

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310117

研究課題名（和文） 細胞内タンパク質ターンオーバーの網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of protein turnover

研究代表者

中東 憲治 (NAKAHIGASHI KENJI)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・准教授

研究者番号：70322740

研究成果の概要（和文）：細胞内に存在するタンパク質のターンオーバー（タンパク質の合成レート及び分解レート、mRNA の翻訳効率）を網羅的に測定する手法を構築した。この手法で大腸菌細胞中の1500種以上のタンパク質のターンオーバーを解析したところ、5%程度の例外を除いて、ほとんどのタンパク質はきわめて安定なことが分かった。嫌気条件から好気条件のように代謝酵素のレベルが大きく変わる場合でも、不要な酵素が分解されることなく存在し続けており、環境に応じたプロテオームの構成変化は合成量の変化によって主に行われていた。

研究成果の概要（英文）：We have developed methods to comprehensively quantify cellular protein turnover, including synthesis rate, degradation rate and translation efficiency of corresponding mRNA. Using these methods we quantified turnover of more than 1500 protein in *E. coli*, and found that most of the protein, excluding about 5% of unstable protein, were quite stable without any degradation. Upon transition from anaerobic to aerobic growth condition, levels of metabolic enzymes changes dramatically. However these changes are brought mostly by changes in synthesis rate but no apparent degradation of unwanted enzymes in central carbon metabolism were observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム発現、タンパク質ターンオーバー、翻訳、タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

細胞内タンパク質の量は、mRNAからの翻訳やプロセッシングを経て合成される量、何らかの機構で分解される量、および細胞増殖による希釈、3つのバランスによって動的に決定される。mRNAの網羅的解析技術の進展に続き、タンパク質の網羅的測定技術も急速に発展しており、両者を測定して相関を調べ

ることも可能になってきた。

我々は、mRNAやタンパク質の量が長時間にわたって変化しない連続培養下において、比較的大量に存在する中心炭素代謝経路の酵素量についても転写後に決定されている割合が少なくないことを示唆していた。しかし、それぞれのタンパク質の合成、分解速度を明らかにしなければ結論は出せなかった。

また、翻訳レベルの調節やタンパク質分解が行われる数々の機構は明らかになってきているが、これらの解析がなされているのは数少ないモデルタンパク質においてだけであり、細胞中に存在するほとんどのタンパク質については翻訳、分解のレベルでどのようなルールに従っているか知られていなかった。

2. 研究の目的

上記の疑問に答えるため、タンパク質の(存在量に加えて)合成量、分解量を網羅的に測定する技術を開発する。この方法を用い、定常培養の大腸菌を用いて、プロテオーム中の個々のタンパク質について、合成、分解速度を網羅的に明らかにする。さらに、環境変化に応じたタンパク質の安定性変化の測定を行って、実測定ベースでプロテオームの維持と変化を支配する機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 菌株と培養条件

大腸菌 BW25113 株より、ロイシン合成経路 (*leuLABCD* 領域) を欠失し、(K-12 由来株ではフレームシフト変異によって不活性化している) *ilvG* 遺伝子を活性のある状態に戻した株を構築、使用した。他に記載のない場合、0.4% glucose, 250 μ M のロイシンを添加した MOPS 培地を用いて 37 $^{\circ}$ C で培養を行った。連続培養では、2L ジャーファーマンター (BMJ02-PI, ABLE 社) を用い、培養液 1L, D(希釈率)=0.2/h で培地交換を行った。1M HCl と NaOH の添加により pH 7 に自動調整し、好気条件では 1L/min の通気、500rpm 攪拌を行い、嫌気条件では通気なし、150rpm 攪拌を行った。

(2) タンパク質サンプル調整と LC-MS/MS 分析

培養液をサンプリング直後に 20%TCA 溶液と混合し、酸不溶分画を SDS-PAGE により 8 切片に分けた後、トリプシン処理、nano-LC-MS/MS による分析を行った。MS/MS データは K-12 株のタンパク質データベースを用いて検索し、由来するペプチド(タンパク質)をアノテーションした。さらに、各ペプチドについて、ラベルされたアミノ酸による同位対の比を定量した。

(3) RNA とポリソームサンプル調整

mRNA の定量解析では、培養液サンプリング直後にホットフェノール法により totalRNA を分離し、rRNA を除去後に断片化、30-50 塩基の RNA をゲル精製して Illumina GAIIx による解析を依頼(タカラバイオ)した。

リボソームによりプロテクトされた mRNA の解析は、タンパク質合成をクロラムフェニコールで停止後、培養液を氷冷し、遠心、菌

体を破碎して遠心によりリボソームフラクションを回収した。ポリソームを RNase により処理した後にショ糖密度勾配遠心を行ってモノソームフラクションを回収、30-50 塩基の RNA をゲル精製して Illumina GAIIx による解析を依頼(タカラバイオ)した。

得られた 75 塩基のリードデータからプライマー部分を除去し、K-12 株ゲノムデータベースに対して検索を行って由来する遺伝子を同定し、各遺伝子のリード数を集計して遺伝子長で割って頻度とした。

4. 研究成果

(1) 定常増殖におけるタンパク質ターンオーバー

① タンパク質全体としてのターンオーバー

連続培養(培養槽に一定量のフレッシュな培地を加え続け、同量の培養液を抜きながら一定の増殖状態を得る培養法)では細胞の状態が変化しないため、細胞内の個々のタンパク質のレベルは一定に保たれており、すなわち、タンパク質合成量は、分解量と細胞の増殖による希釈の合計と釣り合った状態にある。まず、この状態でのタンパク質全体のターンオーバーを測定した。大腸菌 K-12 のロイシン要求性変異株を使い、250mM のロイシンを含む培地をフィードすると、ロイシン濃度によって増殖が制限された定常状態になる(図1)。この後、フィードするロイシンを安定同位体ラベルされたものに置き換えて、定常培

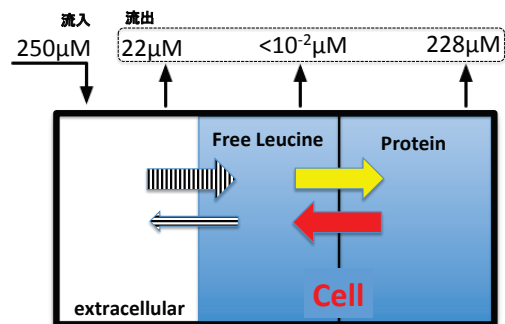


図1 ロイシンの挙動による定常培養のモデル培養槽(外槽)には 1L の培地が存在し、細胞外(白)、細胞内(青)に分けられ、後者はさらに遊離ロイシンとタンパク質を構成するロイシンに分けられる。細胞内外のロイシンは取り込み(縦線矢印)と排出(横線矢印)によって、細胞内遊離ロイシンとタンパク質ロイシンはタンパク質合成(黄矢印)、分解(赤矢印)によって交換される。250 μ M のロイシンを含む培地が供給され、定常状態では3相合計で同濃度のロイシンが流出するので、培養槽全体で250 μ mol のロイシンが存在する。実測により、培養槽、遊離ロイシン、タンパク質ロイシンの量はそれぞれ約 22 μ mol, <math><10^{-2}\mu\text{mol}</math>, 約 228 μ mol と分かった。

養を継続する。一定時間後に、細胞外、細胞内、タンパク質中それぞれのロイシンの同位

対比を測定することで、それぞれのロイシンプールのターンオーバー速度を測定できる。全タンパク質を均質とみなし、ロイシンを複数含むペプチドのターンオーバー速度からタンパク質全体としての分解レート(図1の赤矢印)を計算したところ、分解によるタンパク質の半減期は細胞の倍加時間の10倍~100倍以上と、非常に安定なことが分かった。また、ほとんどのタンパク質は分解せず、一部のタンパク質だけが不安定と仮定したモデルでは、不安定なタンパク質(細胞の倍加時間よりも半減期の短いタンパク質)の割合は、(重量で)約6%以下と推定された。この結果は、定常的な増殖条件では、きわめて少ないレベルのタンパク質分解しか起きず、タンパク質ターンオーバーは合成と、細胞増殖による希釈によってほとんど賄われていることを示している。

② 個々のタンパク質のターンオーバー

次に、個々のタンパク質のターンオーバーについて調べるため、野生株で4回、後述するプロテアーゼ関連変異株で3回の実験を行い、倍化時間後に各タンパク質が新規合成された物に置き換わっている割合を求めた。図2に示したように、ほとんどのタンパク質で新生タンパク質と旧タンパク質の比が1に近く、分解はほとんど起きていないことが分かった。

2回以上の実験で定量できたタンパク質は1506種類あったが、そのうち細胞の倍加時間よりも短い半減期を示したのは61種類(4.1%)しかなかった(図2)。それぞれのタ

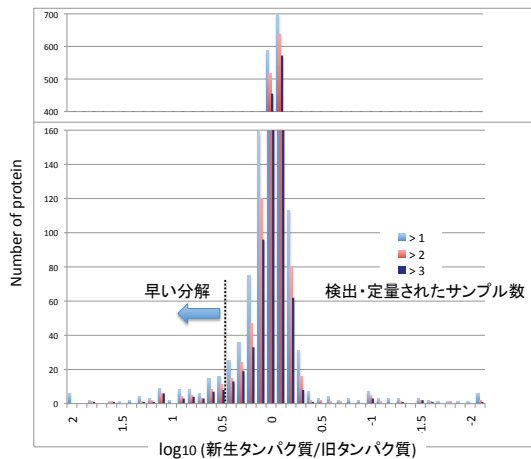


図2 定常培養におけるタンパク質のターンオーバー。ロイシンの同位体を切り替えてから合成されたタンパク質の量と、切り替え前に合成されたタンパク質量の比を横軸に、縦軸にタンパク質の種類数を示した。縦の破線(細胞の倍化時間=分解による半減期)を閾値とし、左側のタンパク質を早いターンオーバーとした。

ンパク質の細胞内レベルについても測定し、

比較したところ、細胞内レベルと安定性に関連は見られなかった(図3)。この割合は①で得た結果とよく一致しているため、タンパク質全体の中で不安定なものは、全タンパク質中の重量においても、種類数でも数%程度と考えられる。

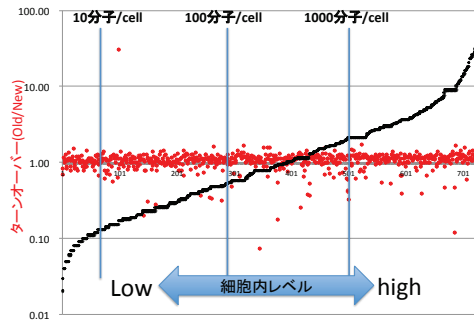


図3 ターンオーバー速度とタンパク質レベルの関連

ターンオーバー速度とタンパク質レベルを示す emPAI スコア¹⁾双方が得られた724タンパク質について、emPAIスコアの順に横軸に並べ、縦軸に emPAI スコア(黒)、ターンオーバー速度(旧タンパク質量/新生タンパク質量)を示した。細胞あたり約10, 100, 1000分子と定量されたタンパク質²⁾の横軸上の位置を青線で示した。

(2) タンパク質分解に関わる機構の解析

① 早い分解を受けるタンパク質の特徴

61タンパク質のうち17種については、既に早い分解を示すことが知られていたが、残りの約40については分解について過去に知られていなかった。また、61のうち19を酵素が占めており、そのうち8種類を Fe-S クラスターを持つ酵素が占めていた。酵素以外でも4つの Fe-S クラスタータンパク質が含まれていた。特に、Radical-SAM 酵素と呼ばれる反応機構で触媒作用を行う Fe-S タンパク質が多く、反応中にラジカルが発生すること、分解速度の速さに関連があると推定される。

② Clp プロテアーゼによるターンオーバー

Clp は、細菌で不溶タンパク質を分解する主要なプロテアーゼの一つと考えられており、プロテアーゼサブユニットである ClpP と基質特異性を決めるサブユニットである ClpX、もしくは ClpA との複合体である。基質特異性サブユニットが欠損した株では、Clp プロテアーゼの天然基質であるタンパク質のターンオーバーが遅くなる。61の不安定タンパク質についてみたところ、clpX 欠損株では9タンパク質、clpA 欠損株では4タンパク質のターンオーバーが顕著に遅くなっていることが確認できた(図4)。これらのタンパク質はそれぞれのサブユニットによって認識、分解されていると考えられる。

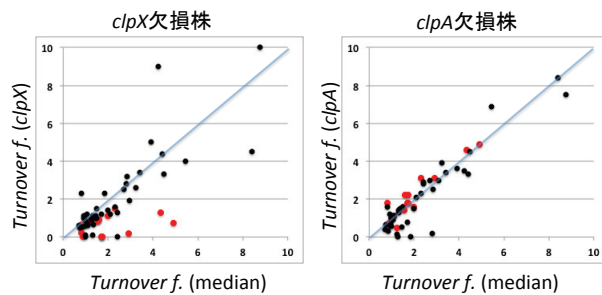


図4 *clpA*, *clpX* 欠損株におけるターンオーバーの変化。速いターンオーバーを示した61タンパク質について、*clpX* 及び *clpA* 欠損株でのターンオーバー速度(縦軸)を全サンプルでの中央値(横軸)と比較した。軸の数値(turnover factor)は細胞倍化時間/タンパク質の半減期によって算出され、数値が大きいほどターンオーバーが速いことを示す。ClpXP に結合することが知られているタンパク質³⁾を赤丸で示した

一方で、*in vitro* の結合実験により、ClpXP 結合するタンパク質が 63 種類報告されている³⁾。そのうち、48 種類は我々の解析でも 3 回以上定量されているが、早いターンオーバーを示したのは、15 種類だけであった(図4 ●)。15 種類のうち 5 種類は *clpX* 欠損株で顕著にターンオーバーが遅くなっていたので、ClpXP に認識され、分解されていることが確認された。他の 10 タンパク質については僅かに分解が遅くなっただけであり、ClpXP プロテアーゼ以外にも分解されることを示唆している。一方、ClpXP に結合することが報告された 63 タンパク質のうち、残りの多くは非常に安定であった。ClpX にはいくつかの認識配列が提唱されているが、それらの配列と、分解を受ける、受けないの間には関連が認められず、分解に必要な配列を情報学的に抽出することは出来なかった。この結果は、ClpX による認識だけでは、ClpXP プロテアーゼによる分解には不十分であり、分解には別のトリガーが必要であることを示唆している。

ここまでの研究で、タンパク質のターンオーバーを網羅的に測定する方法を確立し、数百のタンパク質の測定を行うという本課題の主要目標の一つは達成し、予定を超えて 1000 種以上のタンパク質のターンオーバー測定に成功した。これまでも一つの生物について 1000 以上のタンパク質の分解速度が報告された例はあるが、レポーター遺伝子を使うなどの人工的な系であり、各タンパク質の測定のためそれぞれ実験を行う必要があった。我々の成果は細胞の自然な増殖状態で、同一のサンプルに由来するタンパク質のターンオーバーを測定したものであり、データの意味、応用の可能性双方において利用価値が高い。

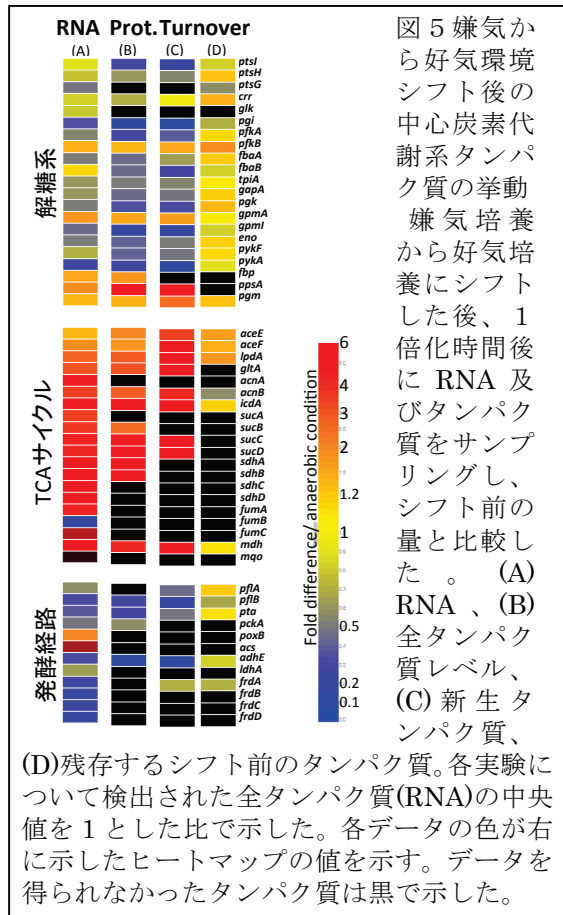
(3)RNA 翻訳効率の影響

タンパク質分解がほとんどおきないという結果から、mRNA 毎の翻訳効率がタンパク質量/mRNA 量の差を生む要因になっていることが示唆された。そこで、mRNA の量とリボソームによって翻訳されている mRNA 量とを比較することにより、翻訳効率がタンパク質レベルに与える影響を実測することにした。翻訳中の mRNA を含むリボソームを細胞から精製し、リボソームにプロテクトされていない RNA を RNase を用いて分解した後、残った mRNA 断片を高速シーケンサによる RNA-seq で解析することで、それぞれのリボソームが翻訳中の mRNA (の部分)配列を定量的に得た。1 サンプルあたり約 2000 万リードの情報が得られ、2500 以上の遺伝子で 100 リード以上の情報を得ることが出来た。一方、同じ培養から得た mRNA 画分を断片化し、同様に RNA-seq による定量を行った。以前の研究²⁾において、細胞内タンパク質レベルを測定した 49 種類の中心代謝系タンパク質について、RNA-seq で得た各遺伝子のリード数とタンパク質レベルの相関係数を調べたところ、mRNA 全体の定量値を使ったときには 0.69 だったのに対して、リボソームによってプロテクトされた断片の定量値を使った場合は 0.74 と僅かに上昇した。mRNA あたりのタンパク質量が特に高いため相関係数を低下させていた 6 タンパク質での改善が著しかったことから、これらのタンパク質の翻訳効率の高さがタンパク質量/mRNA 量の差の要因であったことが示唆された。また、解糖系酵素の平均的な翻訳効率が他の主要代謝経路酵素より高いなど、興味深いデータを得ている。

(4)環境摂動(嫌気-好気シフト)に伴うターンオーバーの変化

これまでの実験で、定常的に増殖している大腸菌では、タンパク質分解はほとんどおきおらず、従ってプロテオームの構成は合成レートによってほとんど決まっていることが示された。では、環境が変化し、細胞がプロテオーム構成を変化させる必要が生じる際にはどうか、嫌気環境下での増殖から好気環境へシフトした後の変化について解析した。嫌気-好気シフトの後の各タンパク質の新規合成量、シフト前に合成されていたタンパク質の残存量を独立に解析することで、環境変化によるプロテオーム再構築に合成、分解がどのように関わっているかを解析した。この環境シフトによって大きく影響を受ける中心炭素代謝系酵素について結果を示す。嫌気から好気へシフトにより、大腸菌は発酵から酸素呼吸へと、エネルギー代謝をシフトする。これに伴い、TCA サイクルが活性化し、酢酸、エタノール合成などの生産(発酵)

が顕著に減少する。解糖系の流量も低下する。嫌気-好気シフトから、倍化時間後に RNA、タンパク質量の変化を調べるとともに、その間の新規合成タンパク質と、分解され残ったタンパク質量をシフト前(嫌気状態)と比較したのが図5である。RNA 量、タンパク質量ともに、TCA サイクル遺伝子(タンパク質)の発現が上昇し、発酵経路及び解糖系発現が低下しており(図 5(A, B))、上記の代謝変化と良く一致している。また、この時間に新たに合



成されたタンパク質の量についても、同様の变化を示しており(図 5C)、新たな環境に適応したタンパク合成が行われていた。一方、シフト後にタンパク質レベルが大きく減少する発酵経路や解糖系酵素についても顕著な減少は見られなかった(図 5D)。

この結果は、中心代謝を大きく変えるような環境変化を受けても、タンパク量の変化は主に合成量の変化が担っており、タンパク質分解の寄与は少ないことを示唆している。同様の現象は中心炭素代謝以外でも観察されたことから、外的環境が変化し、プロテオーム再構成の必要が生じた場合、必要に応じた合成量の変化は速やかに行われるが、タンパク質の選択的な分解は顕著でなく、不要タンパク質の除去は細胞増殖に伴う希釈が主な役割を果たしていると考えられる。

(5)今後の展望

本研究により、定常状態だけでなく、各タンパク質の量が変化する条件下でも、タンパク質の合成や分解を独立して、網羅的に解析出来ることを示した。定常状態や、嫌気から好気環境のシフトでは、タンパク質の分解がプロテオームの再構築に限定的な寄与しかしないという結果を得たが、酵母など真核生物では平均的なタンパク質の半減期がずっと短いことが報告されている。原核生物についても、窒素や炭素枯渇など、タンパク質の分解が起きると考えられている条件で起きる現象を今後解析することで、様々な条件におけるタンパク質合成と分解それぞれの役割を明らかにしたい。

今回行った、リボソームプロテクションによる網羅的な翻訳効率の解析は高速シーケンサーの普及により今後注目される研究対象と考えている。翻訳効率を明らかにするだけでなく、mRNA の特定の部分の翻訳を細かく解析することも可能なことが酵母において報告されているが、今回、使用する RNase 等の検討により、原核生物である大腸菌でも同等の実験を行うことが可能になった。LC-MS ベースのプロテオミクス解析手法と組み合わせることによって、今後、環境変化による翻訳効率の変化など、RNA とタンパク質のレベルを経時的に測定するだけでは解析できなかった、遺伝子発現のダイナミクスを明らかに出来ると考えている。

参考文献

- 1). Ishihama Y, et al. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. Mol Cell Proteomics 4(9):1265-1272.
- 2). Ishii N, et al. (2007) Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. Science 316(5824):593-597.
- 3). Flynn JM, Neher SB, Kim YI, Sauer RT, & Baker TA (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. Mol Cell 11(3):671-683.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ①Fujiwara K, Ishihama Y, Nakahigashi K, Soga T, Taguchi H (2010) A systematic survey of in vivo obligate chaperonin-dependent substrates., EMBO J 29(9): 1552-1564, 査読有

② Toya Y, Ishii N, Nakahigashi K, Hirasawa T, Soga T, Tomita M, Shimizu K (2010) ¹³C-metabolic flux analysis for batch culture of *Escherichia coli* and its Pyk and Pgi gene knockout mutants based on mass isotopomer distribution of intracellular metabolites. *Biotechnol Prog* 26(4): 975-992, 査読有

③ Nakahigashi K, Toya Y, Ishii N, Soga T, Hasegawa M, Watanabe H, Takai Y, Honma M, Mori H, Tomita M (2009) Systematic phenome analysis of *Escherichia coli* multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism. *Mol Syst Biol* 5: 306, 査読有

④ Yamamoto N, Nakahigashi K, Nakamichi T, Yoshino M, Takai Y, Touda Y, Furubayashi A, Kinjyo S, Dose H, Hasegawa M, Datsenko KA, Nakayashiki T, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2009) Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol Syst Biol* 5: 335, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① Kenji Nakahigashi, Yasushi Ishihama, Toya Yoshihiro and Masaru Tomita, Degradation and turnover of protein in growing and non-growing *E. coli* cell after environmental perturbation., BMB2010, 神戸, 2010 12/9

② Kenji Nakahigashi, Comprehensive analysis of protein turnover (and its effect on metabolic simulation)., UK-Japan Symposium of Systems and Synthetic Biology, Guildford UK, 2010 9/14

③ 中東 憲治, 石濱 泰, 本間 雅之, 高井 幸, 富田 勝, “Comprehensive analysis of protein turnover in aerobic and anaerobic continuous culture of *E. coli*” 第 3 2 回日本分子生物学会年会, 横浜 2009 12/11

④ Kenji Nakahigashi, Systematic phenome analysis of *E. coli* multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism, UK-Japan Symposium of Systems Biology, Osaka, 2009 9/23

⑤ Kenji Nakahigashi, Robustness of bacterial metabolic network. Views from

Multi-Omics analysis., Design and Engineering of Microbial Genomes Academia Sinica Workshop, Taipei, Taiwan, 2008 11/26

⑥ 中東憲治, Multi-Omics 解析から見えてくるバクテリア代謝の頑強性, 第 18 回玉川微生物資源ワークショップ, 三島, 2008 10/31

⑦ Kenji Nakahigashi, Yasushi Ishihama, Nobuyuki Ishii and Masaru Tomita, Protein-turnoveromics; global analyses of protein turnover in *E. coli*, IECA2008, Hixton UK, 2008 9/26

[図書] (計 3 件)

① 中東 憲治, 富田 勝 (2010) マルチオミクス (multi-omics) 解析で見えてきた大腸菌の遺伝・環境変化に対する応答機構 ; 遺伝子医学 MOOK ; 株式会社メディカルドゥ, 16: 52-158

② Mori H, Yamamoto N, Dose H, Nakahigashi K, Datsenko KA, Wanner BL (2009) Resources for *Escherichia coli* Systems Biology. In *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*, Yup LS (ed), pp 87-97. Springer

[その他]

現在、Ecoli multiomics-database (<http://ecoli.iab.keio.ac.jp/>) 上に、可視化したデータを公開する準備中である

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中東 憲治 (NAKAHIGASHI KENJI)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・准教授
研究者番号 : 7 0 3 2 2 7 4 0

(2) 研究分担者

石濱 泰 (ISHIHAMA YASUSHI)
京都大学大学院・薬学研究科・教授
研究者番号 : 3 0 4 3 9 2 4 4

(3) 連携研究者

該当なし