

2007年4月4日

独立行政法人 理化学研究所

ユビキチン化タンパク質の大量精製および網羅的解析法の開発に成功

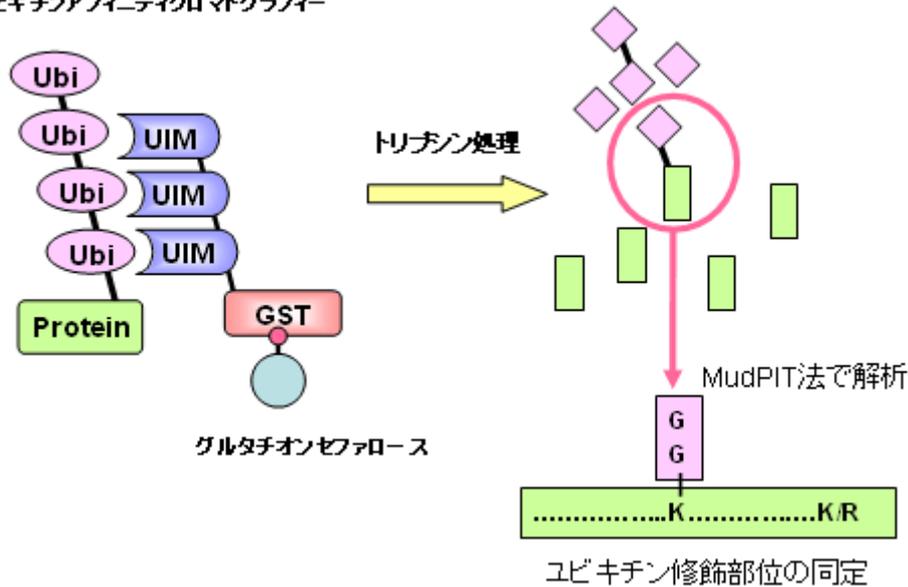
- 生命現象に関するさまざまなタンパク質の制御法への大きな期待 -

細胞周期、免疫、代謝の調節、ストレス応答、DNAの修復などさまざまな生命現象に深くかかわっている重要なタンパク質には、「ユビキチン」が関与しています。このユビキチンは、76個のアミノ酸が結合したタンパク質で、不要になったほかのタンパク質にとりつき、“ここに問題のあるタンパク質がいますよ”と知らせる役目などを担っています。いたるところにある、という意味のラテン語を語源に、この名がついたと伝えられています。2004年、「ユビキチンの仲介でタンパク質が分解される仕組みの解明」に対して、ノーベル化学賞が贈られました。しかし、まだナゾが多く、例えば、ユビキチンがとりにつくタンパク質や修飾部位などは、ほとんど知られていませんでした。

理研植物科学研究センターの植物免疫研究グループは、英国セインズベリー研究所と共同で、ユビキチンの修飾をうけたタンパク質の大量精製と、そのタンパク質を構成するペプチドを網羅的に解析する手法の開発に成功しました。この手法で、シロイヌナズナから85の新規ユビキチン修飾部位を決定しました。

この方法はイネなどにも活用することができるため、将来には植物の成長や開花の制御技術、環境ストレスに強い作物が誕生することになるでしょう。

ユビキチンアフィニティクロマトグラフィー



(図) ユビキチンの修飾をうけたタンパク質の解析法

2007年4月4日
独立行政法人 理化学研究所

ユビキチン化タンパク質の大量精製および網羅的解析法の開発に成功

- 生命現象に関するさまざまなタンパク質の制御法への大きな期待 -

◇ポイント◇

- ・ シロイヌナズナの培養細胞からユビキチン化タンパク質を精製
- ・ 85 の新規ユビキチン修飾部位を特定
- ・ 植物の成長や開花制御技術、環境ストレス耐性、耐病性の育種が可能に

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、生命現象の源となるユビキチン修飾をうけた植物タンパク質の大量精製と、その構造を網羅的に解析する新手法の開発に成功しました。これは、理研植物科学研究センター（篠崎一雄センター長）植物免疫研究グループの白須 賢グループディレクターと、英国セインズベリー研究所（ジョナサン・ジョーンズ所長）のScott Peck（スコット・ペック）博士（現：ミズーリ大学）の研究グループによる共同研究の成果です。

ユビキチン(Ubiquitin)は、すべての真核生物がもつ、76 個のアミノ酸からなるタンパク質で、他のタンパク質に付加（ユビキチン化）されることで、そのタンパク質の分解や活性化、局在化などを制御しています。これまで、植物の成長、花芽形成、環境ストレス耐性、耐病性などさまざまな生命現象へのユビキチン化の関与が示唆されてきましたが、そのターゲットとなるタンパク質や修飾部位などはほとんど知られていませんでした。

今回の研究では、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム配列情報をもとに、ユビキチンを特異的に認識して結合するタンパク質をコードする遺伝子を見出し、ユビキチン結合ドメインとグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）^{*1}との融合タンパク質を、大腸菌で発現させました。この融合タンパク質をグルタチオンセファロースに固定し、アフィニティークロマトグラフィー^{*2}を行い、シロイヌナズナの培養細胞からユビキチン化タンパク質を大量に精製することに成功しました。さらに、これらのタンパク質を構成するペプチドを、最新の微量タンパク質分析法であるMudPIT法（Multidimensional Protein Identification Technology）^{*3}を用いて網羅的に解析し、294 のタンパク質を特定し、85 の新規ユビキチン修飾部位を同定しました。またこの方法は、モデル植物のシロイヌナズナだけでなく、大麦などの単子葉作物などでも有効であることを見いだしました。将来この方法で同定したタンパク質を利用することで、植物の成長・開花制御技術の開発、そして環境ストレス耐性、耐病性の育種につながることを期待されます。

この研究成果は、米国の科学雑誌『Molecular & Cellular Proteomics』の4月号に掲載されます。

1.背 景

ユビキチン化は、真核生物において、タンパク質の分解、活性化、局在化を制御

する重要な制御機構の一つです。植物でも、ユビキチン化が、植物ホルモンや光による成長制御、環境ストレス耐性、耐病性など、多くの生命現象に関わっていることが示唆されていました。モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム解析からその全遺伝子の5%が、ユビキチン化に関与していると考えられています。これは他の真核生物に較べて圧倒的に多く、植物にとってユビキチン化が非常に重要な制御機構であることがわかります。ユビキチン化関連の遺伝子は、これまでに変異体解析などで遺伝学的に同定されてきたものがほとんどでしたが、その数は大変少ないものでした。これは、ユビキチン化関連の遺伝子が、数多く重複しているため、変異体を取りにくかったり、実際にタンパク質がユビキチン化される標的なのかどうか判定しづらかったりするためです。一方で、ユビキチン化されたタンパク質は、すぐに分解されてしまうことや、細胞内では脱ユビキチン化酵素の活性が高いため、微量かつ短時間しか存在しないため、生化学的に大量精製し、網羅的に解析することは非常に困難でした。

2. 研究手法

研究グループは、シロイヌナズナの全ゲノム配列情報をもとに、ユビキチンに特異的に結合するタンパク質をコードする二つの遺伝子 *AtRPN10* と *AtUBP14* を見出しました。この遺伝子を用いて、そのユビキチン結合ドメイン UIM と UBA のそれぞれを、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) と融合させました (図 1)。次に、大腸菌でこの融合タンパク質を発現し精製して、グルタチオンセファロースに固定したアフィニティークロマトグラフィーカラムを作りました。ユビキチン化した標的タンパク質は、プロテアゾーム^{*4}によって短時間で分解してしまいます。これを阻止するために、プロテアゾーム阻害剤である MG132 をシロイヌナズナの培養細胞に加え、標的タンパク質を抽出しました。さらに、カラムあるいはユビキチン化した標的タンパク質に非特異的に結合するタンパク質を除くため、高濃度の尿素 (8M) で前処理してからアフィニティークロマトグラフィーにかけ、ユビキチン化した標的タンパク質を大量に精製しました。

次に、ユビキチン化した標的タンパク質を、トリプシン^{*5}処理で細かくペプチド断片にして、MudPIT法で解析しました (図 2)。MudPIT法は最新の微量タンパク質の網羅的同定法であり、ナノリッタースケールでイオン交換カラムと逆相カラムを組み合わせてペプチドを分離、高性能質量分析器を用いて質量解析するものです。この手法によって、複雑なサンプルからペプチド断片を同定することが可能になりました。また、トリプシン処理することで、ユビキチンのカルボキシ末端にある二つのグリシンがタンパク質の修飾された部位に残ることから、ユビキチン修飾部位を容易に同定できました。

ユビキチン化タンパク質の精製に関しては英国セインズベリー研究所が行い、質量解析とデータベース構築などは英国セインズベリー研究所と植物科学研究センターが行いました。解析には、植物科学研究センターに導入した最新の液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS/MS) ^{*6}などを駆使しました。

3. 研究成果

このように開発した最新の技術を利用して、ユビキチン結合ドメイン UIM および UBA に特異的に結合する 294 のタンパク質を同定しました。さらに、この中から

85 の新規ユビキチン修飾部位を同定しました。UIMとUBAでは、同定したタンパク質に、異なっているものが多く、これらのドメインがユビキチン化した標的タンパク質に何らかの特異性を持っていることもわかりました。同定したタンパク質のなかには、植物免疫に必須な抵抗性タンパク質なども含まれていました。

生化学的手法でユビキチン化した標的タンパク質とその修飾部位を植物から網羅的に同定したのは、本研究が世界で初めてです。ゲノム解析からだけではユビキチン修飾部位がわからないこと、またこれらの修飾がダイナミックに起こることから、タンパク質の修飾状況は予測できません。従って、タンパク質の分解、活性化、局在化といった制御機構を理解し、応用するためには、ポストゲノムのアプローチであるプロテオーム解析^{*7}が不可欠になります。今回の研究成果は、植物のユビキチン化プロテオーム研究の第一歩になります。ユビキチン化した標的タンパク質の精製法および解析法は、モデル植物のシロイヌナズナだけではなく大麦などの単子葉作物などにも応用が可能であることも示されました。

4. 今後の期待

本研究により、植物のさまざまな生命現象を制御する、ユビキチン化した標的タンパク質の網羅的な同定が可能になりました。イネなどの作物のタンパク質の修飾状況を詳細に調べることで、植物の成長、花芽形成、環境ストレス耐性、耐病性の制御技術の開発が期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

植物科学研究センター 植物免疫研究グループ

グループディレクター 白須 賢 (しらす けん)

Tel : 045-503-9574 / Fax : 048-503-9573

研究室ホームページ: <http://ksg.psc.riken.jp/>

横浜研究推進部 企画課

Tel : 048-503-9117 / Fax : 048-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) とグルタチオンセファロース

グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) は、タンパク質の発現や精製の際によく使用される。グルタチオン S トランスフェラーゼは、グルタチオンに高親和性かつ

特異的に結合することから、グルタチオンを結合した親和性樹脂（グルタチオンセファロースなど）を利用すると、GST 融合タンパク質を全細胞抽出物から効率的に精製することができる。

※2 アフィニティークロマトグラフィー

アフィニティークロマトグラフィーは、主に生体高分子（たんぱく質や核酸など）同士、あるいは低分子物質との親和性（アフィニティー）を用いて物質を分離する方法。一方の物質をセファロースやアガロースなどの樹脂に固定化し、分離すべき物質の溶液を流し込むという方法で、精製する。

※3 MudPIT 法 (Multidimensional Protein Identification Technology)

MudPIT 法は最新の微量タンパク質の網羅的同定法で、ナノリッタースケールでイオン交換カラム（イオンが結合できる樹脂を充填したもの）と逆相カラム（疎水性の分子が結合できる樹脂を充填したもの）を組み合わせ、ペプチドを分離、高性能質量分析器を用いて質量解析する。これによって得られたアミノ酸配列を既知のゲノム情報とあわせることによって、これをコードする遺伝子を特定できる。この方法を用いることで、多数のタンパク質を含む複雑なサンプルを、それぞれのタンパク質一つずつ精製することなく、網羅的にアミノ酸配列を特定する、いわゆるショットガンシーケンスが可能となった。

※4 プロテアソーム

Proteasome。細胞内のタンパク質を分解する酵素複合体。

※5 トリプシン

トリプシン (Trypsin, EC.3.4.21.4) は消化酵素のひとつ。セリンプロテアーゼの一種である。塩基性アミノ酸であるリジン、アルギニンのカルボキシル側のペプチド結合を加水分解する。プロテオーム解析用にタンパク質をペプチドに分解するのによく用いられる。

※6 液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS)

Liquid Chromatography and tandem mass spectrometer。ナノリッターでコントロールできる液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析計 (MS/MS) をあわせた超微量物質同定システム。タンデム質量分析計 (MS/MS) とはペプチドの質量を測定した後、そのペプチドをさらに細かく分解しもう一度ペプチド断片の質量を測定することによってアミノ酸配列を決定する方法。

※7 プロテオーム解析

プロテオーム (Proteome) とは、ある生物の系 (組織、生物体、細胞など) において存在しているタンパク質の総体のこと。ある研究系でその差をみるときに (たとえば正常細胞とガン細胞) に、ある特異的なタンパク質の挙動にフォーカスするのではなく、タンパク質の総体の変化を解析することをプロテオーム解析と呼ぶ。また、これを扱う研究分野をプロテオミクスという。一般に、ゲノムは同一生命体では変

化はしないが、プロテオームは生命体、あるいは細胞の状態によって大きく変化する。タンパク質は遺伝子の機能情報を発現しているため、プロテオーム解析は生命現象の解析に不可欠となる。しかし、プロテオーム解析はゲノムの解析よりも難しいものだった。これは、核酸（DNA）は増幅して解析できるが、タンパク質は増幅できないこと、また DNA を構成する核酸は 4 種類であるが、タンパク質のアミノ酸は 20 種類あることから、微量解析が難しかったためである。2002 年ノーベル賞を受賞した田中耕一氏らの発明などで、微量質量解析の技術が飛躍的にあがり、プロテオーム解析が可能となった。

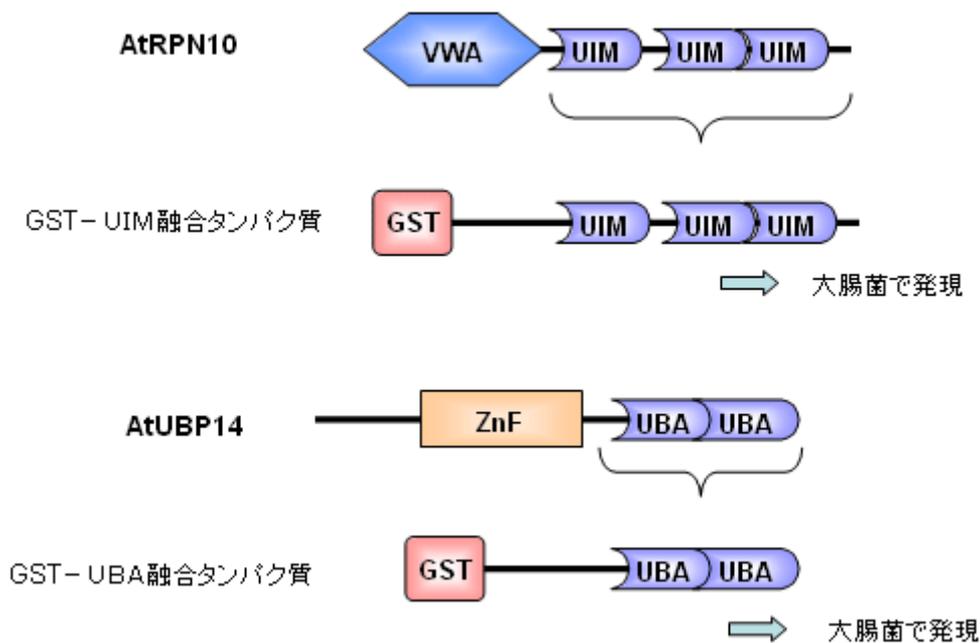


図 1 大腸菌でユビキチン化結合ドメインを生成

シロイヌナズナの全ゲノム配列情報をもとに、ユビキチンに特異的に結合するタンパク質をコードする二つの遺伝子 *AtRPN10* と *AtUBP14* をクローン。この遺伝子を用いて、そのユビキチン結合ドメイン UIM と UBA のそれぞれを、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) と融合。大腸菌で融合タンパク質を発現大量精製。VWA (von Willebrand factor type A ドメイン)、UIM (ubiquitin interacting motif)、ZnF (Zinc Finger ドメイン)、UBA (Ubiquitin associating ドメイン)。

ユビキチンアフィニティークロマトグラフィー

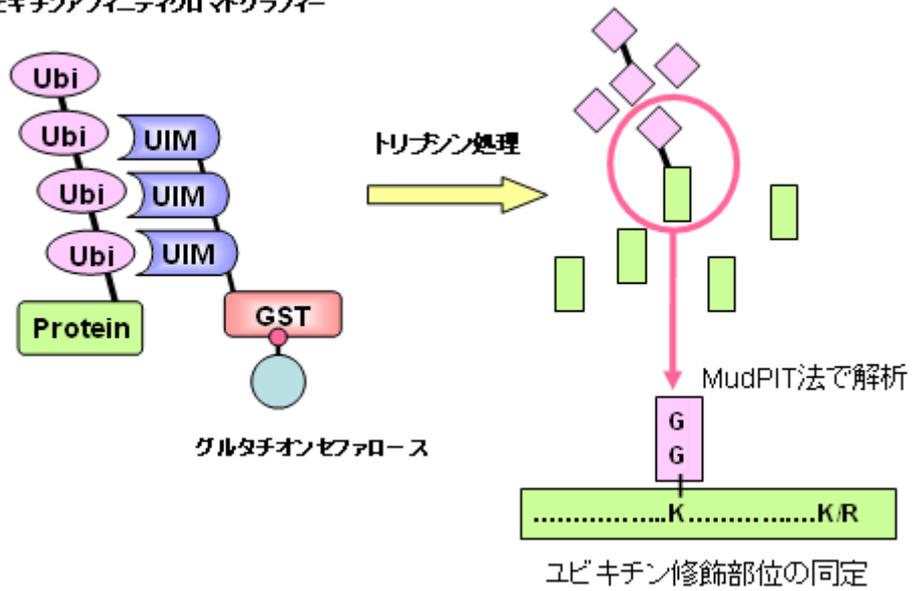


図2 ユビキチン化タンパク質の解析法

グルタチオンセファロースに固定したアフィニティークロマトグラフィーを作り、ユビキチン化した標的タンパク質を精製、トリプシン処理で細かくペプチド断片にして、MudPIT法で解析した。トリプシン処理することで、ユビキチンのカルボキシ末端にある二つのグリシン（G）がタンパク質の修飾された部位に残ることから、ユビキチン修飾部位を容易に同定できる。

ユビキチン（Ubi）、リジン（K）、アルギニン（R）。