

## 学位論文要旨

氏名 高光 恵美

題目： 新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の探索と機能解析

真核細胞やウイルスが発現するほとんどのタンパク質では、機能の効率的な発現に特異的酵素によりいくつかの翻訳後修飾を受けることが必要であることが知られている。このうち、タンパク質 N-ミリスチル化は幅広い生物種に起こるタンパク質脂質修飾であり、細胞情報伝達をはじめとする様々な細胞の機能発現過程において重要な役割を担うことが知られている。しかし、タンパク質 N-ミリスチル化を検出する実験手法が限られているため、その多くは未だに同定されていないと推定されている。この状況を大きく改善したのは最近のケミカルバイオロジーの手法を利用した検出法の開発であった。このケミカルバイオロジーの手法の応用により、ある細胞において一定条件下で発現した N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定が可能となったが、特定の細胞で発現するタンパク質はヒトゲノムにコードされた全タンパク質の一部のみであり、細胞を材料として解析を行う限りヒト個体全体で発現し得る総ての N-ミリスチル化タンパク質を網羅的に同定する事は不可能であることは明らかである。我々はこれまでに、タンパク質 N-ミリスチル化の解析に cDNA リソースを用いた昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系の利用が有効であることを報告した。そこで、本論文では、この手法の有効性をさらに向上させることを目的として、無細胞タンパク質合成系および遺伝子導入細胞を用いた効率的なタンパク質 N-ミリスチル化の検出法の確立を行った。また確立した手法により見出された新規 N-ミリスチル化タンパク質の機能発現における N-ミリスチル化の役割の解析を行った。本論文は、これらの結果をまとめたものである。以下にその概要を記す。

### 1) 小胞体膜タンパク protein Lunapark に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の解析

タンパク質 N-ミリスチル化は主に細胞質タンパク質に起こる修飾であるとされており、N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質はほとんど見出されていない。そこで、膜貫通領域を持つと予測された4つの新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質について、膜局在、膜通過、細胞内局在を調べた結果、4つのうちの1つ protein Lunapark の第1および第2膜貫通領域はそれぞれ II 型シグナルアンカー配列および膜透過停止配列として働き、このタンパク質は N-末端および C-末端をいずれも細胞質側に向けた2回膜貫通型の N-ミリスチル化タンパク質であることが見出された。また、過剰発現した protein Lunapark は主に小胞体周辺に局在し大きな多角形の網目状構造形成を誘導すること、またこの形態変化は2位の Gly の Ala への置換による N-ミリスチル化阻害により顕著に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、protein Lunapark の過剰発現により誘導される小胞体形態変化にタンパク質 N-ミリスチル化が重要な役割を果たすことが示された。

### 2) 無細胞タンパク質合成系および遺伝子導入細胞における代謝標識法を用いたヒト cDNA リソースからの新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定

生理的に重要な新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質を同定するため、ヒト cDNA リ

ソース（かずさ ORFeome プロジェクト cDNA クローン）に含まれる cDNA 4369 個から N-ミリスチル化予測プログラムによりヒト N-ミリスチル化タンパク質をコードすると予測された 90 個の cDNA を選択後、データベース検索により既知の N-ミリスチル化タンパク質を除き、37 個を新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質候補とした。これらのタンパク質 N-ミリスチル化感受性を C 末端に FLAG タグを付加したモデルタンパク質に N 末端 10 アミノ酸を融合させた融合タンパク質を用いて評価した。その後、全長の cDNA 遺伝子産物の N-ミリスチル化感受性を昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系および遺伝子導入培養細胞の両方で代謝標識により評価した。その結果、13 個の cDNA クローン（FBXL7, PPM1B, SAMM50, PLEKHN, AIFM3, C22orf42, STK32A, FAM131C, DRICH1, MCC1, HID1, P2RX5, STK32B）が新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質であることが見出された。このうち、ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 では、ミトコンドリアへ適切に移行するためにタンパク質 N-ミリスチル化が重要な役割を果たすことが明らかになった。以上の結果から、本手法は生理的に重要な役割を果たす新規 N-ミリスチル化タンパク質の同定に有用であることが示された。

### 3) クリックケミストリーを用いた無細胞タンパク質合成系における代謝標識法による新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定

細胞および RI 標識基質を用いないタンパク質 N-ミリスチル化検出法を確立するため、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系においてアルキン化あるいはアジド化したミリスチン酸アナログを用い代謝標識した。クリックケミストリーによりビオチンタグを付加し、これを SDS-PAGE に供与後、N-ミリスチル化タンパク質をストレプトアビジン-HRP で特異的に標識し、化学発光により検出した。培養細胞では 2 つのミリスチン酸アナログは同様に有用であったが、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系ではアジド化ミリスチン酸アナログのみ利用可能であることが分かった。この検出法が cDNA リソースからの新規 N-ミリスチル化タンパク質の同定に応用可能であるか否かを確かめるために、4 つの候補 cDNA クローンを選択しタンパク質 N-ミリスチル化感受性を評価したところ、3 つの cDNA クローン産物 PLEKHN1, STK32A, HID1 が N-ミリスチル化タンパク質であることが明らかになった。また、原形質膜への N-ミリスチル化依存的な局在が 2 つの新規 N-ミリスチル化タンパク質、PLEKHN1 および STK32A で観察された。以上の結果から、クリックケミストリーを用いた無細胞タンパク質合成系における代謝標識法により、タンパク質 N-ミリスチル化が生理的に重要な役割を持つ新規 N-ミリスチル化タンパク質を細胞や RI-標識基質を用いることなく効果的に同定できることが示された。

以上のように、本研究から、これまでに我々が見出した新規 N-ミリスチル化タンパク質の中に、これまでほとんど見出されていなかった膜貫通タンパク質が存在していること、さらにこの N-ミリスチル化は膜貫通タンパク質の機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、cDNA リソースを用いた昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を利用した解析系にバイオインフォマティクスとケミカルバイオロジーの手法を応用することにより、従来法と比較しはるかに効率的で簡便かつ迅速な検出法を確立することに成功した。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第1430号	氏名	高光 恵美
論文審査担当者	主査	内海 俊彦	
	副査	松井 健二	
	副査	宮田 浩文	
	副査		
	副査		
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
新規ヒトN-ミリスチル化タンパク質の探索と機能解析			
関連論文 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
<基礎となる学術論文>			
題目 Protein N-myristoylation plays a critical role in the endoplasmic reticulum morphological change induced by overexpression of protein Lunapark, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. (タンパク質N-ミリスチル化は小胞体膜タンパク質Lunaparkの過剰発現により誘導される小胞体形態変化において重要な役割を果たす)			
掲載誌 PLoS ONE ( 2013年 11月 掲載・掲載予定)			
題目 Cell-free identification of novel N-myristoylated proteins from complementary DNA resources using bioorthogonal myristic acid analogues. (ミリスチン酸アナログを用いたクリックケミストリーによる手法を用いたcDNAリソースからの新規N-ミリスチル化タンパク質の同定)			
掲載誌 Analytical Biochemistry ( 2014年 11月 掲載・掲載予定)			
題目 Identification of human N-myristoylated proteins from human complementary DNA resources by cell-free and cellular metabolic labeling analyses. (無細胞タンパク質合成系および細胞における代謝標識法を用いたcDNAリソースからのN-ミリスチル化タンパク質の同定)			
掲載誌 PLoS ONE ( 2015年 8月 掲載・掲載予定)			
<参考論文>			
題目 Protein N-myristoylation is required for cellular morphological changes induced by two formin family proteins, FMNL2 and FMNL3. (2つのForminファミリータンパク質FMNL2, FMNL3により誘導される細胞形態変化にはタンパク質N-ミリスチル化が必要とされる)			
掲載誌 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry ( 2012年 6月 掲載・掲載予定)			

題目 Spectrophotometric detection of histidine and lysine using combined enzymatic reactions.  
(複合酵素反応を用いたヒスチジンおよびリジンの分光学的同定)

掲載誌 Materials Science and Engineering C

( 2013 年 8 月 掲載・掲載予定)

(論文審査の要旨)

タンパク質 N-ミリスチル化は真核細胞タンパク質に起こるタンパク質脂質修飾であり、細胞情報伝達をはじめとする様々な細胞の機能発現過程において重要な役割を担うことが知られている。しかし、タンパク質 N-ミリスチル化を検出する簡便で高感度の実験手法が確立されていないためヒト細胞に存在する N-ミリスチル化タンパク質の網羅的探索は成されていない。本論文では、無細胞タンパク質合成系および遺伝子導入細胞における代謝標識による N-ミリスチル化の検出法と N-ミリスチル化予測プログラムを用いたバイオインフォーマティクスによる手法、さらにはケミカルバイオロジーの手法であるクリックケミストリーを利用した手法を組み合わせ、ヒト cDNA リソースから簡便に、効率良く、短時間でタンパク質 N-ミリスチル化を同定する手法が確立された。さらにこれらの手法を用いて新たに見出されたヒト N-ミリスチル化タンパク質について詳細な解析が行われ、これまでほとんど見出されていなかった膜貫通タンパク質に N-ミリスチル化が生ずること、さらにこの N-ミリスチル化は膜貫通タンパク質の機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。これらの研究成果は、3報の国際学術雑誌に発表され、5章から成る博士論文に解り易くまとめられており、高い学術的意義を有していると評価され、博士論文として十分の内容を有していると判断された。