

吉田 稔

(独) 理化学研究所 基幹研究所・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。これまでに約 140 種類の翻訳後修飾特異的抗体を用いた網羅的解析により、のべ 3,000 を超えるタンパク質に翻訳後修飾が見つかっている。また、直接代謝と関わるものとして、ヒトミトコンドリアのエネルギー代謝に関わる複数のタンパク質がアセチル化されることを見出した。これらはいずれも脱アセチル化酵素 SIRT3 の基質であった。SIRT3 ノックダウンの表現型をメタボローム解析により調べたところ、特定の有機酸、アミノ酸の異常蓄積が起こるなど、SIRT3 によるアセチル化の制御が一次代謝活性に重要であることが明らかになったので、個々の基質について順次その機能解析を進めている。また、新たな代謝制御法の確立を目指して代謝調節に関わる翻訳後修飾関連酵素の阻害剤探索系を構築した。その結果、世界初のタンパク質 SUMO 化の阻害剤としてイチョウの生理活性物質として知られるギンコール酸を同定し、その作用機構を明らかにした。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

1. 翻訳後修飾の網羅的解析

タンパク質の翻訳後修飾は細胞内分子を多様化し、細胞の構築・維持や細胞分裂など様々な生命現象を司るのに貢献しているだけでなく、タンパク質分子の機能そのものを調節する上で極めて重要な役割を担っている。従って、翻訳後修飾がどのようなタンパク質に起こり、またそれによってどのような細胞機能の制御が行われているかを包括的に理解することは、ポストゲノム時代において非常に重要な命題と考えられる。しかし、現在のところ、ポストゲノム研究が最も進んでいる出芽酵母でさえ、リン酸化やユビキチン化など、約 300 種類も存在すると言われる翻訳後修飾の

ごく一部の網羅的解析が報告されているに過ぎない。

すでに我々は分裂酵母ゲノムにコードされる約 5,000 種類からなる全遺伝子の 99%以上をクローン化し、C 末タグとの融合タンパク質として発現させる株のセットを作製している¹⁾。本研究ではこれらの株から全てのタンパク質を個別に精製して作製したタンパク質アレイに対し、翻訳後修飾特異的な抗体で検出することによって、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した。

前年度までに 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についてすでに精製を

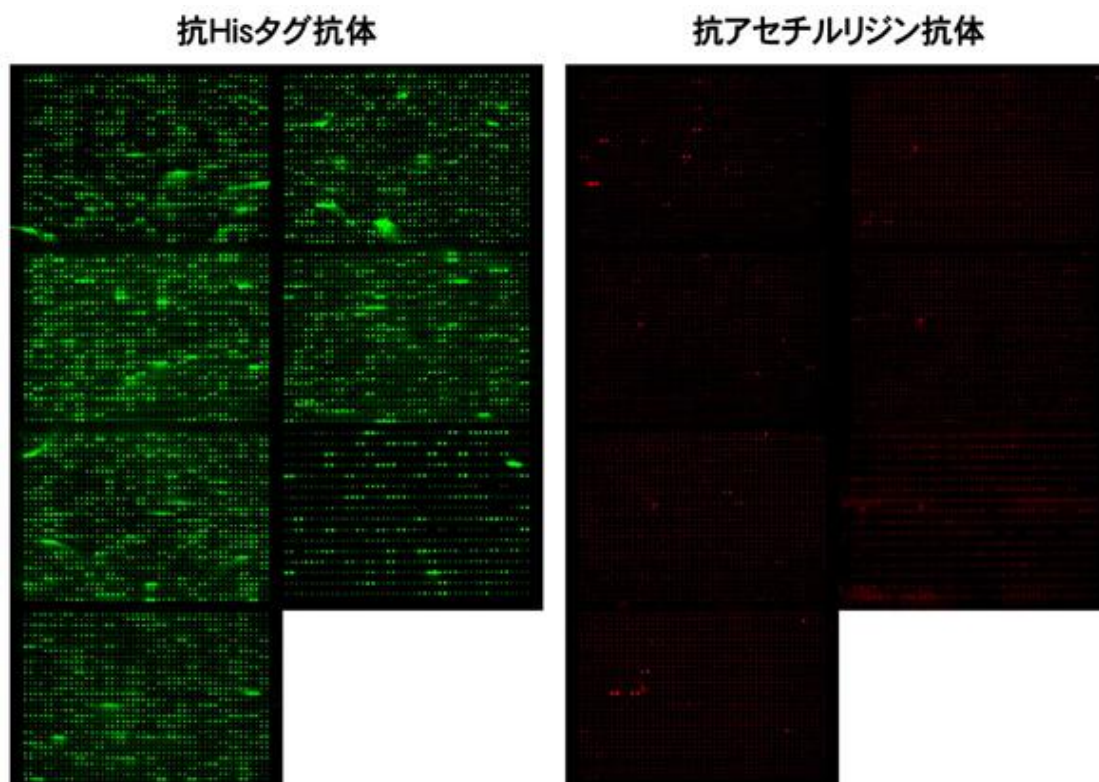


図 1. 分裂酵母プロテオームマクロアレイ

約 5,000 種類におよぶ分裂酵母の全タンパク質を His₆ タグを利用して精製し、ニトロセルロースメンブレンにスポットしてプロテインアレイを作製した。左) 抗 His タグ抗体によりスポットされた精製タンパク質を検出。右) 抗アセチルリジン抗体 (AL11) を用いてアセチル化タンパク質を検出した例。

完了し、1,536 スポットからなるプロテインマクロアレイを作製した。そこで本年度は翻訳後修飾特異的な抗体を用いて順次検出を行い、統計学的処理を行って各修飾を受ける候補タンパク質を同定した(図 1)。これまでに約 140 種類の抗体を用いて検出を行い、少なくともいずれか一つの抗体に反応したタンパク質の総数は実に 3,000 を超えた。現在はこの一次スクリーニングで得られたデータの信頼度を高めるために複数回の検出を行って再現性を確認するとともに、翻訳後修飾を受けるタンパク質の候補を絞り込むために、クラスタリングなどの統計学的な解析を行っている。さらに、得られた結果を別の実験方法で確認するための準備も行った。例えば、ユビキチン化については、GST-ユビキチンを発現する株を作製し、この株で発現させた候補タンパク質の電気泳動パターンを野生株のものと比較することにより、そのタンパク質がユビキチン化を受けているかどうか

かを判定することが可能である。このような確認実験を行うのに適した株を作製するためのツールとして、様々な発現用ベクターを開発した^{2, 3)}。また、翻訳後修飾をより効率的に検出するために、それぞれの翻訳後修飾を担うと考えられる酵素の遺伝子を過剰発現可能した株を作製している。

並行して、質量分析装置などの先端機器による翻訳後修飾解析技術の確立を目指しており、昨年度までに行った分析技術の開発とその検証を基に、本年度はタンパク質全体の質量測定による翻訳後修飾の有無、アミノ酸分析による修飾の種類の同定、LC-MS および MS/MS による修飾部位の同定の3つについて、実際に全遺伝子過剰発現株から調製した一部の分裂酵母タンパク質を用いて分析法を検討した。本年度はビオチン化が予想されるタンパク質を測定したが、主成分がビオチン化されていると確認できたものは無かったため、より微量な成分の分析が必要であった。一方、現在のアミノ酸分析の応用的利用⁴⁾を進め、酸加水分解で壊れてしまう翻訳後修飾の一つであるジスルフィド結合について、結合に関与しないシステイン残基を酸加水分解に安定になるように化学修飾して、還元、非還元条件下で検出を行うことでジスルフィド結合の定量を行った⁵⁾。また、東京理科大学の榎並教授らと共同でタンパク質複合体の成分を検出する方法を検討し光合成複合体 PSII の新しい成分を発見した⁶⁾。

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、タンパク質の翻訳後修飾はこの中でも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や活性に変化が生じることが期待されるため、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。

本年度は、前年度に作製した全細胞抽出液をニトロセルロース膜にスポットすることでリバースアレイを完成させた。そのリバースアレイに対して、ヒストン H3 の Lys9, Lys14, Lys18, Lys23, Lys56 のアセチル化、Lys4 のジメチル化、トリメチル化、Ser10 のリン酸化、ヒストン H4 の Lys5, Lys8, Lys12 のアセチル化を特異的に認識する抗体、ならびに、p38 MAP キナーゼホモログ Sty1 のリン酸化、p42/p44 MAP キナーゼホモログ Pmk1 のリン酸化、eIF2 α のリン酸化、Cdc2 キナーゼのリン酸化抗体を作用させて検討を行った。さらに、ヒストンの翻訳後修飾に対してリバースアレイで得られた陽性因子の SDS-PAGE/Western Blotting による確認を行った。その結果、ヒストンのアセチル化をグローバルに変動させる因子として、アセチル化、脱アセチル化酵素に加えて、ヒストンシャペロンやクロマチン構造に影響を及ぼす因子、さらには rRNA の転写活性化因子や減数分裂開始因子などを同定した。一方、Sty1 のリン酸化、Pmk1 のリン酸化、eIF2 α のリン酸化においてはそれぞれ 58, 171, 120 個の陽性因子を得ており、SDS-PAGE/Western blotting での確認を行っている。また、サブテーマ1「翻訳後修飾の網羅的解析」においてアセチル化とハイプシニ化の翻訳後修飾間に関連があることが示唆された eIF5A について、ハイプシニ化に影響を及ぼす上流因子についてリバースアレイを用いて検討を行った結果、55 個の陽性因子を得た。

さらに、リバースアレイから得られたヒストンの翻訳後修飾を引き起す候補因子に対して、クラスタリングなどの統計学的な解析を行ったのち、KEGG pathway や Gene Ontology などの情報と照ら

し合わせた結果、約 100 個の経路がヒストンの翻訳後修飾を引き起す候補として示唆された。

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を同定し、それらの制御機構を明らかにするとともに⁷⁻⁹⁾、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 とその基質の機能を解明することを目指した。前年度、SIRT3 の基質タンパク質としてケトン体生成に関与する HMG-CoA lyase (HMGCL) を同定したので、HMGCL の活性制御におけるアセチル化の役割について解析した。まず、過剰発現および RNAi 法による細胞レベル、in vitro の解析により、SIRT3 が HMGCL の特異的な脱アセチル化酵素であることを確認した。次に MS 解析を用いて、HMGCL の 48 番目と 56 番目のリシン残基がアセチル化部位であることを見出した。そこで、アセチル化部位変異体を作製してその活性を検討し、56 番目のリシン残基が酵素活性に重要であることが示された。SIRT3 ノックダウンにより内在性の HMGCL を過度にアセチル化させると、活性が顕著に増加した。さらに、SIRT3 ノックダウンによる HMGCL の活性上昇は、野生型の SIRT3 を発現させることにより減少したが、酵素活性欠失変異体では全く影響が無かった。以上の結果から、SIRT3 は HMGCL のアセチル化レベルを調節することによりケトン体生成を制御している可能性が示唆された。

また、アセチル化タンパク質として同定したアクチン結合タンパク質である cortactin のアセチル化の役割について検討した。cortactin のアセチル化部位はアクチン結合領域の繰り返し配列中に 7 箇所存在しており、その部位特異的なアセチル化抗体を作成し、免疫染色に用いたところ、アセチル化された cortactin は核に蓄積していることを見出した。さらに従来細胞質タンパク質と考えられてきた cortactin は核外移行シグナルを有し、核と細胞質をシャトルしていることがわかった。核外移行の阻害剤である leptomycin B 処理による核蓄積の増加は、cortactin のアセチル化を亢進させた。以上の結果から、cortactin は核でアセチル化され、アクチン結合と細胞の運動性が制御されることが考えられる。

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 クローンを分裂酵母へ導入し、過剰発現条件下にて致死性を示した遺伝子を探索したところ、代謝関連遺伝子が約 50 個、翻訳後修飾関連遺伝子が約 50 個含まれていた。これらの遺伝子は潜在的な阻害剤標的の候補となり得る。つまり、各遺伝子の過剰発現による増殖阻害をレスキューし、増殖を回復させるような化合物は、その遺伝子産物そのものか、その下流経路を特異的に阻害するものであることが強く示唆されるからである。また、これとは別に半透過細胞を用いて SUMO 化阻害剤の探索系を構築し、実際にスクリーニングを行ったところ、植物抽出液からギンコール酸およびアナカルジン酸を同定した。これらは E1 に直接結合し、酵素反応の中間体である E1-SUMO 複合体の形成を抑えることで酵素反応を阻害することを明らかにした¹⁰⁾。さらに微生物由来の SUMO 化阻害剤を探索したところ、Kerriamycin B を同定した¹¹⁾。

3. 研究実施体制

(1)「吉田」グループ

① 研究分担グループ長： 吉田 稔((独)理化学研究所、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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Shirai, A., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Arai, R., Komatsu, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *J. Biol. Chem.*, 283(16): 10745-10752, 2008.
2. Matsuyama, A., Shirai, A., Yoshida, M. A series of promoters for constitutive expression of heterologous genes in fission yeast. *Yeast*, 25(5): 371-376, 2008.
3. Matsuyama, A., Shirai, A., Yoshida, M. A novel series of vectors for chromosomal integration in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374(2): 315-319, 2008.
4. 堂前直, 益田晶子 SI トレーサブルなナノグラムレベルのタンパク質絶対定量—国家標準としての SI トレーサブルなアミノ酸標準の提唱—. *アミノ酸研究*, 1(1): 45-47, 2008.
5. Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D.G., Ito, K., and Nureki, O. Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature*, 455: 988-991, 2008.
6. Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Yamagoe, S., Iwai, M., Nakazato, K., Enami, I. A novel protein in Photosystem II of a diatom *Chaetoceros gracilis* is one of the extrinsic proteins located on lumenal side and directly associates with PSII core components. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777: 1545-1551, 2008.
7. Kamemura, K., Ito A., Shimazu, T., Matsuyama, A., Maeda, S., Yao, T.-S., Horinouchi, S., Khochbin, S., and Yoshida, M. Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374: 84-89, 2008.
8. Nishino, G. T., Miyazaki, M., Hoshino, H., Miwa, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377: 852-856, 2008.
9. Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Katoh, Y., Ota, K., Nakanome, A., Muto, A., Omura, S., Ohta, Y., Ito, A., Yoshida, M., Noda, T., and Igarashi K. Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. *Nat. Str. Mol. Biol.*, 15(12): 1246-1254. 2008.

10. Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K., Sodeoka, M., and Yoshida, M., Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem. Biol.*, *16*(2): 133-40, 2009.
11. Fukuda, I., Ito, A., Uramoto, M., Saitoh, H., Kawasaki, H., Osada, H., Yoshida, M., Kerriamycin B inhibits protein SUMOylation. *J. Antibiotics*, 2009, in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）