

**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**

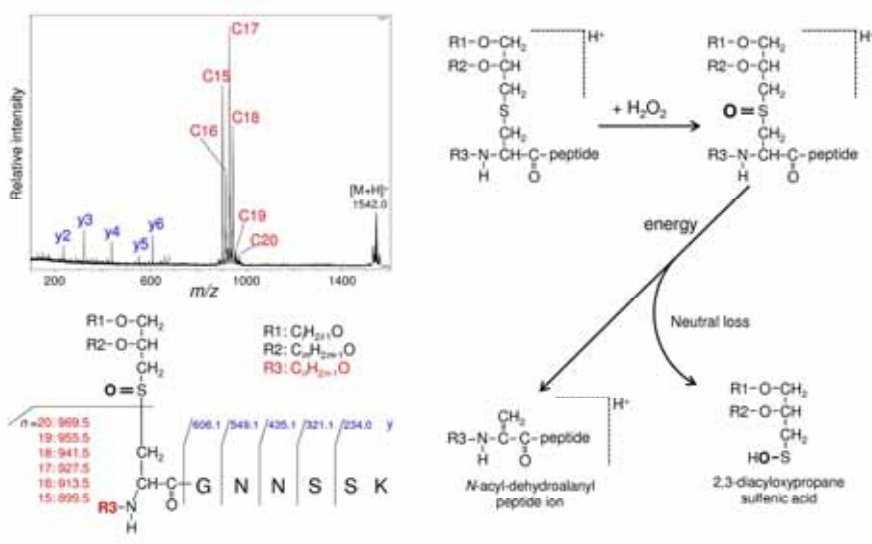
タンパク質は生命活動の中心となる分子であり、我々はこの構造を調べることで遺伝子と機能の相関を解明することを目的としている。最新のプロテオミクス技術の中でも特に翻訳後修飾解析に力を入れて開発を行っている。一般のLC-MS/MSベースのプロテオミクスでは、配列カバー率が低く翻訳後修飾を見逃している場合が多い。我々は、タンパク質全体の質量分析、カバー率を向上させたLC-MS/MS分析、アミノ酸組成分析を組み合わせることで、見落としの少ない翻訳後修飾解析を行う方法を確立した。さらに、播磨SPring-8を用いたタンパク質X線結晶解析の支援をしている。また、近年機能が注目されているRNA分子にも質量分析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



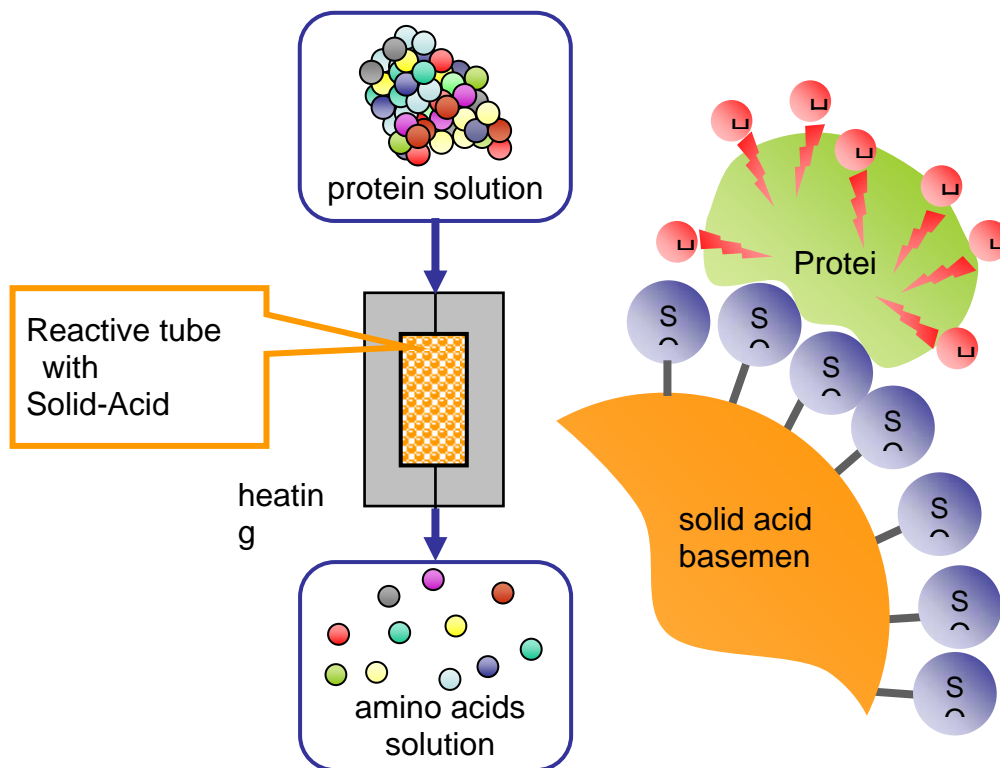
MALDI-TOF MS/MSによる黄色ブドウ球菌リボタンパク質のN末端アシル化の証明

これらの方法を応用することで、XPC複合体中の塩基除去修復の初期課程にかかわるTDG(thymine DNA glycosylase)のSUMO化部位を神戸大学の菅澤教授(客員研究員)と共同で解析し、またカイコの性特異的スプライシングを制御するRNA結合タンパク質の同定を松本分子昆虫学研究室(ASI)と共同で同定した。また、鱗翅類のバキュロウイルスに特有のタンパク質FP25Kの低分子フォームにはN末端が欠けていることを同じく松本分子昆虫学研究室(ASI)と共同で発見したり、緑藻の光合成系II複合体中の表層タンパク質タンパク質PsbO、PsbP、PsbQのトポロジーを東京理科大学の榎並名誉教授と共同で架橋剤を用いて解明した。加えて、プ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*-acyltransferase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末端アミノ基が多様な脂肪酸により修飾されていることをタンデム質量分析により証明し、培養条件によりこの修飾が制御されていることを見出した。昨年度より開始したクラゲタンパク質の有効利用を進めるプロジェクトではクラゲのタンパク質の断片から新しいアミノ酸配列を得た。

昨年に引き続き教育のためのセミナーを企画し、第二回から第八回を開催し、また始めて播磨研究所SPring-8利用システム開発研究部生命系放射光利用システム開発ユニットと共同開催で「生物系研究者のためのタンパク質構造解析に関する教育セミナー」を共同開催した。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)

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や翻訳後修飾の定量を行っている。



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備えた超高感度アミノ酸分析システムを開発している。この装置を用いて、東京大学の浜本チームリーダーと共同でMYPT1がヒストンメチル転移酵素のSETD7の基質であり、MYPT1のリジン442がメチル化サイトであることを同定した。また、組成分析のネックとなるタンパク質の加水分解を自動化するために、我々は固体酸触媒を用いたタンパク質の加水分解装置を開発し報告してきた。本年度はより高温で分解可能な触媒を検索した。

### 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)

近年、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り、和光地区における構造生物学研究の推進に寄与している。また、本年度からは、微小結晶測定用ビームラインである、SPring-8 BL32XUビームラインが運用開始された。和光地区でも微小結晶用の器材を取りそろえ、希望者には微小結晶の回折データ測定も可能な体制を整えた。さらに、和光地区とBL26B1との間に、リモート測定回線確立し、研究者が和光地区にいながらにして、直接BL26B1の器材を制御しながら、遠隔測定が可能なシステムを構築した。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、動的光散乱測定法を駆使した新規なタンパク質結晶化装置の開発を民間企業と共同で行っている(日機装(株)との共同開発)。

さらに、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は、結晶化が不要で、分子量上限も無く、原子分解能の構造情報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、天然型の立体構造を保持した試料のイオン化方法を、質量分析装置を用いて検討した。

### 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場合もあり、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を開始している。今年度は検索エンジンのアルゴリズムを改良しヒトなどの哺乳類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、RNA混合物中から個々のRNA成分を同定することが可能となった。これらの改良により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 SUMOylation site of thymine DNA glycosylase (TDG) that initiates base excision repair in XPC complex, which is a DNA damage detector for nucleotide excision repair.(Collaboration with Pf. SUGASAWA, Kobe univ.) and identified a male-specific RNA binding protein that regulates sex-specific splicing of *Bmdsx*. (Collaboration with Dr.Suzuki and Dr. Matsumoto, Laboratory of Molecular Entomology, RIKEN ASI ) We also identified smaller form is FP25K lacking its N-terminus, which is Lepidopteran baculovirus-specific protein. (Collaboration with Dr.Kang, Laboratory of Molecular Entomology, RIKEN ASI ) and e analyzed a topology of the extrinsic PsbO, PsbP and PsbQ proteins in a green algal Photosystem II complex by crosslinking with a water-soluble carbodiimide. (Collaboration with Pf. Enami, Tokyo University of Science) , and we and professor Lee of Pusan University have determined directly the *N*-acylation of major lipoproteins of *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, although *N*-acyltransferase genes could not be detected in the genomes of these bacteri. We determined new amino acid sequences of the protein fragments 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 have been developing a ultrahigh sensitive amino acid analysis system that have a ultra high pressure LC system and highly sensitive fluorescence detector using laser incident beam to achieve high resolution and high sensitivity. Using this system, we found that MYPT1 was methylated in vitro and in vivo by histone lysine methyltransferase SETD7 and demethylated by LSD1, identifying Lys 442 of MYPT1 as a target for methylation/demethylation by these enzymes. (Collaboration with Dr. Hamamoto, The University of Tokyo)

For amino acid analysis, we have been reported an automated protein hydrolysis system delivering sample to a solid acid catalyst. We examined new solid acid for heat resistance.

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

Recently, synchrotron radiation facilities are indispensable for the related researchers. However, the researchers far from the synchrotron facilities often feel it stressful to visit the facilities for

measurement of X-ray diffraction. Thus we and the division of synchrotron radiation instrumentation together built a mail-in data collection system in Wako campus area for remote accumulation of the diffraction data at SPring-8. In addition, we prepared apparatuses for the micro-beam line of BL32XU at SPring-8, for the users who wish to collect diffraction data using the micro-focused x-rays. We also established a remote-data collection system which enables us to control directly the apparatuses at BL26B1. On the other hand, crystallization of target proteins is difficult for the recent structural biology, 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 (in collaboration with Nikkiso Co., Ltd.).

Single molecule imaging using XFEL may achieve 3D structure determination without crystalline or upper limit 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 a protein ionization using mass spectrometry.

#### **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

猪爪 優子 Yuko Inotsume

### ***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***

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