

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

平成 17 年度採択研究代表者

吉田 稔

(独立行政法人理化学研究所吉田化学遺伝学研究室 主任研究員)

「タンパク質修飾の動態とネットワークの網羅的解析」

1. 研究実施の概要

生体内のタンパク質はさまざまな翻訳後修飾を受け、それらが動的なネットワークを形成し、環境適応と恒常性維持に関与する。特にアセチル化やメチル化は代謝活性と連動することが示唆されているが、その全体像は不明である。すなわち、本研究ではタンパク質の翻訳後修飾の解析から代謝制御を理解し、制御することを研究の主題とする。具体的には、クローン化した分裂酵母全遺伝子産物の翻訳後修飾を網羅的に解析し、その中で明らかになった重要な代謝関連因子のヒトホモログについて修飾と機能の制御機構の解明と阻害剤開発による代謝制御法の確立を目指す。

2. 研究実施内容

研究の目的：本研究は、修飾タンパク質の網羅的解析、その動態とネットワーク解析を通じて代謝とタンパク質修飾の関連を解明するとともに、それらの情報をもとに、ヒト cDNA ライブラリーを用いて、将来代謝機能を人為的にコントロールするための有効な阻害剤探索系を構築することを目的とする。すなわち本研究は網羅的研究、個別研究、応用研究から成り、網羅的研究は分裂酵母の翻訳後修飾とそのネットワークを網羅的解析、個別研究では、動物細胞を用いて見出された新規修飾タンパク質の機能解析、ミトコンドリアに局在する新規脱アセチル化酵素等の機能解析、応用研究は、将来の阻害剤探索のための評価系の構築等を目指す。

方法および結果：

(1) 翻訳後修飾の網羅的解析

全ゲノム DNA の塩基配列の決定により、多くの生物では主に質量分析によって細胞内に存在するタンパク質の網羅的同定、すなわちプロテオーム解析が研究の主流となってきた。しかし、研究対象があまりにも巨大であるのに加え、約 300 種類にも及ぶ翻訳後修飾により、その解析は困難をきわめている。複雑な生命現象を理解するためにはこのプロテオームのさらに先の次元に存在する細胞内タンパク質修飾の全体像、すなわちモディフィコームの解明が重要な命題と考えられる。特に近年、一部の翻訳後修飾は、細胞内の代謝活性と密接に関わることが明らかになってきた。例えばタンパク質アセチル化はアセチル CoA 量に、脱アセチル化は NAD 量に、メチル化は S-アデノシ

ルメチオニンおよびS-アデノシルホモシステイン量に、脱メチル化はFADおよび α -KG量によって制御されることが明らかになってきた。すなわちタンパク質翻訳後修飾のネットワークは、生体内の代謝活性によって調節されていると考えられる。すでに我々は分裂酵母ゲノムにコードされる全遺伝子の98%以上をクローン化し、塩基配列の確認を行った上で、C末タグとの融合タンパク質として発現させることに成功している。そこで本研究では、これらの全ORFのクローンを元に、タンパク質マイクロアレイに翻訳後修飾特異的な抗体を用いたアプローチ、ならびに質量分析を組み合わせた手法により、特定の翻訳後修飾を受けているタンパク質を網羅的に同定し、それらの修飾の生理的機能と代謝調節との関連に迫ることを目指す。

初年度は分裂酵母全タンパク質の翻訳後修飾を網羅的に解析する前段階として、タグを融合させて発現させたタンパク質の精製について株の培養ならびに精製条件の最適化の検討をおこなった。この結果、プレート上で菌体を培養し、タグ融合タンパク質の発現を誘導した後、 Ni^{2+} ビーズを用いて変性条件下でアフィニティー精製を行うことにより、個々のタンパク質については比較的高い収量・精製度で精製できるようになった。また、これらの精製タンパク質の翻訳後修飾を網羅的に解析するためのツールの開発を行っている。質量分析法では、多種のタンパク質試料を自動で測定するシステム開発中である。アミノ酸組成分析法による解析では、タンパク質の精製の程度に関わらず良好な結果を得るため、SDS-PAGEで分離したブロット膜上のタンパク質から加水分解を行い翻訳後修飾が見られるように高感度、低バックグラウンドな方法を開発している。その結果、アミノ酸分析法において100fmol (f は 10^{-15}) でもタンパク質を構成する通常のアミノ酸を検出できた。また、翻訳後修飾されて生じる修飾アミノ酸のクロマトグラムでの溶出位置を決定し、アミノ酸組成分析法による解析を可能にした。モデルタンパク質を用いて解析したところ、このシステムによってブロット膜上の卵白アルブミンを用いて糖鎖の翻訳後修飾を検出できた。一方でアセチル化修飾は加水分解で外れてしまい、またメチル化はモノメチルー、ジメチルーリジンに試薬が導入されにくく定量性がないという問題があり、今後これらを克服する必要がある。

(2) 翻訳後修飾のネットワーク解析

複雑な生命現象は細胞内の様々なシグナル伝達経路およびタンパク質間の相互作用などにより引き起こされるが、この中でもタンパク質の翻訳後修飾は重要な役割を担っていると考えられる。特定の遺伝子の過剰発現により、その下流で機能しているタンパク質の翻訳後修飾、ひいてはタンパク質の活性に変化が生じることが期待されることから、本研究では分裂酵母の全ORFの過剰発現株を利用し、特定のタンパク質の発現や翻訳後修飾に及ぼす遺伝子過剰発現の影響を調べることで、細胞内タンパク質ならびに翻訳後修飾のネットワークを明らかにすることを目指す。

そのために、まず分裂酵母の全予測ORFを強制発現可能なゲノム挿入株約5,000株から全細胞抽出液を調製し、スライドガラスにスポットしてリバースマイクロアレイを作製するための技術開発を行った。ハイスループットに全細胞抽出液を調製するために、細胞の効率のよい培養法、並びにプロテインマイクロアレイ作製装置に適したタンパク質溶液の溶液系を検討し、大量の培養液を用いなくてもマイクロアレイ用のサンプルとして使用可能な全細胞抽出液調製法を確立した。

（３）動物細胞の修飾タンパク質解析

新規アセチル化タンパク質、メチル化タンパク質を同定し、それらの制御機構を明らかにするとともに、ミトコンドリアに局在する新規 NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT3-5 を中心にアセチル化を制御する酵素等の解析からそれらの新しい機能を発見することを目指した。まず、ミトコンドリアに局在する新規脱アセチル化酵素である SIRTs の機能を明らかにするために、各 SIRTs と結合するタンパク質を Tandem Affinity Purification (TAP) システムを用いて同定することを試みた。本年度は、SIRTs-TAP を恒常的に発現する細胞を、レトロウイルス発現系を用いて作製し、精製条件等を検討した。次に、新規アセチル化タンパク質を同定するために、クラス I、II の HDAC（亜鉛依存性）の阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) および、クラス III の HDAC（NAD 依存性酵素 Sir2 ファミリー）の阻害剤であるニコチンアミド (NA) の両方を処理することでアセチル化が亢進するタンパク質を、抗アセチルリジン抗体を用いたアフィニティー精製法により探索し、幾つかの新規アセチル化タンパク質を見出した。これらはいずれも亜鉛依存性 HDAC と NAD 依存性 HDAC の双方の基質となる興味深いタンパク質であると思われるので、質量分析等による同定作業を行う必要がある。

（４）代謝関連因子阻害剤探索系の構築

Gateway 化された完全長ヒト cDNA クローンライブラリーの中から代謝関連因子を中心に重要な遺伝子を選択し、それらを LR 反応によって分裂酵母用発現ベクターにクローン化するための条件検討および宿主となる分裂酵母株の作製を行った。LR 反応条件を検討し、スモールスケールのプロトコルを検討・確立した。さらに大腸菌形質転換体からのプラスミド（LR 反応産物）抽出はロボットを用いたハイスループットな抽出作業条件を整えた。分裂酵母宿主については、最終的に薬剤感受性株（薬剤排出ポンプの破壊株）に導入し直す必要があるが、feasibility test の結果、最初の導入は形質転換効率の高い野生型株を用い、表現型観察を行うこととした。

3. 研究実施体制

「理化学研究所」グループ

- ① 研究分担グループ長：吉田 稔（独立行政法人理化学研究所吉田化学遺伝学研究室、主任研究員）
- ② 研究項目：
 - サブテーマ 1：翻訳後修飾の網羅的解析
 - サブテーマ 2：翻訳後修飾のネットワーク解析
 - サブテーマ 3：動物細胞修飾タンパク質解析
 - サブテーマ 4：代謝関連因子阻害剤探索系の構築