

無細胞タンパク質合成系を用いた 脂質修飾タンパク質の網羅的探索と機能解析

内海 俊彦

無細胞タンパク質合成系は、DNA あるいは RNA を鋳型としてタンパク質を試験管内で合成する手法であり、プロテオーム解析におけるハイスループットなタンパク質発現手段として威力を発揮している。しかしこの無細胞タンパク質合成系がタンパク質の翻訳後修飾の解析に有用であることは意外に知られていない。我々は、主要なタンパク質脂質修飾が無細胞タンパク質合成系で生じ得ることに着目し、cDNA リソースと無細胞タンパク質合成系を用いて脂質修飾タンパク質の網羅的な探索法の確立を行っている。本稿では、生体内に存在する主要なタンパク質脂質修飾についてその概要ならびに最近の知見を紹介するとともに、無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質脂質修飾解析の実際について、タンパク質脂質修飾の一種であるタンパク質 *N*-ミリスチル化に関する我々の研究を例に挙げ紹介する。

1. はじめに

ゲノム解読後の課題として、生体内に存在するすべてのタンパク質の構造と機能の網羅的な解明をめざしたプロテオーム解析が進行している。タンパク質翻訳後修飾は、タンパク質の機能発現やその制御に直接関与することから、プロテオーム解析の中心課題の一つである。タンパク質の脂質修飾は、脂肪酸、イソプレノイド、リン脂質といった脂質によるタンパク質の修飾反応であり、脂質修飾タンパク質の多くは細胞情報伝達をはじめとする多くの細胞の機能発現過程において重要な役割を担っている^{1,2)}。タンパク質プレニル化やタンパク質 *N*-ミリスチル化といった主要な脂質修飾は、1970 年代末から 1980 年代初頭にかけて日本人研究者により見出された反応であり、タンパク質脂質修飾の発見とその後の機能解析における日本人研究者の

貢献は極めて大きい。この傾向は現在も続いており、生理活性ペプチドであるグレリンのオクタノイル化³⁾、オートファジー因子 Atg8 のホスファチジルエタノールアミン化⁴⁾、Wnt シグナル経路のリガンドである Wnt3a のパルミトレイン酸化⁵⁾といった新しい脂質修飾が、日本人研究者により次々と発見されている。

タンパク質脂質修飾が特に注目を集めるようになったのは、タンパク質 *N*-ミリスチル化やタンパク質プレニル化が、Src タンパク質 (p60^{src}) や Ras タンパク質 (H-Ras, N-Ras, K-Ras) といった発がん遺伝子産物に生じ、これらのタンパク質の発がん活性にこれらに生ずる脂質修飾が必須であることが明らかになってからである。その後の研究から、これらの脂質修飾は、正常細胞においても多くの細胞情報伝達に関与する生理活性タンパク質に生じ、単にタンパク質を細胞膜へつなぎ止める膜アンカーとして機能するだけでなく、タンパク質-膜間、あるいはタンパク質-タンパク質間の特異的相互作用を介して、タンパク質の細胞内局在や活性の制御を行うことにより細胞情報伝達に深く関与していることが明らかにされてきた^{1,2,6,7)}。

リン酸化やグリコシル化、ユビキチン化といった主要な翻訳後修飾の解析に関しては、近年、二次元電気泳動や液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせた解析手法

山口大学大学院医学系研究科応用分子生命科学系専攻
(〒753-8515 山口市吉田 1677-1)

Comprehensive analysis of lipid modifications of proteins
using cell-free protein synthesis system

Toshihiko Utsumi (Applied Molecular Bioscience, Graduate
School of Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi
753-8515, Japan)

他の脂質修飾タンパク質と大きく異なっている。

これらのタンパク質脂質修飾は、GTP 結合タンパク質、プロテインキナーゼ、ホスファターゼ、 Ca^{2+} 結合タンパク質、細胞膜受容体、細胞接着因子、細胞骨格タンパク質、核タンパク質など細胞の機能制御において中心的役割を担うタンパク質群に起きる。このため、これらの脂質修飾は、細胞内および細胞間情報伝達、細胞内物質輸送、細胞接着、細胞運動など多様な細胞過程で重要な役割を果たしている。また、これらの細胞機能とは全く異なり、ウイルスや微生物の細胞への感染や増殖に脂質修飾タンパク質が重要な機能を果たしていることも知られている¹⁵⁾。

これらの脂質修飾タンパク質の脂質部位は、単に膜アンカーとして機能するだけでなく、アシル化タンパク質やプレニル化タンパク質では、膜結合に影響を与えるタンパク質側の構造的要因と組み合わせ、図 2 に示したような多様な形式で、生体膜との可逆的な結合を生じ特異的な生理活性を発現する。

またこれらの脂質修飾が原形質膜のラフトと呼ばれるミクロドメインへのタンパク質の局在を介して情報伝達の制御に関わっていることを示すデータが蓄積している^{16,17)}。個々の脂質修飾タンパク質の機能発現機構の詳細について

は最近の総説を参照戴きたい^{1,6,13,18)}。

これら 3 種の主要な脂質修飾に加えて、いくつかの新しい脂質修飾が見出され、タンパク質の特異的な機能発現に関与していることが明らかにされている (図 1B)。例えば、生理活性ペプチドとして知られるグレリン (ghrelin) は、N 末端から 3 位に位置する Ser 残基の -OH 基が、炭素数 8 の飽和脂肪酸であるオクタン酸によりエステル結合を介して *O*-アシル化されている³⁾。発生過程での形態形成において重要な役割を担うヘッジホッグ (hedgehog) や、ショウジョウバエの EGF レセプターのリガンドであるスピッツ (spitz) は、成熟化し分泌する過程で N 末端 Cys 残基の α -アミノ基がアミド結合により *N*-パルミトイル化される^{19,20)}。また Wnt シグナル経路で機能するリガンドである Wnt3a は、その N 末端から 77 位の Cys 残基が *S*-パルミトイル化され²¹⁾、209 位の Ser 残基が不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸により *O*-アシル化されている⁵⁾。脂質修飾タンパク質は通常、細胞内あるいは原形質膜に結合した状態で存在するが、これらグレリン、ヘッジホッグ、スピッツ、Wnt はいずれも分泌タンパク質であり、その分泌過程において、小胞体内腔でアシル転移酵素である MBOAT ファミリータンパク質によりアシル化されることが明らか

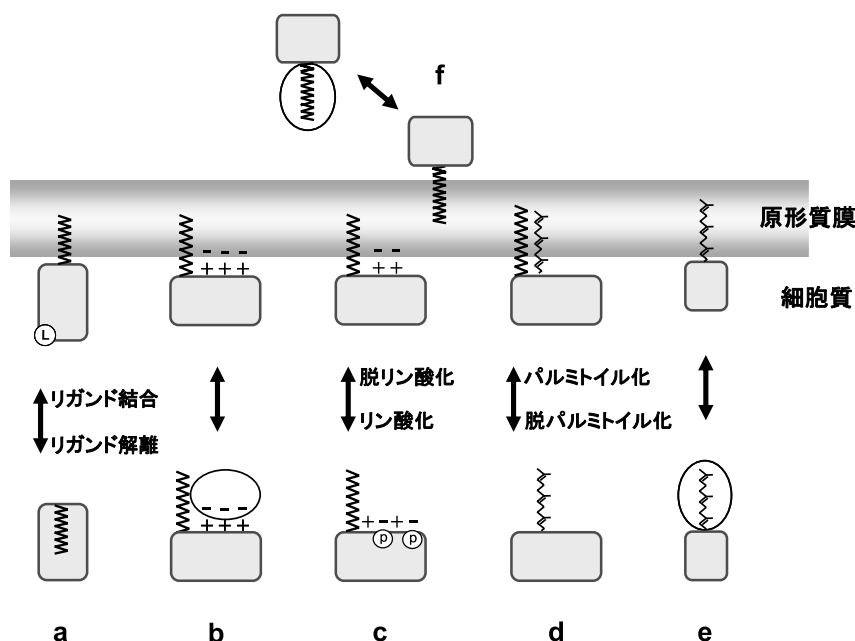


図2 アシル化タンパク質とプレニル化タンパク質の可逆的な膜結合を制御する多様なメカニズム

アシル化タンパク質やプレニル化タンパク質の脂質部位を介した膜との結合は弱く、安定な膜結合を生ずるためには、タンパク質中の連続した正電荷アミノ酸と膜リン脂質の負電荷との静電的相互作用や、パルミトイル化による二重の脂質修飾が必要とされる。これらの膜結合は、a) リガンド (Ca^{2+} , グアニンヌクレオチド等) との結合によるタンパク質構造の変化, b) 特異的なタンパク質との結合による正電荷アミノ酸のブロック, c) タンパク質リン酸化による正電荷の減少, d) 可逆的なパルミトイル化, e), f) 脂質結合ドメインを持ったタンパク質との特異的な結合, といった多様なメカニズムを介して巧妙に制御されている。

にされた^{13, 22, 23)}。ヘッジホッグではこの *N*-パルミトイル化に加え、C 末端 Gly 残基にエステル結合によりコレステロールが結合する²⁴⁾。また、酵母の自食作用（オートファジー）に必須なユビキチン様タンパク質である Atg8 とその哺乳類ホモログである LC3 の C 末端 Gly 残基のカルボキシル基が、ホスファチジルエタノールアミンのアミノ基とアミド結合により結合していることが示されている⁴⁾。これらの新しく見出された脂質修飾は、いずれも脂質修飾されたタンパク質の分泌、局在、特異的な機能発現に必須であることが明らかにされている。今後さらに新しい脂質修飾が見出されることも予想され、脂質修飾タンパク質の発現する生理機能はさらに広がりを見せるものと推測される。

3. タンパク質脂質修飾と疾患

タンパク質 *N*-ミリストイル化やタンパク質プレニル化は、発がんウイルスのがん遺伝子産物である Src タンパク質や Ras タンパク質に生ずる修飾反応であり、これらのタンパク質の発がん活性に必須であることから、がんともこれら脂質修飾との関連が知られていた²⁵⁾。特に、Ras タンパク質の変異とがん化との強い相関が明らかになり、K-Ras

タンパク質では肺がんで25%、大腸がんで50%、膵臓がんでは80%に変異が生じ、活性化していることが報告されている²⁶⁾。これらの事実を背景として、活性化 Ras の活性を阻害することにより抗がん活性を発現する抗がん剤として、プレニル化阻害剤を使用する試みが進行している²⁷⁾。また、*N*-ミリストイル化とがんとの関連についても、*N*-ミリストイル化反応を触媒する *N*-ミリストイル転移酵素 (NMT) の発現が大腸がんや腺がんでは上昇しており²⁸⁾、さらに NMT 基質である Src の活性が大腸がんや肺がん等で上昇していることが見出されている²⁹⁾。これらがんとの関連に加えて、最近、脂質修飾が直接疾患に関与している例が次々と見出されている (図3)。

ヒト遺伝性疾患であるヌーナン症候群と類似の疾患である Noonan-like syndrome においては、Ras-MAPK 経路の制御タンパク質である SHOC2 の2位 Ser 残基が、遺伝子変異に伴い Gly へと変化し、本来生じない *N*-ミリストイル化が生じる。このため、SHOC2 の細胞内局在が変化し、成長因子刺激に伴う情報伝達に異常をきたし疾患が生じる (図3A)³⁰⁾。パルミトイル化に関しては、ある種のがんやハンチントン舞踏病、統合失調症といった疾患がパルミトイル化酵素 (PAT) の機能不全と関連している可能性が示

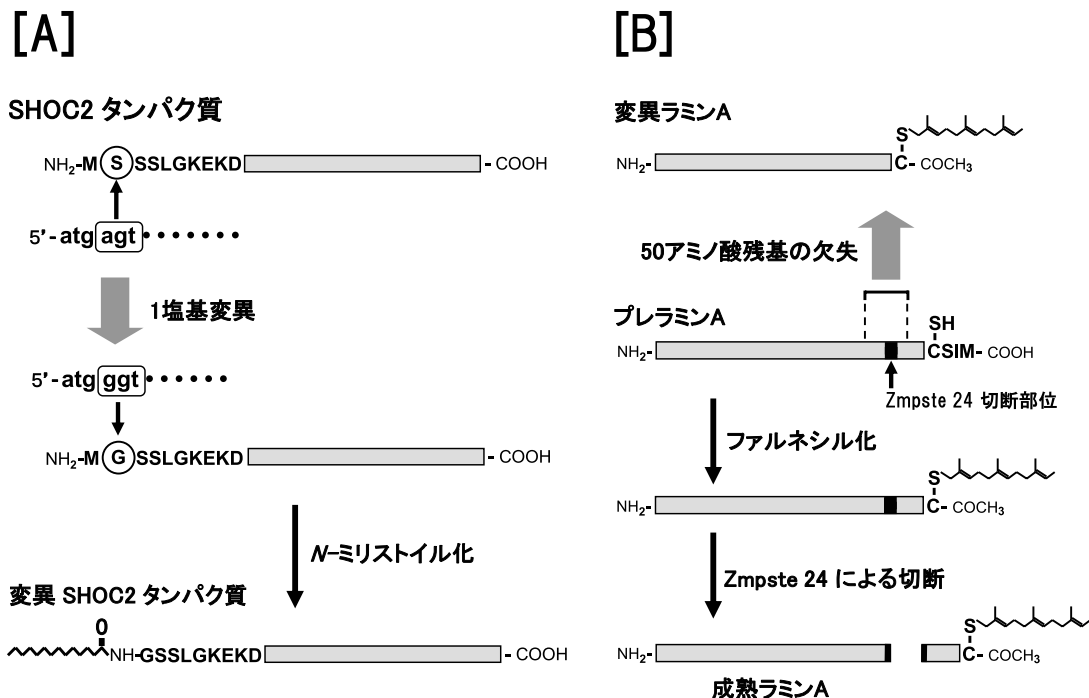


図3 タンパク質 *N*-ミリストイル化とタンパク質ファルネシル化が関与する疾病

[A]ヒト遺伝性疾患である Noonan-like syndrome では、Ras-MAPK 経路の制御タンパク質である SHOC2 の2位 Ser 残基が遺伝子変異に伴い Gly へと変化し、本来生じない *N*-ミリストイル化が生じ、SHOC2 の細胞内局在が変化することで成長因子刺激に伴う情報伝達に異常をきたし、疾患が生じる。

[B]ヒト遺伝性疾患であるプロジェリア症候群では、核タンパク質であるラミン A において、遺伝子変異に伴いラミン A 前駆体 (プレラミン A) の C 末端近傍に50 アミノ酸の欠失が起き、C 末端がファルネシル化されたままの変異ラミン A が生じる。このため、ラミン A の核への輸送に異常が起これ、正常な細胞増殖が阻害される。

唆されている³¹⁾。またプレニル化に関しても、ヒト遺伝性疾患であるプロジェリア症候群にプレニル化反応が関与していることが明らかにされた。即ち、核タンパク質であるラミン A において、遺伝子変異に伴いラミン A 前駆体(プレラミン A)の C 末端近傍に 50 アミノ酸の欠失が生じ、本来切断除去されるべきファルネシル化された C 末端が保持された変異ラミン A が生じる。このため、ラミン A の核への輸送に異常が生じ、正常な細胞増殖が阻害される(図 3B)³²⁾。さらに、GPI アンカー化については、GPI アンカーの欠損が血液疾患の一種である発作性夜間血色素尿症(PNH)や遺伝性 GPI 欠損症(IGD)と呼ばれる難治性の貧血や静脈血栓を引き起こすことが知られている³³⁾。また、GPI アンカーをタンパク質に転移するトランスアミダーゼ複合体を構成するタンパク質をコードする遺伝子(*PIG-U*, *PIG-T*, *GPAA1*)ががん遺伝子として機能することが示されている³⁴⁾。以上のように、近年、タンパク質脂質修飾の異常が疾患に直接関与する例が次々と明らかにされており、今後さらにその数は増加するものと予想される。

4. 3 種の主要な脂質修飾タンパク質の合成過程

A. アシル化タンパク質の合成

タンパク質アシル化には主として二つのタイプが存在する。一つはタンパク質 N 末端 Gly 残基に起きる *N*-ミリスチル化であり、他の一つは分子内 Cys 残基に起きる *S*-パルミトイル化である(図 4A, B)。*N*-ミリスチル化が通常タンパク質合成(翻訳)と同時に起きる不可逆的な修飾であるのに対して、*S*-パルミトイル化は翻訳後に起きる可逆的な修飾である。

N-ミリスチル化されるタンパク質の N 末端には Met-Gly-で始まる 8~9 アミノ酸から成る *N*-ミリスチル化シグナルと呼ばれる配列が存在する³⁵⁾。タンパク質の翻訳途中にメチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)により開始 Met が切断除去された後、露出した N 末端 Gly 残基の α -アミノ基に NMT がミリスチル-CoA のミリスチル基を転移する(図 4A)。

S-パルミトイル化は、タンパク質分子内部の Cys 残基にパルミトイル転移酵素(PAT)がパルミトイル-CoA のパルミトイル基を転位する反応(図 4B)である。最近、この反応を触媒する PAT として、酵母から哺乳類まで広く保存された DHHC ファミリータンパク質が同定された³⁶⁾。ヒトには 23 種類の DHHC ファミリータンパク質が存在し、それぞれの基質特異性が異なり、特異的な基質タンパク質のパルミトイル化を担っているものと考えられている。これらの PAT は膜結合酵素であり小胞体、ゴルジ体あるいは原形質膜に局在すると考えられている。

これらの細胞質で生ずる *N*-ミリスチル化と *S*-パルミトイル化に加え、最近、前述のようにいくつかの分泌タン

パク質の分子内部の Ser 残基の -OH 基がそれぞれ特異的な脂肪酸により *O*-アシル化されていることが見出され、それらのアシル化が小胞体膜上に局在するアシル転移酵素である MBOAT ファミリータンパク質により小胞体内腔で生じていることが明らかにされた¹³⁾。

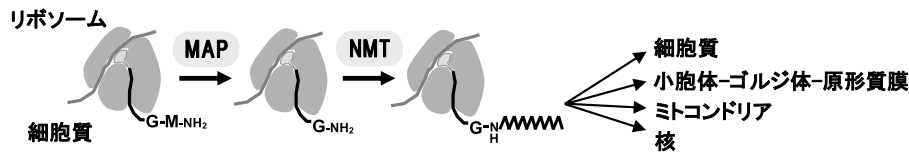
B. プレニル化タンパク質の合成

タンパク質プレニル化には、ファルネシル化(炭素数 15)と、ゲラニルゲラニル化(炭素数 20)の 2 種がある(図 1B)。ファルネシル化はファルネシル転移酵素(FTase)により、ゲラニルゲラニル化はゲラニルゲラニル転移酵素 I および II (GGTase I, II)により触媒される¹²⁾。FTase と GGTase I は、いずれも C 末端に CaaX (CaaX box: C は Cys, a は脂肪族アミノ酸, X は任意のアミノ酸)というコンセンサス配列を持つタンパク質を基質とする。X が Ala, Ser, Cys, Gln, Met の場合、CaaX box は FTase により認識され、ファルネシルピロリン酸を供与体として CaaX box の Cys の -SH 基がファルネシル化される。また、X が Leu, Ile, Phe の場合、GGTase I により認識され、ゲラニルゲラニルピロリン酸を供与体としてゲラニルゲラニル化が起きる。これらのイソプレノイドの付加に続いて、aaX の 3 アミノ酸が、プレニル化された CaaX box を認識する特異的プロテアーゼ(Rce1)により切断除去される³⁷⁾。この後、C 末端に露出した Cys 残基のカルボキシル基がメチル転移酵素(Icmt)により *S*-アデノシルメチオニンをメチル供与体としてメチル化される(図 4C)³⁸⁾。FTase と GGTase はいずれも細胞質に存在するが、Rce1 と Icmt はいずれも小胞体に局在するため、プレニル化タンパク質は小胞体を経由して原形質膜へ移行する。ゲラニルゲラニル化を触媒するもう一つの酵素である GGTase II は、C 末端に CC, CXC あるいは CCXX (C は Cys, X は任意のアミノ酸)という配列を持つタンパク質を認識し、これらの配列中の二つの Cys 残基の両方をゲラニルゲラニルピロリン酸を供与体としてゲラニルゲラニル化する³⁹⁾。

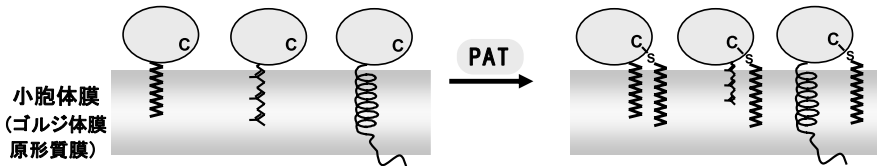
C. GPI アンカータンパク質の合成

GPI アンカータンパク質は、タンパク質 C 末端のカルボキシル基にエタノールアミンを介して GPI が結合した構造を持ち、原形質膜の外表面に局在する(図 1A)。GPI アンカータンパク質の合成は小胞体膜上の内腔側で起きる。これらのタンパク質は、N 末端にシグナルペプチドを、また C 末端に 20~30 アミノ酸から成る GPI アンカー化を指令する GPI アンカー化シグナルを持つ¹⁴⁾。細胞質の遊離リボソーム上で合成が始まった GPI アンカータンパク質前駆体は、シグナルペプチドを介して小胞体膜表面へ移行し、N 末端から膜透過を開始する。この後、C 末端に存在

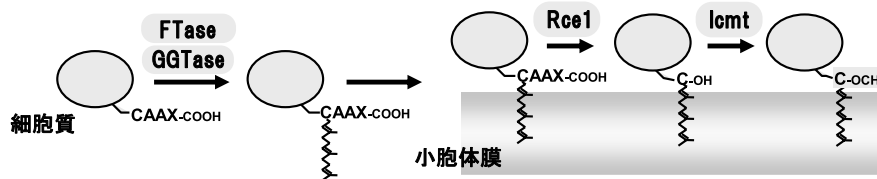
[A] *N*-ミリスチル化



[B] *S*-パルミトイル化



[C] プレニル化



[D] GPI アンカー化

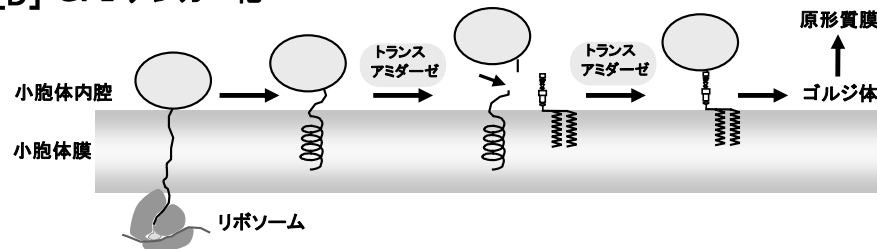


図4 脂質修飾タンパク質の合成過程

[A]*N*-ミリスチル化は細胞質の遊離リボソーム上でタンパク質合成と同時に起きる。メチオニンアミノペプチダーゼ (MAP) による開始 Met の脱離の後、*N*-ミリスチルトランスフェラーゼ (NMT) により *N*-ミリスチル化が起きる。

[B]*S*-パルミトイル化は、タンパク質合成後に、小胞体膜、ゴルジ体膜あるいは原形質膜に局在するパルミトイルトランスフェラーゼ (PAT) により *N*-ミリスチル化タンパク質、プレニル化タンパク質、膜貫通型タンパク質等の膜結合タンパク質中の Cys 残基に起きる。

[C]プレニル化では、タンパク質合成後、細胞質においてファルネシル転位酵素 (FTase)、ゲラニルゲラニル転位酵素 (GGTase) によりプレニル基の付加が起きた後、小胞体膜上で特異的プロテアーゼ (Rce1)、メチル転位酵素 (Icmt) により C 末端 3 アミノ酸の除去と C 末端システイン残基のメチル化が起きる。

[D]GPI アンカー化は小胞体膜上で起きる。N 末端に存在するシグナルペプチドにより小胞体内腔へ移行したタンパク質は C 末端の疎水領域で膜に固定された後、トランスアミダーゼにより C 末端疎水領域の切断、および GPI との結合が起きて GPI アンカータンパク質が生成する。

する GPI アンカー化シグナル中の疎水領域が膜透過停止配列として働き、膜透過が停止し小胞体膜上に固定される。続いて膜貫通領域の N 末端側に隣接する親水性領域がトランスアミダーゼにより認識され切断された後、新たに露出した C 末端カルボキシル基に、末端にエタノールアミンを有する GPI アンカーがアミド結合により結合す

る (図 4D)。このような過程により小胞体膜の内腔側表面に局在した GPI アンカータンパク質は、小胞輸送によりゴルジ体を経由して原形質膜へと到達し、原形質膜の外表面に膜タンパク質として局在する。

5. 脂質修飾タンパク質の一般的検出法

通常、タンパク質の脂質修飾の検出には MALDI-TOF MS 等の質量分析が用いられる。即ち細胞や組織中に存在する目的タンパク質を二次元電気泳動や液体クロマトグラフィーにより一定量精製し、プロテアーゼ等で切断後、得られたペプチドの質量を質量分析により求める。これを DNA の配列から推定される質量と比較することで脂質修飾が検出される。この手法は、特定のタンパク質に生ずる脂質修飾を検出し、その修飾部位を明らかにする方法として優れているが、細胞毒性を有するタンパク質等の微量しか発現しないタンパク質や特殊な条件下でのみ発現するタンパク質の解析は困難であり、ゲノム中に存在するすべてのタンパク質を対象にした網羅的な解析は不可能である。

質量分析を用いることなく特定の遺伝子産物に生ずる脂質修飾を検出する場合、通常、遺伝子導入した培養細胞を用いた代謝標識が用いられる (図 5A)。即ち、N 末端あるいは C 末端にタグを付与した目的遺伝子 (cDNA) を COS-1 細胞等の培養細胞に導入し、特異的なラジオアイソトープ (RI)-標識基質とインキュベート後、細胞溶解液を得る。これを抗タグ抗体を用いて免疫沈降後 SDS-PAGE、フルオログラフィーにより目的遺伝子産物における修飾の有無を

検出する⁴⁰⁾。3 種の主要な脂質修飾はすべてこの手法により検出可能である。この際、N-ミリスチル化、パルミトイル化の検出には RI-標識ミリスチン酸、パルミチン酸が、プレニル化の検出には RI-標識メバロン酸が、また GPI アンカーの検出には GPI アンカーの構成成分であるエタノールアミンの RI-標識体が用いられる。これらの手法には RI-標識基質の使用が必要であったが、最近ではケミカルバイオロジーの手法の発展に伴い、クリックケミストリーと呼ばれる反応を応用した検出法が開発され、RI を用いない代謝標識によって、脂質修飾タンパク質を検出することも可能となっている。この場合、目的タンパク質にアジド修飾脂質を取り込ませた後、アルキン化したビオチンや蛍光色素等の検出試薬を反応させて検出する^{41,42)}。

これらの遺伝子導入した培養細胞における代謝標識は、細胞で実際に発現した特定の遺伝子産物に生ずる脂質修飾を直接検出する手法として優れているが、培養細胞を使用することから操作が煩雑であり、多検体の試料の解析が難しく、またフルオログラフィーによる RI-標識の検出に時間がかかるという欠点を有している。また、細胞毒性を有するタンパク質や、分子量の大きなタンパク質、複数回膜貫通型タンパク質といった、遺伝子導入した細胞でごく少量しか発現しないタンパク質の解析は困難である。これら

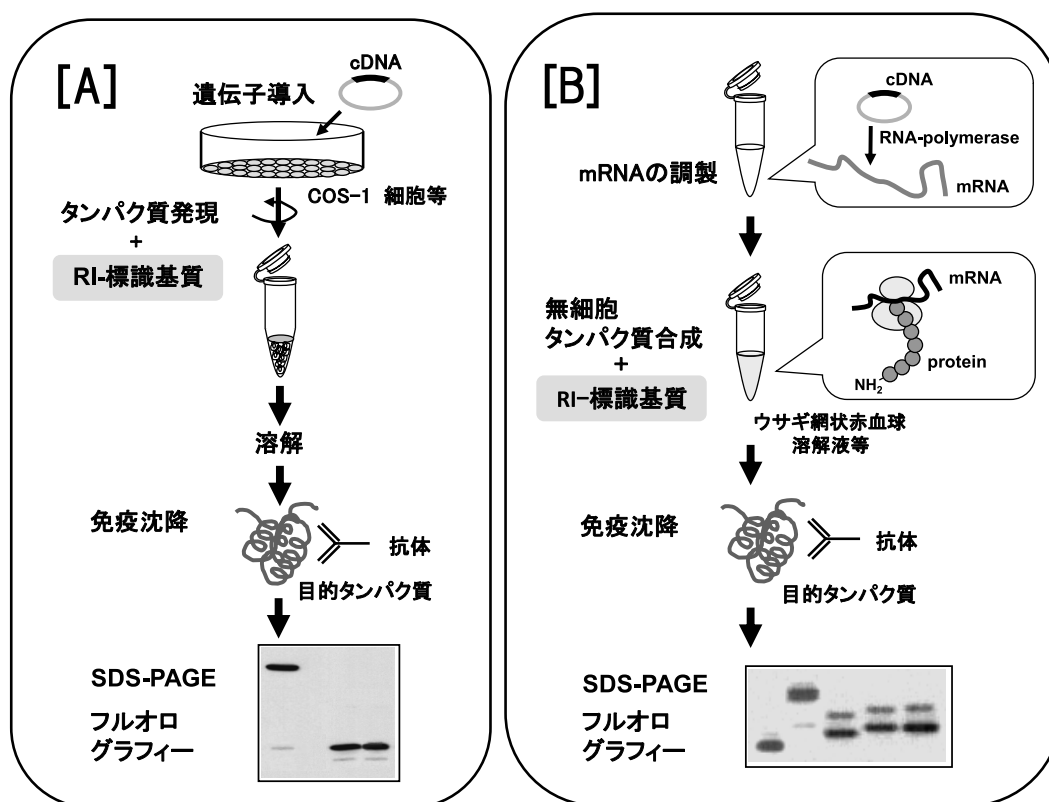


図5 代謝標識法を用いた脂質修飾タンパク質の検出
[A] 遺伝子導入細胞における代謝標識を用いた検出。
[B] 無細胞タンパク質合成系における代謝標識を用いた検出。

の問題を解決する手法として無細胞タンパク質合成系における代謝標識が挙げられる (図 5B)。実際、この手法を用いて *N*-ミリスチル化やプレニル化、GPI アンカー化といったタンパク質合成と共役した脂質修飾が比較的容易に検出できるが^{8,9)}、このことは一般にあまり知られていない。

6. 無細胞タンパク質合成系

無細胞タンパク質合成系とは、タンパク質の合成装置であるリボソームや翻訳因子などを含む細胞や組織抽出液に、タンパク質を構成するアミノ酸、エネルギー源である ATP などを加え、目的タンパク質をコードする RNA または DNA を鋳型として、タンパク質を試験管内で合成する方法である。RNA を鋳型にする方法では、鋳型 RNA として全 RNA、mRNA、*in vitro* 転写産物が用いられる。DNA を鋳型にする方法 (転写/翻訳系) では、鋳型 DNA として、転写プロモーターと翻訳開始点の下流に組み込まれた目的遺伝子を含むプラスミドや PCR/RT-PCR の産物を用いることができる。これまでに大腸菌⁴³⁾、コムギ胚芽⁴⁴⁾、ウサギ網状赤血球⁴⁵⁾、昆虫培養細胞⁴⁶⁾の抽出液など、様々な生物種由来の無細胞タンパク質合成系が確立され、市販されている。無細胞タンパク質合成系は、生細胞を用いる発現系と比較して、必要とするいくつかの成分を混合する操作のみで短時間でタンパク質合成が生じる。このため、多検体の目的タンパク質を速かに合成することができ、また合成タンパク質を簡単に標識することができる。細胞にとって毒性のあるタンパク質の合成が可能であることも大きな利点である⁴⁷⁾。

無細胞タンパク質合成系に、タンパク質合成能のみならず、種々のタンパク質翻訳後修飾能が存在することが確認されている。例えば、開始 Met 脱離、*N*-アセチル化といった翻訳反応と共役して生じる修飾^{48,49)}や、リン酸化、ユビキチン化⁵⁰⁾といった、翻訳後に生じる修飾反応も検出できることが報告されている。また、ミクロソーム膜画分を添加することで、小胞体膜上で生じる糖鎖付加、シグナルペプチド切断⁵¹⁾や、膜タンパク質の膜への組み込み⁵²⁾が検出できることも知られている。このミクロソーム膜画分存在下での無細胞タンパク質合成系を用いることによって、脂質修飾の一つである GPI アンカー化が検出できることが報告されている。この場合、ミクロソーム膜画分存在下で GPI アンカータンパク質をコードする mRNA を翻訳させると、リボソーム上で合成が開始されたタンパク質は、シグナルペプチドを介して小胞体内腔へと移行し、小胞体内腔において GPI アンカー化シグナルを介した GPI アンカー化反応が進行する。このタンパク質に生じた GPI アンカー化は、得られたタンパク質を PI-特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) で処理することにより、GPI アンカー

部分が遊離されることで検出される⁵³⁾。この GPI アンカー化に加えて、*N*-ミリスチル化⁵⁴⁾やプレニル化⁵⁵⁾といった翻訳と共役した脂質修飾が無細胞タンパク質合成系で検出できることが知られている。この方法では、修飾反応に特異的な RI-標識基質 ($[^3\text{H}]$ -ミリスチン酸、 $[^3\text{H}]$ -メバロン酸) 存在下で、目的遺伝子に対応する mRNA をウサギ網状赤血球溶解液等の無細胞タンパク質合成系を用いて翻訳させる。これを SDS-PAGE、フルオログラフィーに供与してタンパク質への RI-標識基質の取り込みから修飾の有無を検出する (図 5B)。

無細胞タンパク質合成系により、ゲノム全体を対象とした網羅的な解析を実行するためには全ゲノムをカバーする cDNA リソースを用いて解析を行う必要がある。ヒトをはじめとする多くの生物の cDNA リソースの整備が世界各国で精力的に進められている⁵⁶⁾。特にヒト cDNA に関しては、日本の貢献が大きく、現在では約 22,000 個程度とされるヒト遺伝子の約 7 割 (15,000 個) の cDNA クローンが比較的安価で市販される状況になっている。近い将来、ヒトを含むいくつかの生物について、その全ゲノムをカバーする cDNA リソースが利用可能になるものと推測される。

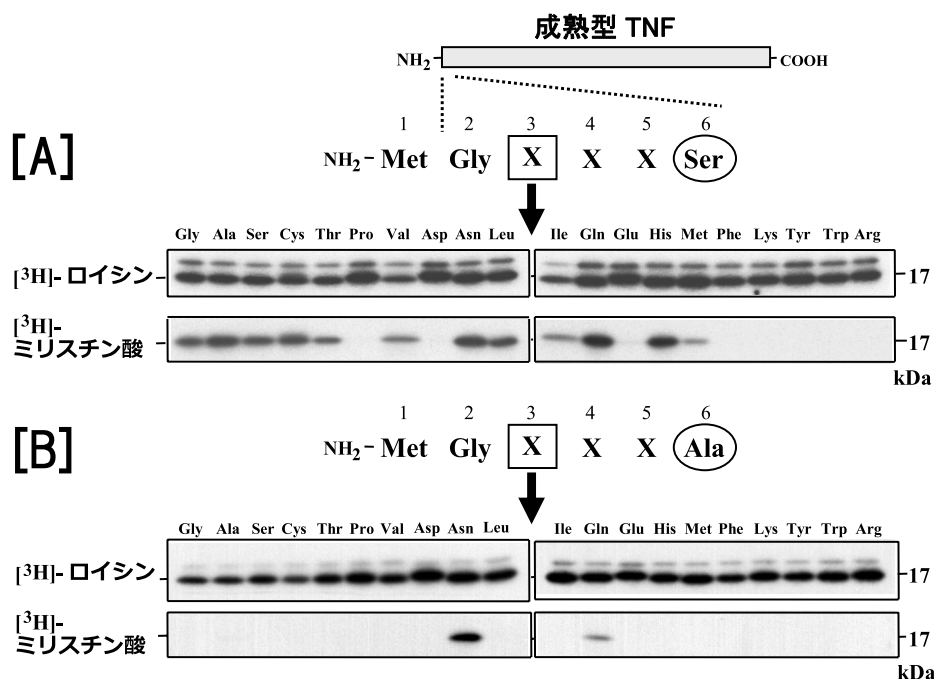
7. 無細胞タンパク質合成系を用いた脂質修飾シグナルの解析

タンパク質の脂質修飾は N 末端や C 末端のわずかな数アミノ酸のアミノ酸配列により指令される。従って、特定の脂質修飾を指令するアミノ酸配列要求性が正確に明らかになれば、対象とするタンパク質のアミノ酸配列から特定の脂質修飾の有無を正確に予測することができる。実際、これまでに明らかにされたアミノ酸配列要求性をもとに *N*-ミリスチル化、パルミトイル化、プレニル化、GPI アンカー化のそれぞれについて、タンパク質のアミノ酸配列から脂質修飾の有無を予測するプログラムが開発され、いずれもインターネット上で公開されている (表 1)。しかしながら、後述するように、これらの予測プログラムの信頼性はいずれも高いとはいえないのが現状である。

生理的に極めて重要な役割を果たすことが知られているアシル化反応の一つである *N*-ミリスチル化は、N 末端の 7~9 アミノ酸から成る *N*-ミリスチル化シグナルにより指令される。この *N*-ミリスチル化シグナルについては、主として精製した NMT と基質ペプチドを用いた解析^{57,58)}から、この配列中の各位置のアミノ酸の要求性については明らかにされているものの、N 末端配列のみから修飾の有無を正確に予測できるほどの詳細なアミノ酸配列要求性の解明には至っていない。特に、*N*-ミリスチル化に必須である N 末端 Met-Gly-という配列は、開始 Met の脱離後、*N*-ミリスチル化だけでなく、*N*-アセチル化される

表 1 タンパク質脂質修飾の予測プログラム

脂 質 修 飾	プログラム名	ホームページアドレス (URL)
N-ミリスチル化	MYR Predictor	http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm
N-ミリスチル化	Myristoylator	http://au.expasy.org/tools/myristoylator/
パルミトイル化	CSS-Palm	http://csspalm.biocuckoo.org
プレニル化	PrePS	http://mendel.imp.ac.at/PrePS/
GPI-アンカー化	big-PI Predictor	http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html

図 6 無細胞タンパク質合成系における代謝標識を用いた *N*-ミリスチル化シグナルにおけるアミノ酸配列要求性の検討

TNF の成熟領域の N 末端を Met-Gly-X-X-X-Ser-モチーフに一致させた変異体を用いて、3 位と 6 位のアミノ酸の組み合わせが *N*-ミリスチル化に及ぼす影響を、ウサギ網状赤血球溶解液を用いた無細胞タンパク質合成系における代謝標識を用いて検討した。3 位と 6 位のアミノ酸の組み合わせが *N*-ミリスチル化に大きく影響することがわかる。

[A] 6 位がセリンの場合の 3 位アミノ酸の影響。

[B] 6 位がアラニンの場合の 3 位アミノ酸の影響。

可能性もあり、この二つの N 末端修飾のアミノ酸配列要求性の関係については何ら知見が得られていなかった。そこで我々は、無細胞タンパク質合成系における代謝標識法を用いて、この *N*-ミリスチル化を指令する *N*-ミリスチル化シグナルに要求されるアミノ酸配列の要求性を詳細に検討した。即ち、N 末端に *N*-ミリスチル化モチーフ [Met-Gly-X-X-X-Ser-X-X-X (X は任意のアミノ酸)] を持つモデルタンパク質を用い、部位指定変異によりモチーフ内の各アミノ酸について一連の置換変異体を作製し、無細胞タンパク質合成系における [³H]-ミリスチン酸の取り込みにより *N*-ミリスチル化を、また [³H]-アセチル CoA の取り込みにより *N*-アセチル化を検討した^{48,54)}。

その結果、効率良く *N*-ミリスチル化が生ずるためには、N 末端の Met-Gly-配列に加えて、それに続く 3 位と

6 位及び 7 位のアミノ酸の種類とその組み合わせが極めて重要であることが示された。例えば、6 位が Ser の場合、3 位には 12 種ものアミノ酸が許容されるのに対し、6 位が Ser 以外のアミノ酸の場合では Asn, Gln といったごく少数のアミノ酸のみが 3 位に許容される (図 6)⁴⁸⁾。

また、7 位のアミノ酸が Lys である場合、3 位のアミノ酸の要求性が変化し、Pro 以外の殆どのアミノ酸が許容されるようになることが見出された。さらに *N*-ミリスチル化と *N*-アセチル化を指令するアミノ酸配列は一部重複しており、Met-Gly-X-X-X-Ser-X-X-X モチーフを N 末端に持つタンパク質のうちの一部は *N*-ミリスチル化ではなく *N*-アセチル化が生じていることが明らかになった。特に 3 位が Asp, Glu の場合、その多くが *N*-ミリスチル化ではなく *N*-アセチル化されることが示された⁴⁸⁾。さらに、

3位, 6位, 7位のアミノ酸の組み合わせによっては, 単一のN末端配列でありながら, N-ミリスチル化とN-アセチル化によるヘテロな修飾が生じ得ることが見出された. この3位と6位及び7位のアミノ酸の組み合わせの制限は, これまでに生体内でN-ミリスチル化が生じていることが実験的に証明された殆ど全てのN末端配列で満たされていることが確認された. このことから, これらのアミノ酸配列要求性が生体内に存在するN-ミリスチル化タンパク質に適用可能であることが明らかになった⁵⁴⁾.

そこで, この3位, 6位, 7位のアミノ酸配列要求性を用いて, これまでに見出されていなかった生理的に重要なN-ミリスチル化タンパク質を, そのN末端配列のみから発見できないかと考え, 以下の実験を行った. ここでは, アポトーシス誘導因子Bidについて見出された翻訳後N-ミリスチル化反応に注目し解析を行った.

8. アポトーシス過程で翻訳後N-ミリスチル化されるタンパク質の探索

Bidはアポトーシスの過程において重要な役割を果たす細胞質タンパク質であり, アポトーシス刺激に伴いカスパーゼ-8により切断されミトコンドリアへ移行し, ミトコンドリアからのシトクロムcの遊離を誘導することによりアポトーシスを進行させる. このカスパーゼ-8による切断に伴い生じたBidのC末端側フラグメント (truncated Bid; tBid) が, 翻訳後にN-ミリスチル化を受けること, さらにこのN-ミリスチル化がtBidのミトコンドリアへの移行およびシトクロムcの遊離に必須であることが明らかにされた (図7)⁵⁹⁾.

このように, Bidに生ずる翻訳後N-ミリスチル化は, アポトーシスのレセプター経路とミトコンドリア経路とを直接連結する役割を担う極めて重要な翻訳後修飾である. カスパーゼ基質の中には, Bidと同様にカスパーゼ切断に伴いそのC末端側フラグメントのN末端にGly残基を露出する基質が数多く存在する. このことから, Bid以外にもアポトーシス過程で翻訳後N-ミリスチル化を生ずるカスパーゼ基質が存在するものと予測された. そこで, 我々はカスパーゼ切断に伴いN末端にGly残基を新たに露出する既知のカスパーゼ基質の中から, N-ミリスチル化に要求される3位, 6位, 7位の制限を満たすものを見出し, この配列のN末端10残基をモデルタンパク質であるTNF成熟領域に融合し, この融合タンパク質のN-ミリスチル化を無細胞タンパク質合成系における代謝標識により検討した. その結果, 細胞骨格系タンパク質であるアクチンやゲルゾリンのC末端側カスパーゼ切断断片のN末端10アミノ酸が, tBidのN末端10アミノ酸と同様, 効率良くタンパク質N-ミリスチル化を指令することが明らかになった⁶⁰⁾. アクチンとゲルゾリンの全長cDNAを

遺伝子導入したCOS-1細胞を用いた解析から, アポトーシス誘導に伴いアクチンとゲルゾリンがカスパーゼにより切断され, そのC末端側断片 (tアクチン, tゲルゾリン) が実際に翻訳後N-ミリスチル化を生ずることが示された^{60, 61)}. さらに, これらのC末端側のカスパーゼ切断断片に生ずる翻訳後N-ミリスチル化はtアクチンではミトコンドリアへの移行を指令する⁶⁰⁾が, アポトーシスの促進も抑制も起こさないこと, また, tゲルゾリンでは, 細胞内局在に影響を与えないが, アポトーシス阻害活性に直接関与すること (図8) を見出し, 翻訳後N-ミリスチル化が細胞骨格系タンパク質を介したアポトーシスの制御に重要な役割を演じている可能性を示した⁶¹⁾.

以上のように, アクチン, ゲルゾリンがアポトーシス過程で, カスパーゼ切断に伴い翻訳後N-ミリスチル化を生じ, その局在や機能を変化させることは明らかである. しかし, これらの現象の分子機構やその生理的意義, またBidに生ずる翻訳後N-ミリスチル化との関連等については明らかではなく, 今後の検討課題である. これらの結果は, 翻訳後N-ミリスチル化が, Bidのみに生ずる例外的な修飾反応ではなく, 生理的に重要な機能を担う, 普遍的なタンパク質修飾の一つであることを示している. このアクチンおよびゲルゾリンに生ずる翻訳後N-ミリスチル化の発見に続いて, 我々の用いた方法と全く同様の手法を用いて, セリン/スレオニンキナーゼであるPAK-2がアポトーシス過程で翻訳後N-ミリスチル化され, アポトーシスを促進させることが他のグループからも報告された⁶²⁾. さらに, 前述のアジド修飾脂質 (azido-myristate analogue) とアルキン化したビオチンを用いた代謝標識により, Jurkat細胞においてアポトーシス誘導に伴い15個のタンパク質がN-ミリスチル化されることが示された⁶³⁾. これらのタンパク質のアポトーシスにおける機能は不明であるが, 今後の解析から, アポトーシス過程で生ずる翻訳後N-ミリスチル化の機能の全体像が次第に明らかになってゆくものと考えられる.

9. 無細胞タンパク質合成系と質量分析の組み合わせによるタンパク質脂質修飾の解析

無細胞タンパク質合成系における代謝標識による検出法は, 簡便に脂質修飾を同定できるという長所を持つが, 修飾部位, 結合様式, といった修飾反応の詳細な解析が不可能であるという欠点を有していた. 最近市販された昆虫細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系は, 哺乳類由来のウサギ網状赤血球溶解液と同様の翻訳後修飾能を持ち, 質量分析が可能な量のタンパク質合成が認められた. そこで我々は, この昆虫細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系で得られたタンパク質を用いて質量分析によりタンパク質修飾が検出できないかと考え, アフィニティー精製

したモデル修飾タンパク質を電気泳動後、ゲル内消化し、質量分析計を用いて MS および MS/MS により解析した (図 9)。

その結果、*N*-ミリスチル化、プレニル化といった脂質修飾や、開始 Met の脱離、*N*-アセチル化といった *N* 末端修飾について、修飾部位、修飾様式の同定を含めた詳細な解析が可能であることが示された^{64, 65)}。

例えば、翻訳後 *N*-ミリスチル化が生ずることが見出された t ゲルゾリンについてこの解析系を用いて解析したところ、ミリスチル CoA 存在下で無細胞合成した t ゲルゾリンでは *N* 末端 Gly 残基が *N*-ミリスチル化されたペプチド断片が明確に検出された。これに対して、ミリスチル CoA 非存在下での合成ではこの *N*-ミリスチル化ペプチドは検出されなかった。また、2 位 Gly を Ala に置換し *N*-ミリスチル化を阻害した G2A 変異体について解析したところ、驚いたことに、この変異体は *N* 末端 Gly 残基が *N*-ミリスチル化される代わりに、もう一つの *N* 末端修飾である *N*-アセチル化が生じていることが明らかになった⁶⁴⁾。この結果は、これまで *N*-ミリスチル化の阻害による効果を検討するために、長年にわたって世界中で行われてきた G2A 変異体を用いた解析では、*N*-ミリスチル化が阻害されていたことに加え、*N*-アセチル化が生じていた可能性が高いことを示す重要な結果と考えられる。

以上の例で示されたように、無細胞タンパク質合成系と質量分析を組み合わせた解析手法は、*N* 末端修飾や脂質修飾といったタンパク質合成と共役したタンパク質修飾の解析手法として極めて有効な手段である。

10. 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いたヒト *N*-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定

前述の翻訳後 *N*-ミリスチル化タンパク質の探索において、目的タンパク質の *N* 末端 10 アミノ酸を含む融合タンパク質を無細胞タンパク質合成系を用いて代謝標識により解析する方法が極めて効果的であったことから、同様の手法を用いてヒトゲノム中に存在する *N*-ミリスチル化タンパク質の網羅的な探索法の確立を試みた。この場合、無細胞タンパク質合成系としては、質量分析が可能な昆虫細胞由来のものを使用した。ここでは、ヒト cDNA リソースを出発材料とし、*N*-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定を試みた。約 2,000 個の cDNA から成る、かずき DNA 研究所ヒトタンパク質発現クローン (Flexi ORF clones)⁶⁶⁾ を解析対象とし、この中から *N* 末端に Met-Gly 配列を持つ cDNA 141 個を選択した。その *N* 末端 10 アミノ酸をモデルタンパク質 t ゲルゾリンの *N* 末端 10 アミノ酸と置換した融合タンパク質のセットを構築し、これらの *N*-ミリスチル化を昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系

(転写/翻訳システム) における [³H]-ミリスチン酸標識により検討した (図 10)⁶⁷⁾。

その結果、141 個の cDNA クローン中の 29 個の cDNA の翻訳産物の *N* 末端配列が効率良く *N*-ミリスチル化を指令することが明らかになった。これら 141 個の融合タンパク質の *N* 末端アミノ酸配列について、*N*-ミリスチル化を予測する二つの予測プログラム (MYR Predictor, Myristoylator)^{68, 69)} を用いて予測を行い、代謝標識による実験結果と比較した。その結果、二つの予測プログラムでの予測結果は多くのサンプルについて互いに異なり、またいずれの予測プログラムについても、実験結果と一致しないサンプルが多数存在していることが示され、これらの予測プログラムの信頼性は低いことが明らかになった (図 10 下段)。次に、融合タンパク質を用いた実験から *N*-ミリスチル化を生ずることが見出された 29 個のサンプルについて、その全長 cDNA を用いて無細胞タンパク質合成系および、遺伝子導入細胞 (COS-1 細胞) における代謝標識により *N*-ミリスチル化を検討した。その結果、29 個のうち少なくとも 27 個の全長 cDNA の翻訳産物に *N*-ミリスチル化が生ずることが示された。これらのタンパク質を無細胞タンパク質合成系で合成、精製し、質量分析により解析した結果、*N* 末端 Gly 残基にミリスチル基の付加が確認された。

これら 27 個のタンパク質についてデータベース検索を行ったところ、27 個中の 9 個は、三量体型 G タンパク質 α サブユニット (G α i1)、低分子量 G タンパク質 (Arf1)、非受容体型チロシンキナーゼ (Abl1)、ホスホジエステラーゼ (PDE2A) といった既知の *N*-ミリスチル化タンパク質であり、いずれも細胞情報伝達において重要な機能を担う生理活性タンパク質であった。残りの 18 個は、これまでに *N*-ミリスチル化が生ずることが報告されていない新規の *N*-ミリスチル化タンパク質であり、このうち 13 個は機能未知のタンパク質であった。機能の報告されている 5 個の新規 *N*-ミリスチル化タンパク質のうちの 4 個は、E3 ユビキチンリガーゼ (MGRN1)、細胞骨格制御タンパク質 (FMNL2)、細胞骨格結合タンパク質 (DIXDC1)、アポトーシス関連タンパク質 (AMID) といった、細胞情報伝達に直接関わる生理活性タンパク質であり、これらのタンパク質の機能発現に *N*-ミリスチル化が重要な機能を果たしているものと推察された。これらの新規な *N*-ミリスチル化タンパク質の機能発現における *N*-ミリスチル化の役割については、現在検討中である。

また、5 個の機能既知の新規 *N*-ミリスチル化タンパク質のうち残り 1 個は、Serinc1 と呼ばれるアミノ酸輸送体タンパク質であり、11 回膜貫通型の膜貫通タンパク質であると報告されたタンパク質であった⁷⁰⁾。さらに、18 個の新規 *N*-ミリスチル化タンパク質の中には、この Serinc1

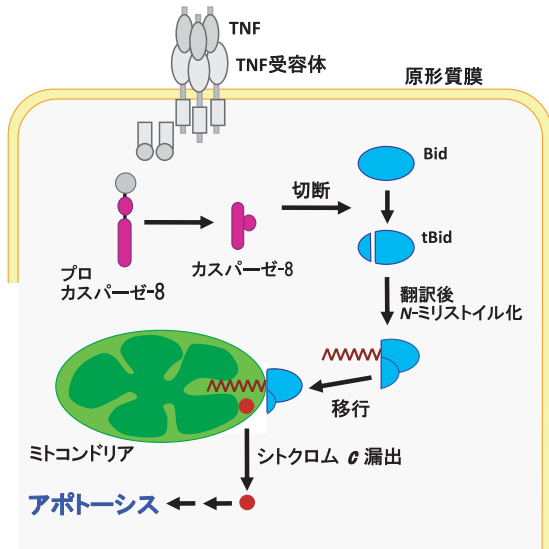


図7 Bidの翻訳後N-ミリスチル化とアポトーシス誘導

BidはTNF刺激等のアポトーシス刺激に伴いカスパーゼ-8により切断され、生じたC末端側フラグメント(tBid)のN末端がN-ミリスチル化を受けミトコンドリアへ移行する。ミトコンドリアへ移行したtBidはミトコンドリア外膜の透過性を亢進しミトコンドリアからのシトクロムcの漏出を誘導してアポトーシスを進行させる。

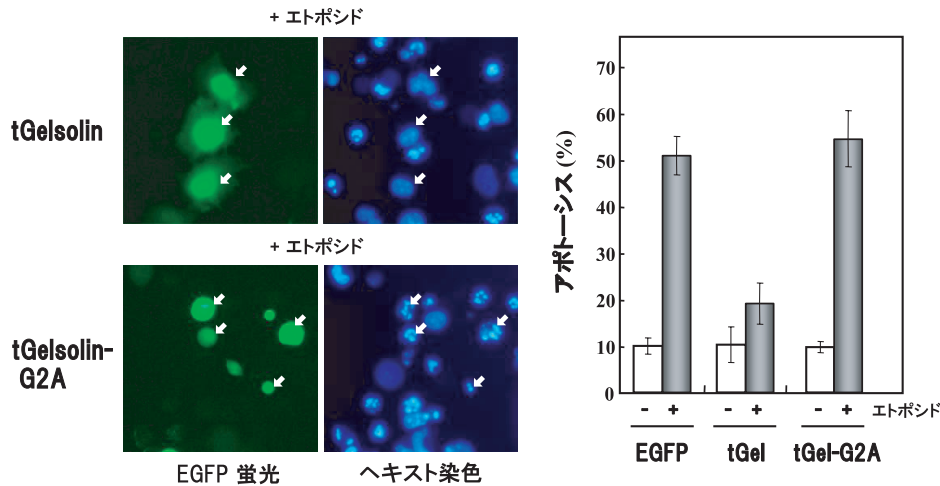


図8 翻訳後N-ミリスチル化されたtゲルゾリンはアポトーシスを阻害する

IRES-ベクターを用いて、tゲルゾリンとEGFPとをCOS-1細胞において共発現させ、エトポシド処理によるアポトーシス誘導に対する感受性を検討した。この際、アポトーシスは核の断片化の有無をヘキスト染色により検出することで検討した。tゲルゾリンを発現した細胞(EGFP-ポジティブ細胞)では細胞の形態変化も核の断片化も生じていないのに対して(左図, 上段), N-ミリスチル化を阻害したtゲルゾリンG2A変異体を発現した細胞では、細胞の球形化と核の断片化が認められた(左図, 下段)。右図は、EGFP-ポジティブ細胞中のアポトーシス細胞の割合を示した。tゲルゾリン発現細胞ではアポトーシスが強く抑制されていることがわかる。

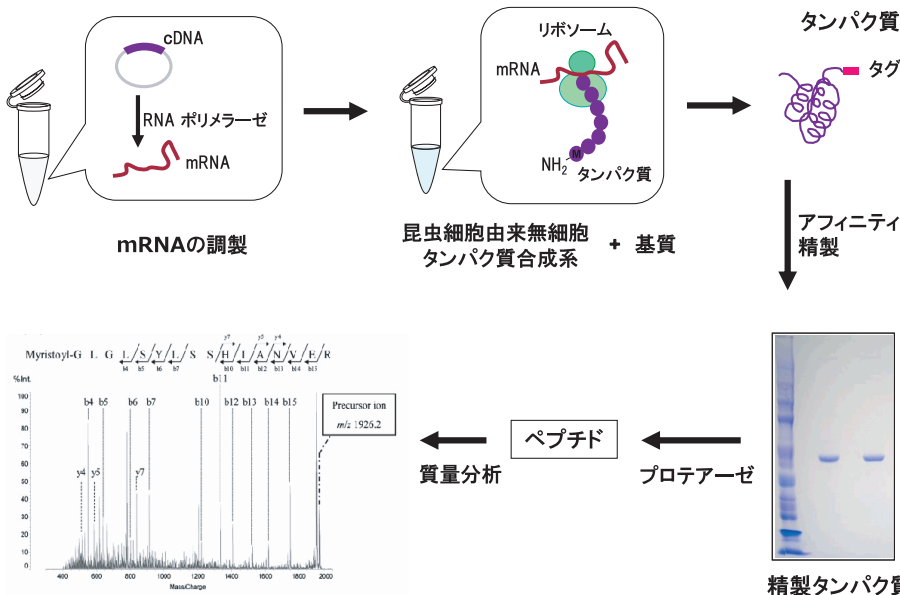


図9 昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系と質量分析を組み合わせた脂質修飾タンパク質の解析

N末端あるいはC末端にタグを付加したcDNAを作成し、これを鋳型としてmRNAを作製する。続いて、目的とする脂質修飾に必要な基質(ミリスチルCoA, フェルニシルピロリン酸, ゲラニルゲラニルピロリン酸等)の存在下で、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系によりタンパク質合成を行う。これをアフィニティー精製し、電気泳動後、ゲル内消化し、質量分析計を用いてMSおよびMS/MSにより解析を行う。

以外に、その疎水性プロットから膜貫通タンパク質であると推定されるタンパク質が3個存在した。これまでに、ウイルス由来のタンパク質中にN-ミリスチル化された膜貫通タンパク質が存在することが報告されている⁷¹⁾。また、我々は、昆虫であるカイコのGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるチラミン受容体のN末端がN-ミリスチル化されていることを明らかにしている⁷²⁾。しかし、ヒト由来のタンパク質については、これまでにN-ミリスチル化された膜貫通タンパク質の存在を示す明確なデータは報告されていない。今回見出されたヒト由来の膜貫通タンパク質に生ずるN-ミリスチル化がどのような機能を持つのか注目される。

以上、約2,000個のcDNAクローンを解析対象として解析を行った結果、18個の新規なN-ミリスチル化タンパク質が見出された。ヒトのゲノム中には22,000個程度の機能的な遺伝子が存在するとされていることから、ヒト全cDNAを解析対象として同様の解析を行うことで、計算上、約200個もの新規なN-ミリスチル化タンパク質が発見されるものと予測される。これらのことから、cDNAクローンと無細胞タンパク質合成系を用いた解析法は、ゲノムから脂質修飾タンパク質を網羅的に同定する手法として極めて優れていると考えられる。

11. おわりに

脂質修飾タンパク質の多くは、細胞情報伝達をはじめとする多くの細胞の機能発現過程において重要な役割を果たしており、またその異常は、様々な疾病に関連することも明らかになってきた。しかしこのような生理的な重要性にもかかわらず、タンパク質の脂質修飾の解析は、他の翻訳後修飾と比較して遅れている。これまでに実験的に同定された脂質修飾タンパク質の数は、生体内で発現している全脂質修飾タンパク質のごく一部でしかなくことは明らかである。本稿で紹介した無細胞タンパク質合成系を用いた代謝標識法は、生体サンプルから抽出したタンパク質を必要とせず、目的タンパク質をコードするcDNAとラジオアイソトープを使用できる環境さえあれば、簡易な設備で容易に解析が可能であり、cDNAリソースを対象とした網羅的解析手法としても極めて有効である。また、この手法と質量分析を用いた解析とを組み合わせることで、修飾部位や修飾基の同定といった脂質修飾の詳細な解析も可能である。本稿ではタンパク質N-ミリスチル化について紹介したが、同様の手法がプレニル化やGPIアンカー化といった他の脂質修飾にも適用可能である。今後、これらの手法がプロテオーム解析を行っている多くの研究者に用いられ、様々な生物種由来のcDNAリソースから多くの新規な脂質修飾タンパク質が見出され、その機能解析が進むことを期待したい。

本稿において紹介した筆者らの研究のうち、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系を用いた研究成果は(株)島津製作所との共同研究により得られたものである。鈴木崇博士、安藤英治博士をはじめ、関係の皆様へ感謝致します。また、その他の研究は、私の研究室に所属した学部学生、大学院生とともに行った研究である。興味を持って研究に邁進してくれた守屋康子博士、石坂瑠美博士をはじめとする多くの皆さんにこの場を借りて感謝の意を表します。

文 献

- 1) Resh, M.D. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 584–590.
- 2) Spiegel, A.M., Backlund, P.S., Butrynski, J.E., Jones, T.L., & Simonds, W.F. (1991) *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 338–341.
- 3) Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999) *Nature*, **402**, 656–660.
- 4) Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000) *Nature*, **408**, 488–492.
- 5) Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., & Takada, S. (2006) *Dev. Cell*, **11**, 791–801.
- 6) Magee, T. & Seabra, M.C. (2005) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 190–196.
- 7) Pechlivanis, M. & Kuhlmann, J. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 1914–1931.
- 8) 内海俊彦 (2003) 生化学, **75**, 373–378.
- 9) 内海俊彦 (2006) 生物物理化学, **50**, 41–45.
- 10) Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P., & Glaser, L. (1988) *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 69–99.
- 11) Resh, M.D. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1451**, 1–16.
- 12) Zhang, F.L. & Casey, P.J. (1996) *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 241–269.
- 13) Steinhauer, J. & Treisman, J.E. (2009) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **19**, 308–314.
- 14) Udenfriend, S. & Kodukula, K. (1995) *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 563–591.
- 15) Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., & Summers, M.F. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 517–522.
- 16) Simons, K. & Toomre, D. (2000) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31–39.
- 17) Lucero, H.A. & Robbins, P.W. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **426**, 208–224.
- 18) Wright, M.H., Heal, W.P., Mann, D.J., & Tate, E.W. (2010) *J. Chem. Biol.*, **3**, 19–35.
- 19) Chamoun, Z., Mann, R.K., Nellen, D., von Kessler, D.P., Belletto, M., Beachy, P.A., & Basler, K. (2001) *Science*, **293**, 2080–2084.
- 20) Miura, G., Buglino, J., Alvarado, D., Lemmon, M.A., Resh, M.D., & Treisman, J.E. (2006) *Dev. Cell*, **10**, 167–176.
- 21) Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, JR 3rd, & Nusse, R. (2003) *Nature*, **423**, 448–452.
- 22) Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., & Goldstein, J.L. (2008) *Cell*, **132**, 387–396.
- 23) Hofmann, K. (2000) *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 111–112.
- 24) Porter, J., Young, K., & Beachy, P. (1996) *Science*, **274**, 255–

- 259.
- 25) Cross, F.R., Garber, E.A., Pellman, D., & Hanafusa, H.A. (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1834–1842.
- 26) Bos, J.L. (1989) *Cancer Res.*, 49, 4682–4689.
- 27) Basso, A.D., Kirschmeier, W.R., & Bishop, W.R. (2006) *J. Lipid Res.*, 47, 15–31.
- 28) Raju, R.V.S., Moyana, T.N., & Sharma, R.K. (1997) *Exp. Cell Res.*, 235, 145–154.
- 29) Frame, M.C. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, 1602, 114–130.
- 30) Cordeddu, V., Schiavi, E.D., Pennacchio, L.A., Ma'ayan, A., Fodale, V., & Tartaglia, M. (2009) *Nat. Genet.*, 41, 1022–1026.
- 31) Tsutsumi, R., Fukata, Y., & Fukata, M. (2008) *Pflugers Arch.*, 456, 1199–1206.
- 32) Musich, P.R. & Zou, Y. (2009) *Aging*, 1, 28–37.
- 33) Almeida, A., Layton, M., & Karadimitris, A. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, 1792, 874–880.
- 34) Ho, J.C., Cheung, S.T., Patil, M., Chen, X., & Fan, S.T. (2006) *Int. J. Cancer*, 119, 1330–1337.
- 35) Farazi, T.A., Waksman, G., & Gordon, J.I. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 39501–39504.
- 36) Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R.A., & Brecht, D. S. (2004) *Neuron*, 44, 987–996.
- 37) Schmidt, W.K., Tam, A., Fujimura-Kamada, K., & Michaelis, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11175–11180.
- 38) Dai, Q., Choi, E., Chiu, V., Ramano, J., Slivka, S.R., Steitz, S. A., Michaelis, S., & Phillips, M.R. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 15030–15034.
- 39) Leung, K.F., Baron, R., & Seabra, M.C. (2006) *J. Lipid Res.*, 47, 467–475.
- 40) Utsumi, T., Takeshige, T., Tanaka, K., Takami, K., Kira, Y., Klostergaard, J., & Ishisaka, R. (2001) *FEBS Lett.*, 500, 1–6.
- 41) Hang, H.C., Geutjes, E.J., Grotenbreg, G., Pollington, A.M., Bijlmakers, M.J., & Ploegh, H.L. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 2744–2745.
- 42) Hannoush, R.N. & Sun, J. (2010) *Nat. Chem. Biol.*, 6, 498–506.
- 43) Kim, D.M., Kigawa, T., Choi, C.Y., & Yokoyama, S. (1996) *Eur. J. Biochem.*, 239, 881–886.
- 44) Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., & Endo, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14652–14657.
- 45) Jackson, R.J. & Hunt, T. (1983) *Methods Enzymol.*, 96, 50–74.
- 46) Ezure, T., Suzuki, T., Higashide, S., Shintani, E., Endo, K., Kobayashi, S., Shikata, M., Ito, M., Tanimizu, K., & Nishimura, O. (2006) *Biotechnol. Prog.*, 22, 1570–1577.
- 47) Sakurai, N., Moriya, K., Suzuki, T., Sofuku, K., Mochiki, H., Nishimura, O., & Utsumi, T. (2007) *Anal. Biochem.*, 362, 236–244.
- 48) Utsumi, T., Sato, M., Nakano, K., Takemura, D., Iwata, H., & Ishisaka, R. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 10505–10513.
- 49) Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., & Uozumi, N. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 40373–40384.
- 50) Suzuki, T., Ezure, T., Ando, E., Nishimura, O., Utsumi, T., & Tsunasawa, S. (2010) *J. Biotechnol.*, 145, 73–78.
- 51) Ishisaka, R., Sato, N., Tanaka, K., Takeshige, T., Iwata, H., Klostergaard, J., & Utsumi, T. (2001) *J. Biochem.*, 126, 413–420.
- 52) Utsumi, T., Akimaru, K., Kawabata, Z., Levitan, A., Tokunaga, T., Tang, P., Ide, A., Hung, M.-C., & Klostergaard, J. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6398–6405.
- 53) Maxwell, S.E., Ramalingam, S., Gerber, L.D., & Udenfriend, S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1550–1554.
- 54) Utsumi, T., Nakano, K., Funakoshi, T., Kayano, Y., Nakao, S., Sakurai, N., Iwata, H., & Ishisaka, R. (2004) *Eur. J. Biochem.*, 271, 863–874.
- 55) Moriya, K., Tsubota, T., Ishibashi, N., Yafune, A., Suzuki, T., Kobayashi, J., Shiotsuki, T., & Utsumi, T. (2010) *Insect Mol. Biol.*, 19, 291–301.
- 56) Temple, G., Lamesch, P., Milstein, S., Hill, D.E., Wagner, L., Moore, T., & Vidal, M. (2006) *Hum. Mol. Genet.*, 15, R31–R43.
- 57) Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P., & Glaser, L. (1988) *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 69–99.
- 58) Rocque, W.J., McWherter, C.A., Wood, D.C., & Gordon, J.I. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 9964–9971.
- 59) Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., & Korsmeyer, S.J. (2000) *Science*, 290, 1761–1765.
- 60) Utsumi, T., Sakurai, N., Nakano, K., & Ishisaka, R. (2003) *FEBS Lett.*, 539, 37–44.
- 61) Sakurai, N. & Utsumi, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 14288–14295.
- 62) Vilas, G.L., Corvi, M.M., Plummer, G.J., Seime, A.M., Lambkin, G.R., & Berthiaume, L.G. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 6542–6547.
- 63) Martin, D.D.O., Vilas, G.L., Prescher, J.A., Rajaiah, G., Falck, J.R., Bertozzi, C.R., & Berthiaume, L.G. (2008) *FASEB J.*, 22, 797–806.
- 64) Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., & Nishimura, O. (2006) *Proteomics*, 6, 4486–4495.
- 65) Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., & Nishimura, O. (2007) *Proteomics*, 7, 1942–1950.
- 66) Nagase, T., Yamakawa, H., Tadokoro, S., Nakajima, D., Inoue, S., Yamaguchi, K., Itokawa, Y., Kikuno, R.F., Koga, H., & Ohara, O. (2008) *DNA Res.*, 30, 137–149.
- 67) Suzuki, T., Moriya, K., Nagatoshii, K., Ota, Y., Ezure, T., Ando, E., Tsunasawa, S., & Utsumi, T. (2010) *Proteomics*, 10, 1780–1793.
- 68) Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., & Eisenhaber, F. (2002) *J. Mol. Biol.*, 317, 523–540.
- 69) Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S., & Veuthey, A. (2004) *Proteomics*, 4, 1626–1632.
- 70) Inuzuka, M., Hayakawa, M., & Ingi, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 35776–35783.
- 71) Persing, D., Varmus, H., & Ganem, D. (1987) *J. Virol.*, 61, 1672–1677.
- 72) Utsumi, T., Ohta, H., Kayano, Y., Sakurai, N., & Ozoe, Y. (2005) *FEBS J.*, 272, 472–481.