

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名: ユビキチンシステムの網羅的解析基盤の創出

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

中山 敬一 (九州大学 生体防御医学研究所 教授)

主たる共同研究者

中山 啓子 (東北大学医学系研究科 教授)(~平成 23 年 3 月)

3. 研究概要

タンパク質のユビキチン化は重要なタンパク質の制御機構であるが、その全体像を解明しようとする試みはほとんど成功していない。特にユビキチン化酵素とその標的となる基質分子の対応関係の解明はユビキチン系の全貌解明のためには必須であるが、その方法論は全く開発されていない。本研究課題では、ユビキチン化システムの全貌を網羅的に解析するための新たな基盤技術の創出を目的としている。

開発している方法論は二つの柱から成り立っている。一つは生化学的な方法をプロテオミクスと組み合わせたインタラクション・プロテオミクス(IPX)法であり、もう一つは遺伝学的な方法プロテオミクスと組み合わせたリバーシブル・プロテオミクス(RPX)である。基本的には九州大学のプロテオミクス・グループが、IPX 法によって酵素・基質関係の候補を絞り出し、そのバリデーションスタディのために東北大学のジェネティクス・グループがその酵素や基質のノックアウトマウスを作製し、各々の予想される生物学的機構に対して解明を進めるという方針を取った。また逆にジェネティクス・グループが作製したノックアウトマウスを用いて、プロテオミクス・グループが RPX 法によって基質を探索する方向も現在完成しつつある。

現在まで、IPX 法に関しては、ほぼ当初の目標を達成した。開発した IPX 法は正常ユビキチンリガーゼと変異型ユビキチンリガーゼへの基質結合親和性の違いに基づくもので、これを SILAC 法というプロテオミクス技術を組み込んだ方法によって網羅的に基質を決定するという方法であり、一種のディファレンシャル・プロテオミクスに相当する。この方法の優れたところは、結合活性の絶対値ではなく、正常型・変異型の差異に基づいている点であり、結合分子のほとんどを占めるノイズタンパク質(非特異的結合分子)を排除できる点にある。既に 15 以上のユビキチンリガーゼに応用し、その基質を次々と明らかにしている。この方法は今までアドホック的にしか探索できなかった酵素→基質という方向のアプローチを構築する世界で初めての方法論である。これによって今までは生物学的な重要性が不明だったユビキチン化酵素の機能が解明された。

RPX 法については、当初有力な方法論と考えていた 2D-DIGE 法の網羅性が十分ではなかったため、発想を全く転換し、新技術の開発を行った。そこで着目したのはターゲットプロテオミクスの一種である Multiple Reaction Monitoring (MRM 法) である。MRM 法は 2D-DIGE 法に比較して圧倒的に解析深度が大きく、網羅的にタンパク質の絶対定量を行うことができる。しかし従来の MRM 法は個別にタンパク質を測定する技術であり、大規模に行えるようなものではなかった。これを大規模化するために、ヒト完全長 cDNA ライブラリー(25,000 種以上のクローンサイズよりなる)からロボット技術を利用して、試験管内でコムギ胚芽抽出液によってヒト全タンパク質のリコンビナントタンパク質を作製した。さらにそれを全て質量分析することによって、全てのタンパク質に対してほぼ 4 つ以上のプローブペプチドを設定し、総計 13 万種以上のプローブペプチドの(HPLC 保持時間・ペプチド質量・ペプチド断片質量)の 3 次元情報の事前取得によって、全てのタンパク質の絶対定量を可能にするシステムを構築した。これを Information-based Multiple Reaction Monitoring (iMRM 法) と命

名し、既に実証実験に成功した。iMRM 法の実現化によって原理的に全てのヒトタンパク質の絶対定量が可能になった。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

本研究領域は、生命システムの動作原理の解明を目指して、新しい視点に立った解析基盤技術を創出することを戦略目標の1つにしており、その解析基盤技術に合致する課題であった。網羅的解析は種々の手法が開発されているが、短期間にインタラクション・プロテオミクス(IPX)法とリバースプロテオミクス(RPX)法という新しい方法を開発し顕著な成果を挙げるに到っている。プロテオーム解析で世界を先導する基盤を構築したことを評価する。

Nature、Cell 関連誌、Cancer 関連誌、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, J. Biol. Chem.などを含む118報もの原著論文を国際誌に発表した。招待講演(国内会議 63 件、国際会議 20 件)や学会発表(国内会議 27 件、国際会議 2 件)、ポスター発表(国内会議 42 件、国際会議 16 件)など積極的に成果を発表していることは、高く評価される。原書論文が118編という突出した数に上っており、国内外からの招待講演も多く、本解析法が多方面で応用され成果をあげていることが窺える。

生命システム動態の解析基盤技術の知的財産として、国内外に「タンパク質の定量方法」、(出願人:国立大学法人九州大学)の特許を出願していることは、評価する。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

生命現象の理解は、分子、遺伝子の発現に主力が注がれてきた流れから、分解や発現阻止の方向に向けられるようになった今日、極めて有用なシステムと技術の開発として高く評価する。本技術が生命現象の理解にどれだけ貢献するかは今後の研究成果を待たなければならないが、これまでの成果は疾患のメカニズムなどに関係するものが多く、今後、医学・医療に展開され、貢献していくことが期待できる。より微量な成分からの解析が進むと実用化は大いに進むであろう。

新聞・マスコミ報道においても、「中性脂肪合成 酵素が制御:九州大、マウス実験 メタボ治療に応用期待」日本経済新聞. 2010 12/5.など、23件あり、社会への貢献への取り組みも活発に行っている。

4-3. 総合評価

本研究は大規模な技術開発を、理研や産総研でなく、大学内で学生を主に指導して行っていることが大きな特色である。そのため、他の技術開発系の大型プロジェクトと比較して、小さい予算規模で成果を出しており、その点は評価に値する。これからは、網羅的な解析を一貫して進めるか、基本的な原理に焦点をあてるのか、十分に考える時期に来ていると考える。

当該期間内に成果を着実に出しており、目標達成度からも有効性からも高く評価でき、第 3 回 JCA-Mauvernay Award(平成 19 年 10 月)、第 27 回井上学術賞(平成 23 年 2 月)を受賞しており、社会からの評価も高い。

ユビキチン系を対象として開発された新しい解析法は非常に強力かつ汎用性に富んでおり、世界でも類を見ないユニークな研究基盤を築いたことを高く評価したい。協働研究を通してその基盤を世界的に広く活用する体制を築いたことも評価する。今後、多様な生体機能分子の量的・質的制御メカニズムの解明が促進され、生物学・医学の進展に貢献すると予想され、国際的に連携を強めて大きなビジョン・ゴールを持った国際的なプロジェクトに発展させる方策を考えることが望まれる。