

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。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、その中で明らかになった重要な代謝関連因子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、約 150 種類の翻訳後修飾特異的抗体により、約 1,300 種類のタンパク質に、のべ 3,000 を超える翻訳後修飾を見いだした。その中から酵母の寿命制御に関わる新たなタンパク質とその重要なアセチル化修飾部位を見いだした。また、高等動物のエネルギー代謝に関わるヒトミトコンドリアの複数のタンパク質がアセチル化されることを見出した。これらは脱アセチル化酵素 SIRT3 の基質であり、その中からケトン体合成に関わる HMG-CoA リアーゼの活性がアセチル化によって制御されていることを見いだした。ケトン体は絶食時のグルコースに代わるエネルギー源であり、ミトコンドリアにおけるタンパク質アセチル化は飢餓への適応に重要であることが示唆された。また、ヒストンアセチル化を生細胞で可視化するための蛍光プローブの開発に成功し、細胞周期での変動やエピジェネティクス変化を直接観察することが可能となった。さらに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確立し、SUMO 化酵素、ポリ ADP リボシル化酵素などの阻害剤を発見した。

§ 2. 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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は、(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複雑な生命現象を説明するのに十分な数の細胞内分子を生み出しているだけでなく、タンパク質の機能を調節する上でも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、非常に重要性の高いミッションであると考えられる。しかし、これまでのところ、タンパク質を包括的に扱う技術上の困難さなどから、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解析がなされているに過ぎない。本研究ではクローン化した分裂酵母の約 5,000 種類からなる全遺伝子産物を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。前年度までに確立した 1,536 スポットからなるプロテインマクロアレイ法により、150 種類以上の抗体の少なくとも一つに反応したタンパク質の総数は実に 3,000 を超えたが、本年度は、より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し、非階層的クラスタリング等の統計学的処理により、候補タンパク質を選び出した。現在、少なくとも一つの修飾を受けていることが予想される約 1,300 種類のタンパク質について再度精製を行い、二次スクリーニングで検討している。

プロテインマクロアレイ法によりヒットした個々の翻訳後修飾タンパク質の高感度解析法の検討を行った。アミノ酸分析は、レーザー蛍光検出器を備えた高感度分析の系を立ち上げることで、以前の 10 倍に高感度化され 1 フェムトモルのアルギニンが S/N=10 以上で検出できた。また、ナノ LC-MS、MS/MS では、回収される断片の網羅性の向上のため、ESI 法ではスプレーカラムを 40 mm まで充填して高分離なシステムに改変した。これについては、ミトコンドリアユビキチン化酵素 MITOL の変異で増減するタンパク質の解析、サイトカイン LECT2(leukocyte cell-derived chemotaxin 2)のジスルフィド結合解析、脳梗塞マーカーアクロレイン結合たんぱく質の解析、DNA 組換えタンパク質 Rad52 の SUMO 化解析などに応用した(論文 2,6,7,8)。MALDI 法では従来 LC で分離していなかったものを LC-MS で分析できるようにオフライン LC-MALDI TOF MS を確立し、ポリアミン飢餓状態で増減するタンパク質の解析に応用した(論文 3)。LC-MALDI と LC-ESI を組み合わせることで、BSA 消化物を用いたテストでは、それぞれのイオン化法では約 50%の網羅率

であったが、共通する部分は 30%程度で両者をあわせることで網羅率が 70%に増加した。LC-MALDI では主に、クロマトグラフィーのごく初期で有機溶媒濃度が上昇しない時間に溶出されるペプチドや、分子量が大きなペプチドなど、ESI が苦手とするペプチドが検出できることを確認した。

2. 翻訳後修飾のネットワーク解析

翻訳後修飾の網羅的解析から翻訳因子の一つである eIF5A がアセチル化とハイプシン化の両方の修飾を受けるタンパク質であることがわかったので、その相互作用について解析した。ハイプシン化とは、スぺルミジンのブチルアミン部分を特異的リジン残基の ϵ -アミノ基へ NAD 依存的に転移後、水酸化されるという eIF5A に固有の翻訳後修飾であり、酵母からヒトまで保存された生育に必須のものである。しかし、その生理的意義は全くわかっていない。アセチル化はハイプシン化部位の近傍に起こり、ハイプシン化を抑制するとアセチル化が亢進したことから、ハイプシン化はアセチル化の抑制因子であることがわかった。アセチル化について詳細な解析を進めた結果、eIF5A はクラス III 脱アセチル化酵素 (Sirtuin) である Sir2、Hst2 によって脱アセチル化され、Gcn5 によってアセチル化されることがわかった。Sirtuin は多種の生物において寿命制御に関わることから、eIF5A のアセチル化にかかわる Sir2、Hst2 と分裂酵母の定常期における寿命との関連を検討した。その結果、通常の培地では eIF5A のアセチル化が過度に亢進される *sir2 Δ hst2 Δ 2* 重破壊株は野生株に比べ短命の表現型を示した。また、アセチル化状態を模倣するグルタミン変異株も短命になった。一方、*sir2 Δ hst2 Δ 2* 重破壊株において eIF5A のアセチル化部位のリジン残基をアセチル化されないアルギニン残基に置換した株では *sir2 Δ hst2 Δ 2* 重破壊株の短命化が抑圧された。さらにこの変異体 eIF5A を野生株に導入すると、高グルコース培地で増殖して定常期に入った細胞の老化を抑制した。これらの結果は eIF5A のアセチル化が短命化を引き起しており、eIF5A の翻訳後修飾がこれまで責任因子の明らかになっていない Sir2 を介した細胞寿命の制御機構の一つであることを示唆している。

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、ミトコンドリアに局在するクラス III 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。SIRT3 の基質として見いだした HMG-CoA lyase (HMGCL) は、ケトン体生成に重要な酵素であり、アセチル化がその活性を増加させることを見出した。さらに *in vivo* の生理的な条件下で HMGCL の活性がアセチル化によって制御されているかどうか検討したところ、48 時間絶食させたラット肝臓ミトコンドリアでは HMGCL のアセチル化レベルは顕著に増加し、その酵素活性も亢進していた。肝臓では絶食により HMGCL のみならず、グローバルなミトコンドリアタンパク質のアセチル化レベルは増加していたことから、絶食により SIRT3 の活性が低下し、その結果 HMGCL のアセチル化レベルが増加することにより酵素活性が上昇し、ケトン体生成を促進させていることが示唆された。一方、他の臓器では絶食によるミトコンドリアタンパク質のアセチル化の上昇は認められなかった。

HDAC6 は、細胞質に局在する HDAC であり、我々は HDAC6 が微小管や Hsp90 の脱アセチル化に関わることを示してきた。昨年、HDAC6 の恒常的なノックダウンにより、EGF 受容体の分解が促進することから HDAC6 がシグナル伝達を制御することを報告したが、本年度さらにファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) が HDAC6 と複合体を形成し、酵素活性そのものを制御することを見いだした。FTase のノックダウンあるいは FTase 阻害剤によってチューブリンのアセチル化が亢進し、微小管阻害薬との相乗効果が観察された (論文 4)。

タンパク質アセチル化の重要性は広く認識されるようになってきたが、これを生細胞で可視化することはこれまで不可能であった。本年度、我々は蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を利用して世界で初めてヒストンアセチル化を検出する蛍光プローブの作製に成功した (文献 5)。ヒストン H4 とアセチル化ヒストン H4 を認識して結合する BRDT のブロモドメインをフレキシブルなリンカーでつなぎ、それらを CFP と YFP で挟んだ蛍光プローブを構築した。Histac と名付けたこの蛍光プローブは、アセチル化に応答して BRDT ブロモドメインがヒストン H4 領域に結合して立体配置を変化させることにより生じる FRET の蛍光強度比変化を利用したセンサーである。実際に Histac を用いることで、細胞分裂期におけるヒストン H4 のアセチル化の変動や HDAC 阻害剤に対する応答を可視化することができた (図 1)。

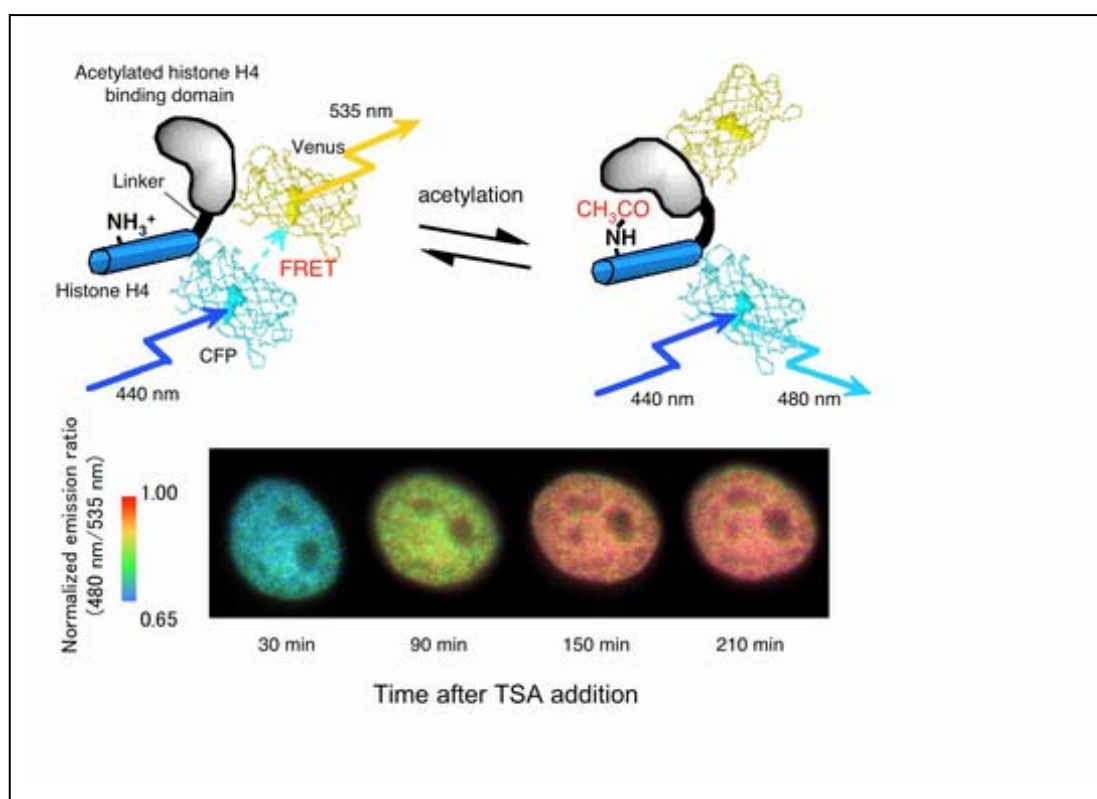


図 1. Histac によるヒストンアセチル化とリアルタイムイメージング

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代謝関連遺伝子のうち、翻訳後修飾関連遺伝子産物である Tankyrase 1 及び PARP10 を選び、その過剰発現株の致死性の回復を指標とした阻害剤探索系を構築した。Tankyrase 1 及び PARP10 は、NAD を基質としてタンパク質のポリ ADP リボシル化反応を触媒する酵素であり、「NAD 代謝ファミリー」に属する。ミトコンドリアの呼吸活性を測定する試薬 WST-1 を用いて細胞増殖を評価する液体培養アッセイ法を用いて化合物スクリーニングを行ったところ、阻害活性を持つ化合物として Tankyrase 1 に対してフラボンを(文献9)、PARP10 に対してクマリン骨格含有化合物をそれぞれ同定した。また、昨年度確立した半透過細胞を用いた SUMO 化阻害剤の探索を継続し、微生物培養液から Kerriamycin B 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 複合体の形成を押さえることで酵素反応を阻害することを明らかにした(文献1)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Fukuda, I., Ito, A., Uramoto, M., Saitoh, H., Kawasaki, H., Osada, H., and Yoshida, M. Kerriamycin B inhibits protein SUMOylation. *J. Antibiotics*, 62: 221-224, 2009. [DOI: 10.1038/ja.2009.10]
2. Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Yanagi, S. Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol. Biol. Cell.*, 20: 4524-30, 2009. [DOI: 10.1091/mbc.E09-02-0112]
3. Nishimura, K., Okudaira, H., Ochiai, E., Higashi, K., Kaneko, M., Ishii, I., Nishimura, T., Dohmae, N., Kashiwagi, K., Igarashi, K. Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41: 2251-61, 2009. [DOI: 10.1016/j.biocel.2009.04.021]
4. Zhou, J., Vos, C. C., Gjyzezi, A., Yoshida, M., Khuri, F. R., Tamanoi, F., and Giannakakou, P. The protein farnesyltransferase regulates HDAC6 activity in a microtubule-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 284: 9648-9655, 2009. [10.1074/jbc.M808708200]
5. Sasaki, K., Ito, T., Nishino, N., Khochbin, S., and Yoshida, M. Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 16257-16262, 2009. [DOI: 10.1073/pnas.0902150106]
6. Okumura, A., Suzuki, T., Dohmae, N., Okabe, T., Hashimoto, Y., Nakazato, K., Ohno, H., Miyazaki, Y., Yamagoe, S. Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biosci. Trends.*, 3: 139-143, 2009. [DOI: ---]

7. Yoshida, M., Higashi, K., Jin, L., Machi, Y., Suzuki, T., Masuda, A., Dohmae, N., Suganami, A., Tamura, Y., Nishimura, K., Toida, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Igarashi, K. Identification of acrolein-conjugated protein in plasma of patients with brain infarction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 391: 1234-1239, 2010. [DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.049]
8. Saito, K., Kagawa, W., Suzuki, T., Suzuki, H., Yokoyama, S., Saitoh, H., Tashiro, S., Dohmae, N., Kurumizaka, H. The putative nuclear localization signal of the human RAD52 protein is a potential sumoylation site. **J Biochem.**, in press.
9. Yashiroda, Y., Okamoto, R., Hatsugai, K., Takemoto, Y., Goshima, N., Saito, T., Hamamoto, M., Sugimoto, Y., Osada, H., and Yoshida, M. A novel yeast cell-based screen identifies flavone as a tankyrase inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, in press.

(4-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)