

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology
Transfer: Development of Advanced Measurement and Analysis Systems

研究開発課題名： (日本語) キノームの活性プロファイル法と制御技術の開発
(英語) Development of the method for profiling and regulation of kinome
activities

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院薬学研究科 教授 石濱 泰
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Professor, Yasushi Ishihama

実施期間： 平成 25年 9月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) *in vitro* キナーゼ阻害薬スクリーニングシステムの開発
開発課題名： (英語) Development of *in vitro* screening system for kinase inhibitors

研究開発分担者 (日本語) カルナバイオサイエンス株式会社、研究開発本部リサーチフェロー 桐井
康行
所属 役職 氏名： (英語) Carna Biosciences, Inc., Department of Research and Development,
Research Fellow, Yasuyuki Kirii

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

本プロジェクトでは、ヒトキノームの活性を大規模計測する技術を開発することを目指し、最終的に400種以上のキナーゼについて、特異的かつ高感度な基質ペプチド（“最強“基質ペプチド）を創出し、さらに細胞内に効率よく導入する方法を確立することにより、細胞内キノーム（キナーゼの総体）の活性計測法やシグナル制御技術の開発へと展開することを目標とした。これにより、分子標的創薬や個別化治療・診療を強力に推進する。

キナーゼ基質探索用キナーゼ組換え体は、昆虫細胞を用いた発現系を用いて合成し、基質既知のものについてはモビリティシフトアッセイを用いてリン酸化活性を評価した（カルナバイオサイエンス株式会社、桐井グループ）。計371種の野生型および28種の変異型のキナーゼ活性体調製を終えており、計画目標である400種をほぼ達成した。次に調製したキナーゼ活性体を用いて、培養細胞から抽出したタンパク質混合試料に対して *in vitro* 反応試験を行い、リン酸化されたタンパク質をLC-MSで解析することによって、各キナーゼの *in vitro* 基質を同定した（京都大学、石濱グループ）。市販のキナーゼも含めて433種類のキナーゼについて、180,000以上のキナーゼ・基質間情報を取得し、リン酸化モチーフを抽出した。取得した *in vitro* 基質情報をもとに、キナーゼ特異的基質ペプチドの設計を行った（京大、杉山グループ）。各キナーゼの基質リン酸化部位周辺のけるコンセンサス配列および、position weight matrix(PWM)を用いた基質モデルから、人工基質ペプチドのキナーゼ選択性を *in silico* で予測し、実際に合成ペプチドを用いた *in vitro* 試験によって評価した結果、予測結果と高い一致を示した。また、基質ペプチドのリン酸化率が、PWMとの一致度を示すスコアと相関がある事から、感度についても予測が可能であることが分かった。十分な基質数が得られている210個のセリン・スレオニンキナーゼおよび78個のチロシンキナーゼを対象とした基質ペプチドの設計および合成を完了した。創出した基質ペプチドの一部を既存の基質ペプチドと比較した結果、高いキナーゼ選択性を有していることから既存技術との差別化が可能である。

開発した基質ペプチドを用いて細胞破碎物中のキナーゼ活性を *in vitro* で計測した（京大、石濱グループ、杉山グループ）。リン酸化された基質ペプチドをLC-MSで定量して、直線性、再現性、感度を評価した結果、いずれにおいても高い数値が示された。選択性に関しては、既知量の組換え体キナーゼを細胞破碎物に添加した試料の計測により評価したところ、基質ペプチドのリン酸化が対象とする組換え体キナーゼの添加によってのみ亢進することを確認した。一部の基質ペプチドについては、反応中に内在性プロテアーゼによる分解が確認されたが、ペプチド両末端の保護により回収率が向上した。また、MAPK阻害薬処理した細胞について、同様にキナーゼ活性を計測した結果、各MAPK阻害薬特有のキナーゼ活性変動をプロファイルすることに成功した。この事から、本活性計測法はキナーゼ阻害薬スクリーニング法としても有用であることが示された。また、細胞中のキナーゼ活性を *in vivo* で直接計測する方法として、基質ペプチドを細胞内に高濃度で導入する手法、条件を開発し（京大、二木グループ）、細胞内での反応後、リン酸化ペプチドを抽出し計測した結果、基質ペプチドのリン酸化が確認できた。細胞刺激によるシグナルの変動も観測されており、当手法による *in vivo* でのキナーゼ活性計測も可能であることが分かった（京大、石濱グループ）。

We developed the technologies for direct monitoring of human kinome activities at a large scale in this program to facilitate a molecular target drug discovery and a personalized medicine. We designed kinase-specific substrate peptides based on the *in vitro* kinase-substrate relationships

and developed a method for monitoring of kinase activities *in vitro* and *in vivo*.

To design the kinase-specific substrate peptides for each kinase, about 400 recombinant human kinases were prepared by using an insect cell expression system (Carna Biosciences, Inc, Kirii group), and then *in vitro* reactions of recombinant human kinases in crude cell extracts were individually performed (Kyoto University, Ishihama group). The phosphorylated substrates were identified with quantitative phosphoproteomics approach based on hydroxy acid-modified metal oxide chromatography and nanoLC-MS/MS. We profiled 433 kinds of wild-type human kinases by using *in vitro* kinase assay, and then more than 180,000 kinase-substrate relationships were identified. Based on the kinase-substrate relationships, about 1,500 phosphorylation motifs were extracted and position weight matrixes (PWMs) were calculated for each kinase. Using a scoring algorithm with the information, artificial kinase-specific substrate peptides targeting for 210 serine/threonine kinases and 78 tyrosine kinases were designed and synthesized (Kyoto University, Sugiyama group). *In vitro* kinase assay using the synthetic substrate peptides and a recombinant kinase showed most of the designed substrate peptides were exclusively or highly-selectively phosphorylated with a specific kinase as shown in the *in silico* prediction. The similarity score to PWM showed a high correlation with phosphorylation stoichiometry of the substrates. It suggested that sensitivity is also predictable with the scoring. Furthermore the designed kinase-specific substrate peptides showed higher specificities compared to well-known substrate peptides.

Using the synthetic kinase-specific substrate peptides, activities of protein kinases in a crude extract of HeLa cell were measured *in vitro*. Phosphorylated substrate peptides were quantified with nanoLC-MS/MS (Kyoto University, Ishihama and Sugiyama groups). The kinase activities were able to be measured with a high linearity, reproducibility and sensitivity. Spiking recovery test revealed some substrate peptides showed low recovery due to a degradation by endogenous proteases. Modification at N and C terminus of the substrate peptides improved the sensitivity of measurement of kinase activity. The assay system was successfully applied to profiling of kinase inhibitors. We also developed and optimized a method for cytosolic delivery of the substrate peptides (Kyoto University, Futaki group) to monitor kinase activities *in vivo*. After *in vivo* reaction, substrate peptides were extracted and measured in the same manner as the *in vitro* assay, we found the peptides were phosphorylated with an endogenous kinases (Kyoto University, Ishihama group). The phosphorylation level of the substrate peptides were increased by cell stimulation. It showed kinase activity is able to be monitored *in vivo* using the cytosolic delivery of the substrate peptides.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 7 件）.

1. Wagih O, Sugiyama N, Ishihama Y, Beltrao P. Uncovering Phosphorylation-Based Specificities through Functional Interaction Networks. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Jan;15(1):236-45.
2. Sugiyama N, Ishihama Y. Large-scale profiling of protein kinases for cellular signaling studies by mass spectrometry and other techniques. *J Pharm Biomed Anal*. 2016 Oct 25;130:264-272.
3. Imamura H, Wagih O, Niinae T, Sugiyama N, Beltrao P, Ishihama Y. Identifications of Putative PKA Substrates with Quantitative Phosphoproteomics and Primary-Sequence-Based Scoring. *J Proteome Res*. 2017 Apr 7;16(4):1825-1830.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 細胞膜透過性キナーゼ基質ペプチドを用いた細胞内キノーム活性計測(ポスター), 石川菜津美・坂本大・Pasrawin Taechawattananant・若林真樹・杉山直幸・石濱泰, 第64回質量分析総合討論会, 2016/05/20, 国内
2. Prediction of protein kinase substrates using primary sequence preference and quantitative phosphoproteomics (ポスター), Haruna Imamura, Pasrawin Taechawattananant, Omar Wagih, Naoyuki Sugiyama, Pedro Beltrao and Yasushi Ishihama, 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2016/06/07, 国外
3. High Resolution Shotgun Proteomics for Kinome Profiling (口頭), Yasushi Ishihama, HPLC2016: 44th international symposium on high performance liquid phase separations and related techniques, 2016/06/22, 国外
4. キナーゼ特異性を有する人工基質ペプチドを用いたヒトキノーム活性プロファイリング(口頭), 坂本 大、石川菜津美、Pasrawin Taechawattananant、若林真樹、杉山直幸、石濱 泰, 日本プロテオーム学会2016年大会, 2016/07/28, 国内
5. 細胞内リン酸化プロテオームプロファイルからキノーム活性を予測する Prediction of cellular kinome activity using phosphoproteome profiles(口頭), Chisato Takahashi, Haruna Imamura, Tatsuya Yazaki, Masaki Wakabayashi, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, JPrOS2016年大会, 2016/07/28, 国内
6. Quantitative phosphoproteomics approach for kinase-mediated protein phosphorylation stoichiometry (口頭), Pasrawin Taechawattananant、坂本 大、若林真樹、杉山直幸、石濱 泰, JPros2016大会, 2016/07/28-29, 国内
7. データベース構築とキナーゼ基質予測を用いた大規模発現/翻訳語修飾プロテオーム解析(口頭), 杉山直幸、三宅里美、坂本 大、Pasrawin Taechawattananant、若林真樹、石濱 泰, JPros2016大会, 2016/07/29, 国内
8. ヒトキノームの基質特異性および活性プロファイリング(口頭), 杉山直幸、坂本 大、今村春菜、Pasrawin Taechawattananant、石川奈津美、若林真樹、石濱 泰, BMAS2016, 2016/09/03, 国内

9. Profiling of kinase substrates using in vitro phosphorylation stoichiometry (ポスター), Pasrawin Taechawattananant, 坂本 大、若林真樹、杉山直幸、石濱 泰, BMAS2016, 2016/09/03, 国内
10. リン酸化プロテオミクスを用いたプロテインキナーゼの構造と基質選択性の相関(ポスター), 敷田奈都紀、佐藤綾香、若林真樹、杉山直幸、石濱泰, BMAS2016, 2016/09/03, 国内
11. キナーゼ収斂型リン酸化プロテオミクスを用いたシグナルネットワーク解析と分子標的創薬(口頭), 石濱泰, 第31回京都がん研究会, 2016/09/16, 国内
12. Profiling Kinome Activities Using Kinase-Specific Substrate Peptides (口頭), Naoyuki Sugiyama, Dai Sakamoto, Haruna Imamura, Pasrawin Taechawattananant, Natsumi Ishikawa, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, HUPO2016, 2016/09/19, 国外
13. Phosphoproteomics-based prediction of cellular protein kinome profiles (ポスター), Chisato Takahashi, Haruna Imamura, Tatsuya Yazaki, Masaki Wakabayashi, Naoyuki Sugiyama, Yasushi Ishihama, 15th Human Proteome Organization World Congress in 2016 (HUPO 2016), 2016/09/19, 国外
14. Kinase-centric pharmacoproteomics for molecular-targeting drug discovery (口頭), Yasushi Ishihama, HUPO2016, 2016/09/21, 国外
15. キナーゼ収斂型リン酸化プロテオミクスによるシグナルネットワーク解析(口頭), 石濱 泰, 第89回日本生化学会大会, 2016/09/27, 国内
16. キノーム活性計測に向けたキナーゼ特異的人工基質ペプチドライブラリの創出(ポスター), 坂本 大、石川菜津美、Pasrawin Taechawattananant、若林真樹、杉山直幸、石濱 泰, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内
17. プロテインキナーゼのリン酸化修飾は基質選択性を制御する(ポスター), 敷田奈都紀、佐藤綾香、若林真樹、杉山直幸、石濱泰, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 国内
18. 分離分析の最新技術—high resolution LC-MS/MSをもちいたプロテオーム解析(口頭), 石濱 泰, 日本農芸化学会2017年度大会, 2017/03/18, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願