

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成26年 1月30日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2013

課題番号：22370042

研究課題名（和文）標的化プロテオミクスによるタンパク質巨大複合体の翻訳後修飾の網羅的解析

研究課題名（英文）Global analysis of post-translational modifications in super-molecular protein complexes by targeted proteomics

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）：

巨大タンパク質複合体、小型オルガネラに標的を絞り、その構成タンパク質の翻訳後修飾を、高分解能フーリエ変換型質量分析装置を中心とした装置と複数の解析法を組み合わせることにより詳細に解析することでを目的とする。これまでのボトムアップアプローチに加え、全長タンパク質を装置内で開裂させることで修飾を解析するトップダウンプロテオミクスによる解析法を組み合わせ、これまでの研究手法に比して、より詳細な修飾を見逃すことなく同定する。

研究成果の概要（英文）：

In this project, post-translational modifications were analyzed by targeted approach by isolating supra-molecular protein complexes and small organelles, and analyzing post-translational modifications using both top-down and bottom-up proteomic approaches. Reducing the complexity of the samples should increase the coverage and the extent of the modifications detected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：プロテオミクス、巨大分子複合体、翻訳後修飾、オルガネラ、質量分析

1. 研究開始当初の背景

（1）ヒトゲノム解析の完成を受けて、生命科学は遺伝子、転写産物、タンパク質、代謝物、それぞれのレベルでの大規模解析・網羅的解析、いわゆるオミックス研究へと向かっている。タンパク質の網羅的解析であるプロテオミクスは、二次元ゲル電気泳動のスポッ

トの同定という定性的な解析から、安定同位体法などによる定量的解析へと進化してきた。一方で、タンパク質の機能はその発現量だけで制御されているわけではない。タンパク質リン酸化に加えて、最近では、アセチル化やメチル化、さらにポリ・ユビキチン化、モノ・ユビキチン化などの翻訳後修飾の、タ

ンパク質分解の調節、活性調節・相互作用調節における重要性が明らかになり、**タンパク質翻訳後修飾の研究は生命科学の最重要テーマのひとつ**であり続けている。

(2) 研究代表者らは、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、ミリスチル化などの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 (Yamauchi 他 Nature Struc.Biol.2003; Matsubara 他 EMBO J.2004)。最近では、**EGF 受容体下流タンパク質のリン酸化プロテオミクスにより、多数の新規タンパク質を発掘**し、それらの生理機能と EGF 受容体との関わりを明らかにしている (Tashiro 他, J.Biol.Chem.2006; Konishi 他, J.Biol.Chem.2006 ; Sano, BBA Mol. Cell.Res.2008 ; Tashiro 他, J.Biol.Chem.2009)。一方で、研究代表者らはオルガネラに標的を絞った**オルガネラプロテオミクスによる細胞内小器官のプロテオーム解析**をもう一つのテーマとし、脂質代謝に関わるペルオキシソームや脂肪滴の構成タンパク質の解析を行ってきた (Kikuchi, J.Biol.Chem.2004; Ozeki 他, J.CellSci.2005)。

(3) 世界的にタンパク質リン酸化をはじめとする翻訳後修飾の網羅的解析の試みが進められているが、タンパク質の存在比に加えて、修飾の程度が様々であることから、細胞に含まれるタンパク質の翻訳後修飾の網羅的解析では、ダイナミックレンジがさらに2桁程度大きくなる事が予想され、存在量が少ないタンパク質成分のマイナーな修飾の存在は容易に見逃されることになるはずである。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、研究代表者らのグループにおいてこれまで行ってきた EGF 受容体下流タンパク質のシグナリング複合体や核膜孔複合体などの巨大分子複合体、ペルオキシソームなどのオルガネラに注目し、それらの試料調製技術を生かすことで標的とする構成成分を単純化する。

(2) 既に導入したフーリエ変換型質量分析装置 (サーモ社製 LTQ-FT) のもつ超高分解能と二つの開裂技術 (衝突誘起解離 CID と電子捕獲解離 ECD)、最新鋭のオービトラップ型質量分析装置が持つ3つめの開裂技術 (電子移動解離 ETD) を用いたトップダウンアプローチとこれまでのタンパク質をプロテアーゼ処理して得られるペプチドを解析するボトムアップアプローチを組み合わせることで、従来に増して詳細な翻訳後修飾を個々のタンパク質分子に注目して解析することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究においては、翻訳後修飾の網羅的解析を、細胞ライセートのような複雑な混合物ではなく、数十から数百種類の構成成分からなる複合体・オルガネラに絞ることで、微量の構成タンパク質の修飾解析も可能にする標的化プロテオミクスの手法に加え、最先端のフーリエ変換型質量分析装置を用い、相補的な開裂法である CID と ECD、ETD の3種類の開裂法を組み合わせ、さらにプロテアーゼ処理して得られるペプチドを解析してきたこれまでのボトムアップアプローチに加え、全長タンパク質を装置内で開裂させることで修飾を解析するトップダウンプロテオミクスによる解析法を組み合わせることで、これまでのリン酸化プロテオミクスなどに比して、より詳細な修飾を見逃すことなく同定する手法を開発する。

4. 研究成果

(1) 最初にトップダウンプロテオミクスのための逆相 HPLC の条件検討を行った。インタクトのタンパク質の逆相カラムによる分離には、通常逆相カラムによるペプチドの分離に比べ、分離そのものが困難であることをはじめとして、疎水性タンパク質の不可逆的な吸着など多くの問題を解決する必要がある。このために、様々な逆相カラムの坦体を検討した。カラム坦体には、通常 C18 に加え、C8、C4 坦体また異なるメーカーのカラム坦体を比較検討した。さらに、溶出条件として、エレクトロスプレー・イオン化に適した 0.1%ギ酸だけでなく、イオン化には適さないが、イオンペア効果により逆相の分離に適した、0.1%トリフルオロ酢酸や、ギ酸に様々な濃度のトリフルオロ酢酸を加えた溶媒を検討した。また、有機溶媒として通常のアセトニトリルに加え、疎水性タンパク質の溶出に優れたイソプロパノールを種々の濃度で混合した有機溶媒を検討した。

その結果、坦体がノンポーラスであり、粒子径が 2 μm であるインタクト社の Prest FF C18 カラムが、微妙なタンパク質の翻訳後修飾の相違によりピークが分離できること、ノンポーラス坦体の使用により、不可逆的な吸着が少なく、かつイソプロパノールの使用により容易に洗浄できることなどの利点が明らかとなった。一方で、ポーラス坦体を用いた場合は、粒子径やポアサイズに関わらず、また、官能基の種類を C18、C8、C4 と変えても選択性にそれ程相違がないことなどが明らかになった。インタクト社の Prest FF C18 カラムの場合、0.1%トリフルオロ酢酸や、同濃度のギ酸に少量のトリフルオロ酢酸を加えた溶媒系で好結果を得た (図1)。

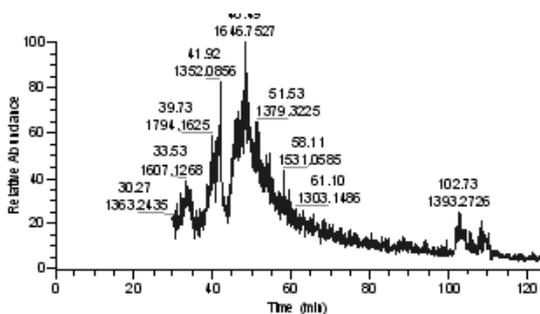


図1. Prest FF C18 カラムによるウシ血清アルブミンのLC/MS分析(クロマトグラム)。ナノ LCからの溶離液を直接FT-ICR-MS(サーモ社 LTQ-FT Ultra)に注入、測定した。糖鎖をはじめ SS-結合の相違など、翻訳後修飾の相違によりピークを分離することができた。

(2) 超高分解能をもつフーリエ変換型質量分析計を用いたインタクトタンパク質の質量測定の測定条件検討を行った。この装置では特にイオン源から分析計までのガス圧を含むパラメーター設定が高感度測定に重要であることが明らかとなった。タンパク質の種類、分子量に応じてパラメータの最適化を行った(図2)。その結果、分子量10万程度までのタンパク質であれば、同位体ピークにまで分離観測する事が可能となった。(1)におけるカラム条件と組み合わせることで、インタクトタンパク質の質量測定による翻訳後修飾の変化を検出する事を可能とした。実際に(1)におけるクロマト上のピークは必ずしも分離していないが、ひとつのピークの前半、中間、後半において明らかに分子量の分布が異なり、用いたカラムにおいてある程度修飾が異なる分子種をある程度分離できている事が明らかとなった。

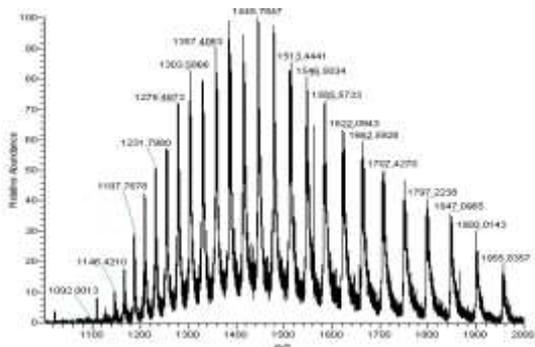


図2. ウシ血清アルブミンのエレクトロスプレー・マススペクトル。分解能をかえることで、同位体ピークを分離観測することも可能となった。

(3) 磁場型フーリエ変換型質量分析計において、イオントラップ部分を用いた衝突誘起

解離(CID)とICRセルにおける電子捕獲解離(ECD)を組み合わせ、インタクトタンパク質のMS/MS測定の条件検討を行った。その結果、CIDとETDによる開裂パターンが相補的であり、配列のカバー率が向上すること、さらにリン酸化などの翻訳後修飾を受けたタンパク質の場合、ETDでは修飾を残したまま主鎖の開裂が起こりやすいことなどが明らかとなった。さらにイオントラップにおけるCIDによる開裂の際に、Wide-band Activationの機能、Multi-stage Activationの機能による効果を検討した。また、最近導入された電場型フーリエ変換型質量分析計(サーモ社 Orbitrap Fusion)を用いて、イオントラップにおけるCIDに加えてHCD(Higher energy Collision Dissociation)によるインタクトタンパク質の開裂を検討した所、カバー率の向上を見た。これらの開裂法の条件検討に加えて、Orbitrap Fusionが持つ電子移動解離ETDによるインタクトタンパク質のMS/MS測定の検討を開始した。現状では、リン酸化やメチル化などの翻訳後修飾を検出し、部位を同定するためには3種類の開裂法、HCD、ETD、ECDを組み合わせることが有効であるという結論が得られている。特にイオントラップ部におけるCIDに比較して、HCDセルにおけるCIDはシークエンソイオンを得るのに有効であった。現在、CIDとETD、さらにMS3を組み合わせた解析法を検討中であり、カバー率をさらに向上させることで、翻訳後修飾の網羅的解析に結びつけることが可能と考えられる。

(4) 一方ボトムアッププロテオミクスによる翻訳後修飾の解析においては、従来のトリプシン、リジルエンドプロテアーゼなど、特異性の明確なプロテアーゼによる処理とLC/MSによる分析が一般的に用いられてきたが、本研究においては、特異性の低いプロテアーゼによる分解の効果と、トリプシンなどと組み合わせることによるカバー率の向上を検討した。その結果、従来のQ-tof型質量分析計など比較的low精度の解析に比べ、FT-ICR-MSや最新のOrbitrapを用いた超高分解能、高精度の解析では、プロテアーゼの特異性が低い場合にも、高い同定精度を維持できる事が明らかとなった。キモトリプシンやサーモライシン、さらに不溶性の細胞外マトリックスタンパク質の分解に有利なエラスターゼなどとトリプシン/リジルエンドプロテアーゼを組み合わせ、カバー率を向上させる解析手法を確立した。現在、上記のトップダウンプロテオミクスの手法による翻訳後修飾のマッピングと組み合わせることで、より詳細でかつ漏れのない翻訳後修飾解析法を検討している。

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 22 件)

1. Hirose T, Maita N (他 8 名、2 番目), Taniguchi H (他 8 名、11 番目), Sharpless KB, Omura S, Sunazuka T. (2013) Observation of the controlled assembly of preclick components in the in situ click chemistry generation of a chitinase inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 15892-15897. DOI:10.1073/pnas.1315049110. 査読有.
2. Maita N, Tsukimura T, Taniguchi T, Saito S, Ohno K, Taniguchi H, Sakuraba H. (2013) Human α -L-iduronidase uses its own N-glycan as a substrate-binding and catalytic module. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110, 14628-14633, DOI:10.1073/pnas.1306939110. 査読有.
3. Nakaya M, Kosako H (他 14 名、3 番目), Taniguchi H (他 14 名、12 番目), Sato Kurose H. (2013) GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. Nat Commun., 1532, DOI: 10.1038/ncomms2540. 査読有.
4. Yu TW, Okamura-Ikeda K (他 46 名、5 番目), Taniguchi H (他 46 名、47 番目), Walsh CA. (2013) Using Whole-Exome Sequencing to Identify Inherited Causes of Autism. Neuron 77, 259-273. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.11.002. 査読有.
5. Hyodo K, Mine A, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Taniguchi H, Okuno T. (2013) The ADP-ribosylation Factor 1 Plays an Essential Role in the Replication of a Plant RNA Virus. J. Virol. 87, 163-176. DOI: 10.1128/JVI.02383-12. 査読有.
6. Maita N, Taniguchi H, and Sakuraba H. (2012) Crystallization, X-ray diffraction analysis and SIRAS phasing of human α -L-iduronidase. Acta Crystallographica Section F 68(Pt 11), 1363-1366. DOI: 10.1107/S1744309112040432. 査読有.
7. Ishimoto K, Iwata T, Taniguchi H, Mizusawa N, Tanaka E, Yoshimoto K. (2012) d-Dopachrome tautomerase promotes IL-6 expression and inhibits adipogenesis in preadipocytes. Cytokine 60, 772-777. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.07.037. 査読有.
8. Okatsu K, Kosako H (他 14 名、5 番目), Tani N, Taniguchi H (他 14 名、15 番目), Tanaka K, Matsuda N. (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. Nat. Commun. Aug 21;3:1016. DOI: 10.1038/ncomms2016. 査読有.
9. Mine A, Hyodo K, Tajima Y, Kusumanegara K, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Taniguchi H, Okuno T. (2012) Differential Roles of Hsp70 and Hsp90 in the Assembly of the Replicase Complex of a Positive-Strand RNA Plant Virus. J. Virol. 86, 12091-12104 (Selected as Article of Significant Interest: SPOTLIGHT). DOI: 10.1128/JVI.01659-12. 査読有.
10. Iwakawa H, Tajima Y, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Tomari Y, Taniguchi H, and Okuno, T. (2012) Poly(A)-Binding Protein Facilitates Translation of an Uncapped/Nonpolyadenylated Viral RNA by Binding to the 3' Untranslated Region. J. Virol. 86, 7836-7849. (Selected as Article of Significant Interest: SPOTLIGHT) DOI: 10.1128/JVI.00538-12. 査読有.
11. Suzuki M, Otsuka T, Ohsaki Y, Cheng J, Taniguchi T, Hashimoto H, Taniguchi H, and Fujimoto T. (2012) Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets Mol. Biol. Cell 23, 800-810. DOI: 10.1091/mbc.E11-11-0950. 査読有.
12. Iwata T, Taniguchi H, Kuwajima M, Taniguchi T, Okuda Y, Sukeno A, Ishimoto K, Mizusawa N, and Yoshimoto K. (2012) The Action of D-Dopachrome Tautomerase as an Adipokine in Adipocyte Lipid Metabolism. PLoS ONE 7(3): e33402. DOI: 10.1371/journal.pone.0033402. 査読有.
13. Okazaki IM, Okawa K, Kobayashi M, Yoshikawa K, Kawamoto S, Nagaoka H, Shinkura R, Kitawaki Y, Taniguchi H, Natsume T, Iemura S, and Honjo T (2011) Histone chaperone Spt6 is required for class switch recombination but not somatic hypermutation. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 920-925. DOI: 10.1073/pnas.1104423108. 査読有.
14. Yamaguchi A, Saito T, Yamada L,

Taniguchi H, Harada Y, and Sawada H. (2011) Identification and localization of the sperm CRISP family protein CiUrabin involved in gamete interaction in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol Reprod. Dev.* 78, 488-497. DOI: 10.1002/mrd.21329. 査読有.

15. Endo T, Taniguchi H (他 17 名、19 番目), and Inaba K (2011) CIPRO 2.5: *Ciona intestinalis* protein database, a unique integrated repository of large-scale omics data, bioinformatic analyses and curated annotation, with user rating and reviewing functionality. *Nucleic Acids Res.*, 39 (suppl 1): D807-814. DOI: 10.1093/nar/gkq1144. 査読有.

16. Kido S, Kuriwaka-Kido R, Umino-Miyatani Y, Endo T, Inoue D, Taniguchi H, Inoue Y, Imamura T, and Matsumoto T. (2010) Mechanical stress activates Smad pathway through PKC δ to enhance interleukin-11 gene transcription in osteoblasts. *PLoS One*. Sep 29;5(9). pii: e13090. DOI: 10.1371/journal.pone.0013090. 査読有.

17. Taniguchi T, Kido S, Yamauchi E, Abe M, Matsumoto T, and Taniguchi H. (2010) Induction of Endosomal/lysosomal Pathways in Differentiating Osteoblasts as Revealed by Combined Proteomic and Transcriptomic Analyses. *FEBS Lett.* 584, 3969-3974. DOI:10.1016/j.febslet. 2010.07.055. 査読有.

18. Tashiro K, Konishi H, Nabeshi H, Yamauchi E, and Taniguchi H. New functional proteins identified by proteomic analysis in the epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathway and application for practical use. *Yakugaku Zasshi*. 2010 Apr;130(4):471-477. Review. Japanese. 査読有.

19. Ishino Y, and Taniguchi H. (2010) Dead time loss correction of mass errors occurring in high-throughput proteomics based on electrospray ionization time-of-flight tandem spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24, 1490-1495. DOI: 10.1002/rcm.4532. 査読有.

20. Mine, A., Takeda, A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2010) Identification and

Characterization of the 480 kDa Template-Specific RNA-Dependent RNA Polymerase Complex of Red Clover Necrotic Mosaic Virus. *J. Virol.* 84, 6070-6081. DOI: 10.1128/JVI.00054-10. 査読有.

21. Okamura-Ikeda, K. Hosaka, H. Maita, N. Fujiwara, K. Yoshizawa, A.C. Nakagawa, A. and Taniguchi, H. (2010) Crystal structure of aminomethyltransferase in complex with dihydrolipoyl-H-protein of the glycine cleavage system: Implications for recognition of lipoyl protein substrate, disease-related mutations, and reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 85, 18684-18692. DOI: 10.1074/jbc.M110.110718. 査読有.

22. Fujiwara, K. Maita, N. Hosaka, H. Okamura-Ikeda, K. Nakagawa, A. and Taniguchi, H. (2010) Global conformational change associated with the two step reaction catalyzed by *Escherichia coli* lipoate-protein ligase A. *J. Biol. Chem.* 285, 9971-9980. DOI: 10.1074/jbc.M109.078717. 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

1. 真板 宣夫: ヒト α -L-イゾロニダーゼの結晶構造解析, 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡県)、2012 年 12 月 14 日

2. 合田 有一郎、腰部脊柱管狭窄症における肥厚黄色靭帯のプロテオーム解析, 第 37 回日本医用マクスペクトル学会年会, ウィンクあいち (愛知県) 2012 年 10 月 26 日.

3. 野田 武志、カタユウレイボヤ 8 細胞期胚におけるタンパク質局在のプロテオーム解析, 第 82 回日本動物学会、東北大学 (北海道)、2011 年 9 月 22 日.

4. 藤中 雄一: Wnt シグナル抑制因子 sFRP4 の肥満・糖代謝との関連性についての検討, 第 32 回日本肥満学会、淡路国際会議場 (兵庫県)、2011 年 9 月 23 日

5. 岩田 武男: D-dopachrome tautomerase は脂肪細胞での脂質代謝を制御する, 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 札幌教育文化会館(北海道), 2011 年 5 月 19 日

6. 峯 彰、Heat shock protein 70 (Hsp70) は Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)

の RNA 複製酵素複合体の形成を制御している, 日本植物病理学会大会, ルミエール府中 (東京都)、2011年3月27日

7. Sato Nori, Establishment of a Method for Proteomic Analysis of Human Achilles Tendon. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society, Long Beach Convention Center, 米国ロングビーチ Jan. 13, 2011.

8. Sato Nori, Development of a Method for Proteomic Analysis of Human Yellow Ligament. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society, Long Beach Convention Center, 米国ロングビーチ, Jan. 13, 2011.

9. 吉沢 明康、仮想ゲルを用いた LC/MS データの表示とタンパク質修飾の探索プログラム, BMB2010, 神戸国際会議場 (兵庫県) 2010年12月7日

10. 横田 直人、カタユウレイボヤにおける精子膜タンパク質のプロテオーム解析, 第81回日本動物学会, 東京大学 (東京都)、2010年9月23日.

[その他]

ホームページ等

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

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

真板 宣夫 (MAITA NOBUO)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授
研究者番号: 00404046

(3) 研究分担者

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

(3) 研究分担者

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: 10291171