

ゲノム情報と逆遺伝学を利用した膜タンパク質複合体の同定

●松岡 健

理化学研究所植物科学研究センター形態構築研究チーム（現、細胞機能研究チーム）

〈研究の目的と進め方〉

タンパク質の輸送等を始めとする複雑な生体内の反応の組み合わせからなる現象には、多くの場合数個以上の遺伝子産物のアセンブリーにより形成されるタンパク質複合体が反応を司る構成単位として用いられている。これらのタンパク質複合体を同定し、その分子機能を解明するためには、現在急速に進行中のゲノム解析とプロテオーム解析により得られる情報が非常に有用ではあるが、これらの情報のみで未知の遺伝子産物の機能を同定したり、遺伝子産物の作るタンパク質複合体の他のメンバーを同定することは多くの場合困難である。したがって、ゲノム解析後に残された課題である遺伝子産物の機能の同定のためには、ゲノム情報の利用を遺伝学的及び生化学的アプローチなどと組み合わせることによるタンパク質複合体の同定方法の開発が必要とされる。そこで本研究では、分泌系関連遺伝子の機能解析に焦点をあて、分泌系の理解の進んでいる動物や酵母とは系統的に離れた生物である植物を用いて、ホモロジー検索を出発点として逆遺伝学的及び生化学的手法を用いることによりタンパク質複合体を同定しその機能解析を行うことにより高等植物細胞におけるの分泌系の分子的理解を深めると共に、ゲノム情報を出発点として実験的に膜内在性タンパク質複合体の構成要素を同定する方法を確立し、確立した方法を用いて膜タンパク質複合体の網羅的な同定を行うことを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

本研究では、小胞体局在膜タンパク質複合体を、膜透過に関わるシグナルペプチドレセプターやSec61等を例にとり、また、ゴルジ装置に局在するtypeII膜タンパク質についても対象としながら、最初の1または2年度中に、タグを用いて標識した膜タンパク質を高度に発現した植物培養細胞を用いて、これらから膜タンパク質複合体を同定し、その過程で膜タンパク質複合体同定の方法論の確立を行うこと当初の目標としていた。また、2年度めから、ゲノム情報を用いて、未知の膜タンパク質cDNAの所得を開始し、3年度めからは、2年度までの成果を用いて新規の膜タンパク質複合体の同定を開始し、以降は網羅的にタンパク質複合体の同定を進めてゆくことを計画していた。また併せて、すでに複合体をつくること明らかにになっていた、酵母のCOPII小胞形成に関わる複数コンポーネントについて、申請者が既に開発していた試験管内でのアセンブリー系を用いて、複合体間及び複合体と膜間の関係も明らかにすることを計画していた。

〈研究期間の成果〉

本研究の補助を受け2年間の成果は以下の通りである。初年度においては、まず、タグ付きの膜タンパク質の発現を簡単に検出するために、小胞体に局在することが知られ、また、各種の膜タンパク質と、電子伝達のために複合体を形成することが考えられた、チトクロームb5を

用いて、それにDsRedタンパク質を融合させたコンストラクトを細胞に発現させた。その結果、思いがけないことに、小胞体パターンではなく、蛍光性の凝集パターンが検出された。従って、この当時用いられていた蛍光性のタンパク質は、タグには不相当であることが判った。これらの結果が得られつつある時点で、DsRedが4量体を形成することが明らかになったので、当初利用を計画していた、2量体を形成するGSTも今回の解析には不相当と考えられた。

この検討と平行して、酵母のCOPII小胞形成に関わる複数コンポーネントについて、試験管内での生体膜上へのアセンブリー系の脂質膜に、標識脂質を導入することにより、複合体と膜間の関係を明らかにする系をも明らかにする系を開発した。その結果、COPII小胞に関わるコンポーネントのうち、Sec23/24複合体が、Sec13/31複合体より膜に近い部位にあることを見いだした。この結果は、以前に解析を行っていた、リポソームを用いた系での結果を確認するものであった。そこで、これらと以前に得ていたCOPII小胞の表面構造に関する結果を併せて、論文発表を行った（成果1）。なお、この年度は、当初研究を開始した名古屋大学から、理化学研究所へと所属が変更となり、引越に多大な時間を割いたため、これら以外の解析は困難であった。

2年度目には、膜タンパク質を複合体として可溶化するための、界面活性剤や塩濃度を簡便に決定するための手法の開発を行った。その結果、マイクロタイタープレート、マルチチャンネルピペッターと微量超遠心機を用いて、16条件を同時に検討できる手法を開発した。この成果は、特許申請を行っている（成果3）。また、これと併せて解析対象の膜タンパク質候補cDNAのクローニングにかかっていたが、理研ゲノムセンターで、シロイヌナズナの完全長cDNAコレクションが作成されつつあるとの情報を得たため、その情報をもとに解析対象を選抜することとした。なお、本研究は、3年目以降補助の対象外となったため、ここで終了した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

成果1の内容は、我々が最近執筆した総説（成果2）に引用しているだけではなく、2006年2月までに41件の論文に引用されている。それらの論文のうち、5件はNature, Science, Cellに代表される評価の高い雑誌に掲載された論文であり、このことは、この論文が世界的に高い評価を得ていることを意味している。

成果3の結果は、実用化に某試薬メーカーが興味を示し、この成果を用いた試薬キットの作成と販売について、その可能性の検討と実用化のためのライセンスの交渉を、平成15年度中まで行っていた。しかしながら、試薬メーカー側のと、研究代表者の所属する組織の間で、ライセンスの際の条件について、折り合いを付けることが出来ず、結果的には実用化には至っていない。しかしながら、この系は我々の以降の実験には有用であり、我々は、この成果の応用により、植物のペプチジルプロリンものオ

キシゲナーゼが、II型の膜タンパク質であることをしめすことが出来た (Yuasa et al., Plant J. 81-94, 2005)。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

今回の研究期間において、多量体を形成するタグは、膜タンパク質複合体の同定のために適しないという結果は得られたが、膜タンパク質複合体の系統的な同定に用いることの出来るタグを見いだすことが出来なかった。この原因は、各々のタンパク質とそれらの存在部位によって、タンパク質に影響を与えないで使用でき、しかも検出可能なタグが異なるということによるのかもしれない。例えば、最近の我々のペプチジルプロリンものオキシゲナーゼの解析に用いることが出来たFLAG-His6タグは、同じ細胞で発現させた場合においても、分泌系を移動する別の酵素の解析には使えていない。従って、今後は各々のタンパク質に適したタグを利用するか、古典的な方法で抗体を作成し、その機能を解析する必要があるのではないか。

〈今後の課題〉

系統的に膜タンパク質複合体を同定するためには、タグを用いるのではなく、天然のタンパク質をいかに効率良く複合体として検出することができるかというのが、今後の課題であろう。そのために、最も確実であるのが、抗体の利用であり、また、アダママーの利用の可能性も検討が必要である。今後は、ゲノム配列で予測された多数のタンパク質について、効率よく特異性高い抗体またはアダママーを作成し、それが天然のタンパク質を認識しているという確認を、効率良く行ってゆく系の確立が望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) Matsuoka, K., Schekman, R., Orci, L. and Heuser, J. E. (2001) Surface structure of the COPII-coated vesicle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13705-13709. (0202181704)

2) Aniento, F., Matsuoka, K. and Robinson, D. G. (2006) "ER-to-Golgi Transport: The COPII-Pathway" in: "The Plant Endoplasmic Reticulum, Plant Cell Monographs, Vol. 4" Ed. D.G. Robinson. Springer-Verlag, (Heidelberg) in press.

3) 松岡 健 (発明者)

「界面活性剤のスクリーニング方法」特開2003-329665