

報道関係各位

東京工業大学広報センター長

大谷 清

生体内のタンパク質の酸化還元状態を可視化

—DNA を着脱自在にした修飾化合物を利用して総合的分析を実現—

【要点】

- DNA をタンパク質の酸化還元状態を探るツールとして活用した新たな技術
- タンパク質の構造形成に重要なシステインの状態を探る新たな技術の開発
- DNA をタンパク質のシステインに着脱自在にした新規の修飾化合物

【概要】

東京工業大学資源化学研究所の久堀徹教授と原怜特任助教は、生体内のタンパク質の機能・構造に重要なシステイン（用語1）の状態を簡単かつ定量的に検出できる新ツール（標識化合物）「DNA-PC マレイミド」を開発した。この化合物を付加（修飾）したタンパク質を電気泳動（用語2）で調べると、明確な移動度の差が得られる。また紫外線でDNAを切断可能なため、抗体色素法（用語3）で、生体内のタンパク質の酸化還元状態などを可視化でき、タンパク質の状態解析の応用範囲を大きく広げることになる。

近年、生体内で働く酵素タンパク質の酸化還元状態が、その生理機能を決定する重要な因子となっている。特にタンパク質を構成するアミノ酸の一つであるシステインは、酸化還元の影響を受けやすく、かつタンパク質構造の決定に重要な分子内の共有結合の足場にもなっていることから、その状態を知ることがタンパク質機能やその調節を明らかにする上で重要な情報となっている。

久堀教授らは昨年、システインの状態を探るツールとして、DNA を化学修飾剤として用いる「DNA マレイミド」という化合物を開発した。この化合物は、還元状態のシステインにだけ反応してタンパク質の分子量を一定量変化させることができるので、変化量からシステインの状態を正確に知ることができる。しかし、DNA のような高分子が付いているため、抗体染色法には使えなかった。今回はこの欠点を紫外線照射によってDNA部分を容易に除去できる方法で解決し、抗体染色にも使用できるようにした。

●研究の背景

タンパク質分子を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、システインのチオール基 (SH 基、用語 4) は、酸化によってスルフェン (SOH) やスルフィン (SOOH) になる、グルタチオン化や S-ニトロソ化されるなど、生体内で様々な化学修飾を受けている。近年、タンパク質分子のシステインが受けるこのような化学修飾が、そのタンパク質の生理機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

また、システインのチオール基は適当な距離に二つ存在すると、酸化条件下でジスルフィド結合 (用語 5) という共有結合を形成し、これがそのタンパク質の立体構造を決定する重要な要因にもなっている (図 1)。システインの化学修飾やジスルフィド結合の形成は、生体内では生理条件下で起こっているため、この状態変化を知ることは、タンパク質の機能そのものや機能調節を理解する上で重要な情報である。

これまで、システインのチオール基の状態を探るツールとして、システインと特異的に反応するマレイミド (用語 6) をもつ化合物が用いられてきた。例えば、4-acetamido-4'-maleimidylstilbene (4-アセトアミド-4'-マレイミジルスチルベン=AMS) は、分子量 540 ほどでチオール基と特異的に反応し、タンパク質全体の分子量を約 500 大きくするので、この変化を電気泳動時のタンパク質の移動度変化として検出することが可能である。

しかし、分子量が 3 万を超えるタンパク質の場合には、タンパク質そのものの分子量に比べて移動度の変化の割合が小さすぎて検出が困難であった。この問題を克服するために、methoxypolyethylene glycol-maleimide (メトキシポリエチレングリコール・マレイミド=PEG マレイミド、通常使われるものは分子量約 5,000) が用いられるが、PEG 部分の化学的な性質の制約から、電気泳動時に付加した分子量に見合った移動度の変化を示さないので、移動度の変化量から反応したシステインの数を知ることができなかった。

AMS や PEG マレイミドのこれらの欠点を克服するために、久堀教授らは DNA を修飾剤として用いることにして、昨年、DNA マレイミドという化合物を開発した。使用したのは 24 塩基の一本鎖 DNA で、システインを修飾すると結合 DNA の数の分だけ電気泳動の移動度を変化させることができる。結合した DNA あたりの移動度変化が分かっているので、タンパク質分子の中で還元状態にあるシステインのチオール基を、電気泳動の移動度変化から逆算して簡単に見積もることができるようになった (図 2)。

●研究の経緯

久堀教授らが開発した DNA マレイミドは、簡便にタンパク質のチオール基の酸化還元状態を知ることのできるツールではあるが、高分子量の化合物をタンパク質に付加するために起こる特有の問題があった。それは、生体内のタンパク質の検出によく用いられる抗体染色法に利用できないことである。

抗体染色法は、電気泳動によって分離したタンパク質分子を、抗体染色法に用いるニトロセルロース膜などに電気泳動的に移動 (転写という) させてから、膜表面で目的タンパク質と抗体と反応させる。ところが、DNA のような高分子を付加したタンパク質は、この高分子部分がおそらく邪魔をしてタンパク質が抗体染色用の膜の方に移動していかないことが分かった。

そこで、DNA マレイミド分子の DNA 部分とチオール基修飾部分であるマレイミド部分の間に光開裂基を導入して、紫外線照射によってタンパク質のチオール基に結合した DNA が離脱するように工夫した。この新規に作成した化学修飾試薬を、光開裂型 (Photo-Cleavable) の頭文字を取って「DNA-PC マレイミド」と命名した。

●研究成果

DNA-PC マレイミドは、これまでの DNA マレイミドと同じようにタンパク質のチオール基を修飾し、分子量変化を与えることができる。一方で、電気泳動後にゲルを紫外線ランプの上に 10 分程度放置するだけで光開裂反応が起こり、DNA 部分がタンパク質から簡単に離脱する。タンパク質の電気泳動後にゲルを紫外線処理してから、抗体染色用の膜へのタンパク質の転写処理を行うと、DNA マレイミドで修飾していないタンパク質と同じ効率でタンパク質が抗体染色用の膜に転写するようになった。

実用例として、HeLa 細胞 (用語 7) を酸化剤、あるいは還元剤で処理した後に、細胞からタンパク質を抽出し、すみやかに DNA-PC マレイミドで化学修飾を施した。そして、抗体染色法を用いて特定のタンパク質の酸化還元状態を調べた。ここでは、分子内にシステインを 3 個持っているグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の状態変化を調べた。

細胞をジアミドによって酸化処理してから GAPDH の状態を見ると、酸化されたチオール基が 2 個となり、これを還元処理することですべて還元状態に戻ることがわかった。すなわち、ジアミドによる酸化処理で、GAPDH 分子にジスルフィド結合が形成されたことが分かる。

一方、細胞を過酸化水素で処理した場合には、酸化されたチオール基を 1 個もつタンパク質と 2 個もつタンパク質が得られた。これを還元処理したところ、2 個が酸化された状態のタンパク質のチオール基はすべて還元状態に戻ったが、1 個が酸化されたものでは、変化が見られなかった。すなわち、後者のチオール基はスルフィンのように容易には還元されない状態になっていることがわかった(図 3)。

また、抗体染色法はシグナル強度でタンパク質量も見積もることができるので、細胞内の GAPDH がどのくらいの割合でジスルフィド結合を形成したり、スルフィンに酸化されたりしているのかも見積もることが可能になった。

●今後の展開

近年、プロテオミクス技術 (用語 8)、および、質量分析法 (用語 9) が急速に進歩し、タンパク質の状態変化はその構成アミノ酸の状態変化として詳細に記述することができるようになってきた。しかし、網羅的な解析を行うためには、状態の変化が見られるタンパク質を迅速に検出するためのツールの開発が不可欠である。

今回、開発した DNA-PC マレイミドは、生体内のタンパク質の機能・構造に重要なシステインの側鎖・チオール基の状態を簡単に、かつ、定量的に検出できるツールであり、応用範囲は極めて広い。この方法で検出したチオール基の変化は、さらに質量分析法によって個々のアミノ酸レベルでの変化の解析に用いるための重要な情報となるはずであり、細胞内のタンパク質の酸化還元状態を網羅的に解析するレドックス・プロテオミクス (用語 10) の重要なツールのひとつとなるものと

期待される。

久堀教授らが開発した DNA-マレイミド、および、DNA-PC マレイミドは特許化し、12月に株式会社同仁化学研究所から発売される予定である。

本研究は、久堀教授が代表を務める科学技術振興機構（JST）CREST「ハイパーシアノバクテリアの光合成を利用した含窒素化合物生産技術の開発」、および、附置研究所間アライアンスによる「ナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト」の支援を受けて実施した。

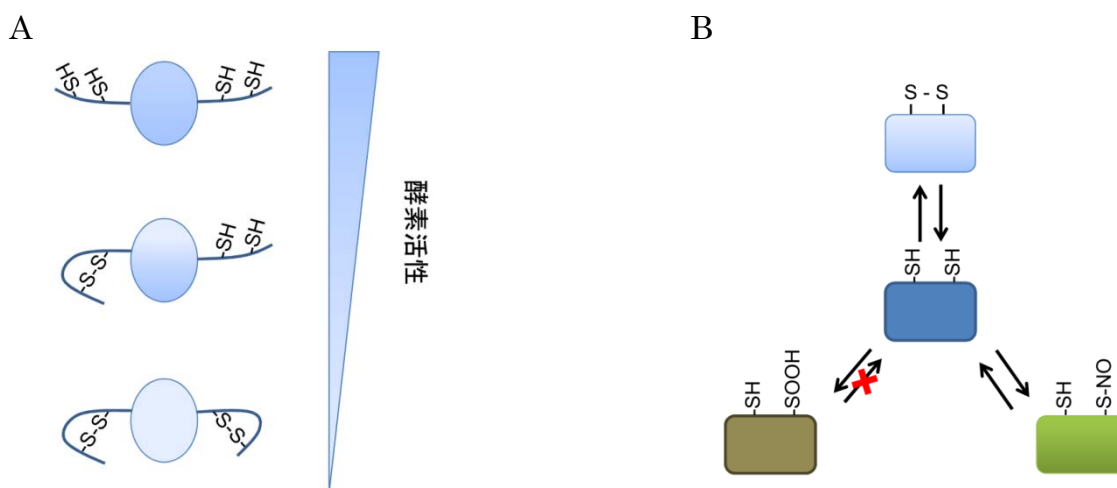


図1. タンパク質のチオール基の酸化還元と機能制御

ジスルフィド結合の数によって酵素活性が調節されるタンパク質(A)や、酸化の種類によって酵素の機能が変化するタンパク質(B)がある。酸化されたチオール基の数や、その可逆性を知ることは、酵素の酸化還元制御を理解するうえで重要な情報である。

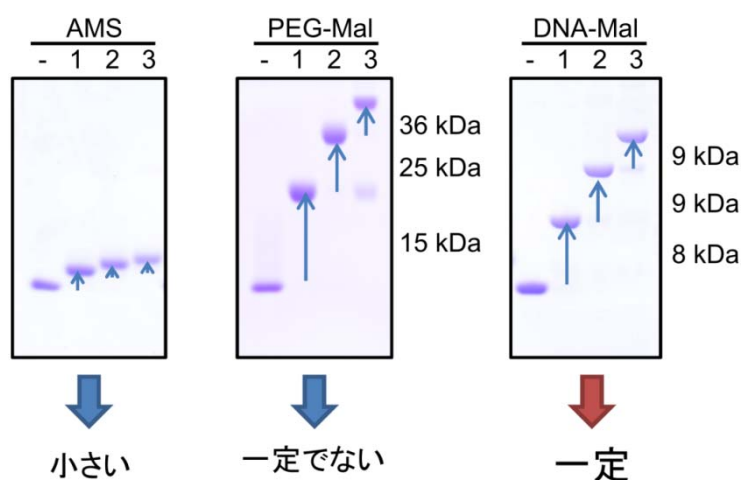


図2. タンパク質のチオール基の修飾による電気泳動の移動度変化

同じタンパク質に、異なる数のマレイミドで修飾し電気泳動の移動度変化を比較した。AMS(左)は移動度変化が小さすぎる。PEG-Mal(中)の場合は、結合数によって移動度変化が異なる。そのため、チオール基の数の決定には向かない。DNA-Mal(右)は、適度で一定な移動度変化であるため、移動度変化からチオール基の数を逆算できる。

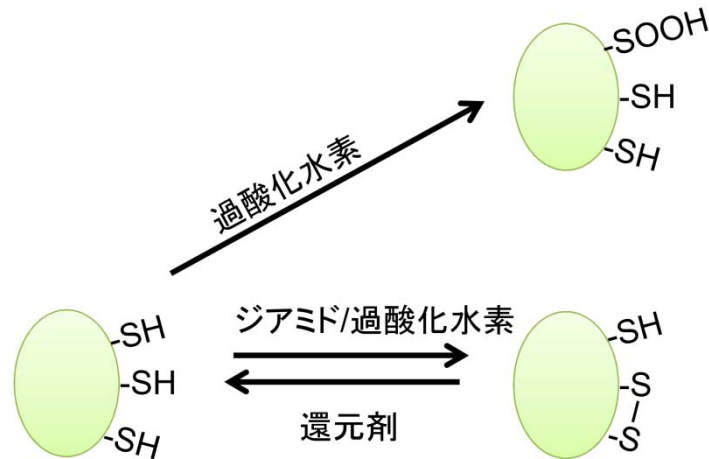


図3. GAPDH のチオール基の酸化状態

細胞内 GAPDH は、ジアミドによる酸化では可逆的なジスルフィド結合を形成した。一方、過酸化水素の場合は、ジスルフィド結合に加えて、還元剤で還元できないスルフィンのような酸化を受けていた。

【用語説明】

- (1) システイン：生体内のタンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のひとつで、側鎖に反応性の高いチオール基 (SH 基) を持っている。
- (2) 電気泳動：生体高分子の持つ固有の電荷の総和の違いを利用して、一定の電場の中で生体高分子を分離する技術。タンパク質や核酸を分離するのに用いる。
- (3) 抗体染色法：特定のタンパク質 (抗原) に反応する抗体を用いて、電気泳動で分離したタンパク質を検出する技術。電気泳動ゲル中で分離されたタンパク質をニトロセルロースなどの高分子膜に写し取り、その膜表面で抗原抗体反応を起こさせる。特定タンパク質に結合した抗体は、さらにその抗体に特異的に反応する抗体 (発色機能を持たせてある) で識別し、可視化することが出来る。
- (4) チオール基：その分子式から SH 基と省略されるが、反応性が高く簡単に酸化されジスルフィド結合を形成する。酵素の活性中心や構造形成に重要な場所に見られ、酵素の機能に密接に関わっている。
- (5) ジスルフィド結合：二つのチオール基が酸化されることで形成される共有結合のこと。タンパク質の構造を規定する重要な結合になっている場合が多い。ひとつの分子の中で形成される場合には分子内ジスルフィド結合、二つの分子間で形成される場合には分子間ジスルフィド結合という。S-S 結合と略される。
- (6) マレイミド：マレイン酸がイミド化 (環状化したイミノ基 (NH) を持つ状態) したものをよぶ。
- (7) HeLa 細胞：ヒト由来の培養細胞。ヒト細胞のモデルとして一般的に使われている細胞である。

- (8) プロテオミクス技術：生体を構成する複数のタンパク質を網羅的に解析する技術の総称である。
- (9) 質量分析：タンパク質の質量分析では、プロテアーゼ等で断片化されたペプチドの分子量を正確に測定する。これによって、ペプチドを構成するアミノ酸の同定や、側鎖の化学修飾を解明できる。
- (10) レドックス・プロテオミクス：タンパク質は酸化還元状態（レドックス状態）の変化によって機能調節されている場合が多い。どのようなタンパク質が酸化還元状態に応じてどのように化学修飾されているのかを網羅的に解析する手法である。

【論文情報】

論文名：Direct determination of the redox status of cysteine residues in proteins in vivo

著者：Satoshi Hara, Yuki Tatenaka, Yuya Ohuchi, Toru Hisabori

掲載誌：*Biochemical and Biophysical Research Communications*

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.082

参考文献

論文名：DNA-maleimide: an improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein.

著者：Hara S, Nojima T, Seio K, Yoshida M, Hisabori T.

掲載誌：*Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1830(4):3077-81.

DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.01.012

【問い合わせ先】

東京工業大学 資源化学研究所附属資源循環研究施設教授 久堀 徹

Email: thisabor@res.titech.ac.jp

東京工業大学 資源化学研究所附属資源循環研究施設特任助教 原 怜

Email: hara.s.ab@m.titech.ac.jp

TEL: 045-924-5234 FAX: 045-924-5268