

平成22年 4月30日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19370041
 研究課題名（和文） プロテオミクスによるEGF受容体下流シグナルの探索
 研究課題名（英文） Proteomic analysis of EGF receptor-mediated signaling
 研究代表者
 谷口 寿章 (TANIGUCHI HISAAKI)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
 研究者番号：10257636

研究成果の概要（和文）： EGF 受容体下流シグナル経路のプロテオーム解析により見出された多数の新規タンパク質の生理機能と、それらのリン酸化など、翻訳後修飾による調節機構を詳細に解析することで、EGF 受容体下流のシグナル伝達系を網羅的に解明することを目的とし、これまで4種類のタンパク質、Ymer タンパク質、CFBP タンパク質、CLPABP タンパク質、GAREM についてそれらの EGF 受容体シグナルにおける役割とリン酸化、ユビキチン化による機能調節機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Four novel proteins identified by the phosphoproteomic analysis of the EGF receptor mediated signaling pathways were studied for their physiological functions. The proteins include Ymer protein, CFBP, CLPABP (Caldiolipine and Phosphatidic Acid Binding Protein) and GAREM (Grb2-associated and regulator of Erk/MAPK). The posttranslational modifications such as phosphorylation and ubiquitination were analyzed for their regulatory roles in the EGF receptor signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・構造生物化学

キーワード： タンパク質／プロテオーム／バイオテクノロジー／シグナル伝達／分析科学

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで質量分析法を用いた微量タンパク質構造解析法を主な技術として、多くのタンパク質の翻訳後修飾、特にタンパク質リン酸化と、ミリスチル化のような

アシル化の詳細な解析を構造と機能の両面から行ってきた。ゲノム解析の進展により、ゲノム情報を生かした網羅的かつ系統的なプロテオーム解析が可能となる状況が整い、細胞におけるシグナル伝達系を大規模に解析し、ネットワークとして理解する基盤が出

来つつある状況である。本研究においては、申請者らのグループにおいて現在進行中の EGF 受容体下流タンパク質の大規模プロテオミクス解析の成果を生かし、新規に見出された多数の新規タンパク質とそれらの生理機能解析とリン酸化・ユビキチン化などの翻訳後修飾の解析をさらに推し進めることで、EGF 受容体下流シグナル伝達系を体系的・網羅的に明らかにすることを目的とする。申請者らは既に、EGF 刺激した A431 細胞から複数の抗ホスホチロシン抗体を組み合わせることで、従来の報告を遙かに上回る 200 余りの EGF 受容体下流タンパク質を同定している (Konishi et al. J. Biol. Chem. 2006) (図 1)。

その中で、60 余りのタンパク質は機能未知タンパク質、あるいは従来 EGF 受容体の下流にあることが知られていなかったタンパク質である。申請者らは既に、これらのタンパク質の一部に関して遺伝子を PCR によりクローン化し、動物細胞における発現系を構築し、また市販の抗体が得られないタンパク質に関しては大腸菌において組み換えタンパク質として大量発現させ、それを抗原としてポリクローナル抗体を作成している。さらに数種類のタンパク質に関しては、免疫沈降による結合タンパク質の解析や免疫蛍光染色や GFP 融合タンパク質の発現による局在解析、質量分析法と変異体を用いた修飾部位の解析などを通じて、それらの生理機能を明らかにすることが出来た。ひとつは Ymer タンパク質と呼ばれるチロシンリッチタンパク質で、もう一つは CFBP (CIN85/CD2AP family binding protein) と名付け、両者は Cbl を介した EGF 受容体の分解の制御に関わっていた。

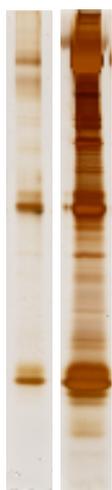


図 1. A431 細胞から抗ホスホチロシン抗体による単離したチロシンリン酸化タンパク質。コントロール (左) と EGF 刺激した細胞由来のタンパク質 (右)。

2. 研究の目的

本研究においては上述の EGF 受容体下流タンパク質のプロテオミクスにおいて同定された新規タンパク質の生理機能解析、特に EGF 受容体の分解の制御という、重要な側面に関する研究を進めて行くことを目的とする。申請者らの“強み”は特に質量分析法による翻訳後修飾の詳細な解析技術を有していることで、タンパク質をトリプシンなどのプロテアーゼにより処理してから、ペプチドレベルで修飾の種類と部位を解析する従来の手法に加え、最近導入したフーリエ変換型質量分析計を用いることで、タンパク質を丸ごとイオン化し、CID 並びに ECD という二種類の開裂法を併用することで、タンパク質を開裂させ、修飾の解析を行う、いわゆる Top-down プロテオミクスの手法を用いることで、タンパク質の N 末端から C 末端まで、全ての修飾を網羅的に解析することを可能とする。また、特異的な部位がリン酸化されて初めて認識する、部位特異的抗リン酸化抗体の作成も進めており、既に上記の 2 種類のタンパク質の EGF 受容体による複数のチロシンリン酸化部位や、EGF 受容体そのものの 11 カ所のチロシンリン酸化部位、またこれまでに明らかにした新規のリン酸化部位などに対する抗体を作成中である。本研究においては、さらにこれらの抗リン酸化抗体作成を継続すると共に、それらを用いたダイナミックなリン酸化の変動を解析し、EGF 受容体下流のネットワークを明らかにして行くことを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 機能未知タンパク質の大腸菌における発現系構築と抗体作成

細胞内局在解析、免疫沈降などに用いる特異的抗体作成を目的として、抗原を大腸菌における組み換えタンパク質として発現した。特に、EGF 受容体の下流タンパク質であることが初めて明らかになったタンパク質に関して、市販の抗体が得られないもの、得られても効率良く免疫沈降が出来ないものに関してヒトの cDNA ライブラリーから PCR により遺伝子をクローニングした。抗原タンパク質としては、全長、100 アミノ酸残基程度の部分配列に GST タグ、His タグをそれぞれ付けたもの融合タンパク質を作成し、大腸菌において発現、アフィニティ精製した。上記で作成した全長、部分配列タンパク質、さらに C 末端の部分配列に相当する合成ペプチドをそれぞれ抗原として、ウサギにおいてポリクローナル抗体を作成した。基本的には、GST 融合タンパク質を抗原として用い、His タグを持つタンパク質をリガンドとして用いてアフィニティ精製することで、GST 部分に対

する抗体を除いた抗体作成を行った。

3-2. 知タンパク質の動物細胞における発現系構築

上記で取得した遺伝子クローンをを用い、293T細胞、COS7細胞などにGFP融合タンパク質、あるいはFlagタグ、やHAタグとのダブルタグ付きで発現させ、局在解析や、免疫沈降による相互作用解析に用いる一過性に過剰発現する発現系を構築した。また、必要に応じて安定発現株を取得した。作成した過剰発現した細胞、或いはA431細胞を用い、GFP融合タンパク質、FLAGタグに対する市販抗体、上記で作成した特異的抗体などを用い、共焦点顕微鏡による局在解析を行った。

3-3. 修飾の詳細解析

EGF刺激した細胞から、機能未知タンパク質を、タグに対する市販抗体、或いは上記で作成した特異的抗体を用いて免疫沈降し、トリプシンなどによる分解後、キャピラリーHPLCとエレクトロスプレー質量分析計をオンライン結合したLC/MS法によりリン酸化や、ユビキチン化をはじめとするタンパク質翻訳後修飾の詳細な解析を行った。

3-4. 異的抗リン酸化抗体の作成

上記で同定したリン酸化部位に対して、リン酸化部位前後の配列に相当するリン酸化ペプチドを合成し（外注）、それらをキャリアタンパク質と結合したモノを抗原としてウサギにおいて部位特異的な抗リン酸化抗体を作成した。得られた抗体のウェスタンブロットによる評価を行うと共に、それらを用いてEGF刺激下のリン酸化の増減の時間変化と、リン酸化タンパク質の細胞内局在を解析することで、これら新規タンパク質の機能解析を行った。

3-5. 抗体を用いたプルダウンによる相互作用解析

本研究において研究対象としている新規タンパク質は、一部の既知の機能ドメインを含むことを除いて、配列の解析からは機能が推定できないタンパク質である。これらの機能未知タンパク質の機能解析は、上記の細胞内局在の解析以外に、相互作用解析による結合タンパク質の探索と、次項(2)のノックダウンによる解析を進める必要がある。具体的には作成した動物細胞における発現系、A431細胞などからタグ或いはタンパク質に対して作成した特異的抗体を用いて標的タンパク質を免疫沈降し、共沈するタンパク質をプロテオミクス解析技術により同定する

ことで、相互作用するタンパク質を探索した。

3-6. RNAiによる機能解析

新規機能未知タンパク質の機能解析のためには、siRNAによるノックダウンが現在最も簡便で有効な方法である。14種類の新規タンパク質、及び50余りの既知タンパク質で、申請者らの解析によりEGF受容体の下流タンパク質として同定されたタンパク質に関してノックダウンによる効果をEGF刺激下に行うことで、生理機能の解析を行った。

4. 研究成果

4-1. CLPABPの機能解析

新規タンパク質のひとつであるPHドメインをタンデムに持つタンパク質に関してその生理機能解析を行った。この2つのPHドメインはカルジオリピンとホスファチジン酸に特異的に結合することからCLPABP (Cardiolipin and phosphatidic acid-binding protein) と名付けた。CLPABPのPHドメインは、他の既知のPHドメインに比してカルジオリピンなどに特異的な脂質結合性を示し、これまで知られているタンパク質ではCool/PIXタンパク質のそれに類似している。蛍光免疫染色により、このタンパク質はミトコンドリアの表面付近にRNAを含む顆粒として存在することを見出した。また305番目と456番目のチロシンがリン酸化部位であることを明らかにした。さらに、免疫沈降により単離した複合体を質量分析法により解析することで、相互作用解析を行い、また過剰発現、siRNAによるノックダウンなどによりCLPABPの生理機能を解析した(Sano他、BBA Mol.Cell.Res.(2008))。

4-2. GAREMの機能解析

4種類目の新規タンパク質がEGF受容体に結合しそのシグナルを伝える上で重要な役割を果たすGrb2タンパク質に結合することを見出し、このタンパク質をGAREM (Grb2-associated and regulator of Erk/MAPK) と名付けた。875アミノ酸よりなるGAREMは分子中央付近に存在するプロリンリッチ領域を通じてGrb2と結合するだけでなく、その少しN末側に存在するTyr453のリン酸化に依存してShp2 (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2) とも結合する。また、GAREMはGrb2を通じてEGF受容体に結合する。さらに、Erk/MAPK経路の活性化に関わることを明らかにした(Tsahiro他、J. Biol. Chem. (2009))。

4-3. 部位特異的抗リン酸化抗体の作成とその評価

EGF 受容体活性化に伴いチロシンリン酸化される部位を質量分析法により同定し、ホスホチロシンを含むペプチドを化学合成した(外注)。キャリアタンパク質に結合後、ウサギにおいてポリクローナル抗体を作成した。

複数の新規タンパク質のチロシンリン酸化を認識する抗体を得たが、例えば Ymer タンパク質の Tyr145 のリン酸化を認識する抗体は、Tyr145 の位置にホスホチロシンを含む合成ペプチドを抗原として得ることができた。抗リン酸化抗体はタンパク質全体の抗体と比較することで、EGF 受容体刺激に伴い、リン酸化タンパク質が特有の局在を示すことを明らかにした。

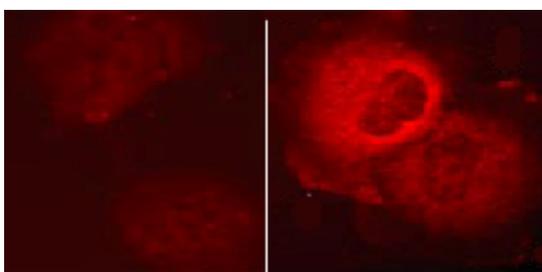


図2. Ymer タンパク質の Tyr145 のリン酸化を認識する部位特異的抗リン酸化抗体による免疫染色。非刺激(左)と EGF 刺激した細胞(右)。

4-4. その他の研究成果

EGF 受容体下流のリン酸化プロテオミクスに平行して、ERK/MAP キナーゼ経路の基質タンパク質の網羅的解析を行い、ヌクレオポリンに依存した核膜輸送が ERK によるリン酸化により調節されていることを見出した(Kosako 他、*Nature Struct. Mol. Biol.* (2009))。また微小管プラス端集積因子 EB3 のユビキチンリガーゼ SIAH-1 と Aurora キナーゼによる制御機構を解明した(Ban 他、*J. Biol. Chem.* (2009))。その他、プロテオミクス解析技術の応用として、自家不和合性を示すホヤの精子と卵膜のプロテオーム解析を行い、それらの構成タンパク質のカタログを作成し、それにより、ホヤの自家不和合性に関わるタンパク質分子を同定した(Harada 他、*Science* (2008); Yamada 他、*J. Biol. Chem.* (2009))。また、これらのプロテオミクスの応用研究を支える技術開発として、内部標準法に基づく、質量分析装置の取得データの再

キャリブレーション法を開発し、プロテオミクスによるタンパク質同定の高精度化に成功した(Ishino & Taniguchi、*Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2008))。それを用いて高精度プロテオミクスデータを作成することで、プロテオミクスデータのゲノム配列へのマッピングを行い、微生物のゲノムアノテーションの評価を行った。その結果、新規遺伝子の同定やこれまでの遺伝子アノテーションのエラーなどを検出することに成功した(Ishino 他、*Proteomics* (2007))。

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12件)

- ① Kosako, H., Yamaguchi, N., Aranami, C., Ushiyama, M., Kose, S., Imamoto, N., Taniguchi, H., Nishida, E., and Hattori, S. Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 16, 1026-1035, 2009、査読有。
- ② Ban, R., Matsuzaki, H., Akashi, T., Sakashita, G., Taniguchi, H., Park, S, Y. Tanaka, H., Furukawa, K., and Urano, T. Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases *J. Biol. Chem.*, 284, 28367-28381, 2009、査読有。
- ③ Tashiro K, Tsunematsu T, Okubo H, Ohta T, Sano E, Yamauchi E, Taniguchi H, and Konishi H. GAREM, a novel adaptor protein for growth factor receptor-bound protein 2, contributes to cellular transformation through the activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *J. Biol. Chem.*, 284, 20206-20214, 2009、査読有。
- ④ Yamada, L., Saito, T., Taniguchi, H., Sawada, H. and Harada, Y. Comprehensive egg-coat proteome of an ascidian *Ciona intestinalis* reveals gamete recognition molecules involved in self-sterility. *J. Biol. Chem.*, 284, 9402-9410, 2009、査読有。
- ⑤ Ishino Y. and Taniguchi, H. An a posteriori calibration method for improving protein identification accuracy in proteomics using electrospray ionization time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Commun.*

- Mass Spectrom.* 22, 1335-1338, 2008、査読有。
- ⑥ Omi, S., Nakata, R., Okamura-Ikeda, K., Konishi, H., and Taniguchi, H. Contribution of peroxisome-specific isoform of Lon protease in sorting PTS1 proteins to peroxisomes. *J. Biochem.* 143, 649-660, 2008、査読有。
- ⑦ Harada, Y., Takagaki, Y., Sunagawa, M., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., Shoguchi, E., and Sawada, H. Mechanism of Self-Sterility in a Hermaphroditic Chordate. *Science*, 320, 548-550, 2008、査読有。
- ⑧ Sano, E., Shono, S., Tashiro, K., Konishi, H., Yamauchi, E. and Taniguchi, H. Novel tyrosine phosphorylated and cardiolipin-binding protein CLPABP functions as mitochondrial RNA granule. *Biochim Biophys Acta Mol. Cell. Res.*, 1783, 1036-1047, 2008、査読有。
- ⑨ Ishino, Y., Okada, H., Ikeuchi, M., and Taniguchi, H. Mass spectrometry-based prokaryote gene annotation. *Proteomics*. 22, 4053-4065, 2007、査読有。
- ⑩ Fujiwara, K., Hosaka, H., Matsuda, M., Okamura-Ikeda, K., Motokawa, Y., Suzuki, M., Nakagawa, A., and Taniguchi, H. Crystal Structure of Bovine Lipoyltransferase in Complex with Lipoyl-AMP. *J Mol Biol.* 371, 222-234, 2007、査読有。
- ⑪ Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., Tanaka, S., Shiota, K., and Nakano, T. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biology*, 9, 64-71, 2007、査読有
- ⑫ 谷口寿章 タンパク質間相互作用におけるアシル化の役割 生体の科学 58 (5), 360-363, 2007、査読無

[学会発表] (計12件)

- ① 谷口貴子、谷口寿章 ProteoFIT: a bundle of VBA macros for parsing, filtering and analyzing Mascot database search results for large-scale proteomics. RECOM Satellite Meeting on Computational Proteomics. UCSD, San Diego, USA 2010.3.27-28.
- ② 谷口寿章 Annotation of prokaryote genomes using large-scale proteomic data. RECOM Satellite Meeting on Computational Proteomics. UCSD, San

Diego, USA 2010.3.27-28.

- ③ 吉沢明康、山田力志、谷口寿章 Western blot-like presentation of gel-enhanced LC/MS data and software-based detection of protein modifications. RECOM Satellite Meeting on Computational Proteomics. UCSD, San Diego, USA 2010.3.27-28.
- ④ 小迫英尊 Phosphorylation of nuclear pore complex proteins by ERK MAP kinase regulates interaction with transport receptors. ASCB 49th Annual Meeting, San Diego, USA, 2010.12.5-9
- ⑤ 吉沢明康、山田力志、谷口寿章 Ascidian Adult Body Map: A proteomic view of adult ascidian tissues. The 5th International Tunicate Meeting, Naha, Okinawa. 2009.6.22.
- ⑥ 山田力志、谷口寿章 Global protein profiling of ascidian *C. intestinalis*: toward the comprehensive understanding at the protein level The 5th International Tunicate Meeting, Naha, Okinawa. 2009.6.22.
- ⑦ 谷口寿章、プロテオミクスによる細胞生物学へのアプローチ 日本細胞生物学会大会、名古屋、2009.6.4
- ⑧ 吉沢明康、山田力志、谷口寿章 Ascidian Adult Body Map: 質量分析によるホヤ・プロテオーム・データベースの構築、日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム、宮崎、2009.5.11
- ⑨ 庄野繁一、谷口貴子、木戸慎介、阿倍正博、松本俊夫、谷口寿章、プロテオミクスによるリンパ腫特異的血清マーカーの探索 BMB2008、神戸、2008.12.12
- ⑩ 池田和子、保坂晴美、真板宣夫、藤原和子、中川敦史、本川雄太郎、谷口寿章、グリシン開裂酵素系 T-H タンパク質複合体の結晶構造解析と反応機構 BMB2008、神戸、2008.12.9
- ⑪ 藤原和子、保坂晴美、池田和子、真板宣夫、本川雄太郎、中川敦史、谷口寿章、大腸菌 lipoate-protein ligase A による2段階反応の構造的基盤 BMB2008、神戸、2008.12.9
- ⑫ 谷口寿章、質量分析を基盤とするプロテオミクスの医学・生物学研究への応用、第56回質量分析総合討論会、つくば、2008.5.15

[図書] (計1件)

谷口寿章「プロテオミクスと病態解析」 一瀬白帝、鈴木宏治 共編 図説分子病態学第4版 中外医学社刊 2008

[その他]

ホームページ等：

<http://www.ier.tokushima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 寿章 (TANIGUCHI HISAAKI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：10257636

(2) 研究分担者

小西 博昭 (KONISHI HIROAKI)

徳島大学疾患酵素学研究センター・准教授

(現広島県立大学教授)

研究者番号：40252811

藤原 和子 (FUJIWARA KAZUKO)

徳島大学疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：20108880

池田 和子 (IKEDA KAZUKO)

徳島大学疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：10108863

小迫英尊 (KOSAKO HIDETAKA)

徳島大学疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：28070741