

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650068

研究課題名(和文) 新たな蛋白質間相互作用の発見を目指す共局在オーム解析法の確立

研究課題名(英文) co-localizationome for finding new protein-protein interaction

研究代表者

木俣 行雄 (Kimata, Yukio)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：60263448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は数千～数万種類のタンパク質を発現している。それらの中には、特定の細胞内小器官に分布したり、あるいは、独特の局在パターンを示すものが多い。また、一見、細胞内に均一に広がっているように見えるタンパク質も、その分布には「ムラ」がある場合も多い。本研究では、そのような細胞内のタンパク質の分布の偏りを網羅的に調べ、新規の細胞内区画やタンパク質複合体を見つけ出す手法の開発を目指す。すなわち、共局在オーム解析であり、ひとつのタンパク質を緑色蛍光タンパク質で、他のタンパク質を赤色蛍光タンパク質で標識し、蛍光顕微鏡にて共局在を調べるという解析を網羅的に行うための技術的基盤を確立したい。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, many proteins show uneven distribution. Some proteins are located on specific cellular compartments. Some proteins shows more unique distribution, which is sometimes hard to be explained. If two proteins show overlapping distributions, it may suggest that they form protein complex and /or work together. Such a knowledge may lead to finding of a new cellular complex. To this end, I have developed methodologies toward co-localizationome, which is the genome-wide and comprehensive dataset of protein co-localization. One protein is labelled by the green fluorescent protein, and another protein is labelled by the red fluorescent protein. Then *Saccharomyces cerevisiae* cells expression two fluorescently labelled proteins are systematically observed under a fluorescent microscope.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質 蛍光顕微鏡 酵母

1. 研究開始当初の背景

細胞は多様なタンパク質を発現する。全ゲノム配列の解読により、単純な真核生物細胞である出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）でさえも6000種程度のタンパク質を作り、また、ほ乳動物細胞が作るタンパク質は選択的mRNA スプライシングなども考慮すると5万種類以上であろうと推定されている。

細胞内でタンパク質はヘテロな複合体を形成していることが多く、また、特定の細胞内区画に局在していることもある。サイトゾルに存在するとされるタンパク質でさえ、その分布は様ではなく、なんらかの「ムラ」がある場合が多い。例えば、プロテアソームの分布は小胞体近傍に偏っており、これは小胞体関連タンパク質分解を為すためであろうと考えられている。

また、小胞体に局在するとされるタンパク質の分布も決して小胞体全体に様ではなく、小胞体存在のタンパク質の偏りは粗面小胞体と滑面小胞体の区別であろうと推察されるが、一方、滑面小胞体が存在しないと考えられる出芽酵母においてさえ、小胞体タンパク質の偏在は認められ、何らかの未知な小胞体の区画化があるということも考えられる。また、透過型電子顕微鏡観察などにより、これまで世界中の研究者が数多くの細胞内小器官を見つけてきたが、トモグラフィなどの技術発展によって見いだされつつある新たな細胞内構造物については、その構成タンパク質や細胞内での役割など、全く不明な場合が多い。

なお、新たな細胞内構造物や細胞内区画の存在、あるいは既知の細胞内区画のさらなるコンパートメント化についての確証を得て、その構造や機能を類推するためには、そこに局在あるいは偏在するタンパク質の同定が近道であろうと考えられるが、生化学的にそのようなコンパートメントを分取することが不可能である場合、研究の進めるのが困難となる。

2. 研究の目的

前項で記したように、細胞内には未知な細胞内区画（既知の細部内区画のコンパートメント化を含む）やタンパク質複合体が存在する可能性があり、本研究ではそれらを網羅的に探索する方法論を開発することを目指した。すなわち、共局在オーム解析と名付けた方法論である。

本研究で開発を試みた方法論の根幹は、細胞内の任意の2つのタンパク質の局在を観察し、そのオーバーラップを調べようとするものである。対象とするタンパク質の数を増やして網羅性を高めることにより、データベースの有益性が高まると期待されるのである。

この研究の着想の根幹は、ひとつのタンパク質の局在あるいは偏在だけではそれにと

のような意味があるのか（あるいは、細胞生物学的・分子生物学的に探求する価値があるのか否か）不明であったとしても、複数のタンパク質のそれがオーバーラップする場合には、何らかの意義があると考えていいだろうということである。

想定される可能性としては、第一には、その2つのタンパク質が（おそらく他のタンパク質も参加して）複合体を作っているということである。アフィニティが弱く細胞を破碎して生化学的に検証することが困難な複合体でも（細胞抽出液中では、バッファー条件などのより、容易に解離してしまう）、細胞の中では安定に存在し、その構成因子が共局在していると期待されよう。新しいタンパク質複合体の発見は、そのタンパク質の機能についての理解を深めるだけでなく、新規な生命現象を見いだすことにも繋がると考えている。

第二の可能性として考えているのが、2つのタンパク質が同じ細胞内区画に存在することである。前項で記したように、未知な細胞内コンパートメント化を見いだすことは、細胞生物学的あるいは分子生物学的に興味深い課題である。

そこで本研究においては、ひとつのタンパク質を緑色蛍光タンパク質で、もうひとつのタンパク質を赤色蛍光タンパク質標識したものを細胞内で発現させ、蛍光顕微鏡観察するという手法を用いることにした。すでに相当数のタンパク質が緑色蛍光タンパク質標識された菌株ライブラリー（ゲノムに緑色蛍光タンパク質遺伝子が組み込まれており、内在性タンパク質が緑色蛍光タンパク質との融合遺伝子として発現される）が存在していること、そして全ゲノム配列が明らかになりゲノム配列操作の手法も多彩かつ容易であること、さらに、さまざまな網羅的解析が先行しており、そのデータとの照合も可能であることから、本研究では出芽酵母を材料として用いた。

3. 研究の方法

(1) 緑色および赤色蛍光タンパク質標識出芽酵母株の作製

緑色蛍光タンパク質タグがゲノムに導入された菌株は、前述のようにパブリックになっている。この菌株では、緑色蛍光タンパク質タグは目的のタンパク質のC末に導入されている。一方、緑色蛍光タンパク質タグの位置を変えるために、自らでゲノムに緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入することも試みた。なお、この場合は、トランスフォーメーションのマーカーとなる抗生物質耐性遺伝子KanMX4はCre-loxP法を用いてゲノムから消去した。

赤色タンパク質タグを持つタンパク質発現株は、ゲノム上の緑色蛍光タンパク質遺伝子を赤色蛍光タンパク質遺伝子に置換することにより作出した。赤色蛍光タンパク質遺

伝子の挿入には、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた。

(2) 緑色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質発現株と赤色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質発現株との交配

赤色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質発現株については、HO 遺伝子を導入することにより接合型を転換した。そして、緑色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質発現株と赤色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質発現株との交配を行った。交配に際してはカナマイシン(G418)とハイグロマイシンの両方に耐性を示すコロニーを選択し、それが2倍体であることは細胞の形態観察によって確認した。

(3) 緑色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質と赤色蛍光タンパク質タグ付きタンパク質の両方を発現する菌株の蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡観察においては、デルタビジョン(高感度高精細蛍光顕微鏡)などを用いた。緑色蛍光のほうが赤色蛍光よりも概して明るいシグナルが得られるので、2種類のタンパク質の発現量に大きな差がある場合は、発現量の多いタンパク質を赤色蛍光タンパク質標識、発現量の少ない方のタンパク質を緑色蛍光タンパク質標識した。また、片方の蛍光が明るすぎる場合はブリーチングも行った。

赤色蛍光観察時の緑色蛍光の漏れ、あるいは緑色蛍光観察時の赤色蛍光の漏れは、緑色蛍光タンパク質あるいは赤色蛍光タンパク質のみを発現する細胞の蛍光プロファイルにより補正することが可能である。

4. 研究成果

本研究では、共局在オーム解析の手始めとして、小胞体局在とされているタンパク質に着目した。小胞体内腔に運ばれる可溶性タンパク質については、BiP など発現量が極めて高いタンパク質を除き、赤色蛍光タンパク質からのシグナルがほとんど認められなかった。これは、小胞体内腔という酸化的環境では、ジスルフィド架橋形成圧がかかり、蛍光タンパク質の折り畳みに不全を来したためであると考えられる。

一方、膜タンパク質については、サイトゾル側ドメインに蛍光タンパク質タグを付けることにより、明るい緑色蛍光および赤色蛍光シグナルを得ることが出来、共局在観察においても興味深い像を得るに至った。

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5件)

① Mathuranyanon R, Tsukamoto T, Takeuchi A, Ishiwata-Kimata Y, Tuchiya Y, Kohno K,

Kimata Y

“Tight regulation of the unfolded protein sensor Ire1 by its intramolecularly antagonizing subdomain” J. Cell Sci. 印刷中, 2015 年 査読有 doi: 10.1242/jcs.164111

② Miyagawa K, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y

“Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*.” Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 78, 1389-1391, 2014 年 査読有 doi: 10.1080/09168451.2014.921561

③ Nguyen TSL, Kohno K, Kimata Y

“Zinc depletion activates the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 via pleiotropic mechanisms.” Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 77, 1337-1339, 2013 年 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748779>

④ Ishiwata-Kimata Y, Promlek T, Kohno K, Kimata Y

“BiP-bound and nonclustered mode of Ire1 evokes a weak but sustained unfolded protein response.” Genes Cells Vol. 18, 288-301, 2013 年 査読有 doi: 10.1111/gtc.12035

⑤ Ishiwata-Kimata Y, Yamamoto YH, Takizawa K, Kohno K, Kimata Y

“F-actin and a type-II myosin are required for efficient clustering of the ER stress sensor Ire1.” Cell Struct. Funct. Vol. 38, 135-143, 2013 年 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666407>

[学会発表] (計9件)

① Yukio Kimata, Kenji Kohno

“Fine regulation of the endoplasmic reticulum-stress sensor Ire1 under various cellular situations” 第87回日本生化学会大会 2014年10月15日~2014年10月18日国立京都国際会館(京都府京都市)

② 木俣有紀、小口能里枝、木俣行雄

「ミトコンドリアの機能不全は Unfolded Protein Response にどのように関わるか？」酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会 2014年9月1日~2014年9月3日東京大学(東京都文京区)

③ 木俣有紀、河野憲二、木俣行雄

「出芽酵母における小胞体ストレスセンサ

「Irel の機能と制御」第 66 回日本細胞生物学会大会 2014 年 6 月 11 日～2014 年 6 月 13 日 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

④ 塚本知子、Rubwad Mathuranyanon、河野憲二、木俣行雄

「N 末端天然変性領域による小胞体ストレスセンサー Irel の厳密な制御」第 36 回日本分子生物学会大会 2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑤ 宮川賢一、河野憲二、木俣行雄

「出芽酵母でのエタノール誘発性小胞体ストレスと防衛応答」第 36 回日本分子生物学会大会 2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑥ 小口能里枝、木俣有紀、河野憲二、木俣行雄

「小胞体ストレスセンサー Irel の活性調節とストレス感知：サイトゾル側ドメインの関与」第 36 回日本分子生物学会大会 2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

⑦ Yukio Kimata

“The ER stress sensor Irel phosphorylates and stabilizes the ion transporter Zrg17 to enable proper zinc distribution in yeast cells” Gordon Research Conference “Stress Proteins in Growth, Development & Disease” 2013 年 7 月 7 日～2013 年 7 月 21 日 Mount Snow Resort (USA)

⑧ Rubwad Mathuranyanon, Kenji Kohno, Yukio Kimata

“Regulation of the ER stress sensor Irel by its N-terminal intrinsically disordered region” 第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19 日～2013 年 6 月 21 日 ウィンク愛知 (愛知県名古屋市)

⑨ Rubwad Mathuranyanon, Kenji Kohno, Yukio Kimata

“The distinct roles of IRE1 paralogues in mammalian secretory cells” FASEB meeting “From Unfolded Proteins in the ER to Disease” 2013 年 6 月 16 日～2013 年 6 月 21 日 Saxon River (USA)

〔図書〕 (計 0 件)

〔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://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木俣 行雄 (KIMATA, Yukio)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授
研究者番号：60263448

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

河野 憲二 (KOHNO, Kenji)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
研究者番号：50142005