

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、ペルオキシソームや後シナプス肥厚部などのプロテオーム解析やタンパク質複合体の立体構造解析などを中心に研究を行った。

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、岡田、鍋師、谷口、山内*1、石堂*1）

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進歩を遂げ、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、病原性大腸菌の分泌タンパク質の解析を継続すると同時に、タンパク質のN末端由来ペプチドの大規模同定法のための試料調製法の確立やプロテオミクスで同定された機能未知タンパク質の正規機能解析などを行った。

病原性大腸菌に関しては、O157の分泌タンパク質を網羅的に解析すると共に、構成タンパク質の大規模解析を推し進め、また同様の病原性大腸菌であるO26のタンパク質発現プロファイリングも行った。O157の分泌タンパク質に関しては、TypeIII輸送系により菌体外に分泌されるタンパク質をプロテオミクスにより同定すると同時に、バイオフィンフォマティクスにより分泌シグナルを持つタンパク質をゲノム配列上に同定し、それらを比較することで、約50種類のエフェクタータンパク質の候補を同定することに成功した。またヒト細胞への取り込みを解析することで、プロテオミクスによる同定と合わせ約30種類のタンパク質がヒト細胞に送り込まれるエフェクタータンパク質であることを見出した。これは従来から存在が知られているエフェクタータンパク質が数種類であったことを考えると、病原性大腸菌による感染の研究に非常に大きな貢献を果たす結果となった。

また、タンパク質のN末端由来ペプチドを特異的に集めることで、遺伝子の翻訳開始点を明確にするプロジェクト

も、プロテオミクスによりN末端由来ペプチドを同定する実験的アプローチと、前年度に開発した、プロテオミクスにより同定されたペプチドを未解釈のゲノム配列に直接マップするバイオフィンフォマティクスによるアプローチの両方から解析を進めた。N末端由来ペプチドを化学的な手法により濃縮し、それらを同定する技術を開発した。これを用いて枯草菌由来のタンパク質のN末端配列を大規模に解析する試みを行った。一方で、プロテオミクスにより同定されたペプチド配列をゲノム配列に直接マップする技術では、従来同定されているORFよりもさらに5'側上流にマップされるペプチドを検出し、さらにインフォマティクスの手法により、様々な情報を組み合わせることで同定された新規翻訳開始点の確からしさを評価するプログラムを開発した。これらを用いて藍藻や分裂酵母のゲノム配列のアノテーションの修正を進めている。

本年度はこれらのプロテオーム解析に加えて、さらに、ペルオキシソームや後シナプス肥厚部（PSD）、脂肪滴などのオルガネラプロテオミクスにより同定された新規機能未知タンパク質の生理機能解析を行った。脂肪滴由来タンパク質に関しては、脂肪滴のプロテオミクスで見出された様々なRabファミリー低分子Gタンパク質に関してそれらの細胞内局在を検討した。その結果、Rab18のみが特異的に脂肪滴に局在すること、その局在にはGTPase活性が必須であることなどを明らかにした。また、PSD由来のタンパク質では、プロリンリッチタンパク質のひとつ（PRR7）が、PSDにおける典型的なスカフォールドタンパク質であるPSD-95とNMDA受容体に結合することなどを明らかにした。

精製ペルオキシソームのプロテオーム解析は、既知のペルオキシソームタンパク質の大部分を同定すると共に、複数の新規タンパク質がペルオキシソームに存在することを明らかにした。その中で、Lonプロテアーゼと呼ばれる分子シャペロンの機能を持つATP依存性プロテアーゼのペルオキシソーム特異的アイソフォームと、新規の脂質代謝酵素は、ペルオキシソーム自身の合成・維持、脂質代謝そのものに関係することから、本年度は特に前者の生理機能解析に重点を置いて研究を進めた。LonプロテアーゼはATPに依存してタンパク質の立体構造をほぐすATPアー

ゼ・ドメインとタンパク質分解活性を持つプロテアーゼ・ドメインよりなり、ペルオキシソームタンパク質のクオリティチェックなどにおける役割が推測される。

このために、Lon プロテアーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌において組み換えタンパク質を作成し、また様々な活性変異体を動物細胞に発現させることで、その様々な性質を調べた。その結果、Lon プロテアーゼを細胞に強制発現させると、ペルオキシソームの肥大化が起こることを見出し、Lon プロテアーゼがペルオキシソームの分裂による増殖に関与することも明らかになった。ペルオキシソームの増殖は脂肪細胞分化や細胞の脂質代謝に直接関係することから、肥満症との関連においても興味深いタンパク質と考えられる。ペルオキシソームに関しては、引き続き Lon プロテアーゼの生理機能とオルガネラの運命における役割を中心に研究を継続している。

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、岡田、松崎、山川、小西*1、山内*1、藤原*1）

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。既に前年度において 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生理機能の解析を推し進めた。

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とアミノ酸置換変異体を用いたリン酸化部位の詳細な解析を進めている。その中で、2 種類の新規タンパク質に関してそれらの生理機能を明らかにすることができた。EGF 受容体の下流タンパク質のプロテオミクスにより同定されたタンパク質のひとつは、アミノ酸配列からは既知の機能ドメインを持たず、配列からはその生理機能を予測することはできなかったが、結合タンパク質の解析から、CD2AP タンパク質と呼ばれるタンパク質に特異的に結合することが明らかとなった。CD2AP タンパク質は EGF 受容体の細胞内への取り込みと分解の制御に関わるタンパク質であり、その後の詳細な解析から、我々が見出したタンパク質は EGF 受容体の分解の制御に関与しているという知見を得た。また、もう一つのタンパク質は、それ自身ユビキチン化されると同時に新規ユビキチン結合ドメインである MIU ドメインを分子中に 2 個持ち、EGF 受容体と結合すること、さらにその生理機能が EGF 受容体の分解の制御にあることを明

らかにした。このように、EGF 受容体下流タンパク質として同定された様々な新規タンパク質の機能解析を推し進めることで、シグナル伝達ネットワークを明らかにする試みを行った。

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*1、藤原*1、池田*1）

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、多数の構成タンパク質よりなり、さらにタンパク質のリポイル化というタンパク質翻訳後修飾が重要な役割を果たしている、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の研究を推進した。

今年度は特にグリシン開裂系酵素群の構成タンパク質の中で、ヒト由来の T タンパク質の立体構造を明らかにすることに成功した。先天性代謝異常症の一つである高グリシン血症は、アミノ酸の一種であるグリシンを分解する T タンパク質などの遺伝子の変異（異常）が原因で発症する。分解されないグリシンが患者の体液中に蓄積し、痙攣や無呼吸症などの神経症状を引き起こすことがその原因である。大腸菌で作られたヒト T タンパク質を結晶化し、SP ring-8 のビームラインを使用して立体構造を解明すると共に、ヒト遺伝病に見られる様々な変異タンパク質の酵素学的分析なども同時に行った。その結果、T タンパク質はクローバーの葉のような形をしており、中央にある空洞部分を支える構造の変異が病気を引き起こすメカニズムも明らかにすることが出来た。

*1 客員研究員

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. This year we could elucidate two component proteins of glycine cleavage enzyme system. One of them, human T protein, is the

main cause of a human hereditary disease, Hyperglycinemia. We have crystallized human T-protein made by Escherichia coli, and elucidated the three-dimensional protein structure. In addition, we conducted an enzymological analysis of mutant proteins. As a result, we have elucidated that T-protein is shaped like a cloverleaf and that the structural mutant of T-protein supporting cavities to which the central folate coenzyme binds causes diseases.

Staff

Head

Dr. Hisaaki TANIGUCHI

Members

Dr. Hideki MATSUZAKI

Ms. Hitomi OKADA

Ms. Hiromi NABESHI

Ms. Tomomi ISHIDO

Dr. Norio YAMAKAWA*1

*1 Special Postdoctoral Researcher

Visiting Members

Dr. Hiroaki KONISHI (Inst. Enzyme Res., Univ. Tokushima)

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

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

Dr. Kazuko IKEDA (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誌

Murata, Y., Doi, T., Taniguchi, H., and Fujiyoshi, Y. (2005) Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 327, 183-191 *.

Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., and Fujimoto, T. (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. J. Cell Sci., 118, 2601-2611 *.

Kazuko Okamura-Ikeda, Harumi Hosaka, Masato Yoshimura, Eiki Yamashita, Sachiko Toma, Atsushi Nakagawa, Kazuko Fujiwara, Yutaro Motokawa and Hisaaki Taniguchi (2005) Crystal Structure of Human T-protein of Glycine Cleavage System at 2.0 Å Resolution and its Implication for Understanding Non-ketotic Hyperglycinemia. J. Mol. Biol., 351, 1146-1159 *

Kazuko Fujiwara, Sachiko Toma, Kazuko Okamura-Ikeda, Yutaro Motokawa, Atsushi Nakagawa, and Hisaaki Taniguchi (2005) Crystal Structure of Lipoate-Protein Ligase A from Escherichia coli: DETERMINATION OF THE LIPOIC ACID-BINDING SITE. J. Biol. Chem., 280, 33645 – 33651 *

Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M. (2005) Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment Proteomics, 5, 4287-4295. *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Okada H.: "Annotation of Bacillus Subtilis Genome using

Proteomic Data", 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, (American Society for Mass Spectrometry), Sun Antonio, USA, June (2005).

(国内会議)

福永 優子, 松崎 英樹, 松原 守, 永井 里奈, 奥田 明子, 宮澤 淳夫, 藤吉 好則: "表面プラズモン共鳴技術による PSD-95 のカルモジュリン結合解析", 第26回日本神経科学大会, 名古屋, 7月 (2003).