

2014 年功労賞受賞者論文 総説

タンパク質の翻訳後修飾異常と疾患

戸田年総*

*E-mail: ttoda@proteome.jp

¹ 横浜市立大学先端医科学研究センター : 236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9

(受付 2016 年 10 月 6 日, 改訂 2016 年 12 月 8 日, 受理 2016 年 12 月 14 日)

タンパク質の機能は、基本的にはゲノム塩基配列によってコードされたアミノ酸配列に基づいているが、多くのタンパク質では翻訳時および翻訳後の修飾によって本来の生理機能や局在性などが細かく調節される。例えばリン酸化は酵素などの活性を調節したり、他の生体分子との相互作用を調節したりすることによってシグナル伝達などで重要な役割を果たしている。またユビキチン化は分解を調節するほか、他のタンパク質との相互作用を介して DNA 修復などにも関わっている。そのため、これらの修飾が正常に行われないと、結果的に疾患病態を引き起こす場合もある。実際多くのがん細胞では、シグナル伝達に関わるタンパク質のリン酸化が亢進しており、これががん細胞の増殖性や転移性に影響を及ぼしていると考えられている。近年網羅的タンパク質分析技術として目覚ましい発展を遂げたプロテオミクスは、疾患に伴う翻訳後修飾の変化を網羅的かつ高感度に検出する技法としても極めて有効であり、今後多くの成果が得られるものと期待される。そこで本稿では、翻訳後修飾異常と疾患の関係に関する最新の知見の中から主なものを取り上げて概説する。

1 序論

疾患は様々な原因によって引き起こされ、多くの場合複数の要因が発症や増悪化のメカニズムに関わっている。基本的には両親から受け継いだ遺伝的要因（先天的形質）を背景とし、これに生活環境などの後天的・環境的要因が加わることによって発症するものと考えられており、適切な診断治療を行なうためには、これらの要因を明らかにする必要がある。遺伝的要因を決定しているものはゲノム DNA の塩基配列情報（遺伝子情報）であるが、実際に機能している分子は翻訳産物としてのタンパク質である。また多くのタンパク質は、翻訳後にさまざまな修飾を受け、これによって本来の生理機能を獲得したり、細胞内局在性や複合体形成能がコントロールされたり、分解除去が調節されたりしている。従って、翻訳後修飾に異常が起きると細胞の増殖制御や分化機能に支障を来し、さまざまな疾患が引き起こされる。近年網羅的なタンパク質分析技術として目覚ましい発展を遂げたプロテオミクスは、疾患に伴う翻訳後修飾の変化を網羅的かつ高感度に検出する技法としても極めて有効である。平成 20 年から 10 年間にわたり横浜市立大学において実施されている文部科学省イノベーションシステム整備事業『翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成』プログラムの中でも、疾患に伴う翻訳後修飾異常の解析が行なわれており、多くの情報が得られている。本稿ではこれまでに明らかになった翻訳後修飾異常

と疾患の関係に関する知見の中から主なものを取り上げて概説する。

2 リン酸化修飾異常と疾患

2-1 BCR-ABL 融合タンパク質によるチロシンキナーゼ活性の異常亢進と慢性骨髄性白血病（CML）の関係

慢性骨髄性白血病（CML）細胞およびフィラデルフィア染色体陽性の急性リンパ性白血病（Ph+ ALL）細胞では、第 9 番と第 22 番染色体の相互転座によって BCR 遺伝子と ABL1 遺伝子が連結し、BCR タンパク質（Breakpoint cluster region protein）がチロシンキナーゼ ABL1（Tyrosine-protein kinase ABL1）と融合した形で産生される¹⁾。この BCR-ABL 融合タンパク質は恒常的に高いチロシンキナーゼ活性を有しており²⁾、その結果下流のシグナル伝達経路のタンパク質リン酸化が亢進し、がん化や増悪化が引き起こされるものと考えられている。

この知見に基づき、BCR-ABL チロシンキナーゼを分子標的とする抗がん剤イマチニブ（Imatinib）が開発され、治療薬として広く利用されているが、長期の投薬中に BCR-ABL 融合遺伝子上にさらなる変異が生じ、イマチニブに対する抵抗性を獲得することが多く、より効果的な治療薬の開発が望まれている。これに対し、翻訳後修飾プロテオミクスの手法を用いて BCR-ABL チロシンキナーゼの下流因子の網羅的探索が行なわれ、新たな治療薬開発の候補タンパク質が見いだされている^{3)~5)}。今後プロテオ

ミクスに基づく創薬研究が益々盛んになるものと期待される。

2-2 イマチニブ抵抗性消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor: GIST) 細胞におけるタンパク質リン酸化の亢進と EGF 受容体シグナル伝達経路の関わり

消化管間質腫瘍 (GIST) 細胞では、がん原遺伝子 *c-KIT* の変異によって受容体型チロシンキナーゼ KIT (Mast/stem cell growth factor receptor Kit) の活性が異常に亢進しており、これが主要な発症要因であると考えられている。イマチニブはもともと BCR-ABL チロシンキナーゼを分子標的として開発された抗がん剤であるが、KIT チロシンキナーゼにも高い阻害効果を示し、GIST 細胞に対しても増殖抑制効果が認められたことから、我が国でも 2003 年に GIST 患者への適応が承認された。しかしながら、イマチニブの長期投与を受けた患者の一部で治療中にがんの抑制効果が低下する場合があります。不応答化のメカニズムの解明と新たな治療戦略の開発が望まれている。そこで Nagata ら⁶⁾ は、イマチニブ感受性の GIST 細胞株 (GIST882) と、イマチニブへの抵抗性を獲得した GIST 細胞株 (GIST882-R) を定量的リン酸化プロテオーム解析法によって網羅的に比較解析し、KIT および EGFR (Epidermal growth factor receptor) シグナル伝達経路のタンパク質にリン酸化の亢進が見られることをつきとめた。そこでさらに EGFR 阻害活性を有する分子標的薬ゲフィチニブ (Gefitinib, 商品名イレッサ) を培地に添加すると GIST882-R の増殖が抑制されたことから、GIST のイマチニブ抵抗性獲得に EGFR シグナル伝達経路のタンパク質リン酸化の亢進が関わっていることが確認された。

2-3 予後不良肺腺がんにおけるチロシンリン酸化の亢進

上皮間葉転移 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) は、発生の過程で上皮細胞が細胞極性や細胞接着性を失い、間葉系の細胞へと変化する現象であるが、上皮系がん細胞の浸潤や転移にも深く関わっていると考えられている。そこで Okayama ら⁷⁾ は、TGF- β 刺激によって誘導される肺腺がん細胞の EMT に伴うチロシンリン酸化タンパク質の変化を LC-MS/MS を用いて定量的に比較分析した結果、Tensin-1 (TNS1) のチロシン 1404, Hepatocyte growth factor receptor (c-Met) のチロシン 1234, および NT-3 growth factor receptor (TrkC) のチロシン 516 のリン酸化が有為に上昇することを見いだした。またウエスタンブロット法によってこれらの変化はタンパク質発現量の上昇によるものでなくリン酸化レベルの亢進によるものであることが確認された。さらにこれらの部位におけるリン酸化レベルを Multiple reaction monitoring (MRM) 法で定量する技術を確認し、38 症例の患者 (予後良好群 25 例、予

後不良群 13 例) の肺がん組織について詳細に調べたところ、予後良好群に対し予後不良群で、それぞれ 37.6 倍、5.2 倍、および 42.1 倍にリン酸化レベルが上昇しており、統計学的にも有為な差 ($p < 0.0001$) があることが確認された。この結果は、術後直ちにこれらの部位のチロシンリン酸化レベルを定量することによって、予後を予測できる可能性があることを示しており、実用化を目指した研究開発が進められている。

2-4 前立腺がん細胞のアンドロゲン除去療法抵抗性獲得における THRAP3 (Thyroid hormone receptor-associated protein 3) タンパク質リン酸化レベルの関わり

前立腺がんに対する治療法の一つにアンドロゲン除去療法がある。治療前の前立腺細胞の増殖にはアンドロゲン依存性が認められることを利用したもので、外科的去勢あるいは性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LH-RH, Gonadoliberin) アゴニスト等の投与による内科的去勢 (ホルモン療法) によりアンドロゲンの分泌を枯渇させることで前立腺がんの進行を抑えようというものである。しかし長期間アンドロゲン除去療法を続けていると、アンドロゲン非依存性の増殖性を獲得し、前立腺がん細胞の増殖が再び上昇する症例が多くみられる。このような再燃患者に対する新たな治療法を開発するためには、アンドロゲン依存性の前立腺がん細胞がアンドロゲン非依存性の増殖能を獲得するメカニズムを明らかにする必要がある。それに対し Ino ら⁸⁾ は、アンドロゲン依存性の前立腺がん細胞 (LNCaP 細胞) をアンドロゲン除去培地中で長期間培養しアンドロゲン非依存性となった前立腺がん細胞 (LNCaP-AI 細胞) を 2 株樹立し、これらの細胞と元の LNCaP 細胞とを定量的リン酸化プロテオーム解析によって比較した結果、66 種のタンパク質においてリン酸化レベルに有意な差があることを見いだした。これらのタンパク質のうち、アンドロゲン受容体の転写共役因子であることが知られている THRAP3 において、セリン 248 およびセリン 253 のリン酸化レベルがアンドロゲン非依存性の増殖能の獲得に伴い劇的に低下することがわかった。さらにこれらの部位におけるリン酸化/脱リン酸化が THRAP3 の生理機能に及ぼす影響を明らかにするため、アラニン置換非リン酸化型変異体タンパク質 (S248A/S253A-THRAP3)、およびアスパラギン酸置換疑似リン酸化型変異体タンパク質 (S248D/S253D-THRAP3) を HaloTag 融合タンパク質として LNCaP-AI 細胞内で発現させ、それらと特異的に結合するタンパク質を LC-MS/MS で同定したところ、両者で差が見られたタンパク質の多くは RNA スプライシングや RNA プロセッシングに関わる因子であった。そのうち特に非リン酸化型変異体 THRAP3 タンパク質に特異的に結

合していた pre-mRNA-processing factor 6 は、アンドロゲン受容体の転写活性調節に関わっている⁹⁾ことが既に知られているタンパク質であることから、THRAP3 のセリン 248 およびセリン 253 におけるリン酸化/脱リン酸化が pre-mRNA-processing factor 6 との複合体形成を調節し、これを介して前立腺がん細胞のアンドロゲン非依存的増殖性獲得が行われているものと推察される。

3 糖鎖修飾異常と疾患

3-1 糖鎖修飾酵素遺伝子 *POMGnT1* の変異と Muscle eye brain disease (MEB 病) の関係

MEB 病は、先天性筋ジストロフィーに眼奇形と脳の形態形成異常を伴う常染色体劣性遺伝病である。Manya ら¹⁰⁾は、MEB 病患者における *POMGnT1* 遺伝子変異により、遺伝子産物である GlcNAc 転移酵素 POMGnT1 (*O*-linked mannose β 1,2-*N*-acetylglucosaminyltransferase 1) の活性が失われることを見出した。その結果 *O*-マンノース型糖鎖の末端構造が正常に形成できなくなり、 α -ジストログリカンに糖鎖修飾異常を来すことが MEB 病の発症要因になっていることが明らかとなった。筋ジストロフィー患者では、*POMGnT1* 遺伝子の他にも多くの糖鎖修飾関連遺伝子に変異が見つかっており (Table 1), 筋ジストロフィーの発症における糖鎖修飾異常の関わりが示唆されている。

3-2 糖鎖修飾酵素遺伝子 *B3GALT6* の変異と関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 I 型 (SEMD-JL1) の関係

Nakajima ら¹⁴⁾は、重度の骨格異常を起こす遺伝性疾患「関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 I 型 (Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, type 1: SEMD-JL1)」の患者 6 家系で *B3GALT6* 遺伝子に変異を見いだした。この遺伝子は β (1,3)-ガラクトース転移酵素をコードしており、この変異によりプロテオグリカンの成熟過程における糖鎖 (glycosaminoglycan: GAG) 付加修飾が正常に行なわれなくなることによって、骨、軟骨、靭帯、皮膚などの組織に異常が起きるものと考えられている。

3-3 骨髄腫患者に見られる IgG κ 鎖の糖鎖修飾異常とクリオグロブリン血症の関係

クリオグロブリン血症は、血液が四肢の皮膚や皮下組織を流れて冷やされたときに免疫グロブリンが析出・沈降する病態で、四肢末梢の疼痛や紫斑を伴う。多発性骨髄腫細胞において産生される単クローン性免疫グロブリン (M タンパク) が時としてクリオグロブリン血症を呈するが、そのメカニズムは不明であった。Toda ら¹⁵⁾は四肢末梢疼痛を伴う多発性骨髄腫患者のクリオグロブリンについて PNGase F 処理による糖鎖切断前後での分子量の違いを SDS 電気泳動・ウエスタンブロット法で解析したところ、IgG の κ 鎖に異常な N 型糖鎖修飾が起きていることを見いだした。さらに質量分析によって糖鎖結合部位のペプチド構造を詳しく調べ、 κ 鎖の可変領域において健常者では Thr-Leu-Ser であるところが Asn-Leu-Ser (N 型糖鎖結合部位のコンセンサス配列 NXS/T に合致) に変異していることを突き止めた。この変異はゲノムレベルで 1 塩基置換 (C \rightarrow A) によって生じたものであり、修飾を受けるタンパク質側の遺伝子に点突然変異が起きることによって異常な N 型糖鎖修飾が生じ、低温による免疫グロブリンの凝集 (クリオグロブリン血症) が引き起こされたものと考えられる。

4 シトルリン化修飾異常と疾患

4-1 シトルリン化修飾と関節リウマチの関係

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) は、四肢の関節痛および関節の変形を主症状とする自己免疫疾患である。RA 患者の血液バイオマーカーとして最初に同定されたリウマチ因子 (Rheumatoid factor: RF) は IgG に対する自己抗体であり RA の検査に利用されているが、他の疾患においても出現することがあり特異度は必ずしも高くない。それに対し、特異度も感度も高い新たなマーカーとして、抗環状シトルリン化ペプチド (Cyclic citrullinated peptide: CCP) 抗体が近年注目されている。RA に特異度が高い自己抗体として、すでに抗 perinuclear factor 抗体 (APF) や抗ケラチン抗体 (AKA) なども報告されていたが、Schellekens ら¹⁶⁾は、これらの自己抗体がシトルリン

Table 1 Glycosylation-related genes of which mutations were found in various muscular dystrophies

Gene	Protein	Function
<i>POMGnT1</i> ¹⁰⁾	Protein <i>O</i> -linked-mannose β -1,2- <i>N</i> -acetylglucosaminyl-transferase 1	Participates in <i>O</i> -mannosyl glycosylation.
<i>FKTN</i> ¹¹⁾	Fukutin	Glycosyltransferase involved in the biosynthesis of the phosphorylated <i>O</i> -mannosyl trisaccharides.
<i>POMT1</i> ¹²⁾	Protein <i>O</i> -mannosyl-transferase 1	Transfers mannosyl residues to the hydroxyl group of serine or threonine residues.
<i>FKRP</i> ¹³⁾	Fukutin-related protein	Glycosyltransferase involved in the biosynthesis of the phosphorylated <i>O</i> -mannosyl trisaccharides.

化されたフィラグリンに対しても反応性を示すことを見いだし、そのエピトープはシトルリン化されたアルギニン残基を含むペプチド領域であることを突き止めた。さらにその領域の配列を含む人工的な環状シトルリン化ペプチド (CCP) を合成し、これを抗原として用いることによって RA 患者の自己抗体を高感度で検出できることを確認して、臨床検査用の ELISA キットとして製品化されるに至っている。しかしながら関節内にはシトルリン化フィラグリンは存在しないため、RA 患者において自己抗体の標的抗原となっているのは別のシトルリン化タンパク質であると考えられる。これに対し Wang ら¹⁷⁾ は、RA 患者の関節液 (滑液) 中のシトルリン化タンパク質を抗シトルリン抗体で免疫沈降し、還元アルキル化および Lys-C 消化後に LC-MALDI-TOF/TOF MS 解析を行なうことによって、83 種のシトルリン化タンパク質を同定しており、これらのタンパク質のシトルリン化修飾異常が RA における関節炎の発症に関わっているものと考えられる。

4-2 シトルリン化修飾とアルツハイマー型認知症の関係

アルツハイマー型認知症患者の脳組織中に、高度にリン酸化されたタウタンパク質や、ベータアミロイドペプチドが蓄積されていることはよく知られているが、さらに Ishigami ら^{18),19)} はシトルリン化タンパク質も増加していることを見だし、MALDI-TOF/TOF MS によってその主要な成分がミエリン塩基性タンパク質 (Myelin basic protein: MBP) であることをつきとめた。MBP はニューロン軸索の髄鞘を構成する主要なタンパク質成分であり、アルギニンはその塩基性のもとになる重要なアミノ酸残基であることから、シトルリン化修飾の異常がアルツハイマー型認知症に見られるニューロン軸索の脱髄変性の要因の一つであると考えられる。

5 ユビキチン化修飾異常と疾患

5-1 ユビキチン化修飾とパーキンソン病の関係

パーキンソン病は、黒質のドーパミン作動性ニューロンが失われることにより、安静時の震えや、歩行の障害、姿勢保持の障害、動作緩慢などの運動障害が起きる難治性神経変性疾患である。高齢になるほど罹患率が高くなり、65 歳を超えると 1% 以上の人が発症するといわれている。高齢で発症したパーキンソン病患者の多くは孤発性であるが、一部の患者 (5 ~ 10%) には家族性が認められ、遺伝子の異常が関与する。特に若年で発症したパーキンソン病患者において原因遺伝子 *PARK2*²⁰⁾ および *PINK1*²¹⁾ が特定されており、これらの翻訳タンパク質である E3 ユビキチンリガーゼ Parkin とセリン/トレオニンキナーゼ PINK1 は、酸化ストレスによって損傷を受けたミトコンドリアの外膜タンパク質をユビキチン化し、選択的なオートファ

ジー (ミトファジー) で分解除去するプロセスに関わっている²²⁾ ことがわかっている。そもそも PINK1 は正常なミトコンドリア外膜上においては速やかに分解されリン酸化活性が抑えられているが、損傷を受け膜電位が低下したミトコンドリア外膜上では安定化することによって活性が上昇し、ユビキチンと Parkin の双方が PINK1 によってリン酸化される。さらにリン酸化ユビキチンによって Parkin の E3 ユビキチンリガーゼが活性化され、MFN (Mitofusin) や TOM70 (Mitochondrial import receptor subunit), VDAC (Voltage-dependent anion-selective channel protein), RHOT (Mitochondrial Rho GTPase) などのミトコンドリア外膜タンパク質がユビキチン化を受けることによって選択的オートファジー (ミトファジー) が誘導され、損傷ミトコンドリアが分解除去される。PINK1 や Parkin をコードする遺伝子 (*PINK1*, *PARK2*) に異常がある患者ではミトコンドリアの品質維持機能が正常に働かず、損傷ミトコンドリアが発生する酸化ストレスによって神経変性が引き起こされ、パーキンソン病が発症すると考えられる。多くの孤発性パーキンソン病患者ではこれらの遺伝子に異常が見られないが、老化に伴うミトコンドリア外膜のモノアミン酸化酵素 (Monoamine oxidase B: MAOB) 活性の上昇や酸化ストレスの増加によりミトコンドリアの損傷速度がミトファジーによる分解処理能力を上回ると、最終的に神経変性に至るものと考えられる。

家族性パーキンソン病患者の遺伝子解析により、*PARK2*²⁰⁾ や *PINK1*²¹⁾ のほかにも *SNCA*²³⁾, *UCHL1*²⁴⁾, *DJ-1*²⁵⁾, *LRRK2*²⁶⁾ などの遺伝子に変異がある症例が見つかっている (Table 2)。このうち *SNCA* はパーキンソン病患者脳組織に蓄積されるレビー小体の主要構成タンパク質 α -Synuclein をコードしている²³⁾。 α -Synuclein はアミノ酸 140 残基からなる分子量 14,460 の比較的小きなタンパク質で、主に大脳皮質、海馬、黒質、視床および小脳に発現する。機能は不明であるが、特にシナプス前終末やミトコンドリア内膜に局在することから、神経伝達やミトコンドリア機能の調節に関わっていると考えられている。変異した *SNCA* 遺伝子によって作られる異常な α -Synuclein では α ヘルックス構造が不安定となり、レビー小体への凝集が起こると考えられている²⁷⁾。なおレビー小体中の α -Synuclein はセリン 129 のリン酸化^{28),29)} やリシン 12, リシン 21, リシン 23 のモノユビキチン化^{30),31)} を受けていることもわかっており、これらの翻訳後修飾が何らかの形でレビー小体への凝集に関わっているものと思われる。また凝集した α -Synuclein は分解抵抗性を有しており、オートファジーを阻害すると考えられる³²⁾。

UCHL1 遺伝子はユビキチン前駆体タンパク質 (Polyubiquitin-C) や、E3 ユビキチンリガーゼによって重合されたイソペプチド結合型ポリユビキチン鎖の C 末端

Table 2 Major genes identified for Parkinson's disease

Gene	Protein	Function
<i>PARK2</i> ²⁰⁾	E3 ubiquitin-protein ligase Parkin	Ubiquitin ligase involved in the ubiquitination of mitochondrial proteins.
<i>PINK1</i> ²¹⁾	Serine/threonine-protein kinase PINK1	Protein kinase involved in the clearance of damaged mitochondria via selective autophagy (mitophagy).
<i>SNCA</i> ²³⁾	α -synuclein	Presynaptic protein involved in the regulation of dopamine release.
<i>UCHL1</i> ²⁴⁾	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase UCH-L1	Protease involved in the processing both of ubiquitin precursors and of ubiquitinated proteins.
<i>DJ-1</i> ²⁵⁾	Protein deglycase DJ-1	Protein deglycase involved in the cell protection against oxidative stress and cell death.
<i>LRRK2</i> ²⁶⁾	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase LRRK2	Protein kinase involved in the regulation of autophagy.

グリシンのペプチド結合を切断しユビキチンモノマーを生成する特異的な加水分解酵素 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1: UCH-L1) をコードしており, この遺伝子に変異があるパーキンソン病患者では, ユビキチンモノマーの生成およびポリユビキチン鎖の分解が低下していると考えられている³³⁾. さらに UCH-L1 タンパク質は酸化修飾を受けるとユビキチン鎖切断活性が低下することが明らかにされており³⁴⁾, 孤発性のパーキンソン病との関わりが示唆されている.

6 アセチル化修飾異常と疾患

6-1 ヒストンのアセチル化とがん

アセチル化は, タンパク質の N 末端 α アミノ基やリシン残基の ϵ アミノ基に対する翻訳後修飾であり, 多くのタンパク質の機能調節に関わっている. とりわけ染色体上の遺伝子の転写活性が高い領域ではヒストンのリシン残基が高度にアセチル化されていることから, ヒストンのアセチル化は遺伝子発現を正に制御していると考えられている.

ヒストンのアセチル化レベルはヒストンアセチル基転移酵素 (Histone acetyltransferase: HAT) とヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase: HDAC) のバランスによって調節されており, 各種がん細胞において HDAC 活性の亢進と抗がん剤耐性との関連性が報告されている^{35),36)}. またヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤によるがん治療効果の改善を目指した研究も数多く報告されており^{37)~39)}, 今後の成果が期待されている.

一方 Karczmarski ら⁴⁰⁾ は, 網羅的なプロテオーム解析によって大腸がん組織と正常コントロール組織のアセチル化タンパク質を比較し, ヒストン H3 のリシン 27 のアセチル化 (H3K27Ac) が大腸がん組織で有意に上昇していることを報告している. また Shen ら⁴¹⁾ は, 大腸がんの原発組織と肝転移組織のリシンアセチル化タンパク質を比較し, ヒストン H3 のリシン 19 のアセチル化 (H3K19Ac) およびヒストン H2B のリシン 121 のアセチル化 (H2BK121Ac)

が肝転移組織において有意に上昇していることを見いだしており, 転写活性の調節への関わりが示唆されている.

7 脂質修飾異常と疾患

タンパク質の脂質修飾には *N*-ミリスチル化や *S*-パルミトイル化, プレニル化, GPI 化などが含まれる. *N*-ミリスチル化の多くは翻訳と同時に起ることがわかっているが, 広義の翻訳後修飾に分類される. これらの脂質修飾によってタンパク質に疎水性の構造が付加され, 細胞膜などの脂質成分との親和性が増す.

7-1 *N*-ミリスチル化と疾患

タンパク質の *N*-ミリスチル化は, *N* 末端グリシンに 14 炭素鎖飽和脂肪酸であるミリスチン酸がアミド結合により付加する不可逆的な脂質修飾である. *N*-ミリスチル化は, 最初エドマン分解を妨害する *N* 末端修飾因子として見つかかり, 後に質量分析によって構造が確認された. 大部分の *N*-ミリスチル化は, *N*-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) により翻訳と並行して修飾が起こる『翻訳時修飾』であるが, 近年アポトーシスの際にカスパーゼにより切断され露出した *N* 末端グリシンに対しても *N*-ミリスチル化が起きていることがわかり⁴²⁾, 翻訳後修飾としての *N*-ミリスチル化の研究も進められている.

N-ミリスチル化を受けるタンパク質として, これまでに Src や Fyn, Lyn などの Src キナーゼファミリー⁴³⁾, c-Abl などのチロシンキナーゼ⁴⁴⁾, cAMP 依存性セリン/スレオニンキナーゼ⁴⁵⁾, カルシニューリン B⁴⁶⁾ などが報告されている.

がん遺伝子産物である Src キナーゼファミリータンパク質は, *N*-ミリスチル化を介して自己リン酸化を受けるとキナーゼ活性が上昇することから, がん細胞の増殖性と密接に関係していると考えられている⁴⁷⁾. また結腸がんの組織では *N*-ミリスチル化酵素 (NMT) の活性が上昇していることがわかっている⁴⁸⁾. Src および Fyn は

NMDA 型グルタミン受容体のチロシンリン酸化を担っているが、受容体との会合には *N*-ミリスチル化が関わっており、神経疾患への関与が示唆されている。例えばてんかんを発症した患者においては、NMT の発現が上昇する一方で、NMT 活性を阻害する熱ショックタンパク質 HSC70 (Heat shock cognate 71 kDa protein) の発現が低下しているとの報告がある⁴⁹⁾。

また特殊な例としてヌーナン (Noonan) 症候群が知られている。ヌーナン症候群は低身長、先天性心疾患、発達遅滞を特徴とする疾患で、Leucine-rich repeat protein (SHOC2) をコードする遺伝子に変異が見つかった⁵⁰⁾。正常な SHOC2 はミリスチル化を受けないが、ヌーナン症候群患者ではセリン 2 がグリシンに変異しており、*N*-ミリスチル化を受けることによって膜へ輸送され、本来の機能が欠落することが疾患の要因になっているものと見られる。

7-2 GPI アンカー修飾異常と疾患

GPI アンカー型タンパク質は、C 末端側に 20 ~ 30 の疎水性アミノ酸残基 (シグナルペプチド) を持つ前駆体タンパク質からシグナルペプチド部分が取り除かれ、新たな C 末端にグリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol: GPI) がアミド結合した構造をしている。糖タンパク質と同様に、GPI アンカー型タンパク質も細胞膜への局在性を示す。GPI アンカー型タンパク質には生体防御や細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしているものが多く、GPI アンカー修飾に異常があると様々な障害が起きると考えられる。GPI アンカー型タンパク質の生合成には、小胞体膜表面における GPI の合成、前駆体タンパク質からのシグナルペプチドの除去、および GPI の連結に関わる多くの酵素が関わっており、それらの遺伝子に異常があると正常に GPI アンカー型タンパク質が作れず、様々な症状 (先天性 GPI 欠損症) を呈する。先天性 GPI 欠損症 (IGD) は知的障害、運動発達障害およびてんかんを主症状とし、時に高アルカリフォスファターゼ血症を伴う遺伝病で、これまでに 12 種類の先天性 GPI 欠損症 (*PIGM*⁵¹⁾, *PIGV*⁵²⁾, *PIGO*⁵³⁾, *PIGA*⁵⁴⁾, *PIGQ*⁵⁵⁾, *PIGW*⁵⁶⁾, *PIGL*⁵⁷⁾, *PIGN*⁵⁸⁾, *PIGT*⁵⁹⁾, *PGAP1*⁶⁰⁾, *PGAP2*⁶¹⁾, *PGAP3*⁶²⁾ 遺伝子に変異) が報告されている。てんかんの発作に伴う痙攣の症状に対しピリドキシン (脱リン酸化型ビタミン B6) の投与が著効する場合があるが、これは GPI アンカー型タンパク質である膜結合型アルカリフォスファターゼ (ALP) の発現低下が関係していると考えられている。健常者においては膜結合型 ALP がビタミン B6 を脱リン酸化し細胞内への取り込みを促しているが、IGD 患者は ALP の発現が低下しているためニューロンへのビタミン B6 の取り込みが不足し、GABA 合成が阻

害されることによって痙攣が起きるものと推察されている。今後さらに発症にかかわる GPI アンカー型タンパク質の同定が進めば、その機能を補う補充療法が可能になるものと思われる。

8 結語

タンパク質の翻訳後修飾異常と疾患との関係が次第に明らかにされてきている。これまで行なわれた多くの研究は、先天性の翻訳後修飾酵素関連遺伝子の異常に関わるものが中心であったが、今後はがんや生活習慣病、感染症など様々な疾患患者検体に対し網羅的プロテオーム解析を行うことによって、その全貌が明らかにされるものと期待される。疾患に伴う翻訳後修飾異常の解明は、臨床の現場において治療方針を決定し個別化医療を実現するための診断バイオマーカーとなるばかりでなく、新たな治療薬を開発するための創薬標的としても極めて重要である。質量分析技術の進歩は目覚ましく、Data-dependent acquisition (DDA) MS/MS に基づく MRM (SRM) 法に加え、近年 SWATH 法や MSE 法、All ion fragmentation 法などの Data-independent acquisition (DIA) MS/MS 技術を駆使して、より網羅的で高感度の定量分析が行えるようになってきているが、翻訳後修飾を含むペプチドの分析においてはサンプルの前処理技術や、修飾基特異的な濃縮技術の改良など、まだ多くの課題が残されている。今後さらにこれらの技術が進歩することによって、翻訳後修飾異常と疾患との関係の全貌が明らかにされるものと期待される。

利益相反

著者に開示すべき利益相反状態はありません。

文献

- 1) Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, *et al.* The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233:212-214.
- 2) McWhirter JR, Wang JY. Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol Cell Biol*. 1991;11:1553-1565.
- 3) Lee CF, Griffiths S, Rodríguez-Suárez E, *et al.* Assessment of downstream effectors of BCR/ABL protein tyrosine kinase using combined proteomic approaches. *Proteomics*. 2010;10:3321-3342.
- 4) Preisinger C, Kolch W. The Bcr-Abl kinase regulates the actin cytoskeleton via a GADS/Slp-76/Nck1 adaptor protein pathway. *Cell Signal*. 2010;22:848-856.
- 5) Preisinger C, Schwarz JP, Bleijerveld OB, *et al.* Imatinib-dependent tyrosine phosphorylation profiling of Bcr-Abl-positive chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2013;27:743-746.
- 6) Nagata K, Kawakami T, Kurata Y, *et al.* Augmentation of multiple protein kinase activities associated with secondary imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors as revealed

- by quantitative phosphoproteome analysis. *J Proteomics*. 2015;115:132–142.
- 7) Okayama A, Miyagi Y, Oshita F, *et al.* Identification of tyrosine-phosphorylated proteins upregulated during epithelial-mesenchymal transition induced with TGF- β . *J Proteome Res*. 2015;14:4127–4136.
 - 8) Ino Y, Arakawa N, Ishiguro H, *et al.* Phosphoproteome analysis demonstrates the potential role of THRAP3 phosphorylation in androgen-independent prostate cancer cell growth. *Proteomics*. 2016;16:1069–1078.
 - 9) Zhao Y, Goto K, Saitoh M, *et al.* Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment. Identification of the p102 U5 small nuclear ribonucleoprotein particle-binding protein as a coactivator for the receptor. *J Biol Chem*. 2002;277:30031–30039.
 - 10) Manya H, Sakai K, Kobayashi K, *et al.* Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306:93–97.
 - 11) Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E, *et al.* Structural organization, complete genomic sequences and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett*. 2001;489:192–196.
 - 12) Beltrán-Valero de Bernabé D, Currier S, Steinbrecher A, *et al.* Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002;71:1033–1043.
 - 13) Brockington M, Yuva Y, Prandini P, *et al.* Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*. 2001;10:2851–2859.
 - 14) Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, *et al.* Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet*. 2013;92:927–934.
 - 15) Toda T, Nakamura M, Yamada M, *et al.* Glycoproteomic analysis of abnormal N-glycosylation on the kappa chain of cryocryoglobulin in a patient of multiple myeloma. *J Electroph*. 2009;53:1–6.
 - 16) Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, *et al.* Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998;101:273–281.
 - 17) Wang F, Chen FF, Gao WB, *et al.* Identification of citrullinated peptides in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using LC-MALDI-TOF/TOF. *Clin Rheumatol*. 2016;35:2185–2194.
 - 18) Ishigami A, Ohsawa T, Hiratsuka M, *et al.* Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2005;80:120–128.
 - 19) Ishigami A, Masutomi H, Handa S, *et al.* Mass spectrometric identification of citrullination sites and immunohistochemical detection of citrullinated glial fibrillary acidic protein in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Res*. 2015;93:1664–1674.
 - 20) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392:605–608.
 - 21) Valente EM, Salvi S, Ialongo T, *et al.* PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol*. 2004;56:336–341.
 - 22) Imai Y, Lu B. Mitochondrial dynamics and mitophagy in Parkinson's disease: Disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21:935–941.
 - 23) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276:2045–2048.
 - 24) Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, *et al.* UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol*. 2004;55:512–521.
 - 25) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, *et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299:256–259.
 - 26) Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, *et al.* A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*. 2005;365:415–416.
 - 27) Dettmer U, Newman AJ, Soldner F, *et al.* Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. *Nat Commun*. 2015;6:7314–7329.
 - 28) Fujiwara H1, Hasegawa M, Dohmae N, *et al.* α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 2002;4:160–164.
 - 29) Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, *et al.* Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem*. 2006;281:29739–29752.
 - 30) Tofaris GK, Razaq A, Ghetti B, *et al.* Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem*. 2003;278:44405–44411.
 - 31) Engelender S. Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease. *Autophagy*. 2008;4:372–374.
 - 32) Tanik SA, Schultheiss CE, Volpicelli-Daley LA, *et al.* Lewy body-like α -synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J Biol Chem*. 2013;288:15194–15210.
 - 33) Leroy E, Boyer R, Auburger G, *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 1998;395:451–452.
 - 34) Choi J, Levey AI, Weintraub ST, *et al.* Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem*. 2004;279:13256–13264.
 - 35) Krumm A, Barckhausen C, Kück P, *et al.* Enhanced histone deacetylase activity in malignant melanoma provokes RAD51 and FANCD2-triggered drug resistance. *Cancer Res*. 2016;76:3067–3077.
 - 36) Zhao YX, Wang YS, Cai QQ, *et al.* Up-regulation of HDAC9 promotes cell proliferation through suppressing p53 transcription in osteosarcoma. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:11818–11823.
 - 37) Zhang Y, Xu Q, Liu G, *et al.* Effect of histone deacetylase on prostate carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:15030–

- 15034.
- 38) He W, Wu Y, Tang X, *et al.* HDAC inhibitors suppress c-Jun/Fra-1-mediated proliferation through transcriptionally downregulating MKK7 and Raf1 in neuroblastoma cells. *Oncotarget*. 2016;7:6727–6747.
 - 39) Xue K, Gu JJ, Zhang Q, *et al.* Vorinostat, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, promotes cell cycle arrest and re-sensitizes rituximab- and chemo-resistant lymphoma cells to chemotherapy agents. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142:379–387.
 - 40) Karczmarski J, Rubel T, Paziewska A, *et al.* Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. *Clin Proteomics*. 2014;11:24–33
 - 41) Shen Z, Wang B, Luo J, *et al.* Global-scale profiling of differential expressed lysine acetylated proteins in colorectal cancer tumors and paired liver metastases. *J Proteomics*. 2016;142:24–26.
 - 42) Perinpanayagam MA, Beauchamp E, Martin DD, *et al.* Regulation of co- and post-translational myristoylation of proteins during apoptosis: interplay of N-myristoyltransferases and caspases. *FASEB J*. 2013;27:811–821.
 - 43) Patwardhan P, Resh MD. Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity. *Mol Cell Biol*. 2010;30:4094–4107.
 - 44) Choi Y, Seeliger MA, Panjarian SB, *et al.* N-myristoylated c-Abl tyrosine kinase localizes to the endoplasmic reticulum upon binding to an allosteric inhibitor. *J Biol Chem*. 2009;284:29005–29014.
 - 45) Carr SA, Biemann K, Shoji S, *et al.* n-Tetradecanoyl is the NH₂-terminal blocking group of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:6128–6131.
 - 46) Aitken A, Cohen P, Santikarn S, *et al.* Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *FEBS Lett*. 1982;150:314–318.
 - 47) Wright MH, Heal WP, Mann DJ, *et al.* Protein myristoylation in health and disease. *J Chem Biol*. 2010;3:19–35.
 - 48) Magnuson BA, Raju RV, Moyana TN, *et al.* Increased N-myristoyltransferase activity observed in rat and human colonic tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1630–1635.
 - 49) Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Charavaryamath C, *et al.* Expression of myristoyltransferase and its interacting proteins in epilepsy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:1132–1139.
 - 50) Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, *et al.* Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet*. 2009;41:1022–1026.
 - 51) Almeida AM, Murakami Y, Layton DM, *et al.* Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat Med*. 2006;12:846–851.
 - 52) Krawitz PM, Schweiger MR, Rödelsperger C, *et al.* Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Nat Genet*. 2010;42:827–829.
 - 53) Krawitz PM, Murakami Y, Hecht J, *et al.* Mutations in PIGO, a member of the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2012;91:146–151.
 - 54) Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, *et al.* Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993;73:703–711.
 - 55) Martin HC, Kim GE, Pagnamenta AT, *et al.* Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Hum Mol Genet*. 2014;23:3200–3211.
 - 56) Chiyonobu T, Inoue N, Morimoto M, *et al.* Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in PIGW is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *J Med Genet*. 2014;51:203–207.
 - 57) Ng BG, Hackmann K, Jones MA, *et al.* Mutations in the glycosylphosphatidylinositol gene PIGL cause CHIME syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;90:685–688.
 - 58) Maydan G, Noyman I, Har-Zahav A, *et al.* Multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome is caused by a mutation in PIGN. *J Med Genet*. 2011;48:383–389.
 - 59) Kvarnung M, Nilsson D, Lindstrand A, *et al.* A novel intellectual disability syndrome caused by GPI anchor deficiency due to homozygous mutations in PIGT. *J Med Genet*. 2013;50:521–528.
 - 60) Murakami Y, Tawamie H, Maeda Y, *et al.* Null mutation in PGAP1 impairing GPI-anchor maturation in patients with intellectual disability and encephalopathy. *PLoS Genet*. 2014;10:e1004320.
 - 61) Hansen L, Tawamie H, Murakami Y, *et al.* Hypomorphic mutations in PGAP2, encoding a GPI-anchor-remodeling protein, cause autosomal-recessive intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 2013;92:575–583.
 - 62) Howard MF, Murakami Y, Pagnamenta AT, *et al.* Mutations in PGAP3 impair GPI-anchor maturation, causing a subtype of hyperphosphatasia with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2014;94:278–287.

Protein Post-translational Modifications in Disease States

Tosifusa Toda*

*E-mail: ttoda@proteome.jp

Advanced Medical Research Center, Yokohama City University, Fukuura 3-9, Kanazawa, Yokohama, 236-0004, Japan

(Received: October 6, 2016; Revised: December 8, 2016; Accepted: December 14, 2016)

Protein function is primarily determined by genomic coding, but further precisely regulated by co- and post-translational modifications. For instance, phosphorylation may be involved in regulation of enzymatic activity, protein interaction with various molecules, cellular localization and so on. Ubiquitination may have significant roles both in protein degradation through proteasome process, and in signal transduction through protein-protein interaction. Therefore, abnormal post-translational modification may disrupt normal cell functions and result in disease states. Actually, phosphorylation of proteins involved in cell growth signaling is upregulated in most cancer cells. Comprehensive proteome analysis based on mass spectrometric technologies are also applicable to detection and identification of post-translational modifications in disease states. Thus, in this review article, I give a brief overview of the recent knowledge about relationship between post-translational modifications and disease states.

Keywords: disease states; mass spectrometry; post-translational modification; proteome.