
グローバル COE 特別セミナー

生物化学専攻セミナー

日時：平成 21 年 11 月 20 日（金） 17:00～18:30

場所：理学部 3 号館 4 階 412 号室

講師：中山 敬一 九州大学生体防御医学研究所 教授

演題：プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平：もうウェスタンブロッティングは要らない？！

要旨：「酵素-基質関係の全体像の解明」というテーマは、現代の生物学が抱える大問題である。細胞内における多くの事象のコントロールには、多くの酵素によるタンパク質の翻訳後修飾が重要な役割を果たしている。しかし、実際にこれらの酵素が生体内で何を標的としているかは、実はあまり明らかになっていないのが現状である。

われわれはこの大問題に立ち向かうため、10 年の歳月を費やして定量プロテオミクス技術を用いた翻訳後修飾の網羅的解析に取り組んできた。具体的には、1) リン酸化やユビキチン化されたタンパク質の全体像（プロテーム）を取得し、2) 酵素変異（ノックアウトやノックダウンによる発現抑制および過剰発現）によるプロテームの変動を解析する、という 2 段階のプロセスによって基質候補分子を LC-MS/MS によって網羅的に同定することを目標として研究を進めてきた。

その結果、リン酸化においては固相化金属親和性カラム（IMAC）法によるリン酸化ペプチドの徹底的な条件検討によって、高い網羅性を持って全体像（リン酸化プロテーム）を取得することにほぼ成功し、安定化同位体標識を用いた定量的プロテオミクスによる変動解析を行った。例えば細胞周期におけるリン酸化タンパク質の網羅的同定と変動解析を行い、多くの新知見を得た。またリン酸化酵素阻害剤を用いることによって、リン酸化カスケード全体像のうち、どこが変化しているのかを可視化することに成功した。またある刺激（インプット）がどのように異なった反応（アウトプット）を引き起こすかを知るために、EGF と Insulin に対する反応性の違いを例にとって詳細に検討することによって、そのキー分子を同定した。さらにキナーゼノックアウトマウスを用いて、そのリン酸化状態を網羅的に検索することにより、その違いを明らかにする試みも紹介したい。

一方でユビキチン化においては全体像（ユビキチン化プロテーム）を取得すると共に、結合や酵素活性に基づく新規の方法論も考案し、実用化へのバリデーションを行っている。特に以前は困難であった酵素-基質結合に基づく方法において、定量的プロテオミクスを用いて新規基質を発見する方法を考案し、新たな基質を数多く見つけることに成功している。

また第 4 世代のプロテオミクスと言われる MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を用いて、抗体を使用せずに数万種類のタンパク質を超高感度で絶対定量する方法を開発した。この方法で得られる情報量は、ウェスタンブロッティング 25,000 レーンに匹敵し、従来の 100 倍以上の高感度、高精度であり、抗体も不要なので全てのタンパク質、部位、修飾に対応できる夢の技術である。全体的なパフォーマンスは現行のウェスタンブロッティング法の約 100 万倍以上であり、今後ウェスタンブロッティング法は不要になると思われる。これによって研究を革新的に進歩させると同時に、臨床検査への応用やバイオマーカー探索など、医学生物学に長足の進歩をもたらすことが期待される。