

プロテインダイナミクスのプロテオーム解析に関する基礎的研究

●榊原 陽一

宮崎大学農学部応用生物科学科

〈研究の目的と進め方〉

プロテオーム解析の過程において、現在広く用いられているIPGストリップを使用した二次元電気泳動では、疎水性の強い膜タンパク質や、塩基性タンパク質などに必ずしも対応できていないのが現状である。そこで、膜タンパク質や塩基性タンパク質に対応したプロテオーム解析法を確立する。そして、タンパク質の細胞内での発現量のみを検討ではなく、細胞のシグナル応答によって誘導されるタンパク質のダイナミックな挙動（タンパク質の細胞内輸送、シグナル分子のラフトへの集積など）を個々のタンパク質に的を絞らず、プロテオーム解析により網羅的に解析できる分析方法の確立を目的とし、そのために必要な二次元電気泳動による分離条件の検討、タンパク質細胞内輸送系の解析のための細胞システムの構築を検討する。

具体的な研究のターゲットとしては、以下の項目に関する研究を2000年度より2004年度の5カ年間で行った。

1. 膜タンパク質をターゲットとした二次元電気泳動解析条件の検討
 2. 安価な蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の開発
 3. T細胞抗原受容体の情報伝達機構の解明
 4. ラフト制御機構としてのコレステロール硫酸化
 5. タンパク質翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明
- (ただし、実施年順とはなっていない点注意)

2000年度～2004年度の5カ年に実施した一連の研究により、新しい二次元電気泳動技術の検討と、それを応用したタンパク質のダイナミックな細胞内挙動の網羅的解析を目指した研究を行った。

〈研究開始時の研究計画〉

1. 膜タンパク質をターゲットとした二次元電気泳動解析条件の検討
非界面活性剤スルホビチン(NDSB)3種を使用し、二次元電気泳動条件を検討した。
2. 安価な蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の開発
最終年度(2004年度)の中途より研究を開始した。二次元電気泳動における定量性、再現性を改善する目的で、安価で容易にできる2D-DIGEを目指した蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動条件を検討した。

3. T細胞抗原受容体の情報伝達機構の解明
ラフト画分に集積するタンパク質群を網羅的に解析することで、T細胞抗原受容体を介した情報伝達機構の全体像の解明を目指した。さらに、T細胞抗原受容体刺激

に伴った受容体のダウンレギュレーションの過程を解析することで同じく情報伝達機構の全体像が解明できる可能性を検討した。

4. ラフト制御機構としてのコレステロール硫酸化
コレステロール硫酸化に関与する硫酸転移酵素の同定を行い、コレステロール硫酸化がラフトタンパク質の局在化への影響を生化学的に検討。
5. タンパク質翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明
タンパク質の翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化に関与する酵素Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST) 2種の生化学的諸性質の検討を行った。チロシン硫酸化は、タンパク質の細胞内輸送に関与すると言われており、細胞表面の膜タンパク質(apical membrane protein)の発現への影響を解析する。

〈研究期間の成果〉

膜タンパク質をターゲットとした二次元電気泳動条件の検討

電気泳動の分離条件としては非界面活性剤スルホビチン(NDSB)3種を使用した膜タンパク質の分離条件の検討を行った。その結果、NDSBを使用することで膜タンパク質のIPGストリップによる一次元電気泳動での分離が特に酸性等電点領域で格段に向上した。

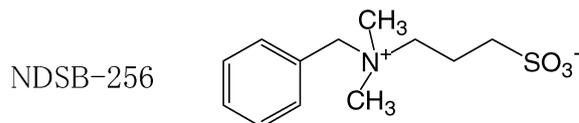
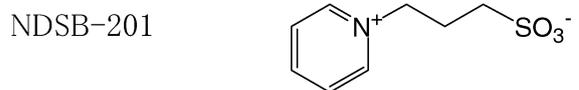
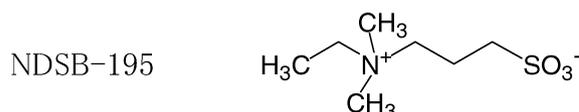


図1. 使用した非界面活性剤スルホビチンの構造

安価な蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の開発

現在、二次元電気泳動のゲル間のスポットマッチングや定量解析における問題点を解決する方法として、2D-DIGEと呼ばれるシステムが開発されているが、ランニン

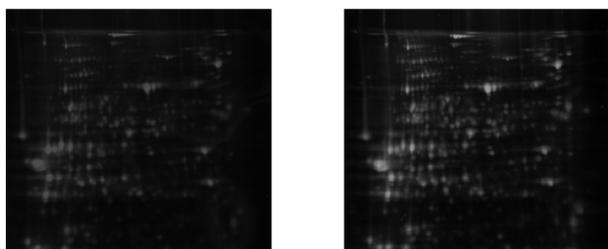
グコストが高く多数の試料を気軽に解析できない状況がある。そこで、より安価な蛍光色素を使用した蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動法の開発を行った。

具体的には、安価な蛍光色素 (IC3、IC5) を用いたプレラベル二次元電気泳動条件の検討を行い、その再現性、定量性について検討した。これらの蛍光色素はCyDyeと同じくインドシアニン系色素に属し、IC3 (ex.550nm、em.570nm)、IC5 (ex.640nm、em.660nm) の蛍光特性を持ち、HeNeレーザー (543nmまたは633nm) を利用できる。ラベルに参与する官能基としてN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルをもち、タンパク質中のリジン側鎖のアミノ基を特異的に蛍光標識する。BSAをモデルタンパク質として定量性の検討を行った。その結果、IC3およびIC5で1ngから125ngの範囲で直線性の高い定量性を示した。さらに検出限界としては、0.125ngであり、銀染色以上に高い検出感度があることも判明した。

次に、これらの蛍光色素を用いたサンプルを混合し、二次元電気泳動を行った。その結果、色素間で電気泳動の移動度の差はほとんど無く、蛍光色素間のシグナルのクロストークもほとんど見られなかった (図2)。

IC3 のゲルイメージ

IC5 のゲルイメージ



IC3 と IC5 のゲルイメージの重ね合わせ

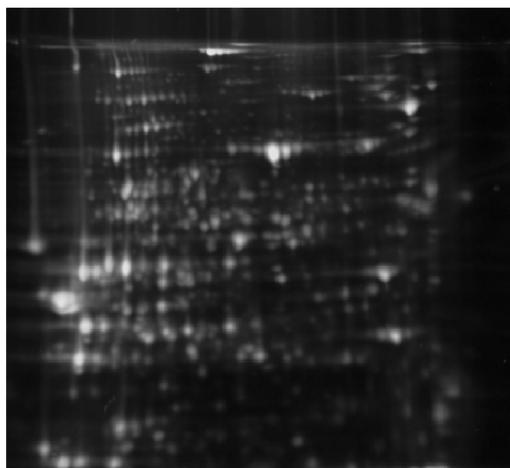


図2. 蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動 (実際の画像は色を付けています)

さらに、一方の蛍光色素標識試料を内部標準として用いることで、ゲル間の再現性及び定量性の問題を解決でき、多数の試料を解析する場合にも十分に利用できると示された。

これにより、2D-DIGEの数十分の一のランニングコストで蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動解析が実現できた。

現在、この蛍光試薬を用いた電気泳動用タンパク質プレラベルキットに関して、試薬メーカーと共同で製品化

を検討中。お試しになりたい方はご一報ください。

T細胞抗原受容体の情報伝達機構の解明 (2000年度～2003年度)

シグナル応答の解析において、T細胞受容体 (TCR) を活性化したときにTCRの下流でシグナル伝達に参与する分子、SHP-1やZap-70などのラフト画分 (DIG、Detergent Insoluble Glycolipid enriched membrane) への移行が確認された (図3)。このことからTCRの刺激に伴ってラフトへ移行する分子群を網羅的に解析することでTCR下流のシグナル伝達系の全体像を明らかにできる可能性が示された。

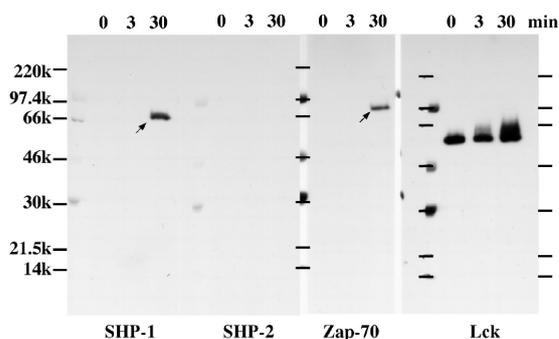


図3. T細胞抗原受容体刺激にもなったシグナル分子のDIG画分への移行

さらに、シグナル応答の解析において、T細胞受容体 (TCR) を活性化したときにTCRの下流でシグナル伝達に参与する分子の分解 (ダウンレギュレーション) の解析を行った。その結果、LAT、lckやZap-70などT細胞抗原受容体情報伝達機構に参与する分子群の分解が確認された。このことからTCRの刺激に伴ってダウンレギュレーションを受ける分子群を網羅的に解析することでTCR下流のシグナル伝達系の全体像を明らかにできる可能性が示された。さらにダウンレギュレーションの課程を定量的に分析した結果、TCR複合体と、ラフトに存在するシグナル分子群は図に示したように異なる経路で分解され、分解機構として少なくとも2種類の機構が存在することが示唆された。

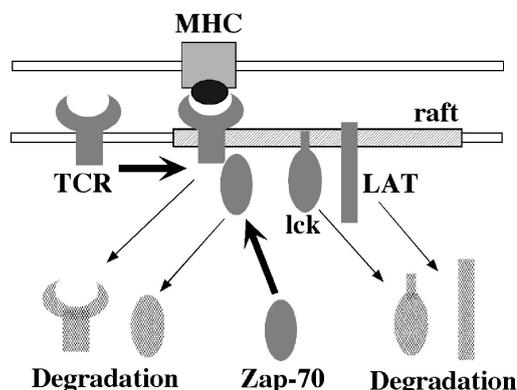


図4. T細胞抗原受容体刺激によるシグナル分子のラフト移行およびダウンレギュレーションのモデル

ラフト制御機構としてのコレステロール硫酸化

生体内におけるコレステロール硫酸化に参与する酵素コレステロール硫酸転移酵素の同定を行った。マウス硫酸転移酵素14種に関してコレステロールを基質として硫

酸化を検討した。その結果、SULT2B1というヒドロキシステロイド硫酸転移酵素の一種がコレステロールを特異的に硫酸化することが判明した（図5）。

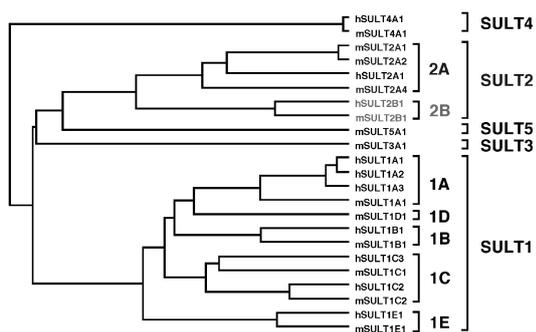


図5. ヒトおよびマウス硫酸転移酵素の系統的分類

ラフトの制御機構としてコレステロールの硫酸化が関与している可能性が示された。コレステロール硫酸化がアンカータイプチロシンキナーゼLckやシグナルアダプターLATの局在に影響する可能性が示された。現在、培養細胞レベルでコレステロール硫酸化の情報伝達機構における役割を解析中。

タンパク質翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明

タンパク質チロシン硫酸転移酵素(TPST)のクローニングと諸性質の検討。ヒトTPST 2種、マウス 2種TPST 2種、ゼブラフィッシュTPST 3種、カタユウレイボヤTPST 1のクローニングを行った。さらにヒトおよびマウスに2種類存在するTPSTの諸性質を比較検討し、タンパク質機能の多様性へのチロシン硫酸化の関与を検討した。

その結果、2種のTPSTは基質ペプチドに対する親和性など諸性質が異なり、これらの酵素を利用することで最終産物であるタンパク質の機能の多様性にチロシン硫酸化が関与することが示唆された（成果公表リスト1）。

2種のTPSTをそれぞれ強発現した細胞を調製し、蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行った。その結果、いくつかのタンパク質スポットで発現量が特異的に変化することが判明し、TPSTがタンパク質の発現に影響することが示唆された（図6）。

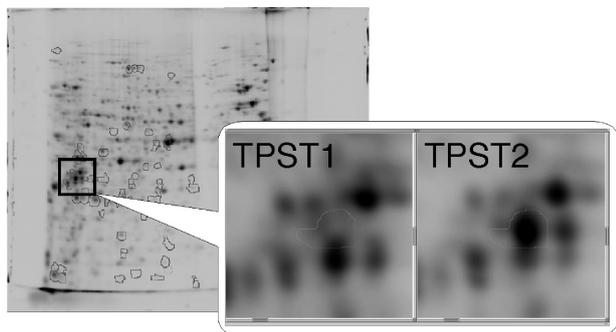


図6. TPST 発現の二次元電気泳動による解析

タンパク質チロシン硫酸化の機能として、タンパク質の細胞内輸送への関与が考えられている。これまでの研究によりMDCK細胞やCaCo-2細胞においてタンパク質のapical面への輸送に関与すると考え、TPSTを強発現したCaCo-2細胞を用いてapical膜特異的なタンパク質発現解析を行った。前述の蛍光色素を用いて、培養器中で細胞のapical膜タンパク質のみを特異的に蛍光標識することが

可能となった。これにより、apical膜タンパク質をターゲットにした蛍光ディファレンシャルに次元電気泳動によるプロテオーム解析が可能となった。

さらに、硫酸化チロシン残基を含むペプチドの質量分析による構造解析を試みた。その結果、チロシン硫酸化ペプチドはリン酸化ペプチド以上にイオン化されにくいことが判明した。結局、硫酸化ペプチドはMALDI-TOF/TOFを使用しての解析の場合、ポジティブモードでは全くイオンが検出されないため、ネガティブモードでの解析が必要である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

膜タンパク質のIPGストリップによる等電点電気泳動にSB3-10という界面活性剤が有用とされ、それを使用したタンパク質可溶性溶液が開発され市販されている。SB3-10とNDSBの併用はさらに分離能を向上するものであり、膜タンパク質の二次元電気泳動において広く応用できると考えられる。

現在、安価な蛍光ディファレンシャルに次元電気泳動に関しては、分析機器メーカーを通じて10件程度の問い合わせが来ている。学会等においても評価が高く、早急に試薬メーカーおよび分析機器メーカーと共同で電気泳動用のタンパク質蛍光ラベルキットの開発を計画。従来の方法と比較し、ランニングコストを数十分の程度に抑えることができ、特に多検体の解析が必要な分野での要求に対応できると考えている。

メンブランマイクロドメイン（ラフト）に関する研究が非常に活発に行われるようになってきた。マイクロドメインが細胞の情報伝達系に重要な機能を持つことから、その網羅的解析をねらった本研究計画は非常に有意義であると考えられる。

コレステロール硫酸化がラフトに関与することでシグナル伝達機構を制御している可能性を示したが、硫酸化に関する研究において、現在知られている14種全ての硫酸転移酵素を用いて検討できるのは我々のグループだけである。硫酸化に関しては、「硫酸転移酵素に関する多様な機能に関する研究」で2003年度の農芸化学奨励賞を受賞し、国内の学会から高く評価されている。

翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化に関する研究に関して。ゲノムプロジェクトが終了し、ポストゲノム時代と呼ばれる現在、少ない遺伝子からより多くの機能タンパク質を作り出す機構として翻訳後修飾が注目されている。日本農芸化学会2003年度大会シンポジウム「タンパク質の機能と運命を制御する新しい翻訳後修飾」における演題として翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明が採択され注目された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

特定領域研究の領域設定期間を通じて、研究に必要な質量分析装置などの機器の整備が非常に困難であった。最終的に、2004年にMALDI-TOF/TOF型質量分析装置を使用できる環境が整い、研究をスムーズに実施できるようになった。現在は、蛍光スキャナや次元電気泳動画像解析ソフトも整備され、プロテオーム解析を行うための環境が一通り整備されたが、地方においてプロテオーム解析の重要性を認識し、環境を整備することは大変困難であった。

安価な蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動に関して、試薬メーカーと共同でキット化を目指し特許申請など検討したが、先願特許など問題が多いことが判明した。

Tyrosylprotein Sulfotransferase (TPST)の発現に関して、ヒトおよびマウスといった哺乳動物由来のTPSTは293T細胞において活性のある酵素を発現することが容易となった。しかしながら、カタユウレイボヤやゼブラフィッシュ由来のTPSTに関しては安定して発現させる系が完成していない。これらのモデル生物に適した発現系が必要と考えられる。

チロシン硫酸化ペプチドの質量分析に関して、現在MALDI-TOF/TOFタイプの質量分析装置を使用しているが、硫酸化されたペプチドはイオン化が困難であり、通常の解析モードであるポジティブモードでは全くスペクトルが観測されない。ネガティブモードで検出することが可能となるが、解析ソフトが現状で対応していないため硫酸化部位の決定など困難である。今後、適したマトリックスの開発などが必要である。

〈今後の課題〉

本研究において確立した二次元電気泳動技術に関しては、今後広く利用されるように、タンパク質プレラベルキットなどの形で情報を提供していく予定である。

コレステロール硫酸化によるラフトを介した情報伝達制御機構は、ノックアウトマウスによる解析など個体レベルでの機能解析が必要である。

翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化に関して、質量分析装置を用いた硫酸化部位の解析技術の確立、基質ペプチドライブラリーを用いたコンセンサス配列の決定など実施する予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0404081453

榊原陽一、三城恵美、Liu, Ming-Cheh、水光正仁

翻訳後修飾としてのチロシン硫酸化の機能解明

Tyrosylprotein Sulfotransferaseの生化学的諸性質の検討

日本農芸化学会誌、78(1), 34-36 (2004).