い、1 ウイルス希釈あたり 4 ウェルで測定した。細胞に希釈ウイルス (1:100-1:100,000,000 希釈) 100 μL を接種した。接種から 3 日後、Cell-Titer Glo アッセイ (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、ウイルス感染によって誘発された細胞障害作用を測定した。感染率は以下のように算出した。

$$\frac{\text{RLU (sample without virus)} - \text{RLU (sample with virus)}}{\text{RLU (sample without virus)} - \text{RLU (blank)}} \times 100$$

また、50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) の値は、GraphPad Prism 8 ソフトウェアにより算出した。

## 3-3. 結果

### 3-3-1 Phos-tag SDS-PAGE による SARS-CoV-2 NP のリン酸化の確認

SARS-CoV-2 NP は、ウイルス粒子形成に重要な役割を果たす最も豊富な構造タンパク質と考えられている<sup>(94-96)</sup>。まず、本研究においては、SARS-CoV-2 NP がリン酸化されているか否かを調べるために、ウイルス感染 VeroE6/TMPRSS2 細胞の細胞溶解液を Phos-tag SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動し、アルカリフォスファターゼ処理系 (脱リン酸化処理) と未処理系で、抗 NP 抗体を用いたイムノブロット解析によりバンドパターンを比較した。その結果、いくつかのアップシフトしたバンドが観察され、それらはアルカリフォスファターゼ処理後に消失し、NP がリン酸化状態にあ

ることを確認した。アルカリフォスファターゼ処理後もいくつかのアップシフトしたバンドが残っており、今回の条件では NP の脱リン酸化は不完全であることが示唆された。一方、通常の SDS-PAGE では、試料間でこのような差はみられなかった（図 3-1）。これらの結果は、感染細胞において NP がリン酸化され、このリン酸化が Phos-tag リガンドによって認識される可能性を示唆した。

### 3-3-2 NP のリン酸化サイトの同定

次に、感染細胞から細胞外に放出された成熟したウイルス粒子のリン酸化状態を正確に調べるために、SARS-CoV-2 感染細胞から得られた培養上清を遠心分離後、ウイルス粒子を単離・回収した。Phos-tag SDS-PAGE によってアップシフトするバンドが観察されたことから、単離・回収されたウイルス粒子内の NP もリン酸化状態にあることが示唆された（図 3-2）。さらに、リン酸化されたウイルスタンパク質を同定するため、ウイルス粒子からタンパク質を抽出し、トリプシンによって消化後に Phos-tag 磁気ビーズを用いてリン酸化ペプチドを濃縮した。精製したペプチドを質量分析に供試し、得られた質量データを UniProtKD からダウンロードした SARS-CoV-2 のアミノ酸配列データベースと照合した。その結果、NP に由来するいくつかのペプチドフラグメントを同定した。その中の 1 つのフラグメント、GQGVPIINTNSpSPDDQIGYYR (#66-#89) は、Ser79 でリン酸化されており、再現良く同定された（図 3-3）。Ser79 の次のアミノ酸残基は Pro であり（Ser79-Pro80）、ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 の標的モチーフ（pSer/Thr-Pro）であることが明らかとなった。くわえて、今回検出された NP のリン酸化部位が進化的に保存されているか否かを調べるため、SARS-CoV-2 の近縁種の WIV1-CoV や SARS-CoV の NP のアミノ酸配列のマルチプルアライメント（多重整列）と分子系統樹解析を行った。WIV1-CoV と SARS-CoV については、既報に示されているように SARS-CoV-2 と高いアミノ酸の配列類似性を持つことが示唆された<sup>(107, 108)</sup>（図 3-4）。一方、今回同定された Ser79 は、他のコロナウイルスには存在せず、SARS-CoV-2 のみに観察される独自のリン酸化セリン残基であることが示唆された（図 3-4）。また、SARS-CoV-2 の変異株における NP の Pin1 標的モチーフ（Ser79-Pro80）周辺のアミノ酸配列のマルチプルアラインメントを実施した。その結果、Ser79-Pro80 は現在世界的に流行しているデルタ株やオミクロン株を含む変異体間で、ほぼ保存されていることがわかった。興味ある知見として、ガンマ変異株は Pro80 が Arg に置換されており（図 3-5）、

Pin1 はこの変異体由来の NP とは相互作用しない可能性も示唆された。

### 3-3-3 Pin1 と NP のリン酸化した Ser79-Pro80 モチーフとの結合

今回同定された Ser79 の次のアミノ酸残基はプロリンであり (Ser79-Pro80)、ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 の標的モチーフ (pSer/Thr-Pro) であることも示唆された。NP のアミノ酸配列全体では、他に 5 つの Pin1 認識/結合モチーフが存在すると考えられるが、Ser79 だけは WIV1-CoV や SARS-CoV には存在しない SARS-CoV-2 独自のアミノ酸残基であると思われた (図 3-6)。次に、GST プルダウンアッセイを用いて、Pin1 が NP と直接相互作用するかどうかを調べた (図 3-7)。その結果、NP は GST-Pin1 には結合するが陰性対照である GST のみには結合しないことが確認された。さらに、Ser79 を Ala に置換 (S79A) すると、GST-Pin1 と NP の結合が著しく減少することから、Pin1 がこの部位に結合していることが示唆された (図 3-8A)。

NP は、ウイルスのヌクレオカプシドの構造タンパク質であり、ウイルスのパッケージングの際、結合宿主タンパク質をウイルス粒子内に輸送することが知られている<sup>(109, 110)</sup>。そこで次に、Pin1 が NP との相互作用を介してウイルス粒子内に取り込まれる可能性があるため、ウイルス粒子内の Pin1 の存在を調べた。その結果イムノブロット解析により、ウイルス粒子内に Pin1 が存在することが確認された (図 3-8B)。

また、ウイルス粒子内に存在する他の宿主タンパク質を網羅的に解析するために、別の解析も並行して行った。その結果、質量分析により、感染細胞の培養上清中に 760 個のタンパク質が同定され、陰性対照である非感染細胞の培養上清で同定された 219 個のタンパク質を除いた 623 個のタンパク質が宿主細胞由来タンパク質であると考えられた (図 3-9)。培養上清から精製したウイルス粒子内で同定された宿主タンパク質の多くは転写や翻訳に関与しており、58 種類はすでに NP との結合が報告されている (表 3-1、図 3-9) (<https://thebiogrid.org/>)。なお、Pin1 はこの解析では検出されなかったが、これはタンパク質濃度が質量分析における検出限界値以下であったためと推定された。また、前項 (3-3-2) において、NP のリン酸化部位同定のために用いたウイルス粒子消化物の試料中にも宿主由来のリン酸化ペプチドが含まれている可能性があることも示唆された。そのため、さらにヒトアミノ酸配列データベースを使用した検索を行った。その結果、3 回解析中 3 回とも同定された宿主由来リン酸化ペプチドは Osteopontin、40S ribosomal protein S3、Cofilin-1 あるいは Heat shock protein beta-1

の4種類のタンパク質に由来することが示唆された。

### 3-3-4 Pin1 とウイルス複製との関係

NP と Pin1 の相互作用の機能を調べるため、2種類の Pin1 標的 shRNA (sh\_Pin1#1 および sh\_Pin1#2) を用いて、Pin1 が安定的に発現抑制された VeroE6/TMPRSS2 細胞を樹立した。Pin1 ノックダウンは免疫ブロット解析により、両 shRNA によって Pin1 の発現が十分に低下していることが確認された (図 3-10A)。また、これらの細胞に SARS-CoV-2 を感染させ (MOI=0.5)、48 時間後に培養上清中のウイルス RNA 量を qRT-PCR で測定した。その結果、Pin1 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較してウイルス RNA 量が著しく減少した (sh\_Pin1#1 で 33%、sh\_Pin1#2 で 38%) (図 3-10B)。同様に、Pin1 ノックダウン細胞では、ウイルス力価も対照細胞と比較して顕著に低下した (sh\_Pin1#1 および#2 で 26%) (図 3-10C)。これらの結果から、Pin1 はウイルスの複製を正に制御している可能性が示唆された。

### 3-4. 考察

ウイルスタンパク質の翻訳後の修飾解析は、ウイルスの複製や病原性の分子機構を理解する上で重要な手段であると考えられている<sup>(111)</sup>。特に、タンパク質のリン酸化は、多くのウイルスにおいて感染と増殖のために必要不可欠であることが示唆されている<sup>(112)</sup>。そこで、本研究では、Phos-tag 技術を利用して、SARS-CoV-2 NP の機能的リン酸化を明らかにし、病原体と宿主の相互作用における分子基盤機構の一部を明らかにすることを試みた。その結果、SARS-CoV-2 感染細胞において NP の Ser79 残基はリン酸化され、パッケージング後に放出されたウイルス粒子内でもリン酸化状態にあることが推定された。さらに、このリン酸化は、宿主因子である Pin1 との相互作用に必要であることも示唆された。さらに、Pin1 をノックダウンすると、感染細胞上清中のウイルス RNA 量が減少することから、Pin1 がウイルスの複製を増強させている可能性も推定された<sup>(113)</sup>。

本研究において使用した Phos-tag システムは、リン酸化プロテオミクスにおいて、様々な条件により変動するウイルスタンパク質のリン酸化パターンを解析するために利用されている<sup>(114, 115)</sup>。例えば、B 型肝炎ウイルスの構成タンパク質である HBc は、serine-arginine-rich protein kinase 1 (SRPK1) と共発現させるとリン酸化が促進されることが Phos-tag SDS-PAGE により明らかになっている<sup>(116)</sup>。また、A 型インフルエンザウイルス



の NP における Tyr78 のリン酸化も Phos-tag SDS-PAGE により確認されている<sup>(117)</sup>。本研究においても、SARS-CoV-2 の NP がリン酸化状態にあることを Phos-tag SDS-PAGE で確認した<sup>(113)</sup>。NP のリン酸化は、理論的にはプロリン指向性 Ser/Thr キナーゼ（CDK、GSK3、MAPK、CLK）などにより行われると考えられるが、本ウイルスは、プロテインキナーゼをコードしていないため、ウイルス感染後に宿主細胞のキナーゼによりリン酸化されると思われる<sup>(118)</sup>。また、NP はウイルスのライフサイクルの様々な過程に関与していることから<sup>(119)</sup>、機能的なリン酸化の解析は、ウイルス複製やウイルスによる細胞病原性の機能解明に有益であると考えられる<sup>(33)</sup>。

さらに、本研究においては、ウイルスのリン酸化タンパク質とそのリン酸化部位を同定するために、感染細胞の培養上清から採取したウイルス粒子を精製した。これまで実施されている SARS-CoV-2 のリン酸化タンパク質解析では、感染細胞をそのまま酵素消化して質量分析している<sup>(33, 120)</sup>。感染細胞内には、成熟前のプロテアーゼで切断されていない 1 本の長いポリペプチド鎖（前駆体）やアセンブリ前のタンパク質も存在している<sup>(121, 122)</sup>。我々はプロテアーゼ切断を受けて成熟したタンパク質のみを解析対象にするために、パッケージングされ細胞外に放出されたウイルス粒子を培養上清から回収して解析に用いた。実験施設のバイオセーフティ上の制約から、密度勾配超遠心法は実施できなかったが、簡便な遠心分離手順でウイルス粒子を精製し、タンパク質抽出とトリプシン消化を行い、Phos-tag 磁気ビーズでリン酸化ペプチドを濃縮してから質量分析を行うことを試みた。一般に、細胞培養上清に含まれる高濃度の FBS や複数の添加物は、質量分析解析においてしばしば障害となるが<sup>(123)</sup>、Phos-tag 磁気ビーズは、リン酸化ペプチドを高い選択性と再現性で効率的に精製するのに有用であることが示唆されている<sup>(61)</sup>。実際、我々の最近の研究において、Phos-tag 磁気ビーズによる濃縮法は、高濃度非リン酸化タンパク質を含む血清の分析に他の方法よりも適していることが実証されている<sup>(63)</sup>。ウイルス研究における Phos-tag 技術は Phos-tag SDS-PAGE を用いたものがほとんどであった。そのため、SARS-CoV-2 のリン酸化タンパク質（リン酸化ペプチド）を Phos-tag ビーズにより網羅的に検出して機能的なリン酸化を探索する試みは、我々が知る限りにおいて、本研究が初めてであると思われる<sup>(33, 124)</sup>。

くわえて、既報により、SARS-CoV-2 の NP は感染細胞内において複数のリン酸化部位が同定されている<sup>(33, 120)</sup>。一方、本研究では、放出されたウイルス粒子を試料として用いた解析を実施し、NP の Ser79 のみが再現良

く高いスコアで同定されることを確認した<sup>(113)</sup>。この理由として、ウイルス粒子の生成中または生成後に脱リン酸化が起こり、NP のリン酸化状態が変化している可能性が考えられる。実際、この仮説と一致して、本研究の Phos-tag SDS-PAGE では、NP のリン酸化バンドが細胞溶解液よりもウイルス粒子では少ないことが示された。また、B 型肝炎ウイルス感染で観察されるように、ウイルス粒子形成時にウイルスのコアタンパク質が脱リン酸化を受けることはよく知られている<sup>(125, 126)</sup>。これらの結果は、ウイルスのコアタンパク質の動的なリン酸化/脱リン酸化が、ウイルス複製の複数の過程を制御していることを示す可能性がある。

次に、本研究で実施した Phos-tag SDS-PAGE 解析において、SARS-CoV2 ウイルス粒子内には、いくつかの NP のリン酸化バンドが検出され、Ser79 以外のアミノ酸サイトでもリン酸化が起こっていることがわかった。しかし、他のサイトでのリン酸化は全て低スコアであるか、再現性がなかった。つまり、Ser79 のリン酸化のみが再現性が高く、高スコアであったことから、これは質量分析により解析されやすい部位と思われた。また、当該部位が再現良く検出されたことは、Ser79 が高頻度でリン酸化されている可能性も示唆している。この点においては、ウイルス粒子内の、NP のリン酸化の挙動を明らかにするために、さらなる研究が必要であろう。

さらに、本研究において、私たちは Pin1 が NP の Ser79 に結合し、ウイルスの複製を増強していることを明らかにした<sup>(113)</sup>。Pin1 は、リン酸化された Ser/Thr-Pro モチーフを特異的に認識し異性化するペプチジルプロリルシストラインソメラーゼである。Pin1 は、ペプチド結合のシス-トランス異性化を通じて構造変化を触媒し、標的タンパク質の触媒活性、局在性、安定性を変化させることが知られている<sup>(127, 128)</sup>。例えば、B 型肝炎のコアタンパク質である HBc では、宿主細胞の Pin1 とウイルスタンパク質の相互作用が報告されており、HBc のリン酸化サイトへの Pin1 の結合が HBc の安定性に寄与していることが示されている<sup>(114)</sup>。Pin1 によるリン酸化タンパク質の機能制御は、ウイルス-宿主細胞間の相互作用にも影響を及ぼしていることが示唆されている<sup>(129)</sup>。RNA ウイルス感染症における粒子内 Pin1 の役割は、広く研究されている。Misumi らは、HIV の脱殻過程にはカプシドタンパク質と Pin1 との相互作用が必要であることを示した<sup>(130)</sup>。また、RNA 干渉による Pin1 発現抑制は、HIV-1 の複製の抑制による標的細胞の細胞質内に存在する粒子状カプシドコアの数が増加することも示唆している<sup>(130)</sup>。さらに、Manganaro らは、Pin1 が HIV-1 インテグラーゼの構造変化

を触媒し、その安定性を高めることで、HIV-1 の効率的なインテグレーション反応と感染に関係していることを報告した<sup>(131)</sup>。興味深いことに、近年、Yamamotoya らは、Pin1 を標的とした低分子阻害剤が COVID-19 の治療薬となる可能性を報告している<sup>(132)</sup>。これらの結果は、Pin1 がウイルスと宿主細胞間の分子間クロストークに重要な役割を果たし、抗ウイルス治療のユニークな標的となる可能性を示唆している。

また、複数のコロナウイルスの NP の配列を比較した結果、興味深いことに、Ser79 は SARS-CoV-2 に特異的に存在し他のコロナウイルスにはないリン酸化部位であることが明らかになった。SARS-CoV-2 は、より効率的な増殖と宿主細胞への適応を実現するために進化したと考えられる。今後は、このようなウイルスタンパク質のリン酸化と Pin1 との相互作用を詳細に解明することで、Pin1 が関わるウイルス増殖の分子機構をさらに明らかにすることが望まれる。

くわえて、Pin1 以外の多くの宿主由来タンパク質がウイルス粒子内に存在することも明らかにされた。これらは Pin1 同様に、ウイルスタンパク質と相互作用することで粒子内に取り込まれた可能性、そしてウイルスの増殖と複製に何らかの役割を果たしている可能性があると考えられる。同定された宿主由来のリン酸化部位は Osteopontin、40S ribosomal protein S3、Cofilin-1 あるいは Heat shock protein beta-1 に由来するものであった。Cofilin-1 と Heat shock protein beta-1 については、そのリン酸化がアクチン線維の重合と再構築を調節していると報告されている<sup>(133, 134)</sup>。特に、今回同定された Cofilin-1 の Ser3 は LIM キナーゼからリン酸化を受け、Ser3 がリン酸化した Cofilin-1 は不活性型となりアクチン線維の切断と脱重合が阻害される<sup>(134)</sup>。ウイルスは、ライフサイクルの様々な過程で、アクチンなどの宿主の細胞骨格系を利用している<sup>(135)</sup>。放出されたウイルス粒子内にリン酸化 Cofilin-1 が存在したことは、SARS-CoV-2 がウイルスの複製や放出の過程で Cofilin-1 によるアクチン線維の再構築のシステムを利用している可能性を示唆している。

最後に、本研究においては、Vero E6/TMPRSS2 の細胞培養モデルのみを用いたため、観察された現象は NP リン酸化や Pin1 相互作用の点で生体内の事象を反映していない可能性があることが、本研究の制限として挙げられる。現時点で最も優れていると思われる方法を用い、SARS-CoV-2 のウイルス感染に関わる Pin-1 と相互作用する NP の新規リン酸化部位を同定し、リン酸化プロテオミクス解析がウイルス研究分野において非常に有用なア

アプローチであることを初めて証明した。リン酸化プロテオミクス解析技術の改良は現在も進行中であり、より優れた前処理法やより高性能・好感度な質量分析装置の利用により、ウイルスのリン酸化プロテオームをより詳細かつ完全に解明することが可能になると予想される<sup>(50, 136)</sup>。そうなれば、ウイルス研究の新たな局面が開かれることが期待され、本研究はその先駆的な研究と位置づけられる。

### 3-5. 結語

本研究では、Phos-tag 技術と質量分析を応用し、SARS-CoV-2 NP の Ser79 がリン酸化されていること、そのリン酸化が宿主タンパク質の Pin1 との相互作用に重要であることを示した。また、そのリン酸化部位は他のコロナウイルスには存在せず、SARS-CoV-2 特異的であることも示唆された。さらに、NP と Pin1 の相互作用は、ウイルス粒子の安定性と感染性に寄与している可能性が示唆された。これまで SARS-CoV-2 NP の Ser79 のリン酸化は検出・同定はされてはいたが、その生理的な機能については明らかになっておらず、本研究において初めてその一端が明らかにされた。特に、成熟後、細胞外に放出されたウイルス粒子内のタンパク質のリン酸化を解析するために Phos-tag 技術を応用したのは、我々が知る限りにおいて、本研究が初めてであると思われる。かように、本研究で得られた結果すなわち、Pin1 依存的なウイルス構造タンパク質の機能制御は、これまで知られていなかったウイルス-宿主間相互作用を明らかにした。究極的に、このことは、Pin1 が COVID-19 の治療標的分子となる可能性を示している。

表 3-1. ゲル内消化および質量分析により同定された SARS-CoV-2 粒子中の宿主細胞由来タンパク質

Supplemental Table S1. Proteins of host cells identified by in-gel digestion and LC-MS/MS analysis in SARS-CoV-2 particles.

Accession No.	Gene name	Accession No.	Gene name	Accession No.	Gene name	Accession No.	Gene name
A2A3N6	PIPSL	P15311	EZR	P51149	RAB7A	Q14847	LASP1
A6NGU5	GGT3P	P15531	NME1	P51665	PSMD7	Q14974	KPNB1
B5MD39	GGTLC3	P15880	RPS2	P51991	HNRNPA3	Q15008	PSMD6
B5ME19	EIF3CL	P16152	CBR1	P52272	HNRNPM	Q15019	SEPTIN2
E9PAV3	NACA	P16403	H1-2	P52597	HNRNPF	Q15084	PDIA6
O00159	MYO1C	P16422	EPCAM	P52758	RIDA	Q15102	PAFAH1B3
O00203	AP3B1	P16444	DPEP1	P52907	CAPZA1	Q15149	PLEC
O00214	LGALS8	P17096	HMGA1	P52943	CRIP2	Q15181	PPA1
O00231	PSMD11	P17174	GOT1	P53396	ACLY	Q15233	NONO
O00232	PSMD12	P17655	CAPN2	P53621	COPA	Q15323	KRT31
O00299	CLIC1	P17931	LGALS3	P54136	RARS1	Q15365	PCBP1
O00303	EIF3F	P17980	PSMC3	P54709	ATP1B3	Q15366	PCBP2
O00410	IPO5	P18077	RPL35A	P54920	NAPA	Q15393	SF3B3
O00425	IGF2BP3	P18085	ARF4	P55010	EIF5	Q15417	CNN3
O00487	PSMD14	P18124	RPL7	P55060	CSE1L	Q15436	SEC23A
O14493	CLDN4	P18621	RPL17	P55072	VCP	Q15717	ELAVL1
O14744	PRMT5	P18669	PGAM1	P55209	NAP1L1	Q15836	VAMP3
O14745	SLC9A3R1	P18754	RCC1	P55786	NPEPPS	Q15907	RAB11B
O14818	PSMA7	P19338	NCL	P55884	EIF3B	Q15910	EZH2
O14950	MYL12B	P19784	CSNK2A2	P56537	EIF6	Q16181	SEPTIN7
O14979	HNRNPD	P20020	ATP2B1	P59998	ARPC4	Q16401	PSMD5
O14980	XPO1	P20042	EIF2S2	P60174	TP11	Q16543	CDC37
O15143	ARPC1B	P20073	ANXA7	P60228	EIF3E	Q16610	ECM1
O15144	ARPC2	P20340	RAB6A	P60660	MYL6	Q16643	DBN1
O15145	ARPC3	P20618	PSMB1	P60842	EIF4A1	Q16851	UGP2
O15305	PMM2	P21281	ATP6V1B2	P60866	RPS20	Q2VIR3	EIF2S3B
O15438	ABCC3	P21283	ATP6V1C1	P60900	PSMA6	Q53H96	PYCR3
O15439	ABCC4	P21291	CSR1P	P60953	CDC42	Q53QZ3	ARHGAP15
O15511	ARPC5	P21730	C5AR1	P61006	RAB8A	Q5D862	FLG2
O43143	DHX15	P21926	CD9	P61019	RAB2A	Q5JWF2	GNAS
O43175	PHGDH	P22102	GART	P61020	RAB5B	Q5JXB2	UBE2NL
O43324	EEF1E1	P22234	PAICS	P61026	RAB10	Q5QNW6	HIST2H2BF
O43390	HNRNPR	P22314	UBA1	P61077	UBE2D3	Q5T2W1	PDZK1
O43396	TXNL1	P22626	HNRNPA2B1	P61106	RAB14	Q5T6V5	C9orf64
O43491	EPB41L2	P22735	TGM1	P61158	ACTR3	Q5VW32	BROX
O43548	TGM5	P23246	SFPQ	P61160	ACTR2	Q5VYS4	MEDAG
O43684	BUB3	P23284	PPIB	P61163	ACTR1A	Q66K14	TBC1D9B
O43707	ACTN4	P23381	WARS1	P61204	ARF3	Q6DKJ4	NXN
O43795	MYO1B	P23396	RPS3	P61247	RPS3A	Q6EEV6	SUMO4
O43852	CALU	P23528	CFL1	P61289	PSME3	Q6IMI6	SULT1C3
O60218	AKR1B10	P24534	EEF1B2	P61313	RPL15	Q6IS14	EIF5AL1
O60506	SYNCRIP	P24666	ACP1	P61353	RPL27	Q6KB66	KRT80
O60701	UGDH	P25398	RPS12	P61923	COPZ1	Q6XQN6	NAPRT
O60716	CTNND1	P25685	DNAJB1	P61978	HNRNPK	Q6ZVX7	NCCRP1
O60763	USO1	P25705	ATP5F1A	P61981	YWHAG	Q71DI3	HIST2H3A
O60841	EIF5B	P25786	PSMA1	P62081	RPS7	Q7KZF4	SND1
O60869	EDF1	P25787	PSMA2	P62136	PPP1CA	Q7KZI7	MARK2
O60884	DNAJA2	P25788	PSMA3	P62140	PPP1CB	Q7L1Q6	BZW1
O75143	ATG13	P26006	ITGA3	P62195	PSMC5	Q7L266	ASRGL1
O75367	MACROH2A1	P26196	DDX6	P62241	RPS8	Q7L2H7	EIF3M
O75390	CS	P26373	RPL13	P62244	RPS15A	Q7L576	CYFIP1

(続き)

O75436	VPS26A	P26599	PTBP1	P62249	RPS16	Q7Z5H4	VN1R5
O75607	NPM3	P26639	TARS1	P62263	RPS14	Q86TW2	ADCK1
O75874	IDH1	P26640	VAR51	P62266	RPS23	Q86U42	PABPN1
O75955	FLOT1	P26641	EEF1G	P62269	RPS18	Q86VP6	CAND1
O76013	KRT36	P27105	STOM	P62277	RPS13	Q86XF0	DHFR2
O95154	AKR7A3	P27348	YWHAQ	P62314	SNRPD1	Q86Y46	KRT73
O95336	PGLS	P27635	RPL10	P62318	SNRPD3	Q8IW75	SERPINA12
O95373	IPO7	P27695	APEX1	P62330	ARF6	Q8N1N4	KRT78
O95832	CLDN1	P27708	CAD	P62333	PSMC6	Q8N257	HIST3H2BB
O95861	BPNT1	P27797	CALR	P62424	RPL7A	Q8N490	PNKD
P00352	ALDH1A1	P27816	MAP4	P62495	ETF1	Q8N7X4	MAGEB6
P00491	PNP	P27824	CANX	P62701	RPS4X	Q8NC51	SERBP1
P00492	HPRT1	P28066	PSMA5	P62714	PPP2CB	Q8NHP1	AKR7L
P00918	CA2	P28072	PSMB6	P62750	RPL23A	Q8WUM4	PDCD6IP
P00966	ASS1	P28074	PSMB5	P62753	RPS6	Q8WW12	PCNP
P01040	CSTA	P28482	MAPK1	P62805	H4C1	Q8WW24	TEKT4
P01111	NRAS	P28838	LAP3	P62820	RAB1A	Q8WXE9	STON2
P01834	IGKC	P29218	IMPA1	P62826	RAN	Q8WXH0	SYNE2
P01859	IGHG2	P29317	EPHA2	P62829	RPL23	Q8WYA1	ARNTL2
P02545	LMNA	P29323	EPHB2	P62847	RPS24	Q92499	DDX1
P04083	ANXA1	P29692	EEF1D	P62851	RPS25	Q92598	HSPH1
P04424	ASL	P29966	MARCKS	P62854	RPS26	Q92734	TFG
P04439	HLA-A	P29992	GNA11	P62873	GNB1	Q92764	KRT35
P04632	CAPNS1	P30040	ERP29	P62888	RPL30	Q92841	DDX17
P04792	HSPB1	P30041	PRDX6	P62899	RPL31	Q92887	ABCC2
P04899	GNAI2	P30043	BLVRB	P62906	RPL10A	Q93008	USP9X
P05023	ATP1A1	P30044	PRDX5	P62913	RPL11	Q96A72	MAGOHB
P05026	ATP1B1	P30050	RPL12	P62917	RPL8	Q96AE4	FUBP1
P05089	ARG1	P30085	CMPK1	P62937	PPIA	Q96BW5	PTER
P05106	ITGB3	P30086	PEBP1	P62979	RPS27A	Q96C19	EFHD2
P05141	SLC25A5	P30419	NMT1	P63000	RAC1	Q96CX2	KCTD12
P05198	EIF2S1	P30511	HLA-F	P63096	GNAI1	Q96EP5	DAZAP1
P05386	RPLP1	P30520	ADSS2	P63244	RACK1	Q96FW1	OTUB1
P05387	RPLP2	P31150	GDII	P67809	YBX1	Q96FZ7	CHMP6
P05388	RPLP0	P31153	MAT2A	P68371	TUBB4B	Q96HN2	AHCYL2
P05413	FABP3	P31689	DNAJA1	P68402	PAFAH1B2	Q96NY7	CLIC6
P05455	SSB	P31942	HNRNPH3	P78371	CCT2	Q96P63	SERPINB12
P05783	KRT18	P31943	HNRNPH1	P78386	KRT85	Q96QA5	GSDMA
P05787	KRT8	P31944	CASP14	P78524	DENND2B	Q96QK1	VPS35
P06454	PTMA	P31946	YWHAB	P80723	BASP1	Q99447	PCYT2
P06576	ATP5F1B	P31949	S100A11	P82979	SARNP	Q99460	PSMD1
P06733	ENO1	P32929	CTH	P83731	RPL24	Q99497	PARK7
P06748	NPM1	P32969	RPL9	P84098	RPL19	Q99519	NEU1
P06753	TPM3	P33176	KIF5B	P84103	SRSF3	Q99536	VAT1
P06756	ITGAV	P34896	SHMT1	Q00341	HDLBP	Q99538	LGMN
P07355	ANXA2	P34932	HSPA4	Q00577	PURA	Q99729	HNRNPAB
P07384	CAPN1	P35080	PFN2	Q00610	CLTC	Q99873	PRMT1
P07741	APRT	P35221	CTNNA1	Q00688	FKBP3	Q9BR76	CORO1B
P07814	EPRS1	P35268	RPL22	Q00839	HNRNPU	Q9BRF8	CPPED1
P07910	HNRNPC	P35579	MYH9	Q01082	SPTBN1	Q9BRL6	SRSF8
P07954	FH	P35606	COPB2	Q01469	FABP5	Q9BSU3	NAA11
P08133	ANXA6	P35637	FUS	Q01813	PFKP	Q9BUF5	TUBB6

(続き)

P08183	ABCB1	P35754	GLRX	Q01844	EWSR1	Q9BUT1	BDH2
P08195	SLC3A2	P35998	PSMC2	Q02790	FKBP4	Q9BVK6	TMED9
P08238	HSP90AB1	P36507	MAP2K2	Q02878	RPL6	Q9BXS5	AP1M1
P08572	COL4A2	P36578	RPL4	Q04695	KRT17	Q9BYE9	CDHR2
P08579	SNRPB2	P37108	SRP14	Q04760	GLO1	Q9C037	TRIM4
P08670	VIM	P37837	TALDO1	Q04828	AKR1C1	Q9H089	LSG1
P08708	RPS17	P38159	RBMX	Q04917	YWHAH	Q9H511	KLHL31
P08754	GNAI3	P38606	ATP6V1A	Q05639	EEF1A2	Q9HAV0	GNB4
P08758	ANXA5	P38646	HSPA9	Q06210	GFPT1	Q9HB71	CACYBP
P08865	RPSA	P38919	EIF4A3	Q06323	PSME1	Q9HC38	GLOD4
P08962	CD63	P39019	RPS19	Q07020	RPL18	Q9NR31	SAR1A
P09211	GSTP1	P39023	RPL3	Q08188	TGM3	Q9NSB4	KRT82
P09382	LGALS1	P40121	CAPG	Q08211	DHX9	Q9NTK5	OLA1
P09429	HMGB1	P40429	RPL13A	Q09028	RBBP4	Q9NUQ9	FAM49B
P09493	TPM1	P40925	MDH1	Q09666	AHNAK	Q9NVA2	SEPTIN11
P09525	ANXA4	P40926	MDH2	Q12846	STX4	Q9NY33	DPP3
P09651	HNRNPA1	P41250	GARS1	Q12904	AIMP1	Q9NZ32	ACTR10
P09913	IFTT2	P41252	IARS1	Q12905	ILF2	Q9NZH8	IL36G
P0C0S5	H2AZ1	P42224	STAT1	Q12906	ILF3	Q9NZM1	MYOF
P0C0S8	H2AC11	P43034	PAFAH1B1	Q12912	LRMP	Q9NZP5	OR5AC2
PODME0	SETSIP	P43487	RANBP1	Q13045	FLII	Q9NZT1	CALML5
PODMV8	HSPA1A	P46459	NSF	Q13148	TARDBP	Q9P0V9	SEPTIN10
PODOX5		P46776	RPL27A	Q13200	PSMD2	Q9P291	ARMCX1
PODP23	CALM1	P46777	RPL5	Q13283	G3BP1	Q9P2J5	LARS1
PODP57	SLURP2	P46778	RPL21	Q13347	EIF3I	Q9UBQ5	EIF3K
P10301	RRAS	P46781	RPS9	Q13404	UBE2V1	Q9UBY0	SLC9A2
P10599	TXN	P46782	RPS5	Q13409	DYNC1I2	Q9UDY8	MALT1
P10619	CTSA	P46783	RPS10	Q13442	PDAP1	Q9UHD8	SEPTIN9
P11021	HSPA5	P46821	MAP1B	Q13492	PICALM	Q9UI42	CPA4
P11047	LAMC1	P46926	GNPDA1	Q13561	DCTN2	Q9UJ70	NAGK
P11216	PYGB	P46939	UTRN	Q13596	SNX1	Q9UJU6	DBNL
P11233	RALA	P46940	IQGAP1	Q13641	TPBG	Q9UL25	RAB21
P11279	LAMP1	P47755	CAPZA2	Q13772	NCOA4	Q9UL46	PSME2
P11586	MTHFD1	P47756	CAPZB	Q13813	SPTAN1	Q9ULA0	DNPEP
P11940	PABPC1	P47897	QARS1	Q13835	PKP1	Q9ULV4	CORO1C
P12004	PCNA	P48059	LIMS1	Q13838	DDX39B	Q9UMS4	PRPF19
P12035	KRT3	P48147	PREP	Q13867	BLMH	Q9UMS6	SYNPO2
P12081	HARS1	P48444	ARCNI	Q13885	TUBB2A	Q9UNM6	PSMD13
P12268	IMPDH2	P48637	GSS	Q14103	HNRNPD	Q9UNS2	COPS3
P12277	CKB	P49189	ALDH9A1	Q14152	EIF3A	Q9UNX3	RPL26L1
P12956	XRCC6	P49207	RPL34	Q14168	MPP2	Q9UPY8	MAPRE3
P13010	XRCC5	P49327	FASN	Q14195	DPYSL3	Q9UQ80	PA2G4
P13489	RNH1	P49411	TUFM	Q14204	DYNC1HI	Q9Y230	RUVBL2
P13639	EEF2	P49720	PSMB3	Q14254	FLOT2	Q9Y265	RUVBL1
P13667	PDIA4	P49721	PSMB2	Q14315	FLNC	Q9Y266	NUDC
P13693	TPT1	P49773	HINT1	Q14344	GNA13	Q9Y295	DRG1
P14550	AKR1A1	P50454	SERPINH1	Q14444	CAPRIN1	Q9Y3F4	STRAP
P14618	PKM	P50502	ST13	Q14451	GRB7	Q9Y3U8	RPL36
P14625	HSP90B1	P50552	VASP	Q14525	KRT33B	Q9Y5S9	RBM8A
P14678	SNRPB	P50914	RPL14	Q14533	KRT81	Q9Y6E2	BZW2
P14735	IDE	P50991	CCT4	Q14574	DSC3	Q9Y6U3	SCIN
P14868	DARS1	P50995	ANXA11	Q14697	GANAB	Q9Y6V0	PCLO
P15121	AKR1B1	P51148	RAB5C	Q14764	MVP		

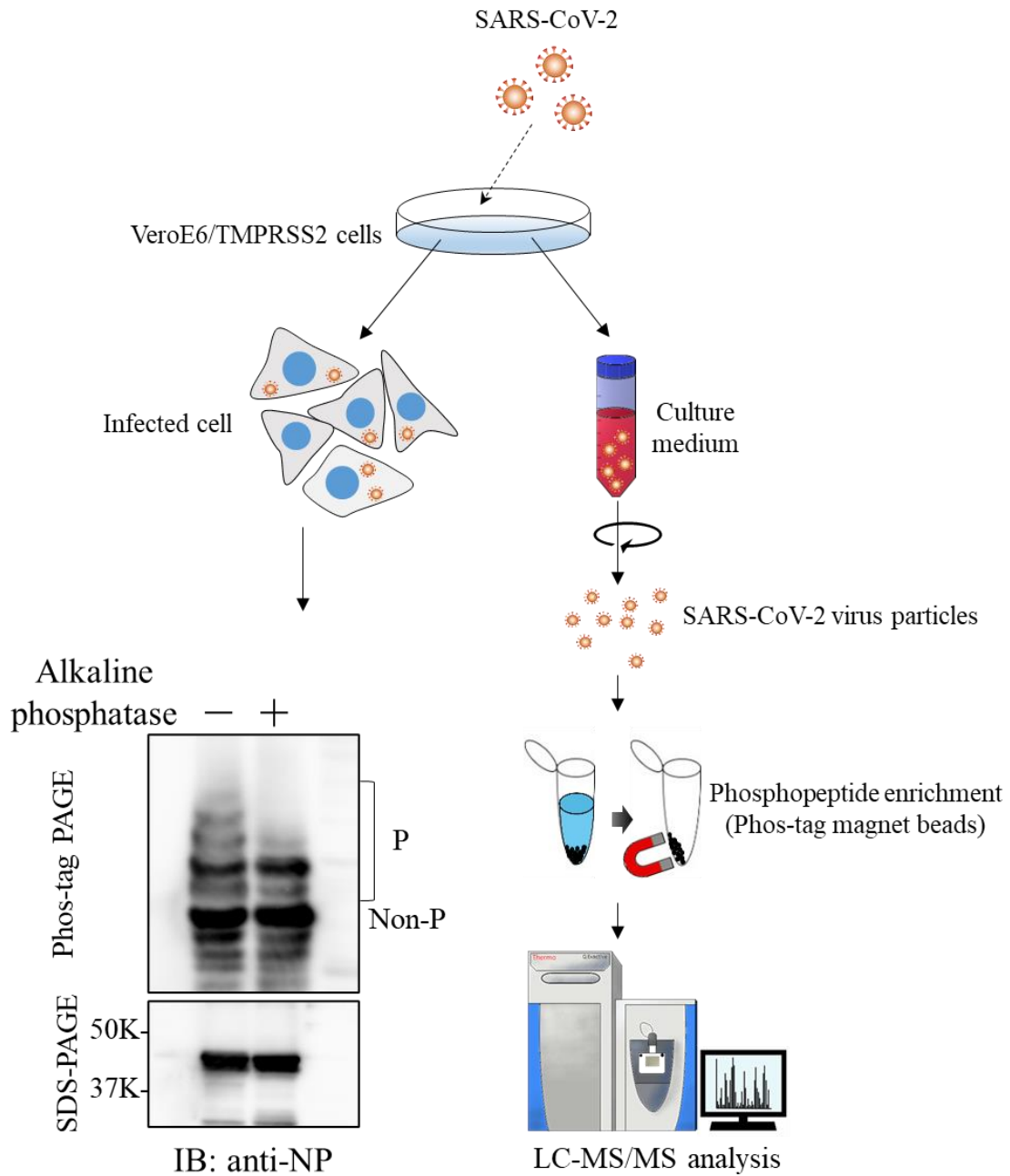


図 3-1.SARS-CoV-2 における NP のリン酸化の確認。VeroE6/TMPRSS2 細胞に SARS-CoV-2 を感染させ、細胞および培養液を別々に回収した。感染した全細胞を Phos-tag SDS-PAGE に使用し、その後抗 NP 抗体でイムノブロッティングを行った。リン酸化型はアップシフトしたバンドとして観察される。培養液中のウイルス粒子は遠心分離によって集められ、Phos-tag 磁気ビーズによるリン酸化ペプチド濃縮に使用された (図 3-2)。



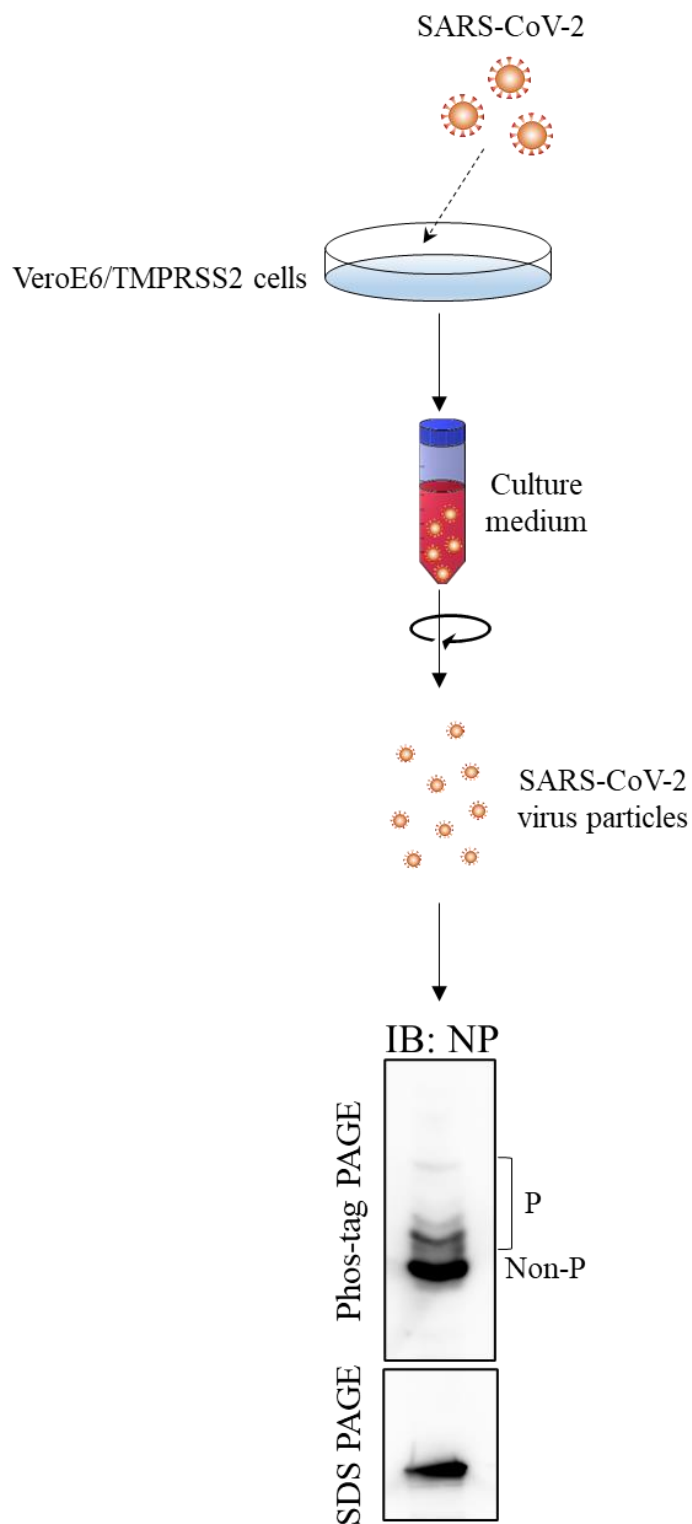
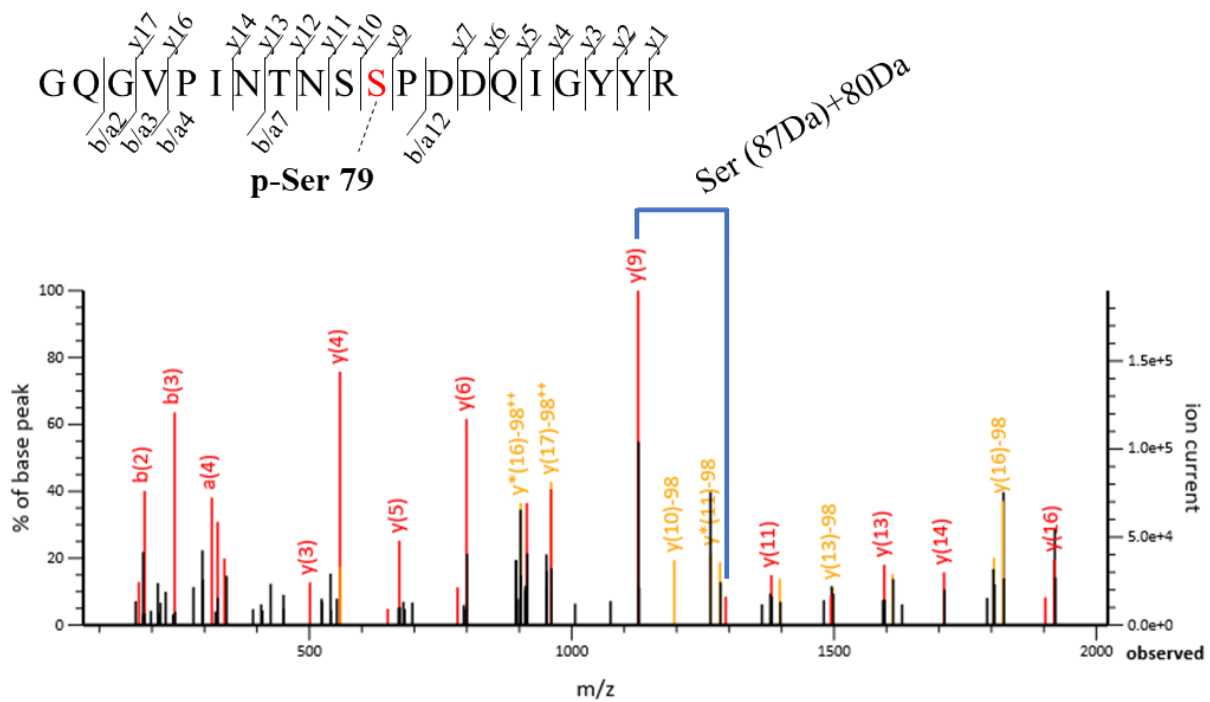
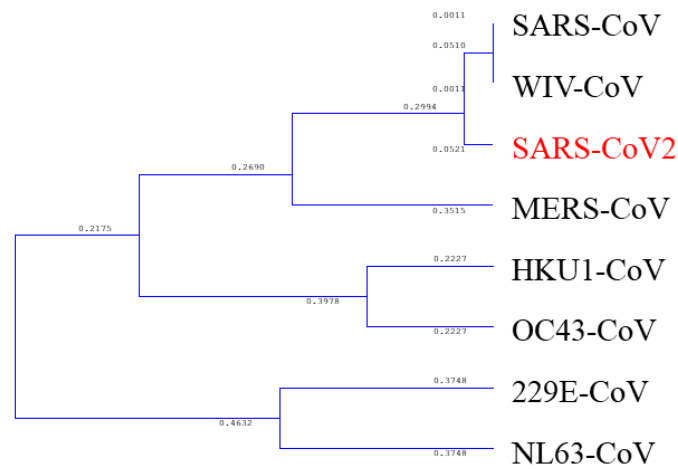


図 3-2.SARS-CoV-2 粒子における NP リン酸化の確認。培養上清から回収したウイルス粒子溶解液を Phos-tag SDS-PAGE により分離後、抗 NP 抗体で免疫ブロット解析を行った。リン酸化型はアップシフトしたバンドとして観察された。



#	a	a <sup>++</sup>	a <sup>*</sup>	a <sup>+++</sup>	b	b <sup>++</sup>	b <sup>*</sup>	b <sup>+++</sup>	Seq.	y	y <sup>++</sup>	y <sup>*</sup>	y <sup>+++</sup>	#
1	30.0338	15.5206			58.0287	29.5180			G					20
2	158.0924	79.5498	141.0659	71.0366	186.0873	93.5473	169.0608	85.0340	Q	2203.9656	1102.4864	2186.9390	1093.9731	19
3	215.1139	108.0606	198.0873	99.5473	243.1088	122.0580	226.0822	113.5448	G	2075.9070	1038.4571	2058.8804	1029.9439	18
4	314.1823	157.5948	297.1557	149.0815	342.1772	171.5922	325.1506	163.0790	V	2018.8855	1009.9464	2001.8590	1001.4331	17
5	411.2350	206.1212	394.2085	197.6079	439.2300	220.1186	422.2034	211.6053	P	1919.8171	960.4122	1902.7906	951.8989	16
6	524.3191	262.6632	507.2926	254.1499	552.3140	276.6607	535.2875	268.1474	I	1822.7643	911.8858	1805.7378	903.3725	15
7	638.3620	319.6847	621.3355	311.1714	666.3570	333.6821	649.3304	325.1688	N	1709.6803	855.3438	1692.6537	846.8305	14
8	739.4097	370.2085	722.3832	361.6952	767.4046	384.2060	750.3781	375.6927	T	1595.6374	798.3223	1578.6108	789.8090	13
9	853.4526	427.2300	836.4261	418.7167	881.4476	441.2274	864.4210	432.7141	N	1494.5897	747.7985	1477.5631	739.2852	12
10	940.4847	470.7460	923.4581	462.2327	968.4796	484.7434	951.4530	476.2302	S	1380.5468	690.7770	1363.5202	682.2637	11
11	1107.4830	554.2452	1090.4565	545.7319	1135.4779	568.2426	1118.4514	559.7293	S	1293.5147	647.2610	1276.4882	638.7477	10
12	1204.5358	602.7715	1187.5092	594.2583	1232.5307	616.7690	1215.5042	608.2557	P	1126.5164	563.7618	1109.4898	555.2485	9
13	1319.5627	660.2850	1302.5362	651.7717	1347.5577	674.2825	1330.5311	665.7692	D	1029.4636	515.2354	1012.4371	506.7222	8
14	1434.5897	717.7985	1417.5631	709.2852	1462.5846	731.7959	1445.5580	723.2827	D	914.4367	457.7220	897.4101	449.2087	7
15	1562.6483	781.8278	1545.6217	773.3145	1590.6432	795.8252	1573.6166	787.3119	Q	799.4097	400.2085	792.3832	391.6952	6
16	1675.7323	838.3698	1658.7058	829.8565	1703.7272	852.3673	1686.7007	843.8540	I	671.3511	336.1792	654.3246	327.6659	5
17	1732.7538	866.8805	1715.7272	858.3673	1760.7487	880.8780	1743.7222	872.3647	G	558.2671	279.6372	541.2405	271.1239	4
18	1895.8171	948.4122	1878.7906	939.8989	1923.8120	962.4097	1906.7855	953.8964	Y	501.2456	251.1264	484.2191	242.6132	3
19	2058.8804	1029.9439	2041.8539	1021.4306	2086.8754	1043.9413	2069.8488	1035.4280	Y	338.1823	169.5948	321.1557	161.0815	2
20									R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498	1

図 3-3.NP のリン酸化部位の同定。SARS-CoV-2 粒子を用いて、Phos-tag 磁気ビーズでリン酸化ペプチドを濃縮し、質量分析を行った結果、NP の Ser79 のリン酸化が確認された。



**Ser 79 (SARS-CoV-2)**

<b>SARS-CoV2:</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>P</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>
WIV1-CoV :	G	Q	G	V	P	I	N	T	N	S	G	P	D	D	Q	I	G	Y	Y	R
SARS-CoV :	G	Q	G	V	P	I	N	T	N	S	G	P	D	D	Q	I	G	Y	Y	R
MERS-CoV:	G	Q	G	V	P	L	N	A	N	S	T	P	A	Q	N	A	G	Y	W	R
HCoV-229E:	N	L	V	-	P	I	N	K	K	D	K	N	K	L	I	-	G	Y	W	N
HCoV-HKU1:	G	Q	G	V	P	I	A	F	G	V	P	P	S	E	A	K	G	Y	W	Y
HCoV-NL63:	N	L	V	-	P	I	G	K	G	N	K	D	E	Q	I	-	G	Y	W	N
HCoV-OC43:	G	Q	G	V	P	I	A	P	G	V	P	A	T	E	A	K	G	Y	W	Y

図 3-4.NP の系統樹解析結果。

	<b>Ser 79</b>									
<b>WT:</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I
<b>α(Alpha):</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I
<b>β(Beta):</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I
<b>γ(Gamma):</b>	N	T	N	S	S	R	D	D	Q	I
<b>δ(Delta):</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I
<b>O(Omicron):</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I
<b>λ(Lambda):</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I
<b>μ(Mu):</b>	N	T	N	S	S	P	D	D	Q	I

図 3-5. SARS-CoV-2 およびその変異株の NP の Ser79 周辺アミノ酸配列のマルチプルアライメント解析。全ての配列で保存されている残基はグレーでハイライトした。

	Ser 105 (SARS-CoV-2)									
<b>SARS-CoV2:</b>	M	K	D	L	S	P	R	W	Y	F
WIV1-CoV :	M	K	E	L	S	P	R	W	Y	F
SARS-CoV :	M	K	E	L	S	P	R	W	Y	F
MERS-CoV:	K	Q	-	L	A	P	R	W	Y	F
HCoV-229E:	R	V	D	L	S	P	K	L	H	F
HCoV-HKU1:	Q	K	Q	L	L	P	R	W	Y	F
HCoV-NL63:	R	V	D	L	P	P	K	V	H	F
HCoV-OC43:	Q	R	Q	L	L	P	R	W	Y	F

	Thr 141 (SARS-CoV-2)									
<b>SARS-CoV2:</b>	G	A	L	N	T	P	K	D	H	I
WIV1-CoV :	G	A	L	N	T	P	K	D	H	I
SARS-CoV :	G	A	L	N	T	P	K	D	H	I
MERS-CoV:	G	A	T	D	A	P	S	T	F	-
HCoV-229E:	G	A	K	T	E	P	T	G	Y	G
HCoV-HKU1:	Q	A	D	T	S	T	P	S	D	V
HCoV-NL63:	G	A	K	T	V	N	T	S	L	G
HCoV-OC43:	Q	A	D	V	N	T	P	A	D	I

	Thr 198 (SARS-CoV-2)									
<b>SARS-CoV2:</b>	S	R	N	S	T	P	G	S	S	R
WIV1-CoV :	S	R	N	S	T	P	G	S	S	R
SARS-CoV :	S	R	N	S	T	P	G	S	S	R
MERS-CoV:	S	R	S	S	S	Q	G	S	R	S
HCoV-229E:	S	Q	S	R	G	-	-	R	G	E
HCoV-HKU1:	G	P	N	N	R	S	L	S	R	S
HCoV-NL63:	N	N	S	R	D	S	S	R	S	T
HCoV-OC43:	A	S	S	A	G	S	R	S	R	A

	Ser 206 (SARS-CoV-2)									
<b>SARS-CoV2:</b>	S	R	G	T	S	P	A	R	M	A
WIV1-CoV :	S	R	G	N	S	P	A	R	M	A
SARS-CoV :	S	R	G	N	S	P	A	R	M	A
MERS-CoV:	R	S	G	N	S	T	-	R	G	T
HCoV-229E:	G	E	S	K	P	Q	S	R	N	P
HCoV-HKU1:	R	S	N	S	N	F	R	H	S	D
HCoV-NL63:	S	T	S	R	Q	Q	S	R	T	R
HCoV-OC43:	R	A	N	S	G	N	R	T	P	T

	Thr 325 (SARS-CoV-2)									
<b>SARS-CoV2:</b>	G	M	E	V	T	P	S	-	-	-
WIV1-CoV :	G	M	E	V	T	P	S	-	-	-
SARS-CoV :	G	M	E	V	T	P	S	-	-	-
MERS-CoV:	K	L	T	H	Q	N	N	D	D	H
HCoV-229E:	S	A	G	V	V	A	N	G	V	K
HCoV-HKU1:	D	S	E	A	D	S	-	-	-	P
HCoV-NL63:	D	S	D	L	V	Q	N	G	V	D
HCoV-OC43:	Q	N	L	S	G	N	P	D	E	P

図 3-6. NP アミノ酸配列内の Ser79 以外の Pin1 標的モチーフ (pSer/pThr-Pro) 周辺アミノ酸配列のマルチプルアライメント解析。

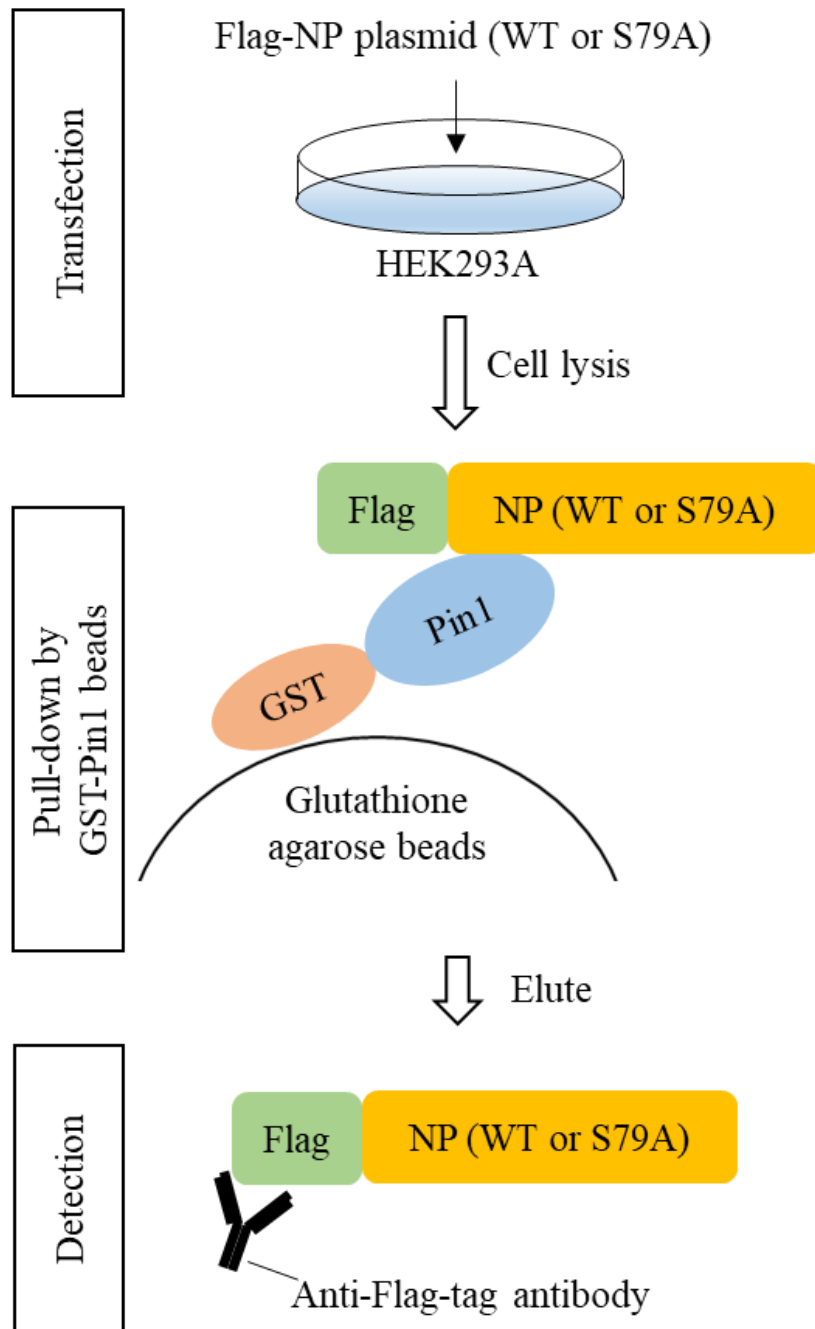


図 3-7.リン酸化 NP と宿主 Pin1 との相互作用確認法。Flag タグ付き野生型 NP (WT) または非リン酸化変異型 NP (S79A) を発現する 293A 細胞溶解液を、GST または GST-Pin1 結合ビーズを含むプルダウンアッセイに供した。抗 Flag タグ抗体を用いたイムノブロット解析により NP を検出した。

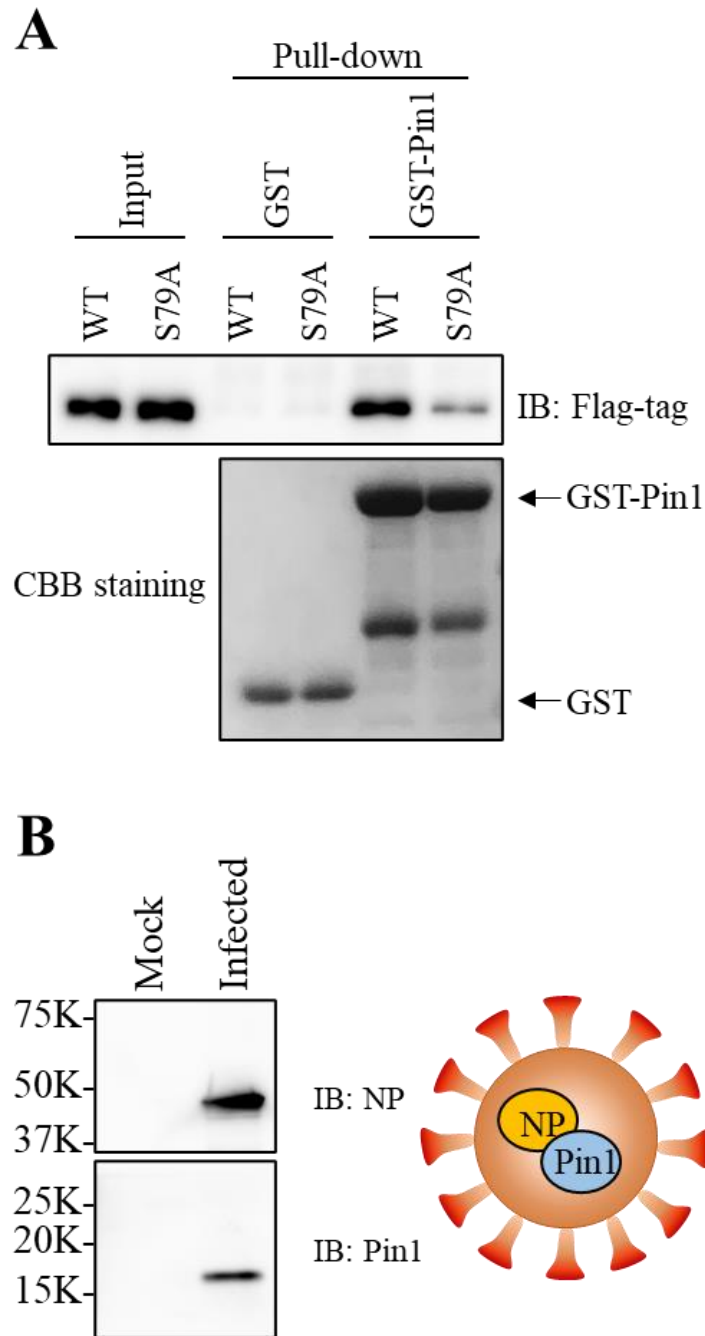


図 3-8. リン酸化 NP と宿主 Pin1 との相互作用。(A) Pin1 に結合した NP を抗 Flag タグ抗体でイムノブロット解析することにより検出した。NP は Pin1 に結合し、NP の Ser79 を Ala に置換することにより結合量が減少することが観察された。ビーズに結合した GST と GST-Pin1 の量は、SDS-PAGE と CBB 染色で確認した。(B) SARS-CoV-2 粒子中の宿主細胞由来の Pin1 のイムノブロット解析による検出。ウイルス粒子内に Pin1 が存在することを確認した。

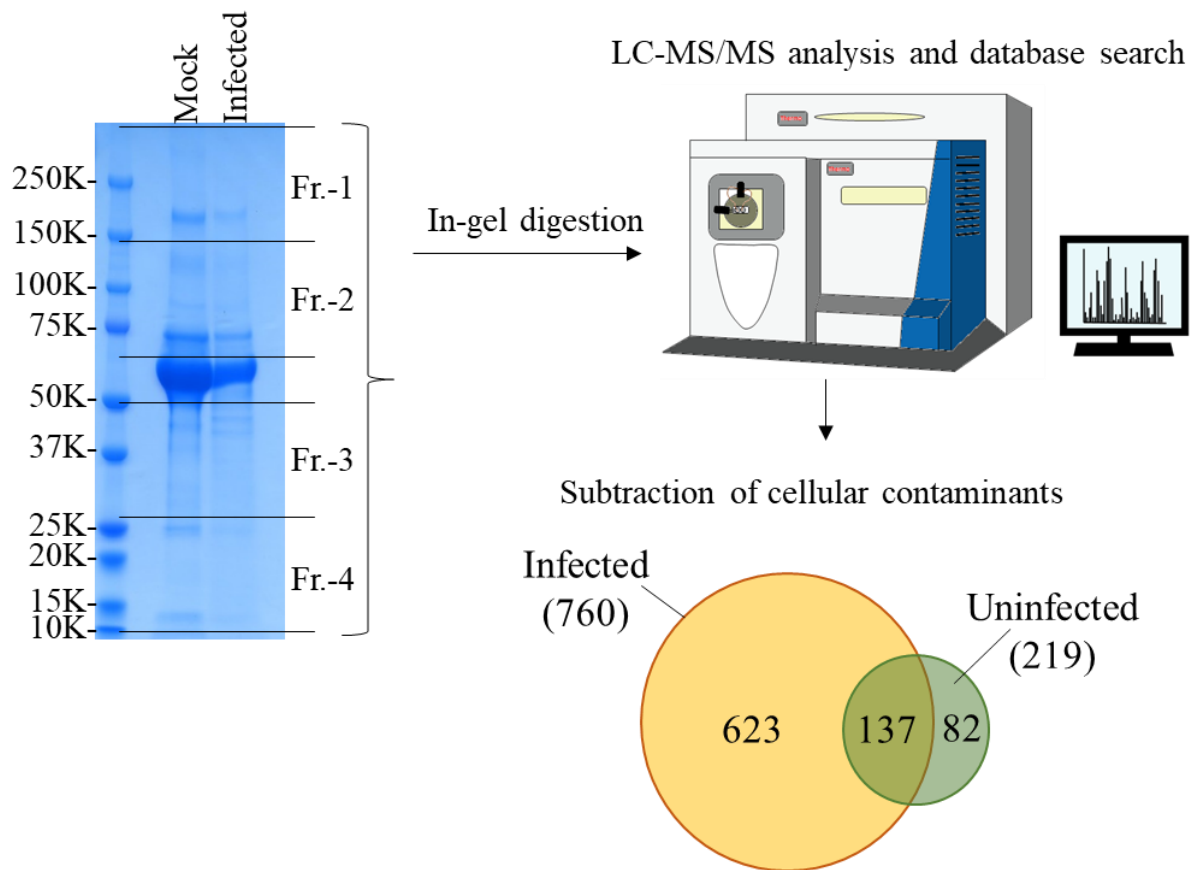


図 3-9.SARS-CoV-2 粒子に含まれる宿主細胞由来のタンパク質の同定。非感染細胞で同定されたタンパク質は、細胞由来のタンパク質とみなし、ウイルス粒子内で同定されたタンパク質から差し引いた。



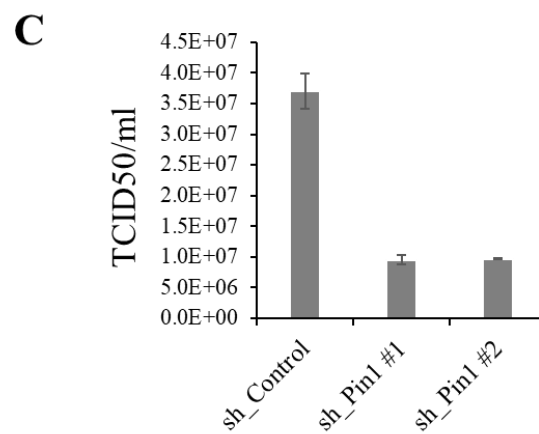
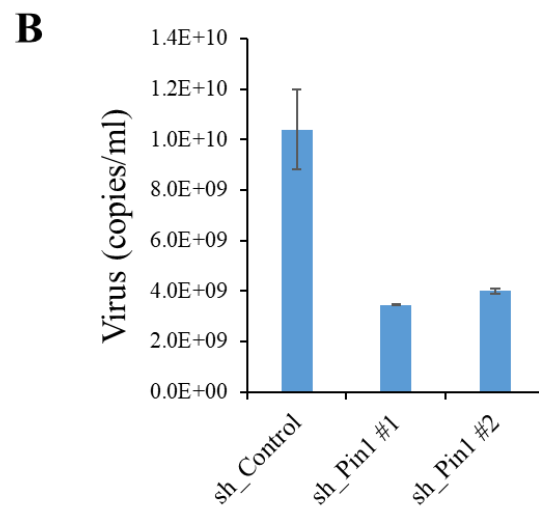
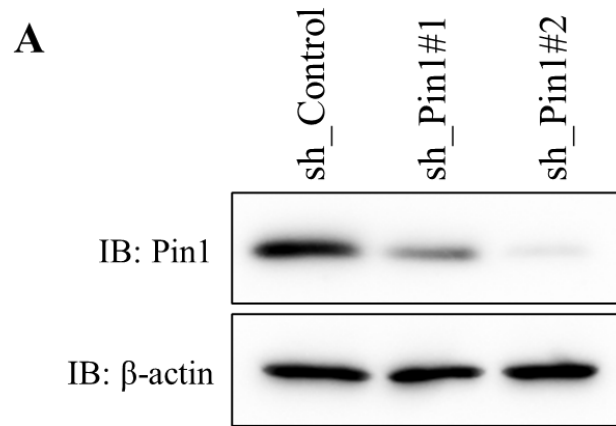


図 3-10. ウイルス複製における Pin1 の機能。(A) コントロールおよび Pin1 ノックダウン VeroE6/TMPRSS2 細胞における Pin1 の発現を免疫ブロット解析により確認した。(B) 各細胞におけるウイルス RNA 量を、特異的プライマーを用いた qRT-PCR により検出した。(C) 各細胞のウイルス力価を TCID50 として測定した。

## 引用文献

33. Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*. 2020,182(3),685-712 e19.
50. Steen H, Jebanathirajah JA, Rush J, et al. Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and quantitative measurements. *Mol Cell Proteomics*. 2006,5(1),172-81.
61. Tsunehiro M, Meki Y, Matsuoka K, et al. A Phos-tag-based magnetic-bead method for rapid and selective separation of phosphorylated biomolecules. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013,925,86-94.
63. Ino Y, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, et al. Evaluation of four phosphopeptide enrichment strategies for mass spectrometry-based proteomic analysis. *Proteomics*. 2022,22(7),e2100216.
85. Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*. 2005,79(5),3187-94.
86. Goonawardane N, Gebhardt A, Bartlett C, et al. Phosphorylation of Serine 225 in Hepatitis C Virus NS5A Regulates Protein-Protein Interactions. *J Virol*. 2017,91(17).
87. Teppor M, Zusinaite E, Merits A. Phosphorylation Sites in the Hypervariable Domain in Chikungunya Virus nsP3 Are Crucial for Viral Replication. *J Virol*. 2021,95(9).
88. Keck F, Ataey P, Amaya M, et al. Phosphorylation of Single Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies. *Viruses-Basel*. 2015,7(10),5257-73.
89. Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci*. 2000,25(12),596-601.
90. Schümann M, Döbelstein M. Adenovirus-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylation during the late phase of infection enhances viral protein levels and virus progeny. *Cancer Res*.

- 2006,66(3),1282-8.
91. Coccia M. Meta-analysis to explain unknown causes of the origins of SARS-CoV-2. *Environ Res.* 2022,211,113062.
  92. Thakur N, Das S, Kumar S, et al. Tracing the origin of Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): A systematic review and narrative synthesis. *J Med Virol.* 2022,94(12),5766-79.
  93. Keck F, Ataey P, Amaya M, et al. Phosphorylation of Single Stranded RNA Virus Proteins and Potential for Novel Therapeutic Strategies. *Viruses.* 2015,7(10),5257-73.
  94. McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses.* 2014,6(8),2991-3018.
  95. Liu W, Liu L, Kou G, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2020,58(6).
  96. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2015,1282,1-23.
  97. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020,117(13),7001-3.
  98. Yamaoka Y, Jeremiah SS, Funabashi R, et al. Characterization and Utilization of Disulfide-Bonded SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain of Spike Protein Synthesized by Wheat Germ Cell-Free Production System. *Viruses.* 2022,14(7).
  99. Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, et al. PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation. *Nat Commun.* 2019,10(1),1844.
  100. Capone S, Raggioli A, Gentile M, et al. Immunogenicity of a new gorilla adenovirus vaccine candidate for COVID-19. *Mol Ther.* 2021,29(8),2412-23.
  101. Yamaoka Y, Miyakawa K, Jeremiah SS, et al. Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection tests. *Cell Rep Med.* 2021,2(6),100311.
  102. Ino Y, Arakawa N, Ishiguro H, et al. Phosphoproteome analysis

- demonstrates the potential role of THRAP3 phosphorylation in androgen-independent prostate cancer cell growth. *Proteomics*. 2016,16(7),1069-78.
103. Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, et al. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*. 2006,34(Database issue),D535-9.
104. Nishi M, Akutsu H, Masui S, et al. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 2011,286(13),11593-603.
105. Shirato K, Nao N, Katano H, et al. Development of Genetic Diagnostic Methods for Detection for Novel Coronavirus 2019(nCoV-2019) in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2020,73(4),304-7.
106. Tsukagoshi H, Shinoda D, Saito M, et al. Relationships between Viral Load and the Clinical Course of COVID-19. *Viruses*. 2021,13(2).
107. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021,184(9),2372-83 e9.
108. Khazeei Tabari MA, Khoshhal H, Tafazoli A, et al. Applying computer simulations in battling with COVID-19, using pre-analyzed molecular and chemical data to face the pandemic. *Inform Med Unlocked*. 2020,21,100458.
109. Shaw ML, Stone KL, Colangelo CM, et al. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog*. 2008,4(6),e1000085.
110. Zhang H, Sha H, Qin L, et al. Research Progress in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Host Protein Interactions. *Animals (Basel)*. 2022,12(11).
111. Fung TS, Liu DX. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function. *Future Virol*. 2018,13(6),405-30.
112. Jakubiec A, Jupin I. Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation. *Virus Res*. 2007,129(2),73-9.
113. Ino Y, Nishi M, Yamaoka Y, et al. Phosphopeptide enrichment using Phos-tag technology reveals functional phosphorylation of the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2. *J Proteomics*. 2022,255,104501.

114. Nishi M, Miyakawa K, Matsunaga S, et al. Prolyl Isomerase Pin1 Regulates the Stability of Hepatitis B Virus Core Protein. *Front Cell Dev Biol.* 2020,8,26.
115. Qiu X, Zhan Y, Meng C, et al. Identification and functional analysis of phosphorylation in Newcastle disease virus phosphoprotein. *Arch Virol.* 2016,161(8),2103-16.
116. Heger-Stevic J, Zimmermann P, Lecoq L, et al. Hepatitis B virus core protein phosphorylation: Identification of the SRPK1 target sites and impact of their occupancy on RNA binding and capsid structure. *PLoS Pathog.* 2018,14(12),e1007488.
117. Cui L, Zheng W, Li M, et al. Phosphorylation Status of Tyrosine 78 Residue Regulates the Nuclear Export and Ubiquitination of Influenza A Virus Nucleoprotein. *Front Microbiol.* 2019,10,1816.
118. Bretana NA, Lu CT, Chiang CY, et al. Identifying protein phosphorylation sites with kinase substrate specificity on human viruses. *PLoS One.* 2012,7(7),e40694.
119. Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat Commun.* 2021,12(1),1936.
120. Klann K, Bojkova D, Tascher G, et al. Growth Factor Receptor Signaling Inhibition Prevents SARS-CoV-2 Replication. *Mol Cell.* 2020,80(1),164-74 e4.
121. Hilgenfeld R. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design. *FEBS J.* 2014,281(18),4085-96.
122. Odenwald WF, Arnheiter H, Dubois-Dalcq M, et al. Stereo images of vesicular stomatitis virus assembly. *J Virol.* 1986,57(3),922-32.
123. Pietrowska M, Wlosowicz A, Gawin M, et al. MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol.* 2019,1073,57-76.
124. Davidson AD, Williamson MK, Lewis S, et al. Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the

- spike glycoprotein. *Genome Med.* 2020,12(1),68.
125. Xi J, Luckenbaugh L, Hu J. Multiple roles of PP2A binding motif in hepatitis B virus core linker and PP2A in regulating core phosphorylation state and viral replication. *PLoS Pathog.* 2021,17(1),e1009230.
126. Zhao Q, Hu Z, Cheng J, et al. Hepatitis B Virus Core Protein Dephosphorylation Occurs during Pregenomic RNA Encapsidation. *J Virol.* 2018,92(13).
127. Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007,8(11),904-16.
128. Ryo A, Liou YC, Lu KP, et al. Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *J Cell Sci.* 2003,116(Pt 5),773-83.
129. Kojima Y, Ryo A. Pinning down viral proteins: a new prototype for virus-host cell interaction. *Front Microbiol.* 2010,1,107.
130. Misumi S, Inoue M, Dochi T, et al. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem.* 2010,285(33),25185-95.
131. Manganaro L, Lusic M, Gutierrez MI, et al. Concerted action of cellular JNK and Pin1 restricts HIV-1 genome integration to activated CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* 2010,16(3),329-33.
132. Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kanna M, et al. Prolyl isomerase Pin1 plays an essential role in SARS-CoV-2 proliferation, indicating its possibility as a novel therapeutic target. *Sci Rep.* 2021,11(1),18581.
133. Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, et al. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem.* 1993,268(32),24210-4.
134. Sousa-Squiavinato ACM, Rocha MR, Barcellos-de-Souza P, et al. Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019,1866(3),418-29.

135. Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol.* 2011,9(6),427-39.
136. Leitner A, Sturm M, Lindner W. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. *Anal Chim Acta.* 2011,703(1),19-30.

## 第4章. 総括

細胞内シグナル伝達などの重要な生命現象に関わるタンパク質のリン酸化修飾は、常に幅広い研究者の興味の対象である。リン酸化タンパク質/ペプチド濃縮技術と高性能質量分析装置の発展に伴い、リン酸化タンパク質解析（リン酸化プロテオミクス解析）は広く活用されることになった。しかし、非リン酸化タンパク質に比べてリン酸化タンパク質の割合は低く、質量分析前のリン酸化ペプチド濃縮操作は必要不可欠である。そのため、試料に適したリン酸化ペプチド濃縮方法を選択することは、解析の効率と精度を向上させると考えられる。そこで、本研究においては、4種類のリン酸化ペプチド濃縮ビーズを比較し、ゲル内消化物や血清、細胞抽出物など様々な試料における最適な濃縮方法を調べた。結果として、Phos-tag 磁気ビーズを用いた手法は、血清消化物などの非リン酸化ペプチドを多く含む試料中からのリン酸化ペプチド濃縮に適していることが明らかとなった。この結果を踏まえ、血清同様に非リン酸化ペプチドを多く含む細胞培養上清からの SARS-CoV-2 のリン酸化ペプチド濃縮に Phos-tag 磁気ビーズを活用した。その結果、質量分析により SARS-CoV-2 の NP の Ser79 のリン酸化が同定された。これまでの SARS-CoV-2 タンパク質のリン酸化解析では、感染細胞抽出液が用いられていたが、本研究では成熟し、細胞外に放出されたウイルス粒子内のタンパク質のリン酸化を標的として解析した。それによりみいだされたこの Ser79 は SARS-CoV-2 に特異的に存在し、他のコロナウイルスにはないリン酸化サイトであることも明らかになった。さらに、プルダウンアッセイの結果、Ser79 のリン酸化が NP と Pin1 の結合に重要であり、その相互作用がウイルス粒子の安定性や感染性に寄与している可能性が示唆された。Pin1 は、標的タンパク質の触媒活性、局在性、安定性を変化させることが知られているタンパク質である。本研究の結果は、Pin1 がウイルスと宿主細胞間の分子クロストークに重要な役割を果たし、抗ウイルス治療の標的となる可能性を示唆している。

リン酸化ペプチド濃縮技術は日々改良が加えられている。さらに、リン酸化部位同定のために使用した質量分析装置についても、より高感度・高性能な製品がリリースされている。それらを活用することにより、将来的に、ウイルスタンパク質の未知のリン酸化部位の同定と、宿主タンパク質との関係が明らかにされるのではないかと期待される。



## 用語集

質量分析：イオン化された試料を電氣的または磁氣的な作用などにより、 $m/z$ （質量電荷比）にしたがって分離検出を行う機器分析法。測定に用いる装置を質量分析装置という。MS と略される。得られた質量スペクトルから試料の定性情報が得られ、イオン量から試料の定量を行うことが可能である。感度が極めて高く、サブナノグラムレベルの試料量での測定が可能であり、特定イオンについては、サブフェムトグラムレベルで検出が可能である。今日、プロテオミクスをはじめとするライフサイエンス分野に大きく貢献している。

プロテオミクス：プロテオーム研究、あるいはプロテオーム科学のこと。ゲノム研究、あるいはゲノム科学を、「gene」の「gen」と、生体物質の発現や機能に関する包括的な研究やその学問領域（科学）を示す接尾後「-omics」を組み合わせてゲノミクス（genomics）と呼ぶように、「protein」の「prote」と「-omics」を組み合わせてプロテオミクス（proteomics）と呼ぶようになった。

ショットガン法：プロテオームの大規模な解析法の1つ。生体試料に含まれる全てのタンパク質成分をペプチドレベルまでプロテアーゼを用いて消化し、得られた消化ペプチドの混合物を対象としてタンデム質量分析による配列解析や定量解析を行った後、個々のペプチド情報をタンパク質レベルに再構築することでプロテオームの全体像を理解するボトムアップ型の試み。ペプチド混合物の分析は、一次元もしくは多次元クロマトグラフィーでペプチドを分離した後、オンライン接続された質量分析計により自動的に行われる。あらかじめ構築したタンパク質配列情報データベースに基づいてペプチドの配列を決定することから、ゲノム情報が明らかな生物のプロテオーム解析に適している。

固定化金属酸化物アフィニティクロマトグラフィー（IMAC ; Immobilized metal affinity chromatography）：キレート性官能基を介して金属イオンを固定化した樹脂を用いて行うアフィニティクロマトグラフィー。IMAC と略される。金属イオンに親和性を有する生体分子の精製などに広く用いられている。なかでもニッケルイオン（II）を固定化した IMAC を用いた、His タグ誘導体化タンパク質精製キットなどが有名。プロテオミクス分野では、リン酸基とアフィニティを有する鉄やガリウムなどの金属イオンを配位させたものが、リン酸化タンパク質やリン酸化ペプチド濃縮用の IMAC として広く利用されている。IMAC による濃縮は、リン酸化されるアミノ

酸残基に依存しないため、適用範囲は広い。その反面、カルボキシ基に対しても親和性を示すため、酸性アミノ酸を有する非リン酸化ペプチドの非特異的な吸着が問題となる。C 末端やアミノ酸側鎖のカルボキシル基をメチルエステル化することで非リン酸化ペプチドの結合を排除し、リン酸化ペプチドの濃縮効率を向上させる方法も報告されている。

ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー (HAMMOC ; Hydroxy acid-modified metal oxide chromatography) : チタニアやジルコニアなどの金属酸化物を担体として用いるクロマトグラフィーにおいて、固定相に動的にヒドロキシ酸修飾するもの。酸化金属アフィニティクロマトグラフィー (MOAC) の一種。α-もしくは、β-ヒドロキシ酸 (ヒドロキシカルボン酸) はチタニアやジルコニアとキレートを形成することが知られており、移動相にヒドロキシ酸を含む溶液を用いることで動的に固定相をヒドロキシ酸修飾することができる。これにより、ヒドロキシ酸よりも担体に親和性の高い溶質は保持されるが、ヒドロキシ酸よりも親和性の低い溶質は排除される。主としてリン酸化ペプチドの濃縮に用いられる。修飾剤としては、当初、芳香族性ヒドロキシ酸である 2,5-DHB、サリチル酸および芳香族カルボン酸であるフタル酸などが用いられたが、リン酸化ペプチド分画に混入してくる残留修飾剤がその後の質量分析に悪影響を及ぼすため、現在ではそれほど使われていない。代わって、リン酸化ペプチドの濃縮効率が高く、脱塩操作で簡単に除去可能な修飾剤として親水性ヒドロキシ酸である乳酸、グリコール酸およびβ-ヒドロキシプロピオン酸が広く用いられている。

Phos-tag : 二価のリン酸化イオンを迅速かつ選択的に捕捉する二核金属錯体のこと。Phos-tag は、全長約 1 nm のナノ分子で、分子内の 2 つの金属イオンがリン酸化イオンを捕捉する。Phos-tag が亜鉛錯体のとき、中性 pH 環境下でリン酸化イオンに対して最も高い選択的結合能を示す。Phos-tag をアガロースビーズに固相化したり、ビオチン、アクリルアミドなど他の機能性分子と組み合わせることで、リン酸化タンパク質やペプチドの様々な解析を可能にしている。リン酸化タンパク質やペプチドの分離・濃縮・精製に用いられる Phos-tag アガロース、電気泳動によりタンパク質のリン酸化状態を分析する Phos-tag アクリルアミドなどがある。

SARS-CoV-2 ヌクレオカプシドタンパク質 (NP) : SARS-CoV-2 の構造タンパク質の 1 つであり、ウイルス中に最も多く存在する。ゲノム RNA と複合体を形成することにより、ヌクレオカプシドを形成する。その他にも、

転写や複製など、ウイルスのライフサイクルの様々な過程に関与することが報告されている。

**チップカラム：**ピペットマンに装着するチップに C18 フィルターやアフィニティビーズなど、タンパク質およびペプチドを捕捉する担体などを封入したカラム。送液のための HPLC などの装置は必要なく、アダプターを使ってチューブにセットすることで、チップ上部から液を添加し、遠心操作で送液を行う。装置が必要ないため、少量のタンパク質およびペプチド溶液を精製することが可能な簡易的なカラムである。

**ゲル内消化：**質量分析を行う際のタンパク質前処理法の 1 つ。タンパク質をゲル内でトリプシンなどによって消化すること。SDS-PAGE や等電点電気泳動などによってタンパク質を分離後、ゲルの染色を行うことで目的タンパク質を選択する。目的タンパク質部分を切り抜き、ゲル内で脱色、還元アルキル化、酵素消化を行った後、得られたペプチドを質量分析装置を用いて分析すればタンパク質を同定することができる。

**還元アルキル化：**二次元電気泳動や質量分析に先立ち、タンパク質中のジスルフィド結合を還元し、生成したチオール基 (-SH) をアルキル化して保護すること。還元剤には DTT やトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩が、アルキル化剤にはヨードアセトアミドやヨード酢酸が主に用いられる。アルキル化後のシステインはヨードアセトアミドを使用した場合はメチル化 (+57 Da)、ヨード酢酸を用いた場合はカルボキシメチル化 (+58 Da) される。

**UltiMate 3000 LC system：**Thermo Scientific から販売されている低流量液体クロマトグラフィーシステム。通常、C18 キャピラリーカラムを接続し、質量分析装置に連結して、分析前のペプチドの脱塩と分離を行う。

**Q Exactive mass spectrometer および Orbitrap Elite mass spectrometer：**Thermo Scientific から販売されているオービトラップを搭載したハイブリッド型質量分析装置。

**Proteome Discoverer ソフトウェア：**質量分析データを解析する Thermo Scientific 社のソフトウェア。ピークリスト変換、タンパク質の同定、定量解析まで一連の解析が可能である。本論文においては質量分析データのピークリスト変換に使用した。

**UniProt Knowledgebase：**タンパク質のアミノ酸配列データベース。質量分析により得られたデータからタンパク質の同定を行う際に使用した。

**MASCOT サーチェンジン：**質量分析装置により得られたペプチドの質量デ

ータに一致するアミノ酸配列、Uniprotなどのアミノ酸配列データベースと照合してタンパク質を同定するツール。独自のアルゴリズムによるスコアリングにより、統計的に有意なタンパク質およびペプチドを区別することができる。

**ptmRS ツール** : Proteome Discoverer ソフトウェアの機能の一つ。同定された修飾位置の確からしさを評価する。

**偽陽性率 (FDR ; false discovery rate)** : 誤って同定された割合。プロテオームにおいては、デコイデータベースに対する検索による偽陽性率のことを指す。

**jPOST partner repository** : 京都大学が中心となり進めている日本のプロテオーム統合データベース。プロテオーム研究者が活用可能な質量分析データのレポジトリシステムであり、ProteomeXchange Consortium に加盟している。

**ProteomeXchange Consortium** : PRIDE や PeptideAtlas などの主なプロテオミクスデータのレポジトリへのデータ登録とデータ配布の標準化のためのコンソーシアムである。複数のレポジトリが加盟しており、登録されたデータは、ProteomeCentral を通じて閲覧することが可能。

**ExPASy Compute pI/Mw ツール** : インプットしたアミノ酸配列から理論的な分子量と等電点を計算するウェブツール。

**motif-x algorithm** : インプットしたアミノ酸配列のデータセットから、頻出パターンを解析するツール。同定されたリン酸化部位近傍の配列モチーフ検索に使用した。

**Progenesis QI for proteomics ソフトウェア** : Nonlinear Dynamics 社から販売されている非標識定量解析ソフトウェア。質量分析装置により得られたイオン強度のデータをもとに、ペプチドの量を相対的に比較解析する。非標識定量解析は、あらかじめタグ標識などを行う必要なく定量解析を可能にするソフトウェアである。

**ウイルス力価** : 検体中 (ウイルスが含まれる液体など) のウイルスが細胞に感染できるような最低濃度または最高の希釈倍率。

**プラークアッセイ** : ウイルス力価測定方法の一つ。ウイルスに感染した細胞は溶解し、隣接する細胞に感染を広げ、感染から溶解までのサイクルが繰り返される。感染した細胞領域は、光学顕微鏡または視覚的に見ることができるプラーク (感染していない細胞に囲まれた感染領域) を形成する。この現象を利用してウイルスの感染力を測定する。

**VeroE6/TMPRSS2 細胞**：アフリカミドリ猿の腎臓上皮細胞由来の培養細胞である VeroE6 細胞にセリンプロテアーゼの一つである TMPRSS2 を過剰発現させた細胞株。ウイルスの分離・増殖実験に適している。

**感染多重度 (MOI : Multiplicity of Infection)**：感染させる細胞に対するウイルスの比率のこと。例えばウイルス粒子を接種した細胞の場合、MOI は一定の空間に存在する標的細胞の数に対するウイルス粒子の数の比率を指す。MOI が増加すると、少なくとも 1 つのウイルス粒子に感染した細胞の割合も増加する。

**GENETYX ソフトウェア**：遺伝情報処理ソフトウェア。核酸・アミノ酸配列の入力や編集、解析を行うことができる。

**BioGRID ウェブサイトツール**：相互作用データセットのレポジトリ。文献に報告されているタンパク質および遺伝子の相互作用データがオープンアクセス化されている。

**shRNA レンチウイルス**：小ヘアピン RNA 干渉を用いた安定的な遺伝子のノックダウン（サイレンシング）細胞を作製するために使用されるウイルスベクターの一種。目的の宿主細胞に感染させることで特定の遺伝子を恒常的にノックダウンした細胞株を樹立できる。

**定量 RT-PCR (qRT-PCR)**：定量的逆転写 PCR のこと。RNA から逆転写酵素により合成された cDNA を用いたリアルタイム PCR。

**50% tissue culture infectious dose (TCID50)**：ウイルス力価測定方法の一つ。宿主細胞の 50% が感染したときのウイルスの濃度のこと。

**GraphPad Prism ソフトウェア**：統計解析ソフトウェア。

**Peptide spectrum matches (PSM)**：ペプチド配列から作成された理論値とのマッチングを検索エンジンが評価した結果、そのスコアが同定基準を超えたスペクトル。

※プロテオミクス分野の用語に関しては、著者も執筆者の一人になっている株式会社講談社発行の「プロテオミクス辞典」（2013 年）より一部抜粋した。その他の用語に関しては、Wikipedia および厚生労働省ホームページなどを参照した。

## 謝 辞

本研究を遂行し、学位論文としてまとめるにあたり、多大なるご指導とご助言を賜りました群馬パース大学大学院 保健科学研究科 博士後期課程 医療科学領域教室の長田 誠教授に深く感謝いたします。

本学位論文の作成ならびに審査にあたり、群馬パース大学大学院 保健科学研究科 博士後期課程 医療科学領域・木村博一教授、高橋克典准教授ならびに木村鮎子講師に深謝いたします。

また、研究全般にわたり、多大なご指導・ご支援をいただいた横浜市立大学大学院医学研究科微生物学教室の梁明秀教授、横浜市立大学先端医科学研究センタープロテオーム解析センターの木村弥生准教授に深く感謝いたします。また、横浜市立大学大学院医学研究科微生物学教室および先端医科学研究センタープロテオーム解析センターのメンバーの皆様には日頃よりご支援いただきましたことに心より御礼申し上げます。

さらに、学位取得ならびに私の研究人生を終始支えていただいた横浜市立大学名誉教授・平野久先生に厚く御礼申し上げます。

最後に、私が自分の思う道に進むことに対し、常に暖かく見守り、支えてもらった家族に感謝します。

## 主論文

Yoko Ino, Mayuko Nishi, Yutaro Yamaoka, Kei Miyakawa, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Makoto Osada, Yayoi Kimura, Akihide Ryo.

Phosphopeptide enrichment using Phos-tag technology reveals functional phosphorylation of the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2.

Journal of Proteomics, Volume 255, 20 March 2022, 104501.

## 副論文

Yoko Ino, Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Tomoko Akiyama, Yusuke Nakai, Kohei Nishino, Makoto Osada, Akihide Ryo, Hisashi Hirano, Tohru Koike, Yayoi Kimura.

Evaluation of four phosphopeptide enrichment strategies for mass spectrometry-based proteomic analysis.

Proteomics, Volume22, Issue7, Apr 2022, e2100216.

## 副論文

Yoko Ino, Noriaki Arakawa, Hitoshi Ishiguro, Hiroji Uemura, Yoshinobu Kubota, Hisashi Hirano, Tosifusa Toda.

Phosphoproteome analysis demonstrates the potential role of THRAP3 phosphorylation in androgen-independent prostate cancer cell growth.

Proteomics, Volume 16, Issue 7, Apr 2016, 1069–1078.

