

「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) 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 の塩基配列が決定され、次の目標として、主に質量分析による細胞内タンパク質の網羅的同定、すなわちプロテオーム解析が多く生物で活発に行われている。しかし、研究対象があまりにも膨大であるのに加え、約 300 種類にも及ぶ翻訳後修飾により、その包括的理解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、重要な翻訳後修飾の中に、細胞内の代謝活性と密接に関わるも

の多い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  $\alpha$ -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。

これまでに His タグを融合させて発現させた分裂酵母の全タンパク質の精製について株の培養ならびにタグ融合タンパク質の精製条件の最適化の検討を行い、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ていた。しかし、確立した方法では尿素を用いるために実験操作中にタンパク質のカルバミル化が起こる可能性があり、さらに SDS を用いるために精製自体は効率よく行ってもその後の解析法は制限されてしまう。そこで、本年度はこの精製法をさらに改良し、精製後に質量分析やアミノ酸組成分析に利用可能な試料の調製法の開発を行った。さまざまな条件検討を行った結果、十分な精製度で 96 穴プレートを用いてタグ融合タンパク質を精製できるようになった。さらに、調製したタンパク質試料で作製したプロテインマイクロアレイを用いたパイロット実験において、全細胞抽出液を用いた場合には確認が困難な、複数のタンパク質に反応してしまう翻訳後修飾特異的な抗体を用いても目的のタンパク質だけを正しく検出できることがわかった。

タンパク質の翻訳後修飾解析は、修飾を受けた部位を検出しなくてはならず、構造解析の中でも最も難しい。従って、酵素消化して質量分析する際には、検出断片のカバー率を上げることや、タンパク質全体の質量分析やアミノ酸組成分析などの別の方法を併用する必要がある。質量分析では、網羅率を上げるために消化の程度を高めて再現性よく多検体分析できるように、ゲル内消化の自動化を行った。また、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を利用した LC-MS, LC-MS/MS とマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) を用いた MS, MS/MS の両方を併用することでカバー率を高めた。たとえば、今回網羅的解析用に調製したある試料では ESI で 76%、MALDI で 55%と高いシーケンスカバー率を示し、さらに両方あわせて 84%のカバー率で見落とす部位を極端に減らすことができた。アミノ酸組成分析では、超高感度なリジンに関する修飾の解析を進め、PVDF 膜上のモデルタンパク質のメチル化を分析し、カルモジュリンはトリメチルリジンを、ヒストン H3 はトリメチルリジン、ジメチルリジン、モノメチルリジンを検出したが、溶液に比べて回収率が低下したため、定量的な扱いには検討を残した。また、モノメチルリジンは誘導体が複数種類生成してしまうため、溶液においても定量的扱いができていない。アセチル化は加水分解で外れてしまうため、あらかじめグアニジル化して、遊離のリジン残基とアセチル化されたリジン残基を区別する試みを行っているが、タンパク質では立

体構造によると思われる障害があり、80–95%程度の導入率にとどまり、アセチル化の率を出すには至らなかった。

また、質量分析法や高感度アミノ酸分析法を応用して、クラゲムチンの糖鎖解析や筋ジストロフィーの病因因子である $\alpha$ ジストロフィンの糖鎖転移部位の解析などの構造解析を行い、これらの分析方法の有用性を確認した。

## 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、その遺伝子産物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旨とする。

前年度までに、全細胞抽出液をスポットするリバーサアレイ作製の試料をハイスルーブットに調製するために、細胞の効率のよい培養法、並びに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解析に十分な量の全細胞抽出液を調製できるようになった。そこで本年度は、実際に約 5,000 株からなる遺伝子過剰発現株をすべて培養し、全細胞抽出液の調製を行った。また、検出に使用可能な抗体についても検討を行い、特にヒストンのさまざまな修飾を個別にモニターできる抗体を検討し、利用可能なものを選定した。

## 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エネルギー代謝に関わる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、レトロウイルスを用いた shRNA 法により各 SIRTs を恒常的にノックダウンさせた細胞を作製した。結果として得られた細胞株の中には、エネルギー代謝が著しく変化したものが見られた。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、SV40 ウイルスの T 抗原、mRNA プロセッシングに関わる CFIm25 がアセチル化タンパク質であることを見出した。次にこれらタンパク質のアセチル化を制御するアセチル化酵素、脱アセチル化酵素を明らかにした。アセチル化は SV40 ウイルスの T 抗原の安定性を減少させることにより足場非依存的な増殖を抑制することがわかった。さらに CFIm25 に加えて複合体を形成

する poly(A) polymerase (PAP) もアセチル化タンパク質であることを見出し、アセチル化は、CFIm25 と PAP の結合活性を低下させること、importin  $\alpha/\beta$  複合体との結合を阻害することにより PAP の核移行を抑制することを明らかにした。加えて、ヒートショックタンパク質 Hsp90 のコシャペロンである Aha1、アクチン結合タンパク質である cortactin が新規アセチル化タンパク質であることを新たに見出した。

#### 4. 代謝関連因子阻害剤探索系の構築

代謝関連遺伝子産物に対する阻害剤を効率よく探索するために、分裂酵母内で過剰発現し、生育阻害が見られる遺伝子を用い、生育阻害の回復を指標とした阻害剤探索系の確立を目指した。今年度は既知の過剰発現生育阻害遺伝子およびその阻害剤を用いて、化合物探索系の有効性を示した。さらに、代謝関連遺伝子を数多く含む Gateway 化された完全長ヒト cDNA クローンライブラリーのうち、約 5,000 クローンを LR 反応により分裂酵母用発現ベクターにクローン化し、それらを分裂酵母に導入した株を作製し、発現誘導培地において増殖阻害がみられる株を選択した。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「吉田 稔・研究代表者」グループ

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

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- Iwabata H., Yoshida M., and Komatsu Y. Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine-acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies. *Proteomics* 5: 4653-4664, 2005
- Shinji C., Maeda S., Imai K., Yoshida M., Hashimoto Y., and Miyachi H. Design, synthesis, and evaluation of cyclic amide/imide-bearing hydroxamic acid derivatives as class-selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 7625-7651, 2006
- Suzuki T., Kouketsu A., Itoh Y., Hisakawa S., Maeda S., Yoshida M., Nakagawa H., and Miyata N. Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate. *J. Med. Chem.* 49(16): 4809-4812, 2006.
- Matsuyama A., Arai R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto,

A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24(7): 841-847, 2006

- Shimazu T., Komatsu Y., Nakayama K. I., Fukazawa H., Horinouchi S., and Yoshida M. Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene* 25: 7391-7400, 2006
- Shimazu T., Horinouchi S., and Yoshida M. Multiple histone deacetylases and the CREB-binding protein regulate pre-mRNA 3'-end processing. *J. Biol. Chem.* 282(7): 4470-4487, 2007