

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26505002

研究課題名(和文) 水晶体クリスタリンプロテオーム(クリスタローム)解析による新しい生物分類学の展開

研究課題名(英文) Development of new biological taxonomy by crystalline crystallin proteome (Crystallome) analysis

研究代表者

田中 幸枝 (Tanaka, Yukie)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：10197486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：水晶体構造タンパク質クリスタリンは、個々の生物種によりその進化の過程で既存のタンパク質が無作為に転用されてきた。ウシガエル特異的クリスタリンの起源タンパク質を解明するため各組織中に存在しているクリスタリン様タンパク質のmRNA配列を解析しその特性を分析した。クリスタロームの裏付けとなるようなプロテオーム解析法として、リジン残基のアミノ基を特異的に標識する新規の安定同位体ラベリング試薬Py-Tagについての評価を行い、ペプチド・蛋白への応用に進展させるべく基礎データを収集した。その後、クリスタリン解析への応用にも発展させようと考えた。

研究成果の概要(英文)：Lens crystalline protein Crystallin has been diverted to existing proteins randomly during their evolution depending on individual species. In order to elucidate the origin protein of bullfrog specific γ -crystallin, mRNA sequence of γ -crystallin-like protein present in each tissue was analyzed and its characteristics were analyzed. As a proteome analysis method to support crystallome, we will evaluate Py-Tag, a novel stable isotope labeling reagent that specifically labels the amino group of lysine residues, and proceed to application to peptides and proteins. Basic data was collected. After that, I thought about developing it for application to crystallin analysis.

研究分野：生化学

キーワード：クリスタリン プロテオーム

1 . 研究開始当初の背景

眼の水晶体は、他の組織と比べ極限られた種類のタンパク質からなる特異な組織である。その構成タンパク質は、クリスタリンと呼ばれ、代謝分解されることなく生涯保持される。脊椎動物が進化したとき、 α -、 β -および γ -クリスタリンが外適応で偶々転用され、現在でも共通クリスタリンとして含まれている。無脊椎動物の水晶体にはないので、 α -、 β -および γ -クリスタリンの存在は脊椎動物へと進化した証である。新しい生物進化が起きる度に、新しいクリスタリンが無作為に出現してくる。この事実は、生物種に特徴的な種特異的クリスタリンの存在として知られている。これまで、アカガエル・アオガエル・オガサワラヤモリの α -クリスタリン(アルドース還元酵素)、アマガエル・モルモット・ラクダの β -クリスタリン(キノン還元酵素)、ニワトリの γ -クリスタリン(アルギノコハク酸リアーゼ)、アヒル・ワニの α -クリスタリン(乳酸脱水素酵素B)、リュウグウノツカイ・サケガシラの α -クリスタリン(アルギノコハク酸合成酵素)、カメ・ヤツメウナギの β -クリスタリン(β -エノラーゼ)およびウサギの γ -クリスタリン(ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素)など、全く関連性のない種特異的クリスタリンが報告されている。これは、既存タンパク質を無作為に転用した結果である。このような生物種により異なるタンパク質の転用は、水晶体でしか見られない。即ち、水晶体タンパク質クリスタリンのプロテオーム(クリスタローム)は、生物種それぞれの進化過程の履歴により異なるという特徴がある。

2 . 研究の目的

元来クリスタリンとしての特別のタンパク質の存在は無く、個々の生物種によりその進化の過程で既存のタンパク質が無作為にクリスタリンとして転用されてきた。ま

た、その履歴が今も保存されている。このような生物種により異なる既存タンパク質の転用は、水晶体以外の組織では見られない。即ち、水晶体タンパク質クリスタリンのプロテオームは、生物種の固有の進化過程を映し出している。本研究では、水晶体タンパク質クリスタリンのプロテオームをクリスタロームおよびクリスタローム解析をクリスタロミクスとそれぞれ定義し、カエル類を例にクリスタロミクスによる生物種の多様な進化過程を解明する新しい生物分類学の確立を目的とした。

3 . 研究の方法

(1)国内生息のカエル5科(アカガエル科、アオガエル科、ヒキガエル科、アマガエル科、ジムグリガエル科)の捕獲

(2)カエル5科合計45個体についてトータルRNAを抽出しクリスタリンのmRNA解析し、ホモロジー分析

(3)ウシガエルの各組織よりタンパク質を抽出しウエスタンブロッティング分析、およびトータルRNAを抽出しクリスタリン様のmRNA解析

(4)遺伝子をクローニングしタンパク質発現用ベクターを作製し、発現タンパク質の性質を分析

(5)クリスタロームの確認のためのプロテオーム解析として、Py-Tag 試薬によるタンパク質のラベル化法の確立

4 . 研究成果

クリスタリン解析の目標としていた5科のうち、初年度は、アカガエル科、アオガエル科、ヒキガエル科、アマガエル科の4科について水晶体クリスタリンのmRNAシーケンス解析を行った。サンプルはアカガエル科では21個体(産地別トノサマガエル13個体、ナゴヤダルマガエル3個体、トウキョウダルマガエル1個体、ツ

チガエル 1 個体, ニホンアカガエル 1 個体, ナガレタゴガエル 1 個体, タゴガエル 1 個体), アオガエル科では 3 個体 (モリアオガエル 1 個体, カジカガエル 1 個体, シュレーゲルアオガエル 1 個体), ヒキガエル科では 2 個体 (アズマヒキガエル 1 個体, ナガレヒキガエル 1 個体), アマガエル科では 1 個体 (アマガエル 1 個体) の合計 27 個体について解析した。その結果, アカガエル科 17 個体, ヒキガエル科 1 個体で発現している クリスタリンのアミノ酸配列が完全に一致した (A 群)。またアカガエル科 1 個体とヒキガエル科 1 個体が一致し (B 群) A 群とは 15 アミノ酸の違いがあった。更にアカガエル科 1 個体とアオガエル科 1 個体が一致し (C 群), A 群とは 20 アミノ酸の違い, B 群とは 23 アミノ酸の違いがあった。

A 群, B 群, C 群の蛋白の分子量と等電点は, それぞれ 36,880, 7.60, 36,962, 7.61, 37,133, 7.61 であった。

これまでに当研究室において, カエル水晶体のアルド・ケト還元酵素を精製しアルデヒド還元酵素の存在を確認している。ヒト, ラット, マウス, ウサギ, イヌなど多くの動物種では水晶体のメジャーなアルド・ケト還元酵素としてアルドース還元酵素が発現しているが, カエル水晶体ではアルドース還元酵素は全く発現していなかった。我々は, カエル水晶体の クリスタリンの起源がアルドース還元酵素である可能性を考えて, カエルの他の臓器におけるアルド・ケト還元酵素の発現を調べることにした。

各臓器から抽出した蛋白質について クリスタリン抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果, 多くの臓器で クリスタリン抗体に陽性なバンドが検出された。臓器によって, 水晶体からの抽出蛋白質で検出されたバンドと同じ分子量サイズのも

のとそれより少し大きな分子量サイズのバンドが観られた。

次に各臓器から抽出した RNA を用いて RT-PCR で発現を確認した。既知の クリスタリン遺伝子の配列をプライマーとして用いたところ, レンズ, 角膜, 網膜以外に, 脳, 脊髄, 舌, 食道, 胃, 精巣に同じサイズの PCR プロダクトが得られたので, それらのシーケンス解析を行った。脳, 脊髄では水晶体と同じ配列の クリスタリン遺伝子が確認できた。また, 舌, 食道, 胃, 精巣では クリスタリン遺伝子とかなりのホモロジーを持つ配列の遺伝子が見つかった。

そこから決定したアミノ酸配列を, クリスタリンおよび, 既知の他種のアルド・ケト還元酵素の配列とアライメント解析したところ, アルドース還元酵素とも相同性が高く近縁であることが分かった。実際にこの新規の配列にはアルドース還元酵素の活性ドメインと推定されているアミノ酸配列が保存されているため, 酵素活性が残存している可能性が示唆された。これらの結果から クリスタリンがアルドース還元活性を持つこのタンパク質から変異し酵素活性を失活後に転用されたことが示唆され, これまでの分子進化の報告とよく一致する。その遺伝子をクローニングしタンパク質発現用ベクターを作製し, 発現タンパク質の性質を調べることにより, クリスタリンの起源となるタンパク質を確認しようとした。このタンパク質は配列のホモロジーの高さからアルド・ケト還元酵素スーパーファミリーに属するものであると考えられたので, 酵素としての特性を調べるために様々なアルド・ケト類を基質としたアッセイを試みたが十分な再現性が得られなかった。

初年度より, クリスタリン解析と並行し

て計画していた Py ラベル化試薬を用いた
プロテオーム解析法についても検討した。

まず、リゾチームを標準蛋白質として未消
化、消化後の蛋白質の Py ラベル化ペプチ
ドの MS 測定を行った。

更に、BSA (ウシ血清アルブミン) を標準
蛋白質としてリシルエンドペプチターゼお
よびトリプシンによる消化後のペプチドを
Py ラベル化し MS 測定を行った。

また、リジンだけでなく、アミノ基を有す
る低分子化合物やリジンを有するペプチド
に対するラベリングを行い、Py ラベル化試
薬の評価を行った。さらに、ペプチド・蛋
白への応用に進展させるべく基礎データを
収集した。その後、クリスタリン解析への
応用にも発展させようと考えた。

5. 主な発表論文等

1) Nanoparticle-Assisted Laser
Desorption/Ionization Mass Spectrometry
(Nano-PALDI MS) with Py-Tag for the
Analysis of Small Molecules. Yukina
Tatsuta, Yukie Tanaka, Akari Ikeda,
Shigeru Matsukawa, Hajime Katano, and Shu
Taira. Mass Spectrometry. 2017. 6(3).

2) Concurrent mass spectrometric
analysis of multiple samples using
Py-Tag reagents. Yukie Tanaka, Akari
Ikeda, Shigeharu Fujieda, Miki Saigyo,
Yuka Imase, Chitose Maruyama, Shu Taira.
(投稿中)

[雑誌論文](計2件)

1) Current mass spectrometric analysis of
multiple samples using Py-Tag reagents.
Miki SAIGYO, Yukie TANAKA, Yutaka
FUJII, Akari IKEDA, Hajime KATANNO, Shu
TAIRA. International Biological Mass
Spectrometry Symposium. 2016.

2) Py-Tag 試薬を用いたタンパク質群の高精
度同時解析. 西行美貴, 田中幸枝, 藤井

豊, 池田明夏里, 片野肇, 平修. 第 64 回
質量分析討論会. 2016.

3) Py-Tag 標識によるアミノ酸, タンパク質
の網羅的検出への応用. 今瀬優花, 田中
幸枝, 池田明夏里, 片野肇, 平修. 第 65
回質量分析総合討論会. 2017.

4) Py-Tag によるタンパク質群の高精度同時
解析. 平修, 田中幸枝, 池田明夏里, 丸
山千登勢, 片野肇. 第 77 回分析化学討論
会. 2017.

5) The Novel Stable Isotope Labelling
Reagent Py-Tag is useful for Proteome
Analysis. Y. Tanaka, A. Ikeda,
C. Maruyama, H. Katano, S. Taira. 第 15
回日本プロテオーム学会. 2017.

6) Py-Tag 標識によるアミノ酸, タンパク質
の網羅的検出への応用. 今瀬優花, 田中
幸枝, 池田明夏里, 片野肇, 平修. 日本
分析化学会 第 66 年会. 2017.

[学会発表](計6件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中幸枝 (TANAKA Yukie)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 10197486

(2) 研究分担者

藤井豊 (FUJII Yutaka)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 80211522