

論文の内容の要旨

論文題目 **Proteomics approach for characterization of lipid-modified proteins**

和訳 脂質修飾タンパク質のプロテオーム解析

指導教員 清水 孝雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

分子細胞生物学専攻

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

氏名 村田 千恵

生体内の種々の機能の多くはタンパク質レベルで制御されており、病気の発症のメカニズムやその病態の把握においても、疾患特異的なタンパク質を解析するプロテオーム解析が重要である。プロテオーム解析法の一つに質量分析 (Mass Spectrometry, MS) を用いる方法がある。MS は、プロテアーゼ等を用いて得られるペプチドの分子量や MS/MS によって生成されるペプチドのフラグメントイオンから配列の解析を行うことによって、タンパク質の同定や定量、翻訳後修飾の解明が可能なため、盛んに利用されている。

現在、翻訳後修飾の一つである脂質修飾が注目され始めている。脂質修飾基は、主に脂肪酸アシル型 (ミリストイル基、パルミトイル基)、イソプレニル型 (ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基)、**glycosylphosphatidylinositol (GPI)** アンカー型に分類される (Table)。脂質修飾基の多くは、不可逆的な結合で、修飾するアミノ酸やコンセンサス配列は決まっているが、

Table Biochemistry of lipid modifications

Modification	Fatty acid acylation		Isoprenylation		GPI anchor
	Myristoyl	Palmitoyl	Farnesyl	Geranylgeranyl	
Amino acid	Gly	Cys	Cys	Cys	Ser, Asn, Ala Asp, Gly, Cys
Consensus sequences	G-X-X-X-S/T-	-?C?-	-C-A-A-X A:aliphatic amino acid X:Met, Ser, Ala	-C-A-A-X A:aliphatic amino acid X:Leu, Ile, Phe -C-C-, -C-X-C	Amino acid (ω site) near C-terminus
Binding	irreversible	reversible	irreversible	irreversible	irreversible
Carbons	14	16	15	20	—
Protein substrates	Heterotrimeric G proteins Src protein kinase MARCKS Recoverin ARFs	Heterotrimeric G proteins Ras GTPases PSD-95 Rhodopsin eNOS	Ras, Raf CENP-E cPLA2 γ T γ	Rho A, Rac, Cdc42 Rabs G γ 2, G γ 3	CD-59, CD-55, Prion, Thy-1

パルミトイル基の修飾のみ可逆的な結合で、コンセンサス配列は未だに不明である。脂質修飾は、細胞膜への局在化だけでなく膜タンパク質の機能にも重要な役割を果たしており、特にパルミトイル基の可逆的な修飾によって、タンパク質立体構造の安定性、細胞膜間の移動やタンパク質間相互作用に関与することが報告されている。これまで、脂肪酸の安定同位体標識法、脂質修飾と予測されるアミノ酸部位の変異、パルミトイル基のビオチン置換標識法、脂質修飾の有無によるタンパク質の活性や分子量の測定によって、脂質修飾解析が行われてきた。しかし、これらの方法は、標的としているタンパク質の脂質修飾や一種類だけの脂質修飾の同定は可能だが、未知の脂質修飾タンパク質の同定や多種類の脂質修飾基を同時に解析することは困難である。また、MS を用いて脂質修飾タンパク質を同定した報告はあるが、脂質修飾ペプチドは修飾されていないペプチドと比べて疎水性が高く、イオン化効率が低いため、MS/MS による修飾部位の同定は殆ど行われず、未だに有効な脂質修飾解析法が確立されていない。

私は、脂質修飾ペプチドと修飾されていないペプチドの疎水性の違いに注目し、それぞれ LC での溶出時間が異なると予想し、それらを分離することによってタンパク質の同定と同時に脂質修飾の解析が可能ではないかと考えた (Fig. 1)。そこで、脂質修飾された標準ペプチド、オクタノイル基、ミリストイル基、ファルネシル基、パルミトイル基が修飾されたペプチドと脂質修飾されていない Bovine serum albumin (BSA) ペプチドの混合溶液を調製し、C18 逆相カラムを用いて、LCQ (Thermo) の data dependent scan mode で測定を行い、脂質修飾されていないペプチドと脂質修飾ペプチドの分離条件の検討を行った (Fig. 2)。その結果、脂質修飾されていないペプチドは 43 分(溶媒 B 80%)までに溶出され、39 分(溶媒 B 75%)以降から脂質修飾ペプチドが溶出されたことがわかった。オクタノイル基が修飾されたペプチドは、炭素数 8 の脂質修飾基で疎水性が低いため、脂質修飾されていないペプチドの溶出

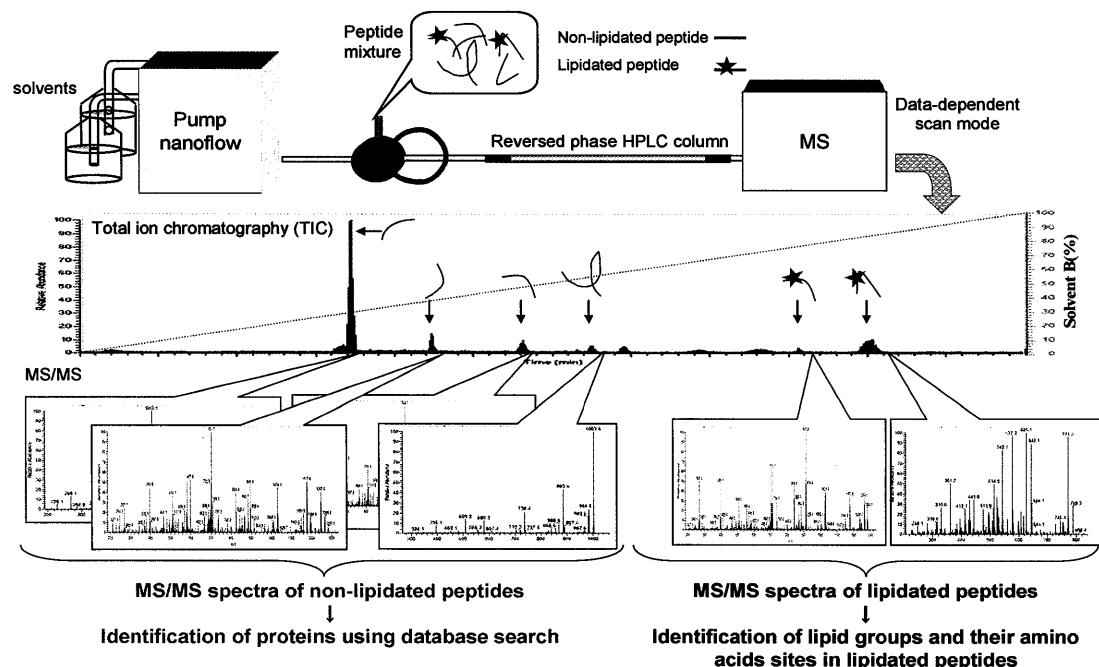


Fig. 1 Strategy

Because the most different physico-chemical property between lipidated peptide and non-lipidated peptide is hydrophobicity, lipidated peptide is postulated to elute after non-lipidated peptide by use of RPLC. I assumed that LC-MS method enables the identification of many peptides in both non-lipidated and lipidated proteins from the MS/MS data in early eluted range and the specification of lipidated peptides and their sites from MS/MS data in lately eluted range.

時間と重なったが、オクタノイル基以外の脂質修飾ペプチドは脂質修飾されていないペプチドより遅く溶出することができた。また、MS/MS のデータから MASCOT 検索でそれぞれのペプチド配列や脂質修飾部位を同定することができた。脂質修飾ペプチドのフラグメントイオンは、脂質がアミノ酸に付加したままの分子量で検出されていることから、今後の脂質修飾の解析に有効であると思われる。さらに、脂質修飾ペプチドは逆相カラムに長時間保持され、有機溶媒を多く含む移動相（アセトニトリル：メタノール：水=6:7:2）で溶出されたことから、一回の測定で脂質修飾されていないペプチドと脂質修飾ペプチド両方の同定が可能になると考えられる。この方法は、複数の脂質修飾ペプチドの配列同定や修飾部位の決定ができる、既知だけでなく未知の脂質修飾タンパク質の解析も可能になると思われる。

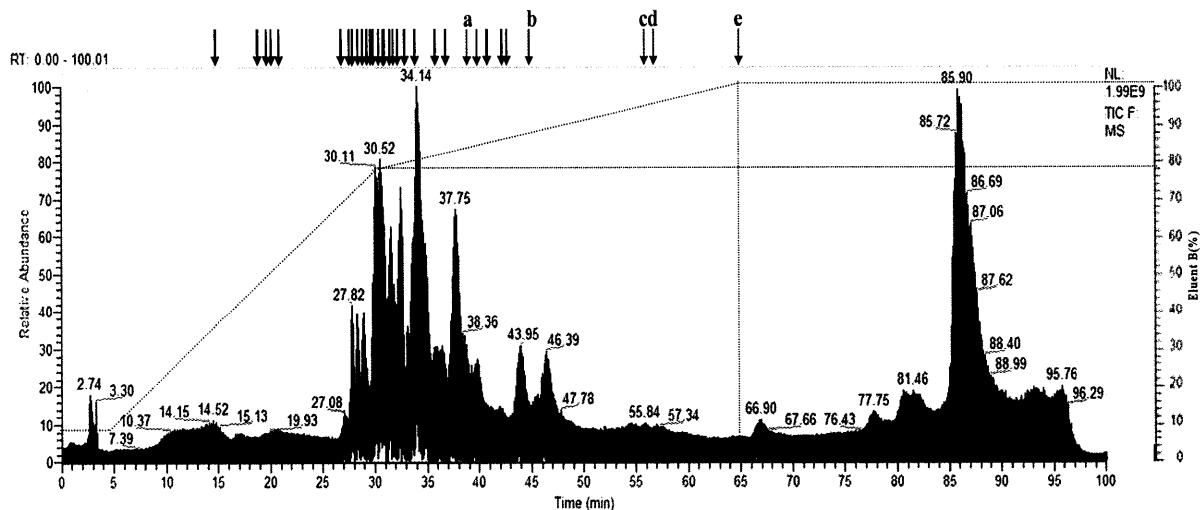


Fig. 2 Each elution time of non-lipidated and lipidated peptides by LC-MS
Total ion chromatography (TIC) of a peptide mixture of tryptic BSA peptides and 5 lipidated test peptides. The black downward arrows indicate the elution times for the tryptic BSA peptides, and the red arrows indicate those of the 5 lipidated test peptides. The MS profiles for each peptide are shown in (a-e). The lipidated peptide eluted as follows: octanoylated peptide (a), G-S-S(n-octanoyl)-FLSPEHQR, eluted at 39min; myristoylated peptide (b), myristoyl-KRTLRL, eluted at 45min; palmitoylated peptide (c), KGLAGLGPAS-C(palmitoyl)-LR, eluted at 56min; farnesylated peptide (d), C(farnesyl)-VIS, eluted at 57min; and myristoylated peptide (e), myristoyl-GQLARFFFSR, eluted at 65min.

この方法を用いて、ラット脳内の脂質修飾タンパク質の解析を行った。脂質修飾タンパク質は、細胞膜、特にスフィンゴリン脂質やコレステロールを豊富に含む微小ドメイン（ラフト）に局在しているので、ショ糖密度勾配法でラフト画分のタンパク質を回収した。まず、タンパク質の高次構造を破壊するため、Dithiothreitol (DTT) とアクリルアミドで還元アルキル化した後、エンドプロテアーゼ (Lys-C) とトリプシンで酵素処理を行い、MS (LCQ) で測定を行った。その結果、133 個のタンパク質を MASCOT 検索で同定することができ、その中に三量体 G タンパク質などの既知の脂質修飾タンパク質が 26 個含まれていた。次に、脂質修飾ペプチドの解析を行った。脂質修飾タンパク質は合成された後、プロセッシングされて脂質が修飾されるため、既存のデータベースでは脂質修飾解析ができない。そこで、同定されたタンパク質の配列を調べ、脂質修飾が可能な配列に直したもの登録し、新しいデータベースを作成した。このデータベースを用いて脂質修飾を解析したところ、有機溶媒を多く含む移動相の溶出時間にミリストイル基が修飾された三量体 G タンパク質由来のペプチド (Gi α-1,2 subunits, Gk α subunit, Go α subunits-1,2) を同定することができた。しかし、Gi α-1 subunit 以外は N 末端のミリストイル基の他に、N 末端から二番目の Cys にパルミトイ

ル基が修飾されることがこれまでの論文で報告されているが、これらのペプチドの MS/MS データから、Cys にアルキル基が修飾されていることがそれぞれのペプチドの分子量やフラグメントイオンからわかった。

これは還元アルキル化の工程中に、パルミトイール基が脱離したため、そこにアルキル基が修飾されたと予想し、パルミトイール基が修飾された標準ペプチドを用いて原因を調べた。その結果、アルカリ性の溶媒によってパルミトイール基のチオエステル結合が不安定になり脱離されることがわかった。そこで、酸性条件下で還元アルキル化を行うことができる Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP·HCl) を用いて脂質修飾解析の検討を行った。パルミトイール基などの脂質が修飾された標準ペプチドと BSA の混合溶液を調製し、TCEP を用いて還元アルキル化後、酵素処理を行い、MS で測定した。その結果、BSA のペプチドは還元アルキル化され、パルミトイール基などの脂質修飾ペプチドは、脂質が修飾された状態で検出された。パルミトイール基でなくアルキル基が修飾されたペプチドも僅かに検出されたが、これは還元アルキル化処理前からパルミトイール基が付いていないペプチドや還元アルキル化によってパルミトイール基が脱離したペプチドにアルキル基が修飾されたためと思われる。

また、ラット脳のラフト画分を TCEP で還元アルキル化を行い、同様に酵素分解した後、MS (LCQ、LTQ) で測定を行った (Fig. 3)。LTQ は LCQ と比べ、ペプチドイオンをより多くトラップできるため高感度で、またイオン検出器が二カ所あることによりスキャンスピードが速くなったため、266 個のタンパク質を MASCOT 検索で同定することができ、その中に既知の脂質修飾タンパク質は 53 個含まれていた。この同定された 266 個のタンパク質だけを含むデータベースを作成し、脂質修飾解析を行ったところ、有機溶媒を多く含む移動相の溶出時間にミリストイル基やパルミトイール基やゲラニルゲラニル基が修飾されたペプチド (VILIP1、Gi α -1 subunit、Gk α subunit、Go α subunits 1,2、MARCKS、Rab-3A) を同定する

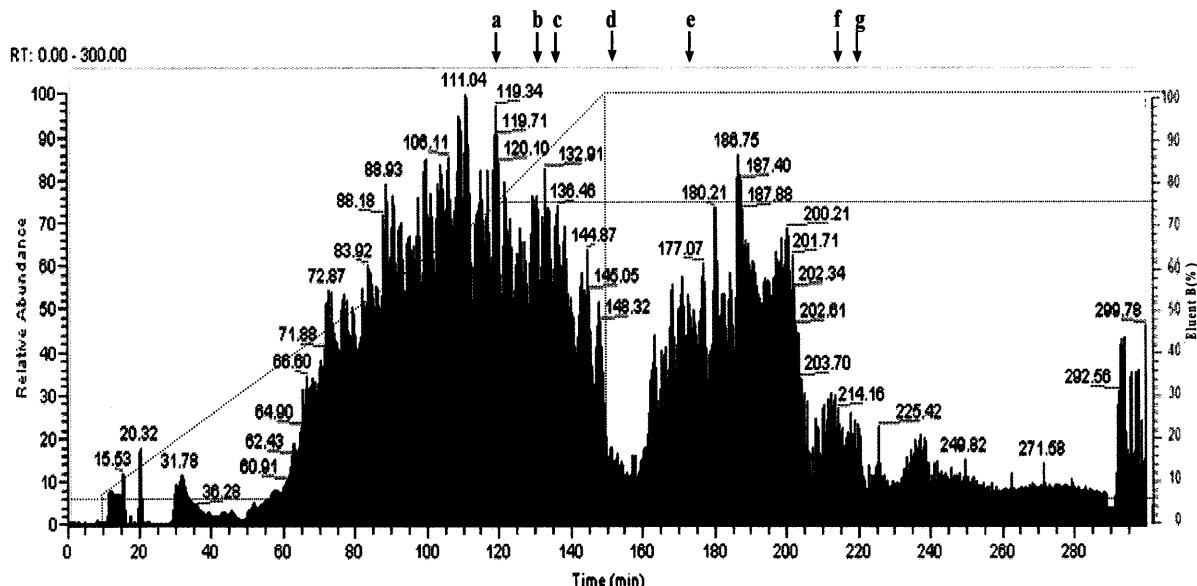


Fig. 3 MS analysis of peptide mixture from lipid raft fraction of a rat brain and each elution time of lipidated peptides by LC-MS TIC of peptide mixture from lipid raft fraction of a rat brain. Proteins were reduced with TCEP HCl, alkylated with acrylamide at acidic pH, and digested with Lys-C and trypsin. The black downward arrows indicate the elution times of the lipidated peptides (a)-(g) respectively. The lipidated peptides eluted as follows: syntaxin binding protein1 (a), VILIP1 (b), Gi, alpha-1 subunit and/or Gk, alpha subunit (c), Go, alpha subunit 1 and/or 2 (d) and (f), MARCKS (e), ras-related protein Rab-3A (g).

ことができた。さらに、脂質修飾の報告のない **Syntaxin binding protein 1 (Sec1)** 由来のパルミトイル基が修飾されたペプチドも同定することができた。**Sec1** は細胞質に局在しているが、細胞膜で膜タンパク質と結合することが報告されており、どのように膜へ移動するのかまだわかっていないかった。この結果から、**Sec1** は脂質修飾によって細胞膜へ移行する可能性が示唆された。

脂質修飾タンパク質は、病気の発生や進行に関与することや病気のバイオマーカーとしての使用できる可能性を持つという報告から大きく注目されているが、未だに脂質修飾タンパク質として同定されていないものも多い。この脂質修飾解析法は、一回の **MS** 測定によって、複数の脂質修飾タンパク質を同定することができ、同時に多種類の脂質修飾基や修飾部位を特定することができる。これまで多種類の脂質修飾基を包括的に同定した報告はないことから、この解析法は非常に有効であると思われる。さらに、この方法は、これまで脂質修飾の報告がないタンパク質の同定や脂質修飾が予測できないアミノ酸部位の同定も可能であると考えている。本研究の結果から、今後この手法が脂質修飾解析において有効な方法となりうることを確信している。