

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17017004

研究課題名（和文） 生体分子パスウェイ・ネットワークの定量計測技術と攪乱法の開発

研究課題名（英文） Development of methods for quantitative description and perturbation of biomolecular pathways and networks

研究代表者

伊藤 隆司 (ITO TAKASHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：90201326

研究成果の概要（和文）：生体分子パスウェイ・ネットワークの動態を理解する基盤として、次世代シーケンシングを用いた遺伝子発現の絶対定量法、質量分析を用いたタンパク質間相互作用の絶対定量法および定量ユビキチン化プロテオーム解析法、FRETを用いた細胞内代謝物のリアルタイム解析法を開発した。

研究成果の概要（英文）：As a basis for understanding dynamics of biomolecular pathways and networks, we developed novel methods for absolute quantification of gene expression using next generation DNA sequencing, absolute quantification of protein-protein interactions and quantitative analysis of ubiquitinated proteomes by mass spectrometry, and real-time monitoring of intracellular metabolites using FRET.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,200,000	0	18,200,000
2006年度	21,100,000	0	21,100,000
2007年度	21,400,000	0	21,400,000
2008年度	21,600,000	0	21,600,000
2009年度	21,700,000	0	21,700,000
総計	104,000,000	0	104,000,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学

キーワード：転写開始点、次世代シーケンサ、定量プロテオミクス、ユビキチン化、FRET

1. 研究開始当初の背景

生命システム理解の第一歩は、構成要素の同定であり、ゲノム解析に代表されるオミクスはその基盤を形成するものである。要素同定に続く段階は要素間の相互作用の解明であるとの認識に基づき、我々は先駆的なインタラクトーム解析を行った。

こうしたアプローチはその後にも発展を続け、生体分子ネットワークの全貌が次第に明らかにされていったが、それはまだ時間的・空間的分解能と定量性を欠いた静的なものに留まっていた。生命システムの挙動を高精度に（定量的に）予測できるレベルにまで理

解を深めるには、ネットワークのトポロジーだけではなく、ダイナミクスと特性をも理解する必要がある。そのためには定量性・実時間性を備えた計測技術の開発が不可欠であり、数理解析もそれに基づいたものでないと意味がない。

研究開始当初は、こうした状況にあり、システム動態の理解につながるデータを取得できる新しい定量的計測技術の開発が求められていた。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景を踏まえて、本研究で

は、1) 遺伝子発現、2) 蛋白質間相互作用、3) 蛋白質翻訳後修飾、4) 細胞内代謝産物のそれぞれを対象に、絶対定量性・網羅性・リアルタイム性に重点を置いた技術開発を進め、それぞれの項目に関して独自の技術・方法論の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現

①出芽酵母遺伝子の発現絶対定量法として開発に取り組んできた GATC-PCR 法を発展させて、ヒト遺伝子の発現絶対定量を試みる。更に次世代シーケンサを用いて転写開始点と終結点を同時に定量的に計測する手法を開発する。

(2) 蛋白質間相互作用

①蛋白質複合体の構成成分の変容を、安定同位元素標識と質量分析 (MS) を用いて定量的に解析する新しい実験法を確立する。

(3) 蛋白質翻訳後修飾

①独自のパラレルアフィニティタグ精製法と安定同位元素標識によるユビキチン化のプロファイリング法を確立する。

(4) 代謝物の視覚化

①細菌ペリプラズム結合蛋白質の両末端に蛍光蛋白質を連結し、基質の結合によるコンフォメーション変化を蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) で検出する蛍光ナノセンサー蛋白質を作成する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現

①GATC-PCR による出芽酵母遺伝子発現の絶対定量

我々は、全ての遺伝子を正確に 1 コピーずつ含むゲノム DNA を共通標準物質として各 cDNA の量を定量することによって、トランスクリプトームの絶対定量を行う一般化アダプタ付加競合 PCR 法 (GATC-PCR) を開発してきた。そのための独自のプライマー設計法および出芽酵母トランスクリプトームの絶対定量の成果をとりまとめて論文として発表した (論文 1, 12)。従来、出芽酵母のトランスクリプトームは、細胞あたり 15,000 分子の mRNA から構成されているとされてきたが、GATC-PCR の結果は 30,000 分子以上という 2 倍以上大きなサイズを示した。この差異の原因を追究したところ、Rot 解析の結果に基づいて mRNA のコピー数を算定する際に、細胞あたりの総 RNA 量が過少に見積もられていたことが主な原因であることが判明し、この 30 年にわたって信じられてきた値を訂正することができた。

また、森下班員によるプライマー設計法の

高度化とともに、この方法をヒトゲノムに応用してヒト遺伝子の絶対定量も可能であることを確認した。

②出芽酵母の完全長 cDNA 解析

ベクターキャッピング法による出芽酵母の完全長 cDNA 解析の成果を取りまとめて論文として発表すると同時に、森下班員の協力を得て UT ゲノムブラウザを介してデータを公開した (論文 3)。この解析によって、3,599ORF を含む 3,638 既知遺伝子に関して 11,575 の転写開始点 (TSS) を同定し、出芽酵母では大半の遺伝子が複数の TSS を持つことを明らかにした。また 45 個の新規イントロンを見出し、4 個の既知イントロンの位置を修正した。これらの中には、出芽酵母では報告のないオルタナティブ・スプライシングや隣接遺伝子間でのスプライシングも含まれていた。

更に、遺伝子間領域由来の新規転写単位、アンチセンス転写単位、ORF 内に TSS を持つ転写単位を、それぞれ少なくとも 667、367、348 個同定し、出芽酵母トランスクリプトームの予想外の複雑さを明らかにした。これらの結果は、SAGE やタイリングアレイ解析による結果ともよい一致を示しており、高等生物で注目されてきたゲノム全般の転写や非コード RNA の解析において出芽酵母がよいモデル系を提供すると期待される (論文 11)。

③クローニング・フリー-GIS-PET によるトランスクリプトーム解析

上記の完全長 cDNA 解析によって、出芽酵母といえども転写物が予想外に複雑であることが分かった。更に、既知遺伝子上流にマップされた TSS であっても、その遺伝子の mRNA ではなくて CUT (Cryptic Unstable Transcript) と呼ばれる短い転写物の TSS であることが少なくないことも明らかにされてきた。プロモータ領域から読まれる CUT は、転写干渉等の機構を介して、下流に位置する遺伝子の転写に対して阻害的に働くことが示されている。したがって、上流領域にマップされた TSS の数をもって遺伝子発現量の指標とするのは単純に過ぎる解釈であるばかりか、興味深い調節機構を見落とすことにもなりかねない。

この問題は、従来までのように TSS タグのみを計数しては解決しない。それぞれの TSS がどんな転写物をコードしているのかを識別しながら、その計数が行われねばならない。理想は全ての完全長 cDNA クローンについて全塩基配列決定を行うことであるが、それは現実的には困難である。しかし、TSS に加えて転写終結点 (TTS) も同時に捉えることができれば、転写単位の確定という意味では非常に大きな進展となる。ここで注意しな

なくてはならないのは、TSS と TTS のペア情報は、多様な分子種の平均や合計としてしかデータが得られないタイリングアレイや RNA-Seq では取得不可能であるという点である。

TSS と TTS を同時に捉える手法としては、GIS-PET が開発されている。しかし、この方法は、大腸菌への形質転換を複数回含むために、集団構成比が歪む危険性が高いこと、そして形質転換効率によって集団サイズ (= 独立クローン数) に限界が生じること、の2点を回避できない。そこで、転写単位の網羅的な確定と正確な絶対定量を目的に、大腸菌へのクローニングステップを完全に排除して、形質転換による独立クローン数よりも多数の分子を計数できる次世代シーケンサをプラットフォームとする手法 (クローニング・フリー GIS-PET 法) の開発に取り組んだ。次世代シーケンサによる PET 解析は既に報告されているが、サイズが均一な集団を対象とするこれらの方法とは異なり、GIS-PET では様々な長さの cDNA から構成される集団を対象とせねばならず、サイズがヘテロな DNA 集団を対象に均一な自己環状化効率を達成することが技術的な課題となった。様々な方法を試行錯誤し、独自のエマルジョン・ライゲーション法によって一定の解決を得ることができた。その結果、二本鎖 cDNA 合成、GsuI による poly(A) 除去、ビオチン化アダプタ付加、自己環状化、type IIS 酵素切断、タグ断片回収、シーケンシングという一連の操作からなるプロトコルが確立された。現在、この方法を用いて出芽酵母の転写単位の確定が進められている。

(2) 蛋白質間相互作用

① PCS-MS による複合体・パスウェイの定量解析

蛋白質相互作用を定量的に解析するには、安定同位元素標識と MS による解析が有効な手段となる。重要な相互作用を多数同時に定量するには、多数の安定同位元素標識標準ペプチドの化学合成とサンプルへの正確な量の添加が必須であるが、これが現実問題としては相当に困難である。また既知量ペプチドを正確に添加できたとしても、標的蛋白質からの当該ペプチドの切断効率が必ずしも 100%ではないために、その正確性には問題が残る。

これらの問題を解決するために、我々は定量に用いるペプチドを連結した人工タンパク質 Peptide-Concatenated Standard (PCS) を作成して用いるという着想を得た。PCS ではペプチドがコンカテネーションされて一つの分子となっているので、全ペプチドが必ず等モルでサンプルに添加される。この点に関しては、英国のグループが独立に発表した

Q-Con-CAT と同様である。しかし、PCS では各ペプチドが前後 3 残基のフランキング配列を保持することで各標的タンパク質における切断効率を正確に反映するように設計されているので、切断効率の影響が相殺されて定量的正確性の向上が期待される。実際に、PCS の有用性を翻訳開始因子 eIF2B および eIF2B-eIF2 複合体の解析により実証し、論文として発表した。これにより様々な複合体や経路の変動を正確に追跡するための標準物質作成のための汎用性の高い方法論が開発された (論文 5)。

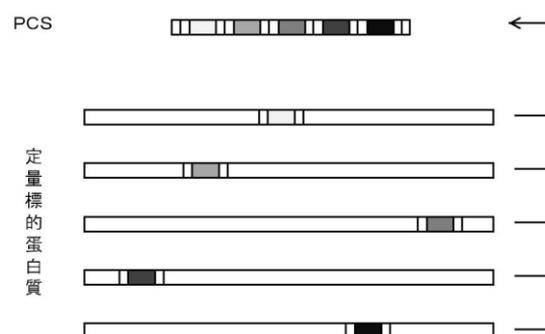


図 1 : PCS の原理

更に我々は、細胞周期エンジンであるサイクリン-Cdk 複合体に関する PCS-MS 定量システムを構築した。この系では出芽酵母の Cdk である Cdc28 と 9 種類のサイクリン、そして 2 種類の Cdk inhibitor (Sic1, Csk1) を定量的に計測できる。このシステムを同調培養した細胞集団に適用することで、細胞周期の進行に伴うサイクリン-Cdk 複合体の化学量論的構成の変動を初めて定量的に明らかにすることに成功した。

また我々は、PCS-MS の対象となる蛋白質数を増大させること、及び定量的ダイナミクスレンジを拡大することを目指して、階層的 PCS-MS の開発に取り組んだ。この方法では複数の PCS (一次 PCS) を同時に利用するが、それぞれに独自の ID ペプチドを付加しておく。これらの ID ペプチドだけを連結した二次 PCS を用いることで、それぞれの一次 PCS による計測データを正確に統合して利用する。更に一次 PCS と二次 PCS 中の ID ペプチドのコピー数の比を様々に変えておくことにより、ダイナミクスレンジを拡大することもできる。

そこで、一次 PCS に付加する ID ペプチドの設計、定量対象ペプチドの選択基準に関する基礎的検討を進めて戦略を策定した。その上で、酵母の粗抽出液を LC-MS/MS 解析して得た 159 蛋白質/1006 ペプチドから、様々な基準に応じて定量に適した 64 蛋白質/105 ペプチドを選択した。各ペプチドの同定回数か

ら推定された発現量に基づいてこれらを5つのグループに分け、それぞれに独自の ID ペプチドを持った5種類のPCSを設計し、安定同位元素標識体として調製した。更に、これらの ID ペプチドを、コピー数を変えながら連結した二次PCSを設計して、非標識体として調製した。これらを組み合わせた階層的PCS-MS計測を行い、64種の蛋白質の定量に成功した。これにより、定量蛋白質数を増大させるとともに、計測のダイナミックレンジを従来の10倍程度から100倍程度にまで拡大することにも成功したことから、階層的PCSのproof-of-conceptを示すことができたと考えている(投稿準備中)。

②蛋白質間相互作用の安定性の解析

相互作用の化学量論比の定量に加えて、その速度論的性質を明らかにする手法も開発した。この手法では、解析対象の複合体の構成因子にアフィニティタグがノックインされた細胞をSILAC法で安定同位元素標識する。一方でタグを持たない親株を通常の培地で培養する。この両者を等量混合してから、アフィニティ精製を行いLC-MSに供する。複合体の構成因子がいずれも安定に結合しているものであれば、それぞれに由来するペプチドは全てが“重い”ペプチドになる。ところが、ダイナミックな構成因子は、抽出液中で精製工程中に交換反応を起こしてしまうので、平衡に達するような極端な場合にはその50%が“軽い”ペプチドに置換される。この方法は、精製における非特異的成分の識別を目的に開発されたI-DIRT法と操作は同様であるが、構成因子が確定している複合体に関しては、相互作用の性質が安定なのか、ダイナミックなのかを明らかにしてくれると期待される。

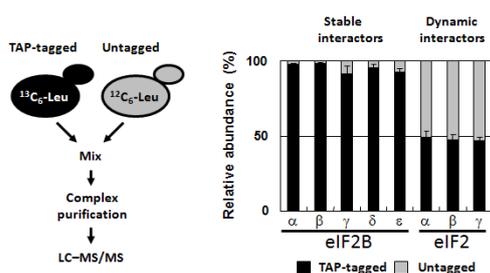


図2：安定な相互作用とダイナミックな相互作用の識別

実際に、翻訳開始因子 eIF2B と eIF2 の超複合体にこの方法を適用したところ、グアニンヌクレオチド交換因子である eIF2B の5つのサブユニット間では交換が全く認められなかったのに対して、その基質 GTPase である eIF2 の3つのサブユニットでは50%が非標識分子に交換されていた。これは、酵素と基

質というこの相互作用の性質をよく反映したものであった。

次に、この方法をサイクリン-Cdk 複合体に適用したところ、サイクリンと Cdk の相互作用が安定であるのに対して、サイクリン-Cdk と Cdk inhibitor である Sic1 の相互作用はダイナミックであることが示された。この場合も、複合体を機能モジュールに分割できたことになる。以上の結果は、この方法の有効性を示すものと考えられた(論文7)。

(3) 蛋白質翻訳後修飾

①ユビキチン化の解析

独自のパラレルアフィニティタグ精製法(PAP)によるユビキチン化蛋白質の網羅的同定法を開発した。PAPでは、それぞれ異なるアフィニティタグで標識された2種類のユビキチンを同一細胞内で平行に発現させる。その上で、それぞれのタグに対するアフィニティ精製を行うことで、双方のタグ付加ユビキチンを併せ持つ分子のみを選択的に精製する。これにより、大量に存在する遊離のユビキチンやモノユビキチン化蛋白質を除去して、ポリユビキチン化蛋白質(及びマルチプルモノユビキチン化蛋白質)を選択的に濃縮することができる。こうして得た PAP 画分を質量分析に供すると(PAP-MS)、効率的にユビキチン化蛋白質を同定することができる(論文8)。

この PAP-MS 法を安定同位元素標識法と組み合わせて用いることで(SILAC-PAP-MS)、野生株とユビキチンリガーゼ(E3)の変異体の比較を行った。モデル実験で既知基質を同定できることが確認できたので、基質未知 E3 の解析を行なった。その結果、F-box 蛋白質 Mdm30 を含む SCF 複合体 SCF(Mdm30)の基質候補としてミトコンドリア外膜蛋白質 Mdm34 が同定された。詳細な機能解析実験の結果、両者の酵素基質関係が実証され、更にそれがミトコンドリアの維持に重要であることも明らかになり、本アプローチの有効性を実証することができた(論文11)。また、この方法を出芽酵母の脱ユビキチン化酵素16種の欠失株にも適用して、基質候補の組織的同定を進めている。

これと関連して、最大の E3 ファミリーを形成する SCF 複合体の構成が様々な条件で再編されるか否かを SILAC-MS で解析した。その結果、diauxic shift によって F-box 蛋白質 Saf1 を含む複合体 SCF(Saf1)が増えること、基質 Met4 の過剰発現によってそのユビキチン化を触媒する SCF(Met30)複合体が増えることを明らかにして、SCF 複合体によるユビキチン化システム構成の可塑性を示した(論文14)。また、SCF 複合体のコア因子 Cdc53 の NEDD8 化が、SCF 複合体構成因子間の相互作用を安定化することを見出した(投稿準備中)。

備中)。

(4) 代謝物の視覚化

ヒスチジンをリガンドとする大腸菌のペリプラズム結合蛋白質 (PBP) である HisJ を骨格とするナノセンサー蛋白質 FLIP-His (Venus-HisJ-ECFP) を開発した。更に細胞内 His 濃度に応答可能なように、Kd を増大させる変異を導入した。その過程で各種アミノ酸に対する Kd を計測したところ、予想外にも HisJ がサブ mM の Kd で Gln と結合することが判明した。そこで His と HisJ の複合体の X 線構造解析データに基づくドッキングシミュレーションを行い Gln の結合様式を予測した。この結果に基づいて、His との結合には影響を与えず、Gln の結合を不安定化する変異を予測し、事実上 Gln に殆ど結合しないセンサーの開発に成功した。

FLIP-His センサーおよびその誘導体はダイナミクスレンジが小さいものが多く、*in vivo* での信頼性の高い計測には不向きであった。その改善のため、宮脇班員によって開発された cpVenus (circularly permuted Venus) の利用、リンカーの改変など、種々の方策を試みたが、いずれによっても改善は得られなかった。また、他の 5 種類のアミノ酸を認識する PBP についてもセンサー化を試みたが、そのうち 3 種類ではリガンド結合による FRET 効率の変化が全く観察されず、センサーとして機能しないことが分かった。PBP は 2 つの lobe からなり、そのヒンジに近い部分でリガンドと結合する。結合により lobe が大きく移動するが、HisJ などの PBP では N 末端と C 末端が同一 lobe に存在しているために、両末端に付加された Venus と ECFP の距離には大きな変化が生じず、ダイナミクスレンジが大きくなると考えられた。

そこで、HisJ に円順列変異を加えることで、N 末端と C 末端が別々の lobe に存在するような蛋白質 cpHisJ を作成できれば、大きなダイナミクスレンジを持つセンサーを開発できる可能性があると考えた。

実際に、cpFLIP-His (Venus-cpHisJ-ECFP) を作成したところ、ダイナミックレンジの拡大が認められた。更に、通常の方法では全く機能しなかった 3 種の PBP を含めて、テストした 6 種の PBP の全てにおいてダイナミックレンジの拡大に成功した。したがって、cpPBP (circularly permuted PBP) を用いるこの手法は一般性の高いものであり、FRET センサー化できる PBP の範囲を拡大する上でも有効な手法になると考えられた (論文 13)。蛍光蛋白質ではなくて FRET センサーの骨格分子自体に円順列変異のような大胆な改変を加えた例はこれまでになく、その意味でも独創的な手法であると云えよう。

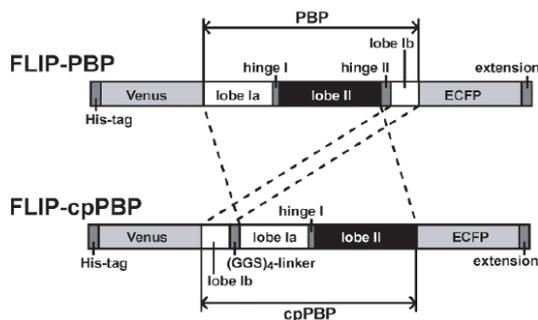


図 3 : cpPBP を利用した代謝物 FRET センサーの開発

一方、計測手法に関しては、フローサイトメーターによる計測に成功し、統計処理に耐え得る数のデータを迅速かつ高感度に取り得る方法を確立した。これを用いて細胞質内 His 濃度の計測を行い、環境中の His 濃度変化に伴うインフラックスの観察、アミノ酸飢餓刺激に伴う細胞内アミノ酸濃度変化と GCN 経路活性化による eIF2 α リン酸化の同時計測などを行った。更に、TOR 経路の阻害剤であるラパマイシンに対する応答の計測に端を発して低温や DNA 傷害等のストレス下での計測を行い、細胞内 His 濃度変化が翻訳速度ときれいな逆相関を示す結果を得た。

一方で、分析化学的手法では取り扱いの難しい不安定代謝物のセンサーの開発のモデルとして、大腸菌の転写因子 MetJ をベースにした SAM(S-adenosylmethionine) センサーの開発を試みた。SAM の結合による MetJ のコンフォメーション変化を FRET で検出することはできなかったが、人工遺伝子回路を用いたセンサーシステムの開発に成功した。これを用いて、更に様々な論理ゲートの構築にも成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Kato, M., Kito, K., Ota, K., Ito, T.: Remodeling of the SCF complex-mediated ubiquitination system by compositional alteration of incorporated F-box proteins, *Proteomics* (査読有) 10, 115-123 (2010)
- ② Okada, S., Ota, K., Ito, T.: Circular permutation of ligand-binding module improves dynamic range of genetically encoded FRET-based nanosensor, *Protein Sci.* (査読有) 18, 2518-2527 (2009)
- ③ Miura, F., Kawaguchi, N., Yoshida, M., Uematsu, C., Kito, K., Sakaki, Y., Ito, T.: Absolute quantification of the budding yeast transcriptome by means of competitive PCR between genomic and complementary DNAs, *BMC Genomics* (査読有) 9, 574 (2008)

- ④ Ota, K., Kito, K., Okada, S., Ito, T.: A proteomic screen reveals the mitochondrial outer membrane protein Mdm34p as an essential target of the F-box protein Mdm30p, *Genes Cells* (査読有) 13, 1075-1085 (2008)
- ⑤ Ito, T., Miura, F., Onda, M.: Unexpected complexity of the budding yeast transcriptome, *IUBMB Life* (査読有) 60, 775-781 (2008)
- ⑥ Kito, K., Ito, T.: Mass spectrometry-based approaches toward absolute quantitative proteomics, *Curr. Genomics* (査読有) 9, 263-274 (2008)
- ⑦ Ota, K., Kito, K., Iemura, S., Natsume, T., Ito, T.: A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins, *Proteomics* (査読有) 8, 3004-3007 (2008)
- ⑧ Kito, K., Kawaguchi, N., Okada, S., Ito, T.: Discrimination between stable and dynamic components of protein complexes by means of quantitative proteomics, *Proteomics* (査読有) 8, 2366-2370 (2008)
- ⑨ Sumimoto, H., Kamakura, S., Ito, T.: Structure and function of the PBI domain, a protein-interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants, *Sci. STKE* (査読有) 2007, re6 (2007)
- ⑩ Kito, K., Ota, K., Fujita, T., Ito, T.: A synthetic protein approach toward accurate mass spectrometric quantification of component stoichiometry of multiprotein complexes, *J. Proteome Res.* (査読有) 6, 792-800 (2007)
- ⑪ Yamaguchi, Y., Ota, K., Ito, T.: A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1: implications for modulation of mating pheromone signaling, *J. Biol. Chem.* (査読有) 282, 29-38 (2007)
- ⑫ Miura, F., Kawaguchi, N., Sese, J., Toyoda, A., Hattori, M., Morishita, S., Ito, T.: A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有) 103, 17846-17851 (2006)
- ⑬ Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S., Chiba, T., Ito, T., Uetz, P.: Transcriptional activators in yeast, *Nucleic Acids Res.* (査読有) 34, 955-967 (2006)
- ⑭ Miura, F., Uematsu, C., Sakaki, Y., Ito, T.: A novel strategy to design highly specific PCR primers based on the stability and uniqueness of 3'-end subsequences, *Bioinformatics* (査読有) 21,

4363-4370 (2005)

[学会発表] (計1件)

Takashi Ito, Unexpected complexity of the budding yeast transcriptome, ASBMB (American Society of Biochemistry and Molecular Biology) 2008, Symposium "Global Systems Biology: Parts" San Diego, Apr 6, 2008.

[図書] (計1件)

① Kito, K., Ito, T.: Methods for protein-protein interaction analysis, *Introduction to Systems Biology* (Ed. Choi, S.), Humana Press, pp.160-182 (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 隆司 (ITO TAKASHI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 90201326

(2) 研究分担者

住本 英樹 (SUMIMOTO HIDEKI)

九州大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30179303

(H17~H19)

紀藤 圭治 (KITO KEIJI)

明治大学・農学部・講師

研究者番号: 40345632

(H21)