

平成 21 年 5 月 9 日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2005 ～ 2008
課題番号：17066004
研究課題名（和文）
細胞内生体分子群の動態シグナル解析
研究課題名（英文）
Development of tools for analysis of comprehensive signals of subcellular biomolecules
研究代表者
植田 充美 (Mitsuyoshi Ueda)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：90183201

研究成果の概要：

植田は、細胞内情報伝達動態の侵襲的デジタル定量用ワンセルプロテオームチップを開発した。高木は、生細胞膜に近い構造のラフト含有非対称リポソームの作製方法を開発した。近藤は、酵母を用いたシグナル伝達システムを開発した。仲山は、好塩性細胞の金属ストレス応答遺伝子を同定した。福崎は、GC/MS および CE/MS を用いた基幹一次代謝系の網羅的解析システムを開発した。伊藤は、臨床応用酵素の新規蛍光プローブを開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	75,000,000	0	75,000,000
2006 年度	71,100,000	0	71,100,000
2007 年度	57,600,000	0	57,600,000
2008 年度	59,200,000	0	59,200,000
年度			
総計	262,900,000	0	262,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：細胞内情報伝達動態、ワンセルプロテオーム、脂質ラフト、環境ストレス応答、代謝プロファイリング、シグナル伝達、蛍光プローブ、侵襲的デジタル定量解析

1. 研究開始当初の背景

細胞内に存在する種々の情報を担うすべての分子群（DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、代謝産物等）の機能解析と動態の網羅的定量分析ならびに、定量的データマイニングの創製を行うために、タンパク質やリガンドペプチド、代謝低分子、DNA/RNA などの網羅的多変数分析と定量解析、タンパク質の網羅的機能探索ツールやシステムの開発、タンパク質構造転移の網羅的多変数解析、生体分子群の網羅的多変数分析結果を対象としたデータマイニングシステムの開発をおこなう。

2. 研究の目的

全生物細胞内情報伝達系におけるタンパク質のリン酸化動態の定量解析に、世界で初めてのオンラインシステムとなるチタニアとシリカモノリスカラムを2次元化した新しいナノ HPLC/MS システムを構築してきた。また、GC/MS、CE/MS、SFC/MS を用いた全生物種に普遍的に存在する基幹一次代謝系代謝物の網羅的解析システムの構築もしてきた。特に、CE/MS については、極性反転と電気浸透流を利用することにより重要アニオン性代謝物のすべてを一システムで網羅する新規観測システムを開発してきた。これらの開発基盤技術をベースにして、細胞の生命現象としての環境ストレスに対する応答機構の解析モデル細胞の網羅的メタボローム解析を行う。また、モデル生物としてゼブラフィッシュを用いて、外部刺激に対応するシグナルのイメージングを行ってきた。一方、細胞膜受容体 GPCR を介したシグナル伝達機能の定量的モニターツールを開発してきた。さらに、抗原やアレルゲンなどをチップ上にマイクロアレイ固定化する方法を開発し、アレルギーや自己免疫疾患に関係する抗体量をデジタル定量できるツールを作成してきた。

今後、開発してきた解析機器システムやア

レイの技術により、動植物微生物系での実試料への実用性の検証を班内外との共同研究を中心に進めて定量動態解析を拡大し、ライフサーベイヤー構築への侵襲的データのプラットフォームを形成する。

3. 研究の方法

計画班のメンバーは下記のように、定量動態解析によるライフサーベイヤー構築への侵襲的データのプラットフォームを形成した。

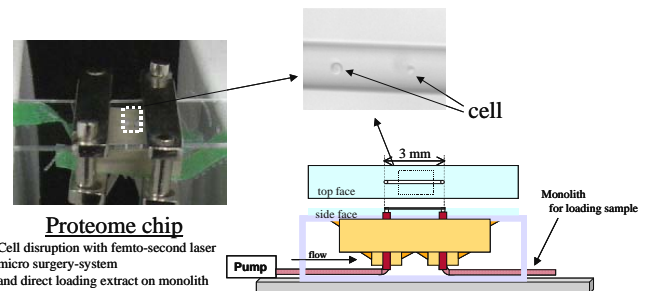
植田は、タンパク質のリン酸化動態の定量解析に、世界で初めてのオンラインシステムとなるチタニアとシリカモノリスカラムを2次元化した新しいナノ HPLC/MS システムを開発してきたので、レーザーとモノリスチップの組み合わせによるワンセルプロテオームに向けた最小クローン数細胞によるデジタルデータの集積と解析を行う。福崎は、開発してきた CE/MS、GC/MS による基幹一次代謝網羅的解析システムおよびナノ LC/MS による微量高感度代謝物プロファイリングシステムの技術開発を進める。開発したシステムを共同研究者（A02 班吉田等）とともに、微生物（酵母，バクテリア），動物（ゼブラフィッシュ等）のメタボローム解析に適用し、システムの有用性を検証する。さらに班間共同研究で RNA プロファイリング技術を開発する。仲山・吉田は、環境応答解析のモデル細胞である好塩性バクテリア *Halomonas elongata* のゲノム全遺伝子の環境ストレスによる発現変動解析データ（全ゲノム塩基配列情報を元に設計・作製したゲノムタイリングアレイ解析）と主に CE-MS を用いた代謝変動解析データ（阪大・福崎グループとの共同研究によるメタボローム解析）を平行して行い、主要環境ストレスである塩および金属に対する細胞応答の鍵遺伝子を特定する。近藤は、これまでに開発した酵母細胞を用いた

ヒト G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 解析システムを利用してアミノ酸置換によって変異を導入したヒト GPCR のシグナル伝達量を定量解析し、GPCR の機能ドメインを明らかにする。また、酵母細胞による発現系を用いてヒト由来 GPCR およびヒト由来 G 蛋白質の相互作用を直接検出できるシステムを創製することにより、より広範な GPCR に対するアッセイ系の開発を目指す。高木は、引き続き、分子・細胞・個体レベルにおいて外部刺激に対する応答を調べる。分子レベルでは、ラフト構造を有する細胞サイズリポソームを構築し、浸透圧等の刺激に対するエンドサイトーシスや出芽などのダイナミックな応答を調べる。得られた知見を細胞・個体レベルに発展させ、ラフト領域の外部刺激に応じた構造変化や膜受容体やアミロイド等との親和性を、一細胞のレベルで可視化、信号伝達や疾患発症のメカニズム解明に活かす。伊藤は、実用化にむけた核酸、タンパク質、糖、リン脂質、低分子化合物、ウイルス、細胞などの光固定化条件や基板の最適化を行うとともに、新しく開発した自動測定装置を用いた性能評価を行う。チップ基板への搭載コンテンツの充実を図るとともに細胞破碎物のマイクロアレイ固定化を行い、リバープロテインアレイへの応用展開を図る。さらに、これまでの化学発光法以外に蛍光法などによる高感度化を行う。

4. 研究成果

植田 充美 (京都大学) 「タンパク質の網羅的機能発現と定量」: 細胞内情報伝達動態の侵襲的デジタル定量解析をめざして、細胞を出発点とし最終解析結果までを大きく3つのセクションー (1) 細胞からのタンパク質の抽出から分析系への導入、(2) HPLC によるプロテオーム分離、(3) 質量分析からのタンパク質同定を基盤としたプロテオーム

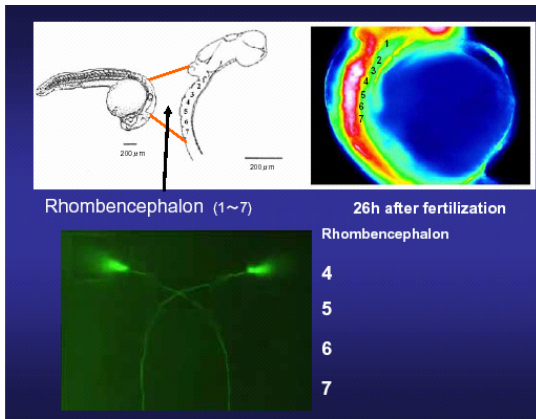
解析一に付けて研究を進めた。生きた細胞からデジタル測定データ採取までのオンライン接続を行い、自動化による人為誤差やサンプルロスを経極まで軽減し、再現よく定量性の高い細胞分析トータルシステム構築をめざした。具体的には、次の (1) - (3) の通りである。(1) フェムト秒レーザーを利用した非接触型の細胞破碎から、細胞抽出液を直ちにモノリス担体に吸着までを微量空間で実行できるワンセルプロテオームチップを作製した。(2) 定量精度の高いタンパク質分析法により、HPLC を基盤としたタンパク質分離を確立した。(3) 目的物質の特異的抽出により定量精度の高い解析を目標に、HPLC と質量分析を基盤とした、ペプチド分析法とタンパク質のオンライン酵素消化法を実施した。



プロテオームチップ

高木昌宏 (北陸先端科学技術大学院大学)

「タンパク質構造転移の網羅的多変数解析」: [個体レベル]ゼブラフィッシュをモデル生物として、蛍光強度によりカルシウム濃度を検出できるタンパク質 (カメレオン) を用い、従来法 (蛍光指示薬やエクオリン等) の限界である受精後 10 時間程度に比べて長時間 (受精後 30 時間以上)、非侵襲的に細胞内のカルシウムイオン濃度変化の観察が可能な系を構築した。その結果、原腸形成期から脳神経形成でのカルシウムシグナルに関する知見を明確にすると同時に、形態形成過程とカルシウムイオン濃度の関係について新たな知見を得た。

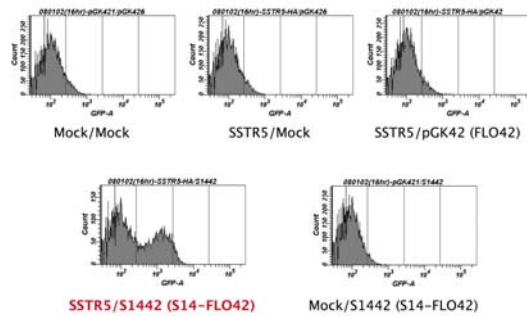


[細胞レベル]1 細胞レベルで脂質ラフト構造を蛍光観察により可視化した。不飽和脂肪酸（リノール酸）添加による濃度依存的なラフト領域の不安定化を観察することができた。細胞レベルでのラフト不安定性を、細胞模倣系（巨大リポソーム）を用いて解析し、細胞の場合と比較した。

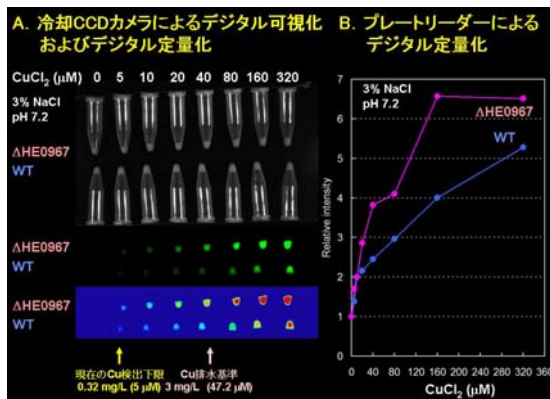
[分子レベル]細胞サイズのラフト含有巨大リポソームを作成し、外部刺激によりタンパク質が無い状態でラフト領域依存型のエンドサイトーシスを起こすことを初めて明らかにした。リポソームをさらに生きた細胞に近づけるため、細胞膜の内側と外側でその組成が異なっている非対称リポソームを非液滴法を利用して作成する方法を考案し特許出願、論文発表した。また、細胞サイズリポソームを用いて、アミロイドβの細胞毒性について、膜のダイナミクスを解析することで評価した。

近藤昭彦（神戸大学）「リガンドペプチドの網羅的機能発現と定量」：ヒトのソマトスタチンレセプターをおよびリガンドであるソマトスタチンをモデルとして用いて、蛍光レポーターによりシグナル伝達量を定量化できる酵母細胞を構築し、さらに1細胞での検出が可能なレベルにまで蛍光感度を高めることに成功した。また、ペプチドリガンド（ソマトスタチン）を酵母表面提示することにより、ヒトソマトスタチンレセプター発現細胞のシグナル伝達を起こさせることに成

功し、簡便かつハイスループットなアゴニストスクリーニングに応用できることを示唆した。さらに、ソマトスタチンレセプターのN末端あるいは細胞外ループ2ドメインに変異を導入することにより、シグナル伝達に關与する重要なアミノ酸残基を決定することに成功し、酵母を用いた本システムの有用性を証明した。



仲山英樹—吉田和哉（奈良先端科学技術大学院大学）「代謝低分子の網羅定量解析」：塩類集積環境では、微量の重金属元素に対して塩分が大過剰量存在するため、飲料水などを対象として開発された既存の環境技術を適用することは困難である。しかしながら、好塩性生物は、塩類集積環境に微量に存在する金属元素をサーベイして選択的に摂取または排出することで細胞内の金属恒常性を維持する環境適応機構を備える。そこで本研究では、好塩性細菌ハロモナスの優れた環境適応機構を解明して活用することにより、塩類集積環境で応用可能な新規金属サーベイヤーハロモナスの開発を行った。まず、ハロモナスのトランスクリプトーム解析により銅応答性プロモーターを同定し、その支配下に緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した銅サーベイヤーハロモナスの作製に成功した。さらに、メタボローム解析により特定した銅恒常性制御の鍵となる代謝物の合成量を代謝工学的制御することにより、細胞の銅応答性を制御することが可能となった。今後は、亜鉛な

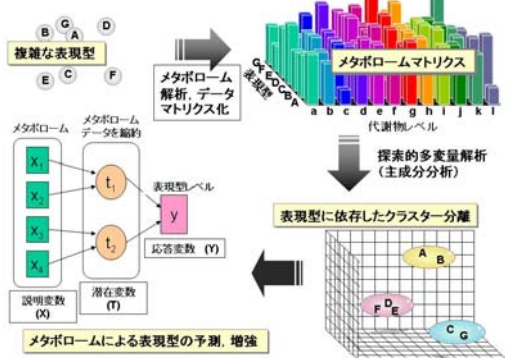


どの他の金属種についても研究を進めることで、標的金属に応じた多様な金属サーベイヤハロモナスの創成が期待される。

福崎英一郎（大阪大学大学院工学研究科）

「データマイニングシステムの開発」：ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）およびキャピラリー電気泳動質量分析（CE/MS）を用いることにより、生体内低分子一次代謝物の網羅的観測システムを構築した。開発したシステムを用いて動植物微生物の一次代謝解析を実施し、実用性を確認するとともに、メタボロミクス（網羅的代謝産物解析）への適用を検証した。

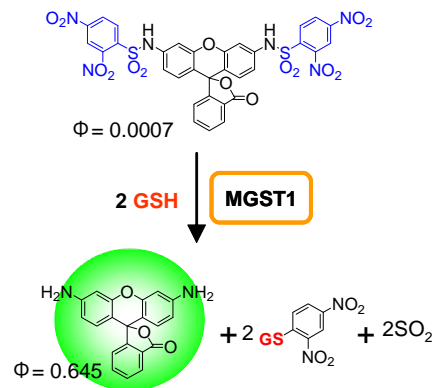
メタボロミクスによる表現型解析と性能向上戦略



伊藤嘉浩（独立行政法人理化学研究所）

「核酸やタンパク質の網羅的多変数分析」：様々な生体成分をマイクロアレイ固定化できる方法論を開発した。開発したマイクロアレイチップを用いて、アレルギー診断、自己免疫疾患診断、不規則抗体診断などができることを明らかにするとともに表面プラズモ

ン共鳴（SPR）、二次元 SPR、さらには水晶発振子マイクロバランスによる測定にも応用可能であることが明らかとなった。一方、細胞内のイメージングを、特に細胞の解毒の役割を担うグルタチオン-S-トランスフェラーゼについて行えるような新しい化学プローブの作成に成功した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 104 件）

①Hata K, Morisaka H, Ishizuka N, Ueda M. Two-dimensional HPLC on-line analysis of phosphopeptides using titania and monolithic column. *Anal Biochem*, 350: 191-197, 2006. (査読有)

②Vestergaard, M., Hamada, T., Saito, M., Yajima, Y., Kudou, M., Tamiya, E., Takagi, M. Detection of Alzheimer's amyloid beta aggregation by capturing molecular trails of individual assemblies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 377, 725-728, 2008 (査読有)

③Horie T, Sugawara M, Okunou K, Nakayama H, Schroeder JI, Shinmyo A, Yoshida K. Functions of HKT transporters in sodium transport in roots and in protecting leaves from salinity stress. *Plant Biotech*, 25: 233-239, 2008. (査読有)

④Kim, J. K., E. Fukusaki et al, "Time course metabolic profiling in Arabidopsis thaliana cell cultures after salt stress treatment." *J Exp Bot*: 58(3), 2007, 415-424. (査読有)

⑤Fukuda N, Ishii J, Tanaka T, Fukuda H and Kondo A. Construction of a novel detection system for protein-protein interactions using yeast G-protein signaling. *FEBS J.* in press, 2009. (査読有).

⑥ Johan Ålander, Katarina Johansson, Vanina Dahlström Heuser, Henny Farebo,

Julia Järvliden, Hiroshi Abe, Aya Shibata, Mika Ito, Yoshihiro Ito, Ralf Morgenstern, "Characterisation of a New Fluorogenic Substrate for Microsomal Glutathione Transferase 1," Anal Biochem, in press (査読有)

他に、98 報

[学会発表] (計 200 件)

国際

- ① Takagi, M 2006/6/6 Imaging of intracellular calcium ion during embryogenesis of zebrafish. The First International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis, Uppsala Sweden,
- ② Ito Y "Photolithography using Novel Photo-Reactive Natural and Synthetic Polymers" CNP-2007, 2007/11/7, Kerala
- ③ Hara K, Morisaka H, Ueda M "Quantitative analysis of signal transduction", The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2008/9/13, Zurich, Switzerland

他に、42 件

国内

- ① 森坂裕信, 植田充美 「ワイドポアシリカモノリス型カラムを用いたプロテオーム解析」第 18 回クロマトグラフィー科学会議, 2007 年 11 月 11 日, 函館市民会館
- ② 森坂裕信, 植田充美 「モノリスカラムを用いた HPLC によるプロテオーム解析」第 21 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2008 年 8 月 5 日, 札幌コンベンションセンター
- ③ 森坂裕信, 植田充美 「モノリス型カラムを用いたプロテオーム解析システムの構築」日本農芸化学会 2009 大会, 2009 年 3 月 28 日, 福岡マリンメッセ
- ④ 森口みゆき, 石井純, 立松健司, 黒田俊一, 福田秀樹, 近藤昭彦 「フェロモン応答性タンパク質を利用した新規レポーターによるリガンド検出システムの開発」化学工学会第 38 回秋季大会, 2006 年 9 月 11 日, 福岡市
- ⑤ 瀧村晋, 和泉 自泰, 馬場 健史, 福崎 英一郎 「LC/IT-TOF-MS による定量的 microRNA 解析手法の開発」日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 28 日, 福岡市

他に、150 件

[図書] (計 51 件)

- ① 神原秀記, 松永是, 植田充美 (2006) 「一細胞定量解析の最前線 -ライフサイエンス構築に向けて-」シーエムシー出版
- ② 植田充美 (2007) 「抗体医薬の最前線」シーエムシー出版

③ 植田充美 (2009) 「ナノバイオテクノロジー: 新しいマテリアル、プロセスとデバイス」シーエムシー出版

他に、48 件

[産業財産権]

出願状況 (計 5 件): 非公開

[その他]

新聞記事 (計 14 件)

2007 年 2 月 5 日 日刊工業新聞

先端技術 (芽を育む研究室)

(北陸先端科学技術大学院大学・

高木昌宏)

他に、13 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 90183201

(2) 研究分担者

高木 昌宏 (Masahiro TAKAGI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテ

リアルサイエンス研究科・教授

研究者番号: 00183434

近藤 昭彦 (KONDO AKIHIKO)

神戸大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 40205547

吉田 和哉 (YOSHIDA KAZUYA)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号: 50252622

仲山 英樹 (NAKAYAMA HIDEKI)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 30324982

福崎英一郎 (FUKUSAKI EIICIRO)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 40273594

伊藤 嘉浩 (ITO YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナ

ノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号: 40192497

(3) 連携研究者: 該当なし