

コンディショナルプロテオミクスによる 亜鉛周辺タンパク質のプロファイリング

田村 朋則, 浜地 格

亜鉛イオン (Zn^{2+}) は細胞内外でシグナル伝達物質として働き、動的に局所濃度が変化する。このような Zn^{2+} の生理機能をより詳細に理解するためには、細胞内において Zn^{2+} の近傍に存在するタンパク質を網羅的に解析することが重要である。ごく最近、筆者らは Zn^{2+} によって活性化されるタンパク質修飾試薬を開発し、これを用いた Zn^{2+} コンディショナルプロテオミクス法を確立した。この方法を用いて、グリオーマ細胞における一酸化窒素 (NO) 依存的な Zn^{2+} の時空間的な変動と、それに伴う Zn^{2+} の近傍に存在するタンパク質のダイナミクスを明らかにした。さらに、同定されたタンパク質を詳細に解析することで、NO 刺激によって生じる Zn^{2+} -rich ベシクルの正体がゴルジ体と小胞体との間を行き来する中間ベシクルであることを初めて実証した。

1. はじめに

亜鉛イオン (Zn^{2+}) はすべての生物に必須の金属イオンであり、生体内において大きく分けて二つのかたちで存在する。一つは、タンパク質と強く結合し、遺伝子発現の制御や血中 pH の調整、アルコールなどの物質代謝といった生命活動の維持に重要な役割をはたすものである。もう一つは、遊離 Zn^{2+} の状態で発生や神経活動などを制御するシグナル伝達分子として機能するものである¹⁾。最近の研究から、生体内における Zn^{2+} 動態は、生理応答や細胞内・外の環境変化に依存して劇的に変動することが明らかとなっている。たとえば、 Zn^{2+} はシナプス小胞から興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸とともに放出され、後シナプスに位置する複数の受容体タンパク質の活性に影響を

及ぼす。このことから Zn^{2+} シグナリングは、記憶・学習といった高次脳機能に重要であると考えられている。さらに、脳虚血、アルツハイマー病、てんかんといった種々の神経症患者の脳組織において Zn^{2+} 濃度の上昇が確認されており、これら脳疾患と Zn^{2+} ホメオスタシス異常の関連性が示唆されている²⁾。

従来、こうした生体内 Zn^{2+} の動態は蛍光プローブを用いた Zn^{2+} イメージングで解析されてきた。これまでに合成小分子や蛍光タンパク質ベースのさまざまな Zn^{2+} 蛍光センサーが開発されており、生きた細胞あるいは組織における濃度分布の変動が直接観察できるようになった³⁾。しかし、 Zn^{2+} の生体動態に関わる分子機構をより詳細に理解するためには、こうしたイメージング技術だけでは不十分である。たとえば、余剰の遊離 Zn^{2+} の細胞外排出過程においては、 Zn^{2+} が蓄積されたベシクル (小胞) が形成されるが、イメージングに基づく動態解析だけではこの Zn^{2+} -rich ベシクルを構成するタンパク質やその由来を特定することは困難であろう。

このような背景から、我々は細胞内の高濃度 Zn^{2+} 環境下に局在するタンパク質群だけを特異的に同定・解析することを目的とした新規ケミカルプロテオミクス法を考案した⁴⁾。この方法を用いて我々は、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) によって誘導される Zn^{2+} 放出が亜鉛関連プロテオームを時間依存的に劇的に変化させることを実証した。また、NO 刺激によって形成される Zn^{2+} -rich ベシクル

京都大学工学研究科合成・生物化学専攻 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂)

A conditional proteomics approach to profile proteins under zinc-rich environments

Tomonori Tamura and Itaru Hamachi (Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan) 本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900328

© 2018 公益社団法人日本生化学会

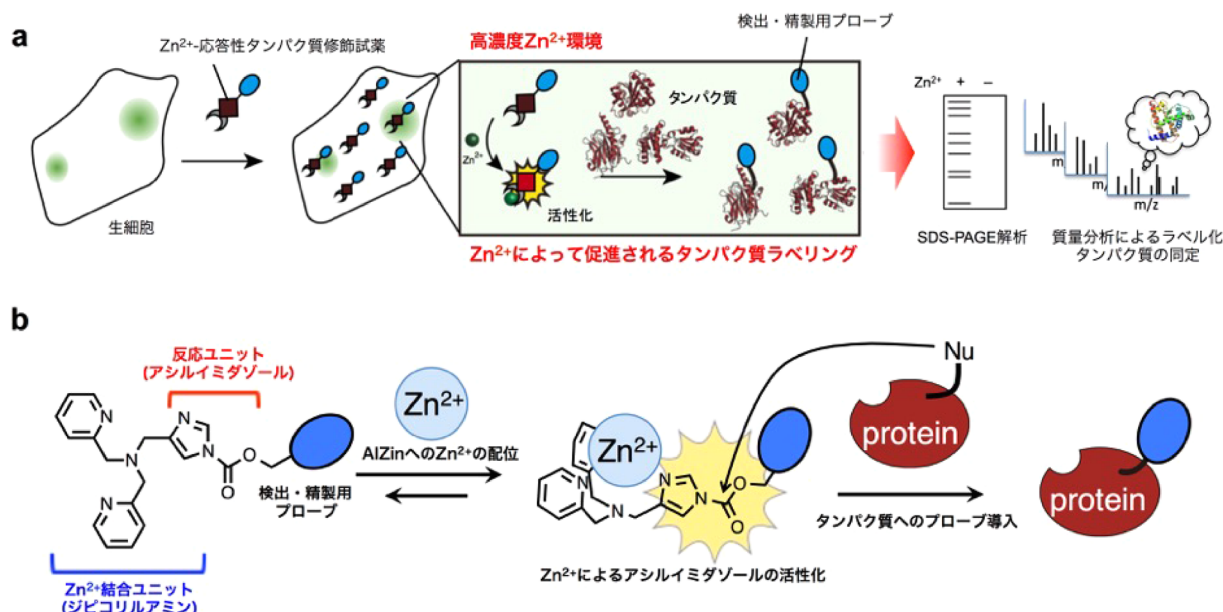


図1 亜鉛イオン (Zn^{2+}) 応答性タンパク質修飾試薬による Zn^{2+} コンディショナルプロテオミクス法
(a)本手法の概略. (b) AIZinの活性化メカニズムとタンパク質ラベル化スキーム.

を構成するプロテオームの同定に成功し、さらにそのタンパク質のプロファイリングから、このベシクルがER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) に由来することを明らかにした。本稿ではこの Zn^{2+} コンディショナル (conditional) プロテオミクス法の開発からその応用について紹介する。

2. Zn^{2+} によって活性化されるタンパク質修飾試薬 “AIZin”の開発

Zn^{2+} コンディショナルプロテオミクス法の概略を図1aに示す。この手法では、細胞内遊離 Zn^{2+} に応答して反応性が向上するタンパク質修飾試薬を用いる。この試薬は、細胞内の高濃度 Zn^{2+} 環境下で活性化され、その領域に存在するタンパク質に対してのみ効率的な修飾反応 (ラベル化) が進行する。このラベル化反応によって検出用あるいは精製用のプローブをタンパク質に導入することができれば、高濃度 Zn^{2+} 環境下に存在するタンパク質を網羅的にSDS-PAGEや質量分析によって同定・解析することが可能となる。

この戦略に基づき、我々は Zn^{2+} 応答性タンパク質修飾試薬AIZinを分子設計した (図1b)。この分子は Zn^{2+} に対して選択的に結合するジピコリルアミン配位子と、アシルイミダゾールと呼ばれるタンパク質ラベリングのための反応基を有している⁵⁾。これら二つのモジュールは、イミダゾール部位が Zn^{2+} 錯体形成に関与しうるように連結されている。この分子にルイス酸性度の強い Zn^{2+} が配位すると、イミダゾール環の電子密度が低下し、反応点であるアシル基の反応性が大幅に向上する。この活性化メカニズムによって高濃度 Zn^{2+} の周辺に存在するタンパク質に対す

るラベル化反応が加速され、 Zn^{2+} 環境選択的なプロテオミクスが可能になると期待した。

はじめに、AIZinと Zn^{2+} 間の錯体形成を確認するためにX線結晶構造解析を行った。その結果、AIZinは Zn^{2+} と三方両錐形型の1:1錯体を形成することがわかった (図2a)。また、イミダゾール環中のN原子の Zn^{2+} に対する配位が確認された。¹H-NMR解析からは、 Zn^{2+} の配位によってイミダゾール環の電子密度が低下することが示された。

次に、 Zn^{2+} の錯化によるAIZinの活性化を加水分解アッセイによって評価した。その結果、 Zn^{2+} 存在下では、非存在下と比較してAIZinの加水分解速度が23倍加速することがわかった (図2b)。このことから、AIZinは設計どおり Zn^{2+} によってその反応性が高められることが実証された。また、同様の加水分解実験からAIZinの Zn^{2+} との親和性を求めたところ、解離定数 $K_d=1\text{ nM}$ であった。細胞内の遊離 Zn^{2+} 濃度は通常pM程度で、特定の刺激に応じてnM~ μM まで上昇する。したがってAIZinは定常状態の細胞内遊離 Zn^{2+} には応答せず、特殊な高濃度 Zn^{2+} 領域においてのみ反応性を示すことが期待された。さらに金属イオン選択性について調べたところ、AIZinは生体内に豊富に存在する Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} や遷移金属である Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} に対してはまったく応答せず、 Zn^{2+} 選択性がきわめて高いことが示された (図2c)。一方、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pd^{2+} といった遷移金属イオンに対しては Zn^{2+} ほどではないものの応答がみられた。ただし、これらの金属イオンは生体内では、 Zn^{2+} に比べて極微量にしか存在しないため、実際の使用にあたっては大きな影響はないと考えられる。

続いて、タンパク質に対する反応性を評価した。クマリン蛍光色素を検出プローブとして有するAIZin-1 (1 μM) をHeLa細胞ライセートに加え、さらにそこに ZnSO_4 (50 μM)

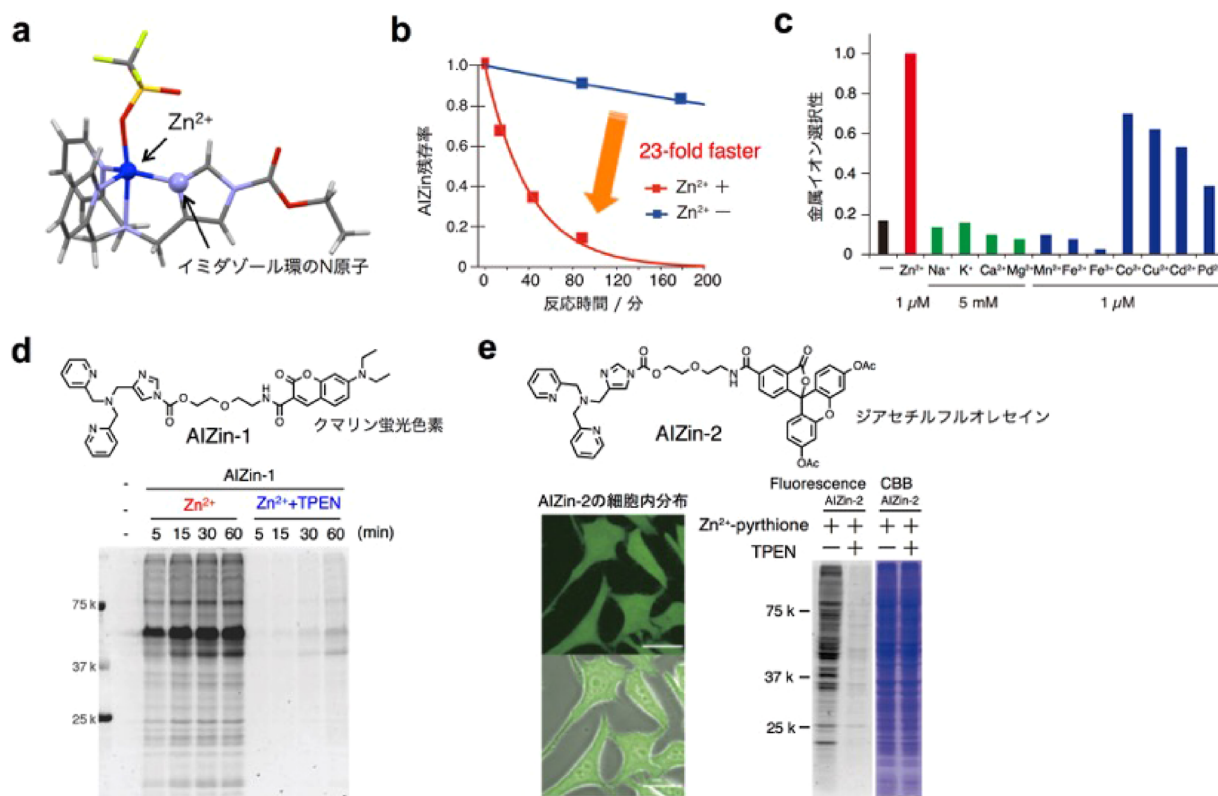


図2 AIZinの反応特性⁴⁾

(a) AIZin-Zn²⁺錯体のX線結晶構造解析。(b) Zn²⁺によるAIZinの活性化。Zn²⁺存在下では非存在下と比較して加水分解速度が23倍加速する。(c) AIZinの金属イオン選択性。(d) AIZin-1を用いたHeLaライセート中におけるZn²⁺応答タンパク質ラベリング。(e) AIZin-2のHeLa細胞内分布とZn²⁺応答タンパク質ラベリング。スケールバー：30 μm。CBB：Coomassie Brilliant Blue.

を加えた。ラベル化反応が進行するとタンパク質にクマリンが修飾されるため、SDS-PAGE後の蛍光検出によってラベル化反応を評価できる。図2dに示すように、AIZin-1とZn²⁺を添加した条件ではラベル化タンパク質に相当する蛍光バンドが複数検出された。一方、Zn²⁺を強くキレートする*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN)を高濃度(1 mM)に共存させた場合では、AIZin-1-Zn²⁺錯体形成が阻害されるため、この蛍光バンドは顕著に減少した。以上の結果から、AIZinはZn²⁺に応答したタンパク質ラベリングが可能であることが明確に示された。

さらに我々は、AIZinによるZn²⁺応答性タンパク質ラベリングを生細胞内環境で実施した(図2e)。細胞実験では、膜透過性、細胞内分散性に優れた蛍光色素であるジアセチルフルオレセインをプローブとして有するAIZin-2を用いた(ジアセチルフルオレセインは細胞外では非蛍光性であるが、細胞内では内在性エステラーゼによりアセチル基が分解されるため蛍光を発する)。まず、ラベル化剤の膜透過性と細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡によって確認した。その結果、AIZin-2は培地に添加するだけで15分程度で形質膜を透過し、細胞内に一様に分散することがわかった。この細胞に外因性Zn²⁺供給剤としてジंकピリチオンを加えると、細胞内Zn²⁺の増加に伴うタンパク質のラベル化が観察された。また、このラベル化反応はTPENに

よって阻害された。以上の結果から、AIZinは生細胞内でもZn²⁺に応答してタンパク質を修飾できることが実証された。

3. NO刺激に伴うZn²⁺周辺タンパク質の動的変化

上記の特性を有するAIZin-2を用いて細胞内在性Zn²⁺の近傍に存在するタンパク質のラベル化および同定を試みた。具体的には、脳内虚血のモデルとしてNOによる酸化ストレスをC6グリア腫細胞に与え、細胞内Zn²⁺の時空間的変動とそれに伴うZn²⁺周辺タンパク質群の種類の変化を追跡した。一般に、細胞内Zn²⁺の多くは金属結合タンパク質であるメタロチオネインと強く結合しているが、そのCysのチオール基がNOにより*S*-ニトロシル化されるとZn²⁺との結合能が失われ、遊離Zn²⁺が増加することが知られている⁶⁾。この細胞質に放出された多量のZn²⁺は解糖系やミトコンドリアの機能に障害を及ぼし、これがきっかけとなってアポトーシスが誘導されると考えられている^{7,8)}。一方、C6グリア腫細胞においては、過剰に生じた遊離Zn²⁺はベシクルに一時的に隔離され、Zn²⁺の毒性が抑制されると報告されている^{9,10)}。このようなZn²⁺を豊富に含むベシクルの構成成分、その起源および他のオルガネラとの関係はほとんど知られておらず、遊離Zn²⁺の代謝

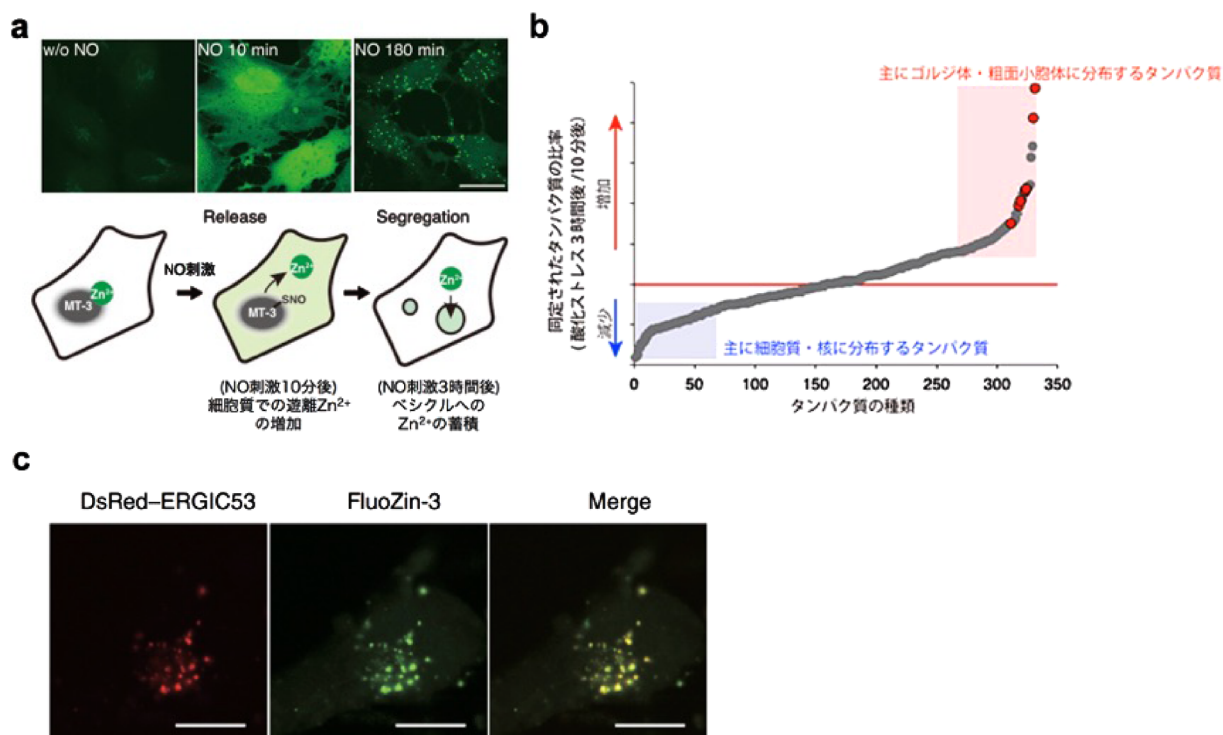


図3 一酸化窒素 (NO) 刺激を受けた細胞における Zn²⁺ 周辺タンパク質の同定⁴⁾

(a) FluoZin-3 を用いた NO 刺激に伴う細胞内 Zn²⁺ 分布変化観察. スケールバー: 20 μm. (b) NO 刺激後 10 分と 3 時間における Zn²⁺ 周辺タンパク質の定量 LC-MS/MS 解析. NO 刺激 10 分後と比較して, 3 時間後ではゴルジ体や小胞体に局在するタンパク質のラベル化量が増加した. (c) NO 刺激 3 時間後における DsRed-ERGIC53 と FluoZin-3 の共染色画像. スケールバー: 10 μm.

機構はいまだ不明な点が多い. そこで我々は今回開発した AIZin-2 を用いてこの Zn²⁺-rich ベシクルの特徴づけおよび同定を試みた.

はじめに, NO 刺激条件における C6 細胞内の Zn²⁺ 分布を市販の蛍光 Zn²⁺ センサー (FluoZin-3) で観察した. その結果, NO 刺激によって Zn²⁺ 濃度は細胞全体 (細胞質や核) で一時的 (10 分程度) に上昇し, さらにそれが 3 時間程度かけてある特定の小さなベシクル (Zn²⁺-rich ベシクル) に濃縮されるようすが観察された (図 3a).

次に, NO 刺激後 10 分と 3 時間後の細胞に AIZin-2 を添加し, ラベル化された複数のタンパク質群を TMT (tandem mass tag) 法に基づく定量質量分析によって解析した. 同定された約 300 種類のタンパク質リストを定量解析すると, NO 刺激後 10 分では細胞質や核に分布するタンパク質が主にラベル化されることがわかった. 一方, NO 刺激 3 時間後ではそれらは減少し, 新たに小胞体 (ER) やゴルジ体, ER-ゴルジ体関連ベシクルのタンパク質が多く同定された (図 3b). 重要なことに, このプロテオーム解析から得られた細胞内 Zn²⁺ 分布に関する情報は, 図 3a で示した蛍光イメージングによる Zn²⁺ の局在変化とよく一致した. これらの結果から AIZin-2 と質量分析を組み合わせた Zn²⁺ コンディショナルプロテオミクス法は, 時空間的に変動する Zn²⁺ の周辺に存在する一連のタンパク質をスナップショット的に同定できることが実証された.

4. Zn²⁺ が蓄積されたベシクルの同定

上述の NO 刺激後 3 時間のサンプルで同定されたタンパク質群を詳細に解析すると, ER やゴルジ体に局在するタンパク質が比較的多く含まれることがわかった. また, フォールディングや翻訳後修飾に関与するタンパク質も多く含まれることから, 蛍光イメージングによって観察される Zn²⁺-rich ベシクルは ER やゴルジ体由来のものであると推察された. 実際に同定された個々のタンパク質をみると, SEC ファミリーや, 小胞輸送を制御する Rab, ARF といった G タンパク質に加えて, いくつかの COP タンパク質がヒットしていることがわかった. これらは, COPI 小胞, COPII 小胞, ER-ゴルジ体中間区画 (ERGIC) といった ER-ゴルジ体間の小胞輸送に関与するタンパク質であることから, 遊離 Zn²⁺ は NO 刺激に伴ってこれらのベシクルに蓄積していることが示唆された¹¹⁾. そこで, この仮説を検証するために ERGIC のマーカータンパク質である ERGIC53 の DsRed 融合体と FluoZin-3 との共染色を行ったところ, その局在はきわめてよい一致を示した (図 3c). 以上の結果から, NO 刺激後遊離 Zn²⁺ が最終的に濃縮されるベシクルは, ゴルジ体と粗面小胞体の間を行き来する中間ベシクルであることが初めて実証された.

5. おわりに

本稿では、 Zn^{2+} 応答性タンパク質修飾試薬AIZinの開発と、これを用いた Zn^{2+} コンディショナルプロテオミクス法について紹介した。なお、ここで紹介したAIZin-2は現在“Zin-Pro Capture”という名称でフナコシ株式会社から販売されており、容易に入手可能となっている。本プローブは高濃度の Zn^{2+} を含む小胞あるいは細胞内小器官の同定が可能であることから、今後、受精や神経活動などさまざまな生体イベントにおける Zn^{2+} シグナリング機構の解明に大きく貢献すると期待される。また、本研究において提案したコンディショナルプロテオミクスという世界初のコンセプトは、鉄や銅などの生体金属、種々の活性酸素/窒素種(ROS/RNS)など、さまざまな細胞環境に対して適用可能であると我々は考えており、現在そのためのプローブ開発に取り組んでいるところである。

謝辞

本研究は浜地研究室卒業生の三木卓幸君(現東京工業大学助教)を中心として、阿波諒君、西川雄貴君によって遂行されました。また質量分析に関しては、京都大学薬学研究科石濱泰教授、若林真樹助教(現国立循環器病センター創薬オミックス解析センタープロテオーム系解析室室長)から多大なるご支援をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

文 献

- 1) Frederickson, C.J., Koh, J., & Bush, A.I. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 449–462.

- 2) Sensi, S.L., Paoletti, P., Bush, A.I., & Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 780–791.
- 3) Domaille, D.W., Que, E.L., & Chang, C.J. (2008) Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 168–175.
- 4) Miki, T., Awa, M., Nishikawa, Y., Kiyonaka, S., Wakabayashi, M., Ishihama, Y., & Hamachi, I. (2016) A conditional proteomics approach to identify proteins involved in zinc homeostasis. *Nat. Methods*, **13**, 931–937.
- 5) Fujishima, S., Yasui, R., Miki, T., Ojida, A., & Hamachi, I. (2012) Ligand-directed acyl imidazole chemistry for labeling of membrane-bound proteins on live cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3961–3964.
- 6) Colvin, R.A., Holmes, W.R., Fontaine, C.P., & Maret, W. (2010) Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, **2**, 306–317.
- 7) Sensi, S.L., Ton-That, D., Sullivan, P.G., Jonas, E.A., Gee, K.R., Kaczmarek, L.K., & Weiss, J.H. (2003) Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn^{2+} pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6157–6162.
- 8) Bossy-Wetzel, E., Talantova, M.V., Lee, W.D., Schölzke, M.N., Harrop, A., Mathews, E., Götz, T., Han, J., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., et al. (2004) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K^+ channels. *Neuron*, **41**, 351–365.
- 9) Haase, H. & Beyersmann, D. (2002) Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 923–928.
- 10) Haase, H. & Beyersmann, D. (1999) Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. *Biometals*, **12**, 247–254.
- 11) Brandizzi, F. & Barlowe, C. (2013) At the ends of their tethers! How coiled-coil proteins capture vesicles at the Golgi. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 382–392.

著者寸描

●田村 朋則 (たむら ともり)



京都大学工学研究科助教。博士(工学)。
■略歴 1985年兵庫県(淡路島)に生る。2008年京都大学工学部卒業。13年同大学院工学研究科にて学位取得。日本学術振興会特別研究員PDを経て、14年より現職。
■研究テーマと抱負 タンパク質有機化学、ケミカルプロテオミクス。
■ウェブサイト <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/>

■趣味 息子とのプラレール作り。

●浜地 格 (はまち いたる)



京都大学工学研究科教授。博士(工学)。
■略歴 1960年福岡県に生る。88年京都大学大学院工学研究科博士課程単位認定退学。同年九州大学助手および京都大学工学博士。2001年九州大学有機化学基礎研究センター教授。05年京都大学へ異動し現職。
■研究テーマと抱負 生細胞有機化学、超分子バイオ材料。

■ウェブサイト <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/hamachi-lab/>
■趣味 ホークスの応援。