

リン酸化プロテオーム解析による生薬・漢方薬エキスの生物活性評価

申請代表者 石濱 泰 京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野 教授
所外共同研究者 杉山 直幸 慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任講師
所内共同研究者 櫻井 宏明 病態制御部門 病態生化学分野 准教授
(現 大学院医学薬学研究部(薬学)がん細胞生物学 教授)

【報告セミナー要旨】

プロテインキナーゼやホスファターゼによるタンパク質の可逆的リン酸化は多くの生命現象に関与しており、特に細胞内シグナル伝達において非常に重要な役割を果たしている。近年、質量分析計の改良やリン酸化タンパク質/ペプチドの濃縮技術の開発によって、生体内で起こるタンパク質のリン酸化を大規模に解析するリン酸化プロテオーム解析が様々な研究に用いられるようになった。また、安定同位体標識を用いた定量解析と組み合わせることで、時間・空間的な細胞内シグナル伝達の変動を俯瞰的に捉えることが可能になった。我々はこれまでに、リン酸化プロテオーム解析のための高選択的リン酸化ペプチド濃縮法（ヒドロキシ酸修飾酸化金属クロマトグラフィー法：HAMMOC法）を開発しており、細胞や組織からの粗抽出物に対して前分画なしでリン酸化プロテオーム解析を行う方法を確立し、ヒトタンパク質においては90,000箇所以上のリン酸化部位に関する情報をデータベースとして蓄積している。本研究ではこのリン酸化プロテオーム解析技術を漢方薬の評価やその生理機能解明に応用することを目的とし、生薬や漢方エキスの投与が細胞内のシグナル伝達に及ぼす影響を解析した。

評価対象として、漢方方剤の一つである十全大補湯と、その構成生薬10種を用いた。安定同位体標識アミノ酸存在下で培養したHeLa細胞に対し、各生薬による刺激処理を行い、細胞を回収した。分画した細胞質と核から抽出したタンパク質混合物を酵素消化した後に、前述のHAMMOC法を用いてリン酸化ペプチドを濃縮した。最終的に、nano-LC-MS測定によって各試料中に含まれるリン酸化ペプチドの同定と定量解析を行った。

リン酸化プロテオーム解析の結果、計4,358箇所のリン酸化部位が同定された。その内、各生薬エキス処理によりリン酸化の有意な亢進が観測された部位は平均して約90部位であった。中でも、桂皮エキスによる刺激により最も顕著な変動が観測された。また、得られたリン酸化プロテオーム解析のデータを用いてクラスター解析を行い、各生薬がシグナル伝達に及ぼす効果の類似性についても調べたのであわせて報告する。

■背景・目的

シグナル伝達研究の進展により、細胞内で起こる様々な生命現象が分子レベルで理解されるようになってきた。特に、リン酸化を代表とするタンパク質の翻訳後修飾が、細胞機能の発現に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになっている。近年、質量分析計(MS)の開発とリン酸化ペプチドの濃縮法の改良により、大規模なリン酸化プロテオーム解析を行うことが可能になった。我々は、HAMMOC (hydroxy acid-modified metal oxide chromatography) 法の開発により、世界で初めて

細胞抽出液から前分画なしに直接数千個のリン酸化ペプチドを同定することに成功し、現在までに9万個以上のヒトタンパク質リン酸化部位を同定している。また、SILAC (stable isotope labeling by amino acids) 法などの安定同位体標識定量法と組み合わせ、細胞内のシグナル伝達の変動をリン酸化ペプチドの定量解析により網羅的に観察することが可能となっている。本法は、シグナル伝達の網羅的な解析に広く応用性があり、我々は種々の生化学的な解析に加えて、がん分子標的薬として臨床応用されているチロシンキナーゼ阻害剤の効果などについて報告してきた。

生薬・漢方薬は非常に多くの化合物が含まれた複合薬物であるため、特定の薬理活性による品質評価は難しく、日本薬局方には主要含有成分量を指標とした品質評価法が記載されている。また、生物活性に関する報告も限られているのが現状である。最近、いわゆるオミクス研究から得られるデータを統合的に解析することが、生薬・漢方薬の複雑系を解き明かす一つの方法論として期待されている。

そこで、本研究では我々が開発したHAMMOC法によるリン酸化プロテオーム技術を、生薬・漢方薬の生物活性の解析に応用する。得られた結果は、生薬・漢方薬が持つ生物活性の解明に向けた基礎的な情報として極めて有用であると考えられることから、将来的に和漢薬データベース上で公開することができれば和漢医薬学研究的発展に貢献できるものと期待される。

■結果・考察

本研究では、漢方方剤の十全大補湯の作用に注目した。10種類の構成生薬および十全大補湯エキスを、ヒト子宮頸がん細胞株HeLaに添加し、リン酸化プロテオームパターンの変化を解析した。まず、構成生薬の一つである桂皮エキスを用いたパイロット試験を実施し、その後十全大補湯およびその構成生薬へと解析を進めた。以下、(1)リン酸化プロテオミクスのプロトコール、(2)桂皮エキスを用いたパイロット試験、(3)十全大補湯構成生薬の効果について記載する。

(1) リン酸化プロテオミクス解析のプロトコール

¹³C, ¹⁵Nを含むArg, ²Hを含むLysを加えた培地にてHeLa細胞を1週間培養し、in vivoにて安定同位体標識を行った。標識した細胞に対し生薬エキスを10-30分作用させた後に回収し、反応をさせていない非標識のHeLa細胞と等量混合した後、核と細胞質に分画してタンパク質を抽出した。Lys-Cおよびトリプシンでタンパク質を消化し、チタニアチップを用いたHAMMOC法により、リン酸化ペプチドを特異的に濃縮し、LC-MS/MS分析を行った。UniProtデータベースを用いて得られたデータからリン酸化タンパク質を同定し、MassNavigatorを用いて定量解析を行った。尚、用いた生薬エキスは、以下に示すとおりであり、すべて株式会社ツムラより提供を受けた。黄耆 (オウギ)、甘草 (カンゾウ)、桂皮 (ケイヒ)、地黄 (ジオウ)、芍薬 (シヤクヤク)、川芎 (センキュウ)、当帰 (トウキ)、人參 (ニンジン)、蒼朮 (ソウジュツ)、茯苓 (ブクリョウ)、および十全大補湯。

(2) 桂皮エキスを用いたパイロット試験

リン酸化プロテオミクス解析を実施するに当たり、培養細胞に生薬エキスを添加した後、どれくらいの時間インキュベートすれば良いのかを判断する目的で、桂皮エキスを用いて予備的な検討を行った。HeLa細胞に桂皮エキス(100および1 μg/ml)を0, 10, 20, 30分添加し、リン酸化チロシン抗体 (PY-20) を用いたウェスタンブロット解析を行った結果、100 μg/mlでリン酸化パターンの変化が認められた (結果省略)。そこで、細胞抽出液を用いてリン酸化プロテオミクスのパイロット試

験を実施したところ、1,300程度のリン酸化ペプチド数が検出できた。次に、検出するペプチド数をできる限り多くするため、細胞質と核に分画して実験を行うことにした。細胞を桂皮エキスで処理する時間を10分間で検討した結果、桂皮処理でリン酸化ペプチド数が細胞質画分から967個、各核画分から1,038個、計2,005個見出された。また、ポジティブコントロールとして用いたTNF- α とEGFによって、代表的なリン酸化タンパク質としてそれぞれERKおよびSOSのリン酸化が確認された。以上の結果より、細胞質と核に分画するプロトコルを採用し、各生薬エキスの効果を検討することにした。

(3) 十全大補湯構成生薬の効果

パイロット試験により設定した実験条件を用いて、十全大補湯の構成生薬の効果を検討した。各エキスの添加時間は30分とした。検出されたリン酸化ペプチドの数は、桂皮エキスの場合には細胞質画分が1,547個、核画分が1,540個、計3,087個であった。これらデータの解析を進めた結果、各生薬エキス添加によってリン酸化が2倍以上変動したペプチドの数を図1にまとめた。各生薬エキスにより20-100個程度のリン酸化ペプチドが変動しており、その数は細胞質画分の方が核画分よりも多く検出できた。桂皮や地黄は比較的多くのリン酸化の変動が認められたのに対して、茯苓、芍薬および川芎ではリン酸化の変動は少なかった。また、意外にも十全大補湯によって変動するものが少なかった。これは、処方として10種の生薬を調合した結果、生薬成分の相互作用により活性も調和されていることを示しているのかもしれない。あるいは、十全大補湯では各生薬を一定の割合で混ぜているため、エキスの単位重量当たりにも占める各エキス成分の量が少なくなっているため、リン酸化の変動も減弱した可能性も考えられる。参考として、各エキスによってリン酸化が誘導されたペプチドについて、細胞質および核画分で誘導率がそれぞれ上位10種を図1に示した。これら11種のエキスの結果を合計すると、のべ4,358個のリン酸化ペプチドを検出した。

| |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|--|---|---|---|
| | オウギ | ケイヒ | トウキ | シヤクヤク | センキユウ | ジオウ | ニンジン | カンゾウ | ソウジユツ | ブクリヨウ | 十全大補湯 |
| Nuc | 39 | 24 | 26 | 19 | 25 | 30 | 29 | 29 | 25 | 16 | 27 |
| Cyto | 43 | 122 | 50 | 51 | 40 | 100 | 43 | 43 | 62 | 16 | 18 |
| Total | 73 | 128 | 64 | 44 | 49 | 106 | 59 | 63 | 72 | 25 | 35 |

Total : 4358 peptides

図1. 生薬エキスによってリン酸化が誘導されたペプチドの数

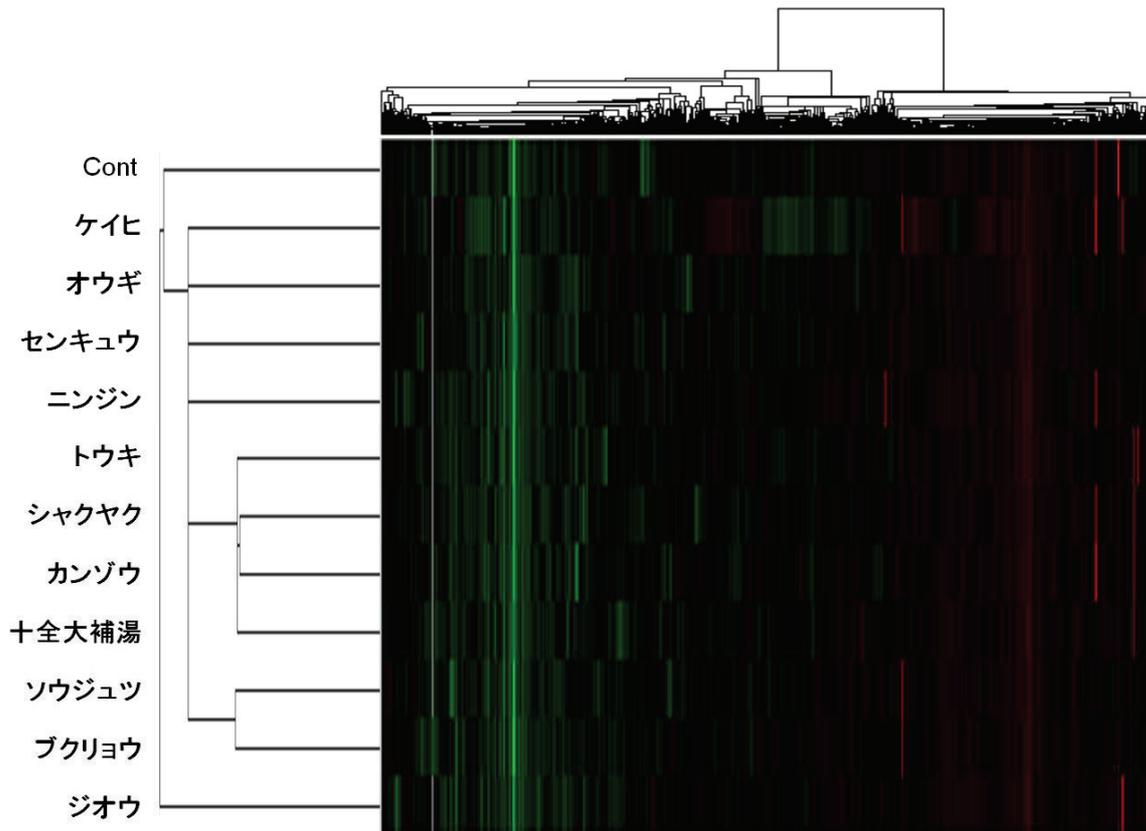


図2. リン酸化ペプチド情報によるクラスター解析

次に、検出したペプチドの情報を基にクラスター解析を行い、図2に示すような結果を得た。甘草、芍薬および当帰が十全大補湯とクラスターを形成した。また、桂皮、黄耆、川芎と人参、さらに蒼朮と茯苓も同じクラスターを形成したが、地黄とクラスターを形成する生薬はなかった。したがって、十全大補湯の効果には甘草、芍薬および当帰が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

■結論

ヒトがん細胞株に生薬エキスを添加することにより起こる細胞応答を理解することは、生薬および漢方方剤がどのような薬理作用を持っているのかを理解する基本情報として極めて重要なものとなると考えられる。特に、タンパク質リン酸化は細胞機能の制御には極めて重要な役割を果たしていることから、生薬エキスの効果を解析して得られる情報は、極めて利用価値の高いものとなると期待される。

今回、我々は独自に開発したHAMMMOC法を応用し、生薬エキスの効果を解析した結果、10個の生薬と1方剤、計11種のエキスによってリン酸化ペプチドをのべ4,358個見出した。これまでに知られていない新しい生薬エキスの生物活性としてこれだけ多くの情報が一度に得られたことから、リン酸化プロテオミクスが強力な解析法であると言える。リン酸化レベルが変動しなかったという情報も、生薬の生物活性を理解するためには重要である。しかしながら、再現性が確認できるかなど、得られた情報の信頼性を検証することも今後必要となってくると思われる。また、変動率が2倍程度のもが多く見つかっているのが現状であり、リン酸化の変動をウェスタンブロットなどの生化学的な手法でも検証する必要があると思われる。今回報告した実験以外にも、我々はすでに11種のエキス

の効果に関する実験を2回実施しており、再現性が確認できるのかについてデータ解析を進めていく予定にしている。

以上のように、今回の我々の研究はまだまだ改善すべきところが多く残されてはいるものの、生薬・漢方薬研究には大きなインパクトを与えることができる可能性を秘めており、本拠点でご支援いただいた共同研究を今後も継続していきたいと考えている。