

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
4. RNAの質量分析

キーワード：

プロテオミクス、翻訳後修飾、RNA、タンパク質化学、質量分析、X線解析、構造生物学（1D, 3D）、アミノ酸分析

研究概要

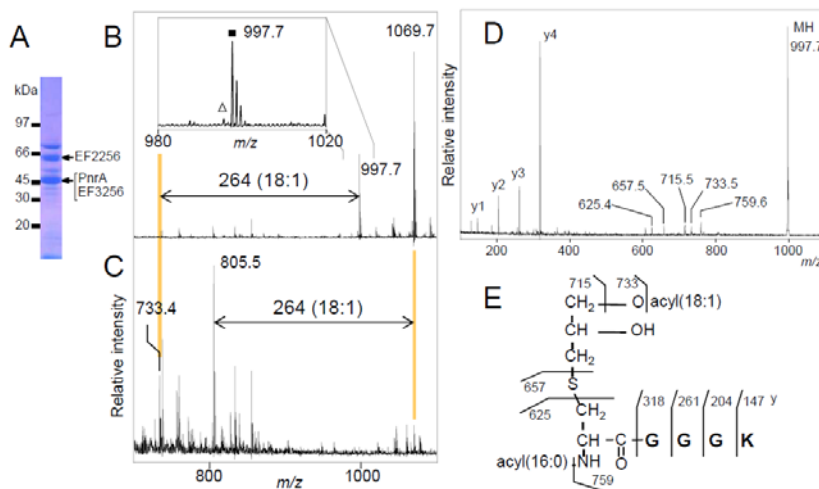
タンパク質は生命活動の中心となる分子であり、我々はこの構造を調べることで遺伝子と機能の相関を解明することを目的としている。最新のプロテオミクス技術の中でも特に翻訳後修飾解析に力を入れて開発を行っている。一般のLC-MS/MSベースのプロテオミクスでは、配列カバー率が低く翻訳後修飾を見逃している場合が多い。我々は、タンパク質全体の質量分析、カバー率を向上させたLC-MS/MS分析、アミノ酸組成分析を組み合わせることで、見落としの少ない翻訳後修飾解析を行う方法を確立した。さらに、播磨SPring-8を用いたタンパク質X線結晶解析の支援をしている。また、近年機能が注目されているRNA分子にも質量分析による構造解析を広げ、検索エンジンAriadneの開発を行った。

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，中山，渡邊）

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翻訳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、また活性を制御されている。この遺伝情報に直接記載されない、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構造解析への大きな要求がある。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. タンパク質を酵素消化断片化し網羅率の高い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. タンパク質を加水分解して、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、東京大学の浜本隆二助教と共同でヒストンメチル転移酵素によるメ



タンデム質量分析によるリポタンパク質の新規脂質修飾構造決定

チル化修飾部位を解析した。さらに、慶応大学の清水史郎講師と共同でカテプシンL2の糖鎖結合部位を決定した。また、慶応大学の清水史郎講師とは加えてC-マンノース化の修飾解析も行っている。(株)アミンファーマ研究所の五十嵐一衛千葉大名誉教授と共同で、脳梗塞以外の患者のアクロレイン化についての解析も進めている。加えて、プサン大学の李福律教授らと共同でリボタンパク質の解析を行い、グラム陽性菌のリボタンパク質には従来知られていなかった新規脂質修飾が広く存在することをタンデム質量分析により証明した。

昨年に引き続き教育のためのセミナーを企画し、第九回から第十回を開催した。これらのセミナーの結果は、バイオ解析チームのホームページ (<http://www.riken.jp/BiomolChar/log.html>) から見る事が出来る。

## 2. 生体分子の定量的解析法の開発 (益田, 鈴木, 堂前)

タンパク質の翻訳後修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御の研究などでは、翻訳後修飾の種類や修飾場所だけではなく、絶対量が重要である。我々は質量分析による定性的な解析と相補的に活用できるよう、超高感度アミノ酸分析法の開発を行っている。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に低分子のアミノ酸として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を用い、アミノ酸を蛍光検出することにより超高感度アミノ酸分析を実現している。また、多量に共存する未修飾アミノ酸と分離し、極微量の翻訳後修飾を検出するために、加水分解後のサンプルから修飾アミノ酸を含む画分のみを得るための前処理について検討を行った。

この超高感度アミノ酸分析によって、松本分子昆虫研究室の松本健専任研究員と共同でmRNA 分解に関与する細胞質mRNA-タンパク質複合体の構成要素の翻訳後修飾、九州大学生体防御医学研究所鶴木元香助教と共同で脱メチル化酵素基質タンパク質中の翻訳後修飾、東京工業大学の木賀大介准教授と共同で改変遺伝暗号を用いた合成タンパク質中の改変アミノ酸の定量を行った。また播磨研究所放射光システム生物学研究グループの新海暁男チームリーダーと共同でタンパク質-リボ核酸複合体中のサブユニット比を決定した。

## 3. 3次元構造に基づく構造生物学およびその関連技術の研究開発 (宮武, 堂前)

SPring-8は世界最高性能を誇る放射光施設であるが、放射光施設から遠方の研究者が限られたビームタイム中に最大限の測定を行うことは容易ではない。近年、特に結晶構造解析の対象が高難度化しており、多数の結晶を効率よく回折測定する必要性が高まっている。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基盤部と共同で、和光地区においてSPring-8遠隔測定支援システムを運用している。このシステムにより、あらかじめSPring-8に送付しておいた多数の結晶の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、高効率に行うことが可能になった。一方、和光地区におけるX線結晶構造解析の研究支援に際しては、X線結晶構造解析を希望する研究者の様々なレベルに応じて対応している。すなわち、回折データ測定のみを希望する場合、その後の回折データ処理まで希望する場合、または更にその後の構造解析やプレゼンテーション資料作成にも踏み込んで支援することが可能である。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にブレークスルーが必要とされている。そこでわれわれは、動的光散乱測定法と溶液循環サーキットを利用した新規なタンパク質結晶化装置の開発を、理研・産業界連携制度の予算的支援を受けつつ、民間企業と共同で行っている (日機装 (株) との共同開発)

## 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)は多くの場合RNA-タンパク質(RNP)複合体を形成し生体にとり重要な機能を果たしていることが明らかとなってきた。従来、これらのRNAを解析するためには、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、RNA機能に重要な役割を持つ転写後修飾の情報が多くの場合失われること、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質量データを核酸配列データベースに対して問い合わせる検索エンジン(Ariadne; <http://ariadne.riken.jp/>)を開始しアフィニティー精製したRNP複合体中の構成RNAをゲノム配列に対して検索し同定することが可能となっている。今年度は、この検索エンジンを改良し、周辺ソフトウェアを開発することで、この方法を普及するための基盤整備を進めた。

-----  
**Key Sentence :**

1. Support for characterization of biomolecules
2. Development and application of proteomics
3. Characterization of protein post-translational modifications
4. RNA mass spectrometry

**Key Word :**

proteomics, post-translational modifications, RNA, protein chemistry, mass spectrometry, X-ray analyzer, structural biology (1D, 3D), amino acid analysis

**Outline**

Protein is one of the most important molecules of the life and our purpose is to clear the correlation of a gene and functions by examining the protein structure. So, we have been developing the characterization methods of protein post-translational modifications (PTMs) in the latest proteomics technology.

In general LC-MS/MS based proteomics, there are many cases overlooking PTMs due to a low sequence cover rate.

We established the less oversight analysis methods of PTMs by the combination of mass spectrometry of the whole proteins, the LC-MS/MS analysis that improved a cover rate, and amino acid composition analysis. Furthermore, we support the protein X-ray crystallographic analysis using SPring-8, Harima. In addition, we widened structure analysis by the mass spectrometry to the RNA molecule which a function attracted attention in late years. And we developed RNA MS search engine Ariadne.

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

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(LC)-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 analyzed protein methylation sites by histone lysine methyltransferases (Collaboration with Dr. Hamamoto, The University of Tokyo). And we also determined N-glycosylation site of cathepsin L2 and have been analyzed C-mannosylation of proteins (Collaboration with Dr. Shimizu, Keio University). Furthermore, we have analyzed acrorein binding site of proteins in patients (Collaboration with Dr. Igarashi, Amine Pharma Research Institute Co.,Ltd.). We and professor Lee of Pusan National University have determined directly novel lipidation structures including *N*-monoacyl-*S*-monoacylglyceryl structure in low-GC Gram positive bacterial lipoproteins.

We have held the Chemical Biology Core Facility Educational Seminar Series. The 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> seminar about mass spectrometry for biologist were held for introduction of recent mass spectrometry.

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

Quantification of post-translational modifications (PTMs) of proteins is necessary for epigenetics or proteomics research. To complement qualitative analyses by mass spectroscopy such as determination of positions or kinds of PTMs, we have developed ultra-sensitive amino acid analysis. Amino acid analysis, which is independent on the sequence of amino acids in proteins and is based on degradation of proteins or 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). We examined pre-treatment of hydrolyzed samples to isolate the modified amino acids from large amount of other normal non-modified amino acids.

Using this system, we quantified PTMs of mRNA-protein complex known as P-bodies which was associated with protein arginine methyltransferases (joint-research with Dr. Matsumoto of Cell. Biochem. Lab.) and of protein substrate of demethylating enzyme (joint-research with Dr. Unoki of Kyushu Univ.). We also proved that synthesized proteins contained amino acids introduced by artificial genetic codes, which suggests the existence of a limited set of genetic codes in ancient times (joint-research with Dr. Kiga of Tokyo institute of technology). Subunit ratio of protein-RNA complexes was determined by gel chromatography in combination with amino acid analysis (joint-research with Dr. Shinkai of Func. Biol. I. Res. Team).

## **3. Studies on structural biology and its related technologies (Miyatake, Dohmae)**

SPring-8 is the most excellent synchrotron facility in the world, but researchers on the off-site often face difficulties to collect data at the maximum efficiency in the limited beam-times. The researchers must collect and validate quality of a lot of data set, especially in the challenges for difficult crystals. Thus our team and the division of synchrotron radiation instrumentation (SPring-8 center) together built a mail-in data collection system in Wako campus area for remote accumulation of the diffraction data at SPring-8. We have been carried out some structural biological collaboration with other laboratories in Wako campus. We are ready to support the users from data collection to data analysis, prep ration of presentations and more. On the other hand, crystallization of target proteins is one of the most difficult processes for the recent X-ray crystallography, so that automated device for macromolecular crystallization is strongly desired. In this point of view, we have developed a novel device for protein crystallization based on dynamic light scattering in corporation with a company under the financial support of the RIKEN Collaboration Center Program (in collaboration with Nikkiso Co., Ltd.).

## **4. Identification and characterization of RNA by mass spectrometry (Nakayama, Akiyama, Koike)**

We are developing 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. We have developed a database search engine, Ariadne, which 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. To expand the identification capability of Ariadne to larger DB such as human genome, we have improved the algorithm in the second step. As a result of the improvement, the method allows to identify RNA components simultaneously from mixtures of RNAs by searching human genome.

***Principal Investigator***

堂前 直 Naoshi Dohmae

***Research Staff***

宮武 秀行 Hideyuki Miyatake

中山 洋 Hiroshi Nakayama

渡邊 剛 Kowashi Watanabe

鈴木 健裕 Takehiro Suzuki

益田 晶子 Akiko Masuda

秋山 美沙紀 Misaki Akiyama

小池 仁美 Masami Koike

***Assistant and Part-timer***

松葉 ゆかり Yukari Matsuba

川田 昭奈 Akina Kawata

久世 みその Misono Kuze

***Visiting Members***

柘植 知彦 Tomohiko Tsuge

森 博幸 Hiroyuki Mori

菅澤 薫 Kaoru Sugasawa

番戸 博友 Hirotomo Banko

濡木 理 Osamu Nureki