「ジスルフィドプロテオーム」による レドックス蛋白質の機能解析

矢野裕之*¹，田中宥司*¹，黒田 秧*^{1,2}

ジスルフィド結合の酸化還元による機能・活性制御（レドックス制御）は、生命現象において重要な役割を果たすと考えられている。しかし、アイソトープや特異的抗体により研究が飛躍的に進んだリン酸化研究に比較し、包括的な解析手法のなかったレドックス研究は、これまで遅れがちであった。筆者らは、最近、レドックス制御を1枚のゲル上で包括的に解析できる「ジスルフィドプロテオーム」を開発した。今後のレドックス研究の発展に寄与することが期待される。

ジスルフィド (S-S) 結合は、蛋白質のシステイン残基どうしの共有結合であり、1つの蛋白質分子内で起こるものと、別々の蛋白質分子間で起こるものとがある。ジスルフィド結合は「かすがい」のような役割で蛋白質の立体構造を安定化させるが、静的なものに限らず、動的な結合/切断により蛋白質の機能を活性化/不活化し、生物の重要な生理機能を制御する場合がある（レドックス制御, redox regulation）。レドックス制御は、蛋白質のリン酸化/脱リン酸化に並んで重要な制御機構であることが明らかになりつつあるが、アイソトープ P³² や

特異的な抗体を用いて発展したリン酸化反応の研究に対して、包括的な解析手段がなかったため、その研究は遅れがちであった。しかし、この制御機構の解明に大きな役割を果たす研究成果が近年報告されてきている。本稿では、最近筆者らが開発した、レドックス反応を1枚のゲル上で包括的に解析できる「ジスルフィドプロテオーム」^(1,2)を中心に、その原理と植物での応用例を併せて紹介する。

ジスルフィドプロテオームの原理

——チオレドキシンのターゲット解析

図1に酸化還元酵素チオレドキシンにより還元されるターゲット（標的蛋白質）を検出する場合の原理を示す⁽¹⁾。チオレドキシンは、微生物から高等植物、動物まで広く生物の重要なレドックス反応を制御すると考えられている。本酵素のターゲットを同定することで、チオレドキシンが制御する未知のレドックス反応を解明できると期待される。図1-Aでは、細胞抽出液にNADPH、チオレドキシンレダクターゼを含むチオレドキシン反応系を添加すると、*in vitro*でターゲットのジスルフィド結合が還元され、SH基が露出する。これに遊離のSH基と特異的に反応する蛍光プローブ（モノ

Functional Analysis of Redox Proteins by Disulfide Proteome
Hiroyuki YANO*¹, Hiroshi TANAKA*¹, Shigeru KURODA*^{1,2},
*¹ 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 中央農業総合研究センター北陸地域基盤研究部, *² 同研究機構 作物研究所

A. チオレドキシンによるターゲット蛋白質のS-S結合の選択的還元とmBBBrによる蛍光標識

B. 非還元/還元二次元電気泳動による分離

C. IEF/SDS二次元電気泳動による分離

図 1 ■ジスルフィドプロテオームの原理
とチオレドキシンのターゲットの同定
文献 1) より許可を得て転載。

ブロモビマン, mBBBr) を加え, ターゲットの SH 基を蛍光標識する様子を模式的に示す。B は, これを非還元/還元二次元電気泳動で分離したものである。右図のように, チオレドキシンの還元されたターゲットは蛍光標識され, ゲルの対角線上に泳動される。対照である左図と比較することで, チオレドキシンのターゲットを同定できる。この泳動法では, ターゲットが分子内または分子間のいずれのジスルフィド結合をもっていたかがわかる。汎用される IEF (等電点)/SDS 二次元電気泳動で分離した場合 (C) は, B に比べてスポットが分散するため, 解像度が高い。

図 2 は, 実際にピーナッツ種子でターゲットを同定した例である⁽¹⁾。対角線の上下にスポットが検出されることから, 分子内, 分子間ジスルフィド結合をもつ蛋白質が多く含まれていることがわかる (上段-A)。一方, 還元剤ジチオスレイトール (DTT) で処理すると, 理論上すべての蛋白質のジスルフィド結合が切断され, 蛋白

質が対角線上に集まる (B)。また, すべての SH 基が mBBBr と反応するため, 蛍光強度も高い。チオレドキシンのターゲットであることを明らかにした。さらに, 種子が登熟し乾燥する際に合成され, ジスルフィド結合した状態で種子を乾燥から守り, 発芽の際にはチオレドキシンのターゲットであることを明らかにした。さらに, 種子が登熟し乾燥する際に合成され, ジスルフィド結合した状態で種子を乾燥から守り, 発芽の際にはチオレドキシンのターゲットであることを明らかにした。

このうち 1 つは, 乾燥耐性をもつ植物 *Cratogeomys plantagineum* が特異的にもつと考えられていた乾燥関連蛋白質 (desiccation-related protein) のアミノ酸配列と相同性をもつものであった。この蛋白質は, *C. plantagineum* の葉が乾燥する際に合成され, 再び水を得たときに消失することが報告されている⁽³⁾。筆者らは, この蛋白質がジスルフィド結合をもち, チオレドキシンのターゲットであることを明らかにした。さらに, 種子が登熟し乾燥する際に合成され, ジスルフィド結合した状態で種子を乾燥から守り, 発芽の際にはチオレドキシンのターゲットであることを明らかにした。さらに, 種子が登熟し乾燥する際に合成され, ジスルフィド結合した状態で種子を乾燥から守り, 発芽の際にはチオレドキシンのターゲットであることを明らかにした。

図2 ■チオレドキシンのターゲット解析例

ピーナッツ種子でターゲットを同定した。矢印は主要なターゲットを示す。Trx:チオレドキシシン, DTT:ジチオスレイトール。文献1)より許可を得て転載。

フィド結合は蛋白質を折りたたみ(フォールディング)、酵素分解を受けにくくするとされている。したがってチオレドキシシンは、ターゲットをアンフォールドすることで消化酵素への感受性を高め、寿命を制御すると考えられる。

以上のように、ジスルフィドプロテオームを用いることによって、蛋白質混合物の中で*in vivo*や*in vitro*でレドックス変化を受けたものだけを同定することができ、さらにそのターゲットの機能を推定することができる。また、グルタレドキシシンやグルタチオンによる還元反応、酸化反応にも応用できる。

一方、まったく異なる原理でチオレドキシンのターゲットを同定する手法が開発されている(図3)。チオレドキシシンは、ターゲットを還元する際、不安定な反応中間複合体を生じると考えられている。Verdoucqら^(4,5)は、チオレドキシシンの活性中心である2つのシステイン残基のうち、1つをセリン残基に置き換えることでこの複合体を安定化させ、さらにポリヒスチジンを付加して

用語解説

非還元/還元二次元電気泳動: まず、一次元目のSDS-PAGEをメルカプトエタノールやDTTなどの還元剤で処理しない非還元状態で行ない、ゲルを切り出した後、還元剤で処理し、さらに二次元目の泳動を行なう。ジスルフィド結合をもたない蛋白質は、一次元目と二次元目で泳動距離が同じなので、対角線上に泳動される。分子間ジスルフィド蛋白質は、還元後には各サブユニットに分かれて低分子化するため、二次元目で泳動距離が長くなり対角線の下側に泳動される。一方、分子内ジスルフィド蛋白質はコンパクトな構造になる場合が多く、非還元状態では見かけ上は低分子として泳動する。還元後は、大きさが回復するため、対角線の上側に泳動されることが多い。

おくことで、ニッケルカラム上での単離を可能とした。Motohashiら⁽⁶⁾は、この変異体チオレドキシシンをカラムに固定することでターゲットを捕捉し、少量しか存在しない場合の濃縮も可能にしている。

ここまで述べてきたように、チオレドキシシンのターゲットの包括的な手法を開発することにより、これまで研究が遅れがちであったレドックス制御機構を解明するためのブレークスルーとなることが期待される。

In vivo レドックス反応の解析

さて次に、前述したジスルフィドプロテオームを用いて、種子の貯蔵蛋白質の分解機構を解析した例を紹介する⁽⁷⁾。

植物種子の貯蔵蛋白質は、合成される際に分子内や分子間に多数のジスルフィド結合が形成され、休眠時にはコンパクトな構造をとることにより、効率よく貯蔵器官であるプロテインボディに収納されている。発芽の際には、これをアミノ酸レベルまで速やかに分解し、葉や根を形成する蛋白質に合成し直す必要がある。このとき一般的に貯蔵蛋白質は、異なった酵素による二段階の消化を受けることが報告されている。すなわち、大きな断片に断片する“ぶつ切り”と、その後細かく刻む“細切り”である。ジスルフィド架橋によるフォールディングがあれば、酵素消化されにくいはずであるが、これまで貯蔵蛋白質が消化される過程でのジスルフィド架橋の状態については詳しく研究されていなかった。詳細な解析データは割愛するが、筆者らは、ジスルフィドプロテオームを用いた解析により、種子の発芽においてグルテリンが酵素消化とジスルフィドの還元の両者のコンビネーションによって効率的な分解を受けることを明らかにした(図4)。

図 3 ■ 変異体チオレドキシンの用いたターゲットの捕捉
文献 5) より許可を得て転載。

まず、分子内・分子間ジスルフィド結合を保持したまま、酸性サブユニットが分断される。続いて、両ジスルフィド結合が還元される。最後に、細切れ酵素が働き、アミノ酸レベルの低分子に分解される。こうした段階的な反応を経ることで、貯蔵蛋白質のプロテインボディでのコンパクトな収納と発芽時の速やかな消化を両立させていると考えられる。以上のように、ジスルフィドプロテオームはレドックス変化と蛋白質の量的変化を同時に解析できるため、*in vivo* で起こる反応の解明にも役立つと言える。

ジスルフィド結合とアレルギー性との関連

最近、ジスルフィド結合が複数の主要なアレルギーのアレルギー性発現に寄与することが報告されている。Sen ら⁽⁸⁾ は、*in vitro* でピーナッツのアレルギー Arah2 を消化酵素によって処理すると、分子量 1 万程度のそれ以上分解されない断片が残ること、またこの断片が IgE 結合性のエпитープを含んでおり、分子内ジスルフィド

結合によりコンパクトな構造になっていることを明らかにした。さらに、ジスルフィド結合の切断により、難消化性だった断片が容易に消化されることを示した。これらの知見は、分子内ジスルフィド結合により蛋白質の分解が阻害されることがあり、切れ残った断片が体内に吸収されることで抗原になる可能性があることを示唆している。

また筆者らは、蛋白質混合物の中からジスルフィド蛋白質だけを特異的に検出する手法を開発した⁽⁹⁾。これは、あらかじめ蛋白質の遊離のシステイン残基 (SH 基) を非蛍光性の修飾試薬でキャッピング (保護) し、次にジスルフィド結合を切断、新たに露出した SH 基だけを蛍光性の修飾試薬で標識することでジスルフィド結合をもつ蛋白質だけを選択的に蛍光標識するものである (図 5-A)。さらにこの手法をコメ⁽¹⁰⁾、花粉、ダニ⁽⁹⁾ に応用し (B)、既知の主要なアレルギー (B-a) やそれにアミノ酸配列相同性をもつ蛋白質 (B-b) を検出することができた。既知の蛋白質に相同性をもたない新規蛋白質も検出されている (B-c)。この結果は、ジスル

図 4 ■ グルテリン蛋白質の分解機構
文献 7) より許可を得て転載。

A. ジスルフィド蛋白質の選択的な蛍光標識法

B. アレルゲンへの応用例

図 5 ■ ジスルフィド蛋白質の選択的な蛍光標識法 (A) とコム、花粉、ダニでの応用例 (B)
文献 9), 10) より許可を得て転載。

フィド結合の形成とアレルゲン性の相関を裏づけるものである。今後、得られた知見を、新しいアレルゲンのスクリーニング技術の開発や、低アレルゲン化に応用したいと考えている。一方で、ジスルフィド結合をもつ蛋白質が必ずしもアレルゲンとは限らず、この結合が関係するアレルゲン性の発現の仕組みを詳細に解析したいと考えている。

*

モデル生物で全遺伝子構造の解明が進んでいる。これからは、得られた遺伝子情報を動的な生理機構の解明や産業にいかにより有効利用するかが重要な研究課題である。最近、「ジスルフィドデータベース」⁽¹¹⁾が開発され、アミノ酸配列相同性が低くても、一次構造上のシステイン残基の出現状態で同じ立体構造や機能をもつ蛋白質の検索ができるなど、レドックス制御への注目度はさらに高まりつつある。レドックスネットワークの解明に向けての研究は今後いっそう進展すると考えられる。ジスルフィドプロテオームは、動植物を問わず広く生物全般のレドックス機構の解明に応用できる。ポストゲノム研究の有効な手段として応用の幅を広げたい。なお、チオレドキシン酵素系は市販されており、ジスルフィドプロテオームは簡単に再現できる実験系である。ご興味をおもち

の方はぜひチャレンジしていただければ幸いである。

謝辞：本研究の一部は、科学技術振興事業団の長期在外若手研究員制度により、カリフォルニア大学 Bob Buchanan 教授との共同研究として行なわれたものです。ご指導をいただいた同教授とプロテオミクス研究所の次田 皓所長に心から感謝いたします。また本研究は、農林水産省イネゲノムプロジェクト (PR 4207) および科学研究費補助金 (基盤 C 16510151) により継続して研究を行なっています。

文献

- 1) H. Yano, J.H. Wong, Y.M. Lee, M.J. Cho & B.B. Buchanan : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4794 (2001).
- 2) H. Yano, S. Kuroda & B.B. Buchanan : *Proteomics*, **2**, 1090 (2002).
- 3) D. Piatkowski, K. Schneider, F. Salamini & D. Bartels : *Plant Physiol.*, **94**, 1682 (1990).
- 4) L. Verdoucq, F. Vignols, J.-P. Jacquot, Y. Chartier & Y. Meyer : *J. Biol. Chem.*, **274**, 19714 (1999).
- 5) Y. Meyer, L. Verdoucq & F. Vignols : *Trends Plant Sci.*, **4**, 388 (1999).
- 6) K. Motohashi, A. Kondoh, M.T. Stumpp & T. Hisabori : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11224 (2001).
- 7) H. Yano, J.H. Wong, M.J. Cho & B.B. Buchanan : *Plant Cell Physiol.*, **42**, 879 (2001).
- 8) M. Sen, R. Kopper, L. Pons, E.C. Abraham, A.W. Burks & G.A. Bannon : *J. Immunol.*, **169**, 882 (2002).
- 9) H. Yano : *Anal. Chem.*, **75**, 4682 (2003).
- 10) H. Yano & S. Kuroda : *Cereal Chem.*, **80**, 172 (2003).
- 11) H.W.T. van Vlijmen, A. Gupta, L.S. Narasimhan & J. Singh : *J. Mol. Biol.*, **335**, 1083 (2004).

お知らせ

うま味研究助成公募のご案内

分野：食品科学，調理科学，生理学，生化学，栄養学，心理学など

対象：①研究テーマが“食”“味”“おいしさ”に関するもの。
②研究の視点，方法が独創的なものであり，その成果が「うま味の本質」「おいしさにおけるうま味の役割」という課題に対し新しい科学的知見を加え，食に関する学際的研究の発展に貢献することが期待できるもの。

期間：平成 17 年 1 月 1 日から 2 年間

助成額：1 件あたり総額 100 万円程度を基準としますが，最終的には研究の具体的内容，規模などに応じて決定します。

申込：指定の申請書に必要事項を記入の上，うま味研究会事務局に送付（申請書は当研究会ホームページ <http://www.srut.org>

www.srut.org からダウンロード，または下記事務局宛てご請求ください）

締切：平成 16 年 10 月 29 日（金）

選考方法，選考結果の報告：うま味研究会の学識経験者による選考委員会で厳正に審査し決定します（予定 11 月下旬）。選考結果は各応募者に直接通知します。

問合せ先：〒104-8315 東京都中央区京橋 1-15-1 うま味研究会事務局

TEL：03-5250-8184，FAX：03-5250-8403

E-mail: umami@srut.org

URL: <http://www.srut.org>