

新規ヒトN-ミリストイル化タンパク質の探索と機能解析

(Identification and functional analyses of
novel human N-myristoylated proteins)

高光 恵美

2016

目次

第 1 章 序論	・ ・ ・ ・ ・	1
文献	・ ・ ・ ・ ・	10
第 2 章 小胞体膜タンパク質 protein Lunapark に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の解析		
2-1 諸言	・ ・ ・ ・ ・	14
2-2 材料と方法		
2-2-1 試薬	・ ・ ・ ・ ・	16
2-2-2 発現プラスミドの構築	・ ・ ・ ・ ・	16
2-2-3 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質 N-ミリスチル化の検出	・ ・ ・ ・ ・	19
2-2-4 Protein Lunapark の <i>in vitro</i> 合成およびアフィニティー精製	・ ・ ・ ・ ・	19
2-2-5 <i>in vitro</i> 合成 protein Lunapark の MS および MS/MS 解析	・ ・ ・ ・ ・	20
2-2-6 培養細胞への遺伝子導入と N-ミリスチル化および N-グリコシル化タンパク質の同定	・ ・ ・ ・ ・	20
2-2-7 細胞分画	・ ・ ・ ・ ・	20
2-2-8 ウェスタンブロットティング	・ ・ ・ ・ ・	21
2-2-9 SDS-PAGE およびフルオログラフィー	・ ・ ・ ・ ・	21
2-2-10 免疫蛍光染色, 蛍光顕微鏡観察および ER 形態変化の定量	・ ・ ・ ・ ・	21
2-2-11 統計分析	・ ・ ・ ・ ・	21
2-3 結果		
2-3-1 膜貫通型タンパク質である protein Lunapark は N-ミリスチル化 されている	・ ・ ・ ・ ・	21
2-3-2 無細胞タンパク質合成系で合成した protein Lunapark を用いた タンパク質 N-ミリスチル化の解析	・ ・ ・ ・ ・	26
2-3-3 Protein Lunapark の膜通過と膜上トポロジーの解析	・ ・ ・ ・ ・	26
2-3-4 Protein Lunapark の膜通過はタンパク質 N-ミリスチル化を 必要としない	・ ・ ・ ・ ・	29
2-3-5 Protein Lunapark の過剰発現による小胞体形態変化とその N-ミリスチル化依存性	・ ・ ・ ・ ・	31

2-3-6	Protein Lunapark のタンパク質 N-ミリスチル化および C 末端ジンクフィンガードメインは protein Lunapark により誘導される ER 形態変化に寄与している	34
2-4	小括	37
2-5	文献	40
第 3 章 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 リソースからのヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定		
3-1	諸言	44
3-2	材料と方法	
3-2-1	試薬	45
3-2-2	N-ミリスチル化予測プログラムを用いたタンパク質 N-ミリスチル化の予測	45
3-2-3	プラスミドの構築	45
3-2-4	mRNA の合成と精製	52
3-2-5	無細胞タンパク質合成	52
3-2-6	培養細胞への遺伝子導入	52
3-2-7	遺伝子導入細胞を用いた代謝標識	52
3-2-8	SDS-PAGE およびフルオログラフイー	53
3-2-9	ウェスタンブロッティング	53
3-2-10	免疫蛍光染色および蛍光顕微鏡観察	53
3-2-11	免疫沈降	53
3-2-12	統計分析	53
3-3	結果	
3-3-1	cDNA リソースからのヒト N-ミリスチル化タンパク質をコードする候補 cDNA クローンの選別	54
3-3-2	無細胞タンパク質合成系において合成した全長 cDNA 産物に起こるタンパク質 N-ミリスチル化の解析	54
3-3-3	遺伝子導入ヒト細胞で発現させた全長 cDNA 産物に起こるタンパク質 N-ミリスチル化の解析	60

3-3-4	本研究で N-ミリスチル化が見出された 13 個のヒト cDNA クローン の遺伝子産物の特性	・ ・ ・ ・ ・ 63
3-3-5	ミトコンドリア外膜タンパク質 SAMM50 のミトコンドリアへの 移行にタンパク質 N-ミリスチル化が強く影響する	・ ・ ・ ・ ・ 63
3-3-6	哺乳動物細胞で発現している内在性 SAMM50 は N-ミリスチル化 されている	・ ・ ・ ・ ・ 66
3-4	小括	・ ・ ・ ・ ・ 66
3-5	文献	・ ・ ・ ・ ・ 72
第 4 章 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		
4-1	諸言	・ ・ ・ ・ ・ 76
4-2	材料と方法	
4-2-1	試薬	・ ・ ・ ・ ・ 78
4-2-2	N-ミリスチル化予測プログラムを用いた N-ミリスチル化 タンパク質の予測	・ ・ ・ ・ ・ 78
4-2-3	プラスミドの構築	・ ・ ・ ・ ・ 78
4-2-4	mRNA の合成と精製	・ ・ ・ ・ ・ 80
4-2-5	無細胞タンパク質合成	・ ・ ・ ・ ・ 80
4-2-6	培養細胞への遺伝子導入	・ ・ ・ ・ ・ 82
4-2-7	遺伝子導入細胞を用いた代謝標識	・ ・ ・ ・ ・ 82
4-2-8	銅触媒によるアジド-アルキン付加環化反応	・ ・ ・ ・ ・ 82
4-2-9	SDS-PAGE およびフルオログラフィー	・ ・ ・ ・ ・ 82
4-2-10	ストレプトアビジンブロッキング	・ ・ ・ ・ ・ 83
4-2-11	ウェスタンブロッキング	・ ・ ・ ・ ・ 83
4-2-12	免疫蛍光染色および蛍光顕微鏡観察	・ ・ ・ ・ ・ 83
4-3	結果	
4-3-1	タンパク質 N-ミリスチル化はクリックケミストリーを用いた手法 により無細胞タンパク質合成系において効率良く検出される	・ ・ ・ ・ ・ 83

4-3-2	アジド化ミリスチン酸アナログは昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチルの検出に適している	・ ・ ・ ・ ・ 84
4-3-3	昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系はミリスチン酸アナログを用いたタンパク質 N-ミリスチル化の無細胞系での検出に適している	・ ・ ・ ・ ・ 86
4-3-4	無細胞タンパク質合成系におけるミリスチン酸アナログを用いた代謝標識によりヒト cDNA リソースから新規 N-ミリスチル化タンパク質を同定する事が可能である	・ ・ ・ ・ ・ 90
4-4	小括	・ ・ ・ ・ ・ 93
4-5	文献	・ ・ ・ ・ ・ 96
第 5 章	総括	・ ・ ・ ・ ・ 99
	学位論文の基礎となる論文リスト	・ ・ ・ ・ ・ 104
	要旨	・ ・ ・ ・ ・ 105
	Summary	・ ・ ・ ・ ・ 108
	謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 111

第1章 序論

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事が必要であることが知られており、これまでに 400 以上の異なるタンパク質修飾が同定されている[1-1]. このうち、タンパク質の脂質修飾は、脂肪酸、イソプレノイド、リン脂質といった脂質がタンパク質に共有結合で付加するタンパク質修飾であり、翻訳途中あるいは翻訳後に起こる. 脂質修飾タンパク質の多くは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[1-2, 1-3].

このうち、タンパク質 N-ミリスチル化は真核生物およびウイルス由来のタンパク質に主として見出されるが、寄生虫(真核単細胞生物)や細菌由来のタンパク質も、寄生あるいは感染した真核宿主細胞により N-ミリスチル化されることがあり、幅広い生物種に起こるタンパク質脂質修飾である[1-4]. N-ミリスチル化されるタンパク質の N-末端には **Met-Gly** で始まり、8 ~ 9 アミノ酸から成る N-ミリスチル化シグナルと呼ばれるコンセンサス配列が存在する. このうち、2 位の **Gly** は必須であり[1-5, 1-6], 3 位, 6 位, 7 位のアミノ酸の種類とその組み合わせが重要であることが分かっている[1-7].

他の N 末端修飾と同様に、ほとんどのタンパク質 N-ミリスチル化は翻訳と共訳して起こり、タンパク質がリボソーム上で 70 ~ 80 アミノ酸合成された時点で修飾が起きる事が知られている. 即ち、タンパク質の翻訳途中にメチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)により開始 **Met** が切断除去された後、露出した N-末端 **Gly** 残基の α -アミノ基にミリスチル-CoA のミリスチル基が N-ミリスチル転移酵素(NMT)より転移される(Fig. 1-1 A). ヒト NMT には2つのアイソフォーム、NMT1 と NMT2 が存在することが知られている. 両者の基質特異性は共通しているものの、ノックアウトマウスを用いた解析から NMT1 ノックアウトのみが胚性致死となることが明らかにされている[1-8]. 従って、生体内では NMT1 が主要な機能を担っていると考えられるが、NMT1 と NMT2 の機能的な違いは詳細には明らかにされていない.

翻訳と共訳したタンパク質 N-ミリスチル化に加え、この修飾がアポトーシスの過程でカスパーゼにより切断されたタンパク質断片に翻訳後にも起きることが知られている(Fig. 1-1 B). 翻訳後 N-ミリスチル化と呼ばれるこの修飾反応では、切断により分子内に存在する N-ミリスチル化シグナルが露出後、NMT によりミリスチル基が転移されることで起こる. この修飾は、初めアポトーシス誘導因子として知られる **Bid** に生ずる事が見出された. 細胞質タンパク質である **Bid** は、アポトーシス刺激に伴いカスパーゼ-8 により切断された後ミトコンドリアへ移行し、ミトコンドリアからのシトクロム **c** の遊離を誘導することによりアポトーシスを進行させる. このカスパーゼ-8 による切断に伴い生じた **Bid** の C-末端側フラグメント(truncated **Bid**; **tBid**)が、翻訳後に N-ミリスチル化を受けること、さらにこの N-ミリスチル化が **tBid** のミトコンドリアへの移行およびシトクロム **c** の遊離に必須であり、アポトーシスの過程において重要な役割を果たすことが明らかにさ

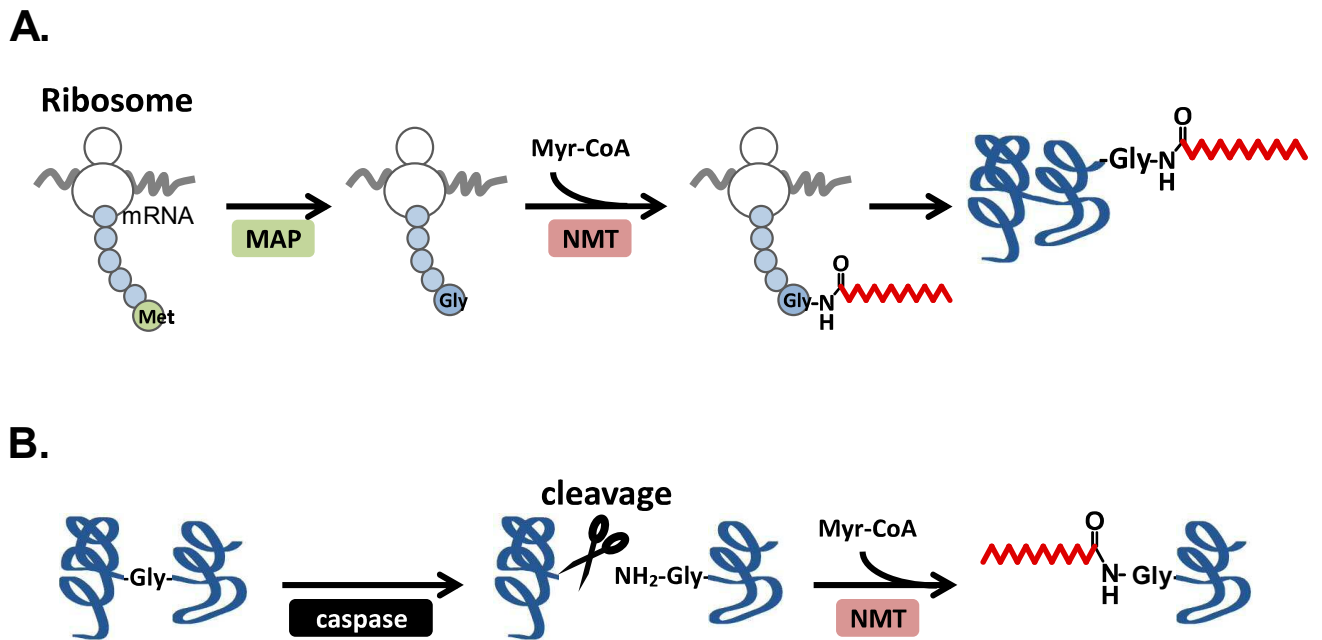


Fig. 1-1. Two types of protein N-myristoylation

A. Co-translational N-myristoylation.

B. Post-translational N-myristoylation occurring on caspase-cleavage products of specific caspase substrates.

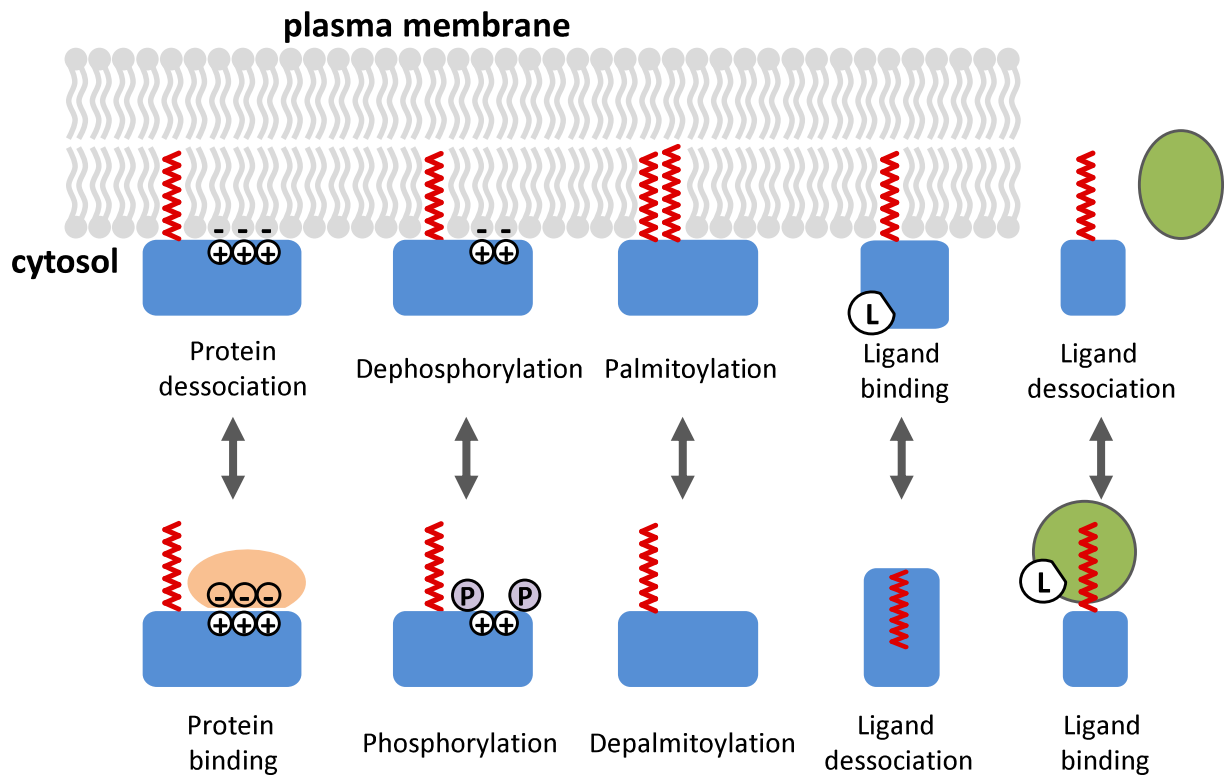


Fig. 1-2. Functional modulation of N-myristoylated proteins

a) elimination of polybasic motif by binding of specific protein. b) elimination of positive charges by phosphorylation. c) reversible palmitoylation. d, e) protein conformational changes induced by ligand binding.

れた[1-9]. その後、我々をはじめ複数のグループが、アクチン、ゲルゾリン、PAK2, PKC ϵ , Huntingtin といったカスパーゼ基質においても翻訳後 N-ミリスチル化が生じ、この修飾に伴いアポトーシスが正あるいは負に制御されることを報告している[1-10~1-12].

タンパク質 N-ミリスチル化の主な役割は、タンパク質を膜に結合させることであり、多くのリン酸化酵素や低分子量 G タンパク質が関与する情報伝達経路の調節に必須である。しかし、ミリスチル基の疎水性は低くそれ単独では膜に結合するとは限らないため、N-ミリスチル化タンパク質が安定して膜に結合するには第二のシグナルを必要とする(Fig. 1-2). 第二のシグナルとして、リジンやアルギニン等の複数の塩基性アミノ酸による正電荷のクラスターあるいはパルミチン酸修飾がある。がん原遺伝子として知られる c-Src では、膜と疎水性相互作用するミリスチル基に加え、N 末端 SH4 領域の正電荷のクラスター(ミリスチル基+正電荷クラスター)と原形質膜の細胞質側に存在するリン脂質との静電的相互作用により膜結合を安定化する。その他に、MARCKS, HIV-1 Gag, ヒサクトフィリンのようなタンパク質が膜結合の安定化に“ミリスチル基+正電荷クラスター”を利用している。正電荷クラスターを第二のシグナルとするタンパク質では、リン酸化修飾により静電的相互作用が弱められることで膜からの脱離が起こる。一方、その他の Src ファミリータンパク質(Yes, Fyn, Lyn など), ヘテロ三量体 G タンパク質の G α サブユニット(G α 1, G α 0, G α 2など), 内皮性一酸化窒素合成酵素(eNOS), AKAP(a kinase anchoring protein) などでは膜結合の安定化に可逆的な脂質修飾であるパルミトイル化が利用されている(ミリスチル基+パルミトイル基)。この場合、パルミトイル化により疎水性が増加し膜結合が安定化されるが、脱パルミトイル化により疎水性が再び低下すると膜からの脱離が起こる。このように、N-ミリスチル化タンパク質と膜との結合は第二のシグナルにより可逆的に調節されると考えられている。また、第二のシグナルとの組み合わせにより相互作用が異なることから、N-ミリスチル化タンパク質と膜との結合はそれぞれのタンパク質でその機能に応じて別々に調節することが可能となる[1-13]. N-ミリスチル化タンパク質の膜結合を制御するその他の機構として、リガンドとの結合で誘導されるタンパク質構造の変化がある。リカバリンや c-Abl チロシンリン酸化酵素のようないくつかのタンパク質では、分子内の疎水性ポケットへ自身のミリスチル基が結合し自己阻害状態となっているが、リガンドの結合によりタンパク質構造変化が誘導され、ミリスチル基が分子表面に突出する。その結果、膜結合が生じ活性化される。これらの機構は「ミリスチルスイッチ」と呼ばれ、ミリスチル基が重要な制御因子として働くことが知られている。

上記のように、タンパク質 N-ミリスチル化はタンパク質の膜への結合には必要であるが十分ではないこと[1-14, 1-15], またこの修飾は不可逆的修飾であることから、N-ミリスチル化タンパク質の挙動は主に可逆的な第二のシグナルにより調節されると考えられてきた。しかし、最近、N-ミリスチル化タンパク質の挙動を変化させる別の機構が存在することが明らかにされ、大きな注目を集めた。それは、フレクスナー赤痢菌で発見された毒素タンパク質 IpaJ による N 末端ペプチド結合切断に伴う不可逆的な脱ミリスチル化反

応である(Fig. 1-3 A). この研究では, 小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質であるヒト Arf の N 末端は N-ミリスチル化されるが, 2 位 Gly 残基と 3 位 Asn 残基の間のペプチド結合が IpaJ により切断され脱 N-ミリスチル化された Arf を生じること, また, IpaJ は細胞増殖, シグナル伝達, オートファゴソームの成熟および細胞小器官の機能に關与する他の多くの N-ミリスチル化タンパク質を切断することが確認された[1-16]. この切断により, 感染宿主細胞のシグナル伝達の全体像に顕著な変化が生じ, フレクスナー赤痢菌がその病原性を発現していると考えられる.

フレクスナー赤痢菌の例以外にも, 細胞情報伝達, 細胞内のタンパク質輸送やオルガネラ形成, アポトーシス, オートファジーの機構にタンパク質 N-ミリスチル化が關与し, さらにそれらの異常により, がんをはじめ神経変成疾患や感染症といった疾患が誘導されることが次々と明らかにされている.

ヒト遺伝性疾患であるヌーナン症候群と類似の疾患である Noonan-like syndrome では, Ras-MAPK 経路の制御タンパク質である SHOC2 において遺伝子変異により 2 位の Ser 残基が Gly へ変化し, N-ミリスチル化が生じる. このため, SHOC2 の細胞内局在が変化し, 成長因子刺激に伴う情報伝達に異常をきたし疾患が生じることが報告されている(Fig. 1-3 B)[1-17]. また, 神経変成疾患であるハンチントン病では, その発症に原因遺伝子産物である huntingtin (HTT) の翻訳後 N-ミリスチル化が關与している可能性が示された. 正常な HTT はカスパーゼによる切断を受け翻訳後 N-ミリスチル化され, オートファジーを誘導するのに対し, ハンチントン病患者の変異 HTT ではカスパーゼ切断とそれに続く翻訳後 N-ミリスチル化が阻害されオートファジーが阻害される(Fig. 1-3 C). このことがハンチントン病発症の原因の一つであると提唱されている[1-18].

発がんウィルスのガン遺伝子産物である Src ファミリータンパク質の研究により, 膜結合と細胞形質転換の促進にタンパク質 N-ミリスチル化が重要であることが以前から知られていたが[1-13, 1-19], N-ミリスチル化反応を触媒する NMT の発現が大腸がんや腺がんで上昇しており, NMT 基質である Src の活性が大腸がんや肺がん等で上昇していることが見出されている(Fig. 1-3 D). N-ミリスチル化タンパク質である FMNL2, FMNL3, BTBD7 では, その発現が大腸がんや肺がんで上昇していることも報告されている[1-20, 1-21]. このように N-ミリスチル化タンパク質の発現上昇ががん化につながる例が多数報告されている.

感染症においてもタンパク質 N-ミリスチル化の關与が見出されている. ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 の Gag タンパク質は宿主細胞 NMT により N-ミリスチル化され細胞質から原形質膜へと移行し, 原形質膜上でウイルス粒子形成や出芽に關与する. Gag タンパク質の N-ミリスチル化はウイルス粒子形成に必須で, ミリスチル化阻害によりウイルス粒子形成の抑制が可能となることが明らかとなっている[1-22]. がんや AIDS などの疾患では, NMT 阻害剤を治療へ応用する研究が進められている. しかし, これらの疾患では NMT 阻害剤は正常細胞の NMT にも作用し, 細胞情報伝達や生存, 成長に必須の 100 以上

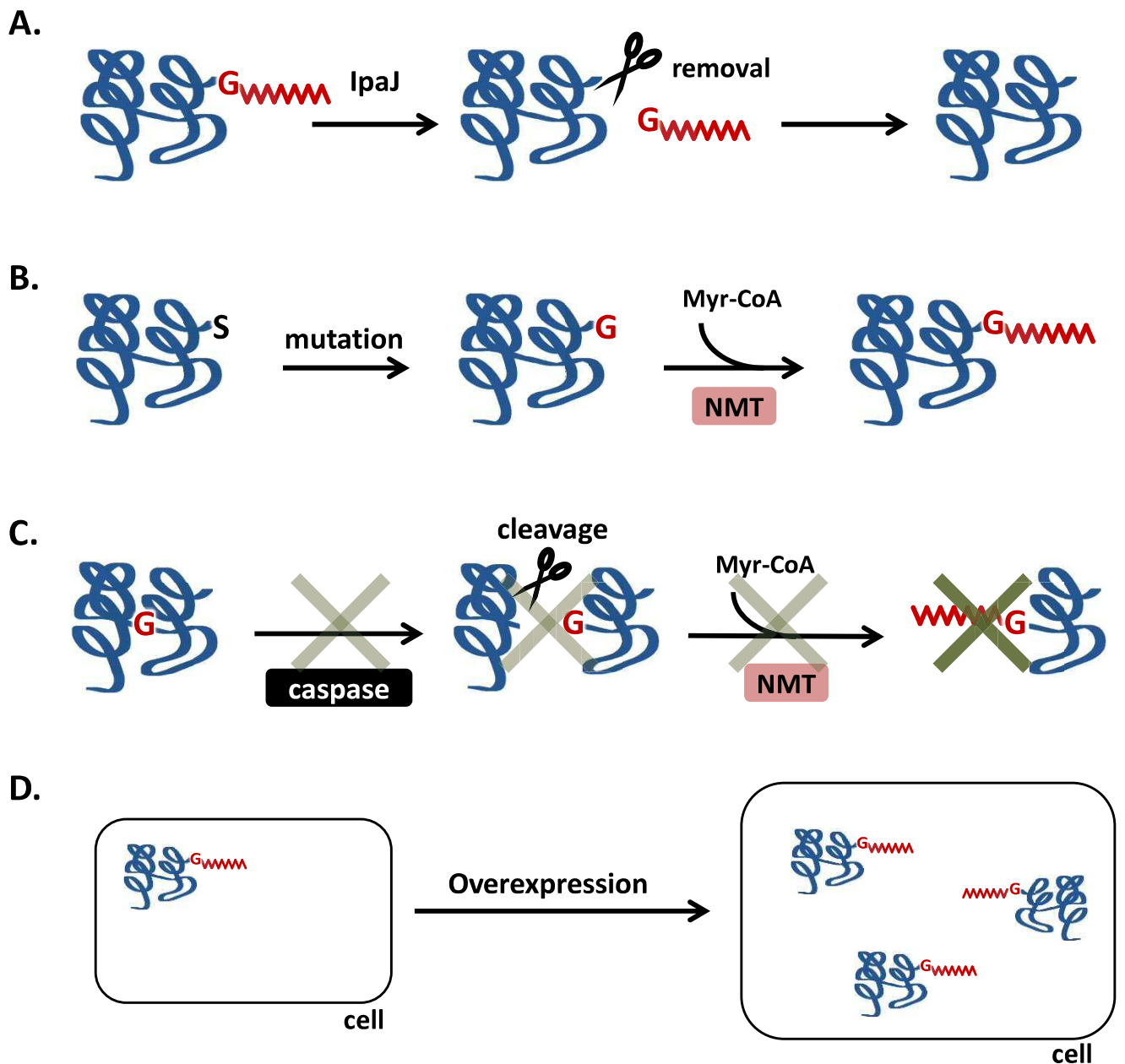


Fig. 1-3. Protein N-myristoylation in disease

- A. Enzymatic removal of N-myristoylated N-terminal moiety by the Shigella virulence factor IpaJ. (Shigellosis)
- B. Protein N-myristoylation resulting from point mutation. (Noonan-like syndrome)
- C. Inhibition of post-translational N-myristoylation. (Parkinson's disease)
- D. Overexpression of N-myristoylated proteins. (several types of cancer)

の N-ミリスチル化タンパク質の修飾も阻害するため、このことによる副作用を伴うことから、NMT を標的とした治療薬の実用化の目途は立っていない。

カンジダ症、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、マラリア等、菌類や原虫が原因となる多くの疾患においても病原性微生物の感染、生存、増殖に N-ミリスチル化タンパク質が必須であることが報告されている。ヒト NMT と菌類および寄生原虫 NMT はその配列に比較的高い相同性があり、類似したミリスチル CoA 結合部位を持っているが、タンパク質基質に対する結合部位はヒトと菌類または原虫 NMT では異なっている。そのため、これらの疾患では病原性微生物特異的 NMT 阻害剤を治療に応用する試みが進んでいる [1-23~1-25]。すでに *Candida albicans* において、抗菌剤として作用する NMT 阻害剤が開発されている [1-26]。リーシュマニア症でも、NMT が新薬の標的となり得る事を示すデータが報告されている [1-27]。また、トリパノソーマ症では、*Trypanosoma brucei* の NMT のペプチド結合部位に作用し NMT 活性を阻害するリード化合物が同定された [1-23]。これらの化合物は nM オーダーの濃度でトリパノソーマ原虫を駆除することができ、トリパノソーマ症マウスを用いた実験ではその効果が確かめられている。世界で年間 3 億人以上が罹患し死亡者数は 100 万人以上(WHO 推定)とされる重大な感染症の一つであるマラリアでは、薬剤耐性マラリアの出現により新たな抗マラリア薬の開発が急がれているが、その有力な候補として NMT 阻害剤の研究が進められている [1-24]。

タンパク質 N-ミリスチル化は真核細胞の全タンパク質の 0.5% [1-28]、その他の説によると 1-4% で起こる [1-29] といわれているが、正確には分かっていない。その理由として、1) 生体試料から脂質修飾タンパク質を同定することが技術的に難しい、2) 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、3) バイオインフォマティクスに基づく N-ミリスチル化予測ツール [1-30] が様々な研究チームにより開発されたが完全なものではなく、個別の実験による確認が必要である、等が挙げられる。N-ミリスチル化が予測されたタンパク質のうち、実験的に確認されたものはわずかであり [1-31]、その多くは未だに同定されていないと推定されている [1-28, 1-29, 1-32, 1-33]。

従来、タンパク質 N-ミリスチル化は、精製されたタンパク質を用いて MALDI-TOF MS 等の質量分析により検出されてきた。この検出法は特定のタンパク質に生じる脂質修飾とその修飾部位を明らかにする方法として優れているが、比較的多量の試料が必要であり、細胞毒性を有するタンパク質等、発現量が微量のタンパク質の同定は困難であった。質量分析以外の検出法としては、遺伝子導入した培養細胞を用いた RI-標識ミリスチン酸による代謝標識法が主に用いられてきた。この方法では、RI 実験施設の使用が必要で、RI 汚染の危険性、長い露光時間が必要であることなどの課題があり、これらの理由により N-ミリスチル化をはじめとする脂質修飾の検出はごく一部の研究者のみにより行われてきた。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、特にアジドとアルキンの間の付加環化反応を利用したクリックケミストリーと呼ばれる反応の開発であった (Fig. 1-4 A)。

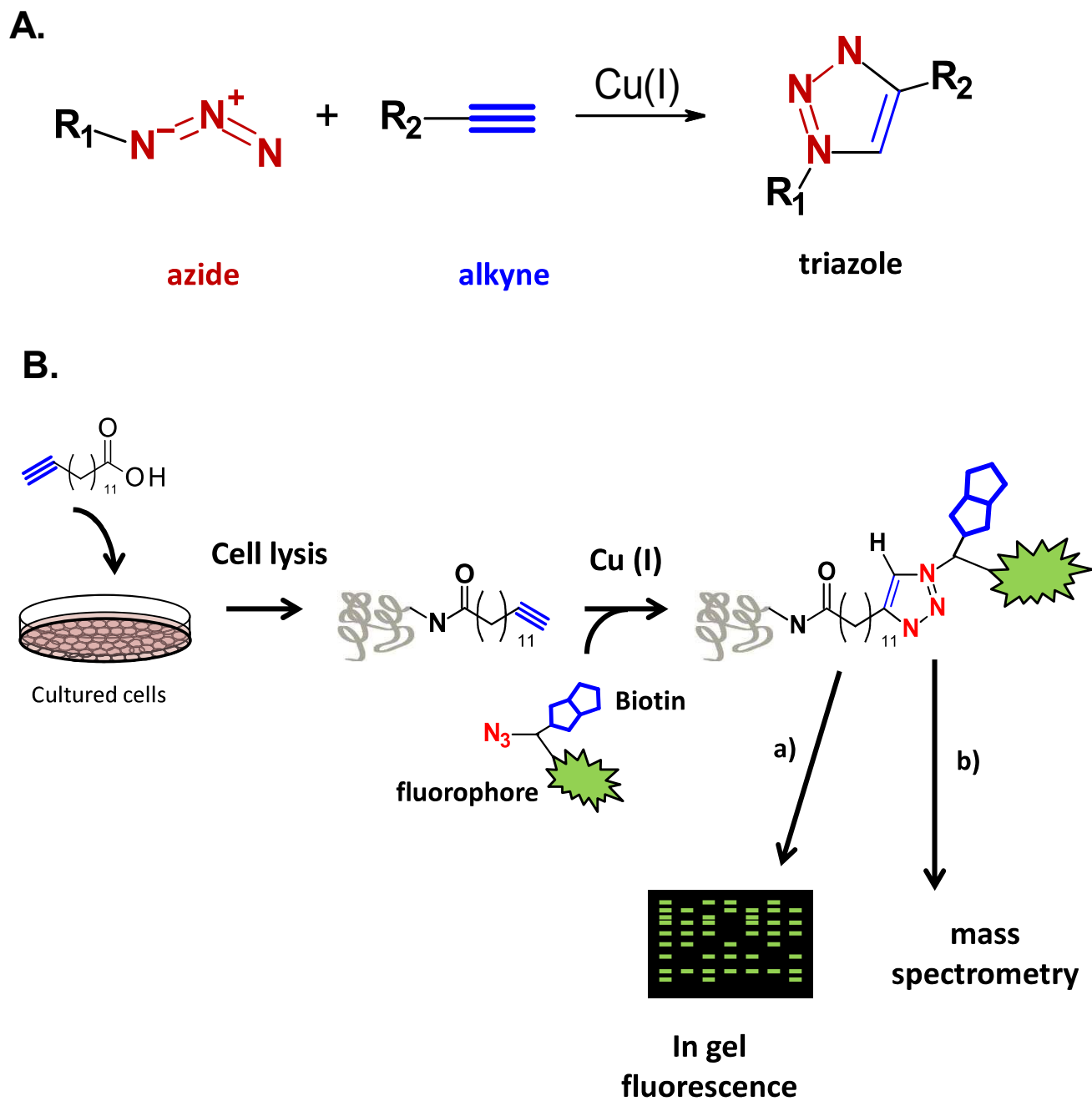


Fig. 1-4. Detection of protein N-myristoylation by bioorthogonal reaction

A. Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. B. Process for metabolic labeling of cellular N-myristoylated proteins with myristic acid analogues. Synthetic-alkynyl fatty acids are added to cultured cells and metabolically incorporated into proteins. After cell lysis, the alkynyl group is chemoselectively ligated to azide-biotin-fluorophore by a Cu (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. The tagged proteins are separated by gel electrophoresis and detected by in-gel fluorescence (a) or alternatively detected by mass spectrometry (b).

クリックケミストリーを用いた N-ミリスチル化の検出では、末端をアルキン化(あるいはアジド化)したミリスチン酸アナログを細胞に取り込ませタンパク質を標識し、細胞を溶解後、アジド化(あるいはアルキン化)した tag をクリックケミストリーにより付加し検出する (Fig. 1-4 B)[1-34, 1-35]. tag としてビオチンを使用した場合、ストレプトアビジンビーズを用いた N-ミリスチル化タンパク質の濃縮・精製が可能なおよび、SDS-PAGE から膜へ転写後ストレプトアビジン-HRP で N-ミリスチル化タンパク質を特異的に標識することができ、化学発光による検出・定量を行うことができる. tag として蛍光色素を使用した場合は SDS-PAGE ゲル上で直接 N-ミリスチル化タンパク質の蛍光検出が可能となる. これらの検出法は RI 標識基質を用いた検出法と比較して操作性および検出感度が飛躍的に向上した. さらに、最近ではビオチンと蛍光色素の両方の tag を含み、さらに切断可能な種々の tag の開発も進んでいる. このような tag を利用し、N-ミリスチル化タンパク質を濃縮・精製後 tag を切断し N-ミリスチル化された N 末端ペプチドを質量分析により直接同定する手法も確立されている [1-36]. これらのクリックケミストリーによる手法と同位体標識を用いた SILAC 法(定量性に優れ高感度な質量分析法)を組み合わせ、特定の細胞内で発現している N-ミリスチル化タンパク質の網羅的解析が行われている. 最近、この手法を用いて定常状態とアポトーシス誘導時における N-ミリスチル化タンパク質を HeLa 細胞において網羅的に解析した例が報告された [1-37]. その結果、定常状態において HeLa 細胞中には約 100 個の N-ミリスチル化タンパク質が発現していることが示された. またスタウロsporin によるアポトーシス誘導に伴い、翻訳と共役した N-ミリスチル化タンパク質の合成が阻害され、代わりに約 40 個もの翻訳後 N-ミリスチル化タンパク質が生ずることが明らかにされた. これらの定常状態およびアポトーシス誘導時に発現する N-ミリスチル化タンパク質の一部は、この解析によりはじめて同定された新規 N-ミリスチル化タンパク質であった. これらの中には、核タンパク質や膜貫通タンパク質といった、これまでほとんど N-ミリスチル化が生ずることが報告されていない種類のタンパク質が含まれていた. この例以外に、同様の手法を用いてヒト免疫不全ウイルス (HIV-1)、ヘルペスウイルス(HSV)、マラリア、リーシュマニアといった病原性ウイルスや原虫に感染した感染細胞の N-ミリスチル化タンパク質の網羅的解析が報告されている [1-24, 1-25, 1-38, 1-39]. その結果、病原性微生物の感染に伴い宿主細胞中に存在する N-ミリスチル化タンパク質の量および種類が大きく変化していることが明らかになってきた.

検出技術の発展に伴い、新たな N-ミリスチル化タンパク質が相次いで報告されているが、それぞれのタンパク質における N-ミリスチル化の機能の多くは未解析のまま残されている. また、上述のケミカルバイオロジーを応用した N-ミリスチル化タンパク質の同定法では、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を網羅的に同定することができる. しかし、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。そこで、ヒトゲノム全体を対象とした N-ミリスチル化タンパク質の網羅的な解析のためには、ゲノム全体をカバーする cDNA リソースを利用すればよいと考えられる。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。即ち、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系は、系内にヒト NMT の基質特異性と極めて類似した基質特異性を有する NMT を持ち、試験管内で効率良く N-ミリスチル化タンパク質を合成することができる。また、細胞では発現し難い、高分子量タンパク質や多重回膜貫通タンパク質、毒性を有するタンパク質も効率良く合成する活性を有している[1-40]。しかし、この手法にはまだ多くの改善の余地があり、また新たに見出された N-ミリスチル化タンパク質の機能解析も殆ど進んでいないのが現状であった。

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と、その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。第 2 章では、これまでに行った解析から新たに見出された小胞体膜タンパク質 **Protein lunapark** に生ずる N-ミリスチル化の機能の解析を行った。第 3 章では、無細胞タンパク質合成系における代謝標識とバイオインフォマティクスの手法を組み合わせ、cDNA リソースから効率よく新規 N-ミリスチル化タンパク質を同定する手法の確立と、その手法により見出されたミトコンドリア外膜タンパク質 **SAMM50** に生ずる N-ミリスチルの機能の解析を行った。第 4 章では、ケミカルバイオロジーの手法として知られるクリックケミストリーを利用し、無細胞タンパク質合成系において RI-標識基質を使用することなく、簡便に短時間で N-ミリスチル化を検出する手法の確立を行った。本論文はこれらの成果をまとめたものである。

1-1. 文献

- 1-1. Krishna RG, Wold F. (1993) Post-translational modification of proteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology.* 67:265-98.
- 1-2. 内海俊彦. (2010) 無細胞タンパク質合成系を用いた脂質修飾タンパク質の網羅的探索と機能解析. *生化学.* 82(9):799-813.
- 1-3. Resh MD. (2013) Covalent lipid modifications of proteins. *Curr Biol.* 23(10):R431-5.
- 1-4. Maurer-Stroh S, Eisenhaber F. (2004) Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends in microbiology.* 12(4):178-85.
- 1-5. Farazi TA, Waksman G, Gordon JI. (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem.* 276(43):39501-4. Epub 2001/08/31. doi: 10.1074/jbc.R100042200. PubMed PMID: 11527981.
- 1-6. Utsumi T, Sato M, Nakano K, Takemura D, Iwata H, Ishisaka R. (2001) Amino acid residue penultimate to the amino-terminal gly residue strongly affects two cotranslational protein modifications, N-myristoylation and N-acetylation. *J Biol Chem.* 276(13):10505-13.
- 1-7. Utsumi T, Nakano K, Funakoshi T, Kayano Y, Nakao S, Sakurai N, et al. (2004) Vertical-scanning mutagenesis of amino acids in a model N-myristoylation motif reveals the major amino-terminal sequence requirements for protein N-myristoylation. *European journal of biochemistry / FEBS.* 271(4):863-74.
- 1-8. Yang SH, Shrivastav A, Kosinski C, Sharma RK, Chen MH, Berthiaume LG, et al. (2005) N-myristoyltransferase 1 is essential in early mouse development. *J Biol Chem.* 280(19):18990-5.
- 1-9. Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science.* 290(5497):1761-5.
- 1-10. Utsumi T, Sakurai N, Nakano K, Ishisaka R. (2003) C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Letters.* 539(1-3):37-44.
- 1-11. Sakurai N, Utsumi T. (2006) Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *J Biol Chem.* 281(20):14288-95.
- 1-12. Martin DD, Beauchamp E, Berthiaume LG. (2011) Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie.* 93(1):18-31.
- 1-13. Resh MD. (2006) Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol.* 2(11):584-90.

- 1-14. Peitzsch RM, McLaughlin S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*. 32(39):10436-43.
- 1-15. Pool CT, Thompson TE. (1998) Chain length and temperature dependence of the reversible association of model acylated proteins with lipid bilayers. *Biochemistry*. 37(28):10246-55.
- 1-16. Burnaevskiy N, Fox TG, Plymire DA, Ertelt JM, Weigele BA, Selyunin AS, et al. (2013) Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the Shigella virulence factor IpaJ. *Nature*. 496(7443):106-9.
- 1-17. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. (2009) Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet*. 41(9):1022-6.
- 1-18. Martin DD, Ladha S, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. (2015) Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci*. 38(1):26-35.
- 1-19. Sigal CT, Zhou W, Buser CA, McLaughlin S, Resh MD. (1994) Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(25):12253-7.
- 1-20. DeWard AD, Eisenmann KM, Matheson SF, Alberts AS. (2010) The role of formins in human disease. *Biochim Biophys Acta*. 1803(2):226-33.
- 1-21. Zeng YF, Xiao YS, Lu MZ, Luo XJ, Hu GZ, Deng KY, et al. (2015) Increased expression of formin-like 3 contributes to metastasis and poor prognosis in colorectal carcinoma. *Experimental and molecular pathology*. 98(2):260-7.
- 1-22. Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD. (1994) Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol*. 68(4):2556-69.
- 1-23. Frearson JA, Brand S, McElroy SP, Cleghorn LA, Smid O, Stojanovski L, et al. (2010) N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature*. 464(7289):728-32.
- 1-24. Wright MH, Clough B, Rackham MD, Rangachari K, Brannigan JA, Grainger M, et al. (2014) Validation of N-myristoyltransferase as an antimalarial drug target using an integrated chemical biology approach. *Nat Chem*. 6(2):112-21.
- 1-25. Wright MH, Paape D, Storck EM, Serwa RA, Smith DF, Tate EW. (2015) Global analysis of protein N-myristoylation and exploration of N-myristoyltransferase as a drug target in the neglected human pathogen *Leishmania donovani*. *Chem Biol*. 22(3):342-54.
- 1-26. Masubuchi M, Ebiike H, Kawasaki K, Sogabe S, Morikami K, Shiratori Y, et al. (2003)

- Synthesis and biological activities of benzofuran antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. *Bioorg Med Chem.* 11(20):4463-78.
- 1-27. Brannigan JA, Smith BA, Yu Z, Brzozowski AM, Hodgkinson MR, Maroof A, et al. (2010) N-myristoyltransferase from *Leishmania donovani*: structural and functional characterisation of a potential drug target for visceral leishmaniasis. *J Mol Biol.* 396(4):985-99.
- 1-28. Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Eisenhaber F. (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J Mol Biol.* 317(4):523-40.
- 1-29. Martinez A, Traverso JA, Valot B, Ferro M, Espagne C, Ephritikhine G, et al. (2008) Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics.* 8(14):2809-31.
- 1-30. Meinnel T, Giglione C. (2008) Protein lipidation meets proteomics. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 13:6326-40.
- 1-31. Traverso JA, Giglione C, Meinnel T. (2013) High-throughput profiling of N-myristoylation substrate specificity across species including pathogens. *Proteomics.* 13(1):25-36.
- 1-32. Maurer-Stroh S, Gouda M, Novatchkova M, Schleiffer A, Schneider G, Sirota FL, et al. (2004) MYRbase: analysis of genome-wide glycine myristoylation enlarges the functional spectrum of eukaryotic myristoylated proteins. *Genome biology.* 5(3):R21.
- 1-33. Podell S, Gribskov M. (2004) Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC Genomics.* 5(1):37.
- 1-34. Hannoush RN. (2015) Synthetic protein lipidation. *Curr Opin Chem Biol.* 28:39-46.
35. Tate EW, Kalesh KA, Lanyon-Hogg T, Storck EM, Thinon E. (2015) Global profiling of protein lipidation using chemical proteomic technologies. *Curr Opin Chem Biol.* 24:48-57.
- 1-36. Broncel M, Serwa RA, Ciepla P, Krause E, Dallman MJ, Magee AI, et al. (2015) Multifunctional reagents for quantitative proteome-wide analysis of protein modification in human cells and dynamic profiling of protein lipidation during vertebrate development. *Angew Chem Int Ed Engl.* 54(20):5948-51.
- 1-37. Thinon E, Serwa RA, Broncel M, Brannigan JA, Brassat U, Wright MH, et al. (2014) Global profiling of co- and post-translationally N-myristoylated proteomes in human cells. *Nat Commun.* 5:4919.
- 1-38. Colquhoun DR, Lyashkov AE, Ubaida Mohien C, Aquino VN, Bullock BT, Dinglasan RR, et al. (2015) Bioorthogonal mimetics of palmitoyl-CoA and myristoyl-CoA and their subsequent isolation by click chemistry and characterization by mass

spectrometry reveal novel acylated host-proteins modified by HIV-1 infection. *Proteomics*. 15(12):2066-77.

- 1-39. Serwa RA, Abaitua F, Krause E, Tate EW, O'Hare P. (2015) Systems Analysis of Protein Fatty Acylation in Herpes Simplex Virus-Infected Cells Using Chemical Proteomics. *Chem Biol*. 22(8):1008-17.
- 1-40. Sakurai N, Moriya K, Suzuki T, Sofuku K, Mochiki H, Nishimura O, et al. (2007) Detection of co- and posttranslational protein N-myristoylation by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. *Anal Biochem*. 362(2):236-44.

第2章 小胞体膜タンパク質 protein Lunapark に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の解析

2-1 諸言

タンパク質 N-ミリスチル化は炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸がタンパク質の N 末端 Gly に付加する反応である[2-1~2-5]. この修飾は真核生物およびウィルスタンパク質に起こる脂質修飾としてよく知られている. 一般的に, 翻訳と共役して, ミリスチン酸は開始メチオニンの除去後, N 末端 Gly に付加する. 翻訳と共役した N-ミリスチル化に加えて, アポトーシス細胞において多くのカスパーゼ分解産物に翻訳後 N-ミリスチル化が起こることが確認されている[2-6~2-8]. 翻訳と共役した N-ミリスチル化と翻訳後 N-ミリスチル化はいずれも GCN5-関連 N-アセチル基転移酵素スーパーファミリーの一つである N-ミリスチルトランスフェラーゼ(NMT)により触媒される[2-9]. 多くの N-ミリスチル化タンパク質は細胞の構造や機能の調節に重要な役割を担っている. それらの中には, タンパク質リン酸化酵素, 脱リン酸化酵素, グアニンヌクレオチド結合タンパク質, カルシウム結合タンパク質, カスパーゼ基質など多種多様な細胞内情報伝達経路に関与するタンパク質が含まれている. 最近の研究から, これらの細胞内情報伝達経路に関与するタンパク質に加えて, タンパク質 N-ミリスチル化が多くの疾患関連タンパク質に起こることが明らかとなった[2-10~2-14]. 多くの場合, これらの N-ミリスチル化タンパク質の機能はタンパク質 N-ミリスチル化を介した可逆的なタンパク質 - 膜およびタンパク質 - タンパク質相互作用により調節される. したがって, タンパク質 N-ミリスチル化は主として細胞質タンパク質に起こるタンパク質修飾として認識されており, 膜貫通タンパク質が N-ミリスチル化され得ることはこれまでほとんど知られていない.

しかし, ウィルスタンパク質では, タンパク質 N-ミリスチル化が膜貫通タンパク質に起こることが見出されている. 複数回膜貫通タンパク質である B 型肝炎ウイルス(HBV)の Large L エンベロープタンパク質は N-ミリスチル化されるが, N-ミリスチル化はこのたんぱく質の細胞内での保持に関与しており, ウィルス感染に必須である[2-15~2-17]. Large L エンベロープタンパク質は膜を通過する pre-S ドメインの部分的な膜通過により 2 つの異なる膜上トポロジーを形成するという非常にまれな能力を持っているがそのメカニズムは不明である[2-18~2-20]. N-ミリスチル化された N 末端 pre-S ドメインを持つ HBV L タンパク質は宿主細胞への接着の際, レセプターとの結合を仲介することによりウィルスの生活環において重要な役割を担っている. このように, HBV L タンパク質の N-ミリスチル化はこのタンパク質の特異的機能の発現に不可欠な役割を果たしている.

真核細胞タンパク質については, 膜貫通タンパク質が N-ミリスチル化されることはほとんど報告されていない. 真核生物において, N-ミリスチル化されることが示された膜貫通タンパク質の一例として, 哺乳類 NADH-シトクロム b(5)還元酵素(b5R)が挙げられる. このタンパク質は N 末端を細胞外, C 末端を細胞質に向けた N-exo/C-cyto 配向性を持ち,

Endoplasmic reticulum(ER)とミトコンドリア外膜の両方に局在する 1 回膜貫通タンパク質である[2-21, 2-22]. b5R では, 非 N-ミリスチル化変異体は ER にのみ局在することから, タンパク質 N-ミリスチル化はミトコンドリアへの移行に必要であることは明らかである[2-23]. さらに, タンパク質 N-ミリスチル化はシグナル認識粒子と新生ペプチド鎖のシグナルペプチドとの相互作用に影響し, 新生ペプチド鎖の一部はシグナルペプチドを介した翻訳と共訳した ER への移行から逃れ, 翻訳後にミトコンドリア外膜へと移行する[2-24]. N-ミリスチル化が示された他の哺乳類膜貫通タンパク質としてはジヒドロセラミド Δ 4-不飽和化酵素 1(DES1)が知られている[2-25]. b5R と同様, DES1 は ER とミトコンドリア両方に局在すること, またタンパク質 N-ミリスチル化がミトコンドリアへの局在に機能することが示されている[2-26]. 加えて, タンパク質 N-ミリスチル化は, DES1 の酵素活性を促進することが明らかにされている[2-25, 2-27].

本研究では, 最近同定された N-ミリスチル化タンパク質のうち, そのアミノ酸配列から膜貫通領域を持つと予測された 4 つのタンパク質の中から, 新規ヒト N-ミリスチル化膜貫通タンパク質を探索した. その結果, 小胞体の網目状構造形成への関与が最近見出された酵母タンパク質 Lnplp[2-28]のヒトオルソログである protein Lunapark が N-ミリスチル化された複数回膜貫通タンパク質であることが明らかになった. Protein Lunapark は Lunapark ファミリータンパク質に属している. このタンパク質は四肢や中枢神経系の発生に関与すると予測されていた[2-29]. しかし, 最近の報告では, Lunapark の酵母オルソログ Lnplp は ER 膜タンパク質であり, ER のネットワーク形成に関与することが明らかになった[2-28]. このタンパク質の生理学的重要性にも関わらず, protein Lunapark の膜への組み込みや膜上トポロジーの生化学的特性評価は成されていない. 本研究では, 始めに protein Lunapark の膜への組み込みと膜上トポロジー形成における protein Lunapark 中に存在する 2 つの推定膜貫通領域の役割を検討した. その後, protein Lunapark の膜への組み込み, 膜上トポロジー形成, 細胞内局在, 生理的機能における protein Lunapark に生じるタンパク質 N-ミリスチル化の役割について検討を行った. その結果, 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機能し, これらにより N 末端および C 末端をいずれも細胞質に向けた N-cyto/C-cyto 配向性を持つ 2 回膜貫通タンパク質を生成させることが明らかとなった. また, タンパク質 N-ミリスチル化は protein Lunapark の膜通過, 膜上トポロジー形成, 細胞内局在に影響しないことが分かった. しかし, 興味深いことに, C 末端に FLAG タグを付加した protein Lunapark をコードする cDNA を遺伝子導入した HEK293T 細胞の免疫蛍光染色の結果から, 過剰発現した protein Lunapark は ER 周辺部に局在し, 大きな多角形のチューブ状構造の形成を誘導した. またこの現象は 2 位 Gly の Ala への置換によるタンパク質 N-ミリスチル化の阻害により顕著に抑制されることが明らかとなった. これらの結果はタンパク質 N-ミリスチル化が protein Lunapark の過剰発現で誘導される ER の形態変化に重要な役割を果たすことを示している. 我々の知る限りにおいて, これらの結果は, ヒトの N-ミリスチル

化された複数回膜タンパク質の膜通過，膜上トポロジー形成，細胞内局在および機能におけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割を解明した初めての報告である。

2-2 材料と方法

2-2-1 試薬

制限酵素，DNA 修飾酵素，RNase 阻害剤，Taq DNA ポリメラーゼはタカラ酒造社から購入した。昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系 Transdirect insect cell は島津製作所から提供された。RNase は Boehringer-Mannheim 社から購入した。[³H]Leucine，[³H]myristic acid および enhanced chemiluminescence (ECL) Prime Western blotting detection reagent は GE Healthcare 社から購入した。ENLIGHTNING は PerkinElmer 社から購入した。The dye terminator cycle sequencing kit は Applied Biosystems 社から購入した。Anti-FLAG モノクローナル抗体，fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG 抗体，myristoyl-CoA，CHCA，DHB，anti-Flag M2-agarose，Flag ペプチドはシグマ社から購入した。ER-tracker Red，Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG 抗体，Hoechst 33342 は Molecular Probes 社から購入した。ヒト cDNAs (Flexi ORF clones)，Ampliscribe T7 High Yield Transcription IVT kit，T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System は Promega 社から購入した。ProteoExtract subcellular proteome extraction kit は Merck KGaA 社から購入した。その他の試薬は和光純薬工業，第一化学薬品，生化学工業の特級または分子生物学グレードを用いた。

2-2-2 発現プラスミドの構築

発現プラスミド構築に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列は Table 2-1 にまとめた。哺乳類細胞における発現ベクターとして用いたプラスミド pcDNA3-FL は前述した方法に従って構築した[2-30]。C 末端に FLAG タグを付加した全長 KOP cDNA クローンを含むプラスミド (ARF1-FLAG，SERINC1-FLAG，KIAA1609-FLAG，Lunapark-FLAG，ZZEF1-FLAG) の構築では，pcDNA3-FL を SgfI および EcoRV で制限消化し，SgfI および PmeI で制限消化した KOP cDNA クローンをサブクローニングした。昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における発現ベクターとして用いたプラスミド pTD1-FL は前述した方法に従って構築した[2-30]。C 末端に FLAG タグを付加した全長 KOP cDNA クローンを含むプラスミド pDT1-FL の構築では，pTD1-FL を SgfI および EcoICRI で制限消化し，SgfI および PmeI で制限消化した KOP cDNA クローンをサブクローニングした。プラスミド pBpro-GLC-TNF は前述の方法に従って構築した[2-31]。この変異体では，N-グリコシル化部位 (Asn-X-Ser) を tumor necrosis factor (TNF) の成熟領域の 45-47 位に導入した。プラスミド pcDNA3ΔMet-GLC-TNF ， pcDNA3pro-GLC-TNF ， pcDNA3Lunapark-TM1-GLC-TNF ， pcDNA3Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF ， pcDNA3Lunapark-TM1/2-GLC-TNF， pcDNA3Lunapark-GLC-TNF の構築は Table 2-2

Table 2-1 The nucleotide sequences of oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence
Primer-N1	5'-gcgcggtaccgtcagatcatcttct-3'
Primer-C1	gcgctcgagtcacagggcaatgat
Primer-N2	gcgcggtaccatgagcactgaaagc
Primer-C2	gcgctcgagtcacagggcaatgat
Primer-N3	gcgcggtaccatgggtggattattt
Primer-C3	gcgcgaattctcttgctgtaaattc
Primer-N4	gcgcgatatcatggctggattatctcga
Primer-C4	gcgctcgagtcacagggcaatgat
Primer-N5	gcgcggtaccatgggtggattattt
Primer-C5	gcgcgaattctgcttcattatttct
Primer-N6	gcgcggtaccatgggtggattattt
Primer-C6	gcgcgaattcctctgccgtcaaaga
Primer-N7	accatggctggattatctcctgat
Primer-C7	taatccagccatggttctatctcct
Primer-N8	tagcacagcaggcattttctcataatggcatg
Primer-C8	atgcctgctgtgctataagtgcatacctgtt
Primer-N9	gagcagcctacgcatttttcttgaaccctgca
Primer-C9	atgcgtaggctgctcgaagcaatgtattc
Primer-N10	gatcggatccatggtgagcaagggc
Primer-C10	gcgcgaattccttgtagctcgtc
Primer-N11	atatgaattccctggtccgacccc
Primer-C11	gcgcgatatcctacgaacgagtgtg
Primer-N12	gcgcggtaccatggtggtcctcagcctc
Primer-C12	gcgcgaattccagggcaatgatccc
Primer-N13	gcgcggtaccatggtggtcctcagcctc
Primer-C13	gcgctcgagtcacagggcaatgat
Primer-N14	gcgcgaattcgatgaatttacagca
Primer-C14	gcgctcgagttacttatcgtcgtcatccctgtaatcttcattatttctttc
Primer-N15	gcgcgaattcgatgaatttacagca
Primer-C15	gcgctcgagttacttatcgtcgtcatccttgtaatctcttgctgtaaattcatc

Table 2-2 The strategies for construction of plasmids used in this study.

Name of plasmid	Strategy for plasmid construction
pcDNA3ΔMet-GLC-TNF	product of a PCR with pBpro-GLC-TNF as template and primers Primer-N1 and Primer-C1 was EcoRI/XhoI cloned into pcDNA3
pcDNA3pro-GLC-TNF	product of a PCR with pBpro-GLC-TNF as template and primers Primer-N2 and Primer-C2 was KpnI/XhoI cloned into pcDNA3
pcDNA3Lunapark-TM1-GLC-TNF	product of a PCR with pF1KSDA-1715(Promega) as template and primers Primer-N3 and Primer-C3 was KpnI/EcoRI cloned into pcDNA3ΔMet-GLC-TNF
pcDNA3Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF	product of a PCR with pcDNA3Lunapark-TM1-GLC-TNF as template and primers Primer-N4 and Primer-C4 was EcoRV/XhoI cloned into pcDNA3
pcDNA3Lunapark-TM1/2-GLC-TNF	product of a PCR with pF1KSDA-1715 as template and primers Primer-N5 and Primer-C5 was KpnI-EcoRI cloned into pcDNA3ΔMet-GLC-TNF
pcDNA3Lunapark-GLC-TNF	product of a PCR with pF1KSDA-1715 as template and primers Primer-N6 and Primer-C6 was KpnI/EcoRI cloned into pcDNA3ΔMet-GLC-TNF
pcDNA3EGFP	product of a PCR with pEGFP-N1(Invitrogen) as template and primers Primer-N10 and Primer-C10 was BamHI/EcoRI cloned into pcDNA3
pcDNA3EGFP-Sec61β	product of a PCR with IRAL006J08 as template and primers Primer-N11 and Primer-C11 was EcoRI/EcoRV cloned into pcDNA3EGFP
pcDNA3H14-TNF-Δtrm	product of a PCR with pBH14-TNF as template and primers Primer-N12 and Primer-C12 was KpnI/EcoRI cloned into pcDNA3
pcDNA3H14-TNF	product of a PCR with pBH14-TNF as template and primers Primer-N13 and Primer-C13 was KpnI/XhoI cloned into pcDNA3
pcDNA3H14-TNF-Lunapark-TM2	product of a PCR with pF1KSDA-1715 as template and primers Primer-N14 and Primer-C14 was EcoRI/XhoI cloned into pcDNA3H14-TNF-Δtrm
pcDNAH14-TNF-Lunapark-ΔTM2	product of a PCR with pF1KSDA-1715 as template and primers Primer-N15 and Primer-C159 was KpnI/XhoI cloned into pcDNA3H14-TNF-Δtrm

にまとめた. プラスミド pcDNA3Lunapark-G2A-FLAG は, 2つのオリゴヌクレオチド, Primer-N7 および Primer-C7 をプライマーとし, pcDNA3Lunapark-FLAG をテンプレートとして Prime STAR Mutagenesis Kit(タカラ酒造社製)を用いて構築した. Lunapark-FLAG の Cys276, Cys279, Cys298 および Cys301 を Ala に置換したプラスミド pcDNA3-Lunapark-CtoA-FLAG は Prime STAR Mutagenesis Kit を用いて次のように構築した. 始めに, 2つのオリゴヌクレオチド, Primer-N8 および Primer-C8 をプライマー, pcDNA3Lunapark-FLAG をテンプレートとして PCR により pcDNA3Lunapark-C276,279A-FLAG を構築した. 次に, 2つのオリゴヌクレオチド, Primer-N9 および Primer-C9 をプライマー, pcDNA3Lunapark-C276,279A-FLAG をテンプレートとして PCR により pcDNA3-Lunapark-CtoA-FLAG を構築した. プラスミド pBH14-TNF(以前 pB Δ -75-47,-32-1pro-TNF と表記)は前述の方法に従って構築した[2-32]. プラスミド pcDNA3EGFP, pcDNA3EGFP-Sec61 β , pcDNA3H14-TNF- Δ trm, pcDNA3H14-TNF, pcDNA3H14-TNF-Lunapark-TM2, pcDNA3H14-TNF-Lunapark- Δ TM2 の構築については Table 2-2 にまとめた. これらの組み換え cDNA の DNA 配列はジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認した.

2-2-3 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質 N-ミリスチル化の検出

cDNA は pTD1 ベクター(島津製作所製)の T7 プロモーター下流にサブクローニングした. cDNA をコードする mRNA は AmpliScribe T7 High Yield Transcription Kit を用い, 付属の取り扱い説明書に従い調製した. 翻訳反応は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系(島津製作所製)を用いて [3 H]leucine または [3 H]myristic acid 存在下にてメーカー推奨条件で行った. 反応混合液(昆虫培養細胞溶解液(12.5 μ L), 反応バッファー(7.5 μ L), 1 mM アミノ酸混合液(ロイシンフリー)(0.5 μ L), [3 H]leucine (2 μ Ci)または [3 H]myristic acid (40 μ Ci)(2.0 μ L), mRNA (5 mg/2.5 μ L))を 25°C で 6 時間インキュベートした. その後, サンプルを SDS-PAGE およびフルオログラフィーにより解析した.

2-2-4 Protein Lunapark の *in vitro* 合成およびアフィニティー精製

Protein Lunapark をコードする mRNA は付属の取扱説明書に従い T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System を用いて 40 μ L スケールで合成した. 反応完了後, *in vitro* 転写反応液に 25mM EDTA (60 μ L)を添加した. その後, 反応液を *in vitro* 翻訳反応のテンプレートとして用いた. *in vitro* 翻訳反応は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて 50 μ M myristoyl-CoA 存在下 1 mL スケールで行った. FLAG タグ付加タンパク質のアフィニティー精製は前述の方法に従って行った[2-33].

2-2-5 *in vitro* 合成 protein Lunapark の MS および MS/MS 解析

MS 解析のためのサンプル調製は前述の方法に従って行った[2-33]. MS スペクトルおよび MS/MS スペクトルは reflectron positive ion mode において, それぞれ AXIMA-CFR plus MALDI-TOF MS 装置および AXIMA-QIT MALDI QIT-TOF hybrid mass spectrometer (Shimadzu/Kratos)により得た.

2-2-6 培養細胞への遺伝子導入と N-ミリストイル化および N-グリコシル化タンパク質の同定

COS-1 細胞(SV40 により形質転換したアフリカミドリザル腎由来細胞株, ATCC より)および HEK293T 細胞(ヒト胎児腎細胞株)は 10%ウシ胎児血清(FCS, Gibco BRL 社製), 100 unit/ml ペニシリン, 100ug/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma 社製)で 37°C, 5%CO₂条件下で培養した. 遺伝子導入前日に直径 35mm 培養皿に 2 × 10⁵ 個の細胞を播種した. Lipofectamine (4 μL), 無血清培地(1 mL)を用い, Flag タグ付加または EGFP タグ付加または TNF 融合タンパク質 cDNA 配列を含む発現プラスミド pcDNA3(2ug)を細胞へ遺伝子導入した. 37°Cで 5 時間インキュベート後, 血清添加培地に交換し 37°Cで 24 時間再インキュベートした. タンパク質 N-ミリストイル化の同定では, 培養細胞を無血清 DMEM 培地(1 mL)で 2 回洗浄後, [³H]myristic acid (100 μCi/mL)および 2% FCS を添加した 1mL DMEM 中, 37°Cで 6 時間インキュベートした. 続いて, 培養細胞を Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)で 3 回洗浄後, 細胞を回収し, RIPA buffer(50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1% sodium deoxysulfate (SDS),プロテアーゼ阻害剤) 200 μL で溶解後, 氷上で 20 分間放置し細胞溶解液を得た. その後, サンプルは SDS-PAGE およびフルオログラフィーにより解析した. TNF 変異体の N-グリコシル化試験では, 遺伝子導入 24 時間後, 上記の方法により全細胞溶解液を取得後, それぞれのサンプルのうち 20 μL を 10 mU/mL glycopeptidase F により 37°Cで 1 時間処理した. その後, Western blotting で解析した.

2-2-7 細胞分画

KIAA1609-FLAG または Lunapark-FLAG を発現させた COS-1 細胞の細胞分画は前述 [2-34]の方法に従って ProteoExtract subcellular proteome extraction kit (Merck 社製)を用いて行った. 2 × 10⁵ 個の COS-1 細胞に 2 μg の pcDNA3KIAA-FLAG または pcDNA3Lunapark-FLAG を遺伝子導入後, 37°Cで 24 時間インキュベートした. 氷冷した洗浄 Buffer で 2 回洗浄後, 氷冷した抽出 Buffer I 0.5 mL を添加し 4°Cで 10 分間インキュベートした. その後, 上清を回収し, 細胞質画分として用いた. 続いて, 氷冷した抽出 Buffer II 0.5mL を添加し 4°Cで 10 分間インキュベート後, 上清を回収し膜および細胞小器官画分として用いた. さらに, 氷冷した抽出 Buffer III 0.5mL を添加し 4°Cで 10 分間インキュベ

ート後、上清を回収し核画分として用いた。

2-2-8 ウェスタンブロッティング

タンパク質は 12.5% SDS-PAGE により分離後、Immobilon-P 膜へ転写した。スキムミルクでブロッキング後、抗 FLAG 抗体または抗 TNF 抗体と反応させた。抗体と反応したタンパク質はプロテイン G-HRP 複合体により特異的に標識した。その後、ECL Prime Western blotting detection reagent と反応させ、化学発光を X 線フィルムへの露光により検出した。

2-2-9 SDS-PAGE およびフルオログラフィー

サンプルを SDS-Sample buffer 中で 3 分間煮沸し変性させ、12.5% SDS-PAGE により分離した。ゲルを固定後、ENLIGHTNING (PerkinElmer 社製)中に 20 分間浸漬した。その後、ゲルを加温吸引により乾燥させ、適切な期間 X 線フィルムに露光させた。

2-2-10 免疫蛍光染色、蛍光顕微鏡観察および ER 形態変化の定量

免疫蛍光染色には遺伝子導入後 24 時間経過した細胞を用いた[2-35]。免疫蛍光染色では、細胞を DPBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(DPBS 中)で 15 分間インキュベートし固定した。固定化された細胞を 0.1% Triton X-100(DPBS 中)で 10 分間室温で透過性処理後、0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄した。透過性細胞は DPBS 中 1000 倍希釈抗 FLAG 抗体中に一時間室温で浸漬した。0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄後、細胞を FITC 標識-抗マウス抗体または Alexa Fluor 594 標識抗マウス IgG 抗体と一時間室温で反応させた。0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄後、マウンティングメディウム(VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories 社製)を用いて封入し、Leica AF7000 蛍光顕微鏡(Leica 社製)により観察した。

2-2-11 統計分析

統計分析は両側 t 検定(マイクロソフト エクセル)を用いて行った。p が 0.05 以下の場合に二群の平均に統計的に有意な差があるものとした。

2-3 結果

2-3-1 膜貫通型タンパク質である protein Lunapark は N-ミリスチル化されている

はじめに、最近同定された N-ミリスチル化タンパク質のうち、膜貫通ドメインの存在が予測された 4 つのタンパク質を用いて新規 N-ミリスチル化膜タンパク質を探索した。以前の研究で、我々は無細胞タンパク質合成系を用いて代謝標識と質量分析により約 2000

個の KOP ヒト cDNA クローンから 18 個の新規 N-ミリスチル化タンパク質を同定した [2-30]. バイオインフォマティクスによる膜タンパク質予測システムである SOSUI[2-36] を用いてこれらのタンパク質を分析した結果, 18 個の新規 N-ミリスチル化タンパク質のうち 4 つが膜貫通タンパク質であることが示唆された. そこで, 本研究では, これらのタンパク質の膜局在および膜組み込みについて調べた. 本研究で解析した 4 つの N-ミリスチル化タンパク質 (serine incorporator 1 (Serinc1), KIAA1609, protein Lunapark (Lunapark), ZZEF1) をコードする cDNA クローンの特徴を Table 2-3 に示した. これらのタンパク質が N-ミリスチル化されることを確かめるために, C 末端に FLAG タグを付加したタンパク質をコードする mRNA を用いて無細胞タンパク質合成系において代謝標識を行った. この実験では, C 末端に FLAG タグを付加した ARF1 をポジティブコントロールとして用いた. Fig.2-1B の左パネルに示したように, [³H]ロイシンの取り込みによりすべてのタンパク質の発現が確認された. この際, SDS-PAGE ゲルにおける SERINC1 の *in vitro* 翻訳産物の相対移動度は非常に低かったが, これは多くの膜貫通ドメインを持つためであると推定された. Fig.2-1B 右パネルに示したように, [³H]ミリスチン酸の取り込み結果から, すべての翻訳産物が効率よく N-ミリスチル化されることが明らかとなった. これらの cDNA を COS-1 細胞に遺伝子導入し [³H]ミリスチン酸で代謝標識し, 遺伝子導入細胞の細胞溶解液をウェスタンブロッティングにより解析した結果, 2 つのタンパク質 (KIAA1609 および protein Lunapark) だけが効率よく発現することが分かった (Fig.2-1C 左パネル). Fig.2-1C 右パネルに示したように, [³H]ミリスチン酸の取り込み結果から, 発現した 2 つのタンパク質はどちらも効率よく N-ミリスチル化されることが示された. これら 2 つのタンパク質の細胞内局在を明らかにするために, COS-1 細胞を用いて発現させ, 細胞分画実験を行った. Fig.2-1D に示したように, 膜/細胞小器官マーカータンパク質である PDI と同様に, protein Lunapark は膜/細胞小器官画分のみ分画された. 一方, KIAA1609 は細胞質画分および膜/細胞小器官画分の両方に分画された. これらの結果は KIAA1609 が膜貫通型タンパク質ではないことを示している. そのため, その後の実験においては protein Lunapark についてのみ解析を行った. Protein Lunapark は protein Lunapark ファミリーに属しており, 四肢や中枢神経系の発生に関与する可能性が報告されている [2-29]. しかし, 最近の報告では, protein Lunapark の酵母におけるオルソログ, Lnplp が ER 膜タンパク質であり, ER のネットワーク形成に関与することが報告されている [2-28]. 植物, 菌類から *Caenorhabditis elegans*, ショウジョウバエ, 脊椎動物のような動物に至るまで protein Lunapark には多くのオルソログが存在する. 種間配列比較により, このタンパク質ファミリーにおいて N 末端 N-ミリスチル化モチーフ, 2 つの推定膜貫通ドメイン, C 末端ジンクフィンガーモチーフが高度に保存されていることが明らかとなった (Fig.2-2).

Table 2-3. Characteristics of the Gene Products of the four cDNA Clones

Protein name	Gene name	Accession no.	Length (aa)	Protein function	No of putative transmembrane domains	
FXC00782	Serine incorporator 1	SERINC1	AB384156	453	Serine incorporator	11
FXC00876	TLD domain-containing protein KIAA1609	KIAA1609	AB384249	456	Unknown	1
FXC00896	Protein Lunapark	LNP	AB384269	428	Unknown	2
FXC01083	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	ZZEF1	AB384472	2961	Unknown	2

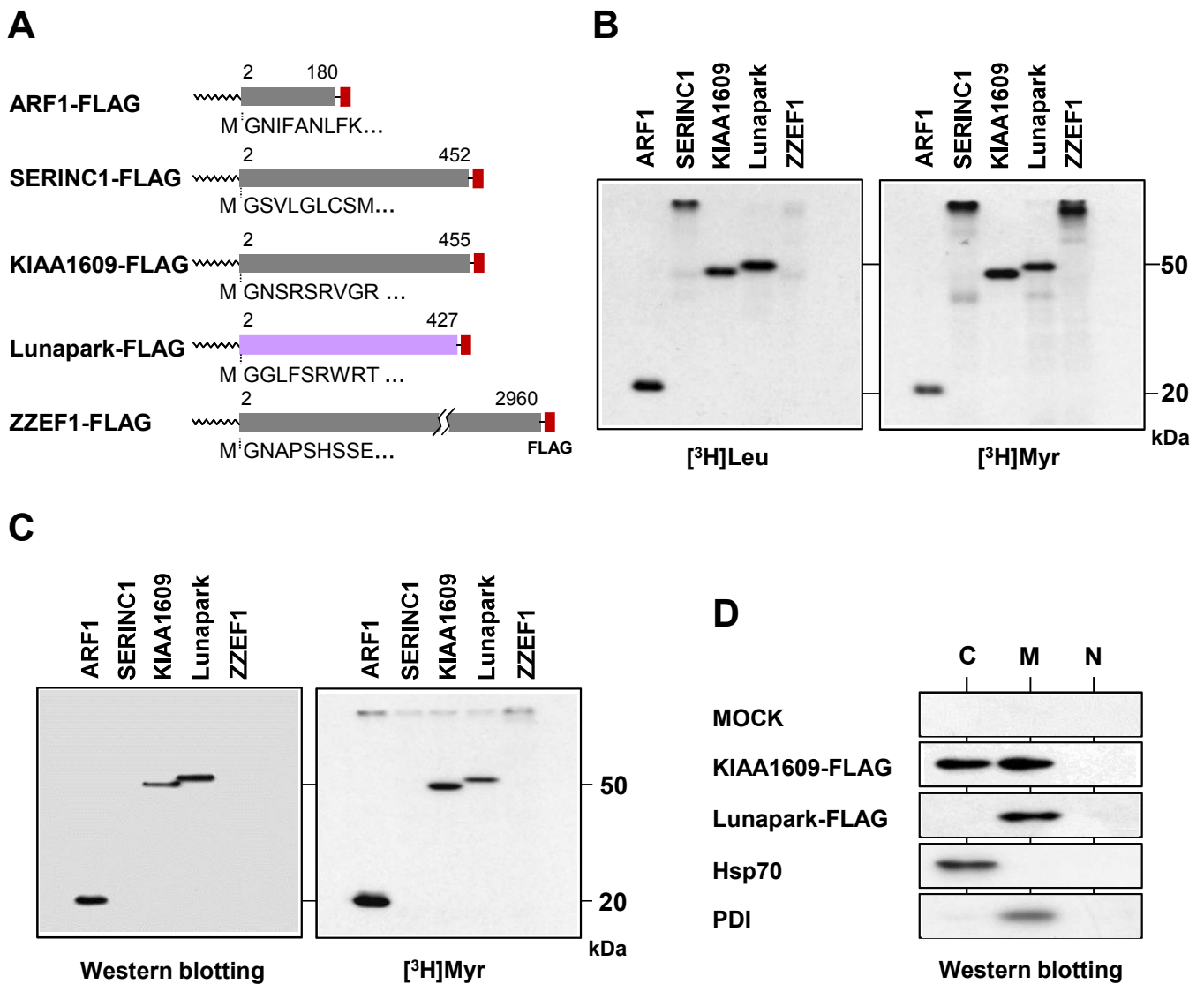


Fig. 2-1. Protein Lunapark is an N-myristoylated integral membrane protein.

A. Structure and N-terminal sequence of cDNA clones analyzed in this study. B. mRNAs encoding ARF1-, SERINC1-, KIAA1609-, Lunapark- and ZZE1-FLAG were translated in vitro in the presence of [³H]leucine ([³H]Leu) or [³H]myristic acid ([³H]Myr) using an insect cell-free protein synthesis system. The labeled translation products were analyzed by SDS-PAGE and fluorography. C. cDNAs encoding ARF1-, SERINC1-, KIAA1609-, Lunapark- and ZZE1-FLAG were transfected in to COS-1 cells, and their expression and N-myristoylation of the products were evaluated by Western blotting analysis and [³H]myristic acid labeling, respectively. D. KIAA1609-FLAG and Lunapark-FLAG were expressed in COS-1 cells, and subcellular fractionation experiments were performed. Hsp70 was used as a cytosolic marker protein and PDI was used as membrane/organelle marker protein. C, cytosolic fraction; M, membrane/organelle fraction; N, nuclear fraction.

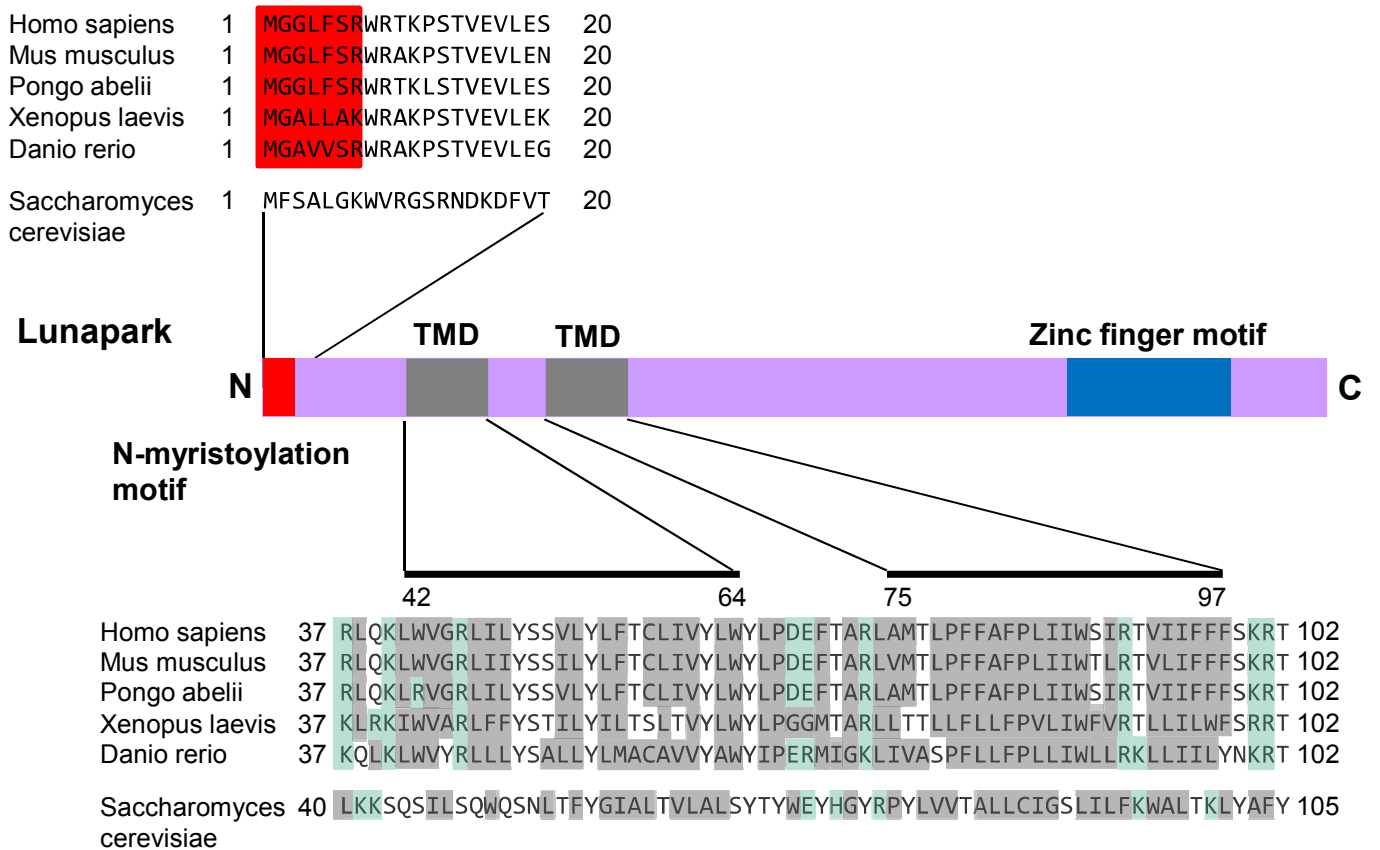


Fig. 2-2. Structure of protein Lunapark.

Alignment of the N-terminal sequences and the transmembrane domains (TMDs) of the Lunapark family of proteins is shown. N-myristoylation motifs are shown in red in the N-terminal sequence. Hydrophobic amino acids are shown in grey and charged amino acids in blue in the transmembrane domain and their flanking regions. The predicted transmembrane domains are indicated as solid lines.

2-3-2 無細胞タンパク質合成系で合成した protein Lunapark を用いたタンパク質 N-ミリスチル化の解析

Protein Lunapark の N 末端 Gly 残基にタンパク質 N-ミリスチル化が起こることを確認するために、無細胞タンパク質合成系で合成した protein Lunapark について質量分析を行った。昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系で合成し、アフィニティー精製した protein Lunapark は、SDS-PAGE ゲル分析において見かけの分子量 49kDa の主バンドとして検出された(Fig.2-3A)。このタンパク質バンドをゲルから切り出し還元、S-アルキル化した後、トリプシンで消化し、トリプシン消化物を MALDI-TOF MS で分析した。その結果、検出されたトリプシン消化ペプチドのほとんどは protein Lunapark に由来するものであることが明らかとなった(Fig.2-3B)。N-ミリスチル化されたトリプシン消化ペプチドに相当するピークは m/z 846.55 に観察された(Fig.2-3B)。MS/MS 分析により、このピークは protein Lunapark の N-ミリスチル化されたトリプシン消化断片で、N-ミリスチル-Gly-Gly-Leu-Phe-Ser-Arg であることが同定された(Fig.2-3C)。これらの結果により、protein Lunapark の N 末端 Gly 残基にタンパク質 N-ミリスチル化が起こることが明白に示された。

2-3-3 Protein Lunapark の膜通過と膜上トポロジーの解析

Protein Lunapark の膜組み込みと膜上トポロジーについて生化学的解析はなされていなかったため、2つの推定膜貫通領域およびそれらの隣接領域と TNF との融合タンパク質を用いてこれらの領域の役割を検討した。Fig.2-4B, レーン 2 に示したように、TNF 成熟領域中に N-グリコシル化部位を持つモデル N-グリコシル化 II 型膜貫通タンパク質(N 末端細胞質側/C 末端内腔側の膜上トポロジーを持つ一回膜貫通タンパク質)である pro-GLC-TNF を COS-1 細胞で発現させた場合、細胞全溶解液中に約 30 kDa のタンパク質バンドが検出された。このタンパク質をグリコペプチダーゼ F(GPF)処理すると、タンパク質バンドの見かけの分子量が約 4kDa 小さくなった(約 26 kDa, Fig.2-4B, レーン 3)。このことは、COS-1 細胞で発現させた場合、pro-GLC-TNF が N-グリコシル化されることを示している。この場合、20 kDa の TNF が細胞培養上清中に検出されたことから(Fig.2-4B, レーン 1)、pro-GLC-TNF が細胞表面で切断され、分泌型 N-グリコシル化 TNF が生じることが示唆された。Protein Lunapark の推定第 1 膜貫通領域(TM1)およびその隣接領域を含む N 末端 73 アミノ酸の C 末端側に pro-GLC-TNF の成熟ドメインを融合させた Lunapark-TM1-GLC-TNF を用いて同じ実験を行った結果、GPF 処理後のタンパク質分子量に同様の減少が観察された(Fig.2-4B, レーン 5, 6)。細胞培養上清中にタンパク質バンドが検出されなかったことから、細胞表面上において Lunapark-TM1-GLC-TNF の切断が起こらなかったことが示された(Fig.2-4B, レーン 4)。これらの結果から、protein Lunapark の TM1 とその隣接領域が II 型シグナルアンカー配列として機能し、II 型(N 末端細胞質側/C 末端内腔側)膜上トポロジーを持つ一回膜貫通タンパク質を生じさせることが示された。

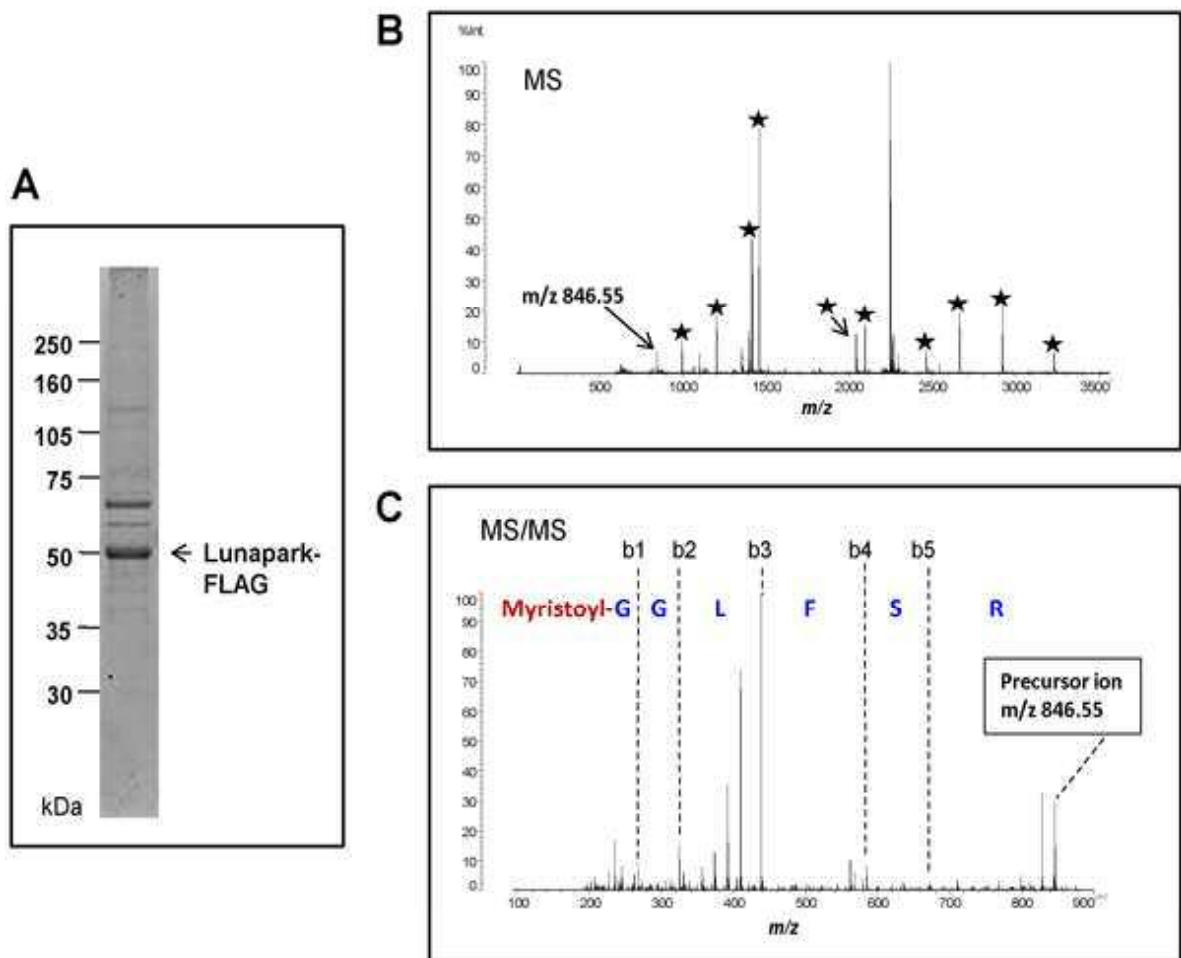


Fig. 2-3. Detection of protein N-myristoylation in in vitro-synthesized protein Lunapark by MS analysis.

A. Purified in vitro-synthesized protein Lunapark (1 μ g) was separated by electrophoresis in an SDS-PAGE gel (12.5%). B. MALDI-MS of the tryptic peptides from in vitro-synthesized protein Lunapark. The peaks of the tryptic peptides derived from in vitro-synthesized protein Lunapark are indicated by stars. C. MS/MS analysis was performed for the peak at m/z 846.55. The identified N-myristoylated N-terminal sequence is shown.

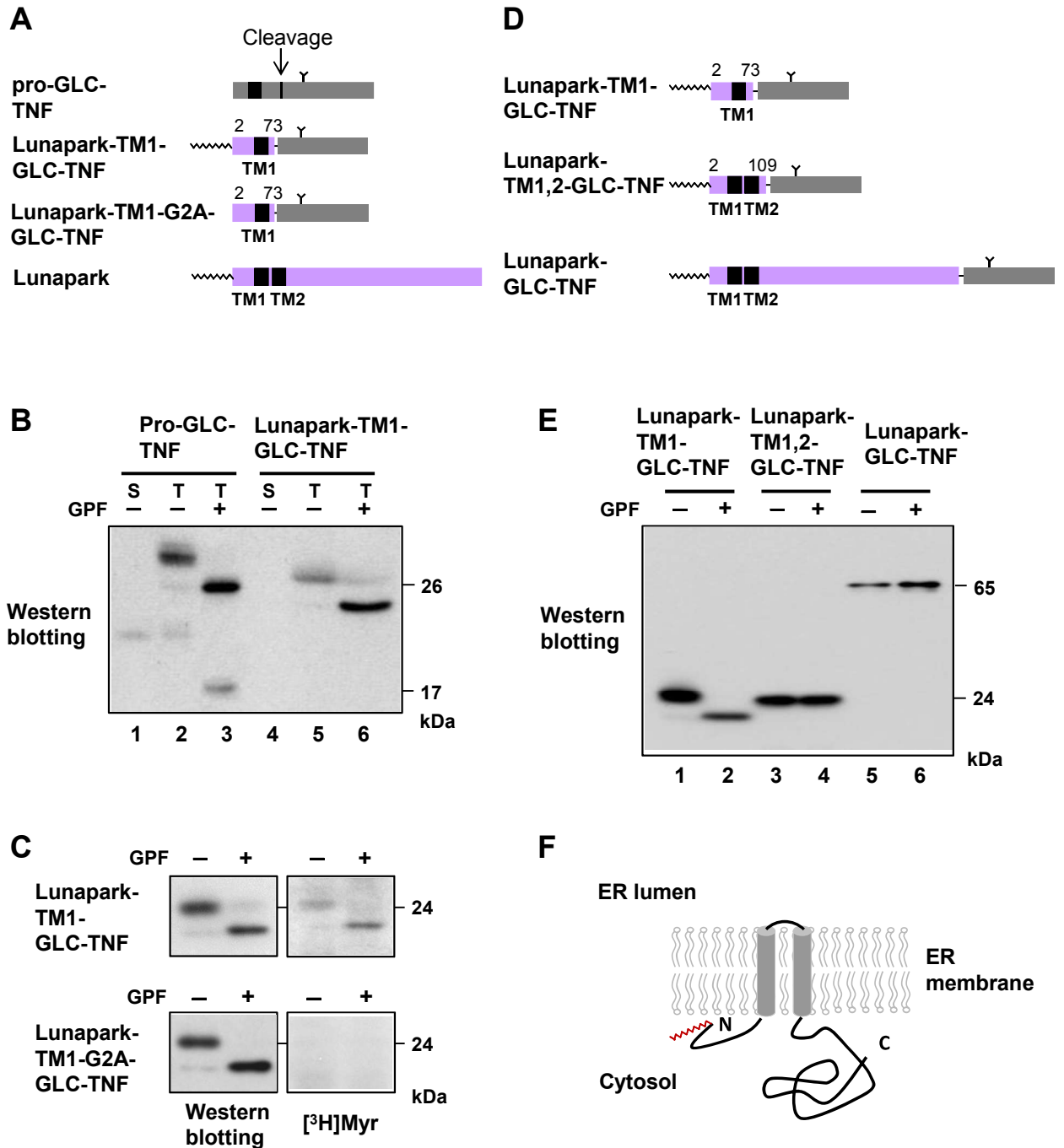


Fig. 2-4. Analysis of membrane integration and membrane topology of protein Lunapark.

A. Structure of pro-GLC-TNF, Lunapark-TM1-GLC-TNF, and Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF for analysis of the function of transmembrane domain 1 (TM1) of protein Lunapark. B. cDNAs encoding pro-GLC-TNF, Lunapark-TM1-GLC-TNF were transfected in to COS-1 cells, and their secretion and expression in total cell lysates were evaluated by Western blotting analysis using an anti-TNF antibody. N-glycosylation of the expressed proteins in total cell lysates was determined by the change in its molecular weight after treatment with glycopeptidase F (GPF). S, cell culture supernatant; T, total cell lysates. C. cDNAs encoding Lunapark-TM1-GLC-TNF and Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF were transfected in to COS-1 cells, and their expression and the N-myristoylation of the products in total cell lysates were evaluated by Western blotting analysis and [³H]myristic acid ([³H]Myr) labeling, respectively. D. Structure of Lunapark-TM1-GLC-TNF, Lunapark-TM1/2-GLC-TNF, and Lunapark-GLC-TNF for analysis of the function of transmembrane domain 2 (TM2) of protein Lunapark. E. cDNAs encoding Lunapark-TM1-GLC-TNF, Lunapark-TM1/2-GLC-TNF, and Lunapark-GLC-TNF were transfected in to COS-1 cells, and their expression in total cell lysates was evaluated by Western blotting analysis. F. Schematic representation of the transmembrane topology of protein Lunapark in the ER membrane.

Lunapark-TM1-GLC-TNF の cDNA を遺伝子導入した COS-1 細胞を [3H] ミリスチン酸で代謝標識し、同様の実験を行ったところ、N-グリコシル化および脱 N-グリコシル化タンパク質のバンドの両方でタンパク質 N-ミリスチル化が観察された (Fig.2-4C, 上パネル)。このことは、小胞体膜を膜通過した膜貫通タンパク質にタンパク質 N-ミリスチル化が確かに起こっていることを示している。

Protein Lunapark の膜上トポロジー形成における第 2 膜貫通領域 (TM2) とその隣接領域の役割を評価するために、protein Lunapark の推定 TM1 および TM2 とその隣接領域を含む N 末端 109 アミノ酸の C 末端側に pro-GLC-TNF の成熟領域を融合させた Lunapark-TM1/2-GLC-TNF を用いて同様の実験を行った。Fig.2-4E, レーン 3 および 4 に示したように、GPF 処理はタンパク質分子量に影響しなかった。このことは、TM2 とその隣接領域は膜透過停止配列として機能し、pro-GLC-TNF の成熟領域の膜通過を妨げることを示している。全長 protein Lunapark の C 末端側に pro-GLC-TNF の成熟領域を融合させた場合、GPF 処理後に Lunapark-TM1/2-GLC-TNF と同様、タンパク質分子量に影響は見られなかった (Fig.2-4E, レーン 5 および 6)。これらの結果から、protein Lunapark の膜通過と膜上トポロジー形成は 2 つの膜貫通領域、TM1 および TM2 とその隣接領域によって生じ、他の領域は膜通過に関与しないことが示唆された。

Protein Lunapark の TM2 とその隣接領域について、膜透過停止配列としての機能をさらに確認するため、この領域が分泌タンパク質の分泌を阻害する能力を持つか否かを検討することにより膜透過を妨げる能力を評価した。そのため、protein Lunapark の TM2 とその隣接領域をモデル分泌タンパク質である H14-TNF の C 末端に融合させた H14-TNF-Lunapark-TM2 を作製した。Fig.2-5 B レーン 1 に示したように、H14-TNF cDNA を COS-1 細胞に遺伝子導入した場合、成熟分泌型 TNF が細胞培養上清に検出された。これに対して H14-TNF-Lunapark-TM2 の場合は、成熟 TNF の分泌は完全に阻害された (Fig.2-5 B レーン 3)。H14-TNF-Lunapark-TM2 から TM2 とその C 末端隣接領域 (Ala74-Glu107) を欠失させた場合、Fig.2-5 B レーン 5 に示したように、成熟 TNF の効率的分泌が観察された。これらの結果から protein Lunapark の TM2 が膜透過停止配列として機能し、細胞からの成熟 TNF の分泌を妨げることが明らかに示された。

2-3-4 Protein Lunapark の膜通過はタンパク質 N-ミリスチル化を必要としない

TM1 とその隣接領域による protein Lunapark の膜通過にタンパク質 N-ミリスチル化が必要であるか否かを検討するために、2 位の Gly を Ala に置換し N-ミリスチル化モチーフを破壊した Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF の膜通過を評価した。Fig.2-4C 左パネルに示したように、発現した Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF の分子量は Lunapark-TM1-GLC-TNF とほぼ同じであった。さらに、GPF 処理後に同程度の分子量減少も観察された。Fig.2-4C 下右パネルに示したように、Lunapark-TM1-G2A-GLC-TNF の N-グリコシル化および脱グリコシル化タンパク質のバンドのどちらにおいても [3H] ミリスチン酸の取り込

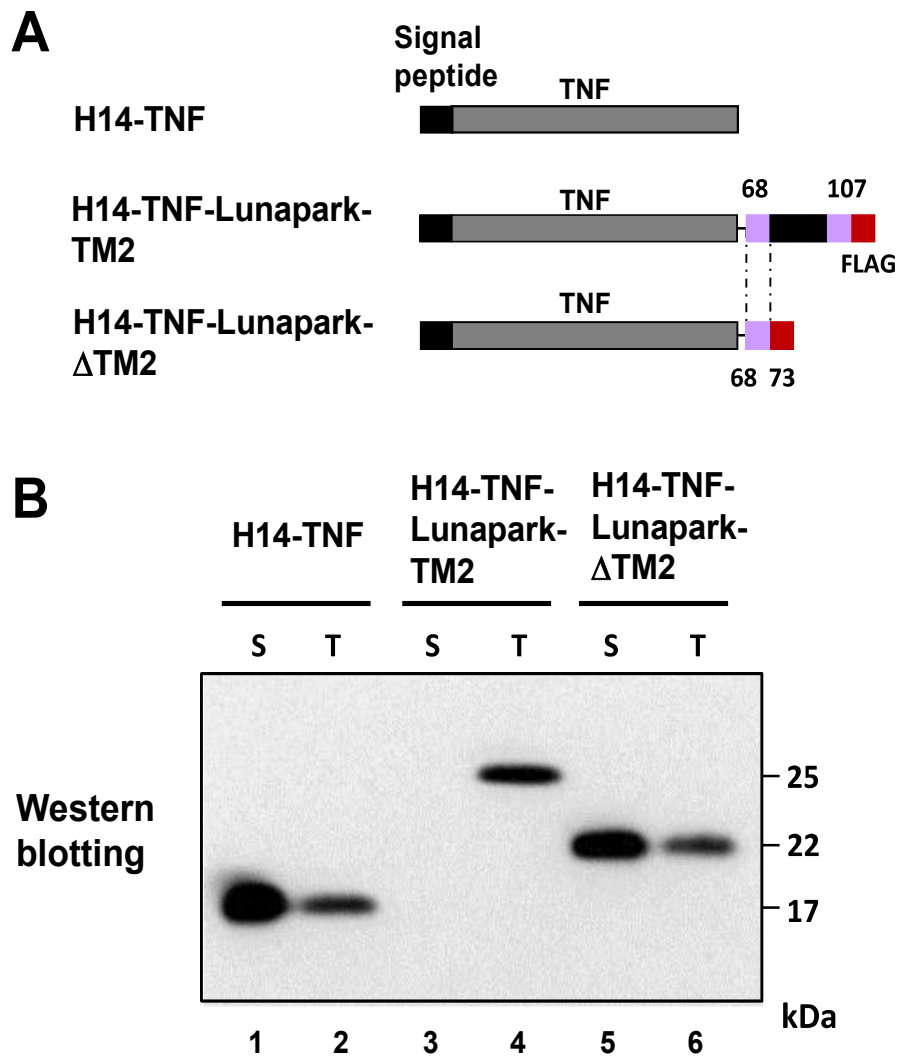


Fig. 2-5. Analysis of the role of transmembrane domain 2 and its flanking region of protein Lunapark on the membrane topology formation of protein Lunapark.

A. Structure of H14-TNF, H14-TNF-Lunapark-TM2, and H14-TNF-Lunapark- Δ TM2 to analyze the function of transmembrane domain 2 (TM2) of protein Lunapark. B. cDNAs encoding H14-TNF, H14-TNF-Lunapark-TM2, and H14-TNF-Lunapark- Δ TM2 were transfected into COS-1 cells, and their secretion and expression in total cell lysates were evaluated by Western blotting analysis using an anti-TNF antibody. S, cell culture supernatant; T, total cell lysate.

みは観察されなかった。これらの結果は、TM1 とその隣接領域を介した膜通過はタンパク質 N-ミリスチル化に関係なく進行することを示している。このことから、protein Lunapark の膜通過と膜上トポロジー形成にはタンパク質 N-ミリスチル化は必要とされないことが明らかになった。

2-3-5 Protein Lunapark の過剰発現による小胞体形態変化とその N-ミリスチル化依存性

Protein Lunapark に生じる N-ミリスチル化が protein Lunapark の細胞内局在に果たす役割を調べるために、C 末端に FLAG タグを付加した protein Lunapark および G2A 変異体をコードする cDNA を構築し、これらの cDNA を導入した HEK293T 細胞の免疫蛍光染色分析により細胞内局在を検討した。Fig.2-6 A に示したように、 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸標識により Lunapark-FLAG は効率よく N-ミリスチル化されたが、Lunapark-G2A-FLAG では $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸の取り込みが観察されなかった。Fig.2-6 B, a に示したように、Lunapark-FLAG をコードする cDNA を導入した HEK293T 細胞における免疫蛍光染色により、過剰発現した Lunapark-FLAG が大きな多角形の網目状構造を持つ特徴的分布パターンを示すことが明らかとなった。これに対して、Fig.2-6 B b に示したように、Lunapark G2A-FLAG では、Lunapark-FLAG で見られた特徴的分布パターンは観察されなかった。細胞小器官のうちで網目状構造は通常、小胞体(ER)に観察されることが知られていることから、protein Lunapark は ER に特異的に局在し N-ミリスチル化依存的に多角形の網目状構造形成を誘導すると推測された。これを証明するために、protein Lunapark の過剰発現が ER に局在するタンパク質の分布に及ぼす影響を調べた。この実験では、EGFP-sec61- β を ER 全体に分布する ER マーカーとして用いた[2-37]。Fig.2-7 A, b に示したように、EGFP-sec61- β を発現させた HEK293T 細胞では、EGFP-sec61- β の核周辺の局在が観察された。この場合、過剰露光しても周辺の編目状構造は観察されなかった(b')。Fig.2-7 B, j k l に示したように、EGFP-sec61- β を発現させた HEK293T 細胞を ER を特異的に染色する ER トラッカーレッドで染色すると、EGFP-sec61- β の EGFP 蛍光は ER トラッカーレッドの蛍光と完全に一致した。これらの結果は EGFP-sec61- β が ER に局在することを示している。EGFP-sec61- β を Lunapark-FLAG と共発現した場合、核近傍のシート構造の周辺に大きな多角形の網目状構造が EGFP-sec61- β の蛍光として観察された(e, e')。EGFP-sec61- β の蛍光として検出されたこの周辺部の編目状構造は Lunapark-FLAG の蛍光として観察された周辺部の編目状構造とよく一致した(d',e',f')。これに対して、Fig.2-7 A, g, g', h, h' に示したように、N-ミリスチル化されない Lunapark-G2A-FLAG を EGFP-sec61- β と共発現させると、Lunapark-G2A-FLAG の分布パターンと同様、大きな多角形の編目状構造を持つ特徴的分布パターンが EGFP-sec61- β の蛍光として観察されなかった。これらの結果は protein Lunapark が N-ミリスチル化依存的に小胞体の網目状構造の形成を誘導することを示している。

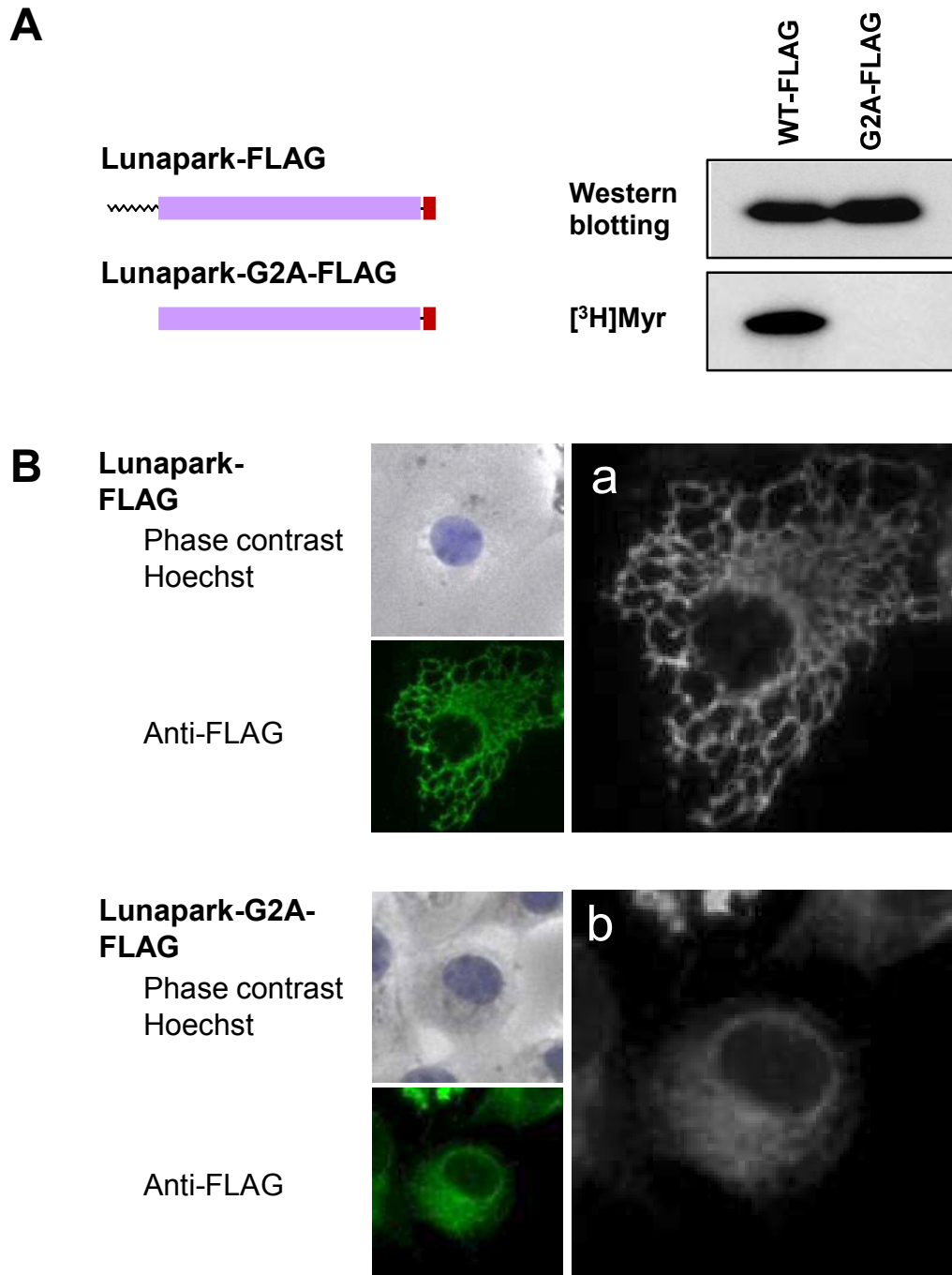


Fig. 2-6. Protein N-myristoylation plays a critical role in the ER morphological change induced by protein Lunapark.

A. Detection of protein N-myristoylation of Lunapark-FLAG expressed in HEK293T cells. cDNAs encoding Lunapark-FLAG and Lunapark-G2AFLAG were transfected into HEK293T cells, and their expression and the N-myristoylation of the products in total cell lysates were evaluated by Western blotting analysis and [³H]myristic acid ([³H]Myr) labeling, respectively. B. Intracellular localization of Lunapark-FLAG and Lunapark-G2A-FLAG was determined by immunofluorescence staining of HEK293T cells transfected with cDNAs encoding these two proteins using an anti-FLAG antibody. a and b show a close-up view of the immunofluorescence image.

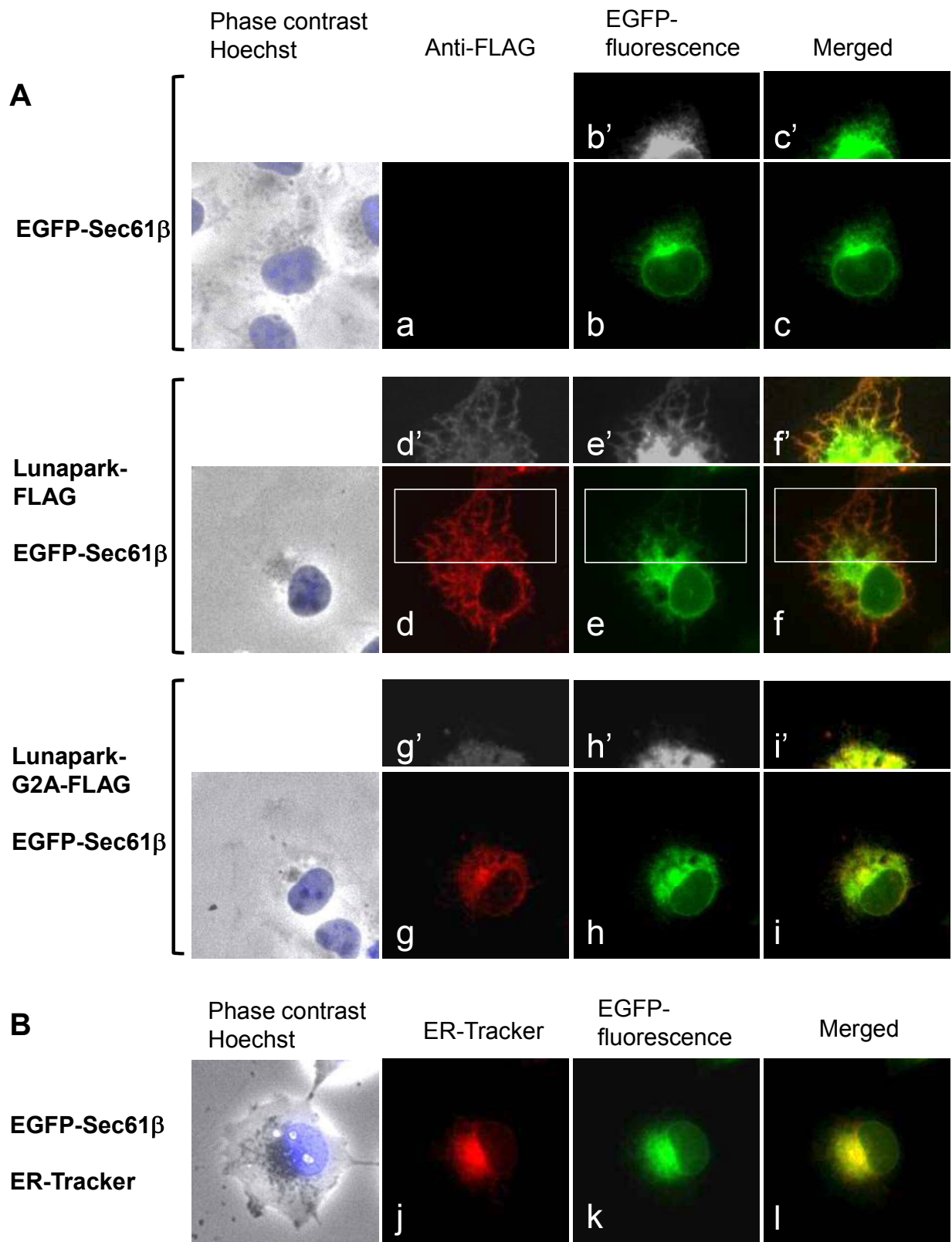


Fig. 2-7. Protein Lunapark mainly localized to the peripheral ER and induced the ER morphological change in an N-myristoylationdependent manner.

A. EGFP-Sec61 β cDNA alone, Lunapark-FLAG cDNA and EGFP-Sec61 β cDNA, or Lunapark-G2A-FLAG cDNA and EGFP-Sec61 β cDNA, were transfected in to HEK-293T cells, and distribution of these proteins was evaluated by immunofluorescence analysis or fluorescence microscopic analysis. b', c', d', e', f', g', h', and i' show a close-up and over-exposed image of the area surrounded by a white box in b, c, d, e, f, g, h, and i, respectively. B. EGFP-Sec61 β cDNA was transfected in to HEK-293T cells and the distribution of the protein was evaluated by fluorescence microscopic analysis. ER was detected with ER-Tracker Red.

このことをさらに確かめるために、EGFP-sec61- β と protein Lunapark を共発現させた細胞(EGFP-positive/immunofluorescence-positive cell)での ER 形態変化の定量的解析を行った。Fig.2-8 A および B に示したように、Lunapark-FLAG と Lunapark-G2A-FLAG には ER 形態変化の誘導能に顕著な差が観察され、高度な網目状構造を持つ ER は野生型 Lunapark-FLAG を発現した細胞でのみ観察された。これらの結果から Lunapark が ER 周辺部に局在し、N-ミリスチル化依存的に網目状構造の形成を誘導することが明確に示された。

2-3-6 Protein Lunapark のタンパク質 N-ミリスチル化および C 末端ジンクフィンガードメインは protein Lunapark により誘導される ER 形態変化に寄与している

Fig.2-9 A に示したように、N 末端 N-ミリスチル化モチーフと 2 つの膜貫通領域に加えて、C 末端ジンクフィンガードメインモチーフが protein Lunapark ファミリーの構成タンパク質間で高く保存されていた。C 末端ジンクフィンガードメインモチーフの機能的役割を調べるために、ジンクフィンガードメインモチーフ中に保存された 4 つの Cys 残基(Fig.2-9 A 矢印)を Ala に置換した変異体(Lunapark-C to A-FLAG)を構築し、この変異体が ER 形態変化を誘導するか否かを免疫蛍光染色により調べた。Lunapark-C to A-FLAG をコードする遺伝子を導入した HEK293T 細胞の [³H] ミリスチン酸代謝標識により、このタンパク質は野生型 Lunapark と同様に効率よく N-ミリスチル化されることが分かった(Fig.2-9 B)。また、ウェスタンブロット解析で示されたように、この実験におけるこれら 3 つのタンパク質のタンパク質発現量は同程度であった。Fig.2-9 C,a,b に示したように、Lunapark-FLAG をコードする cDNA の HEK293T 細胞への導入は、ER の大きな多角形の網目状構造形成を誘導した。それに対して、Lunapark-C to A-FLAG をコードする cDNA を導入した HEK293T 細胞では、特徴的な ER の網目状構造形成は観察されなかった(Fig.2-9 C, e, f)。Protein Lunapark により誘導される ER 形態変化にタンパク質 N-ミリスチル化および C 末端ジンクフィンガードメインモチーフが果たす役割をさらに調べるため、これら 3 つの cDNA を導入した細胞において ER 形態変化の定量的解析を行った。この実験では、これら 3 つの cDNA を導入した細胞の免疫蛍光染色画像を用いて ER 形態変化量を比較した。Fig.2-9 D に示したように、これら 3 つのタンパク質において ER 形態変化誘導に顕著な差が観察された。Lunapark-FLAG の場合、周辺部の網目状構造(高度な網目状 + 部分的網目状)が遺伝子導入細胞(免疫蛍光染色陽性)の約 80%で観察された。それに対して、Lunapark-G2A-FLAG および Lunapark-C to A-FLAG では、周辺部の網目状構造は遺伝子導入細胞の 80-90%で観察されず、部分的網目状構造が遺伝子導入細胞の 10-20%に観察された(Fig.2-9 D)。これらの結果から、タンパク質 N-ミリスチル化および C 末端ジンクフィンガードメインの両方が protein Lunapark により誘導される ER 形態変化において重要な役割を果たすことが明確に示された。

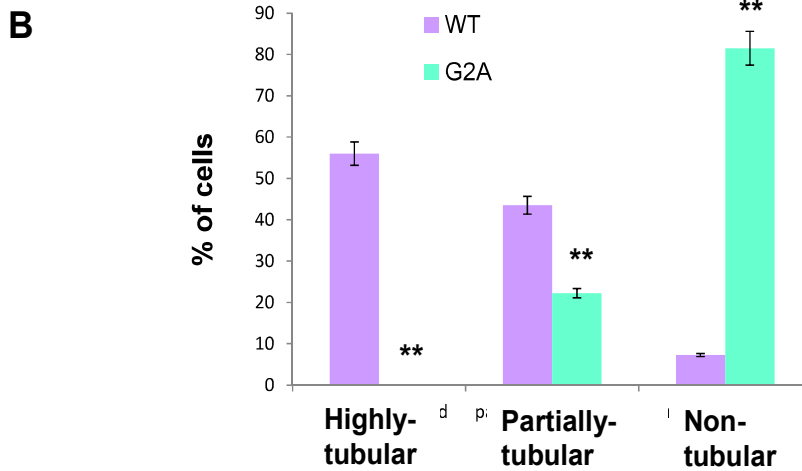
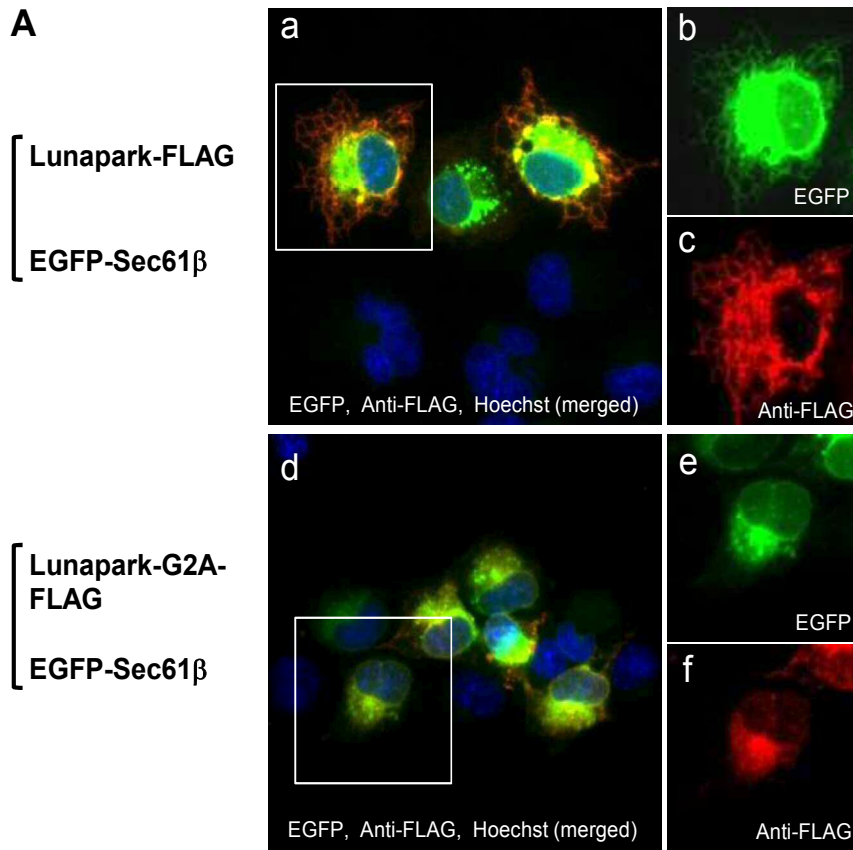


Fig. 2-8. Quantitative analysis of the ER morphological change in HEK293T cells induced by Lunapark-FLAG (WT) and Lunapark-G2A-FLAG (G2A).

HEK293T cells were cotransfected with EGFP-Sec61 β and Lunapark-FLAG (or Lunapark-G2A-FLAG), and quantitative analysis of the ER morphological change was performed by fluorescence microscopic observation of 100 cells expressing both EGFP-Sec61 β and protein Lunapark (EGFP-positive/immunofluorescence-positive cells). A. Left panels (a, d) show merged image of EGFP fluorescence, immunofluorescence, and Hoechst staining. Right panels (b, c, e, f) show a close-up and over-exposed image of the area surrounded by a white box in the left panels (a, d). B. The extent of ER morphological changes is expressed as a percentage of the number of cells having highly tubular, partially tubular, and non-tubular image of EGFP-Sec61 β against the total number of EGFP-positive/ immunofluorescence-positive cells. Data are expressed as mean \pm SD for four independent experiments. ** P <0.001 vs. WT.

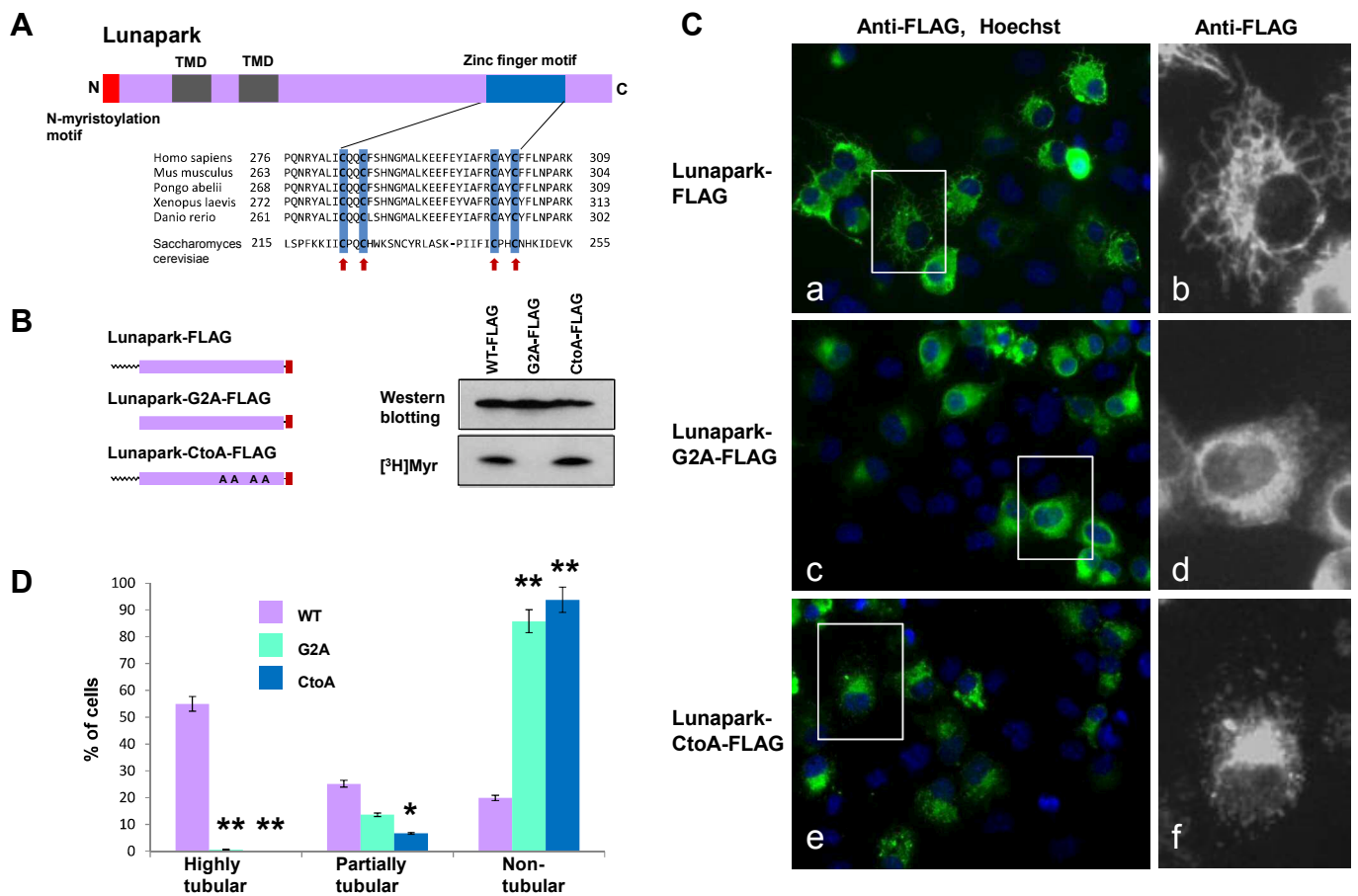


Fig. 2-9. Role of the zinc finger motif of protein Lunapark in the ER morphological change induced by protein Lunapark.

A. Alignment of the zinc finger motif of Lunapark protein family members. Highly conserved cysteine residues are indicated by red arrows. B. Detection of protein N-myristoylation of Lunapark-CtoA-FLAG expressed in HEK293T cells. cDNAs encoding Lunapark-FLAG, Lunapark-G2A-FLAG, and Lunapark-CtoA-FLAG were transfected in to HEK293T cells, and their expression and the N-myristoylation of the products in the total cell lysates were evaluated by Western blotting analysis and [³H]myristic acid ([³H]Myr) labeling, respectively. C. Intracellular localization of Lunapark-FLAG, Lunapark-G2A-FLAG, and Lunapark-CtoA-FLAG was determined by immunofluorescence staining of HEK293T cells transfected with cDNAs encoding these three proteins using an anti-FLAG antibody. Right panel shows a close-up view of the area surrounded by a white box in the immunofluorescence image. D. Quantitative analysis of the ER morphological change in HEK293T cells induced by Lunapark-FLAG (WT), Lunapark-G2A-FLAG (G2A), and Lunapark-CtoA-FLAG (CtoA). cDNAs encoding Lunapark-FLAG, Lunapark-G2A-FLAG, and Lunapark-CtoA-FLAG were transfected in to HEK293T cells and the morphological change of the ER in each cell was determined by immunofluorescence staining and the extent of the ER morphological change was compared. The extent of ER morphological changes is expressed as a percentage of the number of cells with highly tubular, partially tubular, and non-tubular ER against the total number of transfected cells. Data are expressed as mean \pm SD for five independent experiments. **P,0.001 vs. WT. *P,0.01 vs. WT.

2-4 小括

タンパク質 N-ミリスチル化は真核細胞のタンパク質のうち主として細胞質タンパク質に起こり、N-ミリスチル化されることが確認された膜貫通タンパク質はごくわずかしが存在しない。本研究では、ヒトの N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質を探索し、その膜通過、膜上トポロジー形成、細胞内局在、生理的機能発現におけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割を検討した。最近、我々は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて発現させたタンパク質の代謝標識および質量分析により、ヒト cDNA リソースに収集されたヒト cDNA クローンの中からヒト N-ミリスチル化タンパク質を網羅的に同定する手法を確立した[2-30, 2-38]。この方法を用いて約 2,000 個の Kazusa ORFeome project (KOP) ヒト cDNA クローンから 27 個の N-ミリスチル化タンパク質を同定した。これら 27 個の cDNA クローンのデータベース検索により、このうち 18 個が新規 N-ミリスチル化タンパク質であることが明らかとなった。膜タンパク質予測システム、SOSUI [2-36]を用いたバイオインフォマティクス解析により、18 個の新規 N-ミリスチル化タンパク質のうち 4 つが膜貫通タンパク質であることが推測された。それゆえ、本研究では、これら 4 つのタンパク質の膜局在および膜組み込みについて調べた。その結果、最近小胞体(ER)の網目状構造形成への関与が見出された酵母タンパク質 Lnplp のヒトホモログである protein Lunapark が、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(Fig.2-1, 2-3, 2-4)。前述したように、これまでに発見された 2 つの哺乳類由来の N-ミリスチル化膜貫通タンパク質はいずれも ER とミトコンドリアの両方に局在し、タンパク質 N-ミリスチル化はこれら 2 つのタンパク質のミトコンドリアへの局在に有利に働くことが報告されている[2-23, 2-26]。これらの結果はタンパク質 N-ミリスチル化が哺乳類由来膜貫通タンパク質においてミトコンドリア移行シグナルとして機能する可能性を示している。しかしながら、本研究において N-ミリスチル化された protein Lunapark は特異的に ER へ局在したことから、タンパク質 N-ミリスチル化は哺乳類由来膜貫通タンパク質のミトコンドリア移行シグナルとして必ずしも機能しないことが明らかとなった。さらに、protein Lunapark に起こる N-ミリスチル化は protein Lunapark の膜通過や膜上トポロジー形成にも必須ではなく(Fig.2-4)、むしろ protein Lunapark の過剰発現により誘導される ER 形態変化に重要な役割を果たすことが明らかとなった(Fig.2-6, 2-8, 2-9)。

ER はタンパク質合成、脂質合成、タンパク質修飾、カルシウム恒常性の調節のような多くの細胞過程において重要な役割を果たしている[39]。ER は、広がった多角形の網目状のチューブ構造がシート状構造に連結した構造、および核膜から構成されている。ER の網目状構造は管状構造の伸長と融合の過程を繰り返し、細胞全体に広がっている[2-40, 2-41]。いくつかのタンパク質ファミリーが ER の特徴的構造の形成と維持に関与していることが知られている。レティキュロンおよび DPI/Yoplp は ER の網目状構造の形成と維持に中心的役割を担っている[2-42, 2-43]。ダイナミン様 GTPase であるアトラスチンは ER 管状構

造の融合を促進し[2-45, 2-46], 多角形の網目状構造に新しい3方向分岐点の形成を引き起こす. これらのタンパク質に加えて, Lunapark ファミリータンパク質の一つである酵母タンパク質 Lnplp が ER の網目状構造の形成に必要とされることが最近報告された[2-28]. 酵母および哺乳類細胞において, Lnplp はレティキュロン, Yoplp およびアトラスチン酵母オルソログ Seylp と相互作用し ER 網目状構造の分岐点に局在することが見出された. また, Lnplp とレティキュロンとの相互作用および Lnplp の ER 分岐点への局在は Seylp により調節されることが見出された. これらの結果から, Lnplp と Seylp は拮抗して多角形の網目状構造形成の平衡を保つよう機能していると提唱されている.

本研究では, Lnplp のヒトオルソログである protein Lunapark が N-ミリスチル化された状態で主に ER に局在し, ヒト細胞で過剰発現させた場合, 大きな多角形の網目状構造の形成を誘導することを示した. また, protein Lunapark により誘導される ER 形態変化は2位 Gly の Ala への置換による N-ミリスチル化阻害により著しく抑制されたことから, protein Lunapark の過剰発現により誘導される ER 形態変化においてタンパク質 N-ミリスチル化が重要な役割を担うことが示唆された.

Fig.2-2 および 2-9 A に示したように, N 末端 N-ミリスチル化モチーフ, 2つの膜貫通領域, C 末端ジンクフィンガードメインは Lunapark ファミリータンパク質の間で高度に保存されていた. しかし, 興味深いことに, 酵母 Lnplp では N-ミリスチル化モチーフは見出されなかった. 加えて, 酵母 Lnplp の N 末端領域, 2つの膜貫通領域, C 末端ジンクフィンガードメインのアミノ酸配列は他の Lunapark ファミリーメンバーのものと著しく異なっていた. 実際, Lunapark という名前の由来となったペプチド LNPARK [2-29]はほとんどの Lunapark ファミリータンパク質のジンクフィンガードメインの C 末端付近に存在するが, 酵母 Lnplp には存在しない. このように, ヒト protein Lunapark のアミノ酸配列, タンパク質 N-ミリスチル化感受性, 細胞内局在は酵母 Lnplp のものと異なっていた. これらの観察結果から, 酵母 Lnplp の構造と生理的機能は他の Lunapark ファミリーのものとは異なるのかもしれないと考えられた. Lunapark によって誘導される ER 形態変化にタンパク質 N-ミリスチル化が強く影響する分子機構は不明である. 一般的に, N-ミリスチル化タンパク質の機能は, タンパク質 N-ミリスチル化を介した可逆的膜結合により調節される[2-1, 2-5, 2-46]. しかし, protein Lunapark は膜貫通タンパク質であることから, protein Lunapark のタンパク質 N-ミリスチル化の機能は膜アンカーとしての機能ではないと考えられる. 実際, 本研究において我々は ER 膜通過および ER 膜への特異的局在のいずれにも N-ミリスチル化が必要とされないことを示した. GAP-23 / NAP-22 のようないくつもの N-ミリスチル化タンパク質では, タンパク質 N-ミリスチル化を介した特異的タンパク質-タンパク質相互作用がタンパク質機能発現に重要な役割を担っていることが知られている[2-47]. それゆえ, N-ミリスチル化依存的なタンパク質-タンパク質相互作用が protein Lunapark の機能に関与している可能性も考えられる. ジンクフィンガーモチーフ中に保存された4つの Cys 残基を Ala に置換した Lunapark-C to A-FLAG は N-ミ

リストール化されるが特徴的なERの網目状構造形成を誘導しない(Fig.2-9 C, e, f)ことから, ER 形態変化の誘導には N-ミリストイル化のみでは不十分であると推察される. ジンクフィンガーモチーフは比較的小さなタンパク質モチーフであり, 1つ以上の亜鉛イオンの周囲に形成され, 幅広い真核生物に見出される. 多くのジンクフィンガータンパク質は DNA 結合タンパク質であり, 遺伝子発現に関与する[2-48]. DNA 結合モチーフとしての役割に加えて, ジンクフィンガーモチーフはタンパク質-タンパク質またはタンパク質-脂質相互作用を媒介することが分かっている[2-49, 2-50]. したがって, protein Lunapark のジンクフィンガーモチーフを介した特異的タンパク質-タンパク質相互作用は ER 形態変化の誘導に重要な役割を果たす可能性がある. 酵母 Lnplp はレティキュロン, Yoplp および Seylp と相互作用することが見出されている[2-28]ことから, ヒト protein Lunapark もまたレティキュロン DPI およびアトラスチンと相互作用するのかもしれない. protein Lunapark によって誘導される ER 形態変化の分子機構を明らかにするためには, これらのタンパク質と protein Lunapark との相互作用およびこれらの相互作用における protein Lunapark に生ずるタンパク質 N-ミリストイル化および protein Lunapark の持つジンクフィンガードメインの役割を明らかにするさらなる研究が必要である.

本研究において, 我々は 2 回膜貫通型の ER 膜タンパク質である protein Lunapark が N-ミリストイル化されており, この N-ミリストイル化がこのタンパク質によって誘導される ER 形態変化に強く影響することを示した. 我々の知る限りにおいて, これらの結果は, ヒトの N-ミリストイル化された複数回膜タンパク質の膜通過, 膜上トポロジー形成, 細胞内局在および機能におけるタンパク質 N-ミリストイル化の役割を解明した初めての報告である. Swiss-Prot protein knowledgebase(約 20,000 個)に掲載されたすべてのヒトタンパク質において, N-末端に Met-Gly 配列を持つヒトタンパク質の数は約 1,600 個である. これらのタンパク質について膜タンパク質予測システムと, 本研究で用いたタンパク質 N-ミリストイル化予測システムを組み合わせる検索を行ったところ, N 末端に Met-Gly 配列を持つ 50 以上ものタンパク質が N-ミリストイル化された膜貫通タンパク質であると予測された. 我々は現在, これらの候補タンパク質の N-ミリストイル化感受性, 膜通過, さらに N-ミリストイル化の生理的役割について検討中である.

2-5 文献

- 2-1. Spiegel AM, Backlund PS, Jr., Butrynski JE, Jones TL, Simonds WF. (1991) The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci.* 16(9):338-41.
- 2-2. Boutin JA. (1997) Myristoylation. *Cellular signalling.* 9(1):15-35.
- 2-3. Resh MD. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1451(1):1-16.
- 2-4. Farazi TA, Waksman G, Gordon JI. (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem.* 276(43):39501-4.
- 2-5. Resh MD. (2006) Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol.* 2(11):584-90.
- 2-6. Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science.* 290(5497):1761-5.
- 2-7. Utsumi T, Sakurai N, Nakano K, Ishisaka R. (2003) C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Letters.* 539(1-3):37-44.
- 2-8. Martin DD, Beauchamp E, Berthiaume LG. (2011) Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie.* 93(1):18-31.
- 2-9. Dyda F, Klein DC, Hickman AB. (2000) GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annual review of biophysics and biomolecular structure.* 29:81-103.
- 2-10. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. (2009) Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 41(9):1022-6.
- 2-11. Frearson JA, Brand S, McElroy SP, Cleghorn LA, Smid O, Stojanovski L, et al. (2010) N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature.* 464(7289):728-32.
- 2-12. Wright MH, Heal WP, Mann DJ, Tate EW. (2010) Protein myristoylation in health and disease. *J Chem Biol.* 3(1):19-35.
- 2-13. Resh MD. (2012) Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol Med.* 18(4):206-14.
- 2-14. Burnaevskiy N, Fox TG, Plymire DA, Ertelt JM, Weigele BA, Selyunin AS, et al. (2013) Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the *Shigella* virulence factor IpaJ. *Nature.* 496(7443):106-9.
- 2-15. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. (1987) The preS1 protein of hepatitis B virus is

- acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol.* 61(5):1672-7.
- 2-16. Prange R, Clemen A, Streeck RE. (1991) Myristylation is involved in intracellular retention of hepatitis B virus envelope proteins. *J Virol.* 65(7):3919-23.
- 2-17. Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C. (1995) Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology.* 213(2):292-9.
- 2-18. Ostapchuk P, Hearing P, Ganem D. (1994) A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo j.* 13(5):1048-57.
- 2-19. Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. (1999) Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol.* 73(3):2052-7.
- 2-20. Lambert C, Prange R. (2001) Dual topology of the hepatitis B virus large envelope protein: determinants influencing post-translational pre-S translocation. *J Biol Chem.* 276(25):22265-72.
- 2-21. Ozols J, Carr SA, Strittmatter P (1984) Identification of the NH₂-terminal blocking group of NADH-cytochrome b₅ reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain. *J Biol Chem* 259: 13349–13354.
- 2-22. Borgese N, Longhi R (1990) Both the outer mitochondrial membrane and the microsomal forms of cytochrome b₅ reductase contain covalently bound myristic acid. Quantitative analysis on the polyvinylidene difluoride-immobilized proteins. *Biochem J* 266: 341–347.
- 2-23. Borgese N, Aggujaro D, Carrera P, Pietrini G, Bassetti M (1996) A role for Nmyristoylation in protein targeting: NADH-cytochrome b₅ reductase requires myristic acid for association with outer mitochondrial but not endoplasmic reticulum membranes. *J Cell Biol* 135: 1501–1513.
- 2-24. Colombo S, Longhi R, Alcaro S, Ortuso F, Sprocati T, et al. (2005) Nmyristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b(5) reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *J Cell Biol* 168: 735–745.
- 2-25. Beauchamp E, Goenaga D, Le Bloc'h J, Catheline D, Legrand P, et al. (2007) Myristic acid increases the activity of dihydroceramide Delta4-desaturase 1 through its N-terminal myristoylation. *Biochimie* 89: 1553–1561.
- 2-26. Beauchamp E, Tekpli X, Marteil G, Lagadic-Gossmann D, Legrand P, et al. (2009) N-Myristoylation targets dihydroceramide Delta4-desaturase 1 to mitochondria: partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie* 91: 1411–1419.

- 2-27. Ezanno H, le Bloch J, Beauchamp E, Lagadic-Gossmann D, Legrand P, et al. (2012) Myristic acid increases dihydroceramide D4-desaturase 1 (DES1) activity in cultured rat hepatocytes. *Lipids* 47: 117–128.
28. Chen S, Novick P, Ferro-Novick S (2012) ER network formation requires a balance of the dynamin-like GTPase Sey1p and the Lunapark family member Lnp1p. *Nat Cell Biol* 14: 707–716.
- 2-29. Spitz F, Gonzalez F, Duboule D (2003) A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell* 113: 405–417.
- 2-30. Suzuki T, Moriya K, Nagatoshi K, Ota Y, Ezure T, et al. (2010) Strategy for comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *Proteomics* 10: 1780–1793.
- 2-31. Utsumi T, Ohta H, Kayano Y, Sakurai N, Ozoe Y (2005) The N-terminus of B96Bom, a *Bombyx mori* G-protein-coupled receptor, is N-myristoylated and translocated across the membrane. *FEBS J* 272: 472–481.
- 2-32. Ishisaka R, Sato N, Tanaka K, Takeshige T, Iwata H (1999) A part of the transmembrane domain of pro-TNF can function as a cleavable signal sequence that generates a biologically active secretory form of TNF. *J Biochem* 126: 413–420.
- 2-33. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Shikata M, Ando E, et al. (2006) N-Terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry. *Proteomics* 6: 4486–4495.
- 2-34. Sakurai N, Utsumi T (2006) Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *J Biol Chem* 281: 14288–14295.
- 2-35. Utsumi T, Sato M, Nakano K, Takemura D, Iwata H, et al. (2001) Amino acid residue penultimate to the amino-terminal Gly residue strongly affects two cotranslational protein modifications, N-myristoylation and N-acetylation. *J Biol Chem* 276: 10505–10513.
- 2-36. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378–937.
- 2-37. Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA, Palazzo AF, Kozlov MM, et al. (2010) Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* 143: 774–788.
- 2-38. Sakurai N, Moriya K, Suzuki T, Sofuku K, Mochiki H, et al. (2007) Detection of co- and posttranslational protein N-myristoylation by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. *Anal Biochem* 362: 236–244.
- 2-39. Baumann O, Walz B (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205: 149–214.
- 2-40. Friedman JR, Voeltz GK (2011) The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane

- network. *Trends Cell Biol* 21: 709–717.
- 2-41. Chen S, Novick P, Ferro-Novick S (2013) ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 25: 1–6.
- 2-42. Goyal U, Blackstone C (2013) Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2492–2498.
- 2-43. Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM, Rapoport TA (2006) A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 124: 573–586.
- 2-44. Hu J, Shibata Y, Zhu P-P, Voss C, Rismanchi N, et al. (2009) A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* 138: 549–561.
- 2-45. Orso G, Pendin D, Liu S, Toso J, Moss TJ, et al. (2009) Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature* 460: 978–983.
- 2-46. Escriba PV, Wedegaertner PB, Goni FM, Vogler O (2007) Lipid–protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768: 836–852.
- 2-47. Matsubara M, Nakatsu T, Kato H, Taniguchi H (2004) Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J* 23: 712–718.
- 2-48. Bitar M, Drummond MG, Costa MGS, Lobo FP, Calzavara-Silvae CE, et al. (2013) Modeling the zing finger protein SmZF1 from *Schistosoma mansoni*: Insights into DNA binding and gene regulation. *J Mol Graph Model* 39: 29–38.
- 2-49. Brayer KJ, Segal DJ (2008) Keep your fingers off my DNA: protein–protein interactions mediated by C2 H2 zinc finger domains. *Cell Biochemistry and Biophysics* 50: 111–131.
- 2-50. Matthews JM, Sunde M, Sunde M (2002) Zinc fingers—folds for many occasions. *IUBMB Life* 54: 351–355.

第3章 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 リソースからのヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定

3-1 諸言

タンパク質 N-ミリスチル化は炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸がタンパク質 N 末端の Gly に付加する反応であり [3-1~3-5], 真核生物のタンパク質ではその 0.5~1.5% が N-ミリスチル化されていると推定されている。

多くの N-ミリスチル化タンパク質は細胞の構造や機能の調節に重要な役割を果たしている。これらの N-ミリスチル化タンパク質には、タンパク質リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、グアニンヌクレオチド結合タンパク質、カルシウム結合タンパク質、細胞骨格調節タンパク質のように細胞情報伝達に直接関与するタンパク質が多数含まれている [3-1~3-5]。これら細胞情報伝達に関与するタンパク質に加えて、最近の研究から多くの疾患関連タンパク質にタンパク質 N-ミリスチル化が起こることが明らかになってきた [3-7~3-11]。しかし、タンパク質 N-ミリスチル化を検出する簡便な方法の欠如のため、ヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定は成されていない。

近年のケミカルバイオロジーの発展により、タンパク質 N-ミリスチル化の研究にクリックケミストリーを用いた新しい研究手法が利用可能となった [3-12, 3-13]。これらの研究法の利点は、これまでの放射性標識法と比較して非放射性であり、検出時間が短く感度が高いことである。アジド化あるいはアルキン化したミリスチン酸アナログを用いて細胞タンパク質を代謝標識後、2 次レポーターとクリック反応により結合させることにより、N-ミリスチル化タンパク質の可視化、濃縮、質量分析による同定が可能である [3-14, 3-15]。これらの方法に加えて、ヒトタンパク質の N-ミリスチル化はヒト cDNA を用い、無細胞タンパク質合成系あるいは遺伝子導入細胞での代謝標識によっても同定することができる。我々の以前の研究では、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 リソース由来ヒト cDNA クローンを昆虫培養細胞由来タンパク質合成系において発現させ、そのタンパク質 N-ミリスチル化感受性を代謝標識および質量分析により評価した [3-16]。その結果、約 2,000 個の cDNA クローン (Kazusa ORFeome プロジェクトヒト cDNA クローン) のうち 18 個がこれまでに報告のない新規 N-ミリスチル化タンパク質であることが見出された。これらの結果は、ヒト cDNA リソースからのヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定にこの手法が有用であることを示している。

本研究では、生理的に重要な新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質を効率良く同定するため、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にバイオインフォマティクスに基づく N-ミリスチル化タンパク質予測システムを組み合わせ、4,369 個の Kazusa ORFeome プロジェクトヒト cDNA クローンから N-ミリスチル化タンパク質の同定を試みた。

3-2 材料と方法

3-2-1 試薬

昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系 Transdirect insect cell は島津製作所(Kyoto, Japan)から提供されたものを使用した。ヒト cDNAs (Flexi ORF clones)は Promega 社から購入した。[³H]ロイシン, [³H]ミリスチン酸および Enhanced chemiluminescence (ECL) Prime Western blotting detection reagent は GE Healthcare 社から購入した。ENLIGHTNING は PerkinElmer 社から購入した。T7-Scribe standard RNA IVT kit は CELLSRIPT 社から購入した。dye terminator cycle sequencing kit, Lipofectamine LTX, Plus reagent, Mitotracker Red CHMRos, Hoechst 33342 は Life Technologies 社から購入した。抗 FLAG モノクローナル抗体, 抗 SAMM50 モノクローナル抗体(WH0025813), 抗 SAMM50 ポリクローナル抗体(HPA034537), FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体は Sigma 社から購入した。Protein G-HRP conjugate は Bio-Rad 社から購入した。ImmunoStar LD は和光純薬工業から購入した。X-ray film は Eastman Kodak 社から購入した。その他の試薬は和光純薬工業, 第一化学薬品, 生化学工業の特級または分子生物学グレードのものを用いた。

3-2-2 N-ミリスチル化予測プログラムを用いたタンパク質 N-ミリスチル化の予測

Web サーバー上で公開されている 2 つのタンパク質 N-ミリスチル化予測プログラム MYR Predictor (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>) [3-17] および Myristoylator (<http://www.expasy.org/tools/myristoylator>) [3-18]を用いてタンパク質 N-ミリスチル化を予測した。オープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列から推定される全アミノ酸配列を解析に用いた。

3-2-3 プラスミドの構築

プラスミド構築に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列を Table 3-1 にまとめた。プラスミド pTD1(島津製作所製)を無細胞タンパク質合成系における発現ベクターとして用いた [3-19]。プラスミド pcDNA3-tActin-FLAG, pcDNA3-tActinG2A-FLAG, pTD1-tActin-FLAG, pTD1-tActinG2A-FLAG および pcDNA3-FLAG は以前の報告 [3-20, 3-21]に従い調製した。N-ミリスチル化タンパク質のスクリーニングに用いたプラスミド pTD1-Δ10aa-tActin-FLAG の構築方法を Table 3-2 にまとめた。KOP cDNA クローンの N 末端 10 アミノ酸と tActin の融合タンパク質の cDNA を含むプラスミドは次のように構築した。KOP cDNA クローンの N 末端 10 アミノ酸をコードする 2 つのオリゴヌクレオチド, 5'-ATCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNG-3' (センス鎖) および 5'-AATTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAT-3' (アンチセンス鎖)をアニーリングさせた後, pTD1-Δ10aa-tActin-FLAG ベクターの EcoRV-EcoRI 部位へ挿入した。この

Table 3-1 (1)

The nucleotide sequences of oligonucleotides used in this study

Primer	Primer	Sequence
Primer-N1	EcoRI-tAct11-N	5'-ATATGAATCCGGTTCGGCTGCCCT-3'
Primer-C1	XbaI-stop-Flag-C	GCGCTCTAGATTACTTGTTCATCGTC
KOP01999	EcoRV-FXC01999 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCGCGAACAATGGCAAACAGTACGGCG
KOP01999R	EcoRI-FXC01999 10aa-EcoRV-C	AATTCGCCGCTACTGTTTGCCATTGTTGCGGCCCATGAT
KOP02047	EcoRV-FXC02047 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGGACTCAGGATCAAGACGATCTACCG
KOP02047R	EcoRI-FXC02047 10aa-EcoRV-C	AATTCGGTAGATCGTCTTGATCCTGAGTCCCCCATGAT
KOP02078	EcoRV-FXC02078 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAGTGGACATCCGCCATAACAAGGACG
KOP02078R	EcoRI-FXC02078 10aa-EcoRV-C	AATTCGTCCTTGTATGGCGGATGTCCACTCCCATGAT
KOP02452	EcoRV-FXC02452 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCAGCCCCTGGAACGGCAGCGACGGCG
KOP02452R	EcoRI-FXC02452 10aa-EcoRV-C	AATTCGCCGCTCGCTGCCGTTCCAGGGGCTGCCCATGAT
KOP02617	EcoRV-FXC02617 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGTGCATTTTTGGATAAACCCAAAACCTG
KOP02617R	EcoRI-FXC02617 10aa-EcoRV-C	AATTCAGTTTTGGGTTTATCCAAAATGCACCCATGAT
KOP02819	EcoRV-FXC02819 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAAGAATGTCTTCCAAGCAAGCCACCG
KOP02819R	EcoRI-FXC02819 10aa-EcoRV-C	AATTCGGTGGCTTGCTTGAAGACATTCTTCCCATGAT
KOP02844	EcoRV-FXC02844 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGACTGTGCACGCCCGGAGTTTGGAGG
KOP02844R	EcoRI-FXC02844 10aa-EcoRV-C	AATTCCTCCAACTCCGGGCGTGACAGTCCCCATGAT
KOP02940	EcoRV-FXC02940 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGAACAGCCACTGTGTCCCTCAGGCCG
KOP02940R	EcoRI-FXC02940 10aa-EcoRV-C	AATTCGGCCTGAGGGACACAGTGGCTGTTCCCATGAT
KOP02961	EcoRV-FXC02961 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCGGCTGCTTCTCCAAACCCAAACCAG
KOP02961R	EcoRI-FXC02961 10aa-EcoRV-C	AATTCTGGTTTGGGTTTGGAGAAGCAGCCGCCCATGAT
KOP03470	EcoRV-FXC03470 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGCCC GCGGGGAGCCTGCTGGGCAGCG
KOP03470R	EcoRI-FXC03470 10aa-EcoRV-C	AATTCGCTGCCAGCAGGCTCCCGCGGGCCCATGAT
KOP0-3534	EcoRV-FXC03534 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGAGCAAACCTGACTTGCTGCCTGGGCG
KOP03534R	EcoRI-FXC03534 10aa-EcoRV-C	AATTCGCCCAGGCAGCAAGTCAGTTTGCTCCCATGAT
KOP03565	EcoRV-FXC03565 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGTGCTGGGCCCTCCTTGCTGCTCGCCG
KOP03565R	EcoRI-FXC03565 10aa-EcoRV-C	AATTCGGCGAGCAGCAAGGAGGGCCAGCACCCATGAT
KOP03640	EcoRV-FXC03640 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCAGCGACCCGAGCGCGCCCGACGGG
KOP03640	EcoRI-FXC03640 10aa-EcoRV-C	AATTCCTGCTCGGGCGCGCTCGGGTCGCTGCCCATGAT
KOP03765	EcoRV-FXC03765 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAGACAAGAAGAGCCCCACCAGGCCGG
KOP03765R	EcoRI-FXC03765 10aa-EcoRV-C	AATTCGGCCTGGTGGGGCTCTTCTGTCTCCCATGAT
KOP03868	EcoRV-FXC03868 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGACAGCAAATTCGGATCAGACACAGG
KOP03868R	EcoRI-FXC03868 10aa-EcoRV-C	AATTCCTGTGTCTGATCCGAAATTTGCTGTCCCATGAT
KOP03969	EcoRV-FXC03969 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAGCGAACAACCTCAAGAAAACCACCAG
KOP03969R	EcoRI-FXC03969 10aa-EcoRV-C	AATTCTGGTGGTTTTCTGAAGTTCGCTCCCATGAT
KOP04325	EcoRV-FXC04325 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCAATTTACTTAGTAAATTTAGACCCG
KOP04325R	EcoRI-FXC04325 10aa-EcoRV-C	AATTCGGGTCTAAATTTACTAAGTAAATTGCCCATGAT
KOP04954	EcoRV-FXC04954 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTCCTGCGTGTGCGGAGACCTGTTCCG

Table 3-1 (2)

The nucleotide sequences of oligonucleotides used in this study

Primer	Primer	Sequence
KOP04954R	EcoRI-FXC04954 10aa-EcoRV-C	AATTCGAACAGGTCTCGCGACACGCAGGAGCCCATGAT
KOP05791	EcoRV-FXC05791 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTGCTGTGGCTGCTCCAGAGGCTGTG
KOP05791R	EcoRI-FXC05791 10aa-EcoRV-C	AATTCACAGCCTCTGGAGCAGCCACAGCAGCCCATGAT
KOP05792	EcoRV-FXC05792 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTGCTCTGGCTGCTCTGGAGGCTGTG
KOP05792R	EcoRI-FXC05792 10aa-EcoRV-C	AATTCACAGCCTCCAGAGCAGCCAGAGCAGCCCATGAT
KOP05856	EcoRV-FXC05856 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGAATATACTGACCTGTTGTATCAACG
KOP05856R	EcoRI-FXC05856 10aa-EcoRV-C	AATTCGTTGATACAACAGGTCAGTATATCCCCATGAT
KOP05945	EcoRV-FXC05945 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGTTTGTCTCCATTAGCAGCCCTGGCAG
KOP05945R	EcoRI-FXC05945 10aa-EcoRV-C	AATTCTGCCAGGGCTGCTGAATGGAGCAAACCCATGAT
KOP07187	EcoRV-FXC07187 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGAACACATTGGGCCTGGCACCAATGG
KOP07187R	EcoRI-FXC07187 10aa-EcoRV-C	AATTCCATTGGTGCCAGGCCCAATGTGTTCCCCATGAT
KOP07438	EcoRV-FXC07438 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGAACAAACAAGAAGAAAGTGG
KOP07438R	EcoRI-FXC07438 10aa-EcoRV-C	AATTCACCTTTCTTCTGTTTTGTTTTTCCCCATGAT
KOP07771	EcoRV-FXC07771 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAGAAGAAGCATCCATTGTGTCTTCAG
KOP07771R	EcoRI-FXC07771 10aa-EcoRV-C	AATTCTGAAGACACAATGGATGCTTCTTCTCCCATGAT
KOP10490	EcoRV-FXC10490 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGTCGACCGACTCCAAGCTGAACTTCG
KOP10490R	EcoRI-FXC10490 10aa-EcoRV-C	AATTCGAAGTTCAGCTTGGAGTCGGTCGACCCCATGAT
KOP10528	EcoRV-FXC10528 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGGCAGGCGGGCTGCAAGGGGCTCTGCG
KOP10528R	EcoRI-FXC10528 10aa-EcoRV-C	AATTCGCAGAGCCCCTTGCAGCCCGCTGCCCATGAT
KOP10683	EcoRV-FXC10683 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTGCTGCAGCTCCGCCTCCTCCGCCG
KOP10683R	EcoRI-FXC10683 10aa-EcoRV-C	AATTCGGCGGAGGAGGCGGAGCTGCAGCAGCCCATGAT
KOP10889	EcoRV-FXC10889 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCAGTGTGCGAACCAACCGCTACAGCG
KOP10889R	EcoRI-FXC10889 10aa-EcoRV-C	AATTCGCTGTAGCGGTTGGTTCGCACACTGCCCATGAT
KOP11186	EcoRV-FXC11186 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTGCTGTGGCTGTTCCGAAGGCTGTG
KOP11186R	EcoRI-FXC11186 10aa-EcoRV-C	AATTCACAGCCTTCGGAACAGCCACAGCAGCCCATGAT
KOP11187	EcoRV-FXC11187 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTGTTGCGGCTGCTCCGGAGGCTGTG
KOP11187	EcoRI-FXC11187 10aa-EcoRV-C	AATTCACAGCCTCCGGAGCAGCCGCAACAGCCCATGAT
KOP11232	EcoRV-FXC11232 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAGCAGTAAGCTGTCCGGCAGGGGCAGG
KOP11232R	EcoRI-FXC11232 10aa-EcoRV-C	AATTCCTGCCCTGCCGACAGCTTACTGCTCCCATGAT
KOP11252	EcoRV-FXC11252 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCGGAACCACTCCACAAGCCCCCG
KOP11252R	EcoRI-FXC11252 10aa-EcoRV-C	AATTCGGGGGGCTTGTGGGAGTGGTTCGGCCCATGAT
KOP11288	EcoRV-FXC11288 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGTGACAAGGGAACAGGCAACCATTGAG
KOP11288R	EcoRI-FXC11288 10aa-EcoRV-C	AATTCTGAATGGTTGCCTGTTCCCTTGTACCCCATGAT
KOP11366	EcoRV-FXC11366 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGCTGCAGAAGAAGACTAGAGAAGGACCAG
KOP11366R	EcoRI-FXC11366 10aa-EcoRV-C	AATTCTGGTCTTCTCTAGTTCTTCTGCAGCCCATGAT
KOP11932	EcoRV-FXC11932 10aa-EcoRI-N	ATCATGGGAGACCCGGGTCGAAATAATAGAAG
KOP11932R	EcoRI-FXC11932 10aa-EcoRV-C	AATTCTTCTATTATTTCCGACCCCGGTCTCCCATGAT

Table 3-1 (3)

The nucleotide sequences of oligonucleotides used in this study

Primer	Primer	Sequence
Primer-N2	EcoRI-FXC1999-N	GCATGAATTCATGGGCGCGAACAATG
Primer-C2	FXC1999-Flag-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCGAAAGCCGGTT
Primer-N3	EcoRV- FXC02617-N	GCATGATATCATGGGTGCATTTTTG
Primer-C3	FXC02617-Flag-EcoRI-C	GCGCGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCTATTTTTTACCACCT
Primer-N4	BamHI-FXC2844-N	ATATGGATCCATGGGGACTGTGCAC
Primer-C4	FXC2844-Flag-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCAGGAACCTTATCCC
Primer-N5	EcoRV- FXC02940-N	GATAGATATCATGGGGAACAGCCAC
Primer-C5	FXC02940-Flag-EcoRI-C	GCGCGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCGATCCACTGCACAAG
Primer-N6	EcoRI-FXC03470-N	ATATGAATTCATGGGGCCCGCGGGG
Primer-C6	FXC03470-Flag-stop-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCGAGCCTGGTAATATC
Primer-N7	EcoRV-FXC03534-N	GTACGATATCATGGGGAGCAAAGT
Primer-C7	FXC03534-Flag-stop-EcoRI	AGGGGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCAAGCCGGAGAAGTCC
Primer-N8	EcoRV-FXC3565-N	ATATGATATCATGGGTGCTGGGCC
Primer-C8	FXC3565-Flag-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCAATTTAGGAATTGG
Primer-N9	EcoRI-FXC03868-N	GCGCGAATTCATGGGACAGCAAATT
Primer-C9	FXC03868-Flag-XbaI-C	ATGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCTGGCCTGTGGGGCTG
Primer-N10	EcoRV- FXC03969-N	GATAGATATCATGGGAGCGAACACT
Primer-C10	FXC03969-Flag-EcoRI-C	GCGCGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCAAGTTGTTATTCTG
Primer-N11	EcoRI-FXC04954-N	ATATGAATTCATGGGCTCCTGCGTG
Primer-C11	FXC04954-Flag-stop-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCGTTATAGAACACCTC
Primer-N12	EcoRI-FXC05856-N	GCGCGAATTCATGGGGAATATACTG
Primer-C12	FXC05856-Flag-stop-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCCCTGGATGAATCTC
Primer-N13	EcoRV- FXC05945-N	GCATGATATCATGGGTTTGTCCAT
Primer-C13	FXC05945-Flag-EcoRI-C	GCGCGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCAAGCGAAGTTTCATT
Primer-N14	EcoRI- FXC07187-N	GCGCGAATTCATGGGGAACACATTG
Primer-C14	FXC07187-Flag-BamHI-C	GCGAGGATCCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCGCCACAGTGATGCT
Primer-N15	EcoRV- FXC10490-N	ATATGATATCATGGGGTCGACCGAC
Primer-C15	FXC10490-Flag-EcoRI-C	GCGAGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCACCCGCTGTATCTC
Primer-N16	EcoRV-MGQ-ORK10528 N	ATATGATATCATGGGGCAGGCGGGCTGCAAGGGG
Primer-C16	ORK10528-Flag-stop-EcoRI	GCGCGAATTCTTACTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCCGTGCTCCTGTGGGG
Primer-N17	EcoEV-FXC10683-N	ATATGATATCATGGGCTGCTGCAGC
Primer-C17	FXC10683-Flag-XbaI-C	GCGCTCTAGATTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCAGCAGAACTTGCTCC
Primer-N18	EcoRV-FXC11232-N	ATGCGATATCATGGGAGCAGTAAGC
Primer-C18	FXC11232-Flag-EcoRI-C	GCGCGAATTCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCACCTCTCTACCCAT
Primer-N19	EcoRV- FXC11252-N	GCATGATATCATGGGCGGGAACCAC
Primer-C19	FXC11252-Flag-SacI-C	GCGAGAGCTTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAGTCGCTGCTGCAGCCACG
Primer-C20	FXC02617- XbaI-C	GCGCTCTAGATATTTTTTACCACCT

Table 3-1 (4)

The nucleotide sequences of oligonucleotides used in this study

Primer	Primer	Sequence
Primer-N20	BamHI-FXC2844G2A-N	ATATGGATCCATGGCCACTGTGCACGCCCGG
Primer-C21	FXC02940- XbaI-C	GCATTCTAGAGATCCACTGCACAAG
Primer-N21	EcoRI-AIF3 N	GCGCGAATTCATGGGCGGCTGCTTC
Primer-C22	Flag-EcoRV C	GCGCGAATTCTTACTTGTCATCGTC
Primer-N22	BamHI-FXC03534-N	AATTGGATCCATGGGGAGCAAATG
Primer-C23	FXC03969- XbaI-C	GCGCTCTAGACAAGTTGTTATTCTG
Primer-C24	FXC05945- XbaI-C	GCGCTCTAGAAAGCGAAGTTTCATT
Primer-N23	BamHI- FXC07187-N	GCATGGATCCATGGGGAACACATTG
Primer-C25	FXC07187- EcoRI-C	GCATGAATTCGCCACAGTGATGCT
Primer-C26	FXC10490- XbaI-C	GATATCTAGACACCCGCTGTATCTC
Primer-N24	EcoRI-FXC10528-N	ATATGAATTCATGGGGCAGGCGGGC
Primer-C27	FXC10528-XbaI-C	ATATTCTAGACGTGCTCCTGTGGGG
Primer-N25	HindIII- FXC10683-N	ATGCAAGCTTATGGGCTGCTGCAGC
Primer-C28	FXC10683-XbaI-C	GCGCTCTAGAAGCAGAACTTGCTCC
Primer-N26	HindIII- FXC11252-N	GCATAAGCTTATGGGCGGGAACCAC
Primer-C29	FXC11252- EcoRV-C	GATCGATATCGCTGCTGCAGCCACG

Table 3-2 (1) The strategies for construction of pTD1 or pcDNA3 plasmids including fulllength KOP cDNA clones.

Name of plasmid	Strategy for plasmid construction
pTD1- Δ 10aa-tAct-Flag	Product of a PCR with pDT1-tAct-Flag as a template and primers Primer-N1 and Primer-C1 was EcoRI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC01999-FLAG	Product of a PCR with pF1KA0840 as a template and primers Primer-N2 and Primer-C2 was EcoRI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC02617-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8150 as a template and primers Primer-N3 and Primer-C3 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC02844-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8447 as a template and primers Primer-N4 and Primer-C4 was BamHI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC02940-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8695 as a template and primers Primer-N5 and Primer-C5 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC02961-FLAG	pTD1-FL vector was digested with SgfI and EcoI and the KOP cDNA clones digested with SgfI and PmeI were subcloned into the vector.
pTD1-FXC03470-FLAG	Product of a PCR with pF1KB6612 as a template and primers Primer-N6 and Primer-C6 was EcoRI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC03534-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0505 as a template and primers Primer-N7 and Primer-C7 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC03565-FLAG	Product of a PCR with pF1KB5535 as a template and primers Primer-N8 and Primer-C8 was EcoRV/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC03868-FLAG	Product of a PCR with pF1KB0979 as a template and primers Primer-N9 and Primer-C9 was EcoRI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC03969-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0678 as a template and primers Primer-N10 and Primer-C10 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC4954-FLAG	Product of a PCR with pF1KB6310 as a template and primers Primer-N11 and Primer-C11 was EcoRI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC05856-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0523 as a template and primers Primer-N12 and Primer-C12 was EcoRI/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC05945-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0011 as a template and primers Primer-N13 and Primer-C13 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC07187-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0451 as a template and primers Primer-N14 and Primer-C14 was EcoRI/BamHI cloned into pTD1.
pTD1-FXC10490-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9562 as a template and primers Primer-N15 and Primer-C15 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC10528-FLAG	Product of a PCR with pF1KB4832 as a template and primers Primer-N16 and Primer-C16 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC10683-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9940 as a template and primers Primer-N17 and Primer-C17 was EcoRV/XbaI cloned into pTD1.
pTD1-FXC11232-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0683 as a template and primers Primer-N18 and Primer-C18 was EcoRV/EcoRI cloned into pTD1.
pTD1-FXC11252-FLAG	Product of a PCR with F1KE0720 as a template and primers Primer-N19 and Primer-C219 was EcoRV/SacI cloned into pTD1.
pcDNA3-FXC01999-FLAG	Product of a PCR with pF1KA0840 as a template and primers Primer-N2 and Primer-C2 was EcoRI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.

Table 3-2 (2) The strategies for construction of pTD1 or pcDNA3 plasmids including fulllength KOP cDNA clones.

Name of plasmid	Strategy for plasmid construction
pcDNA3-FXC02617-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8150 as a template and primers Primer-N3 and Primer-C20 was EcoRV/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC02844-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8447 as a template and primers Primer-N4 and Primer-C4 was BamHI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC02844G2A-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8447 as a template and primers Primer-N20 and Primer-C4 was BamHI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC02940-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8695 as a template and primers Primer-N5 and Primer-C21 was EcoRV/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC02961-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8718 as a template and primers Primer-N21 and Primer-C22 was EcoRI/EcoRV cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC03470-FLAG	Product of a PCR with pF1KB6612 as a template and primers Primer-N6 and Primer-C6 was EcoRI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC03534-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0505 as a template and primers Primer-N22 and Primer-C7 was EcoRV/EcoRI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC03565-FLAG	Product of a PCR with pF1KB5535 as a template and primers Primer-N8 and Primer-C8 was EcoRV/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC03868-FLAG	Product of a PCR with pF1KB0979 as a template and primers Primer-N9 and Primer-C9 was EcoRI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC03969-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0678 as a template and primers Primer-N10 and Primer-C23 was EcoRV/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC4954-FLAG	Product of a PCR with pF1KB6310 as a template and primers Primer-N11 and Primer-C11 was EcoRI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC05856-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0523 as a template and primers Primer-N12 and Primer-C12 was EcoRI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC05945-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0011 as a template and primers Primer-N13 and Primer-C24 was EcoRV/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC07187-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0451 as a template and primers Primer-N23 and Primer-C25 was BamHI/EcoRI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC10490-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9562 as a template and primers Primer-N15 and Primer-C26 was EcoRV/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC10528-FLAG	Product of a PCR with pF1KB4832 as a template and primers Primer-N24 and Primer-C27 was EcoRI/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC10683-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9940 as a template and primers Primer-N25 and Primer-C28 was HindIII/XbaI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC11232-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0683 as a template and primers Primer-N18 and Primer-C18 was EcoRV/XhoI cloned into pcDNA3-Flag.
pcDNA3-FXC11252-FLAG	Product of a PCR with F1KE0720 as a template and primers Primer-N26 and Primer-C29 was HindIII/EcoRV cloned into pcDNA3-Flag.

プラスミドを pTD1-NNNNN-tActin-FLAG とした。ここで、NNNNN は KOP cDNA クロンの製品 ID を示している。全長 KOP cDNA クロンを含む pTD1 または pcDNA3 の構築方法を Table 3-2 にまとめた。

3-2-4 mRNA の合成と精製

3-2-3 で構築したプラスミドを鋳型として PCR 反応を行い、この PCR 増幅産物を *in vitro* 転写用の鋳型として用いた。mRNA の合成は T7-Scribe standard RNA IVT kit (CELLSCRIPT 社製) を用いて行った。8 μ l の PCR 増幅産物を鋳型とし、付属の取扱説明書に従い 20 μ l の転写反応液を調製した。これを 37°C で 4 時間インキュベートした。転写反応液はフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製後、20 μ l の DEPC 処理水に溶解した。上記操作により約 150 μ g の mRNA が得られた。

3-2-5 無細胞タンパク質合成

無細胞タンパク質合成は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系(Shimadzu 社製)を用いて行った[3-21]。合成した mRNA(8 μ g)を鋳型とし、キットに付属のメチオニン溶液(0.5 μ L), reaction buffer(3.7 μ L), insect cell lysate (6.2 μ L)を添加し、1.0 μ L [³H]leucine (1 μ Ci) または 3.0 μ L [³H]ミリスチン酸(20 μ Ci)を加えた。12.5 μ L の無細胞タンパク質合成反応液とし、26°C で 6 時間反応させた。タンパク質合成産物は SDS-PAGE およびフルオログラフイで分析した。

3-2-6 培養細胞への遺伝子導入

HEK293T 細胞(ヒト胎児腎細胞由来、アデノウイルス 5 型形質転換株)および COS-1 細胞(アフリカミドリザル腎細胞由来、SV40 形質転換株)は 10 %ウシ胎児血清(FCS, Gibco BRL 社製), 100 unit/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma 社製)を用い、37°C, 5 % CO₂ 条件下で培養した。遺伝子導入前日に直径 35 mm 培養皿に 2 \times 10⁵ 個の細胞を播種した。Lipofectamine LTX (2.5 μ L), Plus reagent(2 μ L), 無血清培地 1 mL を用い、Flag タグを付加した cDNA 配列を含むプラスミド pcDNA3(2 μ g)を細胞へ遺伝子導入した。37°C で 5 時間インキュベート後、培地を血清添加培地に交換し、適当な時間インキュベートした。

3-2-7 遺伝子導入細胞を用いた代謝標識

遺伝子導入後、37°C で 24 時間インキュベートした HEK293T 細胞を [³H]myristic acid (100 μ Ci/mL)および 2% FCS を添加した 1mL の DMEM 中、37°C で 6 時間インキュベートした。Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)で 3 回洗浄後、細胞を回収し、クリックケミストリー用 RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS およびプロテアーゼ阻害剤) 200 μ L

で溶解後、氷上で 20 分放置し細胞溶解液を得た。細胞溶解液は SDS サンプルバッファー中で 3 分間煮沸により SDS 化し、SDS-PAGE およびフルオログラフィーによる解析に用いた。

3-2-8 SDS-PAGE およびフルオログラフィー

タンパク質は 12.5% SDS-PAGE により分離し、ゲルを固定化後、ENLIGHTNING (PerkinElmer)中に 20 分間浸漬した。その後、ゲルを加温吸引により乾燥させ、適切な期間 X 線フィルムに露光した。

3-2-9 ウェスタンブロッティング

タンパク質は 12.5% SDS-PAGE により分離後、Immobilon-P 膜へ転写した。スキムミルクでブロッキング後、抗 Flag 抗体(1000 倍希釈)または抗 SAMM50 抗体(2000 倍希釈)で処理した。抗体処理後の Immobilon-P 膜は、続いてプロテイン G-HRP で処理した。その後、ECL Prime Western blotting detection reagent または ImmunoStar LD と反応させ、化学発光を MicroChemi Chemiluminescence Imaging System により検出した。バンド強度は TotalLab Quant software を用いて定量化した。

3-2-10 免疫蛍光染色および蛍光顕微鏡観察

遺伝子導入後 24 時間経過した細胞を免疫蛍光染色に用いた[3-22]。始めに Hoechst 33342 および Mitotracker Red で核およびミトコンドリアを染色した。その後、細胞を DPBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(DPBS 中)で 15 分間インキュベートし固定した。固定した細胞を 0.1% Triton X-100(DPBS 中)で 10 分間室温で透過性処理後、0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄した。透過性細胞は DPBS 中 100 倍希釈抗 SAMM50 抗体(Sigma 社, HPA034537)中に室温で一時間浸漬した。0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄後、細胞を FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体と室温で一時間反応させた。0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄後、マウンティングメディウム (VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories 社製)を用いて封入し、Leica AF7000 蛍光顕微鏡(Leica, Solmsers, Germany)により観察した。

3-2-11 免疫沈降

試料は抗 SAMM50 抗体(Sigma 社, HPA034537)を用いて以前の方法に従って免疫沈降した[3-23]。

3-2-12 統計分析

統計分析は両側 t 検定(マイクロソフトエクセル)を用いて行った。p が 0.05 以下の場合に二群の平均に有意差があるものとした。

3-3 結果

3-3-1 cDNA リソースからのヒト N-ミリスチル化タンパク質をコードする候補 cDNA クローンの選別

ヒト N-ミリスチル化タンパク質を探索するために、4,369 個の KOP (Kazusa ORFeome プロジェクト)ヒト cDNA クローン(FXC01948~FXC23818)から N 末端に Met-Gly モチーフを持つヒト cDNA クローンを選出した(Fig.3-1A). これら 339 個の cDNA クローン産物の N 末端配列を 2 つのタンパク質 N-ミリスチル化予測プログラム, MYR predictor および Myristoylator に適用したところ, ミリスチル化されると予測された 90 個の cDNA クローンを見出した(Table 3-3). これらの cDNA クローンから, 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 53 クローンを除き, 37cDNA クローンをヒト N-ミリスチル化タンパク質候補として選択した(Fig.3-1A).解析したサンプルを Table 3-4 に記載した.

ヒト N-ミリスチル化タンパク質候補のタンパク質 N-ミリスチル化感受性は, C 末端に FLAG タグを付加したモデルタンパク質 tActin 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(Fig.3-1B). この実験では, 融合タンパク質を³Hロイシンまたは³Hミリスチン酸存在下で昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて合成し, SDS-PAGE およびフルオログラフィーにより分析した. Fig.3-1C 上図に示したように, ³Hロイシンの取り込みからほとんどの融合タンパク質の発現が確認された. 一方, Fig.3-1C 中央図に示したように, ³Hミリスチン酸の取り込みは 37 クローンのうち 19 個で観察された. 2 つの N-ミリスチル化予測プログラム, MYR predictor および Myristoylator の予測結果は Fig.3-1C 下図に示した.

3-3-2 無細胞タンパク質合成系において合成した全長 cDNA 産物に起こるタンパク質 N-ミリスチル化の解析

tActin 融合タンパク質で得られた実験結果がこれらの全長 cDNA 産物での結果と一致するか否かを確認するために, tActin 融合タンパク質で³Hミリスチン酸の取り込みが観察された 19 個について, 全長 cDNA を用いて代謝標識実験を行った. 解析したサンプルは Table 3-5 に記載した. Fig.3-2A 上図に示したように, ³Hロイシンの取り込みによりすべての cDNA クローンの発現が確認された. FBXL7(レーン 7), PLEKHN(レーン)4, PAG1(レーン 6), MCC1(レーン 13), TOMM40L(レーン 15), STK32B(レーン 19)のようないくつかのタンパク質では, 理論分子量と一致するタンパク質バンドに加え, それより低分子量のタンパク質バンドが観察された. この理由は不明である. Fig.3-2A 下図に示したように,

Table 3-3. The results of the prediction for protein N-myristoylation of 90 cDNA clones using two prediction programs, The MYR Predictor and Myristoylator.

No.	FXC No.	Gene name	MYR	Myristoylator	No.	FXC No.	Gene name	MYR	Myristoylator
1	FXC01999	FBXL7	Twilight	No	46	FXC04325	C15orf2	Reliable	High
2	FXC02047	KIAA1680	No	Low	47	FXC04954	FAM131C	Reliable	High
3	FXC02078	RPL18	No	Low	48	FXC05230	NCS1	Reliable	High
4	FXC02087	PSMC1	Reliable	High	49	FXC05310	GNAI2	Reliable	High
5	FXC02096	MBP	Twilight	High	50	FXC05311	GNAI3	Reliable	High
6	FXC02112	GNAO1	Reliable	High	51	FXC05451	HPCAL4	Reliable	High
7	FXC02124	ARF6	Reliable	High	52	FXC05791	KRTAP5-2	Twilight	No
8	FXC02148	GNAZ	Reliable	High	53	FXC05792	KRTAP5-3	Twilight	No
9	FXC02199	HPCAL1	Reliable	High	54	FXC05793	KRTAP5-4	Twilight	No
10	FXC02452	MLNR	No	Medium	55	FXC05856	DRICH1	Twilight	High
11	FXC02617	PPM1B	No	Medium	56	FXC05932	MARCKSL1	Reliable	High
12	FXC02691	ARF4	Reliable	High	57	FXC05945	MCC1	No	High
13	FXC02705	CIB1	Reliable	High	58	FXC06109	NCALD	Reliable	High
14	FXC02814	ZNRF1	Reliable	No	59	FXC06445	PPEF2	Reliable	High
15	FXC02819	SOX6	No	High	60	FXC06481	PRKACG	Reliable	High
16	FXC02830	SCYL3	Reliable	High	61	FXC06491	PRKG2	Reliable	Medium
17	FXC02835	PRKACB	Reliable	High	62	FXC07187	TOMM40L	Twilight	Medium
18	FXC02843	CYB5R3	Reliable	High	63	FXC07438	CBX1	No	High
19	FXC02844	SAMM50	No	Medium	64	FXC07768	CHCHD3	Reliable	High
20	FXC02903	CCNY	Reliable	High	65	FXC07771	ZNF292	No	High
21	FXC02940	PLEKHN	Reliable	Low	66	FXC07968	ARL5A	No	High
22	FXC02961	AIFM3	Reliable	High	67	FXC08024	RCVRN)	Reliable	High
23	FXC02992	ARL11	Reliable	Medium	68	FXC08348	GORASP2	Reliable	High
24	FXC02995	ARL4A	No	High	69	FXC10143	VSNL1)	Reliable	High
25	FXC02996	ARL4D	No	Low	70	FXC10490	HID1	No	High
26	FXC03133	ARL4C	Reliable	Low	71	FXC10528	P2RX5	Reliable	High
27	FXC03149	MARCKS	Reliable	High	72	FXC10564	PRKACA	Reliable	High
28	FXC03406	KCNIP1	Reliable	No	73	FXC10600	DUSP22	No	High
29	FXC03442	FRS2	Reliable	High	74	FXC10609	ARF3	Twilight	High
30	FXC03444	LYN	Reliable	High	75	FXC10612	CIB2	Reliable	High
31	FXC03470	PAG1	No	High	76	FXC10616	ARF5	Reliable	High
32	FXC03513	GORASP1	Reliable	High	77	FXC10683	SLC44A1	Reliable	High
33	FXC03534	C22orf42	Twilight	High	78	FXC10684	FYN	Reliable	High
34	FXC03565	CTSC	No	Low	79	FXC10889	KCNJ2	Twilight	No
35	FXC03640	MMP15	No	High	80	FXC10897	CHP2	Twilight	High
36	FXC03679	SLA2	Reliable	High	81	FXC10914	CABP2	No	Medium
37	FXC03685	PDE9A	Twilight	High	82	FXC11186	KRTAP5-7	Twilight	No
38	FXC03736	LCK	Reliable	High	83	FXC11187	KRTAP5-1	Twilight	No
39	FXC03765	YAF2	No	High	84	FXC11232	SGK494	Reliable	No
40	FXC03808	BLK	Reliable	High	85	FXC11252	STK32B	Twilight	High
41	FXC03815	RAPSN	Reliable	High	86	FXC11260	PSKH1	Reliable	High
42	FXC03868	RNF141	No	High	87	FXC11288	OR9K1P	No	Medium
43	FXC03887	PPP3R1	Reliable	High	88	FXC11366	SELL	Twilight	No
44	FXC03909	GMCL1	Twilight	High	89	FXC11854	SRC	Reliable	High
45	FXC03969	STK32A	Twilight	High	90	FXC11932	KIAA1586	No	High

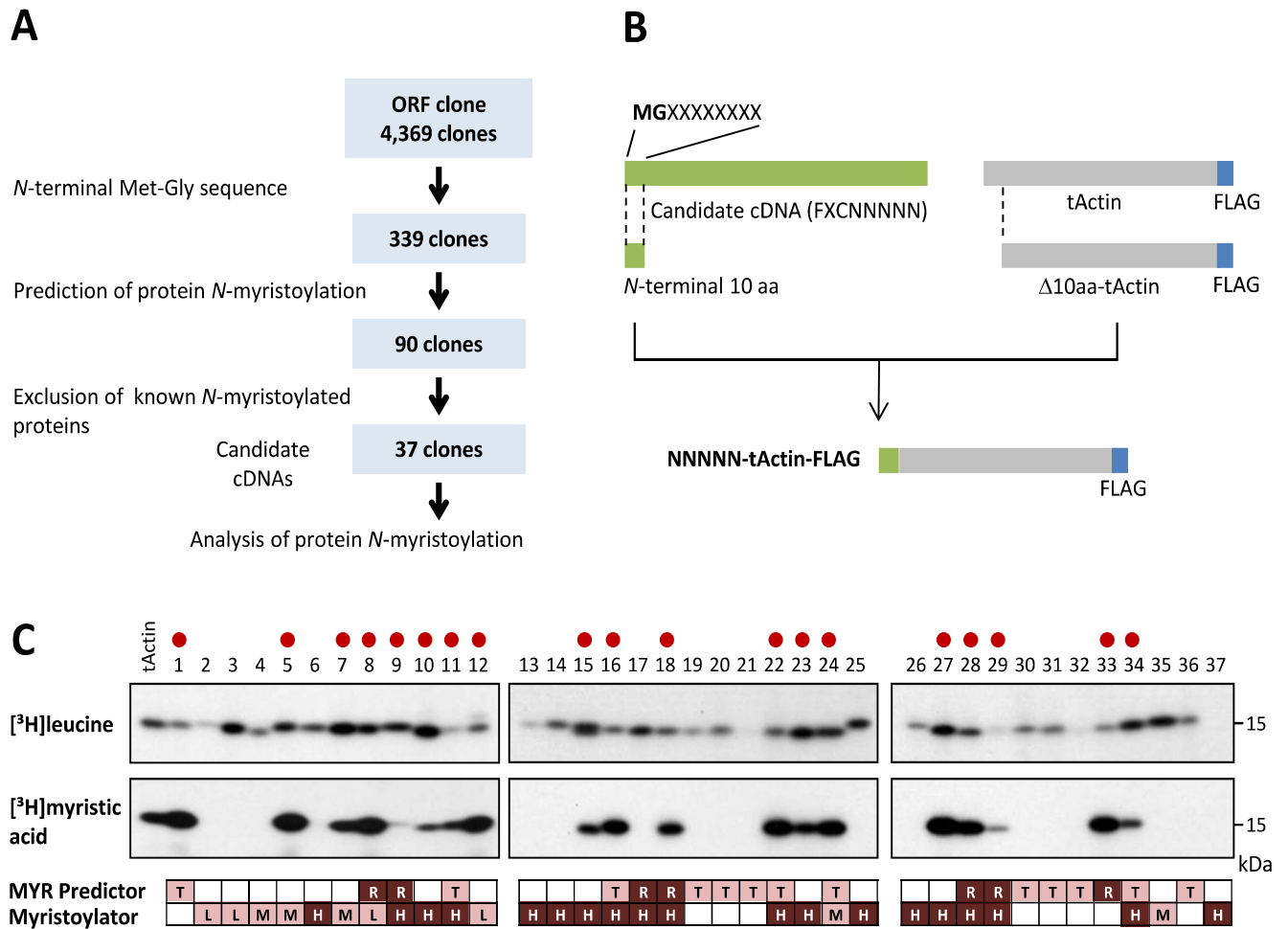


Fig. 3-1. Selection of candidate cDNA clones encoding human *N*-myristoylated proteins from a cDNA resource.

A. Strategy for selection of candidate cDNA clones encoding human *N*-myristoylated proteins from a cDNA resource. B. Schematic representation of the generation of NNNNN-tActin-FLAG with *N*-terminal 10 amino acid sequences of the ORFs of KOP cDNA clones at its *N*-terminus. C. Detection of protein *N*-myristoylation of NNNNN-tActin-FLAGs by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. NNNNN-tActin-FLAGs were synthesized in the presence of [³H]leucine or [³H]myristic acid, and the labeled translation products were analyzed by SDS-PAGE and fluorography. The myristoylated samples are indicated by red circles. The results of the predictions of protein *N*-myristoylation using two prediction programs, The MYR Predictor and Myristoylator, are shown in the lower panels. R, T, and blank represent ‘Reliable’, ‘Twilight zone,’ and ‘No’ prediction from The MYR Predictor, respectively. H, M, L, and blank represent ‘High confidence’, ‘Medium confidence’, ‘Low confidence,’ and ‘No’ predictions from Myristoylator, respectively.

Table 3-4. The list of cDNA samples analyzed in Fig. 3-1.

Lane	FXC No.	Gene name
1	FXC01999	FBXL7
2	FXC02047	KIAA1680
3	FXC02078	RPL18
4	FXC02452	MLNR
5	FXC02617	PPM1B
6	FXC02819	SOX6
7	FXC02844	SAMM50
8	FXC02940	PLEKHN
9	FXC02961	AIFM3
10	FXC03470	PAG1
11	FXC03534	C22orf42
12	FXC03565	CTSC
13	FXC03640	MMP15
14	FXC03765	YAF2
15	FXC03868	RNF141
16	FXC03969	STK32A
17	FXC04325	NPAP1
18	FXC04954	FAM131C
19	FXC05791	KRTAP5-2
20	FXC05792	KRTAP5-3
21	FXC05793	KRTAP5-4
22	FXC05856	DRICH1
23	FXC05945	MCC1
24	FXC07187	TOMM40L
25	FXC07438	CBX1
26	FXC07771	ZNF292
27	FXC10490	HID1
28	FXC10528	P2RX5
29	FXC10683	SLC44A1
30	FXC10889	KCNJ2
31	FXC11186	KRTAP5-7
32	FXC11187	KRTAP5-1
33	FXC11232	SGK494
34	FXC11252	STK32B
35	FXC11288	OR9K1P
36	FXC11366	SELL
37	FXC11932	KIAA1586

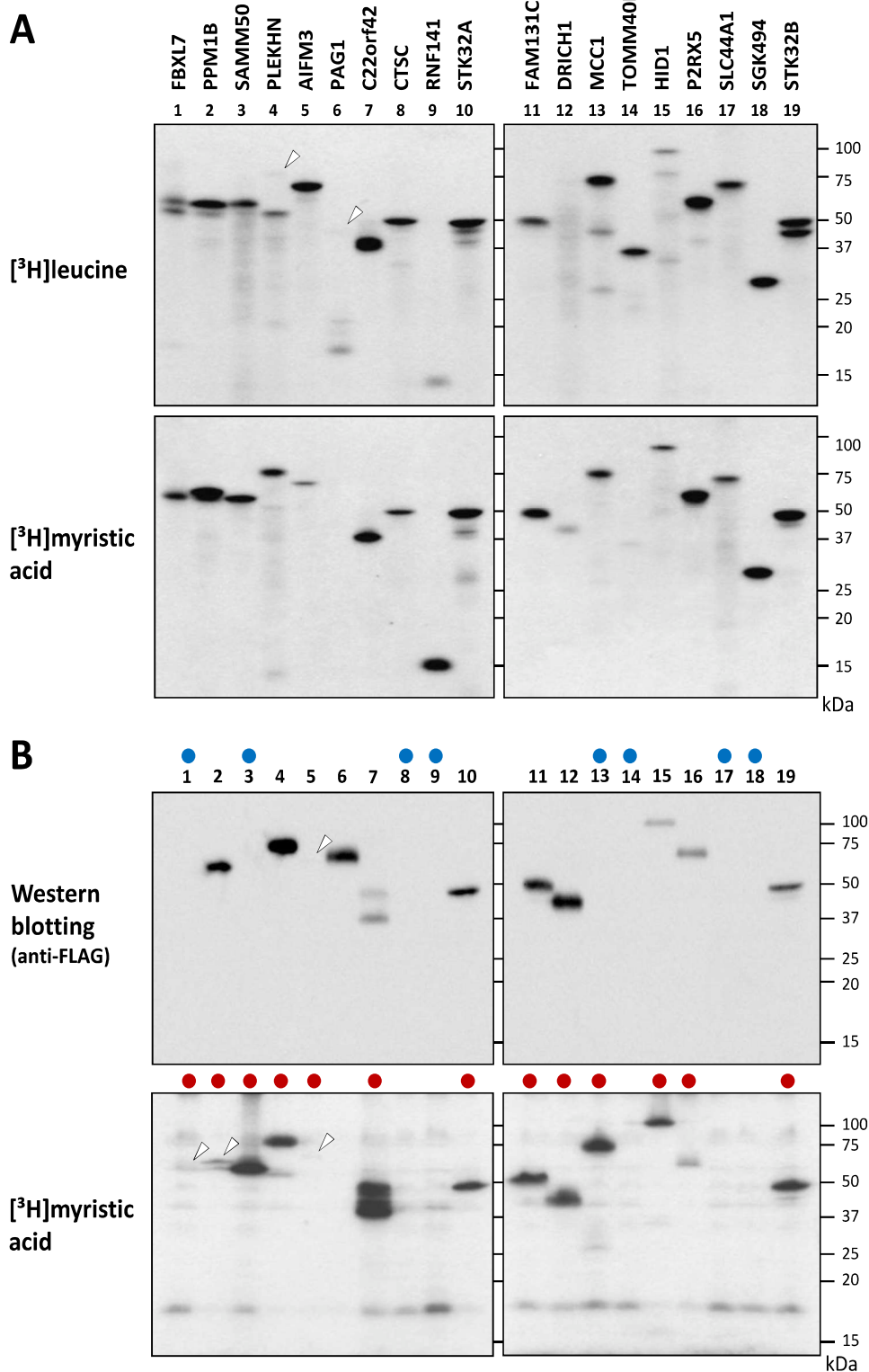


Fig. 3-2. Detection of protein N-myristoylation of the gene products of 19 full-length cDNAs by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system and in transfected HEK293T cells.

A. The gene products of 19 full-length cDNAs, in which efficient incorporation of $[^3\text{H}]$ myristic acid was observed with the tActin fusion proteins, were synthesized using an insect cell-free protein synthesis system in the presence of $[^3\text{H}]$ leucine or $[^3\text{H}]$ myristic acid. The labeled translation products were analyzed by SDS-PAGE and fluorography. Faint bands are indicated by arrowheads. B. The 19 full-length cDNAs analyzed in Fig. 3-2 A were transfected into HEK293T cells, and metabolic labeling with $[^3\text{H}]$ myristic acid was performed. The labeled translation products were separated by SDS-PAGE and then analyzed by western blotting using an anti-FLAG antibody or fluorography. The samples that showed no protein expression are indicated by blue circles in the upper panels. The samples in which protein N-myristoylation was observed are indicated by red boxes in the lower panels. Faint bands are indicated by arrowheads.

Table 3-5. The list of cDNA samples analyzed in Figs 3-2 and 3-3.

Lane	FXC No.	Gene name
1	FXC01999	FBXL7
2	FXC02617	PPM1B
3	FXC02844	SAMM50
4	FXC02940	PLEKHN
5	FXC02961	AIFM3
6	FXC03470	PAG1
7	FXC03534	C22orf42
8	FXC03565	CTSC
9	FXC03868	RNF141
10	FXC03969	STK32A
11	FXC04954	FAM131C
12	FXC05856	DRICH1
13	FXC05945	MCC1
14	FXC07187	TOMM40L
15	FXC10490	HID1
16	FXC10528	P2RX5
17	FXC10683	SLC44A1
18	FXC11232	SGK494
19	FXC11252	STK32B

[³H]ミリスチン酸の取り込み結果から、19個のcDNAクローンのうち18個の産物がN-ミリスチル化されることが明らかとなった。

3-3-3 遺伝子導入ヒト細胞で発現させた全長cDNA産物に起こるタンパク質N-ミリスチル化の解析

昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた *in vitro* 代謝標識で得られた結果が *in vivo* における cDNA 産物の挙動を反映するかを調べるために、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において解析した 19 個の全長 cDNA (Table 3-5)を用いて遺伝子導入 HEK293T 細胞において代謝標識を行った。昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系とは異なり、遺伝子導入 HEK293T 細胞ではタンパク質発現が確認できない cDNA クローンが存在した。抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより確認したところ、タンパク質合成は 11 個の cDNA クローンで確認されたが、Fig.3-2B 上図において青丸で示したように 8 個の cDNA クローンでタンパク質発現が確認されなかった。一方、タンパク質 N-ミリスチル化では、Fig.3-2B 下図において赤丸で示したように、19cDNA のうち 13 個で [³H]ミリスチン酸の明らかな取り込みが観察された。奇妙なことに、Fig.3-2B 下図レーン 1, 3, 13 で示したように、FBXL7, SAMM50, MCC1 では [³H]ミリスチン酸の取り込みが観察されたが、ウェスタンブロッティング解析ではタンパク質発現が検出されなかった。これらの結果から、遺伝子導入 HEK293T 細胞では、これら 3 つのタンパク質の FLAG タグが付加した C 末端領域がタンパク質分解により除去されていることが示唆された。そのため、SDS-PAGE 上での [³H]ミリスチン酸標識タンパク質バンドの分子量を遺伝子導入 HEK293T 細胞と昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系で比較した。Fig.3-3 において赤丸で示したように、遺伝子導入 HEK293T 細胞において検出された 13 個の [³H]ミリスチン酸標識タンパク質の分子量は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における分子量とほぼ同じであった。この実験では、レーン 2, 4, 10 のタンパク質バンドを明確に示すために、Fig.3-3 のフルオログラフィデータについて長時間露光を行ったフルオログラムを Fig. 3-4 に示した。これらの結果から、遺伝子導入した HEK293T 細胞において、FBXL7, SAMM50, MCC1 の FLAG タグが付加された C 末端領域は除去されていないと考えられた。なぜこれら 3 つのタンパク質の発現が抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出されなかったのかは不明である。注目すべきことに、Fig.3-3 左上図レーン 13 および 14 に示したように、遺伝子導入細胞で発現させた C22orf42 では無細胞タンパク質合成で発現させたものと比べ推定分子量より大きな分子量の [³H]ミリスチン酸標識タンパク質バンドが複数検出された。C22orf42 を遺伝子導入した HEK293T 細胞では、タンパク質 N-ミリスチル化に加え、他の翻訳後修飾が起きていると推測される。以上の結果から、実験を行った 19 個のタンパク質のうち少なくとも 13 個は実際に細胞内で N-ミリスチル化されていることが確認された。

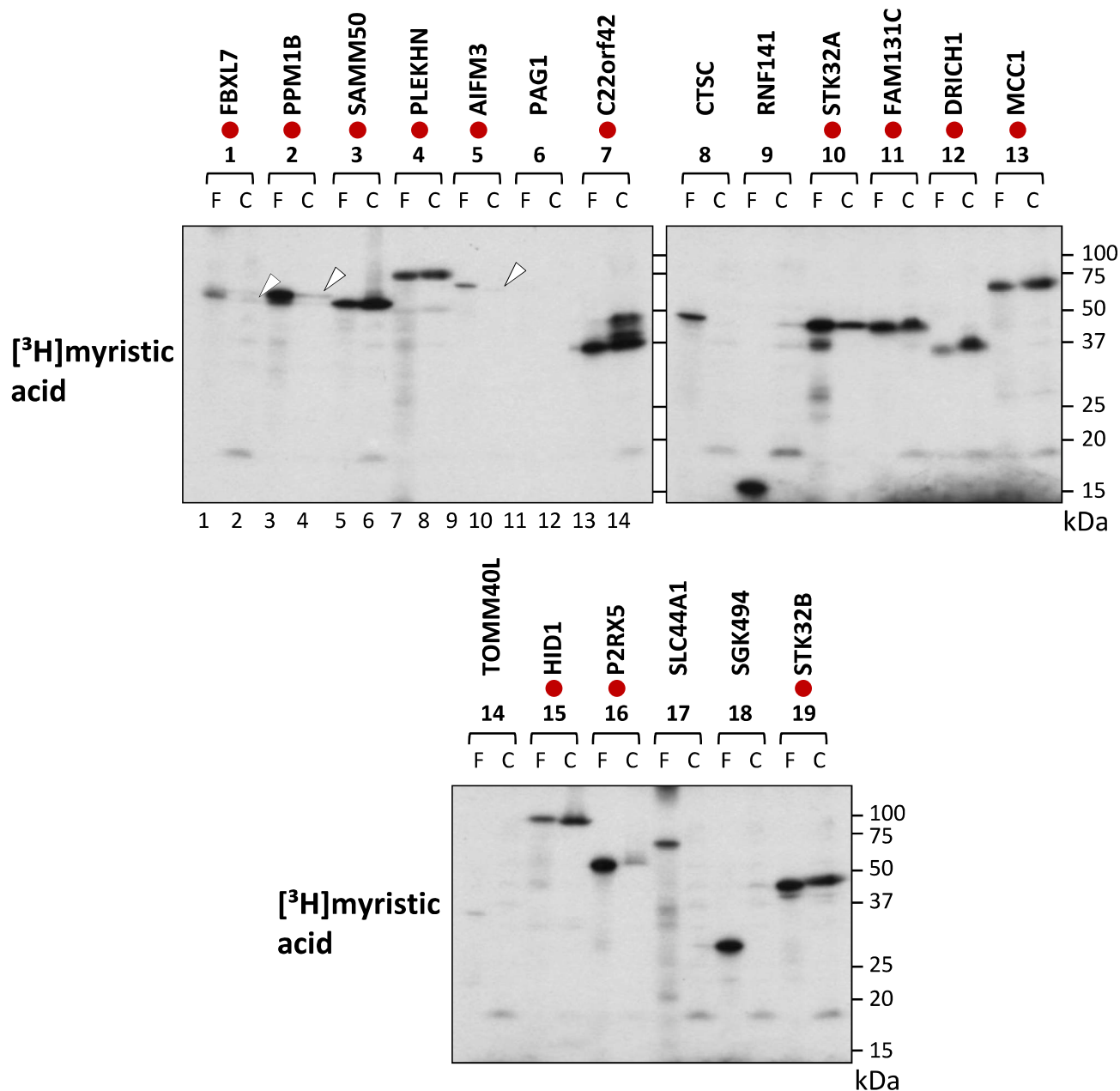


Fig. 3-3. Comparison of the molecular size of [³H]myristic acid-labeled protein bands detected in transfected HEK293T cells with those detected in the insect cell-free protein synthesis system.

The molecular sizes of [³H]myristic acid-labeled protein bands expressed in the two expression systems were compared with each other by SDS-PAGE analysis. The samples in which similar molecular sizes were observed are indicated by red circles. Faint bands are indicated by arrowheads. F; insect cell-free, C; HEK293T cells.

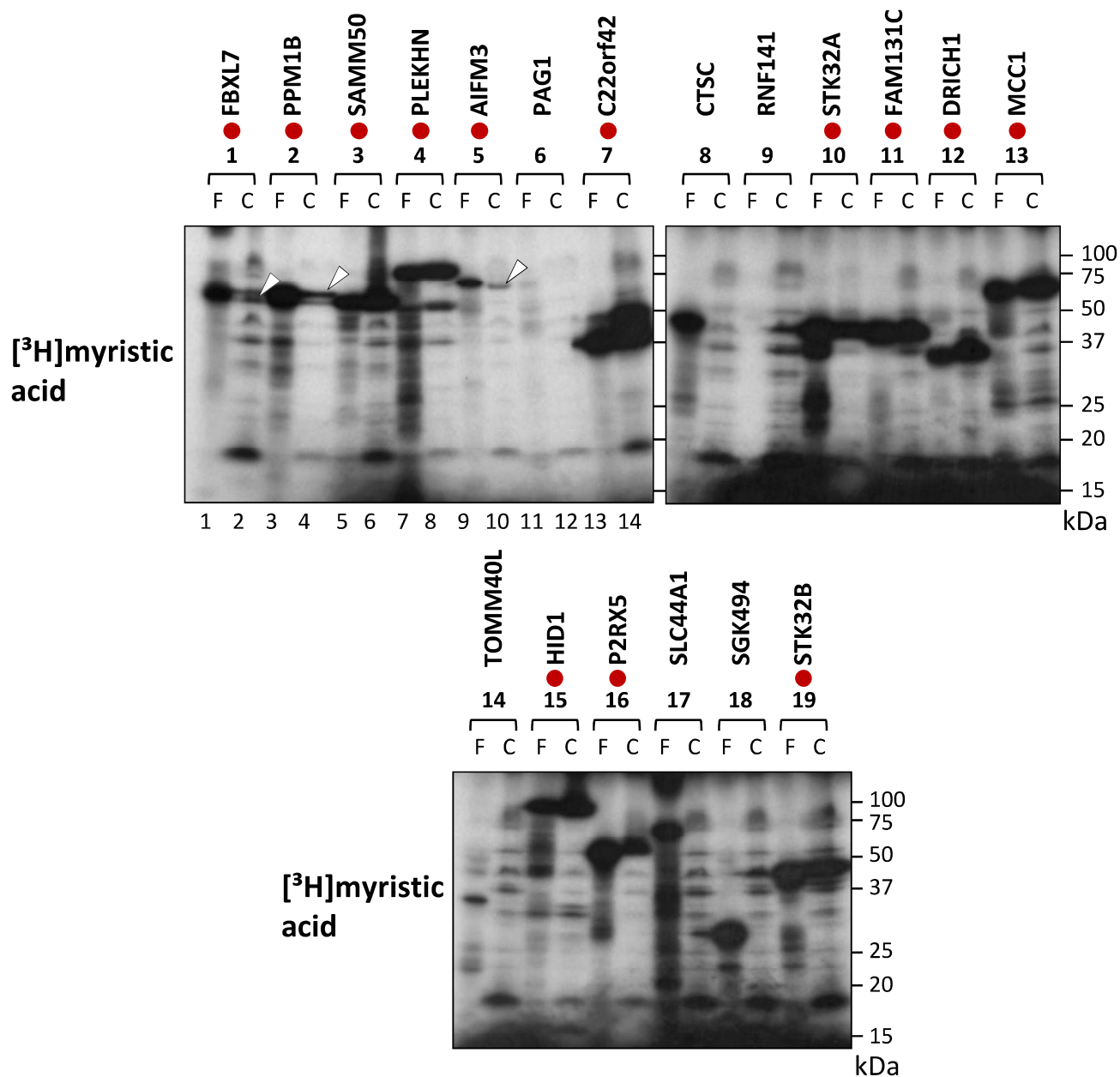


Fig. 3-4 Comparison of the molecular size of $[^3\text{H}]$ myristic acid-labeled protein bands detected in transfected HEK293T cells with those detected in the insect cell-free protein synthesis system. The overexposed fluorograms of the fluorography data of Fig 3-3 are shown to demonstrate the presence of protein bands in lanes 2, 4 and 10.

3-3-4 本研究でN-ミリスチル化が見出された13個のヒトcDNAクローンの遺伝子産物の特性

本研究でN-ミリスチル化が見出された13個のヒトcDNAクローンの遺伝子産物の特性をTable 3-6にまとめた。

これら13個のうち6個のタンパク質 (PPM1B, SAMM50, PLEKHN, STK32A, HID1, P2RX5) は最近、無細胞タンパク質合成系および細胞における代謝標識[3-21, 3-24]またはクリック反応と質量分析による同定[3-14, 3-25]によってN-ミリスチル化されることが報告されたタンパク質であった。これら6個のタンパク質のうち4つのタンパク質 (PLEKHN, STK32A, PPM1B, HID1) では、既に細胞内局在または機能発現におけるタンパク質N-ミリスチル化の役割についての解析がなされている[3-21, 3-24, 3-26]。

本研究で見出された13個のN-ミリスチル化タンパク質の中には、タンパク質リン酸化酵素、E3ユビキチンリガーゼ関連タンパク質、ガン関連タンパク質、アポトーシス関連タンパク質のように多様な細胞内情報伝達経路において重要な役割を果たす生理活性タンパク質が含まれていただけでなく、細胞の機能発現において重要な役割を果たす膜貫通タンパク質も含まれていた。

3-3-5 ミトコンドリア外膜タンパク質SAMM50のミトコンドリアへの移行にタンパク質N-ミリスチル化が強く影響する

本研究で見出されたヒトN-ミリスチル化タンパク質の機能発現におけるタンパク質N-ミリスチル化の生理的重要性を明らかにするために、ミトコンドリア外膜タンパク質SAMM50の細胞内局在におけるタンパク質N-ミリスチル化の役割を調べた。SAMM50はミトコンドリア外膜において β バレルタンパク質の膜組み込みに必要なSAM複合体 (sorting and assembly machinery (SAM))の中心的構成成分である[3-27~3-29]。Fig.3-5Aに示したように、SAMM50のタンパク質N-末端配列の種間相同性を調べたところ、N末端のN-ミリスチル化モチーフが脊椎動物において高く保存されていることが分かった。

この実験では、2位のGlyをAlaに置換しN-ミリスチル化されないG2A変異体を構築し、COS-1細胞に遺伝子導入してその細胞内局在を野生型と比較した。Fig.3-5Bに示したように、抗SAMM50抗体を用いたウェスタンブロッティングによりFLAGタグ付加SAMM50の野生型およびG2A変異体のCOS-1細胞での効率的な発現が確認された。一方、前述したように抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロッティングではタンパク質発現は検出されなかった。[³H]ミリスチン酸による代謝標識では、野生型SAMM50では[³H]ミリスチン酸の効率的取り込みが観察されたが、2位GlyのAlaへの置換により[³H]ミリスチン酸の取り込みは完全に阻害された。Fig.3-5Cに示したように、これらのcDNAを遺伝子導入したCOS-1細胞の免疫蛍光染色により、タンパク質N-ミリスチル化がSAMM50の細胞

Table 3-6. The characteristics of the gene products of the 13 cDNA clones found to be N-myristoylated in this study. For prediction of protein N-myristoylation, the same abbreviations are used as in Fig 3-1C.

FXC No.	Protein name	Gene name	Accession no.	Myristoylation	Prediction	Length (aa)	Protein function	Reference
1	FXC01999 F-box and leucine-rich repeat protein 7	FBXL7	AB463041	Novel	T/N	491	E3 ubiquitin ligase complex component	
2	FXC02617 Protein phosphatase 1B	PPM1B	AB464099	Known	N/M	479	Protein phosphatase	[3-14, 3-24]
3	FXC02844 Sorting and assembly machinery component 50 homolog	SAMM50	AB463278	Novel	N/M	469	Mitochondrial sorting and assembly machinery complex component	[3-15]
4	FXC02940 Pleckstrin homology domain containing, family N member 1	PLEKHN	AB463180	Known	R/L	611	Unknown	[3-21]
5	FXC02961 Apoptosis-inducing mitochondrion-associated, 3	AIFM3	AB462952	Novel	R/H	605	Apoptosis inducing protein	
6	FXC03534 Uncharacterized protein C22orf42	C22orf42	AB527618	Novel	T/H	251	Unknown	
7	FXC03969 Serine/threonine-protein kinase 32A	STK32A	AB528042	Known	T/H	396	Protein kinase	[3-21]
8	FXC04954 Family with sequence similarity 131, member C	FAM131C	AB463624	Novel	R/H	280	Unknown	
9	FXC05856 Aspartate-rich protein 1, chromosome 22 open reading frame 43	DRICH1	AB528170	Novel	T/H	228	Unknown	
10	FXC05945 Mutated in colorectal cancers	MCC1	AB527185	Novel	N/H	813	Cancer-related protein	
11	FXC10490 Protein HDD1	HDD1	AB527292	Known	N/H	788	Cancer-related protein	[3-15, 3-21, 3-25]
12	FXC10528 Purinergic receptor P2X, Serine/threonine kinase 32B	P2RX5	AB528606	Novel	R/H	422	Transmembrane receptor	[3-15]
13	FXC11252 Serine/threonine kinase 32B	STK32B	AB528925	Novel	T/H	414	Protein kinase	

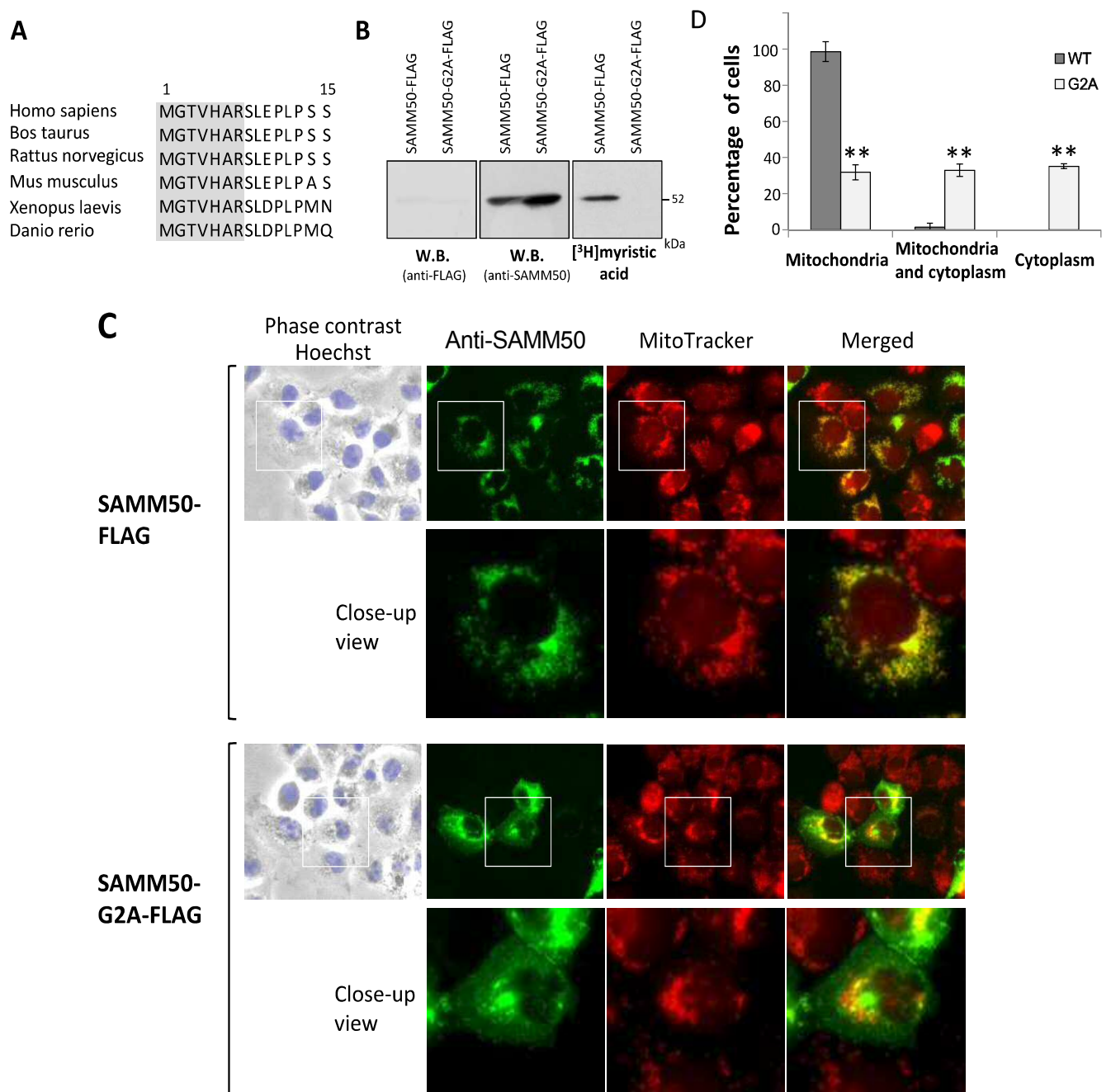


Fig. 3-5. Protein N-myristoylation is required for proper targeting of SAMM50 to mitochondria.

A. Interspecies alignment of the N-terminal sequences of SAMM50. N-myristoylation motifs are shown in grey in the N-terminal sequence. B. Detection of protein N-myristoylation of SAMM50 expressed in COS-1 cells. cDNAs encoding SAMM50-FLAG and SAMM50-G2A-FLAG were transfected into COS-1 cells. Their expression and the N-myristoylation of the products in total cell lysates were evaluated by western blotting analysis and [³H]myristic acid labeling, respectively. C. Intracellular localization of SAMM50-FLAG and SAMM50-G2A-FLAG was determined by immunofluorescence staining of COS-1 cells transfected with cDNAs encoding these two proteins using an anti-SAMM50 antibody. Mitochondria were detected using MitoTracker Red. Lower panels show a close-up image. D. Quantitative analysis of the intracellular localization of SAMM50-FLAG and SAMM50-G2A-FLAG. cDNAs encoding these two proteins were transfected into COS-1 cells and the intracellular localization was determined by immunofluorescence staining. Quantitative analysis of the mitochondrial localization was performed by fluorescence microscopic observation of 50 immunofluorescence-positive cells. The extent of mitochondrial localization was expressed as a percentage of the number of cells in which selective localization to mitochondria, localization to mitochondria and cytoplasm, and selective localization to cytoplasm was observed against the total number of transfected cells. Data are expressed as mean \pm SD for five independent experiments. **P < 0.001 vs. wild-type.

内局在に強く影響することが分かった。抗 SAMM50 抗体を用いた免疫蛍光染色とマイトトラックー染色とを組み合わせた蛍光顕微鏡観察により、N-ミリスチル化された SAMM50-FLAG は特異的にミトコンドリアへ局在するのに対し、N-ミリスチル化を阻害した G2A 変異体は主に細胞質へ局在することが分かった。SAMM50 のミトコンドリア移行におけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割をさらに確かめるために、COS-1 細胞で発現された SAMM50-FLAG および SAMM50-G2A-FLAG の細胞内局在の定量的解析を蛍光顕微鏡観察により行った。その結果、Fig.3-5D に示したように、これら 2 つのタンパク質において顕著な違いが観察された。SAMM50-FLAG の場合、発現したタンパク質のほとんどは特異的にミトコンドリアへ局在した。一方、SAMM50-G2A-FLAG では、遺伝子導入細胞の約 70%で細胞質(細胞質のみ、または細胞質およびミトコンドリア)への局在が観察された(Fig.3-5D)。これらの結果は SAMM50 が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を明確に示している。

3-3-6 哺乳動物細胞で発現している内在性 SAMM50 は N-ミリスチル化されている

哺乳動物細胞で発現した内在性 SAMM50 においてタンパク質 N-ミリスチル化が生じているか否かを調べるために、³H]ミリスチン酸により COS-1 細胞で発現した内在性 SAMM50 の代謝標識を行った。Fig.3-6A レーン 2 に示したように、内在性 SAMM50 の発現は抗 SAMM50 抗体を用いたウェスタンブロット解析により確認された。

この場合、内在性 SAMM50 の分子量は COS-1 細胞で発現させたタグなし SAMM50 とほぼ同じであった(レーン 1)。³H]ミリスチン酸標識では、COS-1 細胞溶解液中に多くの標識タンパク質が検出された(下図 B, レーン 3)。抗 SAMM 抗体を用いた免疫沈降サンプルでは、52kDa の³H]ミリスチン酸標識タンパク質が検出された(レーン 4)。この³H]ミリスチン酸標識されたタンパク質バンドの分子量は、COS-1 細胞で過剰発現させたタグなし SAMM50 を免疫沈降させたものとほぼ同じであった(レーン 2)。これらの結果は哺乳動物細胞で発現している内在性 SAMM50 が N-ミリスチル化されることを明確に示している。Fig.3-6B で分析した 4 サンプルについてウェスタンブロット解析を行った場合、免疫沈降で使用した IgG H 鎖(約 50kDa)由来の強いシグナルがいずれの免疫沈降サンプルでも検出され、SAMM50 由来のタンパク質バンドは検出できなかった(Fig. 3-7)。そのため、Fig.3-6B 上図では SDS-PAGE ゲルのクマシーブリリアントブルー染色の結果を示した。

3-4 小括

タンパク質 N-ミリスチル化はヒト細胞内で起こる主要な脂質修飾の一つである。しかし、タンパク質 N-ミリスチル化を検出する簡便な方法の欠如により、ヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定は成されていない。近年、ケミカルバイオロジーに基づく新

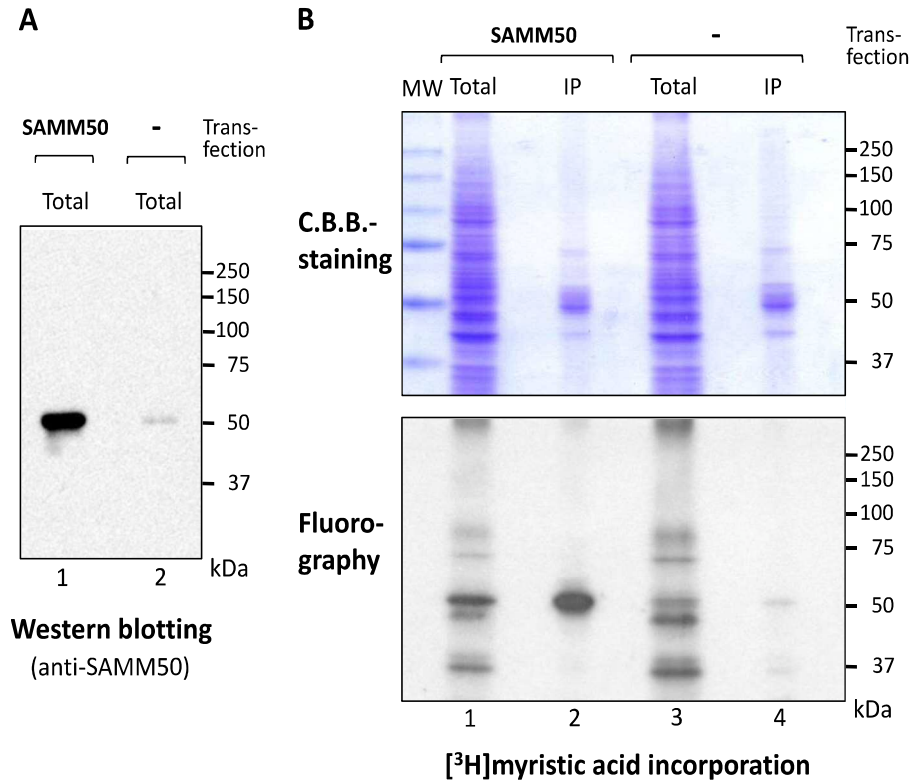


Fig. 3-6. Endogenous SAMM50 expressed in COS-1 cells is N-myristoylated. Metabolic labeling of endogenous SAMM50 expressed in COS-1 cells with [³H]myristic acid was performed.

Tag-free-SAMM50 exogenously expressed in COS-1 cells was used as a control. A. Expression of exogenously expressed Tag-free-SAMM50 and endogenous SAMM50 in COS-1 cells was determined by western blotting analysis using an anti-SAMM50 antibody. B. Protein Nmyristoylation of exogenously expressed Tag-free-SAMM50 and endogenous SAMM50 in COS-1 cells was determined by [³H]myristic acid labeling. MW; molecular weight marker, IP; immunoprecipitated with anti-SAMM50 antibody. Upper and lower panels show the result of C.B.B.-staining and fluorography, respectively. Arrowheads in the upper panel indicate the position of heavy chain of IgG used for immunoprecipitation.

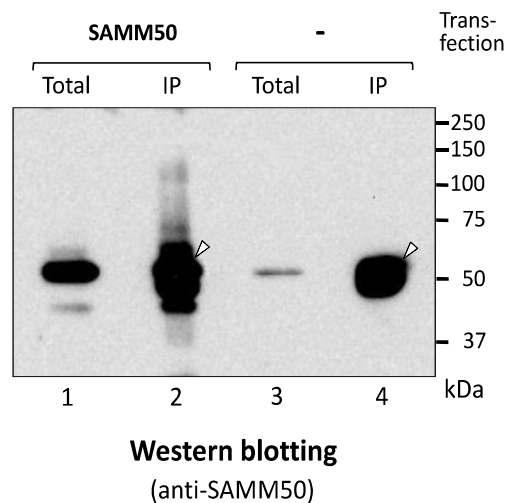


Fig. 3-7 The result of western blotting analysis of 4 samples analyzed in Fig. 3-6 B is shown. Arrowheads indicate the position of heavy chain of IgG (~ 50kDa) used for immunoprecipitation.

しい手法としてクリックケミストリーの利用が行われている[3-12~3-15]。例えば、最近、アジド化あるいはアルキン化したミリスチン酸アナログを用いた細胞内タンパク質の代謝標識とそれに続く2次レポーターとのクリック反応による結合により、HeLa細胞において発現している約100個のヒトN-ミリスチル化タンパク質を同定することに成功したと報告された[3-14]。この方法はインタクトな細胞で発現したN-ミリスチル化タンパク質の検出に非常に有用であるといえる。この方法では、細胞において比較的少量に発現したN-ミリスチル化タンパク質を検出することができる。しかし、いくつかの細胞内タンパク質の発現量はMS解析の検出限界以下であるため、これらの方法はヒト細胞あるいは組織で発現する全N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定には不十分であると考えられる。そのため、ヒトN-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定の実現には、ヒトN-ミリスチル化タンパク質を同定する他の方法が必要である。

cDNA クローンを用いた様々な無細胞タンパク質合成系における代謝標識によりタンパク質N-ミリスチル化が検出できることが示されている[3-30~3-32]。実際、我々は新たに開発された昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系 (Transdirect insect cell) [3-33]が *in vitro* 代謝標識実験に使用可能であり、この実験手法が昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成における代謝標識分析はタンパク質N-ミリスチル化を検出する簡便で高感度な方法であることを示した[3-31]。我々の以前の研究で、新規ヒトN-ミリスチル化タンパク質を同定するために、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いて発現させたタンパク質の代謝標識および質量分析によりヒトcDNAリソース由来ヒトcDNAクローンのタンパク質N-ミリスチル化感受性を評価した[3-16]。この解析では、約2000個のKOP (Kazusa ORFeome project) ヒトcDNAクローンからN末端Met-Glyモチーフを持つ141個のcDNAクローンをN-ミリスチル化タンパク質候補として選択した。これらのcDNAクローンのN末端10アミノ酸をN末端に融合したモデルタンパク質(tGelsolin)を用いてタンパク質N-ミリスチル化感受性を検討した後、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COS-1細胞の両方で全長cDNAの遺伝子産物に起こるタンパク質N-ミリスチル化を代謝標識により評価した。その結果、約2000個のcDNAクローンのうち27個の産物がN-ミリスチル化されることが分かった。そのうち18個のタンパク質はそれまでに報告のない新規のN-ミリスチル化タンパク質であった。これらの結果は、この方法がヒトcDNAリソースからヒトN-ミリスチル化タンパク質を同定する有用な方法であることを示している。しかし、この方法では、試験したcDNAクローンからのN-ミリスチル化タンパク質検出効率は低かった(試験サンプル141個のうち27個)。そこで、本研究では、効率的にヒトN-ミリスチル化タンパク質を同定するため、無細胞および細胞での代謝標識実験にバイオインフォマティクスに基づくタンパク質N-ミリスチル化予測システムを組み合わせ、検出効率の向上を試みた。バイオインフォマティクスの利用はN-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定に有用な方法である[3-17, 3-18, 3-34, 3-35]。2つの予測プログラム、MYR predictor および Myristoylator は公開WWWサーバー上で利用

可能である[3-17, 3-18]. 前述の我々の研究において, これらの予測プログラムの信頼性を評価するために, N末端にMet-Gly配列を持つ141個のタンパク質のN-ミリスチル化の有無を検討した代謝標識実験の結果を2つの予測プログラムの予測結果と比較した[3-16]. その結果, MYR Predictorの信頼性は高いがかなりの数の偽陰性が存在するのに対して, Myristoylatorはより多くのN-ミリスチル化タンパク質が予測されるが, 多くの偽陽性を含むことが分かった. そこで, これら2つの予測プログラムのどちらかで陽性と予測されたタンパク質を合わせてみたところ, ほとんどのN-ミリスチル化タンパク質が正しく予測されることが明らかになった. そこで, 本研究では, 2つの予測プログラムのどちらかでN-ミリスチル化が予測されたタンパク質をヒトN-ミリスチル化タンパク質候補として用い, 新規N-ミリスチル化タンパク質の同定を行った.

本研究では, 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に, 上記の知見をもとに無細胞タンパク質合成系における代謝標識とバイオインフォマティクスに基づくN-ミリスチル化タンパク質予測システムを組み合わせ, cDNAリソース由来ヒトcDNAクローンのタンパク質N-ミリスチル化感受性を評価した. この解析では, 約4,400個のKazusa ORFeome project (KOP)ヒトcDNAクローン(FXC01948~FXC23818)のうちN末端にMet-Glyモチーフを持つcDNAクローンから, 2つN-ミリスチル化予測プログラムによってN-ミリスチル化が予測された90個を選択した(Table 3-1). 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外し, 37個のcDNAクローンを新規ヒトN-ミリスチル化タンパク質候補として選択した(Table 3-2). 初めに, ヒトN-ミリスチル化タンパク質候補のN末端10アミノ酸を, C末端にFLAGタグを付加したモデルタンパク質(tActin)に融合させたタンパク質を用いて, タンパク質N-ミリスチル化感受性を評価した(Fig.3-1). その後, 全長cDNA遺伝子産物のタンパク質N-ミリスチル化を無細胞タンパク質合成系および遺伝子導入ヒト細胞の両方を用いて代謝標識実験により評価した(Fig.3-2 および 3-3).

その結果, 13個のcDNA産物(FBXL7, PPM1B, SAMM50, PLEKHN, AIFM3, C22orf42, STK32A, FAM131C, DRICH1, MCC1, HID1, P2RX5, STK32B)がヒトN-ミリスチル化タンパク質であることが分かった. これら13個のタンパク質のうち, 6個(PPM1B, SAMM50, PLEKHN, STK32A, HID1, P2RX5)は最近N-ミリスチル化タンパク質であることが見出されたタンパク質であり[3-14, 3-15, 3-21, 3-24], そのうち4つのタンパク質(PPM1B, STK32A, PPM1B, HID1)でタンパク質N-ミリスチル化の役割について解析されている[3-21, 3-24, 3-25]. これらのヒトN-ミリスチル化タンパク質には, タンパク質リン酸化酵素, E3ユビキチンリガーゼ関連タンパク質, ガン関連タンパク質, アポトーシス関連タンパク質など生理的に重要なタンパク質だけでなく, 細胞機能において重要な役割を担うことが知られている膜貫通タンパク質が含まれていた.

膜貫通タンパク質に起こるタンパク質N-ミリスチル化に関して, 我々は最近, 小胞体(ER)に局在する2回膜貫通タンパク質であるprotein LunaparkがN-ミリスチル化され

ており、protein Lunapark の N-ミリスチル化がこのタンパク質によって誘導される ER 形態変化に強く影響することを明らかにした[3-36]. このことから、タンパク質 N-ミリスチル化が膜貫通タンパク質の機能に重要な役割を果たす場合があると考えられた. しかしながら、これまでのところ、膜貫通タンパク質に起こるタンパク質 N-ミリスチル化はほとんど報告されていない. 本研究で見出されたヒト N-ミリスチル化タンパク質の一つである SAMM50 はミトコンドリア外膜の膜貫通タンパク質であることから、本研究では SAMM50 に起こるタンパク質 N-ミリスチル化に着目した. 免疫蛍光染色により SAMM50 の細胞内局在におけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割について解析した結果、タンパク質 N-ミリスチル化は SAMM50 の細胞内局在に強く影響することが分かった. N-ミリスチル化 SAMM50-FLAG は特異的にミトコンドリアに局在するのに対し、N-ミリスチル化されない G2A 変異体では主に細胞質に局在した(Fig.3-5 C および 3-5 D). さらに、³H]ミリスチン酸標識した細胞タンパク質の免疫沈降実験から、内在性 SAMM50 が N-ミリスチル化されることが明らかとなった(Fig.3-6). これらの結果から、インタクテナ細胞で発現した SAMM50 は実際に N-ミリスチル化されており、この修飾は SAMM50 の細胞内局在に重要な役割を果たすことが示された. 真核細胞タンパク質では、N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質はほんのわずかしが知られていない. 真核生物において N-ミリスチル化膜貫通タンパク質としてよく知られた例の一つとして、NADH-シトクロム b 還元酵素(b5R)が挙げられる. このタンパク質は N 末端膜内腔側/C 末端細胞質側の膜上トポロジーを持つ 1 回膜貫通タンパク質で、ER とミトコンドリア外膜の両方に局在する[3-37, 3-38]. b5R では、タンパク質 N-ミリスチル化はミトコンドリアへの移行に必要であり、N-ミリスチル化されない変異体は特異的に ER へ局在する[3-39]. さらに、b5R について、タンパク質 N-ミリスチル化が新生鎖とシグナル認識粒子との相互作用を阻害し、このため一部の新生鎖は翻訳と共訳した ER への移行から逃れ、翻訳後にミトコンドリアへ移行することが明らかにされた[3-39]. SAMM50 はミトコンドリア外膜に存在する β バレルタンパク質である[3-27, 3-28]. ほとんどの膜貫通タンパク質が膜脂質二重層に膜貫通 α ヘリックスを介して挿入されるのとは異なり、 β バレルタンパク質は膜に組み込まれた β ストランドを介して膜に挿入される[3-41]. ミトコンドリア外膜に存在する総ての β バレルタンパク質は β シグナルと呼ばれる非切断型のミトコンドリアへの移行と外膜への挿入を指令する特異的配列を持つことが明らかとされている[3-42]. SAMM50 はシグナル認識粒子と相互作用する疎水性配列を持たないことから、SAMM50 のタンパク質 N-ミリスチル化は b5R とは異なり、新生ペプチド鎖とシグナル認識粒子との相互作用に影響しないと考えられる. 実際、ほとんどの N-ミリスチル化を生じない G2A 変異体は ER に局在せず細胞質に局在していた(Fig. 3-5 C). タンパク質 N-ミリスチル化を介した SAMM50 のミトコンドリアへの移行の分子機構は不明であるが、 β バレルタンパク質はミトコンドリア外膜へ細胞質側から直接挿入されることはなく、TOM 複合体を経由して膜間腔へ輸送された後、外膜へ組み込まれる[32, 33]ことから、タンパク質 N-ミリスチル化は

これら β バレルタンパク質の輸送過程に何らかの機構により促進的に影響すると考えられる。SAMM50 のミトコンドリア外膜への移行および膜組み込みにおけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。興味深いことに、本研究において昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた解析から N-ミリスチル化が見出された 18 個のタンパク質中には、SAMM50 以外にミトコンドリア外膜タンパク質である TOMM40L が含まれていた。最近、TOMM40L はインタクテナヒト細胞においても N-ミリスチル化されていることが報告されている[3-14, 3-15]。したがって、TOMM40L のミトコンドリア移行においてもタンパク質 N-ミリスチル化が促進的に影響する可能性がある。

本研究では、cDNA リソースから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に、KOP ヒト cDNA クローンをモデル cDNA クローンとして用い、バイオインフォマティクスに基づくタンパク質 N-ミリスチル化予測と無細胞および細胞における代謝標識実験を組み合わせた解析を行った。その結果、多くの生理的に重要な機能を果たす生理活性タンパク質を含む 13 個の cDNA 産物がヒト N-ミリスチル化タンパク質であることが見出された。この解析において注意を要する点は、この方法はヒト N-ミリスチル化タンパク質の探索手法として有用ではあるものの、見出された N-ミリスチル化タンパク質がヒト細胞内に実際に存在し機能している N-ミリスチル化タンパク質であることを証明するためには、本研究において SAMM50 に関して行った生化学的解析のような、ヒト細胞内での実際の修飾状態やタンパク質の機能発現におけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割を確認する実験を行う必要がある点である。本研究で見出された 13 個の N-ミリスチル化タンパク質のうち 4 個は機能未知のタンパク質であった。多くの N-ミリスチル化タンパク質は細胞の機能に重要な役割を担うことから、これらのタンパク質の機能を研究するうえでタンパク質 N-ミリスチル化の同定は有益な知見となると考えられる。

Swiss-Prot proteinknowledge database に掲載されたすべてのヒトタンパク質(アイソフォームを含む約 46,000 個)において、N 末端に Met-Gly 配列を持つヒトタンパク質の数は約 3,700 個である。したがって、多くのヒト cDNA を含むより大きな cDNA リソースに本手法を適用することにより、さらに多くの生理的に重要なヒト N-ミリスチル化タンパク質が同定されることが期待される。

3-5 文献

- 3-1. Resh MD (2006) Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol* 2: 584–590.
- 3-2. Farazi TA, Waksman G, Gordon JI (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 276: 39501–39504.
- 3-3. Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451: 1–16.
- 3-4. Boutin JA (1997) Myristoylation. *Cell. Signal* 9: 15–35.
- 3-5. Spiegel AM, Backlund PS, Butrynski JE, Jones TL, Simonds WF (1991) The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci* 16: 338–341.
- 3-7. Burnaevskiy N, Fox TG, Plymire DA, Ertelt JM, Weigele BA, Selyunin AS, et al. (2013) Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the *Shigella* virulence factor IpaJ. *Nature* 496: 106–109.
- 3-8. Resh MD (2012) Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol Med* 18: 206–214.
- 3-9. Wright MH, Heal WP, Mann DJ, Tate EW (2010) Protein myristoylation in health and disease. *J Chem Biol* 1: 19–35.
- 3-10. Frearson JA, Brand S, McElroy SP, Cleghorn LAT, Smid O (2010) N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature* 464: 728–732.
- 3-11. Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. (2009) Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 9: 1022–1026.
- 3-12. Grammel M, Hang HC (2013) Chemical reporters for biological discovery. *Nat Chem Biol* 9:475–484.
- 3-13. Tate EW, Kalesh KA, Lanyon-Hogg T, Storck EM, Thimon E (2015) Global profiling of protein lipidation using chemical proteomic technologies. *Curr Opin Chem Biol* 24: 48–57.
- 3-14. Thimon E, Serwa RA, Broncel M, Brannigan JA, Brassat U, Wright MH, et al. (2014) Global profiling of co- and post-translationally N-myristoylated proteomes in human cells. *Nat Commun* 5: 4919.
- 3-15. Broncel M, Serwa RA, Ciepla P, Krause E, Dallman MJ, Magee AI, et al. (2015) Multiple reagents for quantitative proteome-wide analysis of protein modification in human cells and dynamic profiling of protein lipidation during vertebrate development. *Angew Chem Int Ed* 54: 5948–5951.
- 3-16. Suzuki T, Moriya K, Nagatoshi K, Ota Y, Ezure T, Ando E, et al. (2010) Strategy for

- comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using an insect cell-free protein synthesis system. *Proteomics* 10: 1780–1793.
- 3-17. Stroh SM, Eisenhaber B, Eisenhaber FJ (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* 317: 541–557.
- 3-18. Bologna G1, Yvon C, Duvaud S, Veuthey A (2004) N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics* 4: 1626–1632.
- 3-19. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Kobayashi S, Shikata M, Tanimizu K, et al. (2006) Performance of expression vector, pTD1, for insect cell-free translation system. *J Biosci Bioeng* 102: 69–71.
- 3-20. Utsumi T, Sakurai N, Nakano K, Ishisaka R (2003) C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Lett* 539: 37–44.
- 3-21 Takamitsu E, Fukunaga K, Iio Y, Utsumi T (2014) Cell-free identification of novel N-myristoylated proteins from complementary DNA resources using bioorthogonal myristic acid analogues. *Anal Biochem* 464: 83–93.
- 3-22. Sakurai N, Utsumi T (2006) Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *J Biol Chem* 281: 14288–14295.
- 3-23. Utsumi T, Sato M, Nakano K, Takemura D, Iwata H, Ishisaka R (2001) Amino acid residue penultimate to the amino-terminal Gly residue strongly affects two cotranslational protein modifications, N-myristoylation and N-acetylation. *J Biol Chem* 276: 10505–10513.
- 3-24. Chida T, Ando M, Matsuki T, Masu Y, Nagaura Y, Takano-Yamamoto T, et al. (2013) N-Myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. *Biochem J* 449: 741–749.
- 3-25. Moriya K, Yamamoto T, Takamitsu E, Matsunaga Y, Kimoto Y, Suzuki T, et al. (2012) Protein N-myristoylation is required for cellular morphological changes induced by two formin family proteins, FMNL2 and FMNL3. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 1201–1209.
- 3-26. Wang L, Zhan Y, Song E, Yu Y, Jiu Y, Du W, et al. (2011) HID-1 is a peripheral membrane protein primarily associated with the medial- and trans-Golgi apparatus. *Protein Cell* 2: 74–85.
- 3-27. Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Gulard B, et al. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 278: 48520–48523.

- 3-28. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628–644.
- 3-29. Dukanovic J, Rapaport D (2011) Multiple pathways in the integration of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808: 971–980.
- 3-30. Utsumi T, Nakano K, Funakoshi T, Kayano Y, Nakao S, Sakurai N, et al. (2004) Vertical-scanning mutagenesis of amino acids in a model N-myristoylation motif reveals the major amino-terminal sequence requirements for protein N-myristoylation. *Eur J Biochem* 271: 863–74.
- 3-31. Sakurai N, Moriya K, Suzuki T, Sofuku K, Mochiki H, Nishimura O, et al. (2007) Detection of co- and post-translational protein N-myristoylation by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. *Anal Biochem* 362: 236–244.
- 3-32. Yamauchi S, Fusada N, Hayashi H, Utsumi T, Uozumi N, Endo Y, et al. (2010) The consensus motif for N-myristoylation of plant proteins in a wheat germ cell-free translation system. *FEBS J* 277: 3596–607.
- 3-33. Ezure T, Suzuki T, Higashide S, Shintani E, Endo K, Kobayashi S, et al. (2006) Cell-free protein synthesis system prepared from insect cells by freeze-thawing. *Biotechnol Prog* 22: 1570–1577.
- 3-34. Boisson B, Giglione C, Meinnel T (2003) Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote. *J Biol Chem* 278: 43418–43429.
- 3-35. Martinez A, Traverso JA, Valot B, Ferro M, Espagne C, Ephritikhine G, et al. (2008) Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* 8: 2809–2831.
- 3-36. Moriya K, Nagatoshi K, Noriyasu Y, Okamura T, Takamitsu E, Suzuki T, et al. (2013) 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. *PLoS One* 8: e78235.
- 3-37. Ozols J, Carr SA, Strittmatter P (1984) Identification of the NH₂-terminal blocking group of NADH-cytochrome b₅ reductase as myristic acid and the complete amino acid sequence of the membrane-binding domain. *J Biol Chem* 259: 13349–13354.
- 3-38. Borgese N, Longhi R (1990) Both the outer mitochondrial membrane and the microsomal forms of cytochrome b₅ reductase contain covalently bound myristic acid. Quantitative analysis on the polyvinylidene difluoride-immobilized proteins. *Biochem J* 266: 341–347.
- 3-39. Borgese N, Aggujaro D, Carrera P, Pietrini G, Bassetti M (1996) A role for N-myristoylation in protein targeting: NADH-cytochrome b₅ reductase requires

myristic acid for association with outer mitochondrial but not endoplasmic reticulum membranes. *J Cell Biol* 135: 1501–1513.

- 3-40. Colombo S, Longhi R, Alcaro S, Ortuso F, Sprocati T, Flora A, et al. (2005) N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b(5) reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *J Cell Biol* 168: 735–745.
- 3-41. Wimley WC (2003) The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* 13: 404–411.
- 3-42. Kutik K, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Krüger V, et al. (2008) Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell* 132: 1011–1024.

第4章 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

4-1 諸言

タンパク質 N-ミリスチル化は、真核細胞とウイルスで起こる主要な脂質修飾の一つである[4-1~4-5]。多くの N-ミリスチル化タンパク質は細胞の構造や機能の調節に重要な役割を果たしている。それらには、タンパク質リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、グアニンスクレオチド結合タンパク質、カルシウム結合タンパク質、カスパーゼ基質など多様な細胞内情報経路に関与するタンパク質が含まれている。多くの場合、これらの N-ミリスチル化タンパク質の機能はタンパク質 N-ミリスチル化を介した可逆的なタンパク質 - 膜あるいはタンパク質 - タンパク質相互作用により調節される[4-1~4-6]。真核細胞のタンパク質の 0.5-1.5%が N-ミリスチル化されると予測されているが、タンパク質 N-ミリスチル化を検出する簡便な方法の欠如のため、ヒト N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定は成されていない。

我々は以前の研究で、簡便且つ高感度なタンパク質 N-ミリスチル化の検出法を確立することを目的として、無細胞タンパク質合成系における代謝標識により *in vitro* でタンパク質 N-ミリスチル化の検出を試みた。即ちヒト cDNA リソース由来ヒト cDNA クローンを昆虫培養細胞由来タンパク質合成系において発現させ、そのタンパク質 N-ミリスチル化感受性を代謝標識および質量分析により評価した[4-7]。その結果、約 2,000 個の cDNA クローン(Kazusa ORFeome プロジェクトヒト cDNA クローン)のうち 18 個がこれまでに報告のない新規 N-ミリスチル化タンパク質であることが見出された。これらの結果は、ヒト cDNA リソースからのヒト N-ミリスチル化タンパク質の同定にこの手法が有用であることを示している。

しかし、この方法にも改良が必要な点が残されていた。即ち、この方法ではタンパク質 N-ミリスチル化の検出に、従来から使用されてきた³Hミリスチン酸による放射性標識を利用していた。放射性のミリスチン酸を用いたタンパク質 N-ミリスチル化の検出には、長い露光時間が必要なため検出に時間がかかるという欠点を有していた。さらに、RI-標識化合物の利用に伴うリスクおよびコストの面からも、この手法は理想的な手法ではなかった。

ケミカルバイオロジーの近年の進展により、タンパク質脂質修飾の研究にクリックケミストリーを利用した全く新しい方法が利用可能となった[4-8~4-10]。これらの方法では、初めに、アルキン化またはアジド化した脂肪酸アナログで対象タンパク質を標識する(Fig.4-1A)。次に、対となるアジド化あるいはアルキン化した検出用試薬とクリックケミストリーにより反応を行う。これらの方法の利点は、非放射性であり、検出時間が短いことに加え、従来の放射性標識法と比較して検出感度が高いことである。本研究では、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目的タンパク質を代謝標識し、クリックケミストリーによりタンパク質

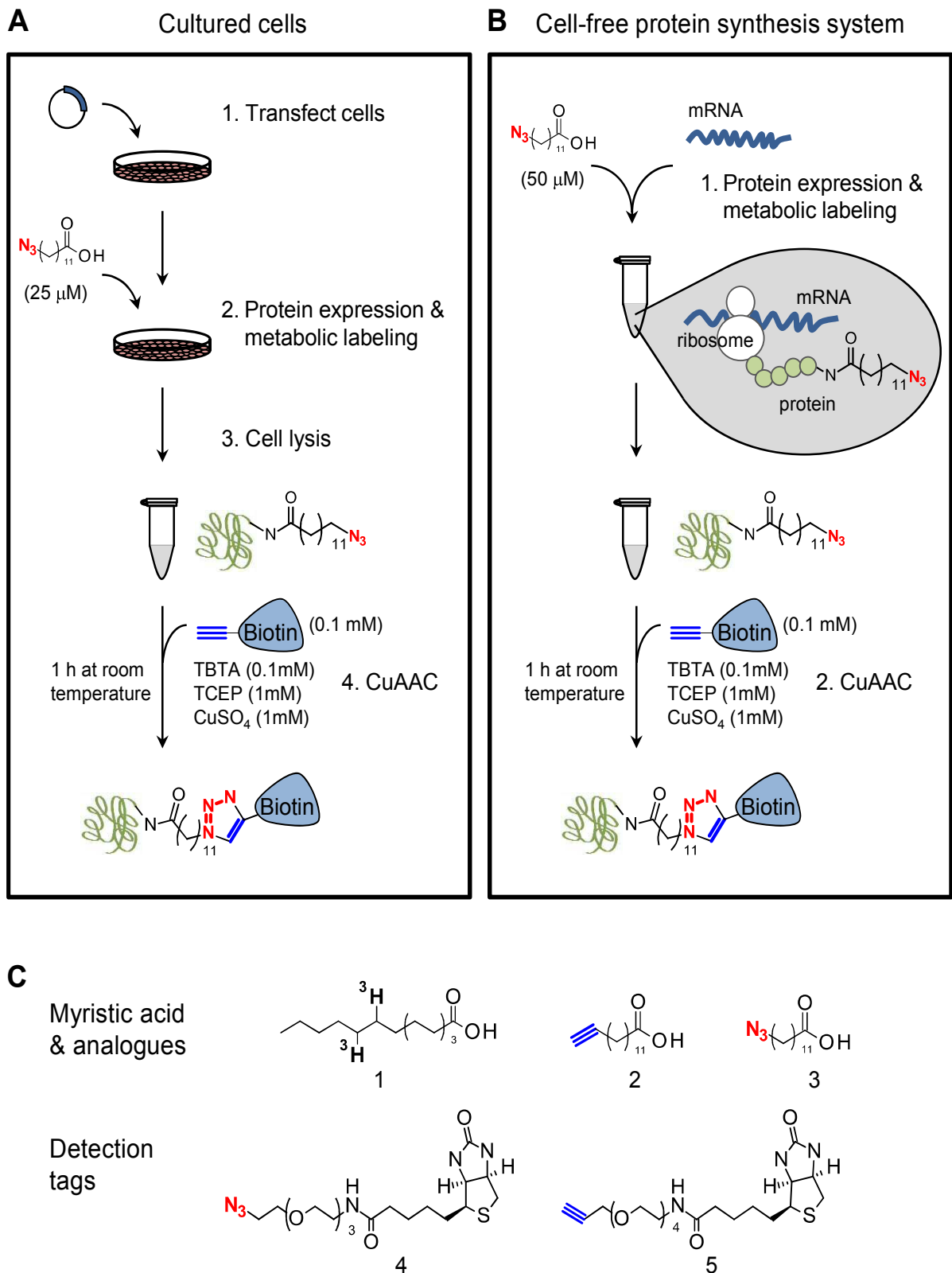


Fig. 4-1. Schematic representation of cellular and cell-free detection systems for protein N- yristoylation by metabolic labeling utilizing bioorthogonal myristic acid analogues.

A. Metabolic labeling in cultured mammalian cells. B. Metabolic labeling in cell-free protein synthesis system. In both detection systems, metabolically labeled proteins with myristic acid analogues were reacted with biotin-tags via CuAAC for gel-based analysis. The recommended concentrations of reagents and reaction times were indicated. C. Chemical structures of alkynyl- or azide-analogues of myristic acid and detection tags. 1. $[^3H]$ myristic acid, 2. alkynyl-analogue of myristic acid (Alk-Myr), 3. azide-analogue of myristic acid (Az-Myr), 4. azide-biotin (Az-Biotin), 5. Alkynyl-biotin (Alk-Biotin)

N-ミリストイル化を検出する新規の手法の確立を行った(Fig.4-1B). その結果, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるアジド化ミリスチン酸アナログを用いた代謝標識と, それに続く銅触媒アジド-アルキン付加環化反応(CuAAC)による検出タグの導入により, cDNA リソースから新規 N-ミリストイル化タンパク質を迅速且つ効率的に同定できることが示された.

4-2 材料と方法

4-2-1 試薬

昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系 Transdirect insect cell は島津製作所(Kyoto, Japan)から提供されたものを用いた. ヒト cDNAs (Flexi ORF clones), rabbit reticulocyte lysate system, nuclease treated は Promega 社から購入した. [³H]leucine, [³H]myristic acid および enhanced chemiluminescence (ECL) Prime Western blotting detection reagent は GE Healthcare 社から購入した. ENLIGHTNING は PerkinElmer 社から購入した. T7-Scribe standard RNA IVT kit は CELLSCRIPT 社から購入した. dye terminator cycle sequencing kit, Lipofectamine LTX, Plus reagent, myristic acid azide (12-azidododecanoic acid, Az-Myr), Alexa Fluor 594 anti-mouse immunoglobulin G (IgG) antibody, Hoechst 33342 は Life Technologies 社から購入した. 13-Tetradecynoic acid (Alk-Myr)は Cayman 社から購入した. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] amine (TBTA)は Sigma 社から購入した. Acetylene-PEG4-biotin conjugate (Alk-biotin), azide-PEG-biotin conjugate (Az-biotin) は Click Chemistry Tools 社から購入した. High-sensitivity streptavidin-horseradish peroxidase (HRP)は Thermo Scientific 社から購入した. Protein G-HRP conjugate は Bio-Rad 社から購入した. X-ray film は Eastman Kodak 社から購入した. その他の試薬は和光純薬工業, 第一化学薬品, 生化学工業の特級または分子生物学グレードのものを用いた.

4-2-2 N-ミリストイル化予測プログラムを用いたタンパク質 N-ミリストイル化の予測

Web サーバー上で公開されている 2 つのタンパク質 N-ミリストイル化予測プログラム MYR Predictor (<http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>) [4-11] および Myristoylator (<http://www.expasy.org/tools/myristoylator>) [4-12]を用いてタンパク質 N-ミリストイル化を予測した. オープンリーディングフレーム(ORF)のヌクレオチド配列から推定される全アミノ酸配列を解析に用いた.

4-2-3 プラスミドの構築

プラスミド構築に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの塩基配列を Table 4-1 にまと

Table 4-1 The nucleotide sequences of oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence
Primer-N1	5'-GATAGATATCATGGGGAACAGCCAC-3'
Primer- C1	5'-GCATTCTAGAGATCCACTGCACAAG-3'
Primer- N2	5'-GCATGATATCATGGCCAACAGCCACTGTGTC-3'
Primer- N3	5'- GATAGATATCATGGGAGCGAACACT -3'
Primer-C2	5'- GCGCTCTAGACAAGTTGTTATTCTG -3',
Primer- N4	5'-GCGCGATATCATGGCGGCGAACACTTCAAGA-3'
Primer- N5	5'- ATATGATATCATGGGGTCGACCGAC -3'
Primer-C3	5'- GATATCTAGACACCCGCTGTATCTC -3'
Primer- N6	5'-ATATGATATCATGGCGTCGACCGACTCCAAG -3'
Primer- N7	5'-GTATGGATCCATGGGCAGTGTGCGA-3
Primer-C4	5'- GCGCGAATTCTATCTCCGACTCTCG -3',
Primer-N8	5'-GCATGATATCATGGGCCAGGTCATC- 3'
Primer-C5	5'- GCGCGAATTCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCGAAGCATTTGCGGTG- 3'
Primer-N9	5'-GCGCGATATCATGGCCCAGGTCATCACCATT -3'
Primer-C6	5'-GCGCGAATTCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCGATCCACTGCACAAG-3'
Primer-C7	5'- GCGCGAATTCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCCAAGTTGTTATTCTG -3'
Primer-C8	5'- GCGAGAATTCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCCACCCGCTGTATCTC -3'
Primer- N10	5'- GATAGATATCATGGGCAGTGTGCGA -3'
Primer-C9	5'- GCGCGAATTCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCTATCTCCGACTCTCG -3'

めた。プラスミド pcDNA3-tActin-FLAG, pcDNA3-tActinG2A-FLAG および pcDNA3-FLAG は以前の報告 [4-13, 4-14] に従い調製した。プラスミド pcDNA3-FXC02940-FLAG, pcDNA3-FXC02940G2A-FLAG, pcDNA3-FXC03969-FLAG, pcDNA3-FXC03969G2A-FLAG, pcDNA3-FXC10490-FLAG, pcDNA3-FXC10490G2A-FLAG および pcDNA3-FXC10889-FLAG の構築方法を Table 4-2 にまとめた。プラスミド pTD1(島津製作所製)を無細胞タンパク質合成系におけるベクターとして用いた。プラスミド pTD1-tActin-FLAG, pTD1-tActinG2A-FLAG, pTD1-FXC02940-FLAG, pTD1-FXC03969-FLAG, pTD1-FXC10490-FLAG, および pTD1-FXC10889-FLAG の構築方法を Table 4-2 にまとめた。

4-2-4 mRNA の合成と精製

4-2-3 で構築したプラスミドを鋳型として PCR 反応を行い, この PCR 増幅産物を *in vitro* 転写用の鋳型として用いた。mRNA の合成は T7-Scribe standard RNA IVT kit (CELLSCRIPT 社製)を用いて行った。8 μ L の PCR 増幅産物を鋳型とし, 付属の取扱説明書に従い 20 μ L の転写反応液を調製した。これを 37°C で 4 時間インキュベートした。転写反応液はフェノール-クロロホルム抽出, エタノール沈殿により精製後, 20 μ M の DEPC 処理水に溶解した。上記操作により約 150 μ g の mRNA が得られた。

4-2-5 無細胞タンパク質合成

N-ミリスチル化反応に用いたミリスチン酸アナログは, 25 mM となるよう DMSO に溶解し, -20°C で保存した。これを無細胞タンパク質合成反応の直前に 10 % DMSO 溶液で 625 μ M に希釈し, 反応に用いた。

無細胞タンパク質合成は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系(Shimadzu 社製)またはウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成系(Promega 社製)を用いて行った。

昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成では, 合成した mRNA(8 μ g)を鋳型とし, キットに付属のメチオニン溶液(0.5 μ L), reaction buffer(3.7 μ L), insect cell lysate (6.2 μ L)を添加した。さらに, 上記のように調製した 625 μ M ミリスチン酸アナログ(1 μ L), または 1.0 μ L [3 H]leucine (1 μ Ci), または 3.0 μ L [3 H]ミリスチン酸(20 μ Ci)を加えた。12.5 μ L の無細胞タンパク質合成反応液を, 26°C で 6 時間反応させた。

ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成では, 合成した mRNA(8 μ g)を鋳型に, キットに付属のアミノ酸混合溶液(0.5 μ L), ウサギ網状赤血球溶解液 (8.7 μ L)を添加した。さらに, 上記のように調製した 625 μ M ミリスチン酸アナログ(1 μ L)または 1.0 μ L [3 H]leucine (1 μ Ci)または 3.0 μ L [3 H]myristic acid(20 μ Ci)を加えた。12 μ L の無細胞タンパク質合成液とし, 30°C で 90 分反応させた。

Table 4-2 Strategies for construction of plasmids used in this study.

Name of plasmid	Strategy for plasmid construction
pcDNA3-FXC02940-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8690 (Promega) as a template and primers Primer-N1 and Primer-C1 was <i>EcoRV/XbaI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pcDNA3-FXC02940G2A-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8690 as a template and primers Primer-N2 and Primer-C1 was <i>EcoRV/XbaI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pcDNA3-FXC03969-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0678 as a template and primers Primer-N3 and Primer-C2 was <i>EcoRV/XbaI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pcDNA3-FXC03969G2A-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0678 as a template and primers Primer-N4 and Primer-C2 was <i>EcoRV/XbaI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pcDNA3-FXC10490-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9562 as a template and primers Primer-N5 and Primer-C3 was <i>EcoRV/XbaI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pcDNA3-FXC10490G2A-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9562 as a template and primers Primer-N6 and Primer-C3 was <i>EcoRV/XbaI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pcDNA3-FXC10889-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0241 as a template and primers Primer-N7 and Primer-C4 was <i>BamHI/EcoRI</i> cloned into pcDNA3-FLAG.
pTD1-tActin-FLAG	Product of a PCR with pcDNA3-tActin-FLAG as a template and primers Primer-N8 and Primer-C5 was <i>EcoRV/EcoRI</i> , cloned into pTD1.
pTD1-tActinG2A-FLAG	Product of a PCR with pcDNA3-tActin-FLAG as a template and primers Primer-N9 and Primer-C5 was <i>EcoRV/EcoRI</i> , cloned into pTD1.
pTD1-FXC02940-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8690 as a template and primers Primer-N1 and Primer-C6 was <i>EcoRV/EcoRI</i> , cloned into pTD1.
pTD1-FXC03969-FLAG	Product of a PCR with pF1KE0678 as a template and primers Primer-N3 and Primer-C7 was <i>EcoRV/EcoRI</i> , cloned into pTD1.
pTD1-FXC10490-FLAG	Product of a PCR with pF1KB9562 as a template and primers Primer-N5 and Primer-C8 was <i>EcoRV/EcoRI</i> , cloned into pTD1.
pTD1-FXC10889-FLAG	Product of a PCR with pF1KB8690 as a template and primers Primer-N10 and Primer-C9 was <i>EcoRV/EcoRI</i> , cloned into pTD1.

4-2-6 培養細胞への遺伝子導入

HEK293T細胞は10%ウシ胎児血清(FCS, Gibco BRL社製), 100 unit/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma社製)を用い37°C, 5% CO₂条件下で培養した. 遺伝子導入前日に直径35 mm培養皿に2 × 10⁵個の細胞を播種した. Lipofectamine LTX (2.5 µL), Plus reagent(2 µL), 無血清培地1 mLを用い, Flag タグを付加した cDNA 配列を含むプラスミド pcDNA3 (2 µg)を細胞へ遺伝子導入した. 37°Cで5時間インキュベート後, 培地を血清添加培地に交換し, 適当な期間インキュベートした.

4-2-7 遺伝子導入細胞を用いた代謝標識

遺伝子導入後, 37°Cで24時間インキュベートした HEK293T細胞を25 µM myristic acid analogue または [³H]myristic acid (100 µCi/mL)を含む2% FCSを添加した1 mLの DMEM 中で, 37°Cで6時間インキュベートした. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)で3回洗浄後, 細胞を回収し, クリックケミストリー用 RIPA バッファー(50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and proteinase inhibitors) 200 µL で溶解後, 氷上で20分放置し細胞溶解液を得た. その後 CuAAC によりミリスチン酸アナログで代謝標識した細胞溶解液をビオチンと反応させた. 放射性標識細胞溶解液は SDS サンプルバッファー中で3分間煮沸により SDS 化し, SDS-PAGE およびフルオログラフィーによる解析に用いた.

4-2-8 銅触媒によるアジド-アルキン付加環化反応

ミリスチン酸アナログにより代謝標識した細胞溶解液および無細胞タンパク質合成反応液は, 直前に混合したクリックケミストリー反応混合液4 µL (1 µL の Alk-biotin または Az-biotin [5 mM 原液(DMSO で溶解), 終濃度 100 µM], 1 µL の TCEP [50 mM 要時調製原液(ミリ Q 水で溶解), 終濃度 1 mM], 1 µL の TBTA [5 mM 原液(DMSO で溶解), 終濃度 100 µM], および 1 µL の CuSO₄·5H₂O [50 mM 要時調製原液(ミリ Q 水で溶解), 終濃度 1 mM]) と混合し, PBS で全反応液量が 50 µL となるよう調整後, 室温で1時間反応させた. 反応は 17 µL の 4×SDS サンプルバッファーの添加により停止させた. サンプルは 70°C で 10 分間加熱して SDS 化し, SDS-PAGE に供与後, ストレプトアビジンブロッキングまたはウェスタンブロッキングにより解析した.

4-2-9 SDS-PAGE およびフルオログラフィー

タンパク質は 12.5% SDS-PAGE により分離し, ゲルを固定化後, ENLIGHTNING (PerkinElmer)中に20分間浸漬した. その後, ゲルを加温吸引により乾燥させ, 適切な期間 X 線フィルムに露光した.

4-2-10 ストレプトアビジンブロッティング

タンパク質はアクリルアミド濃度 12.5% の SDS-PAGE により分離後, Immobilon-P 膜へ転写した. スキムミルクでブロッキング後, high-sensitivity streptavidin-HRP (Tris-buffered saline with Tween [TBS-T])で 10,000 倍希釈)によりビオチン付加タンパク質を特異的に標識した. その後, ECL Prime Western blotting detection reagent と反応させ, 化学発光を MicroChemi Chemiluminescence Imaging System (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)により検出した. バンド強度は TotalLab Quant software (TotalLab, Newcastle upon Tyne, UK)を用いて定量化した.

4-2-11 ウェスタンブロッティング

タンパク質はアクリルアミド濃度 12.5% の SDS-PAGE により分離後, Immobilon-P 膜へ転写した. スキムミルクでブロッキング後, 抗 Flag 抗体(1000 倍希釈)で処理した[4-15]. 抗体処理後の Immobilon-P 膜はプロテイン G-HRP で処理した. その後, ECL Prime Western blotting detection reagent と反応させ, 化学発光を MicroChemi Chemiluminescence Imaging System により検出した. バンド強度は TotalLab Quant software を用いて定量化した.

4-2-12 免疫蛍光染色および蛍光顕微鏡観察

遺伝子導入後 24 時間経過した細胞を免疫蛍光染色に用いた[4-14]. 始めに Hoechst 33342 で核を染色した. その後, 細胞を DPBS で洗浄し, 4%パラホルムアルデヒド(DPBS 中)で 15 分間インキュベートし固定した. 固定した細胞を 0.1% Triton X-100(DPBS 中)で 10 分間室温で透過性処理後, 0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄した. 透過性処理細胞は DPBS 中 1000 倍希釈抗 Flag 抗体中に室温で一時間浸漬した. 0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄後, 細胞を Alexa Fluor 594 rabbit 抗マウス IgG 抗体と室温で一時間反応させた. 0.1%ゼラチンを含む DPBS で洗浄後, マウンティングメEDIUMでマウントし, Leica AF7000 蛍光顕微鏡(Leica, Solmsers, Germany)により観察した.

4-3 結果

4-3-1 タンパク質 N-ミリスチル化はクリックケミストリーを用いた手法により無細胞タンパク質合成系において効率良く検出される

タンパク質 N-ミリスチル化を RI-標識ミリスチン酸を用いず無細胞タンパク質合成系で検出する手法を確立するために, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系においてアジド化あるいはアルキン化したミリスチン酸アナログにより代謝標識を行った. ビオチンタグとの CuAAC 反応後, ビオチン付加タンパク質を SDS-PAGE により分離後 PVDF 膜へ転写した. その後, HRP 標識ストレプトアビジンと反応させ ECL による化学発光により N-ミリスチル化タンパク質を検出した. 培養細胞および無細胞タンパク質合成系にお

けるアジド化あるいはアルキン化ミリスチン酸アナログを用いた代謝標識によるタンパク質 N-ミリスチル化の検出法の模式図を Fig. 4-1 A および B に示した. 培養細胞におけるミリスチン酸アナログを用いた代謝標識によるタンパク質 N-ミリスチル化の検出法では, アジド化またはアルキン化ミリスチン酸アナログが使用されてきた. 我々は, 始めに N-ミリスチル化モデルタンパク質として C 末端に Flag タグを付加した tActin-Flag を HEK293T 細胞で, 発現させアジド化ミリスチン酸アナログ(Az-Myr)またはアルキン化ミリスチン酸アナログ(Alk-Myr)を用いた代謝標識によるタンパク質 N-ミリスチル化の検出を試みた. Az-Myr および Alk-Myr の構造を Fig. 4-1 C に示した. Fig. 4-2 A パネル a と c に示したように, tAct-Flag および 2 位の Gly を Ala に置換し N-ミリスチル化されない変異体である tAct-G2A-Flag はウェスタンブロッティングにより効率の良いタンパク質発現が確認できた. これに対して, ミリスチン酸アナログによる代謝標識では tAct-Flag でのみ N-ミリスチル化が検出された(Fig. 4-2 A パネル b および d). 同濃度(25 μ M)での代謝標識では, これらのミリスチン酸アナログによりほぼ同じ強さの標識が検出されたことから, Az-Myr および Alk-Myr はどちらも培養細胞におけるタンパク質 N-ミリスチル化の検出に利用できることが示された. Fig. 4-2 A パネル e および f に示したように, 培養細胞における代謝標識に³H]ミリスチン酸を用いた場合, ミリスチン酸アナログを用いた代謝標識と同様の標識パターンが得られた. しかし, この場合, X 線フィルムへの露光時間が 3~5 日間必要であった. 次に, 無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチル化の検出にこれらのミリスチン酸アナログが利用できるか否かを調べるために, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において 25 μ M ミリスチン酸アナログによる代謝標識を行った. Fig. 4-2 B (パネル a および c)に示したように, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において tAct-Flag および tAct-G2A-Flag のほぼ同量の発現がウェスタンブロッティングにより確認された. タンパク質 N-ミリスチル化の検出では, Az-Myr により効率的な標識が観測されたが, Alk-Myr ではごく弱い標識しか検出されなかった(Fig. 4-2 B パネル b および d). これらの結果は, 無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチル化の検出には Alk-Myr ではなく Az-Myr が適していることを示している. Fig. 4-2 B (パネル e および f)に示したように, 無細胞タンパク質合成系において³H]ミリスチン酸で代謝標識した場合, Az-Myr の場合と同様に tAct-Flag でのみ特異的な標識が検出された. この場合, 同様の結果を得るためには X 線フィルムへの露光時間が 3 日間必要であった.

4-3-2 アジド化ミリスチン酸アナログは昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチルの検出に適している

ミリスチン酸アナログを用いた無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチル化の検出効率を最適化するために, tAct-Flag を用いて代謝標識および CuAAC 反応におけるそれぞれの成分濃度のタンパク質 N-ミリスチル化検出効率への影響を検討した.

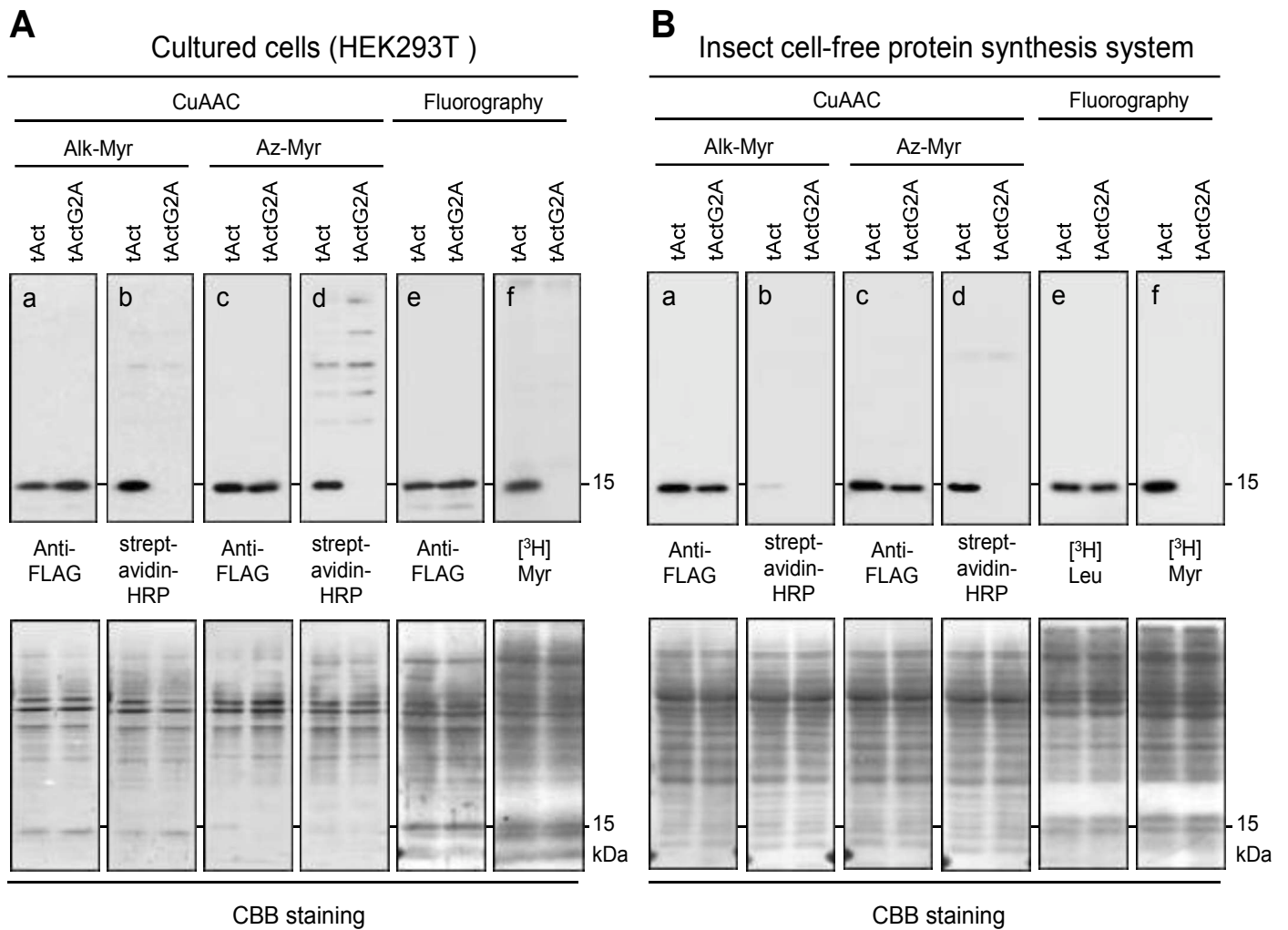


Fig. 4-2. Protein N-myristoylation is efficiently detected in a cell-free protein synthesis system by metabolic labeling with bioorthogonal myristic acid analogues.

A. Detection of protein N-myristoylation of tActin by metabolic labeling in HEK293T cells. cDNAs encoding tActin- and tActinG2A-FLAG were transfected into HEK293T cells, then the cells were labeled with myristic acid analogues or [^3H]myristic acid. The expression of proteins was evaluated by western blotting analysis using anti-FLAG antibody (a, c, and e). Protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling with myristic acid analogues followed by CuAAC with detection tags (b and d) or [^3H]myristic acid (f), respectively, as described in the materials and methods. Two myristic acid analogues, Alk-Myr (a and b) and Az-Myr (c and d), were used for the analysis. B. Detection of protein N-myristoylation of tActin by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. mRNAs encoding tActin- and tActinG2A-FLAG were translated *in vitro* in the presence of myristic acid analogues or [^3H]leucine, [^3H]myristic acid using an insect cell-free protein synthesis system. The expression of protein was evaluated by western blotting analysis using an anti-FLAG antibody (a and c) or incorporation of [^3H]leucine (e). Protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling with myristic acid analogues followed by CuAAC with detection tags (b and d) or [^3H]myristic acid (f), respectively. Two myristic acid analogues, Alk-Myr (a and b) and Az-Myr (c and d) were used for the analysis. CBB-staining of the blotted membrane or the SDS-PAGE gel was used as the loading control (lower panels).

その結果, **tAct-Flag** のタンパク質 N-ミリスチル化の検出効率にはミリスチン酸アナログおよびビオチンタグ濃度が強く影響することが分かった. **Fig. 4-3 A** および **B** に示したように, **Az-Myr/Alk-biotin** ペアを使用した場合, 広範囲にわたる **Az-Myr** および **Alk-biotin** 濃度において効率的な標識が確認された. 対照的に, **Alk-Myr/Az-biotin** ペアでは, 高濃度の **Alk-Myr** および **Az-biotin** でのみごく弱いタンパク質 N-ミリスチル化が検出された. これらの結果は昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチル化の検出には **Az-Myr** と **Alk-biotin** の組み合わせが適していることを示している.

4-3-3 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系はミリスチン酸アナログを用いたタンパク質 N-ミリスチル化の無細胞系での検出に適している

昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系に加え, ウサギ網状赤血球溶解液もタンパク質 N-ミリスチル化の検出に用いられてきた. そこで, 次に, ウサギ網状赤血球由来タンパク質合成系においてミリスチン酸アナログを用いた代謝標識によりタンパク質 N-ミリスチル化が検出可能か調べた. **Fig. 4-4 A** に示したように, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において, $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸(パネル a および b)または **Az-Myr**(パネル c および d)を用いた代謝標識により **tAct-Flag** のタンパク質 N-ミリスチルが効率よく検出された. **Fig. 4-4 B** (パネル a および b)に示したように, ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成における $[^3\text{H}]$ ロイシンまたは $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を用いた **tAct-Flag** の代謝標識では, 分子量約 **15kDa** の位置にブロードなバンドが検出された. **SDS-PAGE** ゲルのクーマシーブリリアントブルー(**CBB**)染色により, 低分子量(**15kDa** 以下)の部分にウサギ網状赤血球由来の多量のタンパク質の存在が確認されたことから, これが原因となってタンパク質バンドが広がったと推察された(**Fig. 4-4 B** パネル a および b, 下段パネル). **Fig. 4-4 B** (パネル c および d)に示したように, **Az-Myr** を用いた **tAct-Flag** の代謝標識では, 低分子量領域の強い非特異的バックグラウンドのため, タンパク質発現, タンパク質 N-ミリスチル化のどちらも検出されなかった. ウサギ網状赤血球は一定量のヘモグロビンを含んでおり, ヘモグロビンはペルオキシダーゼ活性を持つことが知られている[4-16]. そのため, 低分子量領域に観測された非特異的なバックグラウンドは細胞溶解液中に存在するヘモグロビンによるものと推測された. 実際, 抗体/プロテイン **G-HRP** 処理またはストレプトアビジン-**HRP** 処理を行わなかった場合でも, ウサギ網状赤血球溶解液あるいは精製ヘモグロビンを **SDS-PAGE** に供与し, プロットニング後 **ECL** により検出を行ったところ低分子量領域に同様のタンパク質バンドが検出された(**Fig. 4-5**). このことから, **ECL** で観測された非特異的バックグラウンドはウサギ網状赤血球中に含まれるヘモグロビンに由来するものと考えられた. 以上の結果から, ミリスチン酸アナログを用いた代謝標識によるタンパク質 N-ミリスチル化の検出には, ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成系ではなく昆虫培養細胞由来タンパク質合成系が適していることが確認された.

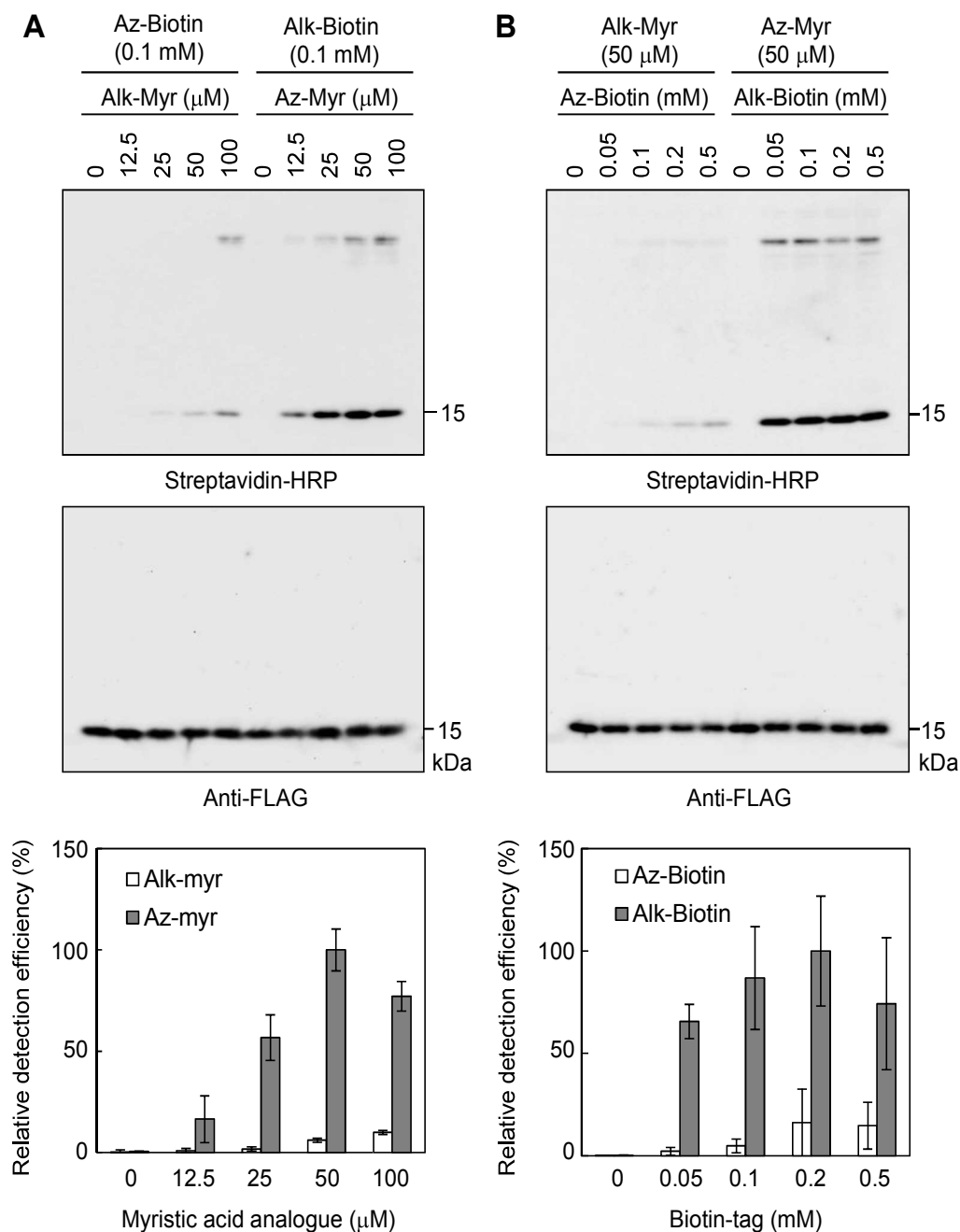


Fig. 4-3. An azide-analogue of myristic acid is suitable for the detection of protein N-myristoylation by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system.

The effect of concentration of myristic acid analogues in metabolic labeling and biotin-tags in the CuAAC reaction on the detection efficiency of protein N-myristoylation of tActin-FLAG in an insect cell-free protein synthesis system was evaluated. A. mRNAs encoding tActin-FLAG were translated *in vitro* in the presence of various concentrations of Alk-Myr or Az-Myr using an insect cell-free protein synthesis system, followed by reaction with biotin tags at 0.1 mM via CuAAC. B. mRNAs encoding tActin-FLAG were translated *in vitro* in the presence of 50 mM Alk-Myr or Az-Myr using an insect cell-free protein synthesis system, followed by reaction with various concentrations of Az-biotin or Alk-biotin, respectively, via CuAAC. The expression of protein was evaluated by western blotting analysis using an anti-FLAG antibody. Protein N-myristoylation was detected by ECL using streptavidin-HRP as described in the materials and methods. Quantitative analysis of the labeled proteins was carried out by scanning the blots using a MicroChem Chemiluminescence Imaging System. Relative detection efficiency was calculated as (intensity of metabolic labeling with myristic acid analogue)/(intensity of anti-FLAG western blotting) of each protein band. The highest relative detection efficiency was set as 100% and the relative detection efficiency of each sample is shown (lower panels). Data are expressed as mean \pm SD for three independent experiments.

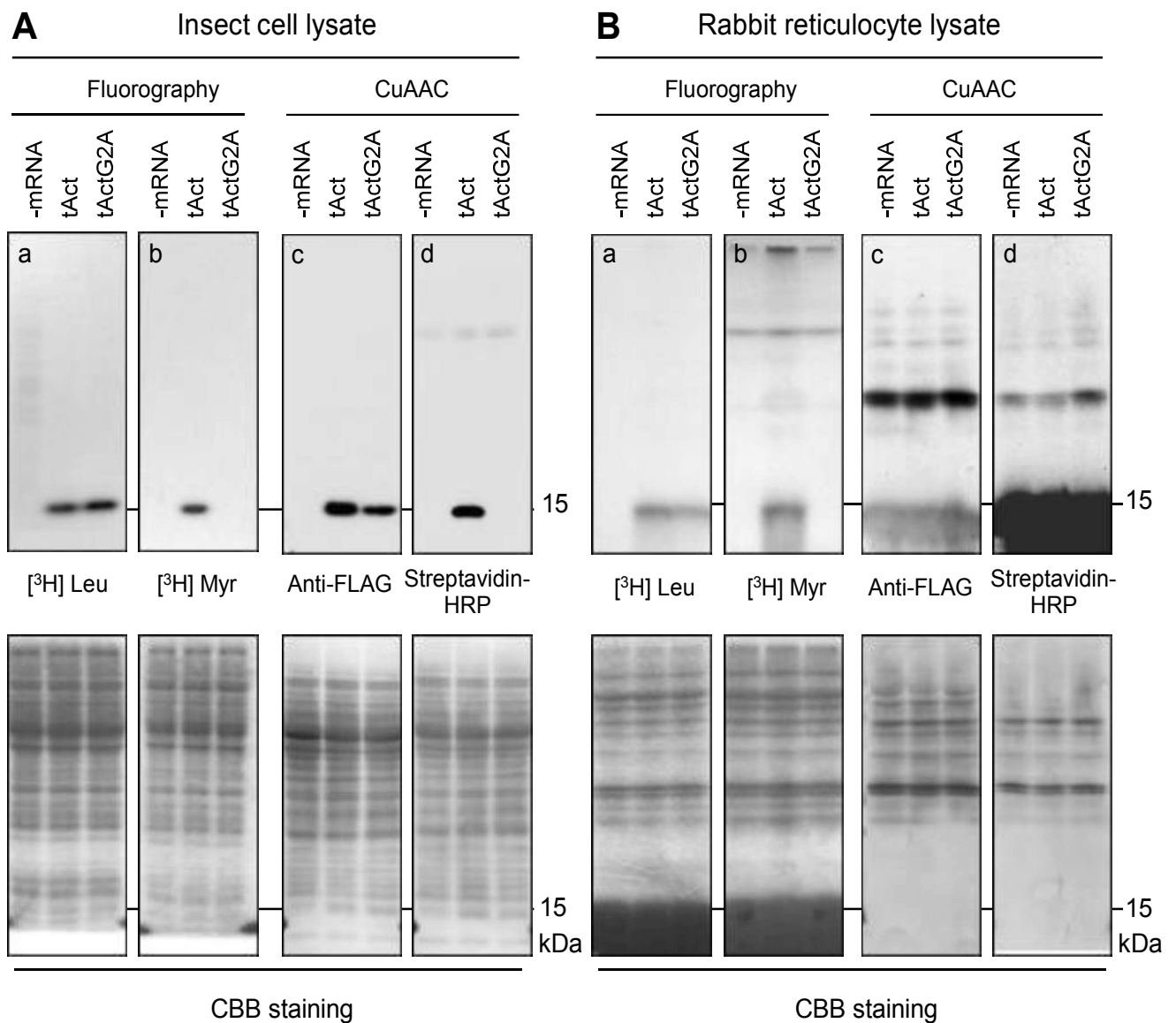


Fig. 4-4. The insect cell-free protein synthesis system is optimal for the cell-free detection of protein N-myristoylation.

mRNAs encoding tActin- and tActinG2A-FLAG were translated *in vitro* in the presence of [³H]leucine, [³H]myristic acid, or Az-Myr using an insect cell-free protein synthesis system (A) or a rabbit reticulocyte lysate system (B). The expression level of protein was evaluated by incorporation of [³H]leucine (a) or western blotting analysis using an anti-FLAG antibody (c). Protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling with [³H]myristic acid (b) or Az-Myr followed by CuAAC with Alk-Biotin (d), respectively, as described in the materials and methods. CBB-staining of the SDS-PAGE gel or the blotted membrane was used as a loading control (lower panels).

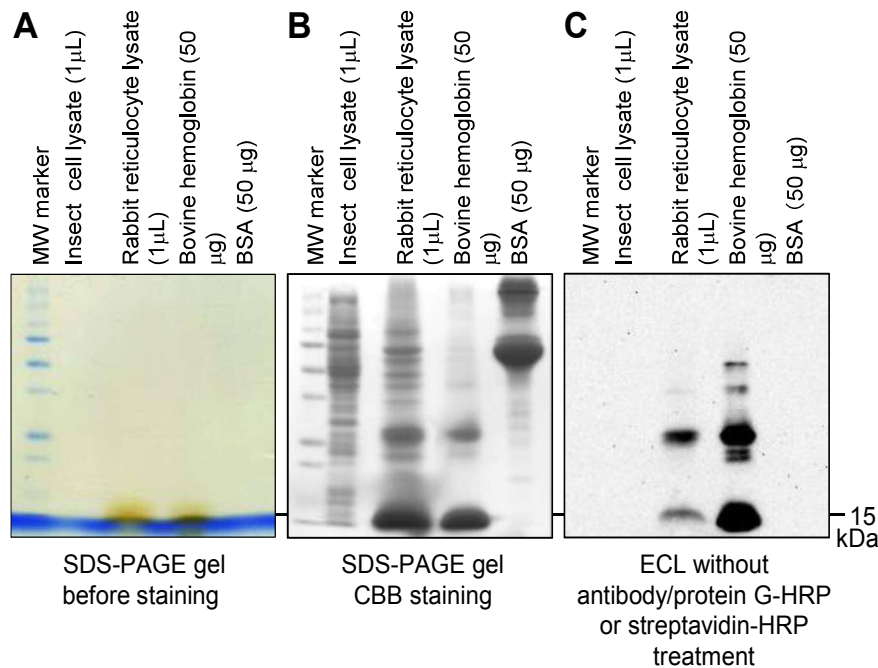


Fig. 4-5 Involvement of hemoglobin contained in the rabbit reticulocyte lysate in the non-specific background observed in ECL

In order to study the involvement of hemoglobin contained in the rabbit reticulocyte lysate in the non-specific background observed in ECL, 1 µL of insect cell lysate or rabbit reticulocyte lysate, and 50 µg of bovine hemoglobin or bovine serum albumin (BSA) were resolved by 12.5% SDS-PAGE (A, B). The proteins in the SDS-PAGE gel were transferred to an Immobilon-P transfer membrane. After blocking with non-fat milk, the membrane was developed using ECL prime western blotting detection reagent and detected using a MicroChemi Chemiluminescence Imaging System (C). As shown in the three figures (A, B, C), similar protein bands were observed with rabbit reticulocyte lysate and bovine hemoglobin, but not with insect cell lysate or BSA. These results strongly indicated that the hemoglobin contained in the rabbit reticulocyte lysate is involved in the non-specific background observed in ECL.

Table 4-3. The characteristics of the gene products of the 4 cDNA clones analyzed in this study.

FXC No.	Protein name	Gene name	Accession no.	MW (kDa)	Protein function	MYR Predictor	Myristoylated or
02940	Pleckstrin homology domain containing, family N member 1	PLEKH N1	AB463180	66	Unknown	RELIABLE	Low confidence
03969	Serine/threonine-protein kinase 32A	STK32A	AB528042	46	Serine/threonine-protein kinase	TWILIGHT ZONE	High confidence
10490	HID1 domain-containing protein	HID1	AB527292	89	Unknown	NO	High confidence
10889	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J member 2	KCNJ2	AB528777	48	Potassium inwardly-rectifying channel	TWILIGHT ZONE	Non-myristoylated

The results of the prediction of protein N-myristoylation of the four cDNA clones using two prediction programs, The MYR Predictor and Myristoylator, are shown.

4-3-4 無細胞タンパク質合成系におけるミリスチン酸アナログを用いた代謝標識によりヒト cDNA リソースから新規 N-ミリスチル化タンパク質を同定する事が可能である

前述の新規検出法が 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できるか否かを検討するために、ヒト cDNA リソース(Kazusa ORFeome project human cDNA clones)から 4 つの候補 cDNA クローンを選出した。これらのタンパク質 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においてアジド化ミリスチン酸アナログを用いた代謝標識により評価した。解析した cDNA クローンを Table 4-3 に示した。これらの cDNA クローンは、公開サーバー上の 2 つのタンパク質 N-ミリスチル化予測プログラム、MYR Predictor[4-11]および Myristoylator[4-12]のうち、少なくともどちらからか N-ミリスチル化されると予測されたタンパク質をコードする cDNA である。HEK293T 細胞において、C 末端に Flag タグを付加したこれら 4 つの候補 cDNA を遺伝子導入し、 $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸を用いて代謝標識したところ、ウェスタンブロッティングにより全てのタンパク質の効率のよい発現が確認された(Fig. 4-6 A パネル a)。これらのうち、PLEKHN1, STK32A, HID1 が $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸代謝標識により N-ミリスチル化されることが見出された(Fig. 4-6 A パネル b)。Az-Myr による代謝標識でも同様の結果が得られた(Fig. 4-6 A パネル c および d)。昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において、Flag タグを付加したこれら 4 つの候補 cDNA を $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸または Az-Myr で代謝標識した場合、タンパク質発現およびタンパク質 N-ミリスチル化について HEK293T 培養細胞において代謝標識した場合と全く同様の結果が得られた(Fig. 4-6 B)。これらの結果は、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における Az-Myr を用いた代謝標識は、細胞で生じているタンパク質 N-ミリスチル化の検出に有用な無細胞系における検出法であることを示している。

次に、新規 N-ミリスチル化タンパク質の細胞内局在におけるタンパク質 N-ミリスチル化の役割を検討した。この解析では、2 位の Gly を Ala に置換し N-ミリスチル化を阻害した G2A 変異体についても細胞内局在を検討した。Fig. 4-7 A に示したように、Flag タグを付加した 3 つの新規 N-ミリスチル化タンパク質のワイルドタイプおよび G2A 変異体を HEK293T 細胞において Az-Myr により代謝標識した結果、タンパク質 N-ミリスチル化は Gly2 の Ala 置換により完全に阻害された。Fig. 4-7 B に示したように、これらの cDNA を導入した HEK293T 細胞の免疫蛍光染色から、タンパク質 N-ミリスチル化が PLEKHN1 および STK32A の細胞内局在に強く影響することが明らかになった。N-ミリスチル化された PLEKHN1 および STK32A は主として原形質膜に局在したが、PLEKHN1 および STK32A の N-ミリスチル化を阻害した G2A 変異体はそれぞれ細胞内小器管と細胞質に局在した。HID1 では、ワイルドタイプおよびその G2A 変異体のいずれにおいても特異的な細胞内局在が観察されなかった(図省略)。これらの結果は、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるアジド化ミリスチン酸アナログを用いた代謝標識はタンパク質

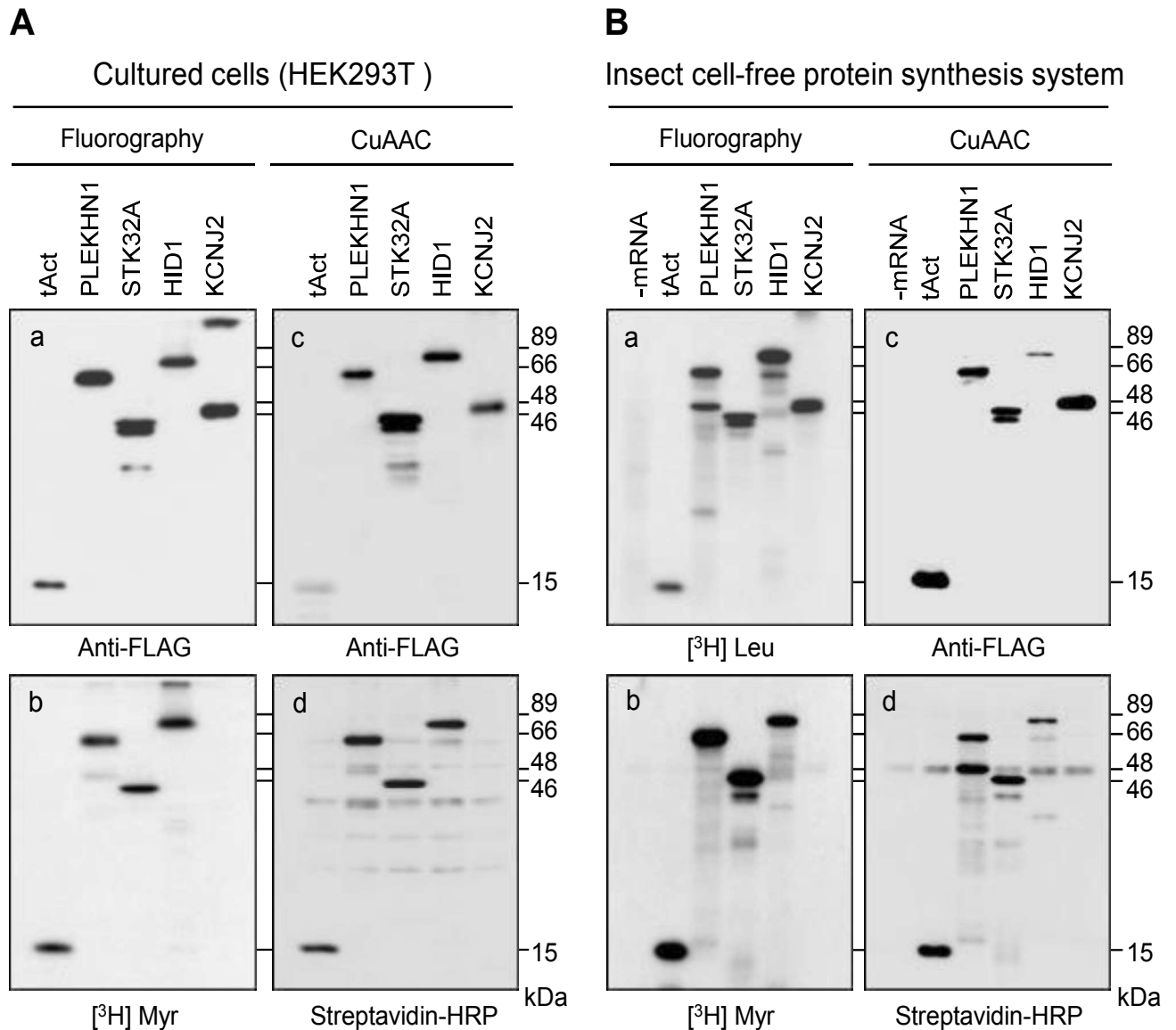


Fig. 4-6. Identification of novel N-myristoylated proteins from human cDNA resources by metabolic labeling in the insect cell-free protein synthesis system using a bioorthogonal myristic acid analogue.

A. Detection of protein N-myristoylation of four candidate proteins by metabolic labeling in HEK293T cells. cDNAs encoding tActin, PLEKHN1, STK32A, HID1, and KCNJ2 were transfected into HEK293T cells, then, the cells were labeled with $[^3\text{H}]$ myristic acid or Az-Myr. The expression of protein was evaluated by western blotting analysis using an anti-FLAG antibody (a and c). Protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling with $[^3\text{H}]$ myristic acid (b) or Az-Myr followed by CuAAC with Alk-biotin (d), as described in the materials and methods. B. Detection of protein N-myristoylation of four candidate proteins by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. mRNAs encoding tActin, PLEKHN1, STK32A, HID1, and KCNJ2 were translated *in vitro* in the presence of $[^3\text{H}]$ leucine, $[^3\text{H}]$ myristic acid, or Az-Myr using an insect cell-free protein synthesis system. The expression of protein was evaluated by incorporation of $[^3\text{H}]$ leucine (a) or western blotting analysis using an anti-FLAG antibody (c). Protein N-myristoylation was evaluated by metabolic labeling with $[^3\text{H}]$ myristic acid (b) or Az-Myr followed by azide-alkyne cycloaddition with Alk-biotin (d), as described in the materials and methods.

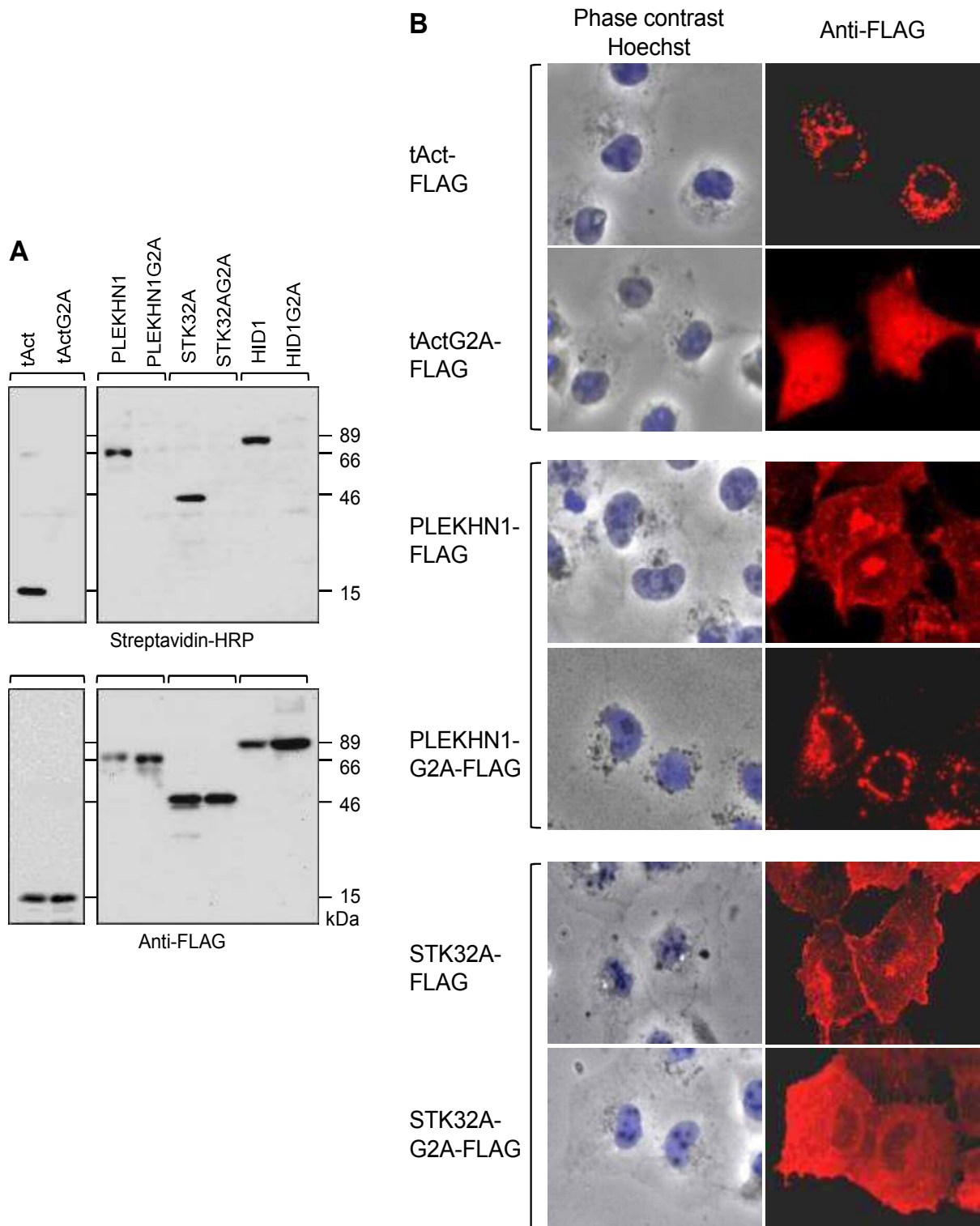


Fig. 4-7. Protein N-myristoylation strongly affects the intracellular localization of novel N-myristoylated proteins.

A. cDNAs encoding wild-type and G2A mutants of tActin, PLEKHN1, STK32A, and HID1 were transfected into HEK293T cells, then the cells were labeled with Az-Myr. The expression of protein was evaluated by western blotting analysis using an anti-FLAG antibody (lower panels). Protein N-myristoylation was evaluated by CuAAC with Alk-biotin, followed by detection with ECL using streptavidin-HRP (upper panels), as described in the materials and methods. B. cDNAs encoding wild-type and G2A mutants of tActin, PLEKHN1, and STK32A were transfected into HEK293T cells, and the intracellular localization of the expressed proteins was determined by immunofluorescence staining using an anti-FLAG antibody.

N-ミリスチル化が生理的に重要な役割を担う新規 N-ミリスチル化タンパク質を同定するための効果的な方法であることを示している。

4-4 小括

細胞または組織中で発現した N-ミリスチル化タンパク質は、通常質量分析(MS 分析)により同定される。この方法では、タンパク質サンプルは細胞または組織から抽出後、二次元電気泳動、液体クロマトグラフィー等により精製され、タンパク質分解酵素で消化した後 MS 分析に用いられる。タンパク質 N-ミリスチル化は、検出されたペプチドの分子量と理論分子量との差により同定される。この場合、特定の細胞または組織では限られた遺伝子のみが発現しているため、この手法では細胞または組織中で発現した主要なタンパク質のみが検出される。また細胞タンパク質中には、MS 分析の検出限界以下の量しか発現されないタンパク質も存在している。

ヒト N-ミリスチル化タンパク質を検出するもう一つの方法は遺伝子導入哺乳動物細胞を用いた代謝標識による方法である[4-14, 4-17]。この方法では、解析するタンパク質をコードする cDNA を哺乳動物細胞に導入する。遺伝子導入細胞を放射性(^3H -または ^{13}C -標識)ミリスチン酸存在下でインキュベートし、目的タンパク質への放射性ミリスチン酸の特異的取り込みによりタンパク質 N-ミリスチル化が検出される。この方法は特定の遺伝子産物のタンパク質 N-ミリスチル化感受性の評価に有用である。しかし、この方法はタンパク質発現に培養哺乳動物細胞を用いており、目的タンパク質への放射性ミリスチン酸の取り込み効率は高くないことから、実験結果を得るために長時間(数週間)が必要となる。これに加えて、すべての cDNA が培養哺乳動物細胞で発現できるとは限らない。例えば、毒性タンパク質、多数回膜貫通タンパク質や高分子量タンパク質の発現量は分子量の小さい可溶性タンパク質と比較して非常に低いことが知られている。したがって、この方法はヒト細胞で発現する N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定法としては適当ではない。

遺伝子導入細胞における *in vivo* 代謝標識に加えて、無細胞タンパク質合成系における *in vitro* 代謝標識がタンパク質 N-ミリスチル化の検出に有用であることが示されている。無細胞タンパク質合成系は、毒性タンパク質を含む mRNA を高速で翻訳することが可能[4-18]であるため、翻訳と共訳した、あるいは翻訳後に生ずるタンパク質 N 末端修飾の解析に非常に有効な手段である。ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成系[4-19]は、メチオニンアミノペプチダーゼ、NMT、N-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)など N 末端タンパク質修飾に関与するすべての構成成分を含むことから[4-20~4-22]、代謝標識実験に幅広く利用されてきた。しかし、この無細胞タンパク質合成系には、翻訳と共訳した、あるいは翻訳後修飾の検出においていくつか不利な点が存在した。第一には、タンパク質発現レベルが低いために代謝標識により実験データを得るまでに長時間(数日から数週間)が必要なが挙げられる。第二は、代謝標識により明確な結果を得るためには免疫沈降等を用いた精製処理が必要であることが挙げられる。近年、*Spodoptera frugiperda* 21 (SF21)昆

虫培養細胞由来の無細胞タンパク質合成系(Transdirect insect cell)が開発された[4-23]. 我々の以前の研究から, 新たに開発されたこの無細胞タンパク質合成系は, N-ミリスチル化タンパク質の *in vitro* 代謝標識による検出に適していることが見出された[4-24]. 即ち, 免疫沈降等の精製処理を経ることなく短い期間で代謝標識によりタンパク質 N-ミリスチル化を検出できることが明らかとなった. また, 昆虫培養細胞溶解液中の NMT の基質特異性は, ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成系のものと極めて類似していることが示された[4-24]. このように, タンパク質 N-ミリスチル化を検出する手法として, この昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における代謝標識は簡便で効率の良い方法である. しかし, この方法にはまだ改良の余地が残されていた. 即ち, タンパク質 N-ミリスチル化の検出における放射性ミリスチン酸の利用は, RI の使用に伴うリスクとコスト上のデメリットを有しており, また実験結果を得るまでに時間のかかる過程であった.

近年, ケミカルバイオロジーの進展により, クリックケミストリーを利用した新たな方法がタンパク質脂質修飾研究に利用可能となった[4-8~4-10]. この方法では, 初めにタンパク質をアジド化あるいはアルキニル化した脂肪酸アナログで標識する (Fig. 4-1 A)[4-25~4-28]. その後, 対となるアルキン化あるいはアジド化した検出用試薬とクリック反応を行う. この方法の利点は, 従来の放射性標識法と比較して, 非放射性であることに加え, 検出に要する時間が短くしかも高い検出感度を持つことである. これまで, これらの方法は主に細胞での代謝標識に応用されてきたため, 上述した理由により, この手法では細胞または組織において発現した主要な非毒性タンパク質のみが検出されてきた. これらの事から, この手法は細胞または組織で発現したすべての N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定に応用することはできなかった.

本研究では, RI-標識基質を用いないタンパク質 N-ミリスチル化の無細胞系での検出法を確立するために, 無細胞タンパク質合成系においてアジド化したミリスチン酸アナログを用いて代謝標識を行った. ビオチンタグとの CuAAC 反応後, タグ付加タンパク質を SDS-PAGE で分離し PVDF 膜へ転写し, ストレプトアビジン-HRP と反応後 ECL によりタンパク質 N-ミリスチル化を検出した. その結果, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における Az-Myr を用いた代謝標識とその後の Alk-biotin との CuAAC 反応は無細胞でのタンパク質 N-ミリスチル化検出に最も効果的な方法であることが分かった.

Fig. 4-2 A に示したように, 培養細胞では, タンパク質 N-ミリスチル化の検出において 2 つのミリスチン酸アナログ, Az-Myr および Alk-Myr はいずれも同様に有用であった. 一方, 昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系では, 培養細胞と同じ代謝標識および CuAAC 反応条件下において Az-Myr のみがタンパク質 N-ミリスチル化の検出に利用可能であった (Fig. 4-2 B). 代謝標識および CuAAC 反応において, Alk-Myr および Az-biotin のそれぞれの濃度の最適化を試みたが, いずれの濃度においてもタンパク質 N-ミリスチル化を効率よく検出することはできなかった (Fig. 4-3). なぜ昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質 N-ミリスチル化の検出に Alk-Myr は適さず, Az-Myr

が適するのかは不明である。これら 2 つのミリスチン酸アナログの代謝上の挙動の差がタンパク質 N-ミリスチル検出効率の差に関与するのかもしれない。実際、アジド基は生体内に全く存在せず[4-29]、細胞内で並外れた安定性を示すことが知られている。一方、肝臓のように特に代謝的活性が高い組織ではアルキンは酵素により還元される傾向があることが知られている[4-30]。

本研究で新たに開発した検出法が 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应用可能であるか否かを明らかにするために、4 つの候補 cDNA クローンを用いてタンパク質 N-ミリスチル化感受性を評価した。その結果、3 つの cDNA クローン産物が新規 N-ミリスチル化タンパク質であることが見出された(Fig. 4-6 B)。遺伝子導入 HEK293T 細胞における³H]ミリスチン酸を用いた代謝標識においても同様の結果が得られた。これらの結果は、本手法が細胞で生じるタンパク質 N-ミリスチル化の検出において信頼のおける方法であることを示している。これらのタンパク質に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の生理的役割に関して検討したところ、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(Fig. 4-7F)。PLEKHN1 は機能未知のタンパク質である。したがって、タンパク質 N-ミリスチル化を介した、このタンパク質の膜結合の役割は不明である。もう一つのタンパク質、STK32A はセリン/トレオニンタンパク質リン酸化酵素である。このタンパク質に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化は、膜結合性の基質タンパク質を特異的にリン酸化するための分子機構として機能している可能性が考えられる。

これら一連の研究結果から、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるアジドミリスチン酸アナログを用いた代謝標識とそれに続くアルキン化ビオチンの CuAAC 反応による付加は、タンパク質 N-ミリスチル化が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効率的な同定法であると結論できる。

4-5 文献

- 4-1. Spiegel AM, Backlund PS, Jr., Butrynski JE, Jones TL, Simonds WF. (1991) The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci.* 16(9):338-41.
- 4-2. Boutin JA. (1997) Myristoylation. *Cellular signalling.* 9(1):15-35.
- 4-3. Resh MD. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1451(1):1-16.
- 4-4. Farazi TA, Waksman G, Gordon JI. (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem.* 276(43):39501-4.
- 4-5. Resh MD. (2006) Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol.* 2(11):584-90.
- 4-6. Matsubara M, Nakatsu T, Kato H, Taniguchi H. (2004) Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Embo j.* 23(4):712-8.
- 4-7. Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, Bertozzi CR. (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(1):19-24.
- 4-8. Saxon E, Bertozzi CR. (2000) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* 287(5460):2007-10.
- 4-9. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 41(14):2596-9.
- 4-10. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry.* 67(9):3057-64.
- 4-11. Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Eisenhaber F. (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J Mol Biol.* 317(4):523-40.
- 4-12. Bologna G, Yvon C, Duvaud S, Veuthey AL. (2004) N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics.* 4(6):1626-32.
- 4-13. Utsumi T, Sakurai N, Nakano K, Ishisaka R. (2003) C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Letters.* 539(1-3):37-44.
- 4-14. Sakurai N, Utsumi T. (2006) Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *J Biol Chem.* 281(20):14288-95.

- 4-15. Utsumi T, Sato M, Nakano K, Takemura D, Iwata H, Ishisaka R. (2001) Amino acid residue penultimate to the amino-terminal gly residue strongly affects two cotranslational protein modifications, N-myristoylation and N-acetylation. *J Biol Chem.* 276(13):10505-13.
- 4-16. Cheng TM, Mao SJ, Lai ST, Chang CC, Yang MC, Chen NC, et al. (2011) Haemoglobin-induced oxidative stress is associated with both endogenous peroxidase activity and H₂O₂ generation from polyunsaturated fatty acids. *Free radical research.* 45(3):303-16.
- 4-17. Utsumi T, Ohta H, Kayano Y, Sakurai N, Ozoe Y. (2005) The N-terminus of B96Bom, a *Bombyx mori* G-protein-coupled receptor, is N-myristoylated and translocated across the membrane. *FEBS J.* 272(2):472-81.
- 4-18. Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. (2002) A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(23):14652-7.
- 4-19. Jackson RJ, Hunt T. (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods in enzymology.* 96:50-74.
- 4-20. Deichaite I, Casson LP, Ling HP, Resh MD. (1988) In vitro synthesis of pp60v-src: myristylation in a cell-free system. *Mol Cell Biol.* 8(10):4295-301.
- 4-21. Towler DA, Adams SP, Eubanks SR, Towery DS, Jackson-Machelski E, Glaser L, et al. (1988) Myristoyl CoA:protein N-myristoyltransferase activities from rat liver and yeast possess overlapping yet distinct peptide substrate specificities. *J Biol Chem.* 263(4):1784-90.
- 4-22. Rocque WJ, McWherter CA, Wood DC, Gordon JI. (1993) A comparative analysis of the kinetic mechanism and peptide substrate specificity of human and *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *J Biol Chem.* 268(14):9964-71.
- 4-23. Suzuki T, Ito M, Ezure T, Kobayashi S, Shikata M, Tanimizu K, et al. (2006) Performance of expression vector, pTD1, in insect cell-free translation system. *J Biosci Bioeng.* 102(1):69-71.
- 4-24. Sakurai N, Moriya K, Suzuki T, Sofuku K, Mochiki H, Nishimura O, et al. (2007) Detection of co- and posttranslational protein N-myristoylation by metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system. *Anal Biochem.* 362(2):236-44.
- 4-25. Heal WP, Wickramasinghe SR, Leatherbarrow RJ, Tate EW. (2008) N-Myristoyl transferase-mediated protein labelling in vivo. *Org Biomol Chem.* 6(13):2308-15.
- 4-26. Martin DD, Vilas GL, Prescher JA, Rajaiah G, Falck JR, Bertozzi CR, et al. (2008) Rapid detection, discovery, and identification of post-translationally myristoylated

proteins during apoptosis using a bio-orthogonal azidomyristate analog. *FASEB J.* 22(3):797-806.

- 4-27. Charron G, Zhang MM, Yount JS, Wilson J, Raghavan AS, Shamir E, et al. (2009) Robust fluorescent detection of protein fatty-acylation with chemical reporters. *J Am Chem Soc.* 131(13):4967-75.
- 4-28. Martin BR, Cravatt BF. (2009) Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nat Methods.* 6(2):135-8.
- 4-29. Griffin RJ. (1994) The medicinal chemistry of the azido group. *Progress in medicinal chemistry.* 31:121-232.
- 4-30. Kitamura S, Kohno Y, Okamoto Y, Takeshita M, Ohta S. (2002) Reductive metabolism of an alpha,beta-ketoalkyne, 4-phenyl-3-butyn-2-one, by rat liver preparations. *Drug Metab Dispos.* 30(4):414-20.

第5章 総括

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おり、これまでに 400 以上の異なるタンパク質修飾が同定されている。なかでもタンパク質の脂質修飾は、脂肪酸、イソプレノイド、リン脂質といった脂質がタンパク質に共有結合で付加するタンパク質修飾であり、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。このうちタンパク質 N-ミリスチル化が生じるためには、タンパク質の N-末端の Met-Gly が必須であり、N 末端の 8 ~ 9 アミノ酸から成る N-ミリスチル化シグナルと呼ばれるコンセンサス配列が存在する。タンパク質の N 末端配列からタンパク質 N-ミリスチル化を予測するプログラムも開発されているが、その信頼性は必ずしも高くなく、細胞内で実際に N-ミリスチル化が生じるか否かについては実験による確認が必要とされる。従来の N-ミリスチル化タンパク質の検出法は質量分析または RI 標識基質を用いた代謝標識によるものであり、質量分析装置や RI 実験施設の使用が必要であることから、実際に N-ミリスチルの検出を行うことができる研究者はごく一部に限られていた。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、特にアジドとアルキンの間の付加環化反応を利用したクリックケミストリーと呼ばれる反応を利用した検出法の開発であった。

これらの検出技術の発達に伴い、新たな N-ミリスチル化タンパク質が相次いで報告されているが、それぞれのタンパク質における N-ミリスチル化の機能の多くは未解析のまま残されている。また、ケミカルバイオロジーの応用により、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。そこで、ヒトゲノム全体を対象とした N-ミリスチル化タンパク質の網羅的な解析のためには、ゲノム全体をカバーする cDNA リソースを利用すればよいと考えられる。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。しかし、この手法にはまだ多くの改善の余地があり、また新たに見出された N-ミリスチル化タンパク質の機能解析も殆ど進んでいないのが現状であった。

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うとともに、その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。以下に得られた結果を概説する。

5.1 小胞体膜タンパク protein Lunapark に生ずるタンパク質 N-ミリストイル化の解析

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よりこれまでに我々の研究で新たに見出された N-ミリストイル化タンパク質のなかに、そのアミノ酸配列から膜貫通領域を持つと予測されるものが含まれていた。通常、細胞質タンパク質で起こるタンパク質 N-ミリストイル化の主な役割はタンパク質を膜へ結合させることであるが、膜貫通タンパク質は膜への局在に脂質修飾を必要としない。そのため、膜貫通タンパク質に起こるタンパク質 N-ミリストイル化は、細胞質タンパク質に起こるそれとは異なる機能を持つと考えられた。

そこで、これまでに見出した新規ヒト N-ミリストイル化タンパク質の中から膜貫通領域を持つと予測された4つのタンパク質を解析した。その結果、小胞体の網目状構造形成への関与が最近見出された酵母タンパク質 Lnplp のヒトオルソログである protein Lunapark が、N-ミリストイル化された2回膜貫通タンパク質であることが明らかになった。protein Lunapark 中に存在する2つの推定膜貫通領域の役割を検討した結果、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機能し、これらにより N 末端および C 末端をいずれも細胞質に向けた N-cyto/C-cyto 配向性を持つ2回膜貫通タンパク質を生成させることが明らかとなった。また、protein Lunapark の膜への組み込み、膜上トポロジー形成、細胞内局在、生理的機能における protein Lunapark に生じるタンパク質 N-ミリストイル化の役割について検討を行った結果、タンパク質 N-ミリストイル化は protein Lunapark の膜通過、膜上トポロジー形成、細胞内局在に影響しないことが分かった。しかし、興味深いことに、免疫蛍光染色の結果から、過剰発現した protein Lunapark は ER 周辺部に局在し、大きな多角形のチューブ状構造の形成を誘導した。またこの現象は2位 Gly の Ala への置換によるタンパク質 N-ミリストイル化の阻害により顕著に抑制されることが明らかとなった。これらの結果はタンパク質 N-ミリストイル化が protein Lunapark の過剰発現で誘導される ER の形態変化に重要な役割を果たすことを示している。我々の知る限り、これらの結果は、ヒトの N-ミリストイル化された複数回膜タンパク質の膜通過、膜上トポロジー形成、細胞内局在および機能におけるタンパク質 N-ミリストイル化の役割を解明した初めての報告である。

5.2 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 リソースからのヒト N-ミリストイル化タンパク質の同定

我々は、細胞を用いずヒト細胞内に存在している全 N-ミリストイル化タンパク質を同定する手法として、ヒトタンパク質の配列情報をもとに、無細胞タンパク質合成系を用いた代謝標識により試験管内で N-ミリストイル化を検出する手法を確立した。しかし、この手法では、N 末端 Met-Gly モチーフを持つ総ての cDNA について実験を行っていたため、試験した cDNA クローンからの N-ミリストイル化タンパク質の検出効率は低く、この点でこ

の手法には改善の余地が残されていた。そこで、N-ミリスチル化タンパク質の検出効率を上げる事を目的として、この無細胞タンパク質合成系を用いた代謝標識による手法と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マティクスによる手法とを組み合わせ、かずさDNA研究所から提供されている4,369個のヒトcDNA(Flexi ORF clones)のアミノ酸配列から新規ヒトN-ミリスチル化タンパク質の同定を試みた。

4,369個のヒトcDNAクローンのうち、N末端にN-ミリスチル化に必須なMet-Gly配列を持つ339個について2つのN-ミリスチル化予測プログラムを適用したところ、このうち90個が少なくともどちらかのプログラムによりN-ミリスチル化されると予測された。これらのcDNAクローンから、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53クローンを除き、37cDNAクローンをヒトN-ミリスチル化タンパク質候補として選択した。これらのタンパク質のN末端10アミノ酸をモデルタンパク質であるtActinのN末端10アミノ酸と置換した融合タンパク質cDNAのセットを構築し、それらのN-ミリスチル化を昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系における³H]ミリスチン酸標識により検討した結果、19個で効率良くN-ミリスチル化が生じることが示された。これらのサンプルについて全長cDNAを入手し、ヒト由来の培養細胞であるHEK293T細胞に遺伝子導入し³H]ミリスチン酸標識により細胞でのN-ミリスチル化を確認した結果、13個のcDNA産物(FBXL7, PPM1B, SAMM50, PLEKHN, AIFM3, C22orf42, STK32A, FAM131C, DRICH1, MCC1, HID1, P2RX5, STK32B)がヒトN-ミリスチル化タンパク質であることが分かった。これらのヒトN-ミリスチル化タンパク質には、タンパク質リン酸化酵素、E3ユビキチンリガーゼ関連タンパク質、ガン関連タンパク質、アポトーシス関連タンパク質など生理的に重要なタンパク質だけでなく、細胞機能において重要な役割を担うことが知られている膜貫通タンパク質が含まれていた。

このうちのひとつであるSAMM50はミトコンドリア外膜に存在するβバレル型膜タンパク質をミトコンドリア外膜に組み込むタンパク質複合体であるSAM複合体の主要構成成分であり、自身もβバレル型膜タンパク質である。SAMM50のタンパク質N-末端配列の種間相同性を調べたところ、N末端のN-ミリスチル化モチーフが脊椎動物において高く保存されていることが分かった。そこで、N-ミリスチル化を阻害したG2A変異体を作成しヒト細胞への遺伝子導入に伴う細胞内局在を検討したところ、野生型SAMM50では効率良くミトコンドリアへの局在が生じたのに対し、G2A変異体ではその多くが細胞質に局在した。このことから、SAMM50が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タンパク質に起こるN-ミリスチル化の同定に有用であることが示された。また、前章で明らかにした小胞体膜上で合成される膜タンパク質に生ずるN-ミリスチル化に加え、細胞質で合成された後、ミトコンドリア外膜に局在するβバレル型膜タンパク質にもN-ミリスチル化が生じ得るをことを初めて示す事に成功した。

5.3 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

ケミカルバイオロジーの手法を用いた N-ミリスチル化タンパク質の同定法の確立に伴い、特定の細胞が特定の条件下で発現する N-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定が可能となっている。しかし、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理論上不可能であることは明らかである。そこで、ヒトゲノム全体を対象とした N-ミリスチル化タンパク質の網羅的な解析のためには、ゲノム全体をカバーする cDNA リソースを利用すればよいと考えられる。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が、この手法にはまだ多くの改善の余地が残されていた。そこで、我々が確立した昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた N-ミリスチル化検出法にケミカルバイオロジーの手法を応用し、簡便で迅速な検出法の確立を行い、その手法を用いて新規 N-ミリスチル化タンパク質の同定を試みた。

2つのミリスチン酸アナログ, **Az-Myr** および **Alk-Myr** を用いて培養細胞あるいは昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系において代謝標識後、ケミカルバイオロジー反応の一つである銅触媒化での付加環化反応(CuAAC)により検出 tag であるビオチンを付加した。これを SDS-PAGE に供与し PVDF 膜へ転写後、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、培養細胞と同じ代謝標識および CuAAC 反応条件下において **Az-Myr** のみタンパク質 N-ミリスチル化検出に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。遺伝子導入 **HEK293T** 細胞における [³H]ミリスチン酸を用いた代謝標識においても同様の結果が得られた。このことから、この方法はインタクトな細胞で発現した N-ミリスチル化タンパク質の検出に非常に有用であると結論できる。

これらのタンパク質に生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の生理的役割に関して検討したところ、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。機能未知のタンパク質である **PLEKHN1** の N-ミリスチル化の役割は不明であるが、セリン/トレオニンタンパク質リン酸化酵素である **STK32A** では膜結合基質タンパク質の特異的リン酸化反応にタンパク質 N-ミリスチル化が寄与する可能性が示唆された。

以上より、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系におけるアジドミリスチン酸アナ

ログを用いた代謝標識と CuAAC 反応によるビオチン tag の付加は、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の RI-標識基質を用いない効果的な同定法であると結論した。

以上述べてきた結果を総合すると、我々が見出した新規 N-ミリスチル化タンパク質の中から、これまでほとんど見出されていなかった膜タンパク質に生ずる N-ミリスチル化の新たな機能が明らかとなった。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し、より効率的で簡便、迅速な検出法を確立することに成功した。

今後より多くの cDNA を含む cDNA リソースを対象として本研究と同様の解析が行われ、多くの新規 N-ミリスチル化タンパク質が同定され機能解析が進むことにより、ヒト細胞内で生ずるタンパク質 N-ミリスチル化の多彩な役割が明らかになるものと期待される。

学位論文の基礎となる論文リスト

- 1) Koko Moriya, Kei Nagatoshi, Yoshimi Noriyasu, Tsuyoshi Okamura, Emi Takamitsu, Takashi Suzuki, Toshihiko Utsumi
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.
PLoS ONE, **8**(11), e78235 (2013)

- 2) Emi Takamitsu, Kazuki Fukunaga, Yusuke Iio, Koko Moriya, Toshihiko Utsumi
Cell-free identification of novel N-myristoylated proteins from complementary DNA resources using bioorthogonal myristic acid analogues.
Analytical Biochemistry, **464**, 83–93 (2014)

- 3) Emi Takamitsu, Motoaki Otsuka, Tatsuki Haebara, Manami Yano, Kanako Matsuzaki, Hirotsugu Kobuchi, Koko Moriya, Toshihiko Utsumi
Identification of human N-myristoylated proteins from human complementary DNA resources by cell-free and cellular metabolic labeling analyses.
PLoS ONE, **10**(8), e0136360 (2015)

本学位論文の第 2 章は 1), 第 3 章は 3), 第 4 章は 2) の論文に基づいた。

要旨

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認するために、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。

Summary

Protein N-myristoylation is one of the predominant forms of lipid modification that occurs in a wide variety of viral and cellular proteins and known to play key roles in regulating various cellular structure and function. However, many N-myristoylated proteins remain to be identified because of the lack of systematic and comprehensive strategy to detect N-myristoylated proteins. Recent progress in chemical biology has made novel approaches available for the detection of N-myristoylated proteins expressed in cells by taking advantage of bioorthogonal reactions. However, it is well known that only a limited sets of genes are expressed in particular cells. Hence, these approaches may not be suitable for the comprehensive identification of human N-myristoylated proteins expressed in whole human cells or tissues. In our previous study, we found that the susceptibility of human cDNA clones from human cDNA resources to protein N-myristoylation could be evaluated by metabolic labeling of proteins expressed using an insect cell-free protein synthesis system and this strategy is useful for the identification of human N-myristoylated proteins. In this study, to improve the efficacy of this strategy, cell-free- and cellular metabolic labeling experiments were coupled with bioorthogonal reactions and bioinformatic prediction systems for protein N-myristoylation to generate novel strategy to identify physiologically important human N-myristoylated proteins from human cDNA resources. The results obtained are summarized as follows.

1) 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

N-myristoylation of eukaryotic cellular proteins has been recognized as a modification that occurs mainly on cytoplasmic proteins. In this study, we examined the membrane localization, membrane integration, and intracellular localization of four recently identified human N-myristoylated proteins with predicted transmembrane domains. As a result, it was found that protein Lunapark, the human ortholog of yeast protein Lnp1p that has recently been found to be involved in network formation of the endoplasmic reticulum (ER), is an N-myristoylated polytopic integral membrane protein. Analysis of tumor necrosis factor-fusion proteins with each of the two putative transmembrane domains and their flanking regions of protein Lunapark revealed that transmembrane domain 1 and 2 functioned as type II signal anchor sequence and stop transfer sequence, respectively, and together generated a double-spanning integral

membrane protein with an N-/C-terminal cytoplasmic orientation. Immunofluorescence staining of HEK293T cells transfected with a cDNA encoding protein Lunapark tagged with FLAG-tag at its C-terminus revealed that overexpressed protein Lunapark localized mainly to the peripheral ER and induced the formation of large polygonal tubular structures. Morphological changes in the ER induced by overexpressed protein Lunapark were significantly inhibited by the inhibition of protein N-myristoylation by means of replacing Gly2 with Ala. These results indicated that protein N-myristoylation plays a critical role in the ER morphological change induced by overexpression of protein Lunapark.

2) Identification of human N-myristoylated proteins from human complementary DNA resources by cell-free and cellular metabolic labeling analyses

To identify physiologically important human N-myristoylated proteins, 90 cDNA clones predicted to encode human N-myristoylated proteins were selected from a human cDNA resource (4,369 Kazusa ORFeome project human cDNA clones) by two bioinformatics N-myristoylation prediction systems, NMT-The MYR Predictor and Myristoylator. After database searches to exclude known human N-myristoylated proteins, 37 cDNA clones were selected as potential human N-myristoylated proteins. The susceptibility of these cDNA clones to protein N-myristoylation was first evaluated using fusion proteins in which the N terminal ten amino acid residues were fused to an epitope-tagged model protein. Then, protein N-myristoylation of the gene products of full-length cDNAs was evaluated by metabolic labeling experiments both in an insect cell-free protein synthesis system and in transfected human cells. As a result, the products of 13 cDNA clones (FBXL7, PPM1B, SAMM50, PLEKHN, AIFM3, C22orf42, STK32A, FAM131C, DRICH1, MCC1, HID1, P2RX5, STK32B) were found to be human N-myristoylated proteins. Analysis of the role of protein N-myristoylation on the intracellular localization of SAMM50, a mitochondrial outer membrane protein, revealed that protein N-myristoylation was required for proper targeting of SAMM50 to mitochondria. Thus, the strategy used in this study is useful for the identification of physiologically important human N-myristoylated proteins from human cDNA resources.

3) Cell-free identification of novel N-myristoylated proteins from complementary DNA resources using bioorthogonal myristic acid analogues

To establish a non-radioactive, cell-free detection system for protein N-myristoylation, metabolic labeling in a cell-free protein synthesis system using

bioorthogonal myristic acid analogues was performed. After Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) with a biotin tag, the tagged proteins were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and blotted on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, and then protein N-myristoylation was detected by enhanced chemiluminescence (ECL) using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin. The results showed that metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system using an azide analogue of myristic acid followed by CuAAC with alkynyl biotin was the most effective strategy for cell-free detection of protein N-myristoylation. To determine whether the newly developed detection method can be applied for the detection of novel N-myristoylated proteins from complementary DNA (cDNA) resources, four candidate cDNA clones were selected from a human cDNA resource and their susceptibility to protein N-myristoylation was evaluated using the newly developed strategy. As a result, the products of three cDNA clones were found to be novel N-myristoylated protein, and myristoylation-dependent specific intracellular localization was observed for two novel N-myristoylated proteins. Thus, the metabolic labeling in an insect cell-free protein synthesis system using bioorthogonal azide analogue of myristic acid was an effective strategy to identify novel N-myristoylated proteins from cDNA resources.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科教授 内海俊彦先生に心より感謝の意を表します。

本学位論文審査において、貴重な御指導と御助言を頂きました山口大学大学院医学系研究科教授 松井健二先生，同教授 宮田浩文先生，同教授 山田守先生，同准教授 薬師寿治先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、御討論ならびに御協力戴きました山口大学医学系研究科分子細胞生化学 守屋康子氏に感謝致します。また、木許真由美氏，松永由佳梨氏，山本卓生氏，岡村剛氏，乗安義実氏，福重大地氏，飯尾雄介氏，大石達也氏，二宮悠一氏，福永和貴氏，大塚基顕氏，南風原樹氏，林田真梨子氏，小玉彩加氏，矢野愛美氏，岩田春菜氏，原田美佳氏，古川翔子氏，松崎嘉奈子氏他，研究室学生の皆様の熱心な協力を得たことに感謝致します。

本研究を進めるにあたり、ここに名前を挙げられなかった多くの方々に支えて頂きました。今後は、本学で得た経験や知識を還元し、社会に貢献する人材となることを誓います。

最後に、共に博士号取得を志し、励ましあった夫、いつも心を照らしてくれた娘の千聡，支えてくれた両親に感謝致します。