

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22685017

研究課題名(和文) N末端ルールに従う基質蛋白質の網羅的新規発見

研究課題名(英文) Systematic discovery of N-end-rule substrate proteins

研究代表者

瀧 真清 (Taki, Masumi)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・准教授

研究者番号：70362952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円、(間接経費) 5,670,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質分解系(ユビキチンリガーゼ)を欠損した変異酵母を用いたとき、不安定化蛋白質が蓄積した際に細胞はObr1蛋白質を多量に発現・蓄積することでストレス耐性を獲得して生き延びることを発見した。N末端ルールに従う基質蛋白質を認識する酵素(L/F転移酵素)による基質蛋白質の認識速度は、N末端から2残基目のアミノ酸配列によって違いがあることを見いだした。そこで、2残基目の配列を網羅的に変化させた種々の化学合成ペプチドを作製し、そのそれぞれにおける反応速度を詳細に解析することで規則性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：i) A mutant yeast strain that defects protein degradation system (i.e. ubiquitin ligase) survives when a destabilizing protein is accumulated inside the cell. At that time, the cell overexpresses Obr1 protein to overcome the stressed condition. ii) Kinetic analysis of L/F-transferase with N-end-rule substrate peptides possessing different N-terminal penultimate residues is systematically performed. This analysis suggests that the side chain of the residue affects substrate-binding affinity towards the transferase. It gives biological insight into the effect of the penultimate amino acid on substrate specificity of natural proteins to be degraded via the N-end rule pathway.

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：N末端ルール NEXT-A反応 L/F-転移酵素 不安定化蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛋白質 N 末端がアルギニンリジンやリジンなど(不安定化アミノ酸)になった場合、細胞内でそれら不安定化蛋白質は速やかに分解されるという法則(N 末端ルール; Varshavsky, Science, 179 (1986))が発見されて以来 20 年以上が経つ。その生物学的意味は依然不透明であり、N 末端ルールに関する遺伝子を欠損させたマウスや出芽酵母が奇形になった報告が数例あるに過ぎない(Kwon, Science, 96 (2002); Zenker, Nature Genetics, 1345 (2005); An, PNAS, 6212 (2006))。N 末端ルールに関する遺伝子が欠損すると蛋白質分解系の一部が働かなくなり、本来分解されるべき不安定化蛋白質が細胞中に蓄積して奇形を引き起こすようである。しかしながら、どんな種類の蛋白質が、いつ、どこで N 末端ルールに従って分解されるかなどの、系統的な研究はなされていない。また、それら不安定化蛋白質の分解異常が起こると、どうして奇形になるのかは未だ分かっていない。

最近の質量分析技術の目覚ましい発展にも関わらず、不安定化蛋白質は数種類しか同定されていない(Varshavsky, Nature, 955 (2001); Ditzel, Nature Cell Biol., 467 (2003); Kwon, Science, 96 (2002); Varshavsky, Nature, 981 (2005))。その最大の理由は、不安定化蛋白質は一般に極少量しか細胞に存在せず、プロテオーム分析で用いられる通常の 2 次元電気泳動と質量分析法とを組み合わせた手法では同定できないことにある(Varshavsky, JBC, 32559 (2006))。上記の問題を解決するため、不安定化蛋白質のみを選択的に濃縮し、網羅的に同定する技術の開発が望まれていた。

一方で、研究代表者は、有機合成化学的手法と酵素的手法とを組み合わせることで、細胞抽出液の中から N 末端にアルギニンやリジンを持つ基質蛋白質だけを人工分子で標識し検出する独自のシステム(NEXT-A 反応)を確立している。(申請者、ChemBioChem, (2009))

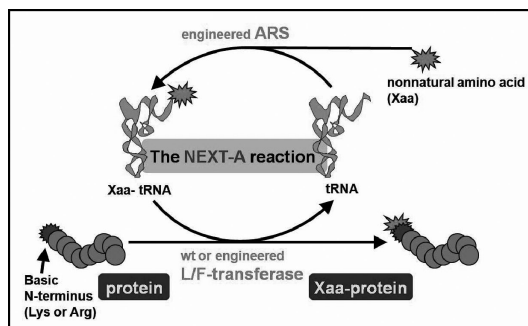


図. NEXT-A 反応による基質蛋白質への人工分子標識

2. 研究の目的

開発した化学酵素的蛋白質標識手法(NEXT-A 反応)を用いて、N 末端ルールに従い分解される蛋白質(「不安定化蛋白質」と定義)を網羅的に探索することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) NEXT-A 反応を応用して、N 末端に不安定化アミノ酸(アルギニンまたはリジン)を持つ不安定化蛋白質を網羅的に標識して濃縮することで釣り上げる。具体的には、N 末端ルールに関する転移酵素遺伝子(aat)を欠損させた大腸菌を用い、蛋白質分解経路を遮断する。このことで不安定化蛋白質を蓄積させた大腸菌抽出液を調製する。次に NEXT-A 反応を用いて、不安定化蛋白質にのみ選択的に標識を行うことで、これらを抽出液中から釣り上げる。釣り上げた不安定化蛋白質を断片化して質量分析(LC/MS-MS)を行い、それらを網羅的に同定する。
- (2) 更にマウス繊維芽細胞や出芽酵母などの、大腸菌と異なる生物種由来の細胞抽出液を用い、同じ手法を用いて不安定化蛋白質を網羅的に釣り上げて同定する。これらを、大腸菌から釣り上げた不安定化蛋白質と比較・考察する。
- (3) 酵母やマウス、ショウジョウバエなどのモデル生物を用い、発見した不安定化蛋白質に関連する遺伝子の破壊および過剰発現を行った時に、奇形が見られるか観察する。また、N 末端不安定化蛋白質を、生細胞内で時空間的に追跡することでそれら不安定化蛋白質の局在変化を調べる。N 末端ルールに従う蛋白質の分解が、生命現象の調節に果たす役割を明らかにする。

以上は当初予定していた研究方法であり、以下得られた実験結果に応じて、その都度軽微な手法の変更を行った(その都度以下に記載する)。

4. 研究成果

- (1) 原核生物(大腸菌)からの不安定化蛋白質探索の試み:

N 末端ルールに関する転移酵素遺伝子を欠損させた大腸菌を用いた時、および大腸菌と異なる生物種(出芽酵母)由来の細胞抽出液を用いた時のいずれも、研究代表者の手法(NEXT-A 反応)を用いた「既知」の「人工」不安定化蛋白質の濃縮・同定を行うに至った。つまり、不安定化蛋白質を標識して濃縮することで釣り上げるための系が確立できた。し

かしながらこの系にて、「未知」の「天然」不安定化蛋白質の同定には至らなかった。

(2) 真核生物からの不安定化蛋白質探索の試み：

上記において同定に至らなかった理由として、未知蛋白質のこれら抽出液中の濃度が当初予定していたそれよりも大幅に少ないと考えた。そこで、DNA クローンライブラリーを用いて、候補不安定化蛋白質の過剰発現による探索を行うことで解決を試みた。

酵母ゲノム DNA クローンライブラリーを購入し、この中から、N 末端ルールや蛋白質分解系に関連すると考えられる遺伝子を数百個ピックアップした。これらを全て網羅的に、N 末端ルールに関する遺伝子(*ubr1*)を欠損させた変異酵母、および野生型酵母へと形質転換し、それら全ての蛋白質を独立に発現させて各々の抽出液を作製した。変異酵母の抽出液中には、不安定化蛋白質が蓄積されることを期待した。なお、各クローン DNA の各翻訳産物は、各酵母由来と蛋白質 HA タグおよび抗体由来 ZZ ドメインタグとの融合蛋白質になっている。野生型酵母に対しても、同様の形質転換および蛋白質発現を行い、比較対照実験として用いた。抽出液を SDS-PAGE 後の CBB 染色、および抗 HA タグ抗体を用いたウエスタンブロットにて解析した。解析の結果、ほぼ全ての酵母由来蛋白質の発現が確認された。変異酵母および野生型酵母を用いた時で比較したとき、蛋白質の発現が確認された組の中では、蛋白質量および分子量が変化している組は見あたらず、不安定化蛋白質候補はこの時点では見つからなかった。

上記一連の実験を行う過程にて、蛋白質分解系(ユビキチンリガーゼ)を欠損した変異酵母を用いたとき、不安定化蛋白質が蓄積した際に細胞の機能不全による表現系異常が起きるかもしれないと当初予想を立てていた。しかしながら予期せず、細胞は *Obr1* 蛋白質を多量に発現・蓄積することでストレス耐性を獲得していることを偶然発見した。*Obr1* は下流の転写因子(*Pap1*)を調節して発現量を増加していることが、広島大(との共同研究)により詳細に確かめられ、その結果、酸化ストレス下においても変異酵母は生き延びることが分かった。本成果を連名にて発表した。(Mol. Microbiol., 80, 739 (2011))

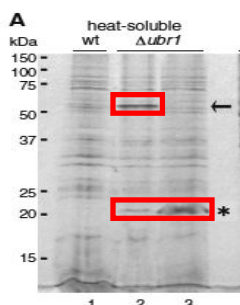


図. 変異酵母における *Obr1* 蛋白質ダイマーおよびモノマーの過剰発現

酵母由来の夾雑蛋白質を取り除くため、上記発現させた各蛋白質に対して IgG-Sepharose を用いたプルダウン精製を行った。精製した各蛋白質に対して、申請者の標識法(NEXT-A 反応)を用いて、不安定化蛋白質候補の N 末端にのみパイオ直交性反応点を持つ非天然アミノ酸による標識を試みた。さらに、このアミノ酸上での反応点特異的な蛍光標識を試みた。標識操作の後、蛋白質を SDS-PAGE により分子量分画し、蛍光イメージャーによるゲルイメージングを行ったが、不安定化蛋白質候補は見つからなかった。

本実験を行う過程で、人工的な不安定化蛋白質(SF-GFP; モデル蛋白質)の N 末端に対して NEXT-A 反応を行うことにより、部分環状構造を持つ蛋白質へと変換可能であることが分かり、論文としてまとめ、発表を行った(Chem. Commun., 47, 9116 (2011); Peptide Science 2010, 113 (2011))。

(3) ランダムペプチドライブラリーからの不安定化蛋白質探索の試み：

真核生物(酵母)を用いた探索：
N 末端ルール関連遺伝子欠損株(*UBR1* など)において N 末端ルールに従う基質ペプチドを過剰発現した場合、細胞の表現系に異常が現れるのではないかと推測した。そこで、真核生物である出芽酵母を用いて N 末端ルールに従う基質探索を行うため、ランダム化したペプチド遺伝子をコードするベクターライブラリーを構築し、報告を行った(Peptide Science 2013, 421 (2014))。ベクターは酵母シャトル型ベクターを用い、*GAL1/10* プロモーター下に GST 遺伝子、ユビキチン(*Ub*)遺伝子、および 12 残基のランダム化ペプチド遺伝子をタンデムに配列させた。ペプチドは融合蛋白質 GST-*Ub*-X12 として翻訳され、翻訳後に脱ユビキチン化酵素によるプロセッシングを受け、X12 のペプチドが遊離する。大腸菌のケミカルコンピテントセルへの導入効率が極めて悪いため、現在これを改善している。

de novo ライブラリーを用いた探索：

不安定蛋白質は大腸菌内で極めて迅速に分解されるために、不安定蛋白質の L/F 転移酵素による認識も極めて迅速に行われなければならない性質を利用して探索を試みた。N 末端から 12 残基までをランダム化したファージディスプレイ用 de novo ペプチドライブラリー中から、NEXT-A 反応にて不安定化蛋白質の N 末端配列候補を探し出すことを試みた。具体的にはファージディスプレイ法にて、ペプチドライブラリーの N 末端に、本反応によりパイオ直交性反応点を持つ非天然アミノ

酸を短時間で標識し、アミノ酸上の反応点特異的なビオチン標識を行うことで濃縮を試みた。

しかしながら、ごく微量起こる副反応が克服できなかったため、次に、L/F 転移酵素に短時間で強く結合するペプチド配列の取得をファージディスプレイ法にて行い、遺伝情報を増幅させることを試みた。5 ラウンドのセクション操作を行った後に、DNA シーケンシングにより濃縮されたペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果、予測していた N 末端に塩基性アミノ酸を持つペプチドが優位に濃縮された。しかしながら、N 末端以外のペプチド配列中にプロリン残基を複数個持つものが優位に濃縮されてしまい、このことは不安定蛋白質に対するセクションを行っている最中にバイアスが生じ、プロテアーゼ耐性を持つペプチドが優先的に濃縮されたと考えた。

この一連の実験を行う過程において、L/F 転移酵素によって認識される基質ペプチドの、N 末端から 2 残基目の配列によって、L/F 転移酵素による認識速度にある程度の差異があることを見いだした。そこで、2 残基目の配列を網羅的に変化させた種々の化学合成ペプチドを作製し、そのそれぞれにおける反応速度を詳細に解析した。これにより規則性を見だし、N 末端ルールに則る不安定化蛋白質との関連性を考察し、論文としてまとめ、発表を行った (FEBS Open Bio, 3, 252 (2013))。

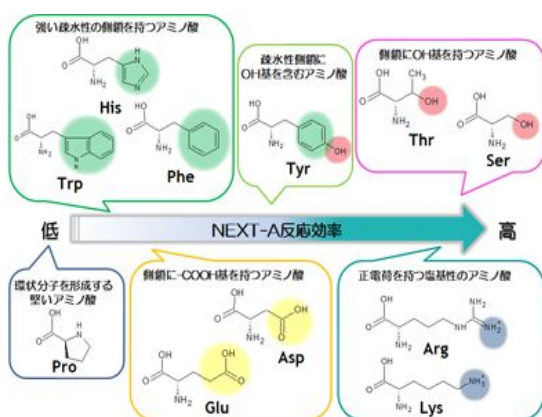


図. N 末端から 2 残基目のアミノ酸配列の違いによる、NEXT-A 反応速度の変化; 塩基性アミノ酸や親水性アミノ酸であると L/F 転移酵素による認識速度が速く、酸性アミノ酸や疎水性アミノ酸であると遅い。

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 5 件)

1. K. Kitamura*, M. Taki, N. Tanaka, I. Yamashita, Fission yeast Ubr1 ubiquitin ligase influences the oxidative stress response via degradation of active Pap1 bZIP transcription factor in the nucleus, *Mol. Microbiol.*, 80, 739-755 (2011); DOI:10.1111/j.1365-2958.2011.07605.x. 査読有
2. T. Hamamoto, M. Sisido, T. Ohtsuki, and M. Taki*, Synthesis of cyclic peptides using the NEXT-A Reaction, *Peptide Science* 2010, 113 (2011). 査読有
3. Hamamoto, M. Sisido, T. Ohtsuki, and M. Taki*, Synthesis of cyclic peptide/protein using the NEXT-A Reaction followed by cyclization, *Chem. Commun.*, 47, 9116 (2011); DOI: 10.1039/C1CC12196K. 査読有
4. J. Kawaguchi, K. Maejima, H. Kuroiwa, and M. Taki*, Kinetic analysis of the leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase with acceptor peptides possessing different N-terminal penultimate residues, *FEBS Open Bio*, 3, 252-255 (2013); <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2013.06.001> (Open access). 査読有
5. K. Fukunaga*, and M. Taki*, Construction of a Peptide Expression Vector Library for Phenotypic Screening of Bioactive Peptides in Yeast, *Peptide Science* 2013, p.421-422 (2014). 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 瀧 真清, NEXT-A 反応による蛋白質/ペプチドの迅速標識, ハイペップ研究所第 11 回紅葉ワークショップ(招待講演), 2012 年 12 月 21 日, 京都市.
2. 川口 淳・瀧 真清, NEXT-A 反応に最適な基質ペプチドの探索, 日本化学会第 93 春季年会(2013), 2013 年 03 月 22 日, 滋賀県草津市.
3. 瀧 真清, 創薬システムエンジニアリング: NEXT-A 法および 10BASEd-T 法の開発, 群馬大学 H25 年度夏期複合材料研究会(招待講演), 草津市, 2013 年 7 月 21 日.
4. K. Fukunaga and M. Taki, Exploration of Bioactive Peptides from Random Peptide Library Expressed in Yeast Cells, 4th Asia-Pacific International

Peptide Symposium (APIPS 2013), Osaka,
2013年11月07日.

〔図書〕(計 1 件)

1. 瀧 真清, 第2章「創薬システムエンジニアリング: NEXT-A 法および 10BASEd-T 法の開発」, 総合コミュニケーション科学シリーズ ユニーク&エキサイティングサイエンス2 (近代科学社), p.39-67 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://tkl.pc.uec.ac.jp/>