

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、miRNA、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, 市川, 中山, 猪爪, 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、昨年に引き続き株式会社アミンファーマ研究所、五十嵐代表取締役社長らと共同で脳卒中患者に見られ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、アレイ解析で陽性だったピオチン化タンパクを解析した。また、早稲田大学胡桃坂研究室の香川亘講師らと共同で組み換え修復反応において中心的な役割を持つタンパク質、放射線医学総合研究所の安田武嗣研究員らと共同で紫外線損傷DNA結合因子などの翻訳後解析を行った。加えて、ブサン大学の李福律教授らと共同でリポタンパク質の解析を行い、N-acetyltransferaseがゲノム上に見つからない黄色ブドウ球菌においてリポタンパク質のN末端アミノ基が脂肪酸により修飾されていることを見出した。さらに、本年度から日華化学株式会社と共同してクラゲの有効利用を進めるプロジェクトを始め、コラーゲンの構造解析についての準備を進めた。

生物関連の研究者でも質量分析を利用する機会が増えており、教育のためのセミナーを企画し、第一回を開催した。

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、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レ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や翻訳後修飾の定量を行っている。

本年度は、高分離・高感度化のために超高压液体クロマトグラフィーとレーザー蛍光検出器を導入した。これにより、内因性のNOS阻害物質で血管緊張度・血管構造に大きな影響を及ぼすADMA(Asymmetric Dimethylarginine)などの塩基性アミノ酸のメチル化体やヒドロキシリジンなど多くの修飾アミノ酸がフェムトモルレベルでの分離・検出が可能となった。

これらを用いて、辻本細胞生化学研究室の松本健専任研究員と共同でmRNA分解に関する細胞質mRNA-タンパク質複合体(P-body)の構成要素の翻訳後修飾、ゲノム医科学センター鶴木元香研究員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、東京大学医科学研究所浜本隆二チームリーダーと共同でノンヒストンタンパク質の翻訳後修飾の同定や定量を行った。

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)

・ヒト由来インポーチン(Rch1)の構造生物学的研究

細胞の核内輸送機構であるインポーチン / システムは、一部のウイルスが核内に進入する際にも利用される。AIDSの原因ウイルスであるHIV-1のブレインテグレーションコンプレックス(PIC)も、アクセサリタンパク質Vprが調整しつつヒトインポーチン / システムにより核内に輸送されると考えられている。本研究では、ヒトインポーチン の一種である、Rch1の分子機構を原子レベルで解明し、HIV-1の核内進入阻害方法を確立することを目的とする。本年度は、Rch1の新規な2量体形成機構をX線結晶構造解析により解析し、更に物理化学的な測定方法を駆使して、2量体形成により輸送能が調整される機構を明らかにした(分子ウイルス学特別研究ユニットとの共同研究)。

・その他のタンパク質

SPring-8遠隔測定支援システムを利用し、その他のタンパク質も高効率にタンパク質のX線結晶構造解析が進行した(ロドコッカス由来アミダーゼ、ルシフェラーゼアクセサリタンパク質LumP、東京農工大学養王田・尾高研究室との共同研究)。SPring-8遠隔測定支援システムは、放射光科学総合研究センターの利用システム開発研究部門基盤研究部の協力により和光キャンパスで運用されている。

・タンパク質の溶液中分散状態制御方法の研究

タンパク質分子は溶液中でブラウン運動により振動し、動的に会合・分離を繰り返している。構造的な均一分子系には自己組織化の性質が内包されており、適切に溶液状態等を制御すれば原理的には自己組織化を任意に進行させることが可能である。本研究では、ナノ粒子であるタンパク質分子の溶液状態を高精度に測定できる、ヘテロダイン方式の動的光散乱装置を使用して、タンパク質分子の均一マルチマー形成過程を制御する方法を確立した(日機装(株)との共同研究)。

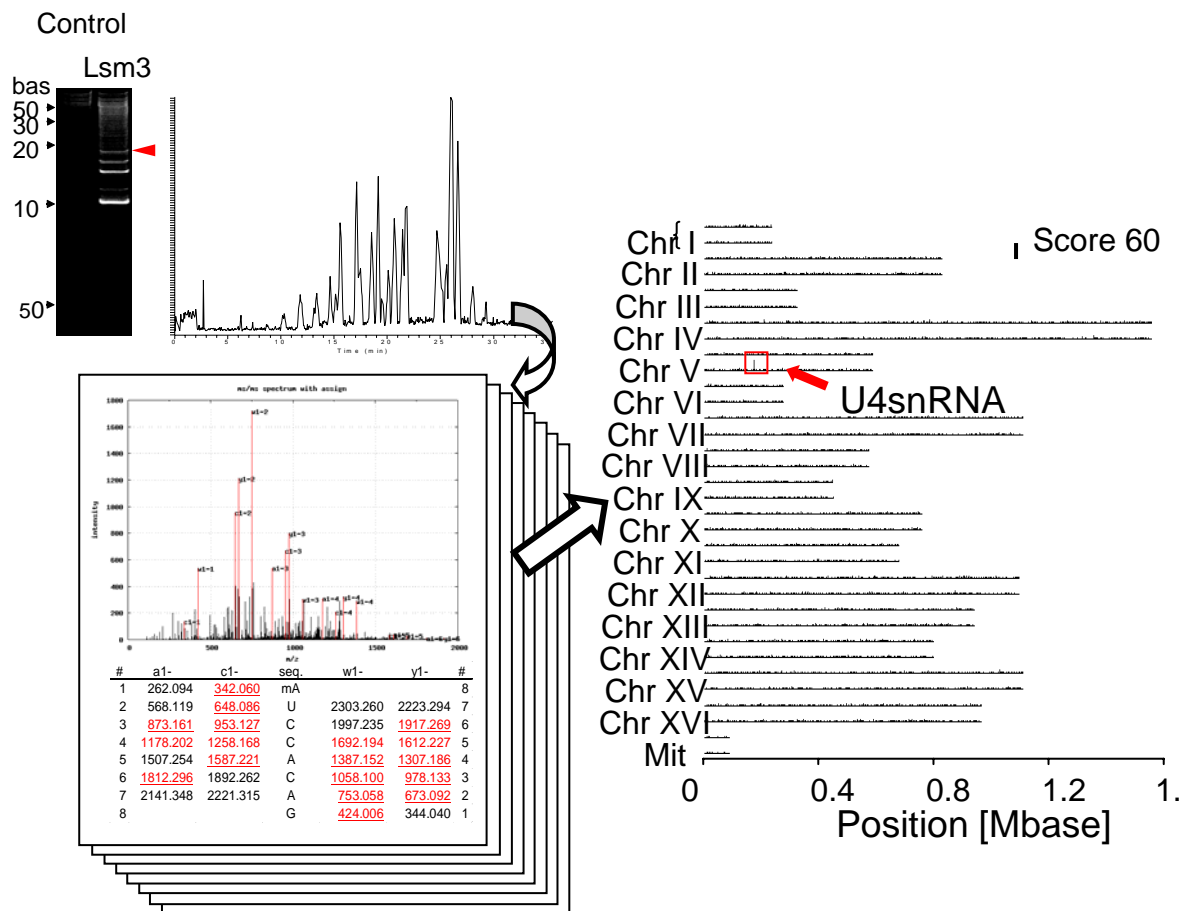
・単粒子イメージングのための基礎検討

自由電子レーザー(XFEL)を用いた生体高分子の単粒子イメージングには、結晶化が不要で、分子量上限も無く、原子分解能のイメージが得られる可能性があり、従来のX線結晶解析やNMR、電子顕微鏡解析では出来なかった膜タンパク質や超分子複合体などの生体試料の高次構造解析に期待がもたれている。慶応大学中嶋敦教授らが中心で行うXFEL照射のための試料照射装置の開発に参加し、試料調製法の検討を行っている。

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を開始している。今年度はプロトタイプ of データベース検索エンジンを拡張することで、ゲノム配列に対して検索しRNAの鋳型DNA領域を同定することが可能となった。このソフトウェアをもちいて酵母(*S. cerevisiae*, *S. pombe*)から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, miRNA, 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 the 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, Ichikawa, Nakayama, Inotsume, 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 modifications of protein involved in human homologous recombination, human UV-damaged DNA binding protein, and we and professor Lee of Pusan University have identified the triacylated ATP binding cluster transporter substrate-binding lipoprotein of *staphylococcus aureus* which functions as a native ligand for the Toll-like receptor 2.. We analyzed modification of proteins by polyamines that are candidate of biomarker for cerebrovascular diseases. Furthermor we have started modificomics project, global biotinylation analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* proteins. We also start a new project concerned in jelly fish.

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) to quantify proteins or PTMs.

We introduced a ultra high pressure LC system and highly sensitive fluorescence detector using laser incident beam to achieve high resolution and high sensitivity. The system enable us to separate and detect of modified amino acids at femto mole level: hydroxylysine and methylated basic amino acids as asymmetric dimethylarginine, which is inhibitor of endogeneous nitric oxide synthase (NOS) and is a key factor of vascular disease and hypertension.

We quantified or identified of PTMs of mRNA-protein complex known as P-bodies, where many enzymes involved in mRNA degradation are concentrated (joint-research with Dr. Matsumoto of Cell. Biochem. Lab.), of protein substrate of demethylating enzyme (joint-research with Dr. Unoki of CGM, RIKEN), and of non-histone proteins (joint-research with Dr. Hamamoto of Univ. Tokyo).

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

• Structural biological study of human importin (Rch1)

The importin / nuclear transport systems are also involved in the some virus infection to transport the viral components into the host nucleus. The human immunodeficiency virus type -1 (HIV-1), the pathogen of AIDS, hacks the systems to transport the pre-integration complex (PIC) into the nucleus with the help of the accessory protein Vpr. In the present study, we aims to elucidate the molecular

mechanism of the Rch1, a kind of human importin α , to establish how to inhibit the HIV-1 to infect the host cell via the invention into nucleus. In this fiscal year, we analysis the homo-dimer structure of the Rch1, which is further functionally assayed by a variety of physicochemical techniques to be responsible for the recognition of the cargoes (joint-researched with Retrovirus Research Unit).

- Other proteins studied by the X-ray crystallography

The mail-in data collection system of SPring-8 is used for the structural biological studies of Rhodococcus amidase and LumP of the luciferase-related accessory protein (joint-researched with Yoda/Odaka laboratories of the Tokyo University of Agriculture and Technology). The mail-in data collection system is managed

- Study on how to control the dispersity state of proteins in solution

Proteins are in equilibration between association and dissociation with the Brownian motion. Structurally homogeneous nano-particles such as proteins tend to be self-assembled against the general nature of increasing entropy, when the solution conditions are properly controlled. In this study, we get the insight to how to control the dispersity of proteins to make the homogeneous multi-assembly of the molecules in the solution, monitoring with a high-performance dynamic light scattering apparatus (joint-researched with Nikkiso co. ltd).

- An examination for single molecule imaging

Single molecule imaging using XFEL may achieve 3D structure determination without crystalline or upperlimit of molecular weight at atomic resolution, so an expectation leans on the highly advanced structure analysis of the biological samples such as a membrane protein or the supermolecule complex which it was not possible for by conventional X-rays crystallographic analysis, NMR, and the electron microscope analysis. We take part in a project of a sample irradiation device development for XFEL, especially examination of sample preparation.

4. Identification and characterization 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 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 successfully applied to the identification of all of the known RNA components of the spliceosomal RNP complex affinity-purified from *S. cerevisiae* by searching against the yeast genome sequence database.

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

猪爪 優子 Yuko Inotsume

Assistant and Part-timer

松葉 ゆかり Yukari Matsuba

川田 昭奈 Akina Kawata

Visiting Members

小池 仁美 Masami Koike

市川 理恵 Rie Ichikawa

柘植 知彦 Tomohiko Tsuge

森 博幸 Hiroyuki Mori

菅澤 薫 Kaoru Sugasawa

番戸 博友 Hirotomo Banko