

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号： 32682
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010 年度 ～ 2012 年度
 課題番号： 22510207
 研究課題名（和文） 絶対量計測に基づく比較プロテオミクスによる生体内代謝経路の制御機構の解明
 研究課題名（英文） Analysis of regulation mechanism for metabolic pathway based on comparative proteomics for protein abundance
 研究代表者
 紀藤 圭治 (Kito Keiji)
 明治大学・農学部・専任講師
 研究者番号： 40345632

研究成果の概要（和文）：

本研究では、複数種の酵母について異なる培養条件でのタンパク質発現量を比較し、種間におけるプロテオームの多様性を解析した。*S. cerevisiae* を含め *Saccharomycetaceae* 科に属する 8 種の酵母のグルコース培地での増殖速度は 1~1.5 倍程度しか違いがなかったのに対し、グリセロール培地および酢酸培地では、*S. cerevisiae* および同属の 3 種の酵母のほうが属の異なる 4 種の酵母より増殖速度が 2~3 倍遅かった。グリセロールを炭素源としたとき、*S. cerevisiae* ならびに同属の酵母 1 種 (*S. mikatae*) に対し、属の異なる酵母 (*K. waltii*) において、主にミトコンドリアタンパク質や酸化ストレス応答因子などの発現量に違いがあった。これら一群のタンパク質が種間での増殖速度の差異に関わっていることが示唆され、現在それらの増殖速度への影響を解析している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed proteome expression pattern for multiple yeast species grown on different culture conditions to understand proteome differences involved in interspecies varieties. Eight yeast species grew with comparable growth rate on glucose medium. In contrast, four species of *Saccharomyces* genus, including *S. cerevisiae*, showed slow growth rate by two-to three-fold on glycerol and acetate medium, compared to four species belonging to different genus. Some groups of proteins involved in mitochondrial metabolic pathway and response to oxidative stress showed different abundance between *Saccharomyces* and other genus when grown on glycerol. It is suggested that such differences in abundance of proteins with specific functions could be responsible for disparity of growth rate among yeast species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子生物学

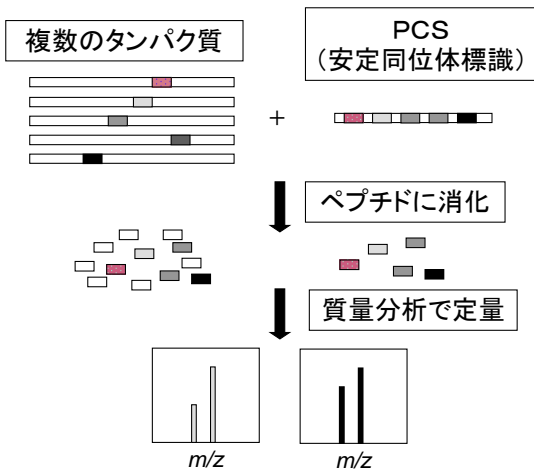
科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード： 比較プロテオミクス、代謝経路、酵母、質量分析

1. 研究開始当初の背景

質量分析を中心とした近年の技術進歩により、タンパク質の大規模な定量解析が可能となってきた。しかしながら、それらは同一生物種内における異なる細胞・組織間での定量解析、または同一細胞における異なる培養条件間での定量解析例がほとんどである。一方で、異なる生物種間でのプロテオームの定量的解析、即ち比較プロテオミクスについてはこれまで殆ど例がなかった。その理由として、従来の定量的プロテオミクス解析技術は、同一タンパク質の量を比較することを得意とするが、異なるタンパク質どうしの存在量の比較が難しいという点が挙げられる。したがって、非常に近縁の種である場合を除き、異なる生物種間でアミノ酸配列の異なるオーソログどうしの量比を正確に比べることが難しい。

研究開始の以前より、質量分析を用いてタンパク質の系統的な絶対定量解析を可能にする独自の戦略として、ペプチド連結型人工標準タンパク質を用いた PCS-MS 法の開発を進めてきた(参考文献1)。定量対象となる多数のタンパク質について効率よくデザイン・調製した人工タンパク質を安定同位体標識した既知量の標準として用いる(図1)。このような絶対量計測技術にもとづけば、複数の異なる生物種において配列の異なるそれぞれのオーソログ間での量的差異を調べること、即ち比較プロテオミクスが可能となる。



る。

図1 PCS-MS 法

2. 研究の目的

酵母には、嫌氣的条件下、およびグルコース存在下では好氣的環境においても発酵し増殖する種と、好氣的条件下でのみ増殖するものがある。前者の種では、グルコースが

枯渇した場合においてのみ、TCA 回路や酸化的リン酸化などの遺伝子発現が増加する。一方で、後者の種では、TCA 回路と酸化的リン酸化の遺伝子発現が常に活性化された状態となっている。また、前者の種はエタノールなどの非発酵性物質を炭素源とした場合の増殖速度が遅い。

このように、酵母の種間において代謝の特徴は大きく異なっている。そこで、以下3点を研究の具体的な研究目的とした。

(1) 8種の酵母を対象に、解糖系、発酵、TCA 回路、酸化的リン酸化に関わる酵素について、その定量解析を実現するために、解析システムの感度および精度の向上を図る。

(2) これらの酵素群について各種炭素源(グルコース、グリセロール、エタノールなど)存在下での各酵素の定量解析を行うとともに、種間の違いに関与する代謝酵素群を見出す。

(3) 転写産物の定量解析とタンパク質代謝回転速度の計測により、発現量の制御機構の差異を解析する。

(4) 特徴的発現パターンを示す代謝酵素群について、発現量を人為的に操作し、代謝状況および増殖速度への影響を精査する。

3. 研究の方法

(1) 定量解析の感度と網羅性の向上

解糖系、発酵、TCA 回路、酸化的リン酸化に関わる全ての酵素の定量解析を実現するために、タンパク質試料をトリプシンでペプチドに消化したものを、液相の等電点電気泳動(OFFGEL システム)を用いて多数に分離した。得られた24分画について個別にLC-MS/MS 分析を計24回を行い、得られたデータを統合して全タンパク質の同定結果とした。

(2) 各培養条件での増殖速度の測定

S. cerevisiae と同属の3種の酵母、および同属の異なる4種の酵母の計8種について(図2)、各種炭素源(グルコース(2%)、グリセ



ロール(3%)、エタノール(3%)、酢酸(2%)を含んだ培地での増殖速度を計測した。

図2 酵母の系統図

(3) 種間におけるプロテオーム発現量の比較解析

グルコース培地またはグリセロール培地で培養した3種の酵母 (*S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *K. waltii*) から抽出したタンパク質をトリプシンで消化し、OFFGELシステムにより24フラクションに分画後にLC-MS/MSで分析した。ペプチドの同定頻度から、各タンパク質の存在量を数値化し、種間でのオーソログ間の存在量を比較した。同時に、本非標識定量結果をPCS-MS法による定量データと比較し、その精度を評価した。

4. 研究成果

(1) 定量解析の感度と網羅性の向上

OFFGELシステムを用いた分画により、検出されたタンパク質数が約700種類から約3000種類へと増加し、検出の網羅性が約4倍向上した。解析に用いるタンパク質試料の量を比較したところ、250 µg と 750 µg とで検出タンパク質数に大差なかったことから、1 mg 以下のタンパク質で十分であることが分かった。さらに、2種類以上のペプチドが検出されたタンパク質の割合が、OFFGELシステムを用いた分画により50%から75%へと向上し、より信頼性の高い同定結果を得ることができた。

また、解糖系、発酵、TCA サイクル、酸化リン酸化などの代謝経路に関わる約90種類の酵素について、その約90%が検出可能となった。さらに、各タンパク質で検出されるペプチド数も平均して約4倍に増加し、より精度の高い定量解析が期待できた。

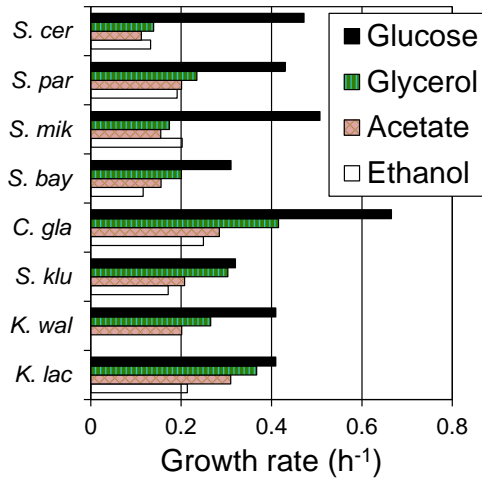
以上より、代謝関連酵素群の定量解析に必要な感度を有する分析システムを構築することができた。

(2) 各培養条件での増殖速度の測定

酵母計8種について、グルコース培地、グリセロール培地、エタノール培地、酢酸培地での増殖速度を計測した。グルコース培地では種間での増殖速度の差異は1.5倍以下であった(図3)。一方で他の培地では、*S. cerevisiae* および同属の3種の酵母のほうが属の異なる4種の酵母より増殖速度が2~3倍遅かった(図3、未発表データ)。*S. cerevisiae* から遠縁になるほど増殖速度が速くなる傾向があった。なかにはグルコース培地での増殖速度とほとんど差のない種もあった。

(3) 種間におけるプロテオーム発現量の比較解析

いずれの種においても、グルコース培地に対しグリセロール培地において、TCA サイクル、グリオキシル酸回路、酸化リン酸化、グリセロール代謝、脂肪酸酸化などに関わる



酵素群の発現量が増加していた。

図3 酵母の増殖速度

一方で、グリセロールを炭素源としたとき、種間 (*S. cerevisiae* と *S. mikatae* 対 *K. waltii*) で特異的に発現量の異なる複数の代謝酵素群を見出すことができた(図4、未発表データ)。その中にはペントースリン酸経路を担う酵素があったことから、ペントース(リボースとキシロース)をグリセロール培地に供給したところ、種特異的に増殖速度の改善効果が見られた(図5、未発表データ)。このことより、ペントースリン酸経路の維持がグリセロールを炭素源としたときの生育に適していることが示唆された。

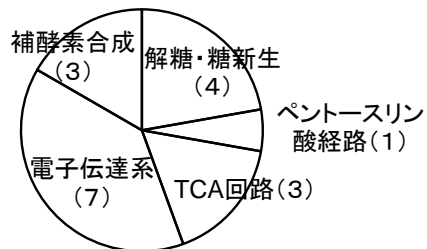


図4 種特異的な発現パターンを示した代謝酵素の数

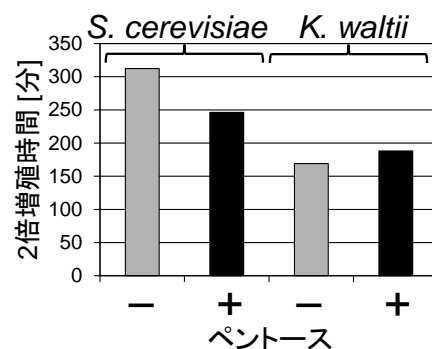


図5 ペントース補充による増殖速度の改善効果

代謝経路以外では、ミトコンドリアへのタンパク質輸送または酸化ストレス応答因子が、グルコース・グリセロール培地の少なくともいずれかで、種間 (*S. cerevisiae* と *S. mikatae* 対 *K. waltii*) で発現量に差がみられた。ミトコンドリア機能全般の向上と、さらには呼吸代謝による酸化ストレス応答の亢進による生存率の向上が、グリセロール培地での生育に適しているのではないかと考えられた。

(4) 比較プロテオミクスから見えてくるもの

単一種におけるタンパク質発現パターン解析からも、それぞれの環境に必要となる一群のタンパク質を明らかにすることは可能である。一方で、今回の解析では種間での比較からのみ見出され発現パターンの差異があった。例えば、*S. cerevisiae* ではグルコース培地とグリセロール培地で差がなかったにも関わらず、グリセロール培地において *S. cerevisiae* と *K. waltii* で発現量に大きな違いがみられたものが複数あった (ペントースリン酸経路、TCA サイクル、グリオキシル酸回路、糖新生の代謝酵素)。また、ミトコンドリアタンパク質輸送や NAD 生合成に関わるタンパク質群は、種内では炭素源に関わらず発現量に違いはなく、種間においてのみその差が検出された。

単に同一種の異なる条件間での発現パターン解析では不十分であり、今回の研究課題で試みた種間での比較プロテオミクスが、タンパク質の機能解析には非常に有効なアプローチであることを示すことができた。本アプローチはまだ報告例が少ないが、今後のプロテオミクスの重要な戦略になっていくことは間違いない。

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)

- 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* 10, 115-123 (2010).

[学会発表] (計3件)

国内

- ① 大西美帆子、伊藤遼、長谷川勇輔、正岡昌一郎、紀藤圭治「酵母種間における比較プロテオミクス」、2012年7月26-27日、日本プロテオーム学会2012年大会

- ② 大西美帆子、伊藤遼、長谷川勇輔、鈴木一司、野原健弘、紀藤圭治「酵母種間における代謝経路の比較プロテオミクス」、2012年12月11-14日、第35回日本分子生物学会年会

海外

- ① Keiji Kito, Takashi Ito. Hierarchical Use of Peptide-concatenated Standard (PCS) for Absolute Protein Quantification with Mass Spectrometry. September 2010. In Human Proteome World Congress Sydney 2010.9.21

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
該当事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紀藤 圭治 (KITO KEIJI)
明治大学・農学部・専任講師
研究者番号：40345632

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：