

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710169
 研究課題名 (和文) ディファレンシャル・ユビキチン化プロテオミクスを用いた
 植物病害抵抗性因子の同定
 研究課題名 (英文) Identification of novel factors involved in plant immunity by
 differential ubiquitinated proteome analysis
 研究代表者
 中神 弘史 (NAKAGAMI HIROFUMI)
 独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究チーム・研究員
 研究者番号：20435663

研究成果の概要：本研究は病原体接種時にユビキチン化される植物側の因子の網羅的解析を目的としている。比較修飾プロテオーム解析の遂行には、1) 網羅的解析用への LC-MS システムの最適化、2) 修飾タンパク質の精製法の確立、3) LC-MS を用いた比較定量解析法の確立、が主要な研究課題となる。本研究成果として、LC-MS システムの最適化および安定同位体標識による比較定量法の確立、そして改良型のユビキチン化タンパク質精製法を用いたユビキチン化タンパク質の同定に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：植物プロテオミクス

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：植物病害抵抗性、プロテオミクス、ユビキチン化、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

作物の安定生産は、人口増加に伴う食糧危機を回避する一つ的手段として重要な課題である。長年の交配による抵抗性品種の選抜育成および様々な農薬の開発にも関わらず、現在でも約3割の作物が、細菌、カビ、線虫、ウィルス、昆虫等の植物病原体や雑草の被害により失われている。

病害抵抗性の分子機構の解明は植物への耐病性付与に重要な手掛かりを与えることが期待され、抵抗性反応を指標とした遺伝学

的手法を用いたスクリーニングが、これまでに多くの研究グループにより精力的に試みられてきた。その成果として、多数のRタンパク質、Rタンパク質の安定化に寄与することで免疫応答を制御する因子群 (RAR1, SGT1, HSP90) が単離され、植物が病原体を認識するプロセスの理解が深まった。しかし、遺伝学的アプローチによるスクリーニングが飽和状態に達したにも関わらず、病原体認識から抵抗性反応に至るシグナル伝達の分子機構は依然として闇に包まれていた。その主な

る原因として、遺伝子の機能重複や変異体の致死性に由来する順遺伝学的手法の限界が挙げられる。

プロテオミクス的手法は、順遺伝学的手法による制約の解消のみならず、翻訳後修飾の解析に最も有効な手段であることから、未知のシグナル伝達機構の解析に威力を発揮すると期待されている。翻訳後修飾はタンパク質の機能を調節する代表的な制御機構であり、細胞内シグナル伝達におけるシグナルの受け渡し的手段として頻用されている。シグナル伝達の分子機構の理解には、シグナル伝達因子の同定に加えて、同定因子の翻訳後修飾制御の有無、更に翻訳後修飾を受ける場合の修飾位置の情報が、非常に重要かつ直接的な手掛かりとなり得る。

近年の質量分析器 (MS) およびナノ液体クロマトグラフ (nanoLC) 等の周辺設備の性能の飛躍的な向上とゲノム情報の充実が相まって、nanoLC-MSシステムを用いたタンパク質のハイスループットかつ網羅的な解析が現実化してきている。このようなプロテオーム解析の主流はショットガンプロテオミクスと呼ばれ、タンパク質混合物をプロテアーゼでまとめて消化し、ペプチド断片をnanoLCシステムでキャピラリー逆相カラムなどを用いて分離して質量分析解析を行い、ペプチドの質量分析情報をもとに試料に含まれていたタンパク質集団を一度に大規模に同定する。理論的には細胞粗抽出液などの未分画の試料の解析を行い、翻訳後修飾されたペプチドを検索することで、タンパク質の翻訳後修飾状態およびその修飾部位を同定することができる。しかし、実際は修飾ペプチドと未修飾ペプチドの存在比が大きく異なるため、解析試料が複雑すぎると存在比が小さい修飾ペプチドの同定は非常に難しくなる。つまり修飾プロテオミクス成功の鍵は修飾ペプチドの精製・濃縮技術にある。

ユビキチン化に絞ったプロテオーム解析は、植物分野では前例がなく、他分野においてもその手法は発展途上にある。ユビキチン化プロテオーム解析の成否は不安定で微量なユビキチン化タンパク質を如何にして選択的に精製できるかに懸かっており、多分野の研究グループがより良い手法の開発を試みているものの、未だ汎用性の高いユビキチン化タンパク質の精製法は確立されていない。

近年、酵母の研究において、タグを付与したユビキチン遺伝子を内在性のユビキチン遺伝子と置換し、タグに特異的なアフィニティーカラムを用いてユビキチン化タンパク質を精製する方法が報告された。この方法は

内在性ユビキチン遺伝子のタグ化ユビキチン遺伝子への置換を前提としているため、酵母以外の生物への適用が困難である。他の欠点として、細胞内に大量に存在する基質に付加されていない遊離ユビキチンが同時に精製され、質量分析解析を行う際の障害になることが挙げられる。

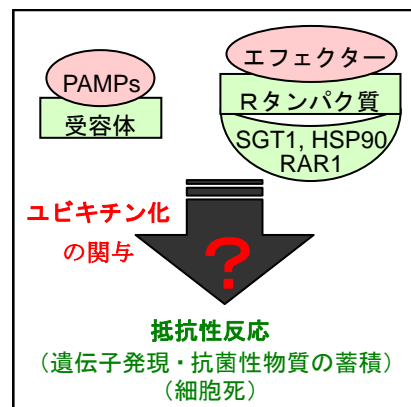
また、基質に共有結合したユビキチンを選択的に認識できる抗ユビキチン抗体を用いたユビキチン化タンパク質の精製法が報告された。この方法は汎用性が高いという点で非常に優れているが、高価な抗体を大量に必要とするという難点を有する。

本研究では、共同研究者のMaor博士 (John Innes Centre, イギリス) が開発した植物由来のユビキチン結合ドメイン (UIM) を用いた新規のユビキチン化タンパク質精製法を活用する。Maor博士は、大腸菌発現系を用いて調製したUIMはユビキチン化タンパク質と選択的に結合し、遊離ユビキチンとは結合しないことを見出した。UIMは他生物でも高度に保存されており、大腸菌発現系を用いたUIMの大量調製は安価かつ容易である。そこで、UIMを利用したユビキチン化タンパク質の精製法は、抗体を用いた方法のコスト面での難点を補う、汎用性の高い優れた方法と成り得る。

2. 研究の目的

本研究では植物免疫応答のシグナル伝達因子の同定を目指したプロテオーム解析手法の確立を目的とした。

より具体的には、ユビキチン化の植物免疫応答への重要性がE3ユビキチンリガーゼ群の研究により示されたことを踏まえ、ユビキチン化タンパク質の量的変動を網羅的に解析するシステムの確立を目的とした。



3. 研究の方法

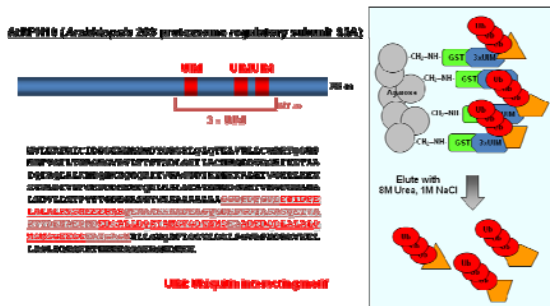
高速かつ高感度なリニアイオントラップ型質量分析器 (Thermo Finnigan LTQ) および多次元分離が可能な液体クロマトグラフィー (GE Ettan MDLC) が所属機関で使用でき

る利点を生かし、2DLC-MS/MS（二次元液体クロマトグラフィー - 質量分析器）を用いたショットガン方式のディファレンシャル・プロテオーム解析法の確立を試みた。

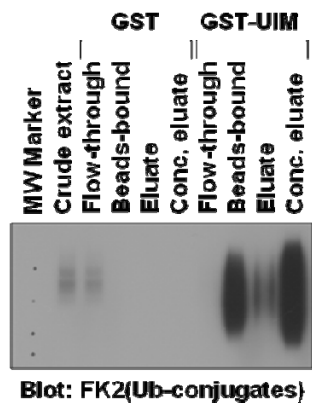
最初に、1) 植物由来のユビキチン結合タンパク質をアフィニティー担体としたブルダウン法によるユビキチン化タンパク質の精製法の最適化を行った。平行して、2) ショットガン式プロテオーム解析用へのLC-MS/MSの最適化を行った。また、3) ディファレンシャル解析を可能にするために、安定同位体標識による比較定量法の確立を行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ由来のプロテアソームのS5aサブユニット (AtRPN10) に存在するユビキチン結合領域UIMを用いて、下図に示すアフィニティーカラムを作製した。



作製したカラムを用いてシロイヌナズナの細胞粗抽出液からのユビキチン化タンパク質の精製・濃縮条件の検討を行い、右図に示すようにユビキチン化タンパク質を効率よく精製・濃縮できる系の確立に成功した。



(2) ペプチド混合物をオンラインで二次元分離して質量分析器で解析できるシステムの構築を行い、同じ試料から1回のLC-MS解析で同定できるペプチドおよびタンパク質の数を飛躍的に向上させることに成功した。その結果、下表に示すように(1)の成果技術を用いて調製した精製試料より100以上

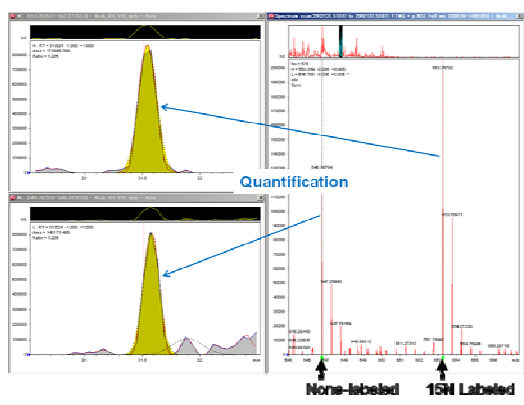
	Identified Peptides	Identified Proteins
1D Separation	33	24
2D Separation	365	141

のタンパク質が1回の解析で同定できるようになった。

(3) 現在、ショットガンプロテオミクスで使用可能な定量解析法は、1) ノンラベルの比較定量解析法、2) iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) 等の安定同位体ラベルされた試薬で精製ペプチドを *in vitro* で標識する方法、3) SILAC (Stable isotope labelling with amino acids in cell culture) 法に代表される¹³Cや¹⁵Nでラベルされた成分を含む培地中で細胞を培養して全タンパク質を *in vivo* で標識する方法、の大きく三種類に分類される。

1) の方法は解析機器の安定性に高度に依存し、測定条件の僅かなブレに結果が左右されるため、最先端の技術を用いても未だに得られる結果の信頼性が低く、2) および3) の方法が現在の比較解析の主流となっている。本研究で使用する質量分析器の特性上、2) の方法を用いると一度の解析で同定されるペプチドの数が大幅に減少することが予想される。そこで、本研究では3) の方法を採用した。

SILAC法でタンパク質の標識に用いるアミノ酸 (リジンおよびアルギニン) は植物細胞内では生合成されるため、植物を材料にSILAC法を用いるとタンパク質の標識が不完全になり定量解析が極めて困難になる。そこで、培地に含まれる窒素源を¹⁵Nでラベルされたものに置換し、代謝産物をも含めて全タンパク質を標識する方法を試みた。



標識のための条件検討を行い、シロイヌナズナにおいて全タンパク質を¹⁵Nで99%以上標識することが可能になった。

比較解析にはデータ処理システムの構築も必要不可欠である。上図に示すような非標識および¹⁵Nで標識したペプチドの比較定量解析が行えるシステムの整備を行い、比較解析のための技術基盤の確立に成功した。

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3件)

- ① Naoyuki Sugiyama、Hirofumi Nakagami、Keiichi Mochida、Arsalan Daudi、Masaru Tomita、Ken Shirasu、Yasushi Ishihama、Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis*、Molecular Systems Biology、4、193、2008、査読有り
- ② Armin Djamei、Andrea Pitzschke、Hirofumi Nakagami、Iva Rajh、Heribert Hirt、Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling、Science、318(5849)、453-456、2007、査読有り
- ③ 中神弘史、白須賢、ユビキチン結合領域を利用したユビキチン化タンパク質の精製法、BIOバイオテクノロジージャーナル、9-10月号、594-598、2007、査読無し

[学会発表] (計4件)

- ① 中神弘史、シロイヌナズナおよびイネにおけるリン酸化部位の大規模解析(リン酸化プロテオミクス)、日本植物生理学会年会、2009年3月22日、名古屋大学
- ② 杉山直幸、Plant Phosphoproteome by Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography (HAMMOC)、HUPO 7th Annual World Congress、2008年8月19日、Amsterdam (Netherlands)
- ③ 中神弘史、Global phosphoproteome analysis of *Arabidopsis*、International symposium on Frontier in plant proteome research、2008年3月10日、つくば農林ホール
- ④ 杉山直幸、Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography (HAMMOC) for phosphoproteomics of plants、International symposium on Frontier in plant proteome research、2008年3月10日、つくば農林ホール

[その他]

ホームページ等

http://ksg.psc.riken.jp/Projects_J.html

<http://omicspace.riken.jp/gps/>

<http://pepbase.iab.keio.ac.jp/phospho/msb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中神 弘史 (NAKAGAMI HIROFUMI)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究
チーム・研究員
研究者番号：20435663

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：