

バイオ解析チーム Biomolecular Characterization Team

チームヘッド 堂前 直 (博士)
DOHMAE, Naoshi (Ph.D)



キーセンテンス：

1. 生命科学領域の分子構造解析基盤の確立
2. 生体高分子の構造解析法の開発と応用
3. タンパク質の翻訳後修飾解析

キーワード：

プロテオーム、翻訳後修飾、核酸、構造生物学

研究目的

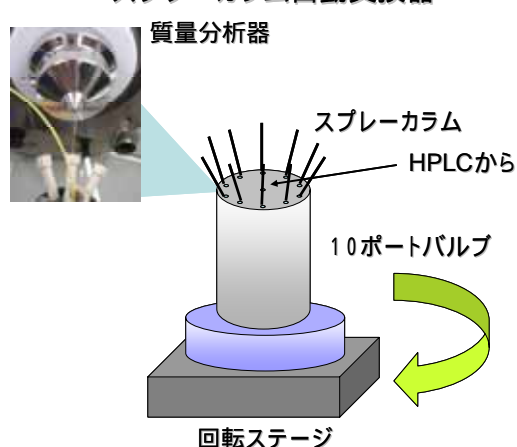
バイオ解析チームは、生命現象の解明に向け、生体分子の構造解析法の開発や構造解析を用いた応用研究を行っている。生体成分の中でも特にタンパク質は生命現象の源であり、さまざまな生物活性を持つ。そのタンパク質の構造を調べることで、活性を生じる遺伝子が判明する。さらに詳細に構造解析することで、生物学的活性のメカニズムや活性の制御機構について重要な知見が得られる。これら生体分子の解析のための新しい手法や装置の開発および導入を行い、装置ならびに設備の設置や管理、解析方法に関する情報の整備をすることで研究支援を行っている。質量分析法の発達やデータベースの充実、検索プログラムの発展に伴い微量成分の同定方法は容易になりつつある。これに反して、定性的なデータベース検索以外の解析は大変困難である。これを打開するため発展著しい質量分析による構造解析に加え、化学的手法をも併用し、新規な修飾や未知の配列に対応できる詳細な構造解析や微量定量解析の開発と応用研究に取り組んでいる。さらに高次構造解析にも力を注いでいる。現在、種々の質量分析計、プロテインシーケンサー、生体高分子用のX線回折装置、及び分析用超遠心装置を管理し共用できるように整備し、さらに播磨研究所研究技術開発室と連携してSpring-8の遠隔測定支援システム和光地区の窓口業務を行っている。

1. 生体分子の翻訳後修飾を含めた詳細な構造解析 (堂前, 鈴木, 益田, 浅沼)

ゲノムに暗号化された遺伝情報はRNAに転写された後、タンパク質に翻訳され合成される。多くのタンパク質はこの遺伝情報どおりにアミノ酸が並んだポリペプチドとして合成された後に何らかの修飾を受けることで生物活性が生じたり、活性を制御されている。この遺伝情報に直接記載されていない、タンパク質独自の情報 = 翻訳後修飾を解明することがポストゲノムシーケンス時代のタンパク質の構造解析への要求である。また、バイオプローブを用いたケミカルバイオロジー研究を始め、低分子薬剤のタンパク質結合位置の解析にも大きな要求がある。しかしこれらの修飾部位解析や薬剤結合部位解析を含めた詳細で精密な構造解析は大変困難な課題として残されている。

この困難を解決するために、翻訳後修飾を解析する一般的な方法として、1. エレクトロスプレーイオン化法質量分析計 (ESI-MS) による精度の高いタンパク質分子の質量測定、2. 網羅率の高いタンパク質を酵素消化断片化し液体クロマトグラフィー質量分析により、修飾の入ったペプチド断片として同定。3. タンパク

スプレーカラム自動交換器



An instrument which coupled with an automatic rotation stage and a ten-port valve (Spray column exchanger).

我々のチームでは超微量分析のために、さまざまな自動化装置も開発している。

質を塩酸加水分解して、アミノ酸レベルへ分解し、翻訳後修飾アミノ酸または修飾残基としての同定、の3つを併用することを確立してきた。

これらの方法を応用することで、守屋バイオスフェア科学創成研究ユニット守屋ユニットリーダーとシロアリ腹腔内細菌のタンパク質同定を昨年に続き行った。松本分子昆虫学研究室の鈴木研究員と共同でカイコのオス特異的に発現するタンパク質の解析を行った。また株式会社アミンファーマ研究所、五十嵐代表取締役社長と共同で脳卒中のマーカー候補としてポリアミンによるタンパク質の修飾を解析した。さらに吉田化学遺伝学研究室の吉田稔主任研究員らと共に開始した分裂酵母タンパク質の網羅的翻訳後修飾解析については、プロジェクト3年目を迎え、分裂酵母の発現タンパク質の網羅的解析に着手した。

2. 生体分子の定量的解析法の開発 (益田, 鈴木, 堂前)

生命活動を支える多種多様な働きをするタンパク質は含まれるアミノ酸の種類や配列によって千差万別の性質を示すため、通常ひとつの方法で定量的解析を行うことは難しい。しかし、アミノ酸組成分析法は、タンパク質・ペプチドをアミノ酸レベルに分解して、アミノ酸配列に依存せず低分子のアミノ酸として定量するために唯一全てのタンパク質を絶対定量できる方法である。我々はAQC (アミノキノリルカルバミル化) 誘導体を用いたプレラベル化法により高感度アミノ酸分析を実現することで微量タンパク質量を行っている。しかし、環境からの汚染を抑えてアミノ酸へ加水分解することがネックとなっていた。この問題を解消するために、固相の酸触媒を用いることによりタンパク質を自動で加水分解する方法を発明し、組成分析へ応用してきた。

本年は酸触媒の種類を検討して、新たに高温処理が可能な触媒を発見し、160度にて加水分解することで短時間に加水分解する方法を開発した。この触媒は膜状であり、電気泳動にて精製したタンパク質試料を直接分析したり、96や384プレートと併用した試料の並列処理が可能になる可能性がある。今後さらにこれらの実現に向けて研究を進める必要が生じた。

アミノ酸分析によるタンパク質の定量的解析法を検討していたが、本年度はタンパク質の任意のアミノ酸をシステインに置換し、システインが酸化して生じるジスルフィド結合の生成率より、置換したシステイン間の距離を測定する試みを行った。これを東京大学の濡木教授及び杉田理論生物化学研究室の杉田准主任研究員らとともにタンパク質の生体膜の通過機構であるタンパク質膜透過装置Secトランスロコンに対して応用し、濡木研究室で得られた結晶構造はモータータンパク質が結合した際に得られる特殊なPre-Open構造であり通常の生体膜中では杉田准主任らが計算したように以前の報告と類似のClosed構造を取ることを証明した。これにより、SecYEトランスロコンはモータータンパク質であるSecAが結合することでPre-Open構造を取ることを見出した。

3. 構造生物学的研究およびその関連技術の研究開発 (宮武, 堂前)

X線結晶構造解析による構造生物学研究において、放射光利用は必須の要件であるが、放射光施設から遠方の研究者が放射光を利用するのは必ずしも容易ではない。そこで、われわれは放射光科学総合研究センターの研究技術開発室と共同で、和光地区にSPring-8遠隔測定支援システムの窓口を開設した。このシステムにより、あらかじめSPring-8に送付しておいた結晶のX線回折測定を、インターネットを経由した遠隔操作によって行うことが可能になり、放射光測定がより身近になった。さらに希望者に対しては、放射光科学総合研究センター放射光システム生物学研究グループの協力の下、目的タンパク質試料を提供する環境も整備した。現在、SPring-8遠隔測定支援システムを利用した構造生物学的研究が、バイオ解析チームと他の研究室との間で進行中である。一方、現在の構造生物学研究においてはタンパク質の結晶化が最大の難関であり、タンパク質の革新的な結晶化技術の開発が望まれている。そこでわれわれは、ナノテクノロジーなどを駆使した新規なタンパク質結晶化方法の開発を行っている(フロンティアナノプロテインサイエンスサブチーム、フロンティア研究技術開発・支援チームとの共同研究)。

4. RNAの質量分析 (中山, 秋山, 小池)

タンパク質に翻訳されないいわゆるnon-coding RNA(ncRNA)が生体にとり重要な機能を果たしていることが次第に明らかとなってきた。これらのncRNAを解析するためには、従来RNAを逆転写して得たcDNAを配列解析することで、元のRNAを同定する方法がもちいられてきたが、ncRNA機能に重要な役割を持つ転写後修飾の情報が無視されてしまうこと、RNAごとの逆転写されやすさの違いにより結果にバイアスが

掛かってしまうことなどが問題だった。一方、タンパク質解析に広くもちいられてきた質量分析法は分子質量および内部構造情報を得ることが出来るためRNA解析法候補としても有望である。しかし、未知試料に含まれているRNAを同定するために一般的なデータ解析方法が無いためもあり、転写後修飾を解析した少数を除けばほとんど報告が無い。私たちは質量分析をもちいたRNA同定を可能とするため、RNA質量データを配列データベースに対して問い合わせる検索エンジンの作成を開始した。今年度はまずRNAの質量分析内での断片化パターン傾向を調べ、その結果を反映させたデータベース検索エンジンのプロトタイプソフトウェアを作成した。このソフトウェアをもちいて生体から分離したsmall RNA画分から個々のRNAを同定することが可能だった。

Key Sentence :

1. Support for biological scientist to resolve molecular structure.
2. Development and application of structural proteomics or ribonucleomics
3. Characterization of protein post-translational modification.

Key Word :

Protein chemistry, Mass Spectrometry, X-ray analyzer, Protein structure (1D, 3D), amino acid chemical analysis

Purpose of Research :

This team is engaged in structural characterization of biological molecules and in development of methodology for analysis of them to elucidate biological phenomena. Proteins in particular cause the biological phenomena and have various biological activities. Investigation of protein structures helps us to elucidate a mechanism of the biological activities, regulation of the activities, or gene functions. We support biological researchers by developing equipment and analytical methods and managing them, or giving advice on methodologies. A qualitative identification of small amount of proteins becomes easy with the development of the mass spectrometry, the excellent database, and the search program of it. The structural analysis and quantitative analysis of proteins with unknown modification or sequence is, however, still difficult. We are wrestling with development of new characterization methods for such proteins by combining sophisticated mass spectrometry with chemical methods. Our activities include mass spectrometry, protein chemical analyses, ultracentrifugal analysis, and x-ray analysis. We also established mail-in system with RIKEN SPring-8 center to deliver protein crystals prepared in Wako campus.

1. Development and application of analytical methods for structural details on biological molecules (Dohmae, Suzuki, Masuda, Asanuma)

Genetic code is transcribed into RNA followed by translation to proteins. Many proteins capture appropriate functions and suffer regulations by post-translational modifications (PTMs). Direct analysis of the modifications of amino acid residues and their positions within a protein sequence is still required in post genome sequence era. Furthermore, binding site of a low molecular reagent to a protein is the most important information for an approach using chemical biology with bio-probe.

To characterize protein structure containing PTMs, we recommend the combination of three procedures. 1) Observation of molecular weight of whole protein using electro-spray ionization mass spectrometry. 2) Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of enzymatic digest. 3) Amino acid analysis of acid hydrolyzates.

We have applied these methods to several cases in collaborative researches. For example, we have characterized a protein of symbiotic microbial in termite guts and a sex-specific protein expressed in *Bombyx mori*. We analyzed modification of proteins by polyamines that are candidate of biomarker for cerebrovascular diseases. Furthermore we have started modificomics project, global analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* proteins.

2. Development of quantitative analysis of biomolecules (Masuda, Suzuki, Dohmae)

An application of a single method is generally insufficient for quantitative analysis of protein since the properties of protein depend on the kinds and the sequence of amino acids. Amino acid analysis, which is independent on the sequence of amino acids in proteins and is based on degradation of proteins of peptides to amino acids, is absolutely quantitative method and is applicable to any kind of protein. We carried out a highly sensitive amino acid analysis using a fluorescent derivatizing reagent, 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). Contamination from environment during acid hydrolysis from protein to amino acids, however, often interferes with the sensitive analysis. We have developed an automated system for acid hydrolysis to avoid the contamination using solid-acid catalyst and have applied the system to amino acid analysis.

We carried out short-time hydrolysis at 160 °C using newly developed membrane-form acid catalyst that had highly resistance to heat. The membrane was capable of laminating a blotted membrane after gel electrophoresis of proteins. The membrane will be useful for analysis of proteins that are extracted from gels after electrophoresis and parallel treatment of many samples combining with 96-well or 384-well plates. Further experiments are needed for the practical use of the membrane.

We applied amino acid analysis to obtain quantitative information of distance between a pair of cysteine residues, which were substituted at any pairs of positions of proteins, through the formation of disulphide bond. We analyzed a free Sec transcolony, which is a protein-conducting channel. Crystal structure of the Sec transcolony including the antibody fragment derived in Nureki Lab. in Tokyo Univ. showed Pre-Open state of the channel. On the other hand, the free Sec transcolony was Closed-form from the amino acid analysis as previously shown in Sugita's simulation (Theo. Biochem. Lab., ASI). Thus, we showed that the channel was normally closed and conformational transition occurs to open the channel with association of motor-proteins, SecA.

3. Structural biological studies and development of the related technologies (Miyatake, Dohmae)

We and RIKEN SPring-8 center established mail-in system to deliver protein crystals prepared in Wako campus to RIKEN SPring-8 center. The system releases the researcher's labor and accelerates the proceedings of the structural biological studies around Wako area. In this fiscal year, we also prepared instruments for protein purification in large amount. In addition, we have been developed a novel method using dynamic light scattering measurement to crystallize proteins in higher efficiency than those of conventional ones.

4. Identification and chemical analysis of RNA by mass spectrometry (Nakayama, Akiyama, Koike)

We develop a method to correlate tandem mass spectra of sample RNA nucleolytic fragments with an RNA nucleotide sequence in a DNA/RNA sequence database, thereby allowing tandem mass spectrometry (MS/MS)-based identification of RNA in biological samples. Ariadne, a unique database search engine, identifies RNA by two probability-based evaluation steps of MS/MS data. In the first step, the software evaluates the matches between the masses of product ions generated by MS/MS of an RNase digest of sample RNA and those calculated from a candidate nucleotide sequence in a DNA/RNA sequence database, which then predicts the nucleotide sequences of these RNase fragments. In the second step, the candidate sequences are mapped for all RNA entries in the database, and each entry is scored for a function of occurrences of the candidate sequences to identify a particular RNA. Ariadne can also predict post-transcriptional modifications of RNA, such as methylation of nucleotide bases and/or ribose, by estimating mass shifts from the theoretical mass values. The method was validated with MS/MS data of RNase T1 digests of in vitro transcripts. It was applied successfully to identify an unknown RNA component in a tRNA mixture and to analyze post-transcriptional modification in yeast tRNAPhe-1.

Head

堂前 直 Naoshi Dohmae

Members

秋山 美沙紀 Misaki Akiyama
浅沼 三和子 Miwako Asanuma
益田 晶子 Akiko Masuda
宫武 秀行 Hideyuki Miyatake
中山 洋 Hiroshi Nakayama
鈴木 健裕 Takehiro Suzuki

Visiting Members

菅澤 薫 Kaoru Sugasawa
柘植 知彦 Tomohiko Tsuge

Trainees

長島 駿 Shun Nagashima

Assistant and Part-timer

市川 理恵 Rie Ichikawa
小池 仁美 Masami Koike
松葉 ゆかり Yukari Matsuba