

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770035

研究課題名(和文)新規手法による葉緑体タンパク質複合体の網羅的検出

研究課題名(英文) A novel method for comprehensive detection of protein complexes in photosynthetic organisms

研究代表者

高林 厚史 (Takabayashi, Atsushi)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90546417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は単体として機能するだけでなく、タンパク質同士が結合したタンパク質複合体としても機能する。そのため、タンパク質複合体を調べることは、個々のタンパク質の機能を調べるためだけでなく、細胞内機構を調べるためにも重要である。本研究では、新規手法により光合成生物のタンパク質複合体を網羅的に調べ、この手法の有用性を明らかにした。同時に、Webデータベース(PCoM-DB; <http://pcomdb.lowtem.hokudai.ac.jp/proteins/top>)を構築し、その結果の一部を公開した。今後、PCoM-DBデータベースを通じて本研究の解析データが幅広く利用されることに期待したい。

研究成果の概要(英文)：To explore protein complexes systematically, we have tried to identify protein complexes by using the Blue-Native PAGE coupled with LC-MS/MS approach. We applied the approach into several photosynthetic organisms. Then, we constructed a new Web-based database PCoM-DB (<http://pcomdb.lowtem.hokudai.ac.jp/proteins/top/>) to make our data to public. Users can predict interaction partners with their proteins of interest through a user-friendly interface. I hope that the database to help users to find new protein complexes, which can contribute to understand cellular mechanisms in photosynthetic organisms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学(植物分子生物・生理学)

キーワード：タンパク質複合体解析 光合成生物 データベース

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は単体で機能するのみならず、別のタンパク質と相互作用して機能することが少なくない。そのため、新規なタンパク質複合体(タンパク質間相互作用)を見出すことはタンパク質の機能を知るのみならず、細胞内機能を理解する上で不可欠である。

しかしながら、従来の方法で網羅的にタンパク質間相互作用を探索するためには、膨大な時間と人手が必要であり、一部のモデル生物を除けば、ほとんど行われてこなかった。そのため、タンパク質間相互作用因子の同定を試みている研究者は決して少なくないものの、その多くは個別の解析にとどまっており、網羅的なタンパク質複合体の検出は現在の生物学における大きな課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、主に光合成生物のタンパク質複合体を網羅的に検出し、その解析データを本研究で開発した新規 Web データベース「PCoM-DB(<http://pcomdb.lowtem.hokudai.ac.jp/proteins/top>)」で公開することにある。

Blue-Native PAGE (BN-PAGE) はタンパク質複合体の複合体構造や活性を維持したまま高解像度で分離する電気泳動法である。この手法は主に呼吸鎖や光合成電子伝達鎖の超巨大なタンパク質複合体の解析に用いられてきたが、近年では様々なタンパク質複合体の解析に広く用いられるようになってきた。また、ゲノム解読および LC-MS/MS の発展により、複数のタンパク質が含まれるクルードなタンパク質溶液を高感度で網羅的に解析することも可能になってきた。そのため、この2つを組み合わせることで、すなわち、タンパク質複合体を BN-PAGE で分離し、その分離したタンパク質複合体を LC-MS/MS で同定することで、タンパク質複合体を網羅的に同定することが可能になると考えた。

常識的には、BN-PAGE の後、2次元 SDS-PAGE を行い、銀染色等の手法でタンパク質のスポットを可視化した後、それぞれのスポットを LC-MS/MS 等で解析することが考えられるが、本研究では簡便で高感度で網羅的な同定を目指し、2次元電気泳動を行わない(省く)ことにした。これにより、high-throughput な解析が可能になり、しかも染色操作を省くことで検出感度を上げることができるはずである。しかし、一方で、タンパク質複合体を推定するための情報処理が必要になる。そこで、本研究では、protein migration profile (後述) を用いたタンパク質複合体の推定を利用した。

3. 研究の方法

光合成生物の細胞や細胞内小器官を分画し

た後、膜タンパク質は可溶化し、その画分に含まれるタンパク質複合体を網羅的に BN-PAGE で分離した。次に、分離ゲルを 1mm 間隔で細かくカットし(ミニゲルに対し 60 スライスほど)、それぞれのゲルスライスに含まれているタンパク質を LC-MS/MS で網羅的に同定した。

次に、ラベルフリーのタンパク質量法である emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) を用いて、各ゲル片における各タンパク質の存在量を見積もり、x 軸に各ゲルスライスをプロットし(BN-PAGE ゲル上での泳動度に対応する)、y 軸に emPAI をプロットし(各ゲルスライス上でのタンパク質のバンド強度に対応する)、それぞれのタンパク質について migration profile を作成した。この protein migration profile の波形のピークは BN-PAGE でのタンパク質複合体バンドに相当する。

最後に、この protein migration profile を検出されたタンパク質ごとに比較することで新規なタンパク質複合体を探ることができる。具体的にはその波形上でピークが一致していれば、(BN-PAGE 上で 2 つのタンパク質が co-migration していることになり)、その 2 つが相互作用している可能性が考えられる。特に profile 全体の波形の類似性が高い場合には、その可能性は高くなる。

本研究では、これらの一連の作業から成る新規なアプローチにより、簡便で検出感度の高いタンパク質複合体同定を試みた。

4. 研究成果

現在までに、モデル植物シロイヌナズナについては、成熟葉、老化葉、葉緑体、チラコイド膜、ストロマ、包膜、ミトコンドリアについて解析を行った。その他の光合成生物としては、ヒメツリガネゴケ、モデル緑藻のクラミドモナス、モデル珪藻の *Phaeodactylum tricornutum*、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 などについて解析を行い、検出タンパク質群についての protein migration profile を作成した。

また、同時に、それらデータを公開するためのプラットフォームとして、Web データベース PCoM-DB (Protein Co-Migration Database for photosynthetic organisms: <http://pcomdb.lowtem.hokudai.ac.jp/proteins/top/>) (図 1) を独自に開発、構築し、現在は公開中である。現在は、このデータベースにおいて、シロイヌナズナのチラコイド膜の解析データと *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全細胞の解析データを公開しており (Takabayashi et al. 2013)、今後も解析データの公開を進めていく。

PCoM-DB

Protein co-migration database for photosynthetic organisms

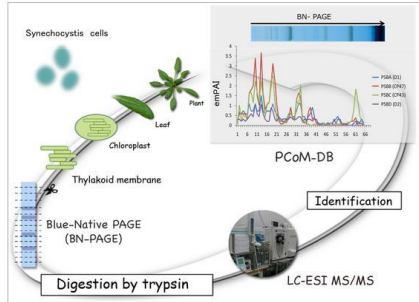
last update: 2013.01.08

Top Search Browse

What is PCoM?

Protein Co-Migration Database for photosynthetic organisms (PCoM) is a powerful tool for predicting the protein complexes in photosynthetic organisms containing your protein of interest. PCoM stores the data obtained by LC-MS/MS analysis of the protein complexes which were separated by BN-PAGE and extracted from BN-PAGE gel slices.

For further information, take a look at [the overview page](#).



Which proteins can be searched ?

At present, PCoM stores the following data for the protein complexes.

- Arabidopsis thylakoids
- Synechocystis PCC6803 whole cells

図 1. PCoM-DB のトップページ

ユーザーはこの PCoM-DB を利用することで、本研究の解析データを元に作成されたタンパク質の protein migration profile を表示し、検出された他のタンパク質と比較することができる (図 2)。

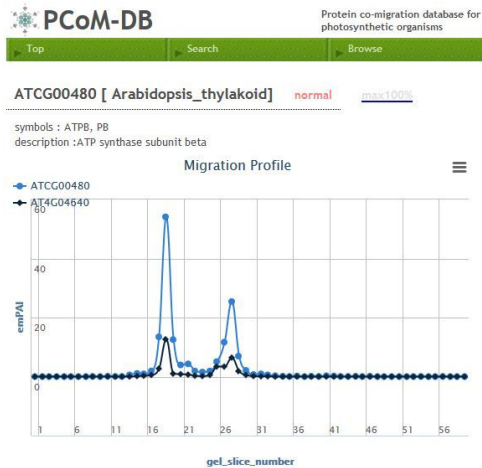


図 2. シロイヌナズナ葉緑体 ATP synthase の 2 つのサブユニットの protein migration profile の比較。2 つのサブユニットのプロファイルは非常に似ている。(なお、左から 1 つ目のピークは CFoF1 ATP synthase。2 つ目のピークは複合体の合成中間体)

本研究により、BN-PAGE と LC-MS/MS 解析を組み合わせた、タンパク質複合体の網羅的解析のための新規アプローチが効果的であることを示すことができた。この手法は、真核生物のオルガネラ、および原核生物全細胞に対しては非常に有効であり、それらサンプルについては大雑把にいて、(存在が) 予想さ

れるタンパク質の 40% 以上を検出することができている。一方で、藻類の全細胞や植物の葉などをサンプルに用いた場合には、10% 程度にとどまり、これらサンプルについては効果的とは言えないことが明らかになった。

このことから、今後は真核光合成生物の細胞内小器官、および原核光合成生物、さらには原核生物に対して、解析とデータ公開を進めていく予定である。

今後、PCoM-DB の公開データを増やし、このデータベースの有用性を増やすとともに、PCoM-DB を用いた成功例の広報活動を進めることで、当該分野の発展により貢献していきたいと希望する。

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) 全て査読あり

1. Takahashi K, Takabayashi A, Tanaka A, and Tanaka R (2014) Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting chlorophyll-binding motif in *Arabidopsis*. The Journal of Biological Chemistry, 289: 987-999.

2. Kunugi M, Takabayashi A*, and Tanaka A (2013) Evolutionary changes in chlorophyllide a oxygenase (CAO) structure contribute to the acquisition of a new light-harvesting complex in *Micromonas*. The Journal of Biological Chemistry, 288:19330-19341. *corresponding author

3. Takabayashi A, Kadoya R, Kuwano M, Kurihara K, Ito H, Tanaka R, Tanaka A (2013) Protein co-migration database (PCoM -DB) for *Arabidopsis* thylakoids and *Synechocystis* cells. SpringerPlus, 2:148. *corresponding author

4. Takabayashi A, Kurihara K, Kuwano M, Kasahara Y, Tanaka R, and Tanaka A (2011) The oligomeric states of photosystems and light-harvesting complexes in the chlorophyll b-less mutant. Plant & Cell Physiology, 52, 2103-2114.

5. Megoro M, Ito H, Takabayashi A, Tanaka R, and Tanaka A (2011) Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in *Arabidopsis*. Plant Cell, 23, 3442-3453.

6. Ishida, S, Morita K, Kishine M,

Takabayashi A, Murakami R, Takeda S, Shimamoto K, Sato F, and Endo T (2011) Allocation of absorbed light energy in PSII to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of Rice. *Plant & Cell Physiology*, 52, 1822-1831.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Atsushi Takabayashi, The application of BN-PAGE for comprehensive detection of the protein complexes in the chloroplast, シンポジウム「Basis, application and future of the blue-native PAGE in plant sciences」植物生理学会、東北大学、2011年3月20日

2. 高林厚史、栗原克宜、田中亮一、田中歩 「新規手法による葉緑体タンパク質複合体の網羅的解析」植物生理学会、京都産業大学、2012年3月18日

〔図書〕(計 0 件)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

PCoM-DB(<http://pcomdb.lowtem.hokudai.ac.jp/proteins/top>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高林 厚史 (Takabayashi Atsushi)

北海道大学 低温科学研究所 助教

研究者番号 : 90546417