

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：34303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14712

研究課題名(和文) 脂質修飾サイクルを制御する新規脱ミリスチル化酵素の同定とその機能構造解析

研究課題名(英文) Identification of novel demyristoylation enzyme controlling lipid modification cycle and its structural function analysis

研究代表者

松原 守 (Matsubara, Mamoru)

京都学園大学・バイオ環境学部・教授

研究者番号：90288481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のミリスチル化は、これまで不可逆的な脂質修飾と考えられており、ミリスチル基を除去する脱ミリスチル化酵素は同定されていない。ミリスチル化タンパク質の多くは疾患に関わる重要なものが多いので、ミリスチル化タンパク質の制御に関わる脱ミリスチル化酵素の存在を明らかにすることは大きな発見である。

本研究では、脱ミリスチル化酵素を精製、同定し、その酵素学的性質を明らかにすることを目的とした。その結果、ラット脳可溶性画分から脱ミリスチル化活性を見出すことに成功した。この研究過程において、脱ミリスチル化活性を同定するためのアッセイ系も開発した。

研究成果の概要(英文)：Protein myristoylation is an irreversible lipid modification and demyristoylation enzymes have not yet been identified. Since many myristoylated proteins are important for disease pathogenesis, it is a major finding to clarify the presence of demyristoylation enzymes involved in the regulation of myristoylated proteins.

In this study, we aimed to purify and identify the demyristoylation enzyme and to clarify its enzymatic characteristics. As a result, we succeeded in finding demyristoylation activity from rat brain soluble fraction. In this research process, we also developed an assay system to identify demyristoylation activity.

研究分野：蛋白質科学、細胞生物学、分子生物学、構造生物学

キーワード：ミリスチル化 ミリスチル化 脂質修飾 細胞内シグナル伝達 脱ミリスチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

脂質修飾の一つであるタンパク質のミリストイル化は、細胞内シグナル伝達系に関わる多くのタンパク質に見られ、タンパク質と生体膜との結合やタンパク質の機能調節などにおいて極めて重要な役割を担っている。これまでミリストイル化は、不可逆的な脂質修飾と考えられており、一旦ミリストイル化されればタンパク質が分解されるまで無くなり、パルミトイル化などの別の脂質修飾で見られるような脱修飾酵素については同定されていない。しかし、ミリストイル基が生体膜やタンパク質と結合した後に可逆的に解離することも必要であり、従来考えられているリン酸化やリガンドなどによる可逆的スイッチ機構以外にも脱ミリストイル化酵素による脱ミリストイル化反応も重要である可能性が出てきた。

1990年代に牛脳のシナプトソーム画分に脱ミリストイル化活性が報告された。その後20年間以上、その実態については明らかになっていなかったが、最近の我々による、予備的な実験から、ラット脳画分に脱ミリストイル化活性が存在することが明らかになった。このことは、これまで同定されていない脱ミリストイル化酵素の存在を示唆するものである。

2. 研究の目的

タンパク質のミリストイル化は、これまで不可逆的な脂質修飾と考えられており、ミリストイル基を除去する脱ミリストイル化酵素は同定されていない。ミリストイル化タンパク質の多くは細胞内のシグナル伝達系を担っている重要なものが多く、更に細胞のがん化、ウイルス感染などに深く関わっているため、ミリストイル化タンパク質の制御に関わる脱ミリストイル化酵素の存在を明らかにすることは大きな発見である。

本研究では、脱ミリストイル化酵素を精製・同定し、その酵素学的性質、細胞内におけるミリストイル化の可逆的なメカニズムを明らかにする。また、脱ミリストイル化酵素の脱ミリストイル化活性を利用した各種疾患における治療薬開発の可能性についても検討する。

3. 研究の方法

脱ミリストイル化酵素を同定するためには、脱ミリストイル化活性を検出するためのアッセイ系の構築が必要である。本研究では、主に2つの方法でミリストイル化タンパク質と脱ミリストイル化酵素によってミリストイル基が除去された非ミリストイル化タンパク質を区別するアッセイ系を構築する。一つは、SDS-PAGEでバンドのシフト差を検出する方法である。ミリストイル化タンパク質と

非ミリストイル化タンパク質では、SDS-PAGE上のタンパク質バンドに差が出ることを利用したものである。もう一つは、化学ラベルされたミリストイル化タンパク質を用いた方法である。クリックケミストリーを用いてミリストイル化タンパク質のミリストイル基を化学ラベル化し、このタンパク質をSDS-PAGEで検出するとバンドが現れる。しかし、脱ミリストイル化活性をもつ可能性があるタンパク質と化学ラベル化されたミリストイル化タンパク質を反応させることで、化学ラベル化されたミリストイル基が解離し、SDS-PAGEではバンドが現れない。よって脱ミリストイル化活性を検出することができる。

本研究では、上記で記した2つのアッセイ系を用いて、ラット脳画分から脱ミリストイル化活性を検出し、脱ミリストイル化酵素の精製・同定を進め、同定した脱ミリストイル化酵素のクローニングと大腸菌および動物細胞に発現させ、その生理機能の解明を行う。

4. 研究成果

SDS-PAGE上でバンドシフトの見られるミリストイル化タンパク質と非ミリストイル化タンパク質として、myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)が我々のこれまでの結果から知られている。本研究では、初めて大腸菌を用いてミリストイル化されているMARCKS(myr MARCKS)とミリストイル化されていないMARCKS(non-myristoylated MARCKS)を発現し精製した。

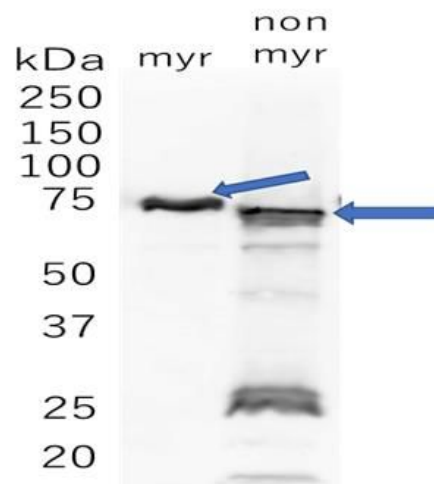


図1 myr MARCKS と non-myristoylated MARCKS のバンドシフト

図1の結果、myr MARCKS と non-myristoylated MARCKS はバンドのシフト差が起こることが確認された。このバンドシフトを用いることにより、脱ミリストイル化活性が検出可能となるため、この系を用いてラット脳可溶性画分中の脱ミリストイル化活性の検証を行った。

ラット脳可溶性画分、myr MARCKS、各条件の試薬をチューブに加えて24時間、37℃で

インキュベートを行い、バンドシフトを用いて脱ミリスチル化活性を検出した。図2に示したように、脱ミリスチル化活性がラット脳可溶性画分に存在すれば myr MARCKS が脱ミリスチル化されてバンドのシフトが見られることになる。

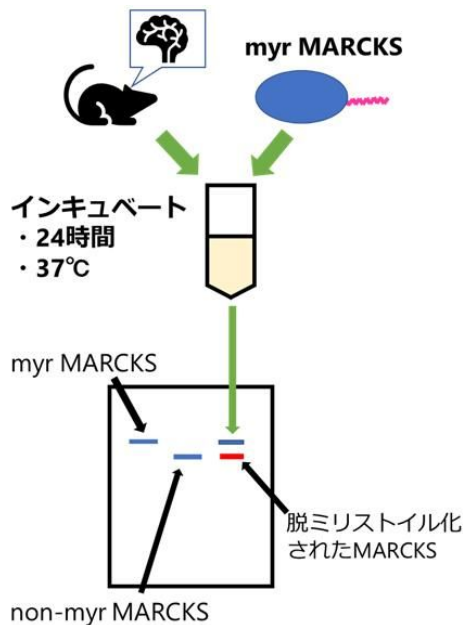


図2 myr MARCKS を用いた脱ミリスチル化活性の検出

実際の反応結果を示したものが図3である。

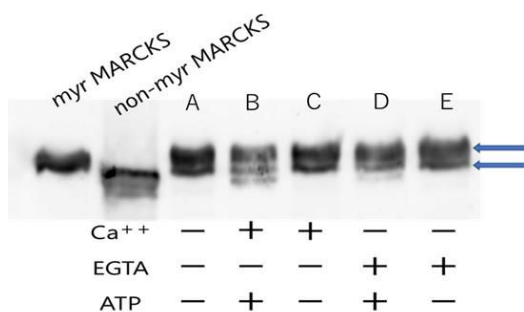


図3 脱ミリスチル化活性の検出

図3の結果から、A~Eのすべてのインキュベーションサンプルには、non-myristoylated MARCKS と同じような位置にバンドがそれぞれ検出されていることが確認できた。このことにより、脱ミリスチル化活性は存在している可能性が考えられる。また、カルシウムやATPの依存性は、脱ミリスチル化活性には関係がないことが明らかになった。

一方、この結果だけでは本当にミリスチル基の部分だけが除去されてバンドシフトが起きているかは分からない。つまり、プロテアーゼによってC末端の部分が見かけ上分子量が小さくなってバンドシフトが見られている可能性もある。従って、次にクリックケミストリーによってミリスチル

基の部分化学ラベルすることによって、ミリスチル基の部分だけが除去されるのかどうかを検証した。今回はミリスチル基の部分にbiotinのラベル化をクリックケミストリーで行った。

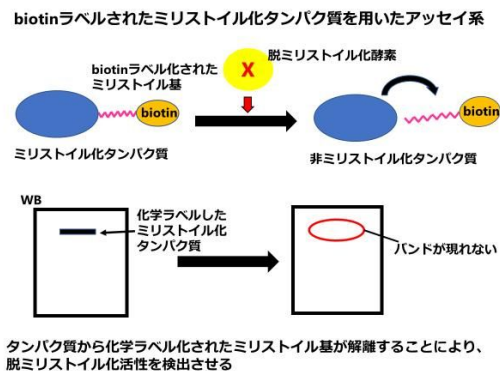


図4 ビオチン化ラベルされたミリスチル化タンパク質を用いたアッセイ系

図4に示したように、クリックケミストリーでbiotinラベル化されたミリスチル基は、ウェスタンブロッティングを行うと化学ラベルであるbiotinにより化学発光が起きバンドが現れる。しかし、biotinラベル化されたミリスチル化タンパク質と脱ミリスチル化酵素を反応させ、biotinラベル化されたミリスチル基を解離させることでバンドは現れなくなる。このアッセイ系を用いることで脱ミリスチル化活性が検出可能となる。

ビオチン化ラベルされたミリスチル化タンパク質は、本研究ではNAP-22を用いた。図5で示したように、クリックケミストリーを用いてビオチン化ラベルされたミリスチル化NAP-22を調製することができた。

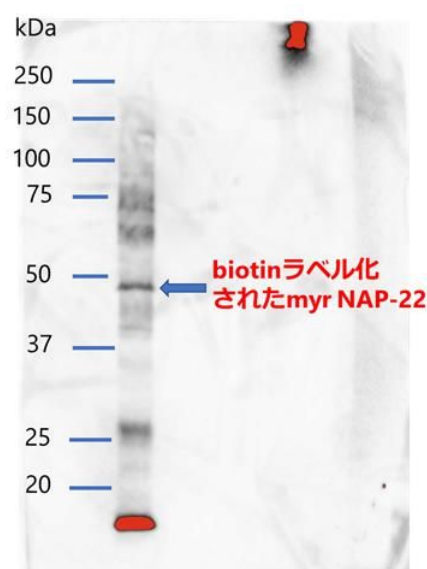


図5 ビオチン化ラベルされたミリスチル化NAP-22

ラット脳可溶性画分と biotin ラベル化された myr NAP-22 をチューブに入れ、24 時間、37 °C でインキュベートを行い、脱ミリスチル化活性の有無の検証を行った。ラット脳可溶性画分中の脱ミリスチル化活性によって、biotin ラベル化された myr NAP-22 のミリスチル基が除去されバンドが薄くなるのが図 6 の結果から明らかになった。

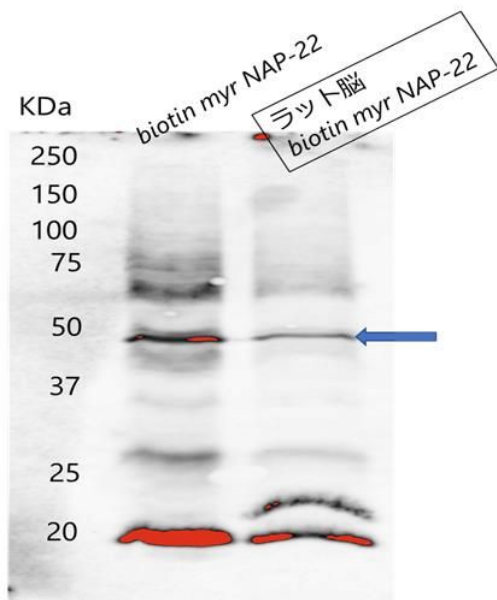


図 6 ラット脳可溶性画分の脱ミリスチル化活性の検出

これらの結果から、ラット脳可溶性画分にはミリスチル化タンパク質のミリスチル基を除去する脱ミリスチル化酵素が含まれていることが明らかとなった。現在、この脱ミリスチル化酵素の精製を行っている。今後、この酵素を精製する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kito, T., Teranishi, T., Nishii, K., Sakai, K., Matsubara, M. and Yamada, K. Effectiveness of exercise-induced cytokines in alleviating arthritis symptoms in arthritis model mice. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 93, 81-88, 2016 査読有

[学会発表](計 9 件)

1. 松原守, 鈴木智之, 坂下真耶, 原田清佑
卵白ペプチドにより誘起されるカルシウムシグナルが筋肥大を促進する
ポスター発表 Biochemistry and Molecular

Biology (BMB) 2015 2015 年

2. 山田晃司, 鬼頭巧, 西井一宏, 酒井一由, 寺西利生, 松原守
関節炎モデルマウスがマイオカインにより症状が緩和されるかについての有効性の検討
ポスター発表 Biochemistry and Molecular Biology (BMB)2015 2015 年

3. 松原守
病気に打ち勝つ社会を創る - タンパク質研究にできること -
口頭発表
バイオ環境学部開設 10 周年記念講演会 2016 年

4. 松原守, 鈴木智之, 坂下真耶, 伊納義和, 古野忠秀, 堀江健二
卵白ペプチドによるカルシウムシグナルの活性化が筋肥大を促進する
ポスター発表 第 89 回日本生化学会大会 2016 年

5. 松原守, 菊池佑一, 鈴木智之, 兼子麻子, 中村正彦
ミリスチル化タンパク質 BASP1 と HDAC1 の核内での相互作用
ポスター発表 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

6. 松原守, 鈴木智之, 坂下真耶, 伊納義和, 古野忠秀, 堀江健二, 金武祚
卵白ペプチドによる運動模倣効果が筋肥大を促進する
口頭発表 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年

7. 鬼頭 巧, 西井 一宏, 姚 潤宏, 寺西 利生, 杉山 智久, 酒井 一由, 松原 守, 山田 晃司
老齢モデルマウスにおける振動振盪刺激による腰椎への影響
ポスター発表 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年

8. 姚 潤宏, 西井 一宏, 鬼頭 巧, 寺西 利生, 杉山 智久, 酒井 一由, 松原 守, 山田 晃司
骨密度低下モデルマウスを用いて骨粗鬆症を予防する新規刺激法の検討
ポスター発表 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年

9. 松原 守, 井上 宮銘, 深見 治一
野菜抽出物によるパーキンソン病原因タンパク質 -synuclein の凝集阻害効果
ポスター発表 017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年

〔その他〕
ホームページ
Mamoru Matsubara Web Site
<http://mamoru-matsubara.com/>

6 . 研究組織
(1)研究代表者
松原 守 (MATSUBARA MAMORU)
京都学園大学 バイオ環境学部・教授
研究者番号: 9 0 2 8 8 4 8 1