

研究題目 Arf6 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子に生じる翻訳後修飾の同定

研究組織

研究代表者：寺脇慎一（愛媛大学プロテオサイエンスセンター）

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

Cytohesin は、低分子量 G タンパク質 Arf6 を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である。その N 末端のコイルドコイル (CC) 領域は、標的タンパク質と結合して特定の細胞内領域への局在化を制御する機能領域であり、申請者の構造生物学的研究から CC 領域が翻訳後修飾されてオリゴマーを形成する可能性を見出している。本研究では、Cytohesin1 CC 領域 (Cyto1-CC) に生じる翻訳後修飾を質量分析によって同定して、新規な機能制御の分子機構の解明をおこなう。

[1-2] 研究の方法・経過

マウス由来 Cyto1-CC を大腸菌で発現させ、カラムクロマトグラフィーで精製した試料を用いて質量分析をおこない、修飾部位および化学修飾基の同定をおこなう。試料の分析は、① Intact MS、② Ion Mobility Mass Spectrometer (IM-MS)、③ 消化酵素による断片化試料の LC-MS の 3 つの手法を用いて分析をおこない、Cyto1-CC に生じる翻訳後修飾の同定を試みた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

まず初めに、Intact MS による質量分析をおこなうことで、Cyto1-CC の翻訳後修飾による分子量の変化量を分析した。その結果、Cyto1-CC の測定分子量は、理論値より -1 だけ減少した実測値として得られた。この結果に基づいて、Cyto1-CC に -1 の分子量変化を生じさせる翻訳後修飾をデータベース Unimod で検索したところ、リシン、グルタミン酸、アスパラギンのアミノ酸残基に生じる翻訳後修飾を候補として

見出すことができた。しかしながら、Cyto1-CC に生じる翻訳後修飾に起因する分子量変化が小さいため、より精密な分析が必要になることがわかった。

そこで、IM-MS と Cyto1-CC を消化酵素によって断片化した試料の LC-MS での分析をおこなった。IM-MS は、立体構造に依存した分離ができるため、同一分子量のペプチドでも分離が可能である。IM-MS において、Cyto1-CC のピークは 2 つに分離したことから、異なる構造的特徴を持つ分子が混在していることを示した。また、Cyto1-CC 消化断片の LC-MS においては、特定のアミノ酸残基に Intact MS 解析から示唆された翻訳後修飾が生じていることが確認された。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究で見出したマウス由来 Cyto1-CC の翻訳後修飾は、大腸菌内で生じたものであり、本来の宿主で生じたものではない。しかしながら、同定した翻訳後修飾は大腸菌とヒトを含む哺乳類動物でも共通に生じる化学修飾であることが確認できたことから、内在性の Cytohesin においても CC 領域に同様の翻訳後修飾が生じている可能性を見出すことができた。この成果に基づいて、Cytohesin の翻訳後修飾に依存した分子機能の制御や修飾酵素群の役割を解析することによって、Cytohesin を標的とした新規な創薬展開が期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

該当なし

[3-2] 学会発表

○足立裕美子、藤岡賢真、南出千尋、寺脇慎一、

Cytohesin1 のコイルドコイル領域を介した細胞局在制御の構造生物学的解析、第 96 回日本生化学会大会、2024 年 11 月、横浜（ポスター発表）

【4】今後の課題等

Cyt01-CC に生じる翻訳後修飾の機能的役割と修飾酵素の制御機構についての解析が必要である。