

バイオ解析チーム

Biomolecular Characterization Team

チームリーダー 堂前 直
DOHMAE, Naoshi

バイオ解析チームは、生命現象の解明に向け、生体成分構造解析法の開発や構造解析の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、活性と遺伝子との対応が見つかる。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う。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になりつつある。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、古典的な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に取り組んでいる。さらに、気相断片化反応を用いた生体分子の構造解析法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、600MHz NMRや分析用超遠心分析装置を管理し共用できるように整備している。

1. タンパク質構造解析法の開発と応用

(1) 生体分子の翻訳後修飾を含めた詳細な構造解析 (堂前 直、中山 洋、鈴木 健裕*1、西村 友枝*2)

タンパク質は20種のアミノ酸が並んだポリマーであり、その並び順を遺伝子が規定している。しかし、多くのタンパク質は遺伝情報どおりに翻訳された後に何らかの修飾を受ける。ポストゲノムシーケンス時代のタンパク質構造解析への大きな期待はこの翻訳後修飾に関する知見の蓄積であろう。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大きな要求がある。これらの修飾部位解析を含めた詳細精密構造解析はポストゲノムの重要な課題の一つと考えられる。

翻訳後修飾を解析するため、昨年度開発した超高感度なアミノ酸組成分析法を利用して、プロット膜上のタンパク質を塩酸加水分解し、修飾アミノ酸やアミノ糖の検出を試みた。標準タンパク質である卵白アルブミンからは、ホスホセリンとグルコサミンを検出することができた。これは、卵白アルブミンにセリンのリン酸化が生じていること、及びN型糖鎖が存在することを示しており、以前の報告と一致した。このようにプロット膜上に転写された微量タンパク質からアミノ酸分析法を利用して翻訳後修飾解析が行えることを示した。

翻訳後修飾の解析は、アミノ酸組成分析のみならず、質量分析法やシーケンス分析などをあわせて総合的に行うことで、未知の試料の解析を行っている。今年は、東京都老人総合研究所の遠藤 玉夫研究部長と共同で、筋ジストロフィー病に関連するタンパク質、ジストロフィンの糖鎖修飾作用機序解明のために、モデルペプチドを用いて、糖鎖の修飾を調べた。また、吉田化学遺伝学研究室の吉田稔主任研究員らと共に分裂酵母タンパク質の網羅的翻訳後修飾解析を開始する準備を始めた。さらに昨年に引き続いて中央研究所丑田ユニットリーダーと共にミズクラゲ由来の新規有用物質の構造解析を行いヒトのムチンと大変類似した新規のムチンであることを示した。さらに、数種類のクラゲ由来のムチンについても解析した。

(2) 生体分子の定量的解析法の開発 (中山 洋、廣谷 直子*2、堂前 直)

全タンパク質の発現定量解析に質量分析法を用いた同位体希釈法への取り組みが数多くなされている。しかし、たとえ現在の技術でペプチドの定量が出来たとしても、タンパク質からペプチドへの変換(つまりプロテアーゼによるタンパク質の消化)が再現的、定量的に行えないと意味を持たなくなる。当チームでは、この段階を自動で行なうことで再現性の高いデータが得られると考え、自動消化装置の開発に当たってきた。昨年に引き続き、電気泳動から調製した試料についてはラピッドエンジニアリングチーム橋内氏と共同でタンパク質プロセッシングロボットの開発を進め、ハードウェアの改良やプロトコルの作成を進めた。また、混合物試料については、タンパク質をビーズ(固相)に吸着させ、消化を行う方式を取る装置の開発をKYAテクノロジーズと共同で行った。開発された装置を用いて標準タンパク質の消化条件を検討し、界面活性剤の存在が消化を助けることを発見した。これらについて、特許申請を行い、開発した装置に関してKYAテクノロジーズを通して商品化できるよう準備を進めている。

アミノ酸組成分析法による極微量タンパク質の絶対定量法については、クロマトグラフィーで精製した微量なタンパク質を再クロマトグラフィーしてから加水分解してアミノ酸組成を求めることで、クロマトグラフィーの回収率を算出し元の試料の絶対量を測定する方法を開発した。これを東京大学井原教授らのグループと共にアルツハイマー病の原因因子であるβタンパク質の生成機構の解明に応用した。βタンパク質は前駆体であるAPPから2箇所酵素消化で切り出されるが、2つ目のガンマ部位での切断の際、さらに短いC末端断片が生成されることを以前我々が報告した。このC末端断片はいくつかの種類があり、各種のC末端断片とアルツハイマー病の発症しやすい形の1-42βタンパク質とそうでない1-40βタンパク質との存在比を定量してC末端断片の長さやβタンパク質の長さの間の関連を調べた。

2. 質量分析法の基盤技術開発

(1) 気相断片化反応を用いた生体分子の構造解析法 (中村 健道)

質量分析法を用いた構造解析には、凝縮相(液相または固相)で解析対象となる分子に対して行った断片化や誘導体化等の反応生成物の分子量測定により構造情報を得る間接的方法と、質量分析装置内(気相)での断片化反応(フラグメンテーション)を利用して構造情報を得る直接的方法がある。直接的方法是感度や迅速性の面で大きな潜在的な可能性を有するが、生体分子の解析における利

用は比較的限られたものとなっている。理由の一つは、揮発性低分子有機化合物に対する電子イオン化質量スペクトルにおいてはフラグメンテーションに関する知識と理論が体系化されているのに対し、不揮発性生体分子に用いられるソフトイオン化とタンデム質量分析法 (MS/MS) の組合せにおいてはスペクトルは条件依存的であり体系化が進んでいない点にある。また、気相で大きな分子を選択的かつ高効率に断片化する方法が無いことが、タンパク質等大きな生体分子の直接解析を阻んでいる。これらの問題に対して、二つの方向から取り組んでいる。低分子の構造解析に関しては、断片化反応に影響を及ぼすスペクトル測定条件を精査し、精密質量測定や安定同位体標識を併用しながらフラグメントイオンの詳細な帰属を行い、確立されているフラグメンテーション理論との関連付けと外挿によって反応の体系的な理解と構造情報の検証を試みる。このアプローチを応用し、種々の分子化合物の構造解析を実施した。一方、選択的かつ高効率な断片化法の開発に向けて、前年度に引き続き、FT-ICR MS 装置のイオン源部六重極イオンリザーバー内への蓄積に伴う時間依存的断片化 (多重極蓄積支援解離) に関する検討を行った。ナノエレクトロスプレイエミッターからの六重極イオンリザーバー内へのイオンの導入を測定パルス系列に同期して制御できるように改造したイオン源を用い、多重極蓄積支援解離におけるイオンの活性化について解析した。結合開裂の閾値が既知である温度計分子を用いての断片化反応条件検討の結果、多重極蓄積支援解離においては、0.4 eV 程度の比較的小さな活性化エネルギー差を識別して、閾値の低い経路の生成物を選択的かつ定量的に生成できることが明らかとなった。

3. 生命科学への応用

(1) タンパク質切断・高次構造変換による細胞死・細胞分化の制御 (森島 信裕, 中西 慶子*³)

多細胞生物の個体中において細胞は増殖、分化、死のいずれかの運命をたどる。これらの運命の選択は個体全体では調和が保たれている必要があり、どれか一つでも異常に過多となったり過少となってしまうと個体の健康や生存が脅かされる。私たちは生体分子、特にタンパク質の挙動によって細胞運命の調和が支えられている機構を明らかにすることを研究目的としている。現在は特に細胞死 (アポトーシス) と細胞分化におけるタンパク質の挙動に注目している。これまでミスフォールディングやアンフォールディングしたタンパク質が小胞体に蓄積する状態、すなわち「小胞体ストレス」がカスパーゼ・プロテアーゼ族を活性化し、これが基質タンパク質群を切断してアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。小胞体ストレス誘導性アポトーシスを引き起こすカスパーゼ族の活性化にはイニシエーターカスパーゼの一つ、カスパーゼ 12 が小胞体ストレスによって特異的に起動することが重要であることを示している。本年度は小胞体ストレス誘導性アポトーシスが発生過程にあるマウス正常胚で起こっていることを見いだした。マウス 13.5 日胚中で筋組織の形成が始まった領域において小胞体ストレスが生じていること、小胞体ストレスによってカスパーゼ 12 が活性化し、アポトーシスが起きていることを見いだした。同様の結果は培養筋分化系においても得られた。筋形成時のアポトーシスは一世紀近く前に観察されていたが、その誘導機構及び実行機構が初めて明らかとなった。

*¹特別任期制職員, *²協力技術員, *³ 協力研究員

This team is engaged in structural characterization of biological molecules to support biological science. Our activities include mass spectrometry, protein chemical analyses, ultracentrifugal analysis and nuclear magnetic resonance spectrometry. We are interested in developing new characterization methods for biological molecules.

1. Biomolecular characterization

(1) Development and Application of Analysis Methods for Structural Detail on Biological Molecules.

Direct analysis of modifications 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. We have been developing the analytical method for post-translational modifications by a highly sensitive amino acid analysis method. Using this method, we have succeeded in detecting phospho-serine and glucosamine residues in an acid hydrolysate of ovalbumin, a protein that has phosphorylation and N-glycosylation, electro-blotted onto a PVDF membrane.

We have applied post-translational modifications analysis combined with mass spectrometry and chemical methods to several cases. For example, O-glycosylation sites of α -dystroglycan peptide and of mucins from some kinds of jellyfishes were determined. And we are preparing to start modificomics project.

(2) Development of Quantitative Analysis of Biomolecules.

However mass spectrometry could detect peptides quantitatively using isotopic diluting method, a protein is difficult to convert to peptides quantitatively. So, we have been developing automate protein digestion system to quantitative protein detection by liquid chromatography - mass spectrometry. We start to develop two systems that are in-gel digestion system and in-solution digestion system.

We have also applied the highly sensitive amino acid analysis method to detect a protein quantitatively. Comparing the species specific amount of C-terminal fragment (CTF) of β -amiloid precursor protein using this method, the relationship of the length between CTF and β -amiloid protein was determined. It is an important observation to realize mechanism of γ -secretase.

2. Fundamentals of mass spectrometry

(1) Gas-phase Chemistry for Structural Characterization of Biomolecules

Mass spectral fragmentations of non-volatile biomolecules are highly dependent on the acquisition conditions unlike those of volatile organic compounds in classical electron ionization mass spectrometry. Therefore, in characterization of small biomolecules, we examine mass spectra acquired under a wide-range of conditions and use accurate mass measurements and stable isotope labeling for assigning the fragment ions. Based on the confident spectral assignments, it was possible to understand the fragmentation of biomolecules by correlating that to the gas-phase chemistry established in classical mass spectrometry. On the other hand, characterization of large biomolecules by mass spectrometry is currently limited partly because the lack of efficient dissociation methods with high selectivity. A promising approach for the selective dissociation, multipole-storage-assisted dissociation, was investigated. A 0.4 eV difference in dissociation threshold was shown to be sufficient for selecting lower energy fragmentation pathways.

3. Application for life science

(1) Control of cell fate by misfolding or unfolding of proteins

Endoplasmic reticulum (ER) stress activates caspase-12, triggering the ER stress-specific cascade for implementation of apoptosis. Although myoblast apoptosis was first observed nearly a century ago, the cause of apoptosis and the mechanism that initiates caspase activity during differentiation were largely unknown. We found that, during muscle fiber formation, both in cell culture and in mouse embryos, the ER stress response is activated, resulting in activation of caspase-12 and apoptosis of a fraction of the cells.

Staff

Head

Dr. Naoshi DOHMAE

Members

Dr. Nobuhiro MORISHIMA

Dr. Takemichi NAKAMURA

Dr. Yasuhiro ISOGAI

Dr. Hiroshi NAKAYAMA

*Dr. Takehiro SUZUKI*¹*

*Dr. Keiko NAKANISHI*³*

*Ms. Naoko IWASAKI*²*

*Ms. Tomoe NISHIMURA*²*

*¹Special Fixed Term Contract Employee *²Contract Technical Scientist *³Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Hiroyuki OSADA (Antibiotics Laboratory, DRI)

Dr. Hideki KAKEYA (Antibiotics Laboratory, DRI)

Dr. Yoko NAGUMO (Antibiotics Laboratory, DRI)

Dr. Hiroo FUKUDA (Morphogenesis Research Group, PSC)

Dr. Koh AOKI (Laboratory for Communication Mechanisms Team, PSC)

Mr. Tokuzi KITSUNAI (Rapid Engineering Team, ADSC, DRI)

Dr. Kiminori USHIDA (Eco-Soft Materials Research Unit, DRI)

Dr. Akiko MASUDA (Eco-Soft Materials Research Unit, DRI)

Dr. Soichi KOJIMA (Molecular Cellular Pathology Research Unit, DRI)

Visiting Members

Tomohiko TSUGE (Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Nakai Y., Shiratsuchi A., Manaka J., Nakayama H., Takio K., Zhang J., Suganuma T., and Nakanishi Y.: "Externalization and recognition by macrophages of large subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in apoptotic cells", *Exp. Cell Res.* **309**, 137-148 (2005). *

Nakanishi K., Sudo T., and Morishima N.: "Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development", *J. Cell Biol.* **169**, No. 4, pp. 555-560 (2005). *

Aoki K., Suzui N., Fujimaki s., Dohmae N., Sakakibara K., Fujiwara T., Hayashi H., Yamaya T., and Sakakibara H.: "Destination-selective long-distance movement of phloem proteins", *Plant Cell* **17**, No. 6, pp. 1801-1814 (2005). *

Kodama K., Fukuzawa S., Nakayama H., Kigawa T., Sakamoto K., Yabuki T., Matsuda N., Shirouzu M., Takio K., Tachibana K., and Yokoyama S.: "Regioselective carbon-carbon bond formation in proteins with palladium catalysis; New protein chemistry by organometallic chemistry", *ChemBioChem: A European Journal of Chemical Biology* **7**, No. 1, pp. 134-139 (2006). *

Katayama Y., Hashimoto K., Nakayama H., Mino H., Nojiri M., Ono T., Nyunoya H., Yohda M., Takio K., and Odaka M.: "Thiocyanate hydrolase is a cobalt-containing metalloenzyme with a cysteine-sulfinic acid ligand", *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 728-729 (2006). *

(総説)

Morishima N.: "Control of cell fate by HSP70: more than an evanescent meeting", *J. Biochem.* **137**, 449-453 (2005).

(その他)

中村健道: "生体分子のフラグメンテーション イオンの活性化と解離: 基礎から新たな展開へ", *ファルマシア* **41**, No. 11, pp. 1071-1075 (2005).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kawano Y., Nojiri M., Odaka M., Nakayama H., Tsujimura M., Takio K., Endo I., and Kamiya N.: "Photoactivation process observed around the reaction center of photoreactive nitrile hydratase", 19th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Pick E., Tsuge T., Dohmae N., and Wei N.: "DDB1-DET1 complex: At the crossroad between ubiquitin mediated enzymes", 2005 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on The Ubiquitin Family, Cold Spring Harbor, USA,

Apr.-May (2005).

Tsuge T., Dohmae N., Wei N., and Oka A.: "Revealing the novel regulation of the COP9 Signalosome (CSN)", 16th International Conference on Arabidopsis Research, Madison, USA, June (2005).

Nakamura T. and Takeuchi T.: "Characterization of slow ion heating in multipole storage assisted dissociation and related processes", 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, (American Society for Mass Spectrometry), San Antonio, USA, June (2005).

Fujibayashi A., Ohtani M., Dohmae N., Takio K., Yamakami M., Fukuda M., Waguri S., Yoshimori T., and Sekiguchi K.: "Potential role of human RME-8 homologue in membrane traffic through early endosomes", 58th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Saitama, June (2005).

Morishima N., Nakanishi K., and Dohmae N.: "Involvement of BH-3 only proteins in initiation of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation", 2005 Cold Spring Harbor Meeting on Programmed Cell Death, Cold Spring Harbor, USA, Sept. (2005).

Nakanishi K., Dohmae N., and Morishima N.: "Physiological role of endoplasmic reticulum stress signaling that mediates apoptosis during muscle development", 2005 Cold Spring Harbor Meeting on Programmed Cell Death, Cold Spring Harbor, USA, Sept. (2005).

Kodama K., Fukuzawa S., Nakayama H., Kigawa T., Sakamoto K., Yabuki T., Matsuda N., Shirouzu M., Takio K., Yokoyama S., and Tachibana K.: "Site-specific functionalization of proteins with palladium-catalyst", International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2005), Honolulu, USA, Dec. (2005).

Arimoto Y., Mori S., Doumae N., Negishi H., Yoshida T., Teraoka T., and Arie T.: "Differential Analysis of Proteins from Pathogenic and Pathogenic-deficient Strains of *Fusarium oxysporum* f.sp.conglutinans using 2-Dimensional Electrophoresis", International Society of Southeast Asian Agricultural Sciences (ISSAAS) International Congress 2005, Hanoi, Vietnam, Dec. (2005).

Iwasaki N., Dohmae N., and Nakayama H.: "Integration of solid-phase microreactor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for proteomics", 20th International Symposium on MicroScale Bioseparations, Amsterdam, The Netherlands, Jan. (2006).

(国内会議)

中村健道: "ゆっくりした活性化による選択的高収率断片化: 生体分子解析における可能性", 第53回質量分析総合討論会, (日本質量分析学会), さいたま, 5月 (2005).

中村健道, 叶直樹, 浅見綾, 本田香織, 長田裕之: "低分子のラベル化における多様性: LC/MS/MSによる解析", 第53回質量分析総合討論会, (日本質量分析学会), さいたま, 5月 (2005).

中村健道: "フラグメンテーションと MS/MS 解析の基礎", 第32回 BMS コンファレンス (BMS2005), (日本質量分析

- 学会), 函館, 7月(2005).
- 中村健道: “蛋白質複合体消化物の解析における定量的評価: 安定同位体を用いない LC/FT MS によるアプローチ”, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の質量分析: 安定同位体標識による新たな展開」, 吹田, 7月(2005).
- 堂前直, 西村友枝: “アミノ酸分析を用いた翻訳後修飾の解析”, 日本ヒトプロテオーム機構第3回大会, 横浜, 8月(2005).
- 叶直樹, 本田香織, 浅見綾, 清水史郎, 室井誠, 長田裕之, 中村健道, 近藤恭光, 雨宮智之, 田代英夫, 京基樹: “化学遺伝学研究用ツールとしての低分子化合物の光クロスリンク反応: 低分子マイクロアレイと低分子アフィニティービーズへの適用”, 第47回天然有機化合物討論会, 徳島, 10月(2005).
- 堂前直, 西村友枝: “Detection of Post-Translational Modifications on PVDF Membrane”, 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月(2005).
- Iijima Y., 中山洋, 堂前直, 辻村昌也, 養王田正文, 尾高雅文: “Function of Cys-SOH modification in Fe-Type Nitrile Hydratase”, 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月(2005).
- 西村友枝, 堂前直: “Trial of Quantification of Protein Phosphorylation on PVDF Membrane”, 第78回日本生化学会大会, 神戸, 10月(2005).
- 小幡裕希, 中山祐治, 笠原広介, 松田大介, 久家貴寿, 池田喜久子, 堂前直, 山口直人: “Src型チロシンキナーゼ Lyn のキナーゼドメインが関わる細胞内トラフィックの解析”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 柘植知彦, 安喜史織, 堂前直, Menon S., Wei N., 岡穆宏: “環境情報とカタチ作りとを結ぶ COP9 シグナロソームの新規制御メカニズムの解析”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 森島信裕, 中西慶子, 堂前直: “小胞体ストレスアポトーシスにおけるカパーゼ12とBH3-onlyタンパク質の役割”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 中西慶子, 堂前直, 森島信裕: “生理的小胞体ストレスシグナルは筋分化を制御する”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 天野美美, 福本泰典, 堂前直, 横井雅幸, 花岡文雄: “分裂酵母 Dcb1 と相互作用する新規 WD40 リピード蛋白質の機能解析”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 福本泰典, 天野美美, 堂前直, 横井雅幸, 花岡文雄: “分裂酵母 Dcb1 複合体の単離と解析”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 古川亜矢子, 堂前直, 花岡文雄, 鳥越秀峰: “分裂酵母テロメア1本鎖DNA結合蛋白質 Pot1 とテロメア1本鎖DNA領域との特異的相互作用”, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月(2005).
- 古川亜矢子, 澤根美加, 古海靖子, 中元佑輔, 堂前直, 花岡文雄, 鳥越秀峰: 第28回日本分子生物学会年会ワークショップ「テロメア分子生物学の新視点: 分子機構から高次機能制御へ」, 福岡, 12月(2005).
- 鞆達也, 鈴木健裕, 平野恵美, 土屋徹, 宮下英明, 堂前直, 三室守: “Chlorophyll d の可逆的な酸化還元反応”, 第47回日本植物生理学会年会, つくば, 3月(2006).
- 鈴木健裕, 榎並勲, 大田尚孝, 堂前直: “Synechocystis sp. PCC 6803 における塩, 浸透圧ストレス応答に対するプロテオーム解析”, 第47回日本植物生理学会年会, つくば, 3月(2006).
- 榎並勲, 藤利彰彦, 鈴木健裕, 堂前直, 大田尚孝: “表在性 PsbO 蛋白質の PSII 膜蛋白質への静電的結合に関与するリジン残基”, 第47回日本植物生理学会年会, つくば, 3月(2006).