

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14689

研究課題名(和文)酸化還元・リン酸化状態定量技術の融合に基づく生体応答プロファイリング技術の構築

研究課題名(英文)Development of bio-response profiling technology based on the integration of redox and phosphorylation state determination technologies

研究代表者

新木 和孝 (Araki, Kazutaka)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60514255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の翻訳後修飾は、細胞内の恒常性、すなわちプロテオスタシスを維持する上でも重要な役割を果たしている。本研究では、タンパク質翻訳後修飾の代表例であるリン酸化状態と、酸化修飾状態という異なる翻訳後修飾間の細胞内クロストークをとらえるための解析系の構築をすすめた。リン酸化修飾状態と酸化還元状態の定量化と同時に、酸化還元状態の制御を受けるタンパク質を中心とした相互作用検出法を検討し、反応性の高いシステイン残基を中心とした相互作用部位の同定につながる実験系の構築に成功した。この技術は、システイン残基を介するタンパク質間のシグナルクロストークを検証する上で、有用性の高いツールと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素(Reactive Oxygen Species, ROS)の発生による酸化ストレスが、多岐に渡る生命現象や疾患とも密接に関わっていることに注目が集まっている。例えば、生活習慣に起因する動脈硬化や糖尿病等の疾患、加齢に伴う生体機能の低下や神経変性疾患、がん発生の原因(酸化修飾)とも密接に関与していることが知られており、その実像に迫る必要がある。特に、細胞内酸化還元状態のバランスとその制御に関して、酸化修飾とシグナル伝達という複合的な視点で、その具体的な影響をもとに両者の関連性をとらえる必要性がますます高まっており、本研究がその一助となる意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Post-translational modifications of proteins play an important role in maintaining cellular homeostasis, i.e. proteostasis. In this study, we developed a quantitative and direct analysis system to capture the crosstalk between different states of post-translational modifications of proteins: phosphorylation and oxidative modification. The quantitative analysis of the phosphorylation-modified state and the quantification of the redox state of the cysteine residues have been carried out, and at the same time, an experimental system has been successfully constructed that leads to the identification of interaction sites around the redox-reactive cysteine residues. We believe that these techniques will be a useful tool for examining signaling pathways, with a focus on crosstalk between proteins via cysteine residues.

研究分野：細胞生物学

キーワード：翻訳後修飾 質量分析測定 リン酸化 酸化還元 相互作用解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内酸化還元状態のバランスとその制御に関して、酸化修飾とシグナル伝達という複合的な視点で、その具体的な影響をもとに両者の関連性をとらえる必要性がますます高まっている。兼ねてから、活性酸素(Reactive Oxygen Species: ROS)の発生による酸化ストレスが、多岐に渡る生命現象、中でも疾患とも密接に関わっていることに注目が集まってきた。例えば、生活習慣に起因する動脈硬化や糖尿病等の疾患、加齢に伴う生体機能の低下や神経変性疾患、さらにはがん発生の原因(酸化修飾)とも密接に関与していることが知られており、その実像に迫る必要がある。

これまでの研究でも、生物学的にも重要な役割を果たしている多くの生体因子の活性が、その活性中心付近などに存在するレドックス反応性の高いシステイン残基の酸化還元状態で制御されていることが報告されている。例えば、シグナル伝達に関与する因子として AMPK, ASK1, HIF, KEAP, JNK, NFκB, PTEN, p53, Src, 代謝に関わる GAPDH, PKM なども、その活性中心近傍のシステイン残基の酸化還元状態の変化に応じて、その活性が制御されている¹⁾。さらに、ROS 自体がシグナル仲介分子であり、シグナル伝達と密接に関係していることも明らかになっている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、細胞内システイン残基の酸化還元状態の変動と、細胞内の代表的シグナル伝達経路であるリン酸化シグナル状態との協調性や関連性を明らかにする技術基盤を構築することを目的とした(図1)。

申請者はこれまでに、細胞内酸化還元状態定量、リン酸化状態定量に関して次のような技術開発を進めてきた。

細胞内酸化還元状態に関しては、細胞内酸化ストレスの惹起時に、主にシステイン残基のチオール基に可逆的・不可逆的翻訳後修飾が生じるため、システイン残基の酸化還元状態というプロファイル情報をもとにして、細胞内の酸化還元状態を評価する技術を開発した²⁾。ここでは、安定同位体により質量差をもたせたラベル体(iodoTMT-iodoacetyl tandem mass tag)を活用し、複数サンプル由来の酸化還元状態の網羅的同時定量を行う技術である。

リン酸化プロテオミクスに関しては、チタンカラムを用いたリン酸化ペプチドの回収精製回収し、そのリン酸化ペプチドの質量分析測定によりリン酸化部位の同定とともに、イオン強度をもとにした相対定量が可能である。本研究では「3. 研究の方法」に示す技術開発を進め、これらの技術を融合する橋渡し技術の確立に注力した。



図1 生体恒常性維持

3. 研究の方法

本研究期間においては、上述したチタンカラム等を用いたリン酸化ペプチド回収技術、還元状態と可逆的酸化状態のシステイン残基を安定同位体型の質量の異なるラベル体で修飾し、酸化還元状態の定量化を進めると同時に、細胞内酸化還元状態とリン酸化状態の直接的な協調性や関連性を明らかにするために、主に次のような2つのポイントから研究を進めた。

①異なる翻訳後修飾間のクロストーク検出技術の開発

申請者らはこれまでに、DVSF を用いて、システイン残基を中心とする、直接的な相互作用関係を明らかにしてきた(図2)^{3,4)}。システイン残基の酸化還元状態の制御には、チオレドキシン(以下:TXN)やペルオキシレドキシニンなどの酸化還元酵素が直接的に働きかけている可能性が高いと考えられる。

TXN 等の酸化還元酵素を中心として、酵素と基質との活性中心依存的な相互作用を明らかにする際に一般的に用いられる手法は右図に示す方法である。酸化還元酵素の活性中心は CXXC motif(X は任意のアミノ酸)であることが知られ、活性中心依存的な相互作用を検出するために CXXA 変異体を用い、AXXA 変異体を用いて活性中心「非」依存的な相互作用を検出することが可能である。s

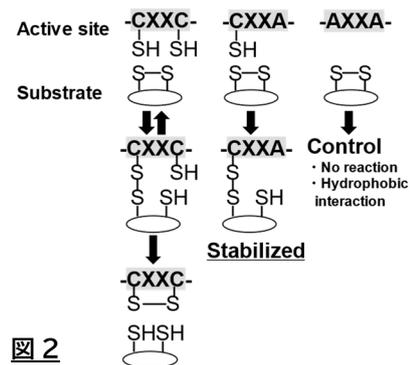


図2

さらに図3のようにDVSFを用いた手法もすでに開発している。この手法を用いて、TXNの基質として、リン酸化シグナル経路に関係する分子を同定することを試みた。本研究では、サイトゾル画分に存在する代表的な酸化還元酵素としてTXN、チオレドキシンドメイン様タンパク質17(以下:TXNDC17)を用いた³⁾。これらのFLAG-tag付き配列および変異体を恒常的に発現する

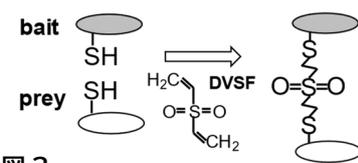


図3

HEK293T細胞を用いて相互作用解析を進め、特に酸化・還元ストレスとして50 μM H₂O₂と1 mM DTTを負荷した条件下で、特異的な相互作用関係が明らかになるかに注目した。

②直接的な相互作用を同定するための基盤開発

①で述べたシステイン残基を介して直接的に相互作用する因子を同定するため、ジスルフィド結合やDVSF架橋されたペプチド部位を同定する技術開発を進めることとした。

クロスリンクされた配列のみを回収する技術の一つとして、図 4 のように示される方法を採用した⁵⁾。タンパク質を Typsin で消化後、(3)分画・濃縮を行う。ここでは、クロスリンクされたペプチド断片のそれぞれの C 末端に、アルギニンまたはリジン残基があるため、陽イオン交換カラムにおいて溶出されにくいペプチド複合体である。または、分子量サイズが他のクロスリンクされていないものと比較して大きい傾向があるため、分子量サイズでの分画も可能である。これらの分画・濃縮を通して、クロスリンクされたペプチドが質量分析測定において検出されるかを検証した。

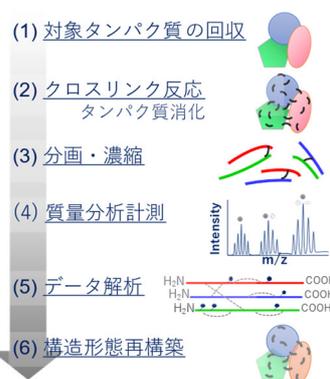


図 4

4. 研究成果

<相互作用解析結果>

変異体を用いた相互作用、DVSF を用いた相互作用解析を進めた。また、酸化ストレス(50 μ M H₂O₂)、還元ストレス(1 mM DTT)を 5 分程度負荷した条件での実験を進めた。再現性を含めて、84 解析の相互作用解析を行った結果、ノンスペと予想される因子も含めて 1167 因子の相互作用因子を同定した。そのなかで、リン酸化カスケードに関連し、さらにストレス応答依存的に相互作用する因子を抽出したところ、TXN 特異的な因子として 4 因子、TXNDC17 特異的な因子 7 因子、共通する因子として 8 因子を同定した(投稿準備中)。

TXN は興味深いことに、酸化ストレス(50 μ M H₂O₂)、還元ストレス(1 mM DTT)を受けた際に、いずれも酸化状態に移行する(図 5)。すなわち、TXN は酸化・還元ストレスいずれも同等の「ストレス」として応答している可能性が示唆される。この結果と相関性のある結果として、TXN 特異的に相互作用する 4 因子は、酸化・還元ストレスいずれの状況下においても相互作用する因子であった。

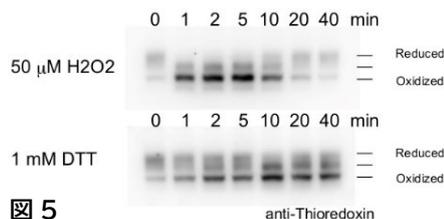


図 5

今回の結果では、予想以上に TXNDC17 がシグナルカスケード関連の因子と相互作用することが見いだされた。また AXXA 変異体でも多数の相互作用因子を同定する結果になっており、活性中心以外の領域でも相互作用しやすい性質をもっていることが強く示唆された。これらの相互作用結果を踏まえ、リン酸化シグナルとレドックスとの直接的な相互作用に関する生物学的意義の検証を引き続き進めている。

<直接的な相互作用に関して>

以上の結果を踏まえて、TXN や TXNDC17 の相互作用因子が、具体的にどのシステイン残基を介して相互作用しているのかを明らかにすることが、レドックス制御とリン酸化シグナルとの直接的な関係性を明らかにするために必要である。そのため、ここで取り組んだのは、クロスリンクされたペプチド断片のみを効率よく回収する技術である。具体的な実験操作は図 4 で示した通りであり、クロスリンクされたペプチドの濃縮方法として、陽イオン交換カラムを中心に最適化を行った。その結果、モデルタンパク質を対象として、比較的再現性の高い技術が確立することに成功した。

この手法では必ずしもシステイン残基同士のペプチド検出が同定されない可能性があり、相互作用している領域を抽出する別の手法の開発を進めた。その一つとして、クロスリンカーにタグを入れ、クロスリンクされたペプチド部位を、そのタグを用いて回収する方法である。この場合、クロスリンクされた領域は、立体構造上近傍にあることが予想されるため、立体構造予測をもとに、どのシステイン残基同士が近傍に存在するかを推定することが可能である。

タグ付きのクロスリンカーはほぼ市販されておらず、有機合成をする必要がある。そのため、本研究期間においてはタグ付きクロスリンカーの有機合成を中心に行った。取り組んだクロスリンカーを図 6 に示した⁶⁾。リン酸基をもつクロスリンカーであり、リン酸化ペプチドを回収する方法と同等の方法で濃縮可能である。

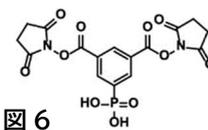


図 6

本研究結果から、TXN/TXNDC17 との直接的な相互作用関係が強く示唆されるリン酸化シグナル関連因子が同定された。今後は、この相互作用因子の直接的な相互作用領域の同定とその生物学的意義を明らかにする。本研究で開発している基盤技術は、TXN/TXNDC17 以外にも多様な酸化還元酵素を中心とする分子に対して応用可能であり、汎用性の高い手法へと高度化を進める。

<引用文献>

1. Dustin, C. M., Heppner, D. E., Lin, M. C. J. & van der Vliet, A. Redox regulation of tyrosine kinase signalling: more than meets the eye. *J. Biochem.* 167, 151-163 (2020).
2. Araki, K. et al. Redox Sensitivities of Global Cellular Cysteine Residues under Reductive and Oxidative Stress. *J. Proteome Res.* 15, 2548-2559 (2016).
3. Araki, K. et al. A crosslinker-based identification of redox relay targets. *Anal. Biochem.* 520, 22-26 (2017).
4. Araki, K. et al. Functional profiling of asymmetrically-organized human CCT/TRiC chaperonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 481, 232-238 (2016).
5. Schneider, M., Belsom, A. & Rappsilber, J. Protein Tertiary Structure by Crosslinking/Mass Spectrometry. *Trends Biochem. Sci.* 43, 157-169 (2018).
6. Steigenberger, B., Pieters, R. J., Heck, A. J. R. & Scheltema, R. A. PhoX: An IMAC-Enrichable Cross-Linking Reagent. *ACS Cent. Sci.* 5, 1514-1522 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新木和孝
2. 発表標題 プロテオミクスによるタンパク質相互作用形態追跡
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----