

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770234

研究課題名(和文) 真核細胞の細胞周期・細胞小器官特異的プロテオーム解析

研究課題名(英文) Cell cycle and organelle specific proteomic analysis of eukaryotic cell

研究代表者

吉田 昌樹 (YOSHIDA, Masaki)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：10449308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：単細胞紅藻Cyanidioschyzon merolae(シゾン)において、キネシン様タンパク質「TOP」が葉緑体およびミトコンドリアの分裂装置複合体に含まれ、オルガネラの分裂を制御していることを明らかにした。また葉緑体・ミトコンドリアに続いて第三の分裂装置をペルオキシソームから発見し、その分裂機構を解明した。さらに、タンパク質の機能解析に関連して、シゾンにおける遺伝子ターゲティングの手法を確立した。この技術により、プロテオミクスで見出された任意のタンパク質をコードする遺伝子の破壊・置換が容易に行えるようになった。これらのデータ処理に用いた解析技術に関しては特許を取得した。

研究成果の概要(英文)：We identified novel kinesin-like protein named TOP from unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae. It was revealed that TOP composes a dividing machinery of both chloroplast and mitochondrion and regulates organelle division process. In addition, we discovered the third dividing machinery from the peroxisome of C. merolae and clarified the working mechanism of the machinery. We have established a reliable and reproducible method for gene targeting in C. merolae. Our method will be applicable to the manipulation of genes targeted based on proteomic analysis, i.e. gene disruption and replacement. Technology of data analysis method used in the studies above has been patented.

研究分野：構造生物学

キーワード：細胞分裂 分裂装置 細胞小器官

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物は細胞の中に様々な細胞小器官を持ち、それらを構成するタンパク質など多くの生体分子が細胞周期の遷移とともに変化しながら、生命活動を支えている。このような細胞中の生体分子の動態を捉える試みは数多くなされている。例えば蛍光染色によって特定のタンパク質を可視化して視覚的に追跡し、あるいはマイクロアレイなどの分子遺伝学的技術を用い、遺伝子の発現量を数値化して統計的に変化を見出すなどの手法がある。これらの技術はそれぞれに得手不得手があり、適宜組み合わせることで生命現象の理解が進められてきた。このような従来技術に対し、申請者らは質量分析装置を用いたプロテオミクスによって細胞内のタンパク質の変化を網羅的に捉える新たな手法に想到したため、これを実践すべく本申請に至った。

(2) 申請者らが研究材料として選んだ単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾン) は、非常にシンプルな細胞構造のモデル生物であり、研究の遂行に都合の良い多くの特徴を備えている。1978年にイタリアの温泉で発見されたシゾンは、植物としては高温の 42℃ を至適生育温度に持つ温泉藻である (De Luca et al. 1978)。シゾンはその細胞内構造の単純さから、当初は専ら細胞生物学的な研究の材料として用いられていた。シゾンを用いた研究は、立教大学の黒岩常祥理学部特任教授を中心として進められてきた。1990年代から葉緑体やミトコンドリアの分裂装置が研究され続け、その普遍的な構造と機能に関する知見は今なお蓄積され続けている (Yoshida Y et al. 2010 他)。シゾンはまた、真核生物で初めて 100% のゲノムが解読された生物である。シゾンのゲノムプロジェクトは 2001 年に始動、その成果は 2004 年に発表され (Matsuzaki et al. 2004)、2007 年には全てのリボソーム DNA のコピーを含む完全なゲノムが公表された (Nozaki et al. 2007)。この完全なゲノム情報を利用して、細胞周期を通じた遺伝子発現状況のマイクロアレイ解析も行われている (Fujiwara et al. 2009)。さらにこれらの研究を支える基盤として、培養の容易さ、さらに光条件の制御のみで高度の同調培養が可能であるという特性を持つ (Suzuki et al. 1994)。同調培養により、細胞周期の任意のステージの細胞を大量に得ることができるのである。

(3) 以上のようにシゾンは細胞生物学的な技術および知見と、分子遺伝学的な情報基盤の双方が整った研究材料である。これらの利点は、細胞内の微細構造とゲノム情報とを結び付けた強力なアプローチを可能にする。立教大学の極限生命情報研究センターにおい

ては、単離した細胞小器官のプロテオーム解析 (Yagisawa et al. 2009、Yoshida M. et al. 2010) や、さらにその一部に対するプロテオーム解析も行われている (Yoshida Y. et al. 2010)。シゾンはゲノム配列中に少数のイントロン (全 5334 遺伝子中 27 遺伝子) しか含まないため、塩基配列とタンパク質との対応付けが容易であることも、プロテオミクスに有利に働く。申請者らはこれらシゾンの利点および知見を組み合わせて、真核細胞内におけるタンパク質の時間・空間的分布を網羅的に明らかにすることを計画した。

(4) シゾンは同調培養法および細胞小器官の単離技術が確立されているため、「特定の時期の特定の細胞小器官」という、他の生物では調製が非常に困難な画分を容易かつ大量に得ることができる。同調培養は薬物等の添加を行わず、光条件のみで制御が可能であることから、薬物自体による影響を排除して実験を行うことができる。

また完全なゲノム情報が提供されていることは、質量分析装置によるペプチドマスフィンガープリンティングの精度を向上させ、各画分に含まれるタンパク質の高精度の同定を可能にする。これは得られる情報の精度向上に貢献するだけでなく、時間やコストのかかる高次のタンデム質量分析を行う手間省けるなど、小規模で迅速な研究遂行にも有利に働く要素である。

(5) 引用文献

- De Luca et al. (1978) *Webbia* 33: 37-44.
- Fujiwara et al. (2010) *DNA Res.* 2009 16(1): 59-72.
- Nozaki et al. (2007) *BMC Biol.* 5: 28.
- Matsuzaki et al. (2004) *Nature*. 428(6983): 653-7.
- Suzuki et al. (1994) *Eur. J. Cell Biol.* 63: 280-8.
- Yagisawa et al. (2009) *Plant J.* 60(5): 882-93.
- Yoshida Y. et al. (2010) *Science*. 329(5994): 949-53.
- Yoshida M. et al. (2010) *Phycol. Res.* 58:, in press

2. 研究の目的

(1) シゾンにおいて、G1、S、G2、M 期における細胞の全タンパク質を質量分析装置によって同定し、その量的・質的变化を明らかにする。質量分析装置を用いて細胞内のタンパク質を直接分析することで、マイクロアレイのような転写解析よりも細胞の実態に即した情報を得ることができる。また葉緑体などの細胞小器官を単離して同様の解析を行い、G1、S、G2、M 期における細胞小器官内のタンパク質の変化をも捉える。既に単離技術が確立されている葉緑体の解析を最

低目標に定め、研究の進捗によってはミトコンドリアや油滴など他の細胞小器官の単離を行い、解析対象を順次拡大する。

(2) 本研究により、真核生物の細胞を構成する主要な成分であるタンパク質について、細胞周期を通じた変動や、細胞内における局在の概要が明らかとなる。これは従来多用されてきた転写レベルに基づく見積りよりも、実際の細胞の状態を反映した情報であることが期待される。また既知の転写レベルの情報と比較照合することによって、タンパク質のターンオーバーなどメタボローム的な情報を得ることもできる。

細胞小器官の細胞周期特異的プロテオーム解析は全く新規の試みであり、タンパク質が細胞質と細胞小器官を移動する状態など、これまで把握が困難であった情報を網羅的に得られると期待される。このような情報はヒトなど他の真核生物の研究にも波及する可能性がある。また産業上の利用可能性によっては、特許など知的財産権の確保につながることも期待される。

3. 研究の方法

(1) シゾンにおけるプロテオーム解析

細胞の同調培養：材料である単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の同調培養を行った。同調培養の方法は既に確立されており (Suzuki et al. 1994)、これに倣って行った。細胞は Imoto et al. (2010) を基準とし、特に分裂期の細胞に特異的なタンパク質に注目して研究を進めた。

同調培養で得られた各時期の細胞を可溶化し、SDS-PAGE によって分離精製し、トリプシンによるゲル内消化を行って抽出した。抽出液は nanoLC (島津製作所 Prominence) によってさらに分画し、LC 直結のスポットター (島津製作所 AccuSpot) によって MALDI サンプルプレートへスポットした。これを質量分析装置 (島津製作所 AXIMA-TOF2) にて解析した。得られたデータはデータベース検索ソフトウェア (MatrixScience 社 MASCOT) および自作の差分解析ソフトウェア (吉田ら、特許 5636614) を用いて処理し、ペプチドマスマフィンガープリンティング法を用いてタンパク質の同定を行った。

(2) 油滴関連タンパク質の解析

細胞小器官プロテオームの応用的展開の端緒として、海洋性のオイル産生藻類であるフェオダクチラム (*Phaeodactylum tricorutum*) およびオーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) の油滴関連タンパク質の解析も試みた。細胞小器官の単離はシゾンと同様、フレンチプレスによる物理破碎、界面活性剤処理、スクロースおよびパーコール密度勾配遠心法等を組み合わせで行った。

プロテオーム解析には LC/Q-TOF/MS (Agilent 6500 Q-TOF) を用いた。なおフェオダクチラムは既にゲノム情報が解読されており (Bowler et al. 2008)、ペプチドマスマフィンガープリンティング法が利用可能であったが、オーランチオキトリウムの当該株はゲノム情報が未解読であったため、沖縄科学技術大学院大学の協力によりゲノム解読も進めた。

(3) 引用文献

・Bowler et al. (2008) Nature 456, 239-44.
・Imoto et al. (2010) Protoplasma 241 (1-4), 63-74.

4. 研究成果

(1) シゾンに関する研究成果

分裂期の細胞のプロテオーム解析により、キネシン様タンパク質である TOP (Three-Organelle divisions inducing Protein) が葉緑体およびミトコンドリアの分裂装置複合体に含まれ、葉緑体・ミトコンドリア・細胞核の3つのオルガネラの分裂を制御していることを明らかにした (Yoshida Y. et al. 2013)。

また、葉緑体・ミトコンドリアに続いて第三の分裂装置をペルオキシソームから発見し、その分裂機構を解明した (Imoto et al. 2013)。ペルオキシソームは分裂期にダイナミン (Dnm1) ベースの分裂装置により分断され、娘細胞に継承されることが明らかとなった。我々はこの複合体を peroxisome-dividing ring (POD machinery) と命名した。これは細胞内共生に由来する細胞小器官以外では初となる分裂装置の報告であり、極めて重要な知見である。

さらにタンパク質の機能解析に関連して、シゾンにおける遺伝子ターゲティングの手法を確立し、PLoS ONE 誌に報告した (Fujiwara et al. 2013)。この技術により、プロテオミクスで見出された任意のタンパク質をコードする遺伝子の破壊・置換が容易に行えるようになった。

(2) 油滴関連タンパク質の解析

細胞小器官プロテオームの応用的展開を図るべく、フェオダクチラムおよびオーランチオキトリウムの油滴関連タンパク質の解析を行った。フェオダクチラムの定常期の細胞から油滴を単離し、そのプロテオーム解析を行った結果、NAD 依存性ヒドロゲナーゼや Rab6 ファミリータンパク質、Longin ファミリーの SNARE タンパク質など、ステロール合成や油滴小胞形成に関与すると思われるタンパク質が同定された。さらにプロテオームの手法を改良し、タンパク質の同定に LC/Q-TOF/MS を用いたところ、新たに複数の

タンパク質が油滴より見出された。解析対象のタンパク質が当初の予定より多く得られたため、今後の研究で解析対象とするタンパク質の絞り込みを行うべく、リアルタイムPCRによる発現確認を進めた。当該研究内容の中間とりまとめとして、藻類学会第37回大会(船橋大会)にて発表を行った(米田ら、2014)。

オーランチオキトリウムにおいてプロテオーム解析を進めるべく、沖縄科学技術大学院大学の協力を得て、プロテオミクスの基盤となるゲノム情報の解読に着手した。解読の結果、オーランチオキトリウムのスクアレン産生系統である NYH1 株のゲノムサイズは約41Mbpであることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Fujiwara T, Ohnuma M, Yoshida M, Kuroiwa T, Hirano T (2013) Gene Targeting in the Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*: Single- and Multi-Copy Insertion Using Authentic and Chimeric Selection Markers. PLoS ONE 8(9): e73608. 査読あり。doi: 10.1371/journal.pone.0073608

Imoto Y, Kuroiwa H, Yoshida Y, Ohnuma M, Fujiwara T, Yoshida M, Nishida K, Yagisawa F, Hirooka S, Miyagishima S, Misumi O, Kawano S, Kuroiwa T (2013) Single-membrane-bound peroxisome division revealed by isolation of dynamin-based machinery. Proc Natl Acad Sci USA 110(23):9583-8. 査読あり。doi: 10.1073/pnas.1303483110

Yoshida Y, Fujiwara T, Imoto Y, Yoshida M, Ohnuma M, Hirooka S, Misumi O, Kuroiwa H, Kato S, Matsunaga S, Kuroiwa T (2013) The kinesin-like protein TOP promotes Aurora localization and induces mitochondrial, chloroplast and nuclear division. J Cell Sci. 126(Pt 11):2392-400. 査読あり。doi: 10.1242/jcs.116798

[学会発表](計 2 件)

米田広平・吉田昌樹・鈴木石根・渡邊信「海産珪藻 *Phaeodactylum tricorutum* 油滴局在タンパク質に関する研究」日本藻類学会第37回大会、2014年3月15-16日、東邦大学習志野キャンパス(千葉県

船橋市)
YOSHIDA, Masaki "Squalene accumulation process of *Aurantiochytrium* sp. strain NYH1" 1st Korea-Japan Microalgae Symposium (KJMS2013) October 10Thu-12Sat, 2013 Multimedia Hall (1F) Dept. Chemical & Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, Korea 招待講演

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称:LC-MALDI で得られたデータの比較解析方法
発明者:吉田昌樹、吉田大和、黒岩常祥
権利者:同上
種類:特許
番号:PCT/JP2011/069885
出願年月日:2011年9月1日
国内外の別:国外

取得状況(計 1 件)

名称:LC-MALDI で得られたデータの比較解析方法
発明者:吉田昌樹、吉田大和、黒岩常祥
権利者:同上
種類:特許
番号:特許 5636614
出願年月日:2010年9月2日
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田昌樹(YOSHIDA, Masaki)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号:10449308