

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、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、プロテインシークエンサー、生体高分子用のX線回折装置や600MHz NMR、さらに分析用超遠心装置を管理し共用できるように整備しているほか、さらに播磨研究所研究技術開発室と連携してSpring-8のメールインシステム和光地区の窓口業務を開始した。

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、鈴木 健裕*1、益田 晶子*3、中山 洋、西村 友枝*2)

タンパク質は遺伝情報を写し取ったmRNAを翻訳して生合成される。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は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に求められる大きな役割である。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精密構造解析は大変困難な課題のひとつである。

AQC誘導体化を利用した超高感度なアミノ酸組成分析法を利用したによる翻訳後修飾の解析では塩酸加水分解に耐性のあるリジン残基のメチル化をターゲットにして行い、カルモジュリンなど以前に報告のあるリジンのメチル化を、電気泳動後の試料をPVDF膜に転写して検出することができた。メチル化はひとつのリジン残基にモノ、ジ、トリの3種類が生じるが、これらのうちジ、トリメチルリジンはAQC誘導体化物がひとつ1種類のため定量の可能性がある。また、モノメチルリジンはモノAQC、ジAQCの二つの誘導体が生じるため、今後これらの取り扱いを検討する必要がある。また、遊離のリジン残基を標識して、アセチル化などの塩酸加水分解不安定な修飾の有無を確認する方法も検討したが、こちらはタンパク質では標識率が十分に上がらず、更なる検討が必要とされた。

翻訳後修飾の解析は、昨年引き続き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、ジストロフィンのモデルペプチドのマンノース転移部位を同定した。また、長田抗生物質研究室の清水史郎研究員と共同でヘパラーゼのジスルフィド架橋及びシステイン残基の修飾を決定した。BSI細胞機能探索の筒井秀和研究員と共同で新規タンパク質の部分アミノ酸配列の決定を行った。また、昨年より開始した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、いくつかのタンパク質のアセチル化部位を解析し、今後の網羅的解析の基盤を作った。

(2) 生体分子の定量的解析法の開発 (中山 洋、益田 晶子*3、秋山 美沙紀*4、堂前 直)

タンパク質を分析的な手法をもちいて同定する場合には、取り扱いの難しいタンパク質ではなく酵素消化ペプチドとして取り扱うことが一般的である。この方法で同定と併せてタンパク質量も出来れば多くの生物化学的研究で有用である。原理的には消化ペプチドを同位体希釈法などをもちいて定量的に分析することで元のタンパク質を定量することが可能である。しかし、実際には(1)タンパク質ごとおよびタンパク質内の部位ごとの酵素消化が均一でないこと、(2)酵素消化ペプチドの回収率が低いこと、から酵素消化ペプチドをもちいたタンパク質の定量は大変難しく、一般化されていない。

私達はほぼ全てのタンパク質に適用可能な一般的なタンパク質試料調製法を開発するためのプラットフォームとなる自動化装置をラピッドエンジニアリングチーム橋内氏と共同で開発してきた。昨年度、電気泳動で分離したタンパク質を消化する装置の製作と動作テストを行った。今年度はさらにこの装置をもちいて一般性の高いプロトコルの開発を行った。ゲル内でのタンパク質消化法は多くの報告があり、自動化装置も市販されているが、回収率を定量的に見積もることが困難なため決定的な方法は見出されていなかった。私達は試料ペプチドイオン強度を当チームで開発したペプチドスタンダード由来のピーク強度と比較することで各工程を定量的に評価し、ゲルへの酵素の吸収、ゲルからの消化ペプチドの回収工程を改良した。これらの改良により従来自動化装置では困難だった銀染色タンパク質(10ng)の同定が可能となり、各ペプチドの回収率も従来法と比較して有意に向上した。次に、細胞抽出液をもちいてその一般性について評価した。酵素添加時にペプチドスタンダードを一定量添加することで、設定した感度、MS/MS数が保たれていることを担保しながら分析することが可能となった。

タンパク質を質量分析と同位体希釈法を用いて定量する試みがあるが、このためには、タンパク質からペプチドへ定量的に変換する必要がある。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ス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。

ロボットについて中山分

(3) 高次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 秀行、堂前 直)

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、和光地区にメールインシステムを構築した。メールインシステムにより、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、メールイン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(フロンティア研究技術開発・支援チームとの共同研究)。

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)

生体分子の構造解析における質量分析装置内(気相)での断片化反応(フラグメンテーション)の利用は比較的限られたものにとどまっており、その潜在的可能性は十分には生かされていない。一つの課題は、生体分子の多様さとそれらに対して用いられる質量分析法の多様さが相俟って、フラグメンテーションに関する知識と理論の体系化が進んでいない点にある。この問題に対し、二つの方向からアプローチしている。すなわち、生体分子のイオン化によって生成する偶数電子イオンの断片化を、i) 直接振動励起状態に導き断片化する方法(CID法等)と ii) 電子捕獲等により奇数電子イオンに導き断片化する方法(ECD法等)に大別し、それぞれの特徴に立脚した解析法を確立していく。前者においては、観測されるフラグメンテーションがイオン化法、励起法、測定の時間枠それぞれに依存することが体系的理解の障害となっているが、これを解決するため、閾値エネルギー解離質量分析法の開発を行なっている。本法では、エレクトロスプレイ法等により生成したイオンを、緩和な振動励起状態としてイオントラップ中に一定時間保ち、最低閾値エネルギー反応経路の生成物へと選択的に導く。これにより、構造特異的な断片化反応の閾値エネルギーに基づく体系的解析が可能となる。フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析装置のイオン源部六重極イオンリザーバーをイオントラップとして用いた予備的な実験では、0.4 eV 程度の閾値エネルギー差を識別可能であった。閾値エネルギー近傍での解離反応を再現性よく誘起し、同時に実験条件と熱化学パラメーターとの関連付けを容易にするため、四重極イオントラップの改造によりトラップ加熱型の反応装置を試作し、閾値エネルギー断片化について検討を行った。一方、ECD等の奇数電子イオンの生成に基づく断片化法においては、測定条件自体は概ね固定的であるが、不對電子の関与によって起こりうる多彩な反応に対する理解がまだ不十分である。システイン残基を含むペプチドや複合型のN-結合糖鎖を含むペプチドのECDスペクトル中に現れるフラグメントイオンの帰属について精査した結果、ECDの発見者らにより提唱されている非エルゴード機構のみで全てのフラグメンテーションを説明することは困難であり、ECDによる反応には複数の機構が関与している可能性が示唆された。

(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。直接的方法は感度や迅速性の面で大きな潜在的可能性を有するが、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*)

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。私たちはタンパク質の挙動によって細胞運命が決定される機構について研究を行っている。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切断や高次構造の変化に注目している。前年度までに、小胞体内でミスフォールディング、アンフォールディングしたタンパク質が蓄積した状態(小胞体ストレス)が正常な筋分化過程で生じていることを示唆する結果を得た。小胞体ストレスは一部の筋芽細胞においてはプロテアーゼの活性化を誘導してアポトーシスを引き起こしているが、分化過程を進行する筋芽細胞においても同様にストレスが発生していた。筋分化において小胞体ストレスシグナルが果たす役割についてさらに検討するため、小胞体ストレス・センサータンパク質の活性化を抑制する薬剤を筋芽細胞に加えたところ、分化過程におけるアポトーシスが抑制されるとともに筋分化も起こらなくなった。一方、小胞体ストレスを増大させる薬剤を加えると分化過程におけるアポトーシスの促進と筋分化効率の上昇が見られた。以上のように小胞体ストレスまたはそのセンサー系が発するシグナルが筋分化過程に対してポジティブな効果を持つことが示唆された。

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, *4派遣職員

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 Analytical Methods for Structural Details on Biological Molecules

Direct analysis of modifications of amino acids 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 pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). We have succeeded in detecting protein methylation in an acid hydrolysate of calmodulin, a protein that has tri-methyl lysine residue, electro-blotted onto a PVDF membrane. We have applied post-translational modifications analysis combined with mass spectrometry (MS) and chemical methods to several cases. For example, O-glycosylation sites of α -dystroglycan peptide and disulfide bond pair of heparanase were determined. Furthermore we have started a glycomics project. Some acetylation site of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* proteins were determined using liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS).

(2) Development of Quantitative Analysis of Biomolecules

Whereas mass spectrometry could detect peptides quantitatively using isotopic diluting method, a protein is difficult to convert to peptides quantitatively. So, we have been developing an automated protein digestion system for quantitative protein detection by liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS). We have developed a digestion system.

Analysis of proteolytic peptides, a common means for the identification of the original protein by analytical techniques, can also be useful for the quantitation of the protein. However, there are two difficulties: incompleteness of proteolysis and low-recovery of the resulting peptides.

We have developed an automated processing system for proteolysis of gel-separated proteins. The system includes a robotic arm, pipettors, nanospotter and incubators. Using the system, silver-stained protein (10 ng) could be quantitatively processed and identified by LC-MS/MS. Furthermore, the system was tested using whole cell extracts of some bacteria.

(3) Studies on Structural Biology and Its Related Technologies

Researchers far from synchrotron facilities often feel it stressful to visit to the facilities for measurement of X-ray diffraction measurement. Thus we and the division of synchrotron radiation instrumentation together built a mail-in system in Wako campus area for remote accumulation of the diffraction data connection at SPring-8. In addition, we provide purified protein samples to the researchers in Wako area in cooperation with SR system biology research group. On the other hand, recent structural biology mostly suffers from crystallization of target proteins is indispensable to recent structural biology in the process of structural studies, that because so that any effective techniques of crystallization are strongly desired. In this point of view, we have developed novel methods of protein crystallization based upon nano-technologies.

2. Fundamentals of mass spectrometry

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

Systematic understanding of the experimental and theoretical aspects on gas-phase ion chemistry is a key to full exploitation of mass spectral fragmentations in structural characterization. Long-lived even-electron biomolecular ions are often fragmented by i) leading them into vibrationally excited state (e.g. collision-induced dissociation) or ii) converting them into relatively fragile odd-electron ionic species (e.g. electron capture dissociation). In the first approach, systematic understanding of the chemistry is thwarted since fragmentations are highly dependent on the ionization methods, the excitation conditions, and the timeframes of observation. To deal with the problem, we are exploring threshold-energy dissociation mass spectrometry, in which electrospray-generated ions are stored in an ion trap with gentle excitation to allow them to fragment via structure-dependent lowest threshold-energy pathways. In the second approach, one of the current limitations is the poorly understood chemistry of the odd-electron biomolecular ions. The ECD mass spectra of the peptides containing cysteine-residues and/or complex-type N-glycosyl chains were examined in detail to shed light on the origins of fragment ions. The observed fragment ions were not fully explainable based on the nonergodic mechanism and the involvement of multiple mechanisms was suggested. 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

The ER stress response is activated during muscle fiber formation, resulting in activation of caspase and apoptosis of a fraction of the cells. Inhibition of ATF6 activation blocks both apoptosis and myotube formation in culture models, suggesting that ER stress or ER stress signaling is required for these processes. Treatment with ER stress-inducers enhanced apoptosis during myoblast fusion, while the surviving cells efficiently formed myofibers. ER stress exerts a positive effect on myofiber formation, possibly mimicking the action of signals that drive apoptosis and differentiation in vivo. 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 ISOGAIHideyuki MIYATAKE

Dr. Hiroshi NAKAYAMA

Dr. Akiko MASUDA *³

Dr. Takehiro SUZUKI*¹

Dr. Keiko NAKANISHI*³

Ms. Naoko IWASAKI*²

Ms. Tomoe NISHIMURA*²

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

in collaboration with

Dr. Minoru YOSHIDA (Chem. Genet. Lab.)

Dr. Akihiro ITO (Chem. Genet. Lab.)

Dr. Akihisa MATSUYAMA (Chem. Genet. Lab.)

Dr. Hiroyuki OSADA (Antibiotics Antibiot. Lab.oratory, DRI)

Dr. Siro SimizuSIMIZU (Antibiot. Lab.Antibiotics Lab.)

Dr. Makoto Muroi MUROI (Antibiot. Lab.Antibiotics Lab.)

Dr. Makoto KawataniKAWATANI (Antibiot. Lab.Antibiotics Lab.)

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 Eng. Team, ADSC, DRI)

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

Dr. Masamitsu WatanabeWATANABE ((Low Temperature. Physics. Laborator.))

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

Dr. Soichi KOJIMA (Molecular Cellular Pathology Research Unit, DRI)(Nanosci. Develop. Sup. Team.)

Dr. Hidekazu TsutsuiTSUTSUI (Lab. Cell Func. Dynam.)

Dr. Atsushi MiyawakiMIYAWAKI Atsushi(Lab. Cell Func. Dynam.Laboratory for Cell Function Dynamics)

Dr. Yayoi HONGO (Molecular. Characterization. Team, ADSC, DRI)

Visiting Members

Dr. Tomohiko TSUGE (ICR, Kyoto Univ.)

Dr. Masayoshi NAKASAKO (Fac. Sci. Tech., Keio Univ.)

Ms. Misaki AKIYAMA (WDB Co. Ltd.)

Trainees

Mr. Yuichi HIRANO (Fac. Sci., Tokai Univ.)