

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

平成30年4月27日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団  
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局 工学研究科 合成・生物化学専攻

職 名 助教

氏 名 田 村 朋 則

助成の種類	平成29年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	オルガネラ新生蛋白質の化学修飾による時空間分解プロテオミクス			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	「リガンド指向性N-acyl-N-alkylsulfonamide化学による蛋白質の迅速ラベリングと不可逆阻害剤への応用」という課題名で、細胞内の蛋白質を迅速かつ選択的に化学修飾するための技術を開発した。この成果を発表する際の論文掲載料に本助成金を充当した。			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 京都大学工学研究科合成・生物化学専攻 教授 浜地 格			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) ConBio2017 (ポスター発表、神戸ポートアイランド) Nature Communication, 2018 in press			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		論文掲載料	613,000 円	
		消耗品費	387,000 円	
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 業績が乏しいうちはなかなか科研費に採択されないのでは、本助成は若手にとって大変ありがたい制度だと思います。今後も研究者の教育研究活動を幅広くサポートする助成事業であってほしいと思います。			

## 成果の概要/田村 朋則

細胞内蛋白質の時空間的な発現プロファイル（それぞれの蛋白質がいつ、どこで、どのくらい発現するか）は、細胞の状態や外部環境に依存して大きく変動する。こうしたプロテオームの動的変化は、恒常性維持、分化、増殖、ストレス応答といった基本的な細胞内プロセスを規定する最重要因子である。従って、細胞機能の分子メカニズムをより深く理解するためには、ある刺激に応じたプロテオームの時空間変化量を精度よく定量することが必要不可欠である。近年、LC-MS/MS 等の質量分析機器の飛躍的な進歩に伴い、外部刺激前後における蛋白質発現量の比較定量が容易に行えるようになった。しかし多くの場合、蛋白質の変化量は極めて小さいため、最新の分析機器をもってしても精密かつ高感度な検出・定量には限界がある。

この問題を解決するために Tirrell, Schuman らは、ある時間から新たに合成された蛋白質に精製用タグをラベルし、“新生蛋白質”だけを濃縮する方法を開発した(BONCAT : Bioorthogonal noncanonical amino acid tagging)(図 1 A)。この手法では、アジド基を有する非天然アミノ酸(AHA)がメチオニンアナログとして代謝的に蛋白質合成経路に取り込まれることを利用し、新生蛋白質をパルス的にアジド修飾する。アジド化された新生蛋白質に対しては、細胞破碎後 click 反応によってビオチン等の親和性タグを修飾できるため、精製濃縮による検出感度の向上が達成される。加えて、もともと細胞内に存在していた古い蛋白質とは区別できるので、質量分析における複雑性が減少し従来検出できなかった低発現蛋白質の同定・定量も期待できる。

このように BONCAT 法はプロテオーム発現の時間変化を高感度に定量できる優れた手法であるが、細胞内のどの場所で発現量が変化するのか、といった空間情報は得られない。これに対して我々は、特定の細胞オルガネラに局在する蛋白質を同定解析するための分子ツールとしてごく最近「オルガネラ局在性修飾試薬: Organelle-localizable Reactive Molecule (ORM)」を開発した(図 1 B)。ORM はオルガネラ局在モチーフと求電子性反応基からなり、細胞内の標的オルガネラに自発的に局在・濃縮して蛋白質と反応する。この反応によって検出用プローブを蛋白質に修飾し質量分析に供することで、蛋白質の細胞内局在を高い空間分解能で解析可能である。この戦略に基づき、我々は

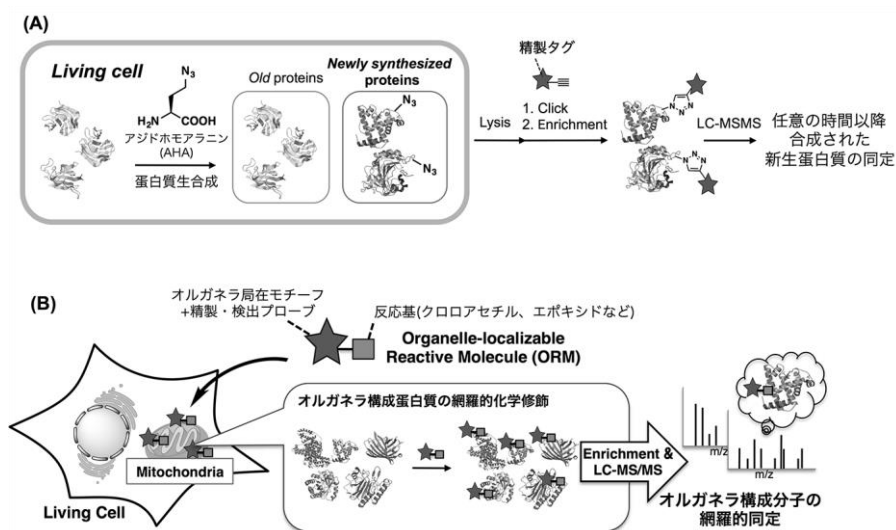


図 1 (A) BONCAT による時間分解プロテオミクス法

(B) 申請者らが開発したオルガネラプロテオミクス法

のどの場所で発現量が変化するのか、といった空間情報は得られない。これに対して我々は、特定の細胞オルガネラに局在する蛋白質を同定解析するための分子ツールとしてごく最近「オルガネラ局在性修飾試薬: Organelle-localizable Reactive Molecule (ORM)」を開発した(図 1 B)。ORM はオルガネラ局在モチーフと求電子性反応基からなり、細胞内の標的オルガネラに自発的に局在・濃縮して蛋白質と反応する。この反応によって検出用プローブを蛋白質に修飾し質量分析に供することで、蛋白質の細胞内局在を高い空間分解能で解析可能である。この戦略に基づき、我々は

これまでに細胞核やミトコンドリア蛋白質の選択的なラベル化・同定に成功した。一方この手法は、(i)発現量が豊富かつ変化量の大きな蛋白質群しか捉えられない、(ii)反応に要する時間が比較的長い(~6 h)ため時間分解能が低い、といった課題を抱えていた。そこで本研究では、新生オルガネラ蛋白質を選択的かつ高感度に検出可能なケミカルツールの開発を試みた。具体的には、オルガネラ局在モチーフと歪みアルキンからなる「オルガネラ局在性 click 試薬」を新たに開発し、AHA が代謝導入された新生アジド化蛋白質のうち、標的オルガネラに存在する蛋白質のみを銅フリーの click 反応によってラベルする手法の確立を目指した(図 2)。

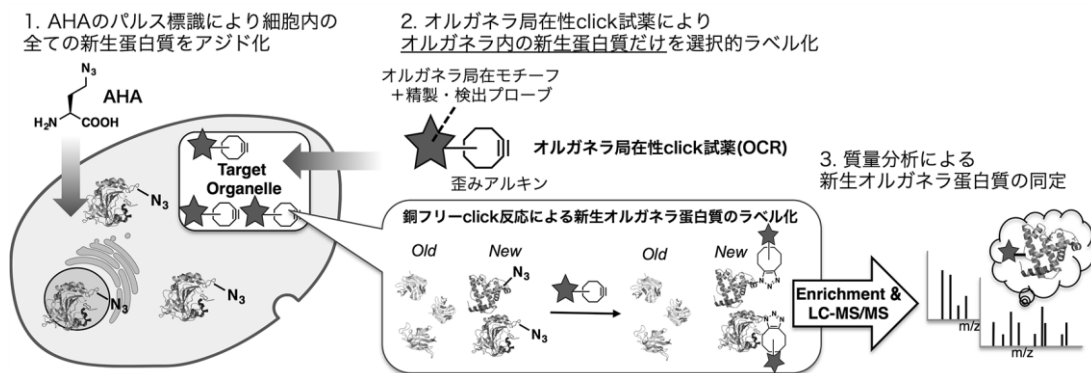


図 2 新生オルガネラ蛋白質の選択的ラベリングによる時空間分解プロテオミクス

平成 29 年度においては、実際にミトコンドリアと小胞体 (ER) を標的としたプローブを設計・合成した。それぞれの生細胞内局在を確認したところ、狙い通りミトコンドリアと ER それぞれに局在した。また、蛋白質合成阻害剤を用いて、新生蛋白質選択的に反応が進行することを確認した。さらに、固定細胞の蛍光イメージングから、ラベル化蛋白質の細胞内局在は狙い通りミトコンドリアと ER であることを確認した。最後に、LC-MS/MS 解析によって、ラベル化蛋白質を同定した。ミトコンドリア用プローブでラベルされた蛋白質は 179 個で、そのうち約 50% の 88 個がミトコンドリア蛋白質であった。ER 用プローブでラベル化される蛋白質は 233 個で、ヒットした蛋白質の機能でアノテーション解析を行ったところ、ER に関連する蛋白質群がエンリッチされることがわかった。本研究に関する成果は ConBio2017 にてポスター発表を行った。現在、本研究から派生したプロジェクトも含めて、3 本の論文を執筆中であり国際誌に投稿予定である。

また、本研究とは別プロジェクトとして、細胞内蛋白質を迅速かつ選択的に化学修飾するための新しい手法として、リガンド指向性 N-acyl-N-alkylsulfonamide 化学を開発した。本成果は Nature Communications に掲載されることが決定し (in press)、その掲載費として本助成金の一部を充当した。