

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 単アミノ酸側鎖付加の分子機構

2 研究者氏名: 瀬藤光利

研究員: 早坂 孝宏 (研究期間 H.15.10~H.16.3)

矢尾 育子 (研究期間 H.15.5~H.16.3)

新井 麻友美 (研究期間 H.15.4~H.17.10)

富永 由香 (研究期間 H.16.4~H.16.8)

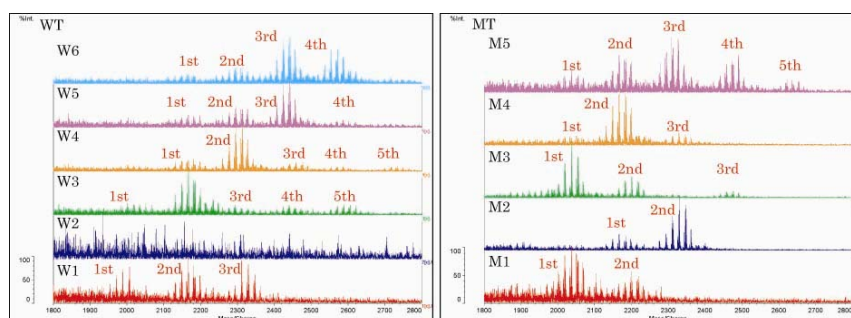
畠中 靖恵 (研究期間 H.16.5~H.17.10)

3 研究のねらい:

ストレス、加齢発達、記憶学習といったタイムシグナルに対して我々の体は応答機構を備えている。応答の重要な制御ポイントに、ホルモンや神経ペプチドといった伝達物質やその受容体の輸送がある。伝達物質の細胞内輸送のレールとしてチューブリンという蛋白質でできる微小管が重要である。チューブリンはグルタミン酸やグリシンといった単アミノ酸の付加を受けるが、その酵素実体は明らかでなかった。酵素実体を明らかにすれば、生化学的、細胞生物学的、遺伝学的に細胞内輸送の制御の実体に切り込むことが出来る。私はこのチューブリンの翻訳後修飾が細胞内輸送の制御ポイントである可能性に注目し、酵素実体とその分子機構を明らかにすることを狙った。

4 研究成果:

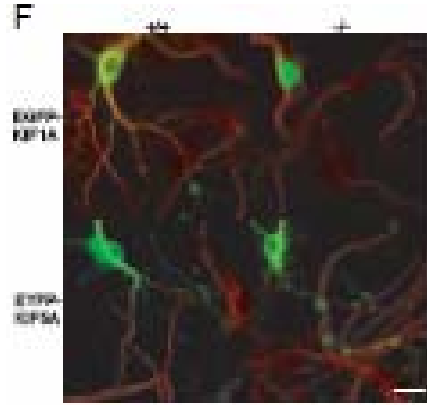
まず、チューブリンの翻訳後修飾等(文献1, 2)をイオンラックタイムフライト多段階質量分析等で解析観察する系を試



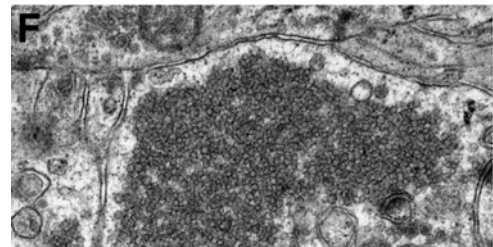
行、確立した(文献3, 4, 5, )。ランダム muta ジェネシスから拾われた ROSA22 マウス(現在の知見からは PGs1 ミュータント マウス)に、グルタミン酸付加の異常があることに気が付いたことから研究は急速に進展した。PGs1 からのイーストツウハイブリッドで同定した酵素は ATP 加水分解中心を持ち、チューブリンチロシンリガーゼ(TTL)に類似した新しい分子群であり、TTLL ファミリー蛋白質群と名づけた。 $\alpha$  チューブリンにグルタミン酸を付加する酵素は TTLL1 を活性中心とした PGs complex であった。PGs1 のミュータント マウスでは  $\alpha$  チューブリンのグルタミン酸付加が消失してい

た(上図)。WT の W6 スポットの3rdが-Y+2E、4thが-Y+3E であり、MT の4thは+E、5thは何もつけないチューブリンである。

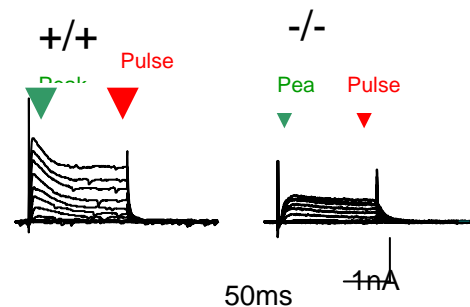
PGs1のミュータントマウスでは多くの微小管関連蛋白質の異常がみられ、KIF1 キネシンモーター蛋白質は細胞体の出発が障害されていた。意外なことに、KIF5 キネシンモーター蛋白質はむしろ輸送が亢進していた(文献6)。右図緑色が KIF で、上が KIF1、下が KIF5。KIF1 のシグナルは右列のミュータント由来の神経細胞で細胞体から出られずにいる。一方 KIF5 はむしろ突起にシグナルが強い。つまり、モーターの種類によって微小管の翻訳後修飾によって受ける影響が異なることが明らかになった。



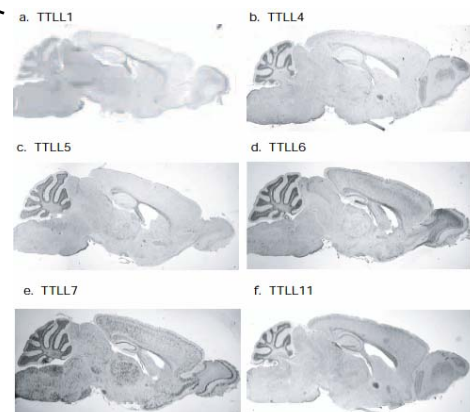
突起に向かった KIF はユビキチンリガーゼで分解されていた。この新規のユビキチンリガーゼのノックアウトマウスには神経伝達の異常とシナプス小胞の輸送の異常が見られた(文献7)。右図はそのミュータントマウスの脳の電顕像である。巨大なプレシナプスとシナプス小胞の過大な集積と変性が見られた。



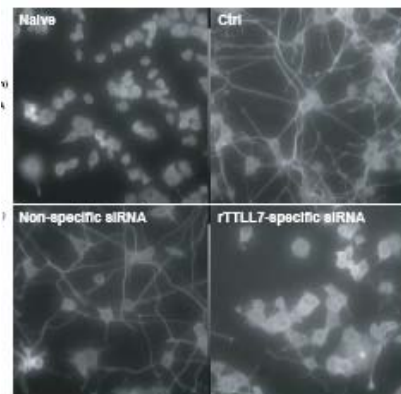
PGs1ミュータントマウスでは KIF17 モーター蛋白質などによる樹状突起輸送も傷害されており、Kv4.2 を主体とする A 電流の異常と LTP の抑制が見られた(文献8)。右図ホモロジーからゲノムを解析した結果、TTLL1 はそれ以外の13種類以上の大きな蛋白質とファミリーを作っていることが明らかになり、TTLL ファミリーと名づけた。それらは生体内でそれぞれに特徴的な分布をしていた(右中図)。興味深いことに、TTLL7mRNA は樹状突起内 mRNA 輸送を受けており、樹状突起での翻訳制御が示唆された(文献9)。



全種類の TTLL に対する RNAi 解析を神経細胞で行ったところ、 $\alpha$  チューブリンと  $\beta$  チューブリンでグルタミン酸付加酵素は異なっており、 $\beta$  チューブリンにグルタミン酸を付加する酵素は神経細胞ではこの TTLL7が主体であることが明らかになった。RNAi による TTLL7阻害では神経突起伸張が阻害された(文献10)。右下図



我々の *in vitro* の解析によると TTLL1 は単独では酵素活性を持たず PGs1 等の補酵素が必要であるが、TTLL7 は大腸菌リコンビナントで試験管内反応を再構成可能である(発表準備中)。脂肪細胞では TTLL4 が  $\beta$  チュブリンにグルタミン酸を付加する酵素であり、TTLL4 の RNAi で脂肪細胞表面へのトランスポーターの輸送(投稿中)が抑制され、糖の取り込みが抑えられた(発表準備中)。



以上、チュブリンのc末端の複雑な翻訳後修飾の分子実体として TTLL 酵素ファミリーを同定した。この成果によって、モーター蛋白群それぞれに適したレールの特異的な変化が引き起こされることで細胞内輸送が制御され、タイムシグナルに対する細胞の環境応答様式を変化させているという、いわば“Tubulin code hypothesis”という新しい概念を確立した(文献1, 2)。

## 5 自己評価:

スイスのグループの原虫の結果を参考にして最初解析に取り掛かったマウスの酵素 Nek2 は非常に弱い活性しか持たず、ミュータントマウスにチュブリンの異常がなかったことから否定的な結果となり、3年のうち最初の1年半を費やしてしまったのは痛かったが、よい国際共同研究者を得たことと、技術員や研究員の皆の努力でこの報告書を書いている時点で多くの論文を投稿するまでにいったのは、ポスドク参加型でこそ可能であり、大変よい経験になった。もっとレベルを落としたジャーナルに投稿すればアクセプトがこの原稿に間に合ったかとも思うが、レビューワーの指摘に沿った追加実験での新しい発見もあり、結果良かったと考えている。

酵素があるのかすらが、そもそもさだかでなかった3年前の出発からスタートして、目標であった同定、再構成、ミュータントの解析、まで期間内にすべて我々の手で達成できたことは大変うれしい。ミュータントマウスにグルタミン酸付加の異常があることはもとより、その細胞内輸送に与える影響はチュブリンのc末端の修飾の種類とモーターの種類組み合わせにより異なるという思いがけない精緻なもので、電気生理的異常や行動の異常はまったく予測できなかった興味深いものであった。夢中の3年間であったが、こうしてふりかえてみると、顕微質量分析の発明、PGs-TLLの物質の発見、それによるチュブリンコード概念の提唱、という流れで論文がまとまり、シドニーブレナーの「新しい発見は方法、物質、概念、多分この順番」というまったくその通りであった。

以上の活動が認められ、多くの国内外の招待口演を行った。特に前スタンフォード大学総長で現サイエンス編集長の Don Kennedy 氏に招待いただき、全米科学者協会(AAAS,サイエンス誌発行の母体)の今年の年次総会で、ブッシュ米国大統領科学補佐官の McBurger 氏らの前で講演を行う栄誉を得たのは大変な光栄であった。また、医師会からの表彰もいただいた。

このさきがけ研究の苦闘の中から質量分析顕微鏡のゼロから1の芽生えがあった。この発明は JST に将来性を高く評価していただき栄誉ある先端機器計測の第一回の支援を得ることになり、さきがけは皆さんよりも半年早く卒業させていただき、より大きな JST の委託研究に発展させていただいている。そのためさきがけの発展研究には応募を辞退させていただいた。また、付加酵素が大きな蛋白質ファミリーを作っていたのは想定外であった。それら多様な TLL ファミリー分子群の解析は続けており今後さらに楽しみである。自由でオリジナルな発想を支援していただけたこのタイムシグナルと制御のご理解とご支援に大変感謝している。

## 6 研究総括の見解:

質量分析顕微鏡の開発にみられるように、多彩な資質に恵まれているだけに、興味を分散させること無く、常に何を最重要な課題としているかに思いを致し、進んでいって欲しい。今後の注目すべき展開が期待される。論文のまとめは新たな課題の存在を提示し、盡きることがない。その意味で論文作成は研究終末ではない。研究の全行程を百里とすれば、その五十里と云ってよい。論文作成は新たな道程へと研究者を導く貴重な実り多い作業であることを銘記すべきであろう。

## 7 主な論文等:

### 1 Setou M, Hayasaka T, Yao I

Axonal transport vs dendritic transport

J Neurobiol. 2004 Feb;58(2):201-6.

### 2 Setou M, Matsumoto M, Yang HJ

The role of receptor transports by motor proteins.

Seikagaku (in press)

### 3 Shimma S & Setou M,

Review of Imaging Mass Spectrometry,

Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan

Vol. 53, No. 4, 2005 (p230 - p238)

### 4 Shimma S, Furuta M, Ichimura K, Yoshida Y & Setou M,

Direct MS/MS analysis in mammalian tissue sections using MALDI-QIT-TOFMS and chemical inkjet technology, Surface and Interface Analysis (in press)

### 5 Setou M, Shimma S, Sugiura Y, Yao I, Toyoda M, Hoshikawa Y, Suzuki M, Katakuse I, Nagayama K & Yoshida Y,

Development of MS microscope,

Surface and Interface Analysis (in press)

- 6 Ikegami et al., (PGs1) Submitted
  - 7 Yao I, et al (ubiquitin ligase) Submitted
  - 8 Takagi et al., (A current defect) Submitted
  - 9 Matsumoto et al., (TTLL characterize) Submitted
  - 10 Ikegami et al., (TTLL7) Submitted
- その他 7編

#### 特許

1. 発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: ユビキチンリガーゼ SCF 複合体の F-box タンパク質、及び該タンパク質をコードする核酸分子

機構整理番号: K052P10

特願 2004-006551

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

2. 発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: グリシン付加酵素、グリシン付加酵素活性の測定方法、及び、グリシン付加酵素を用いる細胞増殖制御物質のスクリーニング

機構整理番号: K052P11

特願 2004-006552

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

3. 発明人: 瀬藤 光利

発明の名称: ポリグルタミン付加酵素の同定とそれを用いたスクリーニング

機構整理番号: K052P12

特願 2004-006553

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 平成 16 年 1 月 14 日

(外国出願せず)

#### 受賞

2004年2月4日 平成15年度東京都医師会医学研究賞奨励賞

招待講演(国内)

- 1 瀬藤光利(2004)  
AMPA receptor interacting protein GRIP1 steers kinesin to dendrites  
平成15年度生理学研究所研究会 神経可塑性の分子的基盤
- 2 瀬藤光利(2004)  
シナプス脱構築の分子機構の解明に向けて  
平成15年度生理学研究所研究会 神経回路網形成と可塑性機構研究における領域横断的  
アプローチ
- 3 瀬藤光利(2004)  
受容体動態の分子機構  
第1回 Neuroscience Frontier Research Conference (NEFRE)
- 4 瀬藤光利(2004)  
受容体動態の分子機構  
第8回 Molecular Cardiovascular Conference Keynote Lecture
- 5 瀬藤光利 et al.,(2005)  
顕微質量分析顕装置の開発  
第53回質量分析総合討論会
- 6 瀬藤光利 et al.,(2005)  
質量分析顕微鏡の開発  
学振 141 委員会第 119 回研究会
- 7 瀬藤光利(2005)  
Novel polyglutamylase regulates the traffic of K channel  
第29回日本神経科学学会大会
- 8 瀬藤光利 (2006)  
顕微質量分析によるナノバイオマシン制御解析と創薬  
日本薬学会第7回創薬ビジョンシンポジウム

その他2件

招待講演(国外)

1. Setou M (2005)

Personalized medicine in Japan

American Association of Advance of Science, Annual Meeting (Washington DC)

2. Setou M et al., (2005)

Development of MS microscope

5<sup>th</sup> international conference of Atomic Level Characterizations (Hawaii)