

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570133
 研究課題名（和文）
 プロテオミクスにより同定された EGF 受容体下流新規因子に関する研究
 研究課題名（英文）
 Proteomic identification of the new functional proteins in the EGF receptor-mediated signaling pathway
 研究代表者
 小西 博昭（KONISHI HIROAKI）
 県立広島大学・生命環境学部・教授
 研究者番号：40252811

研究成果の概要：EGF（上皮細胞増殖因子）受容体からの情報伝達経路は、正常な細胞の営みに欠かせないものであるが、一方でその破綻が細胞のがん化やがん悪性化につながることも明らかになっている。我々は EGF 受容体からの情報伝達機構をより詳細に理解するために、プロテオミクス解析により同定した EGF 刺激時に細胞内で機能する新規タンパク質の解析を行っている。本研究費により主に 3 種類の下記タンパク質の機能解析を行い、学術論文として発表することができた。

- ・ 新規ミトコンドリア指向性 RNA 顆粒形成タンパク質 CLPABP の機能解析
- ・ 新規ペルオキシソーム特異的 Lon プロテアーゼの機能解析
- ・ 新規 Grb2 結合タンパク質 GAREM の機能解析

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景：様々な生物種におけるゲノム配列が決定され、詳細な遺伝子情報データベースが確立し、さらに、質量分析装置を用いたタンパク質解析技術の急速な発展に伴い、現在ではそれらを応用することにより、微量なタンパク質からでもそのアミノ酸配列を決定することが可能となった。そして、その技術を用いた様々なタンパク質の

網羅的解析（プロテオミクス）が盛んに行われている。我々は、複数のチロシンリン酸化抗体を組み合わせて用いることにより、EGF 刺激した扁平上皮がん由来 A431 細胞より効率的にチロシンリン酸化タンパク質を回収した。銀染色で可視化した後、質量分析装置によりこれらすべてのアミノ酸配列を決定したところ、150 種類以上のタンパク質が同

定できた。そして、同定できたタンパク質の中から新規なものに着目し、それら新規タンパク質の抗体作製、リン酸化部位の同定、結合タンパク質の解析、ならびに細胞内における局在観察などについて優先的にを行い、それらの役割を調べた。そして、その内の2種類については2006年にYmer及びCFBPとして報告した。これらはEGF受容体のリガンド依存性細胞内移行及び分解に關与するものであり、新規のEGF受容体代謝調節タンパク質であった。

2. 研究の目的：一般的に、細胞増殖因子受容体は細胞外領域でリガンドと結合すると細胞内領域のタンパク質リン酸化酵素活性が上昇し、受容体自身もしくは他の基質をリン酸化することにより、下流へのシグナル伝達を開始される。EGFをはじめとして、細胞増殖因子のシグナル伝達機構は細胞増殖のみならず、細胞の形態変化や運動能獲得、細胞周期進行など、細胞の様々な生理現象に關与する。また、そこで機能するいくつかのタンパク質は、受容体自身を含め、がんや他の疾病との直接的關与が見出され、臨床面からも注目されており、細胞増殖因子受容体抗体や受容体リン酸化酵素活性阻害剤が分子標的医薬として開発され、がん治療等に利用されている。そのような背景から、細胞増殖因子やサイトカインシグナル伝達機構をより詳細に理解するために、それらの刺激により細胞内でリン酸化されるすべてのタンパク質を網羅的に明らかにするためのリン酸化プロテオミクスが盛んに行われている。ところで、リン酸化タンパク質の同定数や、リン酸化量の刺激依存的変動を解析することも重要であるが、我々は同定できたタンパク質の中から新規なものに着目した。プロテオミクスの共通の盲点として、多数のタンパク質が同定された後、特に新規なものに關しての解析が進まないことが挙げられる。当然のことながら、新規タンパク質の目的プロテオミクスにおける意義づけ及び機能解析において効率的な方法は特になく、これまでと同様に多大な労力を必要とする。しかし、その工程を避けてはせつかく得られた新規タンパク質の機能はおろか、本当に解析サンプルに含まれていたのかさえも不明のままになってしまう。現在、世界中で様々な細胞情報伝達系に着目した大規模なプロテオミクス研究が実施されているが、そこから見出された新規タンパク質の機能解析についてはあまり研究が進んでおらず、我々はこのような新規タンパク質の中に、EGF受容体経路の研究分野におけるブレークスルーをもたらすような因子が含まれていると考え、それらの機能を網羅的に解析する目的で研究を行っている。

3. 研究の方法：
新規タンパク質の解析はいずれについても下記の戦略を基本に行っている。

- 1、目的タンパク質の抗体作製
- 2、培養細胞における過剰発現系の構築と、それを用いた細胞刺激依存的なチロシンリン酸化の有無の確認
- 3、チロシンリン酸化部位の同定とそれを認識するリン酸化抗体の作製
- 4、細胞における目的タンパク質の局在観察
- 5、過剰発現系を用いた目的タンパク質の精製と結合タンパク質の同定
- 6、同定された結合タンパク質との關連づけと機能解析

4. 研究成果：これまで機能未知であった3つの新規タンパク質の細胞における役割を明らかにした。

CLPABP

CLPABPは611アミノ酸からなる新規タンパク質であるが、これまでの解析により、EGF刺激やH₂O₂刺激により305および456番目のチロシンがリン酸化されることを明らかにしている。CLPABPはアミノ末端側に2つのPH領域を持つが、免疫蛍光染色による観察から培養細胞内におけるその局在は微小管およびミトコンドリア表面に局在した。一般的にPH領域は細胞膜に存在する様々な脂質に結合し、それを有するタンパク質は様々な細胞刺激に応じて細胞膜へ移行することが知られており、CLPABPの局在はそれと大きく異なった。様々な種類の脂質がプロットされたメンブレンを用いたドットプロット法で解析したところ、ミトコンドリアに特異的な脂質で知られるカルジオリピン(CL)およびその分解物のホスファチジン酸(PA)がCLPABPのPH領域に結合した。このタンパク質の名前はこの性質に由来する。次に、FLAGタグが付加されたCLPABPをHEK293T細胞に発現させ、FLAG抗体を用いたアフィニティー法にて、このタンパク質の複合体を精製分離した。それに含まれるタンパク質を質量分析装置で解析し、それらのアミノ酸配列を決定した。すると、ミトコンドリアタンパク質でもあるSF2Ap32をはじめとして、細胞質におけるmRNAのプロセッシングに關わるタンパク質群とリボソームタンパク質が多数含まれていた。培養細胞における過剰発現および発現抑制実験により、このタンパク質はチトクロームcなどのミトコンドリアタンパク質と、その翻訳過程のmRNAをミトコンドリアに正しく運ぶための新規RNA顆粒の形成に重要な役割を持つことが示唆された。このタンパク質をRNAiでノックダウンしたHeLa細胞ではチトクロームcの発現量がコントロール細胞に

比較して低下した。一方、CLPABP を過剰発現させた細胞ではチトクローム c の発現量が増加した。また、このような細胞株では CLPABP が蓄積した顆粒においてチトクローム c が発現する。CLPABP の複合体には確かにチトクローム c の mRNA や多数のリボソームタンパク質が存在したことから、この複合体は細胞内で mRNA の運搬と翻訳を同時に行う性質を持つことが示唆された。これらのことから、提案者は、CLPABP はミトコンドリア表面にターゲティングし、それに含まれる様々なミトコンドリアタンパク質を翻訳するための mRNA を運び、同時に翻訳も行うような RNA 顆粒を形成するのではないかと考えている。一般的にミトコンドリアタンパク質は小胞体で翻訳された後、それに含まれる局在配列に依存しミトコンドリアに運ばれるのが定説であり、培養細胞などではそれで充分であろう。しかし、神経細胞など核や小胞体から遠く離れたアクソンに存在するミトコンドリアに必要なタンパク質を運ぶためにはタンパク質のみが局在配列により能動的に移動するよりも、タンパク質翻訳能を持つ RNA 顆粒によりミトコンドリアに運ばれていく方法が有利なのではないかと考えてもよいのではないだろうか。この仮説を培養細胞のレベルのみならず、より生理的条件下で立証するために CLPABP のコンディショナルノックアウトマウスを作製中である。ヒトでは第 1 染色体短腕 1p36 に存在する CLPABP ゲノム遺伝子は、マウスでは第 4 染色体に存在し、15 のエクソンからなる。現在、ノックアウトマウス作製は理化学研究所発生・再生科学総合研究センター相沢研究室との共同研究により進めている。マウス CLPABP 染色体遺伝子中で、比較的長いエクソン 2 と 8 付近に loxP 配列を挿入し、Cre リコンビナーゼにより抜き出せるために構築したトランスジーンを持つ ES 細胞を相同組換えにより樹立した。さらに、その ES 細胞を用いてキメラマウスを作製した。現在、野生型マウスとのかけ合わせによる F1 マウスを得ている。今後それらをかけ合わせ、染色体の 2 対ともトランスジーンが導入された個体を得る予定である。それが得られた後、Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスとの交配により CLPABP を発現しないマウスの樹立を目指す。基本的には CLPABP 完全欠失マウスになるよう広範な組織で発現するプロモーター支配下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配を考えているが、その表現系により様々な Cre トランスジェニックマウスを試す予定である。

pLon プロテアーゼ

我々の行ったプロテオミクスにより同

定した新規ペルオキシソーム特異的 Lon プロテアーゼ (pLon) の解析を行った。pLon はこれまでに同定されているミトコンドリア特異的 Lon (mLon) に構造上は類似しているが、カルボキシル末端に PTS1 (ペルオキシソーム移行シグナル) 配列を持ち、ペルオキシソームにのみ局在する。pLon に特異的に結合するタンパク質を解析したところ、PTS1 配列を含む acyl-CoA oxidase (AOX) や PTS2 配列を含む 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase (PTL) などが結合した。pLon の過剰発現により AOX のペルオキシソームへの正しい局在が促進され、RNAi による pLon の発現抑制によりそれが阻害された。しかし、AOX の発現による PTL のペルオキシソーム移行への影響は見られなかった。このことから、pLon は PTS1 依存的なペルオキシソームタンパク質の正しい局在において重要なプロセシング酵素であることが示唆された。ペルオキシソームは活性酸素などの除去などにおいて重要な働きをするオルガネラであるが、ペルオキシソーム内の酸化酵素活性やカタラーゼ活性にも pLon の発現が影響した。また、いくつかの酸化酵素はペルオキシソームの正常な分裂、成熟化に寄与していることが最近報告されている。pLon の発現により、ペルオキシソームの分裂阻害による肥大化が観察された。これらのことから、pLon の発現異常はペルオキシソームそのものの働きにも影響することが考えられる。これについては今後のさらなる解析が必要である。

GAREM (FLJ21610)

875 アミノ酸から構成される新規タンパク質である。構造上、カルボキシル末端に ATPase と相同性を持つようであるが、その機能はまったく不明である。最近、他グループによる類似プロテオミクス解析においてもこのタンパク質はチロシンリン酸化タンパク質として同定されており、さらに 453 番目のチロシンがリン酸化されるとの報告がなされた。申請者らはこのタンパク質自身および上記リン酸化部位に対する抗体をすでに作製した。これらを用いて解析したところ、このタンパク質には上記リン酸化部位以外にも EGF 刺激によりアミノ末端側約 100 アミノ酸付近のチロシンがリン酸化されることを明らかにしている。また、450 番目付近のプロリンに富む領域においてシグナルアダプター分子 Grb2 と結合し、このタンパク質は EGF 刺激における ERK の活性化を増強する作用を有することを見出した。現在、EGF 受容体 Grb2 SOS Ras Erk シグナルカスケード特異的なシャペロン活性を有するのではないかと考え、ATPase 活性の有無などに着目し解析を進めている。

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 4 件)

- 1 . Contribution of peroxisome-specific isoform of Lon protease in sorting PTS1 proteins to peroxisomes.
Omi, S., Nakata, R., Okamura-Ikeda, K., Konishi, H.*, and Taniguchi, H.
J. Biochem. 143, 649-660 (2008)
(*corresponding author) 査読有り
2. Novel tyrosine phosphorylated and cardiolipin-binding protein CLPABP functions as mitochondrial RNA granule.
Sano, E., Shono, S., Tashiro, K., Konishi, H.*, Yamauchi, E., and Taniguchi, H.
Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research 1783, 1036-1047 (2008)
(*corresponding author) 査読有り
3. EGF 受容体下流のプロテオミクスより同定された新規タンパク質の機能解析
小西博昭 「生化学」第 79 巻、第 8 号 781-785 2007 年 査読有り
- 4 . Muc4 is required for activation of ErbB2 in signet ring carcinoma cell lines.
Yokoyama, A., Shi, B.H., Kawai, T., Konishi, H., Andoh, R., Tachikawa, H., Ihara, S., and Fukui, Y.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 355(1):200-203 (2007) 査読有り

[学会発表](計 1 件)

小西博昭：プロテオミクスにより同定された EGF 受容体下流新規因子に関する研究、ひろしまビジネスマッチングフェア 2008, 2008 年 10 月 2 日 広島

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称：新規アポトーシス誘導タンパク質及びそれをコードする遺伝子

特開 2008-237030

発明者：小西博昭

権利者：谷口寿章 (徳島大学)

種類：公開特許公報 (A)

番号：特開 2008 - 237030

取得年月日：平成 20 年 10 月 9 日

国内外の別：国内

[その他]

科研費取得時：徳島大学疾患酵素学研究センター・准教授

平成 19 年 9 月より、現職に就き現在に至る。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小西 博昭 (KONISHI HIROAKI)
県立広島大学・生命環境学部・教授
研究者番号：40252811

(2)研究分担者

(3)連携研究者