

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450125

研究課題名(和文)脂質修飾タンパク質の網羅的探索に基づく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 lipid modified proteins

研究代表者

内海 俊彦 (UTSUMI, TOSHIHIKO)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：20168727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：N-ミリスチル化タンパク質とプレニル化タンパク質は、その変異や過剰発現ががんや神経変性疾患をはじめとする多くの疾患と関与することが知られている。本研究では、まず、主として無細胞タンパク質合成系を用いたN-ミリスチル化タンパク質、プレニル化タンパク質の網羅的探索法の確立を行い、続いて、この手法を用いて新規バイオマーカーの探索を目的として、UniProtに収集された全ヒトタンパク質の中からN-ミリスチル化タンパク質の網羅的同一性を行った。その結果、171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 this study, to search for novel lipid modified proteins that can be applied for molecular biomarkers, we have established the strategy to identify the novel lipid modified proteins from human proteome by using metabolic labeling method performed in the insect cell-free protein synthesis system. By using this strategy, we next tried the comprehensive identification of human N-myristoylated proteins from whole human proteins listed in UniProt protein database. As a result, 171 novel N-myristoylated proteins were found from all human proteins. These novel N-myristoylated proteins contain not only physiologically important proteins mainly involved in the signal transduction pathways but also many disease-associated proteins that can be applied for molecular biomarkers.

研究分野：農学

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

1. 研究開始当初の背景

タンパク質翻訳後修飾は、細胞情報伝達をはじめとする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事が知られている。このためタンパク質翻訳後修飾の解析は、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、極めて重要な生理的機能を担う翻訳後修飾として知られている。その中でも特にタンパク質 N-ミリスチル化とタンパク質プレニル化は、細胞質で生ずる主要な脂質修飾であり、細胞情報伝達、タンパク質輸送、オルガネラ形成、アポトーシス、といった多様な細胞機能に直接関与するのみならず、がんや神経変成疾患、感染症といった多くの疾患と直接関与することが明らかにされている。これらの脂質修飾の解析法については、近年ケミカルバイオロジーの手法と質量分析を組み合わせた手法が開発され、個々の細胞に発現した脂質修飾タンパク質の同定が急速に進行している。しかし、ヒトが発現するすべてのタンパク質を対象とした網羅的解析は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究において我々が確立した、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、ケミカルバイオロジーの手法を用いてより簡便に実施する手法を確立すること、またこれらの手法をタンパク質C-末端に生ずる脂質修飾であるプレニル化に応用し、プレニル化タンパク質の網羅的探索法を確立することを目的とした。さらに、これらの手法を約46,000個のヒトタンパク質配列を含むタンパク質データベース UniProt 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及びプレニル化タンパク質の網羅的同定をめざす。さらに同定されたタンパク質の中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脂質修飾タンパク質を選択し、細胞での機能発現における脂質修飾の役割、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、タンパク質プレニ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 ^3H ミリスチン酸、 ^3H メバロン酸を用いた代謝標識、あるいはクリックケミストリーを用いた代謝標識により検出した。タンパク質の細胞内局在は、オルガネラマーカーを用い、遺伝子導入細胞の免疫蛍光染色により、またタンパク質-タンパク質相互作用は、特異抗体を用いた免疫沈降後、SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングにより解析した。

4. 研究成果

(1) クリックケミストリーを利用した無細胞タンパク質合成系における代謝標識による新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定法の確立

これまでに確立したヒト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、ケミカルバイオロジー(クリックケミストリー)の手法を導入し、ラジオアイソトープを使用することなく、極めて短時間に N-ミリスチル化を検出する手法を確立した。

(2) 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

これまでに N-ミリスチル化反応で確立した手法をタンパク質プレニル化に応用したところ、プレニル化では N-ミリスチル化と異なり、C-末端 10 アミノ酸残基をモデルタンパク質に融合した融合タンパク質では修飾反応が起きず、全長アミノ酸配列を用いてはじめて修飾反応が生じることが明らかになった。そこで、ヒトcDNA リソースから C-末端に CaaX モチーフと呼ばれるプレニル化を指令するコンセンサス配列を持つ候補タンパク質を選出し、全長cDNA を用いて無細胞タンパク質合成系における代謝標識によりプレニル化を検出した結果、これまでに報告のない新規ヒト由来プレニル化タンパク質の同定に成功した。

(3) ヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定

これまでに確立した N-ミリスチル化を生ずるタンパク質をタンパク質 N-末端のアミノ酸配列から予測し、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、この手法を約46,000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 に適用し、171個の新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質を同定した。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、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。

(4) N-ミリスチル化されたミトコンドリア外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、本研究から、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、これらの中の一つであるバレル構造を有するミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 について、その N-ミリスチル化の機能について解析を行った。その結果、ミトコンドリア外膜タンパク質である SAMM50 の N-ミリスチル化は、SAMM50 のミトコンドリアへの局在に必要なことが示された。この結果はバレル構造を有する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。

(5) 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、核膜の構造と機能に重要な役割を果たす事が知られており、神経変成疾患の原因遺伝子産物であることが知られている核タンパク質について、こ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、培養細胞への遺伝子導入に伴い、このタンパク質は核膜へ局在し、顕著な核の形態変化を誘導することが明らかになった。さらにこの核膜の形態変化にこのタンパク質に生じる N-ミリスチル化が必須であることが示された。これらの結果から、このタンパク質に生ずる N-ミリスチル化がこのタンパク質により誘導される核形態変化の原因である可能性が示唆された。この結果は、タンパク質 N-ミリスチル化を指標として神経変成疾患のバイオマーカーを探索することが可能である可能性を示している。今後、今回見出された 171 個の新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の機能解析を行うことにより、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 9 件)

Tasaki E, Matsumoto S, Tada H, Kurahashi T, Zhang X, Fujii J, Utsumi T, Iuchi Y. Protective role of testis-specific peroxiredoxin 4 against cellular oxidative stress. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 60, 156-161, 2017 査読有
Moriya K, Kimoto M, Matsuzaki K, Kiwado A, Takamitsu E, Utsumi T. Identification of dually acylated proteins from complementary DNA resources by cell-free and cellular metabolic labeling. *Analytical Biochemistry*, 511, 1-9, 2016 査読有

内海俊彦, 守屋康子. N-ミリスチル化タンパク質が担う多彩な生命現象—細胞情報伝達から疾患誘導まで—. *化学と生物*, 54, 484-492, 2016 査読有

Fujita H, Nagakawa K, Kobuchi H, Ogino T, Kondo Y, Inoue K, Shuin T, Utsumi T, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H. Phytoestrogen suppresses efflux of the diagnostic marker protoporphyrin IX in lung carcinoma. *Cancer Research*, 76, 1837-1846, 2016 査読有

Takamitsu E, Otsuka M, Haebara T, Yano M, Matsuzaki K, Kobuchi H, Moriya K, Utsumi T. Identification of human N-myristoylated proteins from human complementary DNA resources by cell-free and cellular metabolic labeling analyses. *PLOS ONE*, 10, e0136360, 2015 査読有

Kumar R, Corbett MA, Smith NJ, Jolly LA, Tan C, Keating DJ, Duffield MD, Utsumi T, Moriya K, Smith KR, Hoischen A, Abbott K, Harbord MG, Compton AG, Woenig JA, Arts P, Kwint M, Wieskamp N, Gijzen S, Veltman JA, Bahlo M, Gleeson JG, Haan E, Gecz J. Homozygous mutation of STXBP5L explains an autosomal recessive infantile-onset neurodegenerative disorder. *Human Molecular Genetics*, 24, 2000-2010, 2015 査読有

Ezure T, Nanatani K, Sato Y, Suzuki S, Aizawa K, Souma S, Ito M, Hohsaka T, von Heijine G, Utsumi T, Abe K, Ando E, Uozumi N. A cell-free translocation system using extracts of cultured insect cells to yield functional membrane proteins. *PLOS ONE*, 9, e112874, 2014 査読有

Takamitsu E, Fukunaga K, Iio Y, Moriya K, Utsumi T. Cell-free identification of novel N-myristoylated proteins from complementary DNA resources using bioorthogonal myristic acid analogues. *Analytical Biochemistry*, 464, 83-93, 2014 査読有

Kaneko K, Tabuchi M, Sueyoshi N, Ishida A, Utsumi T, Kameshita I. Cellular localization of CoPK12, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in mushroom *Coprinopsis cinerea*, is regulated by N-myristoylation and limited proteolysis. *Journal of Biochemistry*, 156, 51-61, 2014 査読有

[学会発表](計 20 件)

黄波戸亜哉, 松崎嘉奈子, 守屋康子, 内海俊彦 網羅的探索により見出した N-ミリスチル化された多重回膜貫通タンパク質の解析. 日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 19 日 京都女子大学 (京都府京都市)

松崎嘉奈子, 岩永友花, 黄波戸亜哉, 守屋康子, 小淵浩嗣, 内海俊彦, ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 と特

異的に相互作用するN-ミリスチル化タンパク質の解析. 第89回日本生化学会大会 2016年9月25日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

藤田洋史, 永川恵介, 小淵浩嗣, 荻野哲也, 近藤洋一, 井上啓史, 執印太郎, 内海俊彦, 内海耕慥, 佐々木順道, 大内淑代. ヘム代謝制御に基づく光感受性物質 protoporphyrin IX蓄積機構の研究. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会 2016年8月30日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

Saito S, Hamamoto S, Sato Y, Uozumi N, Hashimoto K, Kudla J, Utsumi T, Moriya K, Tozawa Y, Yamauchi S. Lipidation of Arabidopsis CPK6 promotes the plasma membrane targeting and the stomata closure mediated by activation of SLAC1 in Arabidopsis guard cells. International workshop on Plant Membrane Biology. 2016年6月8日 Annapolis, USA

松崎嘉奈子, 岩永友花, 守屋康子, 小淵浩嗣, 内海俊彦. N-ミリスチル化されたミトコンドリアタンパク質 SAMM50, TOMM40, CHCHD3, CHCHD6 の間に生ずる相互作用の解析. 第57回日本生化学会中国・四国支部例会 2016年5月28日 高知大学(高知県高知市)

黄波戸亜哉, 仁戸田紗希, 守屋康子, 内海俊彦. ヒト多重回膜貫通タンパク質に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の解析. 第57回日本生化学会中国・四国支部例会 2016年5月28日 高知大学(高知県高知市)

竹林昂亮, 齋藤俊也, 内海俊彦, 守屋康子, 加藤恵, 佐藤陽子, 武藤潤, 越智直樹, 橋本研志, Katrin Held, Jörg Kudla, 上田実, 横山隆亮, 西谷和彦, 浜本晋, 魚住信之. シロイヌナズナ CBL5 の発現解析と脂質修飾による細胞内局在調節機構の解析. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月20日 岩手大学(岩手県盛岡市)

齋藤俊也, 浜本晋, 内海俊彦, 守屋康子, 松浦愛子, 佐藤陽子, 野口寛人, 戸澤謙, 山内清司, 橋本 研志, Jörg Kudla, 魚住信之. シロイヌナズナ CPK の脂質修飾による細胞内局在調節および輸送体活性調節の解析. 第57回日本植物生理学会年会 2016年3月19日 岩手大学(岩手県盛岡市)

矢野愛美, 大塚基顕, 守屋康子, 内海俊彦. タンパク質 N 末端配列情報に基づくヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的探索. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月1日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

松崎嘉奈子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 および TOMM40 に生ずる N-ミリスチル化の解析. 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月1日 神戸ポ-

トアイランド(兵庫県神戸市)

矢野愛美, 大塚基顕, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. 無細胞タンパク質合成系における代謝標識法を用いたヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定の試み. 第56回日本生化学会中国・四国支部例会 2015年5月29日 島根大学(島根県松江市)

松崎嘉奈子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 および TOMM40 に生ずる N-ミリスチル化の解析. 第56回日本生化学会中国・四国支部例会 2015年5月29日 島根大学(島根県松江市)

高光恵美, 飯尾雄介, 福永和貴, 守屋康子, 内海俊彦. ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の解析. 日本農芸化学会2015年度大会 2015年3月28日 岡山大学(岡山県岡山市)

南風原樹, 大塚基顕, 林田真梨子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. シグナルペプチドに生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の解析. 日本農芸化学会2015年度大会 2015年3月28日 岡山大学(岡山県岡山市) 久場遥, 上野可南子, 塩田真友, 玉栄空輝, 藤山加奈子, 田代淳, 市原直己, 高坂智之, 内海俊彦, 山田守. シロイヌナズナにおける IAN family 遺伝子の分子生物学的および形態学的解析. 日本農芸化学会2015年度大会 2015年3月28日 岡山大学(岡山県岡山市)

高光恵美, 福永和貴, 飯尾雄介, 守屋康子, 内海俊彦. 無細胞タンパク質合成系におけるクリックケミストリーによる蛍光標識法を用いた新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定. 第87回日本生化学会大会 2014年10月17日 京都国際会館(京都府京都市)

林田真梨子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. Click chemistryを用いた in vitro 及び in vivo 代謝標識法による脂質修飾タンパク質の検出. 日本農芸化学会2014年度中四国支部大会 2014年9月26日 徳島大学(徳島県徳島市)

南風原樹, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. シグナルペプチドに生じる N-ミリスチル化の解析. 日本農芸化学会2014年度中四国支部大会 2014年9月26日 徳島大学(徳島県徳島市)

矢野愛美, 大塚基顕, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦. 細胞周期制御タンパク質 CDCA3はN-ミリスチル化されている. 日本農芸化学会2014年度中四国支部大会 2014年9月26日 徳島大学(徳島県徳島市) 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脂質修飾タンパク質の網羅的探索と機能解析. 第14回日本蛋白質科学会シンポジウム 2014年6月25日 ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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・大学院創成科学研究科・教授
研究者番号：20168727

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし