

研究題目 ウイルス感染防御を担う新規翻訳後修飾のターゲット探索

研究組織

研究代表者：岡崎朋彦（北海道大学遺伝子病制御研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

全タンパク質のおよそ3割を占める膜タンパク質の機能発現は、細胞内で正しいオルガネラ膜上に挿入・輸送されることが基盤となる。ところが、研究代表者らは、近年、ウイルス感染依存的に局在が変化する膜タンパク質を見出しており、さらには、この局在変化がウイルス感染への防御機構の一端を担うことを明らかにしてきた（岡崎ら，未発表）。研究代表者らは、これまでに幾つかのタンパク質がウイルス感染下にてこのような局在変化を伴うことを見出しているが、網羅的な探索は行われておらず、ウイルス感染下での局在変化が個々のタンパク質に限ったイベントなのか、あるいは、多くのタンパク質がこのような挙動をするのか、その全容は全く不明であった。ほとんどの膜タンパク質は翻訳と同時にまず、小胞体（ER）へ挿入され、そこから、適切なオルガネラ・細胞表面へと輸送される。「ウイルス感染下では、ERへの膜挿入機構が通常時とは異なるのではないか」という研究代表者らの独自の仮説に基づき、本研究課題ではまず、ウイルス感染下において、ERへの膜挿入が変化するタンパク質の網羅的探索を行う。これにより、ウイルス感染への細胞の防御応答の包括的な理解を得る。

さらに、これまでに個別に見出してきた、ウイルス感染依存的に局在変化するいくつかの膜タンパク質のうち、翻訳後修飾酵素に着目する。翻訳後修飾の局在変化は、その修飾ターゲットが一斉にスイッチすることになり、細胞内で大きなインパクトになると考えられる。そのうちの1つである FICD (FIC domain-containing protein)は、小胞体膜に局在する AMP 化・脱 AMP 化酵素であり、ほぼ全ての動物で保存されている。FICD の酵素活性部位は小胞体内腔にあり、これまでに知られている主なターゲットは小

胞体内局在シャペロン分子 BIP であると長い間考えられてきた。その一方で、細胞抽出液を用いた AMP 付加タンパク質スクリーニングなどから細胞質局在のターゲットの存在も示唆されてはいたが、細胞内での AMP 付加酵素反応を標識する系が存在せず、本当に細胞質局在基質が存在するかは未解明であった。ごく最近、細胞膜透過性を高めた ATP 前駆体アナログ (pro-N6pA) を用いて、細胞内での酵素反応標識が可能な系が報告された。そこで、本研究では、この細胞内標識系を用いることで、ウイルス感染で局在変化した FICD による修飾ターゲットタンパク質の網羅的探索を行う。具体的には、pro-N6pA によって生細胞中で標識されたタンパク質に対して、抽出液中で Click 反応によってビオチン標識を行い、ストレプトアビジンビーズで回収し、on-bead トリプシン消化後に LC-MS/MS 解析を行う。これにより、ウイルス感染防御における AMP 化修飾の働きを調べるとともに、ウイルス感染時に FICD が局在変化する意義を明らかにする。

[1-2]研究の方法・経過

ウイルス感染依存的に、平常時の ER 膜挿入機構を経ないような膜タンパク質群を網羅的に探索するため、ビオチン付加酵素が ER 内腔内に局在する安定発現細胞株の作製を行った。この安定発現細胞株に対して、ウイルス感染模倣刺激を行い、刺激依存的なビオチン付加ペプチドのプロテオーム解析を行った。共同研究者によるラベルフリー定量解析を行うことにより、これまで独自の手法により個別に見出していた局在変化するタンパク質とは異なる新たなタンパク質候補群を得た。現在、この候補タンパク質群の中から、真に局在変化するタンパク質を検討しているところである。

さらに、FICD の修飾ターゲットの探索のた

め、細胞へ ATP 前駆体アナログを取り込ませた後で、細胞内で修飾された AMP 化修飾タンパク質を、細胞抽出液の状態で Click 反応によりビオチン化し、ビオチン化タンパク質をプロテオーム解析する予定であった。この解析に関しては、現在、研究分担者による ATP 前駆体アナログの合成、細胞へ投与の条件検討、細胞抽出液での Click 反応条件検討は完了した。今後、予定していた実験を実行する計画である。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

今年度のプロテオーム解析をラベルフリー定量解析を用いて統計解析した結果、ヒットしたペプチド数は 6060 個、タンパク質数は 774 個であった。ウイルス感染模倣刺激の前後で、ER 局在ではないタンパク質も標識されており、ウイルス感染時には、タンパク質の局在が変化する可能性を示唆する結果も得られた。現在、得られた候補群の中から、公開データベースを用いてタンパク質の局在、膜貫通ドメインの有無などから、ターゲット候補を絞り、実際に局在を変えるか、そして、局在変化がもたらす機能変化について解析を行っている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今回同定された候補タンパク質群の、ウイルス感染下での役割を明らかにし、さらには、機能欠損時の細胞の応答変化を調べることで、細胞が、ウイルス感染というストレス状況下において適応的に振舞う、その戦略について新たな理解が得られる。このような、ウイルス感染時の細胞の応答の分子基盤の解明は、医学・薬学分野への波及効果も大きい。新たな治療ストラテジーの提案が可能になる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今回の網羅的探索で見出してきた候補タン

パク質群から、個別に実験を行うことで、ウイルス感染時に、真に局在変化するようなタンパク質を同定する必要がある。

また、FICD のターゲット探索については、来年度、早急に行い、ウイルス感染下での FICD の局在変化の意義について明らかにする。