

翻訳後修飾による動的調節機構研究チーム

Posttranslational Modification and Dynamic Regulation Research Team

チームリーダー 谷口 寿章
TANIGUCHI, Hisaaki

当研究チームでは、質量分析を中心としたプロテオーム解析の技術開発とその情報伝達系の網羅的解析への応用を主な研究対象としている。この目的のために、播磨研究所に最新鋭の質量分析計やロボットなどを導入し、大規模なプロテオミクス・ファシリティを確立している。これを用いて、様々な微生物をはじめとし、ヒトに至るまでの様々な生物種の発現プロファイリングを行い、さらに細胞内小器官（オルガネラ）プロテオーム解析により細胞の内部構造を解剖することで、タンパク質局在と輸送機構の研究も目指している。またリン酸化や脂質修飾などタンパク質の翻訳後修飾を網羅的に解析することで、シグナル伝達ネットワークを網羅的に明らかにすることが重要な目標である。本年度はこの中で、病原性大腸菌のプロテオーム解析や脂質修飾が関与したタンパク質複合体の立体構造解析を行った。

1. 質量分析を基盤としたプロテオミクス技術の開発とその応用（松崎，石野，岡田，鍋師，谷口，山内*，日吉*，石堂*）

近年タンパク質など生体高分子に応用可能な質量分析法が急速に歩を進め、特に超微量タンパク質のアミノ酸配列や翻訳後修飾などの構造解析に威力を発揮するようになった。高感度に、しかも多数の試料を同時に解析できることから、細胞に含まれる全てのタンパク質を解析対象とするような、いわゆるプロテオーム解析、プロテオミクスが現実のものとなりつつある。当研究チームでは、既に、質量分析法を基盤としたプロテオーム解析を推進するために、それぞれの目的に応じた解析を行うための様々な質量分析計やその支援システムを導入し、試料調製から質量測定、解析、データベース検索に至るまでの解析過程を自動化したプロテオミクス・ファシリティを確立した。本年度は、これらのファシリティを用いて、様々な生物種のプロテオーム解析、なかでも、枯草菌と光合成細菌である藍藻の解析を継続すると同時に、病原性大腸菌の分泌タンパク質の解析を行った。これらにおいて、異なる培養条件における発現変化を解析した。特に藍藻においては、光強度を変えて培養した細胞から試料を調製し、光合成系タンパク質などの発現の変化を見いだした。質量分析のデータを用いることで従来の二次元ゲル電気泳動を用いる方法では不可能であった、およそ千種類を超えるタンパク質の量的変動を解析することに成功した。病原性大腸菌に関しては O157 の分泌するタンパク質を解析するために、様々な輸送系タンパク質の変異体を駆逐することで、菌体の破損により漏れ出てくるタンパク質との区別を明確にすることに成功した。

また、質量分析により得られるタンパク質の構造情報を直接ゲノム配列にマップする技術を様々な微生物に関して応用し、この手法が、ゲノム配列のシーケンズの精度、遺伝子予測の精度、の両方に寄与することを明らかにした。特に枯草菌とパイロコッカスにおけるプロテオームデータのゲノム配列へのマッピングは、多くの新規遺伝子、特に短

い新規遺伝子の発見に結びついた。この手法を用いて様々な培養条件において培養した枯草菌のプロテオーム解析を行い、既知の ORF の半数以上のタンパク質を同定することに成功した。これらのデータを枯草菌のゲノム配列に直接マッピングすることで、新規遺伝子を見いだすと同時に、タンパク質の開始コドンの同定ミスや C 末端のシークエンスミスなどを見いだした。これらはプロテオミクスによるゲノム解析への有用なフィードバックであると考えられた。

2. プロテオミクスによるシグナル伝達ネットワークの網羅的解析（谷口，小西，岡田，松崎，山内*，小畑*，藤原*）

タンパク質の生理機能は、その発現量による調節以外に、タンパク質リン酸化など翻訳後修飾により動的に調節されている。従って、個々のタンパク質の発現量以外に、それぞれのタンパク質の修飾と、その生理機能に及ぼす影響を詳細に解析する必要がある。このために、当研究チームでは三連四重極型質量分析計の特性を生かしたタンパク質リン酸化の解析法を確立した。この手法を用いて、成長因子などにより刺激した細胞から、特異的抗体を用いて個々のタンパク質を単離し、そのリン酸化部位の詳細な解析をすることが可能となった。既に昨年度において EGF 受容体の下流においてチロシンリン酸化されるタンパク質を明らかにした。その中にはシグナル伝達系タンパク質や細胞骨格系タンパク質が多数含まれ、今まで EFG 受容体関連のシグナル伝達系とは無関係とされていたタンパク質も多く含まれていた。本年度はこれらのタンパク質のリン酸化部位の詳細な解析を行うためにこれらタンパク質をタグ付きで動物細胞に発現させ、タグに対する抗体を用いて単離するシステムを構築した。これまでに、およそ 50 種類のタンパク質の発現ベクターを構築し、それらのタンパク質を動物細胞において EGF 受容体を共発現させ、細胞内において EGF 受容体刺激によりリン酸化された試料を作成することに成功した。現在これらのタンパク質について質量分

析を用いたリン酸化部位の詳細な解析を進めている。また、神経の興奮伝達に主要な役割を果たしている PSD (後シナプス肥厚部) の構成タンパク質を解析し、これらについて特異的抗体の作成を進めているが、これらに関してもおよそ 50 種類のタンパク質に関して特異的抗体を得ることに成功し、抗体を用いた細胞免疫染色による細胞内局在の解析、組織内分布、免疫沈降により共沈してくる相互作用タンパク質の解析を進めている。その中で、数種類の機能未知新規タンパク質に関して、PSD への局在の確認、相互作用タンパク質の解析に成功した。

3. 立体構造解析によるタンパク質間相互作用の解析 (谷口, 山内*, 藤原*, 池田*)

情報伝達系のタンパク質、がん遺伝子、ウイルスタンパク質などはしばしば脂質により修飾され、これらのタンパク質の機能発現に脂質修飾は必須である。脂質修飾は、これらタンパク質の可逆的膜結合、他のタンパク質との相互作用に関与していると考えられてきたが、その具体的な作用機構は未だ不明である。我々は、プロテインキナーゼ C の主要基質タンパク質 MARCKS のミリスチル化が、MARCKS の可逆的膜結合に関与していることを明らかにしてきた。本年度は、MARCKS ファミリーに属し、同様にミリスチル化を受けている神経特異的リン酸化タンパク質 NAP22 の N 末端のミリスチル基と、カルモジュリンの複合体の結晶解析を行い、立体構造を明らかにした。タンパク質間相互作用に脂質修飾が関与していることを明らかにし、さらにその構造基盤を立体構造解析により明らかにしたのは最初である。その結果、NAP22 の N 末端のミリスチル基が、カルモジュリンの折りたたまれた内部にくわえ込まれ、カルモジュリンが直接タンパク質に結合したアシル基を結合することが明らかとなった。カルモジュリンは通常の標的タンパク質を結合する際とは異なる立体構造を取り、また相互作用に関与するアミノ酸残基もかなり異なるユニークな結合様式を示した。さらにミリスチル基以外のタンパク質部分、特にその塩基性アミノ酸残基も結合に関与し、単なる疎水性結合だけではなく、特異的な相互作用を行うことが立体構造からも明らかにされた。このようにして脂質修飾が関与するタンパク質間相互作用の分子機構を明らかにすることができた。また、グリシン開裂系酵素群の立体構造解析を推し進め、それに関与するタンパク質を単独に立体構造解析することで、多数のタンパク質が関与する複雑な酵素反応系の構造基盤を明らかにすることができた。

* 連携研究員 (非常勤)

Our research project is focused on the development of mass spectrometry-based proteomics technology and its application to the signal transduction system. We have established a large-scale proteomics facility consisting of various mass spectrometers and robotic systems at the Harima Institute. Our aim is to analyze the expression profiles of proteins in species including various microbes and higher Eukaryotes. Other type of application of the proteomic analyses is to map the proteomic data directly to the genome sequence. This approach promoted the findings of new genes, and the correction of the initiation sites.

Apart from these “classical” proteomics studies, we study the regulatory mechanisms by protein posttranslational modifications. The global analysis of protein phosphorylation in a cell and the elucidation of the signaling network are our final object. We have conducted also structural studies of various signal transducing proteins. We could crystallize calmodulin complexed with a N-terminal myristoylated domain of a MARCKS related protein, NAP-22. This is the first demonstration of a protein complex in which the protein myristoylation is directly involved in the protein-protein interaction.

Research Subjects

1. Development of mass spectrometry-based proteomics
2. Global analysis of signaling networks by proteomics
3. Protein-protein interactions studied by protein crystallography

Staff

Head

Dr. Hisaaki TANIGUCHI

Members

Dr. Hiroaki KONISHI

Dr. Hideki MATSUZAKI

Dr. Yoko ISINO

Ms. Hitomi OKADA

Ms. Hiromi NABESHI

Visiting Members

Dr. Kazuko FUJIWARA (Inst. Enzyme Res., Univ. Tokushima)

Dr. Mineyoshi HIYOSHI (Inst. Enzyme Res., Univ. Tokushima)

Dr. Kazuko IKEDA (Inst. Enzyme Res., Univ. Tokushima)

Ms. Tomomi ISHIDO (Miyazaki Univ.)

Dr. Toshiyuki OBATA (Inst. Enzyme Res., Univ. Tokushima)

Dr. Emiko YAMAUCHI (Inst. Enzyme Res., Univ. Tokushima)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Matsubara M., Nakatsu T., Kato H., and Taniguchi H.: “Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca^{2+} /calmodulin”, EMBO J. **23**, 712–718 (2004). *

Li X., Sakashita G., Matsuzaki H., Sugimoto K., Kimura K., Hanaoka F., Taniguchi H., Furukawa K., and Urano T.: “Direct association with inner centromere protein

(INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C”, J. Biol. Chem. **279**, 47201–47211 (2004). *

Murata Y., Doi T., Taniguchi H., and Fujiyoshi Y.: “Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor”, Biochem. Biophys. Res. Commun. **372**, 183–191 (2005). *

(総説)

谷口寿章: “質量分析による微量タンパク質構造解析とシグナル伝達系プロテオミクス”, 生化学 **76**, 1289–1295 (2004).

(国際会議等)

Ishino Y., Okada H., and Taniguchi H.: “Direct mapping of *synechocystis* sp. PCC6803 MS/MS data onto genomic DNA sequence”, 52nd ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics, (ASMS), Nashville, USA, May (2004).

Okada H., Ishino Y., Ikeuchi M., and Taniguchi H.: “Proteome analysis of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803”, 52nd ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics, (American Society for Mass Spectrometry), Nashville, USA, May (2004).

口頭発表 Oral Presentations