

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580099
 研究課題名(和文) 翻訳後N-ミリスチル化反応を介する新規なアポトーシス制御機構の解析
 研究課題名(英文) Analysis of novel regulatory mechanism of apoptosis mediated by the posttranslational N-myristoylation of protein
 研究代表者
 内海 俊彦 (UTSUMI TOSHIHIKO)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20168727

研究成果の概要(和文)：

本研究では翻訳後 N-ミリスチル化がアポトーシス過程で多くのアポトーシス関連タンパク質に生ずる普遍的な翻訳後修飾であるか否かについて検討した。その結果、これまで、Bid、アクチン、ゲルズリン 等のごく少数のタンパク質に生ずる例外的な翻訳後修飾であると考えられてきた翻訳後 N-ミリスチル化は、アポトーシス過程で、多くのカスパーゼ基質に生じる普遍的なタンパク質翻訳後修飾であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

Protein N-myristoylation has been recognized as a cotranslational protein modification. Recently, it was demonstrated that protein N-myristoylation could also occur posttranslationally during apoptosis as in the case of BID, actin, gelsolin and PAK2. The posttranslational N-myristoylation has been shown to play a crucial role in the biological activity of BID, gelsolin, and PAK2. However, it was not fully accepted that the reaction is a universal posttranslational modification frequently observed during the apoptosis pathway.

In this study, we established the strategy for genome-wide screening of posttranslationally N-myristoylated proteins. Using this strategy, we could successfully demonstrate that the posttranslational myristoylation of caspase cleavage product represents a universal mechanism widely used to regulate cellular apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：翻訳後 N-ミリスチル化, アポトーシス, 脂質修飾, ゲルズリン, アクチン

1. 研究開始当初の背景

アポトーシス誘導因子として知られる Bid がカスパーゼ切断に伴い「翻訳後 N-ミリスチル化」と呼ばれる新しいタイプの脂質修飾を生じ、ミトコンドリアに移行し、ミトコンドリアを介するアポトーシスを誘導することが示されている。これまで

に我々は、Bid 以外に細胞骨格系タンパク質であるアクチンとゲルズリンがアポトーシスの過程で翻訳後 N-ミリスチル化を生じることを発見した。さらに、これらの修飾はアクチンではミトコンドリアへの移行に、また、ゲルズリンではアポトーシス阻害活性に直接関与することを見出し、

翻訳後 N-ミristol化が、細胞骨格系タンパク質を介したアポトーシスの制御に重要な役割を演じている可能性を示した。しかしこれらの反応の分子機構や、翻訳後 N-ミristol化が、アポトーシス過程で生ずる普遍的な翻訳後修飾であるか否かについては明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、アクチンとゲルゾリンの翻訳後 N-ミristol化を介するアポトーシス制御の分子機構の解明をめざすとともに、ヒト細胞中に存在する、アポトーシス過程におけるカスパーゼ切断に伴い翻訳後 N-ミristol化を生ずるタンパク質の網羅的探索を行い、翻訳後 N-ミristol化がアポトーシス過程で機能する普遍的な翻訳後修飾であるか否かについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質 N-ミristol化は、無細胞タンパク質合成系、あるいは遺伝子導入細胞における³[H]メチオニン酸を用いた代謝標識により検出した。タンパク質間の相互作用は無細胞タンパク質合成系、遺伝子導入細胞で発現した tag 付加タンパク質を用いて抗 tag 抗体によるプルダウンアッセイにより検討した。また、タンパク質の細胞内局在は抗 tag 抗体を用いた免疫蛍光染色、あるいは EGFP 融合タンパク質を用いた蛍光顕微鏡観察により検討した。細胞のアポトーシスはヘキスト染色、DNA ラダー形成等により検出した。

4. 研究成果

翻訳後 N-ミristol化されたゲルゾリン(t-ゲルゾリン)によるアポトーシス抑制作用について解析を行った。まず t-ゲルゾリンと特異的に相互作用するタンパク質の探索を行ったところ、t-ゲルゾリンと同様翻訳後 N-ミristol化されるがその生理的機能が同定されていない t-アクチンと t-ゲルゾリンとが相互作用し、ミトコンドリアへと移行する可能性が示唆された。しかし、プルダウンアッセイにより t-ゲルゾリンと t-アクチンとの結合を検討したところ、明確な直接的な結合は検出されなかった。この両者の相互作用の t-ゲルゾリンによるアポトーシス抑制作用における役割については今後の検討課題である。また、ミトコンドリアへの特異的局在を示す t-アクチンのミトコンドリア局在機構の解明を目的として、種々の欠失変異体を作成し、その細胞内局在を検討した結果、t-アクチンのミトコンドリア移行には、そのほぼ全長のタンパク質が必要であることが明らかになり、t-アクチンのミトコンドリア局在機構は、ミトコンドリアタンパク質に通見られる典型的なミトコンドリア移行シグナルを介した局在機構とは異なることが明らかになった。

続いて生体内に存在する翻訳後 N-ミristol化を生ずるタンパク質の網羅的な同定を行い、翻訳後 N-ミristol化がアポトーシス過程で機

能する普遍的な翻訳後修飾であるか否かについて検討を行った。この際、翻訳後 N-ミristol化タンパク質の同定は、(1) カスパーゼ基質のデータベースである Casbase に登録された約 300 のカスパーゼ基質の中からカスパーゼ切断後、Gly で始まる N-ミristol化コンセンサスマチーフを持つタンパク質を見出す、あるいは(2) NCBI データベースより得たヒトの全タンパク質の配列データを対象として、カスパーゼ切断部位の直後に N-ミristol化コンセンサスマチーフが存在する配列を計算機により検索する、という2つの手法により行った。

その結果、Casbase に登録された約 300 のカスパーゼ基質の中から見出された候補タンパク質では、PKC ϵ といった細胞情報伝達や、アポトーシス過程において重要な機能を果たすタンパク質が、thapsigargin 等のアポトーシス刺激に伴いカスパーゼにより切断され、その切断断片に翻訳後 N-ミristol化が生じる事が示された。また NCBI データベースに収録されたヒト全タンパク質の配列データの検索により見出された候補タンパク質では、SHFM3 といった、これまでカスパーゼ基質であることが知られていなかった、形態形成に関与するタンパク質がエトポシド等のアポトーシス刺激に伴いカスパーゼ切断され、その切断断片が翻訳後 N-ミristol化を生じる事が示された。これらの翻訳後 N-ミristol化されたカスパーゼ切断断片のうち tPKC ϵ および tSUFU についてその細胞内局在を免疫染色法により検討した結果、これらはいずれも細胞質に局在することが示され、多くの N-ミristol化タンパク質が局在する原形質膜、オルガネラ膜とは異なることが明らかになった。

以上の結果から、これまで、Bid, アクチン, ゲルゾリン 等のごく少数のタンパク質に生ずる例外的な翻訳後修飾であると考えられてきた翻訳後 N-ミristol化は、アポトーシス過程で、多くのカスパーゼ基質に生じる普遍的なタンパク質翻訳後修飾であることが明らかになった。今後、これらの新たに見出された翻訳後 N-ミristol化を生ずるタンパク質のアポトーシス過程における生理的機能の解明が期待される。

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 9 件)

- ① Suzuki, T., Ezure, T., Ando, E., Nishimura, O., Utsumi, T., Tsunasawa, S. Preparation of ubiquitin-conjugated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *Journal of Biotechnology* **145**, 73-78, 2010 査読有
- ② Fujita, H., Shiba, D., Utsumi, T., Ogino, T., Ogawa, T., Yasuda, T., Utsumi, K.,

- Sasaki, J. Alpha-tocopheryl succinate induces rapid and reversible phosphatidylserine externalization in histiocytic lymphoma through the caspase-independent pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* **333**, 137-148, 2010 査読有
- ③ Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., Utsumi, T., Nishimura, O., Tsunasawa, S. Development of an Insect Cell-Free System. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **11**, 279-284, 2010 査読有
- ④ Suzuki, T., Moriya, K., Nagatoshi, K., Ohta, Y., Ezure, T., Ando, E., Tsunasawa, S., Utsumi, T. Strategy for comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *Proteomics* **10**, 1780-1793, 2010 査読有
- ⑤ Moriya, K., Tsubota, T., Ishibashi, N., Yafune, A., Suzuki, T., Kobayashi, J., Shiotsuki, T., Utsumi, T. Bombyx mori Ras proteins, BmRas1, BmRas2 and BmRas3 are neither farnesylated nor palmitoylated but are geranylgeranylated. *Insect Molecular Biology* **19**, 291-301, 2010 査読有
- ⑥ Yamauchi, S., Fusada, N., Hayashi, H., Utsumi, T., Uozumi, N., Endo, Y., Tozawa, Y. Characterization of the consensus motif for N-myristoylation of plant proteins with a cell-free system based on wheat germ extract. *FEBS Journal* **277**, 3579-3607, 2010 査読有
- ⑦ 内海俊彦 無細胞タンパク質合成系を用いた脂質修飾タンパク質の網羅的探索と機能解析 *生化学* **82**, 799-813, 2010 査読有
- ⑧ Amo, T., Kawanishi, N., Uchida, M., Fujita, H., Oyanagi, E., Utsumi, T., Inoue, K., Shuin, T., Utsumi, K., Sasaki, J. Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by Mn²⁺, deferoxamine, and NOC-18 in human histiocytic lymphoma cell line U937. *Cell Biochemistry and Function* **27**, 503-515, 2009 査読有
- ⑨ Fujita, H., Shiosaka, M., Ogino, T., Okimura, Y., Utsumi, T., Sato, E., Akagi, R., Inoue, M., Utsumi, K., Sasaki, J. Alpha-Lipoic acid suppresses 6-hydroxydopamine-induced ROS generation and apoptosis through the stimulation of glutathione synthesis but not by the expression of heme oxygenase-1. *Brain Res.* **1206**, 1-12, 2008 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 山本卓生, 守屋康子, 鈴木崇, 安藤英治, 内海俊彦 N-ミリストイル化に依存して細胞形態変化を誘導するヒト由来タンパク質の探索 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7 日 神戸市 神戸国際会議場
- ② 木許真由美, 岡村剛, 乗安義実, 守屋康子, 内海俊彦 N-ミリストイル化および S-パルミトイル化による二重の脂質修飾を生ずるヒト由来タンパク質の網羅的探索法 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7 日 神戸市 神戸国際会議場
- ③ 松永由佳梨, 守屋康子, 鈴木崇, 安藤英治, 内海俊彦 AIF 関連タンパク質 AMID 及び AIFL は N-ミリストイル化され特異的細胞内局在を示す 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7 日 神戸市 神戸国際会議場
- ④ Moriya, K., Suzuki, T., Ando, E., Utsumi, T. Strategy for comprehensive identification of functional human N-myristoylated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. The 12th IUBMB, 21st FAOBMB & ComBio2010 Conferences 2010 年 9 月 29 日 Melbourne, Australia, Melbourne Exhibition & Convention Center
- ⑤ 永利圭, 守屋康子, 太田伊宣, 鈴木崇, 内海俊彦 N-ミリストイル化された膜貫通タンパク質 Lunapark の膜上トポロジーの解析 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 28 日 東京都 東京大学
- ⑥ 鈴木崇, 江連徹, 伊東昌章, 四方正光, 安藤英治, 西村紀, 内海俊彦, 網澤進 昆虫無細胞タンパク質合成系に存在するカスパーゼ様活性の同定 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 30 日 東京都 東京大学
- ⑦ 内海俊彦 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質脂質修飾の網羅的解析 日本蚕糸学会第 75 回関西支部・第 65 回九州支部合同大会 2009 年 11 月 12 日 山口市 山口大学学生会館
- ⑧ 守屋康子, 坪田拓也, 石橋直人, 八舟宏典, 太田伊宣, 鈴木崇司, 塩月孝博, 内海俊彦 カイコ Ras タンパク質 BmRas1, BmRas2, BmRas3 に生ずる脂質修飾の解析

- 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸市 神戸ポートアイランド
- ⑨ 内海俊彦, 鈴木崇, 永利圭, 山本卓生, 木許真由美, 松永由佳梨, 安藤英治, 守屋康子 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリストイル化タンパク質の網羅的同定 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸市 神戸ポートアイランド
- ⑩ Moriya, K., Tsubota, T., Ishibashi, N., Yafune, A., Suzuki, T., Kobayashi, J., Shiotsuki, T., Utsumi T. Analysis of lipid modification occurs on Bombyx mori Ras proteins, BmRas1, BmRas2, and BmRas3. IUBMB 2009 2009 年 8 月 4 日 上海(中国)Shanghai International Convention Center
- ⑪ 松永由佳梨, 木許真由美, 山本卓生, 守屋康子, 内海俊彦 ヒト AIF2(apoptosis-inducing factor 2) は N-ミリストイル化されている 第 50 回日本生化学会中国・四国支部例会 2009 年 5 月 15 日 鳥取市 とりぎん文化会館
- ⑫ 守屋康子, 鈴木崇, 永利圭, 安藤英治, 内海俊彦 無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリストイル化タンパク質の網羅的同定法の確立 第 50 回日本生化学会中国・四国支部例会 2009 年 5 月 15 日 鳥取市 とりぎん文化会館
- ⑬ 守屋康子, 坪田拓也, 石橋直人, 八舟宏典, 太田伊宣, 鈴木崇, 小林淳, 塩月孝博, 内海俊彦 カイコ Ras タンパク質に生ずる脂質修飾の解析 第 50 回日本生化学会中国・四国支部例会 2009 年 5 月 15 日 鳥取市 とりぎん文化会館
- ⑭ 内海俊彦, 永利圭, 柿原圭介, 村田賢祐, 鈴木崇, 安藤英治, 守屋康子 脂質修飾を生ずる膜貫通タンパク質の網羅的同定法の確立. 日本農芸化学会 2009 年度大会 2009 年 3 月 29 日 福岡市 福岡国際会議場
- ⑮ 守屋康子, 石橋直人, 八舟宏典, 太田伊宣, 村田賢祐, 鈴木崇, 内海俊彦 タンパク質プレニル化の解析における無細胞タンパク質合成系の有用性. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 12 日 神戸市 神戸ポートアイランド
- ⑯ 永利圭, 柿原圭介, 村田賢祐, 鈴木崇, 安藤英治, 守屋康子, 内海俊彦 N-ミリストイル化された膜貫通タンパク質の探索. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 2008 年 12 月 12 日 神戸市 神戸ポートアイランド
- ⑰ 太田伊宣, 守屋康子, 石橋直人, 八舟宏典, 鈴木崇, 内海俊彦 昆虫由来無細胞タンパク質合成系を用いた Rab タンパク質のプレニル化の検出. 日本農芸化学会中四国支部 2008 年度支部大会 2008 年 9 月 13 日 鳥取市 鳥取大学
- ⑱ Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., Utsumi, T., Nishimura, O., Tsunasawa, S. Posttranslational modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by MALDI-TOF MS. The joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science and 4th Asian-Oceania Human Proteome Organization 2008 年 6 月 25 日 Cairns- Australia, Cairns convention center
- ⑲ 内海俊彦 無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質翻訳後修飾の解析. 第 8 回日本蛋白質科学会年会 2008 年 6 月 12 日 東京都 タワーホール船堀
- ⑳ 惣福梢, 守屋康子, 石橋直人, 八舟宏典, 鈴木崇, 内海俊彦 アポトーシス過程で翻訳後 N-ミリストイル化を生ずるタンパク質の網羅的同定法の確立. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会 2008 年 5 月 17 日 高松市 アルファあなぶきホール

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内海 俊彦 (UTSUMI TOSHIHIKO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20168727

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし