

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580136

研究課題名(和文) N-ミリスチル化タンパク質の網羅的探索による新規バイオマーカーの発見と応用

研究課題名(英文) The search for novel biomarkers by comprehensive identification of human N-myristoylated proteins

研究代表者

内海 俊彦(UTSUMI, TOSHIHIKO)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20168727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：N-ミリスチル化タンパク質は、その過剰発現や変異ががんをはじめとする疾患と直接関与することが明らかにされているが、ヒトゲノム中に存在するN-ミリスチル化タンパク質の網羅的探索は成されていない。本研究では、新規バイオマーカーの探索を目的として、主として無細胞タンパク質合成系を用いた代謝標識法により、約6,300個のヒトcDNAクローンからN-ミリスチル化タンパク質を網羅的に同定した。その結果、35個もの新規N-ミリスチル化タンパク質が見出され、これらの中に多数の細胞情報伝達関連タンパク質やバイオマーカーとなり得る疾患関連タンパク質が含まれる事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to search for novel human N-myristoylated proteins that can be applied for biomarkers, the susceptibility of human cDNA clones in human cDNA resources to protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling of proteins expressed using an insect cell-free protein synthesis system. For this analysis, 178 cDNA clones with an N-terminal Met-Gly motif were selected as potential candidates from ~6,300 Kazusa ORFeome project (KOP) human cDNA clones. The susceptibility of these cDNA clones to protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling experiments both in an insect cell-free protein synthesis system and in transfected mammalian cells. As a result, the products of 35 out of ~6,300 cDNA clones were found to be novel human N-myristoylated proteins. These novel N-myristoylated proteins contain not only physiologically important proteins but also many disease-associated proteins that can be applied for biomarkers.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：N-ミリスチル化 バイオマーカー探索 タンパク質脂質修飾 細胞情報伝達 タンパク質翻訳後修飾

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質翻訳後修飾は、タンパク質の機能発現やその制御に関与し、その異常は疾患に直接関与することから、生体内に存在するすべてのタンパク質の構造と機能の網羅的な解明をめざしたプロテオーム解析の中心課題の一つとなっている。実際、リン酸化、グリコシル化あるいはユビキチン化といった主要な翻訳後修飾に関しては、ヒトゲノムを対象とした網羅的な探索が行われ、がんを初めとする多くの疾患関連のバイオマーカーが発見され、臨床応用が進んでいる。タンパク質の脂質修飾は、リン酸化やグリコシル化と並んで主要な翻訳後修飾であるが、修飾の検出手法の開発の遅れからヒトゲノムを対象とした網羅的な解析は進んでいない。特にタンパク質 N-ミリスチル化は、Src ファミリーチロシンキナーゼや三量体型 G タンパク質 $\alpha$ サブユニット等の生理活性タンパク質に生じ、その過剰発現や変異ががんをはじめとする疾患と直接関与することが明らかになってきているにも関わらず、ヒトゲノム中に存在する N-ミリスチル化タンパク質の網羅的解析は成されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究において確立した、N-ミリスチル化を生ずるタンパク質をタンパク質 N-末端の 10 アミノ酸のアミノ酸配列のみから予測し、それを無細胞タンパク質合成系を用いて実験的に確認する手法を、cDNA リソース(KOP cDNA クローン)やタンパク質配列データベース(Swiss-Prot protein knowledgebase) に適用し、ヒト細胞中で発現している N-ミリスチル化タンパク質を網羅的に同定する。さらにこれらの同定されたタンパク質から、疾患や細胞情報伝達に直接関与すると予測される新規 N-ミリスチル化タンパク質を選択し、細胞での機能発現における N-ミリスチル化の役割、疾患との関連、細胞情報伝達における生理的意義について検討するとともに、バイオマーカーとしての利用の可能性について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

タンパク質 N-ミリスチル化は、無細胞タンパク質合成系、あるいは遺伝子導入細胞における $^3\text{H}$ ミリスチン酸を用いた代謝標識により検出した。タンパク質の膜局在は、遺伝子導入細胞の細胞分画により、またタンパク質の小胞体膜通過は、細胞に遺伝子導入したグリコシル化 TNF-融合タンパク質のグリコペプチダーゼ感受性試験により解析した。タンパク質発現に伴う細胞形態変化は、EGFP 融合タンパク質 cDNA の遺伝子導入に伴う細胞の形態変化を EGFP 蛍光のタイムラプス撮影により検討した。また、タンパク質の細胞内局在は抗 tag 抗体を用いた免疫蛍光染色により検討した。タンパク質発現に伴うアクチン

細胞骨格の変化はファロイジン染色により検出した。

### 4. 研究成果

#### (1)新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定

ヒト cDNA リソースから、タンパク質 N 末端 10 アミノ酸の配列を用いて無細胞タンパク質合成系により N-ミリスチル化タンパク質を同定する手法に、2 種のタンパク質 N-ミリスチル化予測プログラムを組み合わせたバイオインフォーマティクスの手法を加え、より多くのヒト cDNA から、高い確率で新規の N-ミリスチル化タンパク質を同定する実験手法を確立した。この手法を約 6,300 個のヒト cDNA クローン (KOP cDNA クローン) に適用し、35 個もの新規 N-ミリスチル化タンパク質を同定した。さらに、この手法を約 43,000 個のヒトタンパク質を含むヒトタンパク質データベース(UniProt KB)に適用し、現在までに 50 個を超える新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質候補を同定した。これらの中には、多数の細胞情報伝達関連タンパク質、膜タンパク質、がんをはじめとする疾患との関連が示唆されているタンパク質が含まれていた。

#### (2)N-ミリスチル化された膜タンパク質の発見とその機能解析

N-ミリスチル化タンパク質は一般的に細胞質タンパク質に生じることが知られているが、本研究では、膜貫通領域を有する新規 N-ミリスチル化タンパク質が多数同定された。そこで、これらの中の一つ、Protein Lunapark についてその膜局在化、N-ミリスチル化の機能について解析を行った。その結果 Protein Lunapark は、N 末端および C 末端を細胞質側に向けた 2 回膜貫通型膜タンパク質であり、小胞体周辺部の編目状構造に特異的に局在することが明らかになった。また、N-ミリスチル化を阻害した変異体との比較から、Protein Lunapark に生ずる N-ミリスチル化は小胞体の網目状構造の形成に関与することを見出した。これらの結果は、多重膜貫通型のヒト由来膜タンパク質に N-ミリスチル化が生じ、その修飾が重要な生理的機能を発現しうることを示した初めての知見であり、極めて注目すべき成果であると考えられる。

#### (3)疾患関連タンパク質に生ずる N-ミリスチル化の解析

本研究で見出された新規 N-ミリスチル化タンパク質中に、がんをはじめとする疾患に関与することが明らかにされているタンパク質が多数存在していた。そこで、これらの中から、大腸がん等の浸潤や転移に関与していることが知られているアクチン結合タンパク質である FMNL2 および FMNL3 について、これらのタンパク質に生ずる N-ミリスチル化の機能を解析した。その結果、培養細胞への FMNL2、FMNL3 の遺伝子導入に伴

い、これらのタンパク質は原形質膜へと局在し、アクチンフィラメントと相互作用することにより細胞の顕著な形態変化を誘導することが明らかになった。さらに FMNL2, FMNL3 の膜局在、アクチンフィラメントとの相互作用、細胞形態変化の誘導に FMNL2, FMNL3 に生じる N-ミリスチル化が必須であることが明らかになった。これらの結果から、FMNL2, FMNL3 を介したがん細胞の浸潤・転移に N-ミリスチル化が重要な役割を果たしていることが示された。これらの結果は、タンパク質 N-ミリスチル化を指標としてがんのバイオマーカーを探索することが可能であることを示しており、今後、ヒトゲノム全体を対象として N-ミリスチル化タンパク質を網羅的に探索することにより、多くの疾患バイオマーカーが同定できるものと期待される。

#### 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 6 件)

Kaneko K, Tabuchi M, Sueyoshi N, Ishida A, Utsumi T, Kameshita I. Cellular localization of CoPK12, a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in mushroom Coprinopsis cinerea, is regulated by N-myristoylation and limited proteolysis. *Journal of Biochemistry*, in press, 2014 査読有

Moriya K, Nagatoshi K, Noriyasu Y, Okamura T, Takamitsu E, Suzuki T, Utsumi T. Protein N-myristoylation plays a critical role in the endoplasmic reticulum morphological change induced by overexpression of protein Lunapark, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *PLoS One* **8**, e78235, 2013 査読有

Hanada H, Kobuchi H, Yamamoto M, Kashiwagi K, Katsu K, Utsumi T, Kashiwagi A, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K. Acetyl-L-carnitine suppresses thyroid hormone-induced and spontaneous anuran tadpole tail shortening. *Hereditas* **150**, 1-9, 2013 査読有

Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, Yasuda T, Utsumi K, Utsumi T. Mitochondrial localization of ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One* **7**, e50082, 2012 査読有

Moriya K, Yamamoto T, Takamitsu E, Matsunaga Y, Kimoto M, Fukushige D, Kimoto C, Suzuki T, Utsumi T. Protein

N-myristoylation is required for cellular morphological changes induced by two formin family proteins, FMNL2 and FMNL3. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **76**, 1201-1209, 2012 査読有

Ogino T, Kobuchi H, Munemoto K, Fujita H, Yamamoto M, Utsumi T, Inoue K, Shuin T, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K. Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **358**, 297-307, 2011 査読有

[学会発表](計 25 件)

Toshihiko Utsumi, Emi Takamitsu, Takashi Suzuki, Koko Moriya Identification of novel human N-myristoylated proteins using cDNA resource and cell-free protein synthesis system. 第 12 回ヒトプロテオーム国際会議(HUPO2013) 2013 年 9 月 18 日 パシフィコ横浜(横浜市)

Toshihiko Utsumi Comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using cDNA resource and cell-free protein synthesis system. 第 12 回ヒトプロテオーム国際会議(HUPO2013, 招待講演) 2013 年 9 月 18 日 パシフィコ横浜(横浜市)

江連徹, 七谷圭, 佐藤陽子, 相澤圭師, 相馬聡, 内海俊彦, 安藤英治, 魚住信之 昆虫培養細胞由来無細胞蛋白質合成システムを用いた膜蛋白質の合成. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜(横浜市)

守屋康子, 永利圭, 乗安義実, 高光恵美, 岡村剛, 内海俊彦 小胞体膜タンパク質 Lunapark に生ずる N-ミリスチル化の解析. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜(横浜市)

高光恵美, 守屋康子, 林田真梨子, 内海俊彦 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系とクリックケミストリーを用いた新規 N-ミリスチル化タンパク質の同定. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 パシフィコ横浜(横浜市)

大塚基顕, 白井崇之, 南風原樹, 林田真梨子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 タンパク質配列データベース Swiss-Prot に基づくヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的探索の試み. 第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会 2013 年 5 月 31 日 徳島大学(徳島市)

内海俊彦, 守屋康子, 乗安義実, 福永和貴, 飯尾雄介, 高光恵美 ヒト cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリスチル化された膜タンパク質の探索. 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 24 日 東北大学(仙台市)

金子啓祐, 田淵光昭, 末吉紀行, 内海俊彦, 亀下勇 N-ミリスチル化と限定分解は担子菌キノコ Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性プロテインキナーゼ CoPK12 の細胞内局在を制御する. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡国際会議場 (福岡市)

小淵浩嗣, 守屋康子, 荻野哲也, 藤田洋史, 井上啓史, 執印太郎, 安田立二, 内海耕慥, 内海俊彦 5-アミノレブリン酸によるプロトポルフィリン IV 蓄積における ABCG2 のミトコンドリア局在と機能. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日 福岡国際会議場 (福岡市)

守屋康子, 乗安義実, 福永和貴, 高光恵美, 鈴木崇, 内海俊彦 小胞体膜に局在する N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質 Lunapark. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日 福岡国際会議場 (福岡市)

飯尾雄介, 岡村剛, 福重大地, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 ヒト cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いた新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日 福岡国際会議場 (福岡市)

福重大地, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 ヒト細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質脂質修飾の解析. 日本農芸化学会中四国支部大会 2012 年 9 月 21 日 山口大学 (宇部市)

福永和貴, 飯尾雄介, 乗安義実, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質の同定. 日本農芸化学会中四国支部大会 2012 年 9 月 21 日 山口大学 (宇部市)

小淵浩嗣, 内海俊彦, 荻野哲也, 安田立二, 内海耕慥 ABCG2 のミトコンドリア局在とプロトポルフィリン IX 蓄積の制御. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会 2012 年 5 月 18 日 岡山大学 (岡山市)

飯尾雄介, 福永和貴, 福重大地, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いた新規 N-ミリスチル化タンパク質の同定. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会 2012 年 5 月 18 日 岡山大学 (岡山市)

内海俊彦 無細胞タンパク質合成系を用いた脂質修飾タンパク質の網羅的探索法の確立とその応用. 2012 年度日本農芸化学会大会シンポジウム (招待講演) 2012 年 3 月 25 日 京都女子大学 (京都市)

高光恵美, 乗安義実, 岡村剛, 福重大地, 守屋康子, 内海俊彦 無細胞タンパク質合成系とクリックケミストリーを用いた新規 N-ミリスチル化タンパク質の同定. 2012 年度日本農芸化学会大会 2012 年 3 月 23 日 京都女子大学 (京都市)

小淵浩嗣, 内海俊彦, 内海耕慥, 安田立二 がん細胞のポルフィリン蓄積における

ABCG2 の役割. 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 22 日 国立京都国際会館 (京都市)

松永由佳梨, 高光恵美, 守屋康子, 岡村剛, 乗安義実, 田淵光昭, 内海俊彦 AIF 関連タンパク質 AMID 及び AIFL に生ずる脂質修飾と特異的細胞内局在. 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 国立京都国際会館 (京都市)

守屋康子, 山本卓生, 高光恵美, 福重大地, 鈴木崇, 安藤英治, 内海俊彦 Formin ファミリータンパク質 FMNL2 及び FMNL3 に生ずる N-ミリスチル化の役割. 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 国立京都国際会館 (京都市)

⑲ 岡村剛, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 無細胞タンパク質合成系を用いたプレニル化タンパク質の網羅的同定法の確立. 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会 2011 年 9 月 17 日 宮崎大学 (宮崎市)

⑳ 福重大地, 乗安義実, 山本卓生, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 Formin ファミリータンパク質 FMNL3 による細胞形態変化誘導における N-ミリスチル化の役割. 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会 2011 年 9 月 17 日 宮崎大学 (宮崎市)

㉑ 守屋康子, 山本卓生, 高光恵美, 鈴木崇, 安藤英治, 内海俊彦 細胞骨格制御タンパク質 FMNL2 及び FMNL3 に生ずる N-ミリスチル化の役割. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 14 日 広島大学 (広島市)

㉒ 乗安義実, 岡村剛, 福重大地, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦 N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質の探索. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 14 日 広島大学 (広島市)

㉓ 小淵浩嗣, 宗友一晃, 藤田洋史, 守屋康子, 荻野哲也, 内海俊彦, 井上啓史, 佐々木順造, 安田立二, 内海耕慥 がん細胞のプロトポルフィリン IX 蓄積における ABCG2 の役割. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 14 日 広島大学 (広島市)

〔図書〕(計 1 件)

内海俊彦 (分担) 講談社 プロテオミクス辞典 (日本プロテオーム学会編, 135 ページ) 2013 年

〔その他〕

ホームページ等

内海俊彦

<http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/utsumi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内海 俊彦 (UTSUMI TOSHIHIKO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20168727

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし