

# ヒト顎下腺由来腺癌細胞株のプロテオミクス

加茂政晴・客本斉子・佐藤詔子

口腔組織培養学会誌 15(2): 11-28, 2006

## **Proteins profiling of human salivary intercalated duct cell line by proteomics**

Masaharu Kamo and Nobuko Sato

Department of Biochemistry School of Dentistry, Iwate Medical University

Chief: Prof. Nobuko Sato

### Summary

Proteome of the human oral cultured cells is important to characterize the cells as well as transcriptome. We investigated proteomics of the human salivary intercalated duct (HSG) cells. Proteins extracted from HSG cells were separated on two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), and over one thousand protein spots in 2-DE were visualized by silver staining. The proteins of 575 spots from the gel were digested by trypsin in gel, and the resultant peptides were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Two hundred and thirty seven proteins were identified with the search of peptide mass database. These proteins belong to 13 functional groups with a category of protein destination-associated proteins, which contains molecular chaperone and proteasome in the first place. The large accumulation of proteins involved in the categories of cell structure, metabolism and energy production indicates that HSG cells have a high ability in survival and proliferation. Post-transcriptional modifications such as the blockage of N-terminal amino acid and phosphorylations were further analyzed. A HSG proteome database that consists of the 2-DE map images and the respective spots data was constructed on the home page of web.

This review aims to summarize the proteomics approach and the analytical methods of post-transcriptional modifications for human oral cultured cells

*Jpn. J. Tissue. Cult. Dent. Res.*, 15(2):11-28, 2006

Key words: proteomics (プロテオミクス),  
human salivary intercalated duct cell (ヒト顎下腺由来腺癌細胞株),  
mass spectrometry (質量分析),  
two-dimensional electrophoresis (二次元電気泳動),  
post-transcriptional modification (翻訳後修飾)

## 緒言

細胞に含まれる全タンパク質を分離しそれらタンパク質を同定するというプロテオーム解析の研究が行われている。これは全遺伝子 DNA の配列を解析するというゲノム研究の相補的研究で、プロテオミクスと呼んでいる<sup>1)</sup>。ある遺伝子がタンパク質として実際に発現されているのか、あるいはどのような翻訳後修飾を受けているのかは重要な問題である。分化やストレス等の環境変化により引き起こされる細胞のタンパク質の変動も研究されている<sup>2,3)</sup>。またがんの診断に有用な腫瘍マーカーやバイオマーカーを検出するための研究が行われている<sup>4,6)</sup>。このように生命活動の中心であるタンパク質を直接調べることは重要であるが、従来はタンパク質の解析は時間と手間が非常にかかり効率が悪かった。プロテオミクスやプロテオーム解析は、このタンパク質解析を効率よく行う方法であり、遺伝情報だけでは不明確な点

も解析できるという利点がある。

プロテオーム解析においては数多くのタンパク質スポットを同定するため、微量で迅速に配列を解析することが重要である。現在のところ、試料の損失をできるだけ抑えるためにできるだけ精製を行わず、かつ一度に多数のタンパク質を分離する方法として二次元電気泳動法が頻用されている。この方法で分離したタンパク質のスポットを分析してタンパク質の同定を行う。古典的には、プロテインシーケンサーを用いて解析が行われていたが、真核生物において半数のタンパク質はN末端がブロックされているため、タンパク質<sup>7)</sup>の配列が得られないという欠点があるため、現在では利用が少なくなっている。

前世紀の終わりから質量分析計と高分子の質量分析法が発達して、タンパク質の同定が可能になってきた<sup>8)</sup>。質量分析法では、タンパク質を酵素分解してペプチドフラグメントの混合物にし、これらのペプチドの分子量を測定するのである。もし測定しようとするタンパク質のアミノ酸配列がすでに決定されていれば、これをプロテアーゼで分解すれば、どのようなペプチドが得られるかは、コンピューターで簡単に決定できる。そこで、タンパク質のデータベースからどのようなペプチドから構成されるのかを計算し、実際に得られたペプチドの分子量と比較することにより目的タンパク質を同定することが可能である。この方法を **peptide mass fingerprinting** 法<sup>9)</sup>と呼んでおり、最終的には検索ソフトを用いて同定する。**Matrix-assisted laser-desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF)** 質量分析計 (MS) は、ペプチド混合物を、短時間で分析できる装置である<sup>10)</sup>。プロテオーム解析では、大量のサンプルを解析することが多いので、質量分析計を用いた解析が必要となっている。しかし、ペプチド断片の質量だけでは、すべてのタンパク質の同定は不可能である。そのためには、ペプチドを質量分析計中でさらに分解して、分解物の質量分析を行うことでアミノ酸配列を得る方法が必要となる。この操作を **MS/MS** といい、一般

的には高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と組み合わせた LC-MS が用いられている<sup>11)</sup>。

これまでにヒト細胞では数多くの細胞に対してプロテオーム解析がなされてきている<sup>4-6)</sup>。ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG 細胞) は、ヒト唾液腺癌細胞としてその表現形質と増殖・分化との特性が解析されている細胞で<sup>12)</sup>、形態学的にはヒト唾液腺介在部導管上皮細胞に近似している<sup>13)</sup>。また HSG 細胞は癌胎児抗原(CEA)、ラクトフェリンや分泌コンポーネントを発現しており、これは唾液腺介在部導管上皮細胞のマーカールと一致している<sup>14)</sup>。

ここでは、HSG 細胞に含まれるタンパク質のプロファイリングをについて網羅的にプロテオーム解析した結果を中心として概説したい。

## 1. ヒト顎下腺由来腺癌細胞株のプロテオミクス

### 1.1 二次元電気泳動による細胞タンパク質の分離

未処理の細胞を直接に質量分析計に入れて、全部のタンパク質を同定することが理想であるが、現状ではまだまだ不可能である。そこで何らかの方法で、タンパク質を分離する方法が必要となるが、存在するタンパク質を極力損失させない方法が望まれる。そのためには、分離操作を可能な限り減らすことが重要である。この分離方法として現在も使用されているのが、O'Farrell<sup>15)</sup>による二次元電気泳動法である。二次元電気泳動法には各種の方法があるが、O'Farrell の方法は一次元目に等電点電気泳動を二次元目に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行う方法である。しかしながら、この方法でも、すべてのタンパク質が検出されるわけではない。1) 一次元目に使用できる、SDS より可溶化力が強い界面活性剤が存在し

ないため全部のタンパク質を回収できない、2) Immobiline DryStrip (IPG)ゲルやアクリルアミドゲルでは、分子量 100kDa 以上のタンパク質は、うまく泳動されない、3) 極端に等電点が高い (pI>11) あるいは低い (pI<3) タンパク質は分離されない、などの問題点がある。しかしながら、これにかわるシステムはまだできていないため、多くの研究者がこの方法を用いている。他の方法としては、多次元クロマトグラフィ (LC) で行う方法が行われているが、三次元以上の LC の組合せになると、個々のタンパク質の把握が困難という問題が出ている。

## 1.2 HSG 細胞タンパク質の二次元電気泳動による分離

HSG 細胞を直接溶解緩衝液 (7.8M 尿素, 2M チオ尿素, 2%w/v NP-40, 2%v/v Pharmalyte, 100mM DTT) に溶解させ、全細胞タンパク質の二次元電気泳動を行った<sup>16,17</sup>。最初に一次元目として等電点の広い IPG (等電点範囲が pH 3~10 linear gradient 型、GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて細胞全体のタンパク質の分離を行

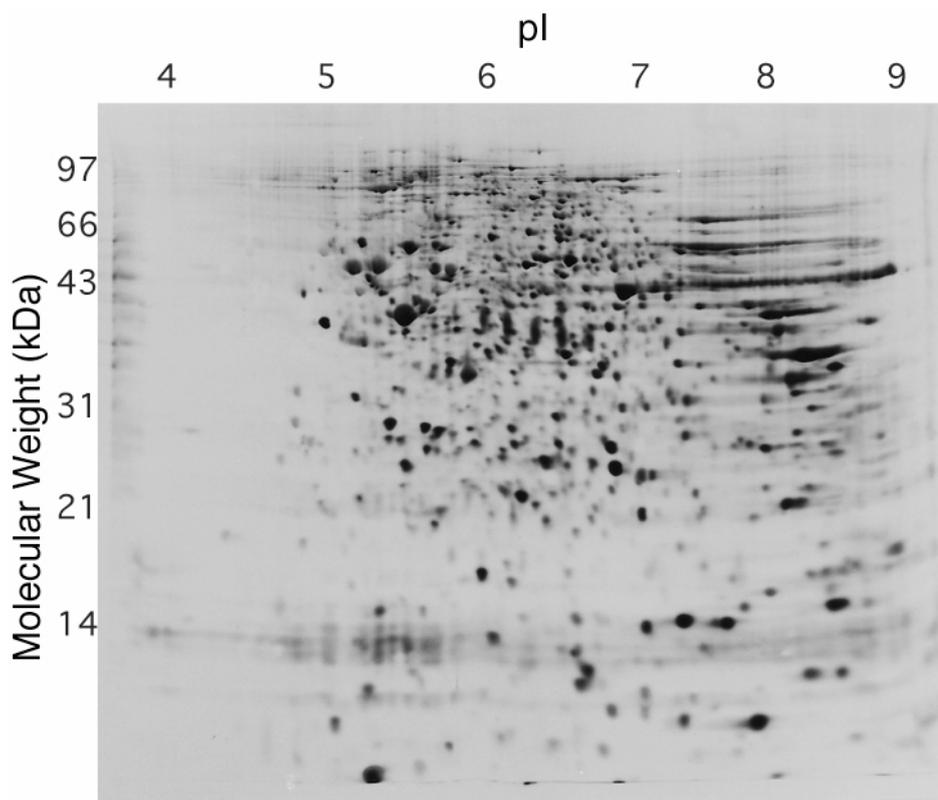


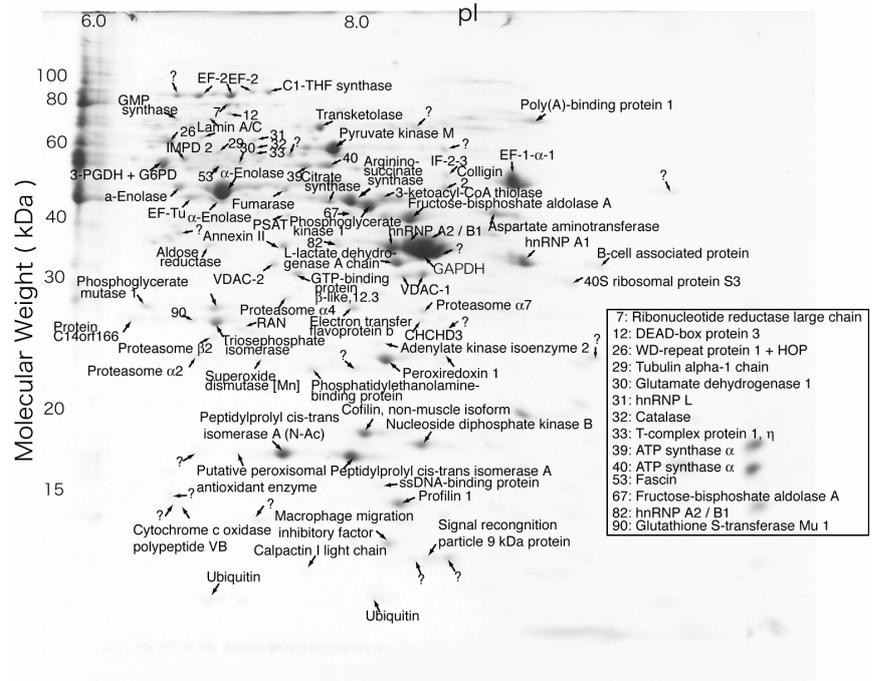
図 1. HSG 細胞タンパク質の二次元電気泳動パターン

一次元目は Immobiline Drystrip, pH3-10, 13 cm を用いて行った。(GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて行った。二次元目には、ゲル濃度 12.5% の 16X16 cm のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。スポットの染色は、銀染色を用いた。



**図 3. HSG 細胞タンパク質の二次元電気泳動マップ**

一次元目は Immobilone Drystrip, pH6-11, 13cm (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて行った。二次元目には、ゲル濃度 12.5% の 16X16 cm のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。スポットの染色は、CBB 染色を用いた。解析を行ったスポットを矢印で示し、同定されたものにはタンパク質名を記入した。



はサイズの大きなゲルを用いるか、1次元目を等電点の狭い領域で行うことになる。また等電点の高く、かつ高分子量の領域、すなわち pI7~9 で M.W. 30 kDa 以上の領域では、スポットのピークが横に流れる傾向が大きかった。そのため、等電点で2つの領域に分けることにした。すなわち等電点の範囲の狭い IPG, pI4~7 および pI6-11 を用いて、それぞれ2次元電気泳動を行った (図 2、図 3)。ここでは高感度だが、定量性の低い銀染色ではなく、明確な発現量の違いを見るためと、その後のスポットの同定の切り出しに便利なクマシーブリアントブルー R250 (CBB) 染色を用いてスポットを染色した。その結果、各電気泳動においてそれぞれ約 400 個のスポットが観察された。

現在では、各種の蛍光染色試薬が開発され SYPRO ruby など銀染色と同等な感度を持つ試薬が市販されている。これらは、CBB と同様に質量分析に支障を来さないが、問題点としては価格と、検出や切り出しに特別な装置が必要になることである。銀染色を行ったスポットの解析の場合、感度は落ちるが、アルデヒドを用いないタイプの銀染色法では、前処理を行えば質量分析には使える<sup>18)</sup>。しかし筆者たちが用いた MALDI-TOF MS では、分子量にも依存するが、銀染色レベルでしか検出でき

ないスポットでは同定は困難であった。

### 1.3 プロテオーム解析

プロテインシーケンサーは、現状では利用されることは少なくなってきた。その理由として、1) 分析時間が1アミノ酸残基に約40分かかり、1日で1検体の解析しかできない点、2) 化学分解を行うのでその試薬代に高額な費用を必要とする点および、3) 最大の欠点としてアミノ(N)末端がブロックされている場合には、解析ができないという点があるためである。しかしながら、細菌などの原核生物由来のタンパク質や、ゲノム解析が行われていないタンパク質の解析を行っている研究では使用されている。

タンパク質の同定に限定すれば、In-gel digestion<sup>17,18)</sup>後、MALDI-TOF MS で解析するのが一般的である。特に、多検体の処理を行うためには、分析時間が短時間で済む MALDI-TOF MS を利用することが多い。これに対して、配列分析や後に述べる修飾残基の同定には、MS/MS を行える機種が必要であるため、イオントラップ型や四重極型に HPLC をつないだ LC-MS を使用することが多い。最近では MS/MS を行える機種として、四重極型と TOF のハイブリッド型である Q-TOF や MALDI-TOF をタンデムにつないだ TOF/TOF あるいは、フーリエ変換(FT)型が使われてきているが、価格の点でまだ普及しているとは言えない。

MALDI-TOF MS は、タンパク質の同定には便利な機器であるが、欠点としては先ほど述べたように、1) 構造解析を行うのは不可能ではないが困難である、および2) 20kDa 以下のタンパク質の同定には、得られるフラグメントの数が少ないため同定の精度が良くないことがある。特に後者は、筆者らも統計を取ってみたが、20kDa 以上では、約 80% が同定可能であったのに対して、20kDa 以下では約 1/3 しかなかった。これに対して、イオントラップ型 LC-MS を用いた場合には

分子量に関係なくほぼ全部のタンパク質の同定が可能であった。

HSG 細胞のタンパク質は、初期に 32 スポットについてはプロテインシークエンサーを用いて同定し、最近の 9 スポットについて LC-MS/MS を用いて同定した以外は、MALDI-TOF MS を用いて分析し、MS-Fit<sup>19)</sup>による検索から同定したものである。

#### 1.4 HSG 細胞のプロテオーム解析

HSG 細胞におけるプロテオーム解析を行うために、主要な 572 スポットについて同定を試みた。この結果、全体の 79%に相当する 450 スポットについては 237 種類のタンパク質が同定された(表 1)。この内アミノ酸配列分析から 32 スポット中 18 スポットが同定されたが、N 末端がブロックされているタンパク質の割合は 44%で、他の真核生物と類似していた<sup>16,20)</sup>。

プロテオミクスの解析では、同定したタンパク質の機能を個々について述べると冗長であるため、機能別に分類することが多い。しかしながらタンパク質の機能は 1 種類に限定されておらず、種々の機能を持つことが示されている<sup>21,22)</sup>。そこで同定されたタンパク質の一覧を表 1 に、また Bevan らの方法<sup>23,24)</sup>に従って機能別に分類したものを円グラフに示した(図 4)。タンパク質はできるだけ、クラスに分けるようにして、複数機能がある場合には、最も重要と思われるもの一つに限定した<sup>25)</sup>。このようにして機能で分類してみると、同定されたタンパク質のうち最も多いのが、タンパク質の destination(用途)のカテゴリーに関するもので、48 個(20%)を占めた。このカテゴリーにはタンパク質のフォールディングを行う、シャペロンや、分解を行うプロテアソーム構成タンパク質が多数同定された。ついで、細胞構造 (Cell structure)に関与するタンパク質で、34 個(14.3%)を占めた。このカテゴリーには、細胞骨格に関与するタンパク質が大部分を占めた。サブカテゴリーまで分けると、細胞骨格タンパク質が 34 個と最も多かった。3 番目は、タンパク質の代謝(Metabolism)

に関するもので30個(12.7%)を占めた。このカテゴリーに属するタンパク質としては、アミノ酸代謝、核酸代謝、脂質代謝および炭水化物代謝に関するものが多くを占めた。4番目には、エネルギー産生(Energy)に関するもので、28個(11.8%)を占めた。このカテゴリーには、解糖系、TCA回路およびATP合成に関与するタンパク質が多数同定された。これら、上位4カテゴリーを合計すると、全体の約60%を占めた(図4)。

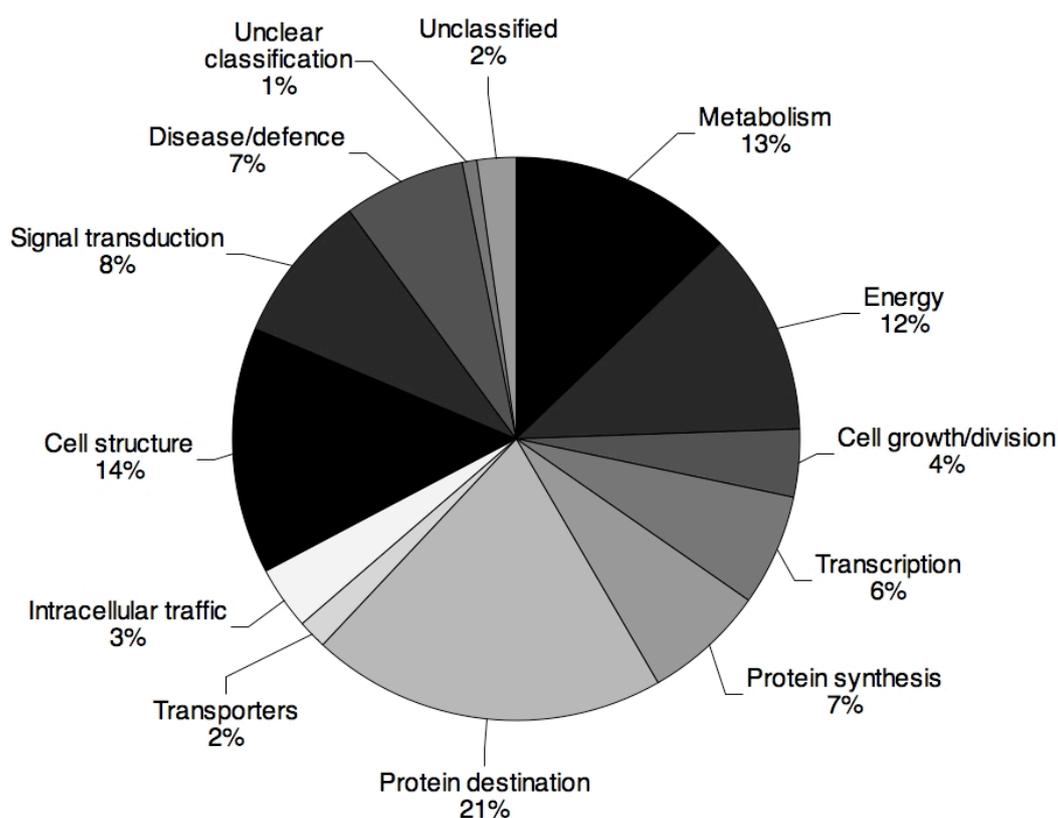


図4. 同定されたタンパク質の分類

同定された237種類のタンパク質を13のカテゴリーに分類した。各カテゴリーに含まれるタンパク質の種類をグラフに示した。各カテゴリーには、同定された全タンパク質に対する各カテゴリーに含まれるタンパク質の種類の割合を%で示した。

代謝のカテゴリーでは、アミノ酸代謝に関与するタンパク質が8種類でaminotransferaseが3種類同定された。核酸代謝に関与するタンパク質が9種類、脂質代謝に関与するものが4種類で、 $\beta$ 酸化の酵素であった。炭水化物の代謝に関す

るものが7種類とリン酸代謝に関与するものが1種類同定された。エネルギー産生のカテゴリーには解糖系のタンパク質が10種類同定されたが、解糖系の最初の3酵素は検出されず、これらは存在量が少なく、むしろ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase のように解糖系の後半の酵素は存在量が多いことが示された。また糖新生のタンパク質が1種類、ペントースリン酸回路のタンパク質が3種類同定された。TCA回路のタンパク質が4種類、電子伝達系のタンパク質が4種類およびATP合成酵素のサブユニットが4種類同定された。

細胞の成長および分裂のカテゴリーにはDNAの複製に関与するタンパク質が7種類同定された。しかし、主要なDNA polymeraseはその分子量が二次元電気泳動の範囲外のためか全く検出されなかった。細胞周期と分裂に関与するタンパク質は1種類ずつ同定されたが、量的には少なかった。転写のカテゴリーでは、スプライシングなどのmRNAのプロセッシングに関与する Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein<sup>26)</sup>の仲間が9種類と多く同定された。これらのタンパク質は、比較的多量に存在していた。これ以外には、RNAの輸送に関与するタンパク質が3種類、転写制御に関するタンパク質が3種類同定されたが、いわゆる転写因子に属するタンパク質は検出されなかった。またRNA polymeraseのサブユニットも検出されなかった。タンパク質合成のカテゴリーでは、4種類のリボソームタンパク質、3種類の Aminoacyl-tRNA synthetase、4種類ずつの伸長因子と延長因子が同定された。Aminoacyl-tRNA synthetaseの存在量は少なかったが、他のタンパク質は中程度に存在していた。

タンパク質の用途のカテゴリーに属するプロテアソーム構成タンパク質は、20種類同定された。Ubiquitinとユビキチン化に関与するタンパク質として1種類が同定された。20種類のプロテアソーム構成タンパク質は、中程度に存在していた。分子シャペロンなどタンパク質のフォールディングに関与する、26種類のタンパク質が

同定された。T-complex<sup>27)</sup>を構成するサブユニットが6種類、またタンパク質の isomerase も5種類同定された。このサブカテゴリーに属するタンパク質は、T-complex 以外のタンパク質は比較的少量に存在することが特徴であり、特に HSP60 や HSP70 や GRP78 や GRP94 などは多量に存在した。トランスポーターのカテゴリーには、3種類のチャネルタンパク質が同定された。細胞内輸送のカテゴリーでは、核-細胞質輸送に関与するタンパク質である GTP-binding nuclear protein RAN<sup>28)</sup>および、小胞輸送に関与するタンパク質が7種類同定された。

細胞構造のカテゴリーでは細胞骨格とその制御タンパク質が最も多く、34種類が同定された。この内 Actin が細胞内タンパク質として最も多量に存在していた。その次が Tubulin 類であった。また Keratin 類も多量に存在していた。これらは、分子量 40~50kDa、pI5~6 付近に局在していた。その他のタンパク質としては、Actin のフィラメント形成制御タンパク質が15種類同定された。これらは、中程度の存在量で存在していた。また核やクロモソームの形成に関与するタンパク質が5種類同定された。

シグナル伝達のカテゴリーでは、リセプターとして Annexin 類が6種類、サイトカインが2種類同定された。またメディエータとしては、14-3-3 タンパク質を6種類含む12種類が同定された。14-3-3 タンパク質はやや多量に存在していた。疾患および防御のカテゴリーには、3種類の細胞死に関与するタンパク質、酸化還元に関与する6種類の Peroxiredoxin、解毒に関与するものとして、2種類の Superoxide dismutase や Catalase および4種類の Glutathione 関連酵素が同定された。機能不明なタンパク質としての非分類化のカテゴリーとして5種類のタンパク質が見出された。これは、Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3 (Q9NX63)、Protein C14orf166 (Q9Y224)、Protein PP2447 (Q9H4I3)および Tumor protein D54 (O43399) Uncharacterized protein C19orf10 (Q969H8)の4種類であった。

HSG 細胞をその産生されるタンパク質から特徴を得るために、まず isoform のタイプから調べてみた。解糖系では多くの isoform が知られているので、解糖系の酵素について調べてみた。Enolase には、 $\alpha$ 、 $\beta$  及び  $\gamma$  の 3 種類の isoform が知られているが、 $\gamma$  isoform は、神経組織特異的な isoform であることが知られている<sup>29)</sup>。HSG 細胞では、 $\alpha$  と  $\gamma$  のタイプが主に発現しており、筋肉型の  $\beta$  タイプは、現在までに検出されなかった。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase では肝臓型、Phosphoglycerate mutase では脳型、L-Lactate dehydrogenase でも心臓型の A(H)鎖が筋肉型の B(M)鎖より強く発現していた。全解糖系のタンパク質を解析していないが、現在のところ筋肉型が主要であったのは、Fructose-bisphosphate aldolase の A 型だけであった。このように HSG 細胞は、筋肉細胞のマーカーの発現が少なく、これまでの細胞の特徴と一致していた<sup>13)</sup>。また 5-Azacytidine 処理後の派生細胞として腺房様細胞の特徴を示す HSG-AZA3 細胞が知られている<sup>30)</sup>。筆者らは、HSG-AZA3 細胞との発現タンパク質の比較を以前に行ったが、その結果 HSG 細胞はより神経細胞に多く発現している型の isoform が強く発現していたのが特徴であった<sup>17)</sup>。

HSG は腺癌細胞<sup>12-14)</sup>であるので、腫瘍マーカーの発現について調べてみた。腫瘍において発現量が増大することが知られている、Folate receptor alpha<sup>31)</sup>や Peroxiredoxin-1<sup>32)</sup>が同定され、その発現量は中程度であった。Stathmin<sup>33)</sup>は tubulin を結合して微小管形成の制御を行っているタンパク質であるが、最近ヒト口腔扁平上皮癌で大量に発現されていることが見出された<sup>33)</sup>。HSG 細胞においては、Stathmin が HSG-AZA3 細胞よりも多く発現していることが示された。また Tumor protein D54 が同定されたが、発現量との関連は不明である。一方、Nucleoside diphosphate kinase A と B は、ATP を用いてヌクレオシド 3 リン酸を合成する酵素であるが、癌転移抑制遺伝子としても知られ、高い転移性を持つ腫瘍細胞では発現量が減少している<sup>34)</sup>。両者とも、比較的多い発現量を示した。また Nucleoside

diphosphate kinase A は HSG-AZA3 細胞に比較して HSG 細胞で多く発現していた<sup>17)</sup>。

次に上皮細胞のマーカータンパク質の発現について調べてみた。14-3-3 タンパク質は、7種類のタンパク質があり、多彩な機能を持っている<sup>35)</sup>。このうち $\sigma$ は、G2/M移行期の p53-regulated inhibitor としても知られている<sup>36)</sup>。 $\sigma$ は、上皮細胞のマーカータンパク質でもあり、ケラチノサイトには多量に存在する<sup>36)</sup>。14-3-3 $\sigma$ は HSG 細胞で同定され HSG-AZA3 細胞よりも強く発現した<sup>17)</sup>。また Folate receptor alpha<sup>31)</sup>も上皮細胞に特徴的に見られることが知られている。上皮細胞を特徴づけるタンパク質として、ケラチンの発現がある。今回の解析では、Keratin, type II cytoskeletal 6A(CK6A)、Keratin, type II cytoskeletal 7(CK7)、Keratin, type II cytoskeletal 8(CK8)、Keratin, type I cytoskeletal 17(CK17)および Keratin, type I cytoskeletal 18(CK18)の5種類が同定され、これらの発現量は、CK6Aを除いて多かった。ケラチンは、type I と type II のタンパク質間でヘテロダイマーを形成する<sup>37)</sup>。このダイマーの組合せも決定されているものがあり、その例としては CK8 と CK18 および CK6A と CK17 である<sup>38)</sup>。これらのケラチンの発現パターンは単層上皮におけるケラチンタンパク質の発現<sup>39)</sup>とよく似ていて CK6A と CK19 以外は一致した<sup>17,40)</sup>。

最後に、得られたタンパク質の細胞内の局在を Swiss-Prot のデータベース<sup>41)</sup>からまとめてみた。近年タンパク質の機能が明らかになるにつれ、1つのタンパク質が細胞質や核あるいは細胞外などに移行することが知られるようになってきた<sup>21)</sup>。そのため単純な分類は困難であるが、この方法でどのようなタンパク質が得られたのかを考察するために分析してみた。複数の細胞内小器官に渡って存在が記載されているものについては、重要と思われる1器官のみを計算した。その結果は、細胞質がもっとも多く141種類(60%)を占めていた、次はミトコンドリアのタンパク質で34種類(14%)、核のタンパク質で25種類(11%)、ついで小胞体(ゴルジ装置も含む)タンパク質が13種類(5%)であった。なお35種類のタンパク質におい

て核と細胞質の両方に存在することが記載されており<sup>41)</sup>、これは全体の15%を占めていた。これに対して、細胞膜タンパク質は9種類(4%)、細胞外(分泌タンパク質を含む)タンパク質は3種類(1%)であった。使用したタンパク質の可溶化方法では、膜タンパク質の可溶化は十分でないようであった。また、分泌タンパク質も Macrophage migration inhibitory factor、Serotransferrin および Uncharacterized protein C19orf10 が得られたのみで、アミラーゼなどの唾液タンパク質は得られなかった。従って、分泌タンパク質の解析には、培養液から濃縮することが必要となる。

通常の二次元電気泳動の分離限界から、分子量が100kDa以上のタンパク質や10kDa以下のタンパク質は分析できないため、範囲外のタンパク質の同定には別の方法が必要となる。高分子量タンパク質では、ポリアクリルアミドではなくアガロースを用いる方法<sup>42)</sup>、低分子量では、クロマトグラフィーによる分離<sup>43)</sup>が用いられている。また多量に存在するタンパク質があると、微量にしか存在しないタンパク質が隠れてしまうことがある。これは2種類の要因を含み、1つには、Actinなどの非常に強いスポットがあるとその近くにある弱いスポットが隠されてしまうことである。2つには、二次元電気泳動で泳動できるタンパク質の総量が決まっているため微量タンパク質は検出できない。最初の要因に対応するためには、分解能を上げることが必要であり、pIの範囲が狭いIPGを用いることやゲルのサイズを大きくすることである。2つめの要因に対応するには、簡単な精製を行い濃縮する必要がある。

## 2. タンパク質の翻訳後修飾の解析

遺伝子情報だけでは、成熟したタンパク質の情報は正確には得られず、直接タンパク質を解析することが必要となる。質量分析法では、質量から修飾情報は簡単に

同定可能であり、また MS/MS を行うことにより修飾位置の決定できるようになってきた。このため最近では、タンパク質のメチル化やリン酸化の網羅的解析<sup>44,45)</sup>も行われてきている。しかしながら糖鎖構造は、近年解析技術が進んできたが、糖鎖ペプチドのイオン化は難しく、まだ簡便に解析できるようにはなっていないのが現状である。

## 2.1 N 末端のアミノ基の修飾

タンパク質の N 末端は、機能との関係が重要でない場合が多いためか、遺伝子解析のみですませることが多く、正確には分かっていないタンパク質が多い。例えば、Swiss-Prot のデータベース<sup>41)</sup>においても、多くは Met からしか記述がないか、相同性や可能性で N 末端がアセチル化していると記述しているだけである。しかしながら、アミノ酸配列はタンパク質の最も基本事項であり、重要な知見である。この N 末端の情報は、In-gel digestion したペプチドの解析で、タンパク質の同定と共に得られることがある。

HSG 細胞のプロテオミクスを行ったデータを基にして、N 末端のデータについて解析してみた。その結果、59 種類のタンパク質で 61 個の N 末端を含むペプチドが検出された。このうち 46 個は N 末端がアセチル化され、残りの 12 個の N 末端は修飾されていなかった。アセチル化 N 末端のうち、27 個はアセチル-Ala、13 個はアセチル-Ser、2 個はアセチル-Met とアセチル-Asp、アセチル-Thr とアセチル-Val が 1 個ずつであった。非修飾 N 末端のうち 2 個は Pro、1 個は Val で、残りの 12 個は Met が N 末端アミノ酸であった。すでに、Swiss-Prot に記載されて修飾が一致したタンパク質は、このうち 43 種類であった。また、新規あるいは、実験で確認できたタンパク質は 10 種類であった (表 2)。一方、記載と異なった結果を得たものが 8 種類のタンパク質において認められた。Annexin A3、Glutathione S-transferase MU3、

Keratin type II cytoskeletal 6A、Keratin, type II cytoskeletal 7、Lactoylglutathione lyase および Triosephosphate isomerase では、それぞれのアミノ酸がアセチル化されたアミノ酸として検出された。また Fascin は、予想されたアセチル-Thr ではなく Met が N 末端アミノ酸であった。また、Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase については、2 種類の N 末端が得られた。従来知られているアセチル-Ala と、今回見出された Met である (表 2)。

興味深い結果としては、Peptidylprolyl cis-trans isomerase A は等電点の異なる 2 種類のスポットが得られている。このうち等電点の低いスポットの HSG001 は、N 末端がアセチル-Val であるのに対して、等電点の高いスポットの HSG002 では、N 末端はブロックされておらず Val であった。N 末端の修飾体と非修飾体が同程度存在することから、この修飾が何らかの機能に関与しているのかもしれない。

## 2.2 リン酸化

細胞内における情報の伝達すなわちシグナル伝達は、タンパク質中の Tyr, Ser および Thr のリン酸化、脱リン酸化によるところが大きい<sup>46)</sup>。従って、タンパク質のリン酸化については、非常に多くの研究者の興味の対象である。リン酸化の解析に対しては、従来から抗体を用いる方法が行われていたが、特にリン酸化 Ser および Thr に対する特異的抗体を得るのが困難であった。最近になって、MS/MS 装置の感度が上がったことや、検出および同定の方法が発達してきており、“Phosphoproteomics” (リン酸化プロテオミクス) として多くのリン酸化タンパク質の同定が行われてきている<sup>47-50)</sup>。ここでは、簡単に検出方法とその同定について述べたいと思う。

## 2.3 リン酸化タンパク質の検出方法

これまでにリン酸化タンパク質の検出には抗リン酸化抗体を用いる方法が一般的であった。確かに抗リン酸化 Tyr 抗体は、汎用性がありよく使用されている。これに対して抗リン酸化 Ser/Thr 抗体は汎用性に乏しく、個々のリン酸化タンパク質に対する抗体でないと利用できないという欠点があった。また、ウェスタン・ブロットした膜とこれとは別のゲルを比較してそのスポットを切り出す場合に困難な場合が多い。そこで、リン酸化タンパク質の検出には、ホスファターゼによる脱リン酸化を行い<sup>51)</sup>、ホスファターゼ処理を行った試料と行わない試料を二次元電気泳動で比較して、スポットの位置の変化からリン酸化タンパク質の検出を行う方法が行われていた。しかしながら、脱リン酸化反応が完全に行われないうことと、二次元電気泳動上のスポットの比較が困難であることから、よい検出方法ではなかった。最近、新しいリン酸化タンパク質を染色する方法が見出された。Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Molecular Probes)という染色法であり、580nmの蛍光でリン酸化 Tyr のみならずリン酸化 Ser/Thr を持つタンパク質の検出が可能である<sup>52)</sup>。染色方法は、時間がかかるが、固定、染色そして洗浄の三工程でそれほど難しくなく。また最大の利点は、その後直接 CBB などタンパク質染色が可能なことである。

### 図 5. HSG 細胞のリン酸化タンパク質の検出

一次元目は Immobilone Drystrip, pH3-10, 7cm (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて行った。二次元目には、10-20%グラジエントゲル濃度の 9x9 cm のポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品) を用いて電気泳動を行った。同一ゲルに a) Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain (Molecular Probes) を用いて染色を行った後、b) CBB R-250 (Sigma) を用いて染色した。

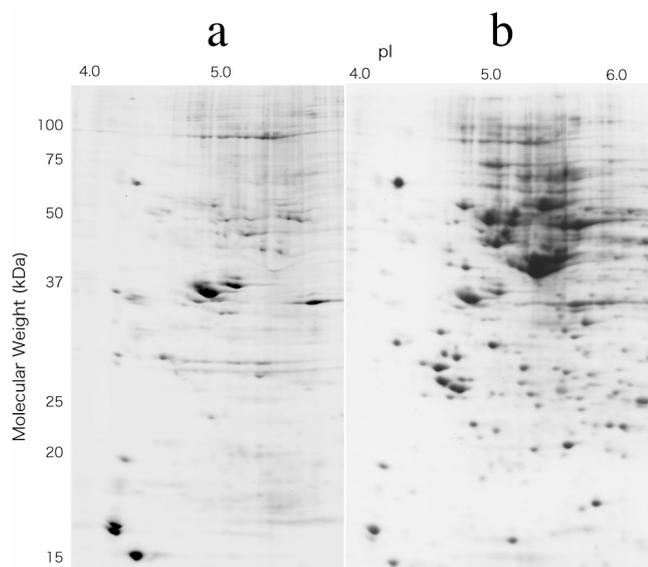


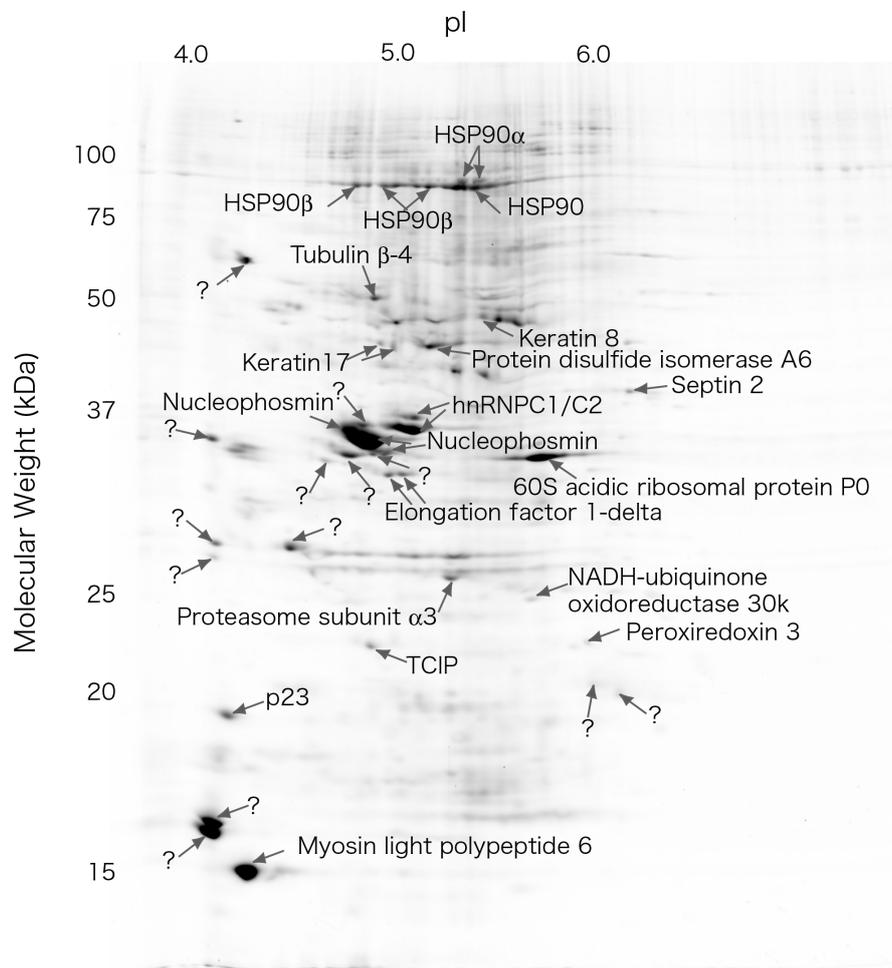
図 5 に HSG 細胞のリン酸化タンパク質の染色した二次元電気泳動のパターンを

示す。比較としてそのゲルをさらに CBB でタンパク質染色したゲルを示した。このようにスポットの対応が容易で、しかも図を重ね合わせることも可能であり、目的のタンパク質をほぼ正確に切り出すことができる。ただし、タンパク質量が多いスポットの場合には、銀染色と同様に白抜けすることがあった。

実際にこの染色されたタンパク質が、リン酸化されているかどうかを調べるためにスポットの同定を MALDI-TOF MS を用いて行った。図 6 に示したようなタンパク質が同定された。同定されたタンパク質の多くは、Nucleophosmin のように既にリン酸化されることが分かっているタンパク質であったが、Myosin light polypeptide 6、Peroxioredoxin 3、Keratin, type I Cytoskeletal 17 および NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit では新規にリン酸化を受けることが認められた。

### 図 6. HSG 細胞で同定されたリン酸化タンパク質

一次元目は Immobilone Drystrip, pH3-10, 7cm (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて行った。二次元目には、10-20% グラジエントゲル濃度の 9x9 cm のポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品) を用いて電気泳動を行った。スポットの染色は、Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain を用いた。解析を行ったスポットを矢印で示し、同定されたものにはタンパク質名を記入した。



## 2.4 リン酸化部位の決定

タンパク質のリン酸化において重要な点は、リン酸化のタイプとリン酸化を受ける部位の情報である。さらに情報伝達の際は、リン酸化—脱リン酸化に関する時間軸での解析情報が望まれる。ここでは、特に培養細胞を用いた最近の方法論について述べる。

リン酸化の位置情報の決定であるが、通常の MALDI-TOF MS を用いた解析では困難である。最近よく使用されているのは、固相化金属親和性カラム (IMAC) を用いる方法である。この方法は、リン酸化ペプチドあるいはリン酸化タンパク質をカラムにより濃縮精製後、LC-MS/MS によりペプチドの配列分析を行い、タンパク質とリン酸化残基を同定するものである<sup>45,49)</sup>。IMAC の代わりに抗リン酸化 Tyr 抗体を用いて精製する方法もある<sup>50)</sup>。このような方法で、細胞のリン酸化タンパク質の網羅的解析、すなわちリン酸化プロテオミクスが行われている。最近 IMAC を用いていると思われる濃縮キットが市販されている。これらを用いれば、リン酸化タンパク質の同定も簡便にできるようになるとと思われる<sup>50)</sup>。

リン酸化の研究において、さらに重要なのは、リン酸化—脱リン酸化がどのように起きているかである。細胞外の刺激に応答して細胞内のリン酸化がどのように起るのかを知ることはシグナル伝達において重要な課題である<sup>48)</sup>。その解析方法に役立つと思われるのが、安定同位体の利用と質量分析の組合せである。質量の違いがあれば質量分析計で測定可能であることから、安定同位体を用いることは古くから試みられてきた。ここでは、Mann らのグループによる方法<sup>47)</sup>を紹介する。本法は安定同位体である  $^{13}\text{C}$  を含むアルギニン (Arg- $^{13}\text{C}6$ ) を用いる。通常アルギニン (Arg- $^{12}\text{C}6$ ) は炭素を 6 個持つため、 $^{13}\text{C}$  安定同位体を持つ Arg- $^{13}\text{C}6$  は通常アルギニンより質量 6 だけ大きい。この質量 6 の差を質量分析計により検出するのである。細胞を 2 つの培地、すなわち正常な Arg- $^{12}\text{C}6$  を含む培地で培養したものと、Arg- $^{13}\text{C}6$

を含む培地で細胞を培養しておき、タンパク質中の Arg を置換させておく。この Arg-<sup>13</sup>C6 で培養した細胞のみを、 FGF2 で刺激する。その後両者の細胞を溶解し、タンパク質比 1:1 で混合させる。抗リン酸化 Tyr 抗体を用いてリン酸化タンパク質を精製後、トリプシン処理でペプチドを断片化する。これを LC-MS/MS で解析するのである。もし FGF2 刺激により、リン酸化が起れば、得られたリン酸化ペプチドの [Arg-<sup>13</sup>C6]/ [Arg-<sup>12</sup>C6] は 1 より大きくなるはずである (論文では 1.3 より大きいものとしている)。一方、刺激によりリン酸化が起らなければ、リン酸化ペプチドの [Arg-<sup>13</sup>C6]/ [Arg-<sup>12</sup>C6] は 1 で変化しないはずである。従って、質量 6 の異なるピークの組を検索し、その比とペプチドの同定を行うことによりタンパク質のリン酸化を解析できる。さらに彼らは、刺激後の時間経過を解析することによりダイナミックなリン酸化のネットワークも解析できるとしている<sup>48)</sup>。この方法は対応するソフトウェアが十分でないため、一般の利用者が簡便に利用することは現在では難しいが、今後発展すると思われる。

このように、培養細胞に安定同位体を組み込んで質量分析計で解析する方法はまだ一般的ではないが、様々な応用が考えられる。放射性同位体を用いる必要がないため、通常の培養室や実験室で行えることが利点である。培養細胞を扱う研究者が質量分析の研究者ともっと交流が盛んになれば、新しい方法論が開発できるのではないかと期待している。

### 3. データベースの構築

プロテオーム解析後にデータベース化する必要性があるのは、通常の表では、二次元電気泳動のマップ上の、どの位置に目的のタンパク質が位置しているのかを示すことが困難なためである。このため、画像とテキストが混在する型式が必要であ

る。この種類のデータベースを構築するには HTML 形式で作成するのが最も簡単であり、他の研究者に容易に開示することが可能である。また大抵の市販の画像解析ソフトにデータベース化できるソフトが付属しているので、ソフト上でデータベース化する方法もある。筆者らの経験では、100 以上のスポットになるとそれぞれのデータの関係覚えておくのは不可能であり、その点でもデータベース化は重要である。また、タンパク質のデータベースはどんどん更新されており、二次元電気泳動のマップ上のデータベースも更新する必要がある。特に、タンパク質名は変わりやすく、混乱することが多い。Swiss-Prot であれば、entry name または accession number で管理することがよいと思う。またデータベースには、スポットの位置データ、質量分析の測定データ、タンパク質検索結果、同定したタンパク質のデータベースのエントリーおよびタンパク質データベースへのリンクを含むことがデータベースを更新する上で重要と思われる。

現在までに得られた知見をまとめて、HSG 細胞タンパク質の二次元電気泳動データベースを作成した。このデータベースは、HTML 形式で書かれているので、インターネットにつなげて、PC のブラウザから見る事が可能である<sup>17)</sup>。データベースの一例を図 7 に示した。なお実際のデータベースの URL アドレスは、以下のとおりである。<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/biochem/biochem/kamo/index.html>

また細胞タンパク質のデータベース構築の重要性として、他の細胞や発現変化の比較が容易になる点がある。すなわち、このデータベースを基にすれば、HSG 細胞に対する抗がん剤や放射線治療にともなう mRNA とタンパク質の発現変化などを関連付けて解析することができる。そのための基本的データベースが作成できたと考えられる。

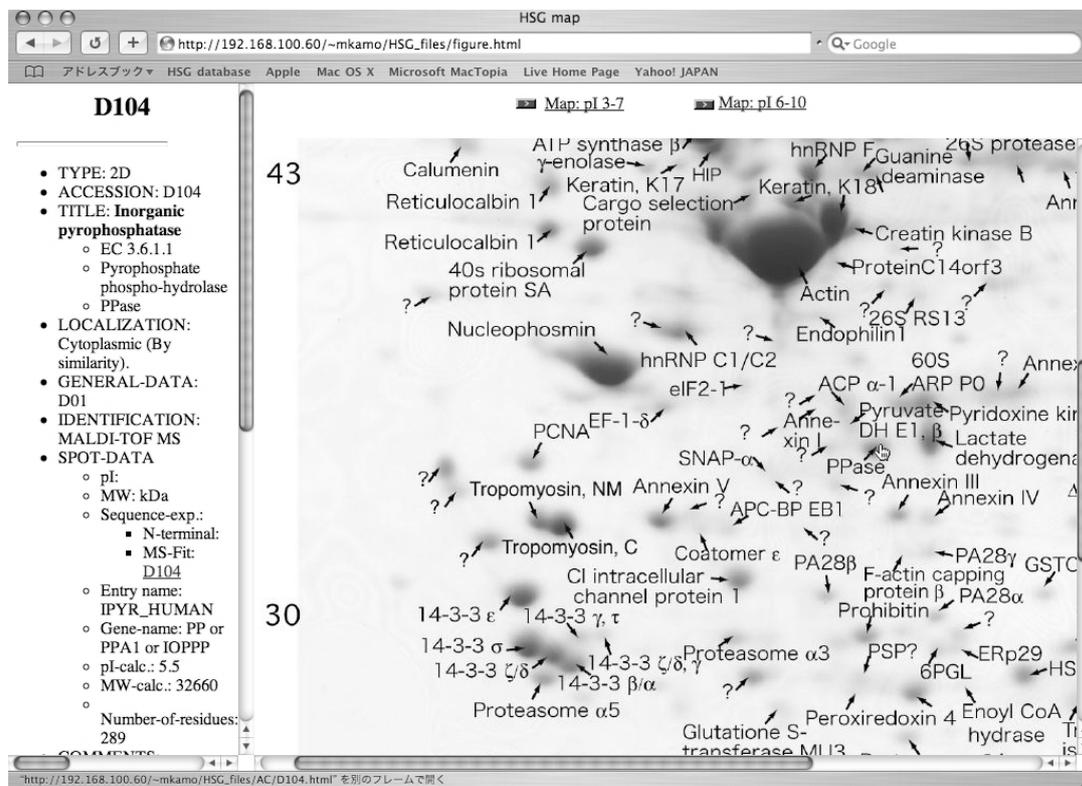


図 7. HSG 細胞タンパク質の二次元電気泳動データベース

ブラウザからデータベースにアクセスした画面を取り込んだデータベースの一画面。スポットをクリックすると、そのスポットに対応するデータが左側のフレームに示される。

ゲノム解析が終了したのに伴い、その遺伝子の機能解析が重要になってきた。その解析方法の一つとして、タンパク質の相互作用から機能解析を進める研究があり、インタラクトーム<sup>54,55)</sup>と呼ばれている分野である。プロテオミクスもこれだけでは、その細胞にどんな部品があるかということしか分からないわけである。これらの部品がどんな組合せにより細胞を動かしているのかを知ることが重要である。このためタンパク質間の相互作用のマップと連動して解析できるようになることが望まれる。

おわりに

プロテオーム解析の手法と実際例を、口腔組織培養細胞である HSG 細胞における解析を通して概説した。質量分析計の発展に伴い今後ますますプロテオーム解析が行われていくと思われる。ここでは、触れなかったがプロテオミクスが最も用いられているのは、がんの診断に有用な腫瘍マーカーやバイオマーカーの検出である<sup>4,6)</sup>。細胞における、種々の作用の担い手の中心はタンパク質である。従って、タンパク質を直接調べることは、今後も重要である。その点からも様々な分野にプロテオミクス手法が利用されることを希望している。

## 謝辞

HSG 細胞を分譲して下さいました徳島大学名誉教授佐藤光信先生（前歯学部口腔外科学第二講座教授）に感謝します。

## 参考文献

- 1) Anderson, N. L., Anderson, N. G.: Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, *Electrophoresis*, 19: 1853-1861, 1998.
- 2) Ostergaard, M., Rasmussen, H. H., et al.: Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation, *Cancer Res*, 57: 4111-4117 1997.
- 3) Wilhelm, D., Huang, E., et al.: Comparative proteomic analysis to study molecular events during gonad development in mice. *Genesis*, 44: 168-176, 2006.
- 4) Lim, Y. P.: Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin Cancer*

Res, 11: 3163-3169, 2005.

- 5) Gronborg, M., Kristiansen, T. Z., et al.: Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteomics*, 5: 157-171, 2006.
- 6) Garcia-Foncillas, J., Bandres, E., et al.: Proteomic analysis in cancer research: potential application in clinical use. *Clin Transl Oncol*, 8: 250-261, 2006.
- 7) 網沢進：新生蛋白質の N 末端プロセッシング. *蛋白質核酸酵素*, 40:389-398, 1995.
- 8) Chalmers, M. J., Gaskell, S. J.: Advances in mass spectrometry for proteome analysis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11: 384-390, 2000.
- 9) Krause, E., Wenschuh, H., et al.: The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins, *Anal. Chem.* 71: 4160-4165, 1999.
- 1 0) Courchesen P. L., Patterson S. D.: Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using peptide and fragment ion masses, *Methods Mol. Biol.*, 112: 487-511, 1999.
- 1 1) Williamson, B. L., Marchese, J., et al.: Automated identification and quantification of protein phosphorylation sites by LC/MS on a hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 5: 337-346, 2006.
- 1 2) Shirasuna K., Sato M., et al.: Neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland, *Cancer (Phila.)*, 48: 745-752, 1981.
- 1 3) 佐藤光信：唾液腺腫瘍の分化誘導療法. *癌の化学療法*, 20:1028-1036, 1993
- 1 4) Sato, M., Hayashi, Y., et al.: Search for specific markers of neoplastic epithelial duct and myoepithelial cell line established from human salivary gland and

characterization of their growth in vitro, *Cancer (Phila.)*, 54: 2959-2967, 1984.

- 1 5) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250: 4007-4021, 1975.
- 1 6) Tsugita, A., Kawakami, T., et al.: Proteome analysis of mouse brain: two-dimensional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging, *Electrophoresis*, 21: 1853-1871, 2000.
- 1 7) 加茂政晴、客本斉子、他：プロテオーム解析におけるヒト顎下腺由来腺癌細胞株とその派生細胞における発現タンパクの比較．口腔組織培養学会，9:31-42, 2000.
- 1 8) Yan, J. X., Wait, R., et al.: A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 21: 3666-3672, 2000.
- 1 9) MS-Fit, URL= <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>
- 2 0) Kamo, M., Kawakami, T., et al.: Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis*, 16: 423-430 1995.
- 2 1) Subramanian, A. Miller, D. M.: Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem*, 275: 5958-5965, 2000.
- 2 2) Rahman, S. A., Advani, P., et al.: Metabolic pathway analysis web service (Pathway Hunter Tool at CUBIC). *Bioinformatics*, 21: 1189-1193, 2005.
- 2 3) Bevan, M., Bancroft, I., et al.: Analysis of 1.9Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391: 485-488. 1998.
- 2 4) Mewes, H.-W., Albermann, K., et al.: Overview of the yeast genome. *Nature*, 387:

485-488. 1997.

- 2 5 ) Yang, P., Liang, Y., et al.: Proteome analysis of rice uppermost internodes at the milky stage. *Proteomics*, 6: 3330-3338, 2006.
- 2 6 ) He, Y., Brown, M. A., et al.: Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *J Cell Sci*, 118: 3173-3183, 2005.
- 2 7 ) Wagner, C. T., Lu, I. Y., et al.: T-complex polypeptide-1 interacts with the erythrocyte cytoskeleton in response to elevated temperatures. *J Biol Chem*, 279: 16223-16228, 2004.
- 2 8 ) Arnaoutov, A. Dasso, M.: Ran-GTP regulates kinetochore attachment in somatic cells. *Cell Cycle*, 4: 1161-1165, 2005.
- 2 9 ) Oliva D., Barba G., et al.: Cloning, expression and sequence homologies of cDNA for human gamma enolase. *Gene*, 79: 355-360, 1989.
- 3 0 ) Sato, M., Azuma M., et al.: 5-Azacytidine induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Res*, 47: 4453-4459, 1987.
- 3 1 ) Evans CO, Reddy P., et al.: Differential expression of folate receptor in pituitary adenomas. *Cancer Res*, 63: 4218-24, 2003.
- 3 2 ) Jiang D, Ying W., et al.: Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis. *Proteomics*, 3: 724-37, 2003.
- 3 3 ) Kouzu, Y., Uzawa, K., et al.: Overexpression of stathmin in oral squamous-cell carcinoma: correlation with tumor progression and poor prognosis. *Br J Cancer*, 94: 717-723, 2006.
- 3 4 ) Miyazaki, H., Fukuda, M., et al.: Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in

human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastasis, differentiated phenotype in the metastatic site, and growth factor-independent proliferative activity in culture. *Clin. Cancer Res*, 5: 4301-4307, 1999.

- 3 5) Darling, D. L., Yingling, J., et al.: A. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr Top Dev Biol*, 68: 281-315, 2005.
- 3 6) Hermeking H., Lengauer C., et al.: 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression, *Mol. Cell*, 1:3-11, 1997.
- 3 7) Fuchs, E.: Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *J Cell Biol*, 125: 511-516, 1994.
- 3 8) Toivola, D. M., Ku, N. O., et al.: Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology*, 40: 459-466, 2004.
- 3 9) Moll, R., Franke, W. W., et al.: The catalog of human keratins. Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31:11-24,1982.
- 4 0) 南順子、加茂政晴、他：コラーゲンスポンジを用いた三次元培養におけるヒト顎下腺由来腺癌細胞株の遺伝子発現. *岩医大歯誌*, 30: 216-227, 2005.
- 4 1) SWISS-PROT, URL= <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>
- 4 2) Tomonaga, T., Matsushita, K., et al.: Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Cancer Res*, 10: 2007-2014, 2004.
- 4 3) Hardt, M., Thomas, L. R., et al.: Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry*, 44: 2885-2899, 2005.
- 4 4) Ong S.E., Mittler G., et al.: Identifying and quantifying in vivo methylation sites

- by heavy methyl SILAC. *Nat Methods*, 1: 119-126, 2004.
- 4 5 ) Rush, J., Moritz, A., et al.: Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol*, 23: 94-101, 2005.
- 4 6 ) McCubrey, J. A., May, W. S., et al.: Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*, 14: 9-21, 2000.
- 4 7 ) Hinsby, A. M., Olsen, J. V., et al.: Tyrosine phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling: a role for insulin receptor substrate-4. *J Biol Chem*, 279: 46438-46447, 2004.
- 4 8 ) Johnson, S. A., Hunter, T.: Phosphoproteomics finds its timing. *Nat Biotechnol*, 22: 1093-1094, 2004.
- 4 9 ) Nousiainen, M., Sillje, H. H., et al.: Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 5391-5396, 2006.
- 5 0 ) 服部成介 : リン酸化プロテオーム解析について. *ゲノム工学*, 4: 569-573, 2004.
- 5 1 ) Larsen, M. R., Sorensen, G. L., et al.: Phospho-proteomics: evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics*, 1: 223-238, 2001.
- 5 2 ) Murray, J., Marusich, M. F., et al.: Focused proteomics: monoclonal antibody-based isolation of the oxidative phosphorylation machinery and detection of phosphoproteins using a fluorescent phosphoprotein gel stain. *Electrophoresis*, 25: 2520-2525, 2004.
- 5 3 ) Ghavidel, A., Cagney, G., et al.: A skeleton of the human protein interactome. *Cell*, 122: 830-832, 2005.

5 4) Gandhi, T. K., Zhong, J., et al.: Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. *Nat Genet*, 38: 285-293, 2006.

表1 HSG細胞において同定されたタンパク質

Protein No.	Swiss-Prot Accession No.	Protein Name	Theoretical	
			pI	MW(kDa)
HSG024	P31946	14-3-3 Protein beta/alpha	4.8	27.6
D054	P62258	14-3-3 protein epsilon	4.6	29.2
B100	P61981	14-3-3 protein gamma	4.8	28.2
HSG022	P31947	14-3-3 Protein sigma	4.7	27.8
HSG061	P27348	14-3-3 Protein theta	4.7	27.8
HSG023	P63104	14-3-3 Protein zeta/delta	4.7	27.7
T033	Q9Y4L1	150 kDa oxygen-regulated protein	5.1	107.7
T070	P17980	26S protease regulatory subunit 6A	5.1	49.2
T069	P43686	26S protease regulatory subunit 6B	5.1	47.4
D170	P35998	26S protease regulatory subunit 7	5.7	48.6
40-058	P62195	26S protease regulatory subunit 8	7.1	45.6
40-059	P62333	26S protease regulatory subunit S10B	7.1	45.6
D082	O75832	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10	5.7	24.4
D126	Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	5.5	42.9
40-066	P42765	3-ketoacyl-CoA thiolase	8.5	42.0
N-11	P25398	40S ribosomal protein S12	6.4	14.4
40-099	P23396	40S ribosomal protein S3	9.7	26.7
HSG092	P08865	40S ribosomal protein SA	4.8	32.9
T077	P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	6.0	53.5
HSG025	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSP60)	5.2	58.0
D109	P05388	60S acidic ribosomal protein P0 (L10E)	5.7	34.3
D094	O95336	6-phosphogluconolactonase (6PGL)	5.7	27.5
HSG088	P11021	78 kD glucose-regulated protein (GRP78)	5.0	70.3
HSG014	P60709	Actin, cytoplasmic 1	5.3	41.7
T076	P61158	Actin-like protein 3	5.6	47.4
T073	O96019	Actin-like protein 6A	5.4	47.5
D124	O95433	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1(AHA1)	5.4	38.3
T028	P49588	Alanyl-tRNA synthetase	5.3	106.8
40-072	P14550	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	6.3	36.6
40-077	P15121	Aldose reductase	6.5	35.9
T024	O43707	Alpha-actinin-4	5.3	104.9
HSG018	P06733	Alpha-enolase	7.0	47.0
D102	P54920	Alpha-soluble NSF attachment protein	5.2	33.2
B150	P04083	Annexin A1	6.6	38.6
HSG303	P07355	Annexin A2	7.6	38.5
D099	P12429	Annexin A3	5.6	36.4
D098	P09525	Annexin A4	5.8	35.9
HSG048	P08758	Annexin A5	4.9	35.8
T086	P08133	Annexin A6	5.4	75.7
HSG304	P00966	Argininosuccinate synthase	8.4	46.4
40-070	P00505	Aspartate aminotransferase	9.0	44.7
40-039	P25705	ATP synthase alpha chain, mitochondrial	8.3	55.2
HSG069	P06576	ATP synthase beta chain, mitochondrial	5.0	51.8
HSG003	P18859	ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial	5.5	9.0
D063	O75947	ATP synthase D chain, mitochondrial	5.2	18.5
40-008	Q92499	ATP-dependent helicase DDX1	5.1	59.5
40-012	O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	6.7	73.2
40-006	P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase	6.9	101.6
N-20	P62158	Calmodulin	4.1	16.7
HSG019	P27797	Calreticulin	4.3	46.5

D026	O43852	Calumenin	4.5	37.1
T071	P10644	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory chain	5.3	43.0
D036	P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory chain	5.0	45.5
40-032	P04040	Catalase	6.9	59.8
HSG050	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	5.0	26.9
40-063	O75390	Citrate synthase	7.0	49.0
D074	O14579	Coatomer epsilon subunit	5.0	34.5
HSG005	P23528	Cofilin-1	8.2	18.5
40-096	Q9NX63	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3	8.5	26.2
40-045	P50454	Collagen-binding protein 2 (HSP47)	8.8	44.5
HSG057	P12277	Creatine kinase B-type	5.3	42.6
HSG160	P10606	Cytochrome c oxidase polypeptide Vb	7.0	10.6
D176	O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH)	6.3	56.7
D135	Q13011	Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase	6.6	36.0
T026	Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	5.3	92.9
40-094	P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	8.2	27.8
HSG312	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	9.1	50.1
D046	P29692	Elongation factor 1-delta	4.9	31.1
40-002	P13639	Elongation factor 2	6.4	95.3
40-055	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	6.3	45.0
D093	P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29	6.8	29.0
B028	P14625	Endoplasmic reticulum protein GRP94	4.7	90.2
HSG170	P30084	Enoyl-CoA hydratase	5.9	28.4
D111	P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	5.0	36.1
40-044	P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	8.7	51.1
D108	Q13347	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	5.4	36.5
N-05	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	5.1	16.7
T020	P15311	Ezrin	6.0	69.3
HSG083	P52907	F-actin capping protein alpha-1 subunit	5.5	32.9
D096	P47756	F-actin capping protein beta subunit	5.4	31.4
40-052	Q16658	Fascin (Singed-like protein)	6.8	54.5
HSG090	Q02790	FK506-binding protein 4	5.4	51.7
HSG039	P15328	Folate receptor alpha	8.1	24.5
HSG309	P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	8.4	39.3
40-061	P07954	Fumarate hydratase	7.0	50.1
N-02	P09382	Galectin-1	5.3	14.6
HSG051	P09104	Gamma-enolase	4.9	47.2
HSG097	P11413	Glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase	6.4	59.1
40-030	P00367	Glutamate dehydrogenase 1	6.7	56.0
P11	P07203	Glutathione peroxidase 1	6.2	21.9
40-090	P09488	Glutathione S-transferase Mu 1	6.3	25.6
D080	P21266	Glutathione S-transferase Mu 3	5.4	26.6
T075	P48637	Glutathione synthetase	5.7	52.4
D136	P78417	Glutathione transferase omega 1 (GSTO 1-1)	6.2	27.6
HSG307	P04406	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, liver	8.6	35.9
D187	P41250	Glycyl-tRNA synthetase	6.6	83.1
40-010	P49915	GMP synthase	6.4	76.7
3B099	P62826	GTP-binding nuclear protein RAN	6.6	24.4
T084	Q9Y2T3	Guanine deaminase	5.4	51.0
HSG043	P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1	7.6	35.1
T057	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1)	5.5	70.1
HSG087	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70)	5.4	70.9
P39	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	4.9	84.5
HSG089	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	5.0	83.2
HSG047	P04792	Heat-shock protein beta-1 (HSP 27)	7.8	22.3

3B083	P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9.3	38.8
40-071	P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	9.3	38.8
HSG073	P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	5.4	45.7
B010	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	5.9	49.2
40-074	P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	5.9	49.2
HSG078	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	5.4	51.0
40-031	P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	6.7	60.2
HSG028	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	9.0	37.4
HSG049	P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	5.1	33.3
N-04	P62805	Histone H4	11.4	11.2
B068	Q09028	Histone-binding protein RBBP4	4.7	47.7
HSG068	Q16576	Histone-binding protein RBBP7	4.9	47.8
HSG071	P50502	HSC70-interactin protein (HIP)	5.2	41.3
D104	Q15181	Inorganic pyrophosphatase (PPase)	5.5	32.7
40-051	P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	6.4	55.8
D127	P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	5.7	36.6
HSG072	Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	5.0	48.1
HSG074	P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	5.3	48.1
HSG313	P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	8.1	60.0
B008	P08729	Keratin, type II cytoskeletal 7	5.4	51.3
HSG026	P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8	5.5	53.5
D085	P78330	L-3-phosphoserine phosphatase (PSP)	5.5	25.0
B086	Q04760	Lactoylglutathione lyase	5.2	20.7
40-009	P02545	Lamin A/C	6.6	74.1
D149	Q14847	LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1)	6.6	29.7
40-084	P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	8.5	36.6
HSG013	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	5.7	36.5
HSG006	P14174	Macrophage migration inhibitory factor	8.2	12.3
HSG302	P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6.9	36.4
HSG091	O60664	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	5.3	47.0
T041	P43243	Matrin 3	5.9	94.6
D075	Q15691	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	5.0	30.0
P01	P60660	Myosin light polypeptide 6	4.6	16.8
D084	O75489	NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit	5.5	26.4
A006	Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	5.7	106.8
40-034	P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	7.0	52.5
HSG015	P06748	Nucleophosmin	4.6	32.6
HSG017	P15531	Nucleoside diphosphate kinase A	5.8	17.1
HSG008	P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	8.5	17.3
D020	P55209	Nucleosome assembly protein 1-like 1	4.4	45.4
D021	Q99733	Nucleosome assembly protein 1-like 4	4.6	42.8
HSG001	P62937	Peptidylprolyl cis-trans isomerase A	7.8	17.9
HSG009	Q06830	Peroxiredoxin-1	8.3	22.1
HSG016	P32119	Peroxiredoxin-2	5.7	21.9
HSG045	P30048	Peroxiredoxin-3	5.8	21.5
D086	Q13162	Peroxiredoxin-4	5.9	30.5
HSG155	P30044	Peroxiredoxin-5	6.8	16.9
D141	P30041	Peroxiredoxin-6	6.0	24.9
40-108	P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein	7.0	21.1
40-014	Q16822	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	6.6	74.1
HSG308	P00558	Phosphoglycerate kinase 1	8.3	44.5
HSG012	P18669	Phosphoglycerate mutase 1	6.8	28.7
40-060	Q9Y617	Phosphoserine aminotransferase	7.6	40.4
T048	P13797	Plastin-3	5.5	70.4
D155	Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	6.7	37.5

HSG315	P11940	Polyadenylate-binding protein 1	9.5	70.7
HSG007	P07737	Profilin 1	8.5	14.9
40-019	O95831	Programmed cell death protein 8	6.9	55.7
HSG084	P35232	Prohibitin	5.6	29.8
HSG318	Q99623	Prohibitin-2	9.6	23.6
D049	P12004	Proliferating cell nuclear antigen	4.6	28.8
D166	Q9UQ80	Proliferation-associated protein 2G4	6.1	43.8
P04	Q15185	Prostaglandin E synthase 3 (p23)	4.8	11.6
HSG055	Q06323	Proteasome activator complex subunit 1	5.8	26.0
D095	Q9UL46	Proteasome activator complex subunit 2	5.4	27.4
D097	P61289	Proteasome activator complex subunit 3	5.7	29.5
D137	P25786	Proteasome subunit alpha type 1	6.0	29.5
40-106	P25787	Proteasome subunit alpha type 2	6.9	25.9
D077	P25788	Proteasome subunit alpha type 3	5.2	28.4
40-093	P25789	Proteasome subunit alpha type 4	7.6	29.5
D058	P28066	Proteasome subunit alpha type 5	4.7	26.5
40-095	O14818	Proteasome subunit alpha type 7	8.6	27.9
40-105	P49721	Proteasome subunit beta type 2	6.5	22.8
HSG044	P49720	Proteasome subunit beta type 3	6.1	22.9
D081	P28070	Proteasome subunit beta type 4	5.7	29.2
D061	P28072	Proteasome subunit beta type 6	4.8	25.4
40-102	Q9Y224	Protein C14orf166	6.2	28.1
D008	P07237	Protein disulfide isomerase	4.7	55.3
HSG041	P30101	Protein disulfide isomerase A3	5.6	54.3
P29	Q15084	Protein disulfide isomerase A6	5.0	46.2
P17	Q9H4I3	Protein PP2447	8.2	42.3
HSG163	P08206	Protein S100-A10	7.3	11.1
40-088	P00491	Purine nucleoside phosphorylase	6.5	32.1
D110	O00764	Pyridoxine kinase	5.7	35.1
HSG082	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	5.4	35.9
HSG305	P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	8.0	57.8
D168	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	6.1	50.7
B070	Q15293	Reticulocalbin 1	4.9	38.9
D022	Q14257	Reticulocalbin 2	4.3	36.9
40-007	P23921	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	6.8	90.1
T074	Q9Y230	RuvB-like 2	5.5	51.2
P33	Q15019	Septin 2	6.2	41.5
40-041	P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	8.2	52.6
T058	P02787	Serotransferrin	6.7	75.2
D117	Q99962	SH3-containing GRB2-like protein 2	5.3	40.0
D153	Q9NR45	Sialic acid synthase	6.3	40.3
HSG034	P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	8.3	10.0
HSG158	Q04837	Single strand DNA-binding protein	8.2	15.2
N-06	P16949	Stathmin	5.8	17.2
B050	P38646	Stress-70 protein (GRP75)	5.5	68.9
HSG098	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1(HOP)	6.4	62.6
HSG095	P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	6.0	52.1
N-07	P00441	Super oxide dismutase [Cu-Zn]	5.7	15.8
40-107	P04179	Superoxide dismutase [Mn]	6.9	22.2
HSG093	P78371	T-complex protein 1, beta subunit	6.0	57.5
40-038	P50991	T-complex protein 1, delta subunit	7.5	57.8
HSG077	P48643	T-complex protein 1, epsilon subunit	5.5	59.7
40-033	Q99832	T-complex protein 1, eta subunit	7.6	59.4
HSG094	P49368	T-complex protein 1, gamma subunit	6.2	60.3
40-025	P40227	T-complex protein 1, zeta subunit	6.2	58.0

HSG036	P10599	Thioredoxin	5.8	21.5
B023	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase)	5.1	89.3
40-017	P29401	Transketolase	7.6	67.9
D060	P13693	Translationally controlled tumor protein (TCTP)	4.8	19.6
HSG011	P60174	Triosephosphate isomerase	6.5	26.5
HSG030	P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	4.8	29.0
D050	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	4.7	28.5
D182	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase	5.8	53.2
D006	P68363	Tubulin alpha-ubiquitous chain	4.9	50.2
HSG020	P07437	Tubulin beta-2 chain	4.8	49.7
HSG066	P68371	Tubulin beta-2C chain	4.8	49.8
P27	Q13509	Tubulin beta-3 chain	4.8	50.4
P08	O43399	Tumor protein D54	5.3	22.2
T085	P31930	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I	5.4	49.1
HSG151	P62988	Ubiquitin	6.6	8.6
T027	P22314	Ubiquitin-activating enzyme E1	5.6	117.8
N-10	Q969H8	Uncharacterized protein C19orf10	6.2	18.8
40-020	P49748	Very-long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	7.7	66.2
T037	P08670	Vimentin	5.1	53.5
B036	P18206	Vinculin	5.8	116.6
40-085	P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	8.6	30.6
40-080	P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	6.3	18.1

---

表2 タンパク質の翻訳後修飾の解析 -アミノ末端について

No.	Protein Name	N-treminus	m/z submitted	MH <sup>+</sup> Matched	Sequence	Swiss-Prot
D094	6-phosphogluconolactonase (6PGL)*	Ac-Ala	2,794.80	2,794.51	(-)AAPAPGLISVFSSSQELGAALQLVAQR(A)	Met**
D124	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1(AHA1)*	Ac-Ala	1,057.46	1,057.51	(-)AKWGEEDPR(W)	Met**
D099	Annexin A3	Ac-Ala	967.48	967.51	(-)ASIWVGH(R)(G)	Ala
D036	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory chain*	Ac-Ser	2,505.21	2,505.37	(-)SHIQIPGLTELLQGYTVEVLR(Q)	Ac-Ser (Probable)
40-53	Fascin	Met	2,351.12	2,351.15	(-)MTANGTAEAVQIQFGLINCGNK (Y)	Ac-Thr (Probable)
HSG097	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Ac-Ala	915.51	915.49	(-)AEQVALSR(T)	Ac-Ala
	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Met	1,956.96	1,957.01	(-)MAEQVALSRTHVCGILR(E)	Ac-Ala
D080	Glutathione S-transferase Mu 3	Ac-Ser	1,758.77	1,758.78	(-)SCESSMVLGYWDIR(G)	Ser
HSG083	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Ac-Ser	1,556.82	1,556.79	(-)SKSESPKEPEQLR(K)	Ac-Ser (Similarity)
D118	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2*	Ac-Ala	1,244.55	1,244.62	(-)ASNVTNKTDPR(S)	Met**
HSG068	Histone-binding protein RBBP7*	Ac-Ala	1,628.74	1,628.71	(-)ASKEMFEDTVEER(V)	Met**
D104	Inorganic pyrophosphatase (PPase)*	Ac-Ser	954.44	954.42	(-)SGFSTEER(A)	Met**
HSG313	Keratin, type II cytoskeletal 6A	Ac-Ala	878.43	878.46	(-)ASTSTTIR(S)	Ala (By similarity)
B008	Keratin, type II cytoskeletal 7	Ac-Ser	1,406.70	1,406.71	(-)SIHFSSPVFTSR(S)	Ser
B086	Lactoylglutathione lyase*	Ac-Ala	2,831.48	2,831.24	(-)AEPQPPSGGLTDEAALSCSDADPSTK(D)	Ala (Probable)
HSG091	Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1*	Ac-Ser	2,813.28	2,813.31	(-)SADGAEADGSTQVTVEEPVQQPSVVDR(V)	Met**
HSG001	Peptidylprolyl cis-trans isomerase A	Ac-Val	1,988.06	1,988.01	(-)VNPTVFFDIAVDGEPLGR(V)	Ac-Val (partial)
HSG002	Peptidylprolyl cis-trans isomerase A	Val	1,946.05	1,946.00	(-)VNPTVFFDIAVDGEPLGR(V)	Ac-Val (partial)
D091	Proteasome activator complex subunit 1*	Ac-Ala	1,383.61	1,383.74	(-)JAMLRVQPEAQAK(V)	Met**
HSG077	T-complex protein 1, epsilon subunit*	Ac-Ala	2,171.23	2,171.12	(-)JASMGTLAFDEYGRPFLLIK(D)	Met**
T013	Triosephosphate isomerase	Ac-Ala	1,993.99	1,994.02	(-)APSRKFFVGGNWKMNDR(K)	Ala

Ac: アセチル基

\*: 新規あるいは実験でN末端が確認されたタンパク質

\*\* : N末端の記述がないものは、N末端をMetとしている。