

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能  
制御基盤技術」  
研究課題「タンパク質修飾の動態と  
ネットワークの網羅的解析」

## 研究終了報告書

研究期間 平成17年10月～平成23年3月

研究代表者：吉田 稔  
(独立行政法人理化学研究所、  
主任研究員)

## § 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。タンパク質リン酸化修飾におけるリン酸基供与体である ATP はもとより、アセチル化、メチル化、ポリ ADP リボシル化等の修飾のためのアセチル基、メチル基、ADP リボシル基供与体は、それぞれアセチル CoA、S-アデノシルメチオニン、NAD であり、いずれも代謝の鍵物質でもある。また脱アセチル化酵素 Sirtuin は補因子として NAD を要求する。NAD は高カロリー栄養では NADH に変換されて減少するのに対し、低栄養状態では逆に増加する。したがって、Sirtuin は細胞内のエネルギー（酸化還元）状態を反映した酵素活性を示すことが知られている。このようにアセチル化やメチル化などのタンパク質翻訳後修飾は代謝活性と連動して制御されることが強く示唆されているが、その全体像は不明である。そこで本研究では、「**タンパク質翻訳後修飾から代謝を見る**」ことを研究の主題とし、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目標とする。具体的には、我々がクローン化した分裂酵母の全ゲノム ORF からタンパク質を完全精製したライブラリーを構築し、高密度プロテインアレイによって翻訳後修飾を網羅的に解析する、また同様に全ゲノム ORF 過剰発現株ライブラリーを用いて特定の翻訳後修飾を制御する上流因子を解析する、さらに動物細胞においても代謝調節に関わる翻訳後修飾の機能を解析し、最終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阻害剤開発による代謝制御法の確立を目指す。そのために4つのサブテーマを掲げ、以下の成果を挙げた。

### サブテーマ1「翻訳後修飾の網羅的解析」(堂前サブグループ)

約 5,000 種類からなる分裂酵母全タンパク質を変性条件下で相互作用タンパク質を除去した完全な精製タンパク質として取得し、1枚あたり 1,536 (384×4) スポットまたは 3,456 (384×9) スポットからなるプロテインアレイの作製に成功した。これを用いて約 150 種類の抗体により、のべ 3,000 タンパク質の翻訳後修飾を検出し、最終的に再現性、統計解析結果をもとに 1,300 種類のタンパク質で1つ以上の修飾が起こっていると結論した。次にこれらを物理的に確認するため、質量分析の最適化、固体酸触媒を用いた自動アミノ酸分析法の開発を行った。一方、同定された新規修飾タンパク質の中から、分裂酵母 eIF5A の機能解析を行い、そのアセチル化が高グルコース培地中で生育した細胞の経時寿命を制御していることを明らかにした。

### サブテーマ2「翻訳後修飾のネットワーク解析」(松山サブグループ)

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、翻訳後修飾を制御する上流因子を明らかにすることが可能である。そこで、全細胞抽出液をブロットしたマクロアレイ(リバースアレイ)を開発し、これを用いて各種部位特異的ヒストンアセチル化、eIF5A アセチル化およびハイプシニ化などを増減させる遺伝子を探索したところ、すでにヒストンアセチル化を上昇させることが知られている Cia1 や減少させる Sir2 を含む多数の遺伝子を同定した。

### サブテーマ3「動物細胞修飾タンパク質解析」(伊藤サブグループ)

HDAC 阻害剤トリコスタチン A および Sirtuin 阻害剤ニコチンアミドを併用処理することで細胞内の全ての脱アセチル化酵素活性を阻害し、動物細胞内に蓄積させたアセチル化タンパク質の解析を行った。ミトコンドリアタンパク質に関しては、ミトコンドリアに局在する SIRT ファミリーの恒常的ノックダウン細胞も併用した。その結果、複数の転写関連因子、mRNA 代謝関連因子、細胞骨格制御因子、シャペロン、ミトコンドリア代謝酵素などがアセチル化修飾を受けていることを見いだした。機能解析の結果、アクチン制御タンパク質 cortactin、ケトン体生成に関わる酵素 HMGCL 等の活性調節におけるアセチル化の重要な役割を明らかにした。

### サブテーマ4「代謝関連因子阻害剤探索系の構築」(八代田サブグループ)

ヒト cDNA 導入分裂酵母の作製とその表現型解析からいくつかの翻訳後修飾酵素の過剰発現が分裂酵母に致死的な作用を示すことを見いだした。Tankyrase、PARP10 などについて致死性を抑圧する化合物のスクリーニングを行い、活性化化合物を得た。また、タンパク質 SUMO 化を簡便に測定する評価系を開発し、イチヨウ抽出液からギンコール酸を単離するなど、初の SUMO 化阻害剤を

見いだした。さらにヒストン修飾を変化させる化合物の作用機構解析を行い、スプライシング因子を標的とすることを明らかにした。

## § 2. 研究構想

### (1) 当初の研究構想

#### <当初目的>

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行う。

#### <当初計画>

##### サブテーマ1「翻訳後修飾の網羅的解析」(堂前サブグループ)

質量分析、アミノ酸分析、プロット法などを駆使して、特定の翻訳後修飾について分裂酵母遺伝子産物を全体にわたって解析する。

##### サブテーマ2「翻訳後修飾のネットワーク解析」(松山サブグループ)

リバースアレイ法を中心に特定のタンパク質の翻訳後修飾を制御する上流因子を明らかにする。また、複数の翻訳後修飾を受けるものについて、その相互作用を解析する。

##### サブテーマ3「動物細胞修飾タンパク質解析」(伊藤サブグループ)

ミトコンドリアに局在する SIRT ファミリーの機能解析、新規アセチル化、メチル化タンパク質の機能解析など、個別の興味深い現象について解析する。

##### サブテーマ4「代謝関連因子阻害剤探索系の構築」(八代田サブグループ)

ヒト cDNA 導入分裂酵母の作製とその表現型解析、得られた表現型が遺伝子の機能に由来するかどうかの確認等を行う。また、重要な代謝関連因子のヒト cDNA 導入培養細胞を作製し、動物細胞でも評価系確立を試みる。

### (2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

当初の研究目的や研究計画からの大幅な変更や逸脱はなく、概ね当初の目標を達成した。変更点としてサブテーマ1では、当初想定したマイクロアレイではなく、最適化したピンレプリケーターを搭載したスポッティング装置を開発し、高精度、高密度マクロアレイによる高効率解析を可能とした。また、網羅的解析だけでなく、個別研究として新規アセチル化タンパク質の機能解析を行い、分裂酵母の新規寿命調節因子を同定した。サブテーマ4では、ヒト cDNA の分裂酵母への導入と表現型解析だけにとどまらず、それを用いた薬剤探索を実際に実施し、いくつかの新規活性物質を同定した。また、ヒト cDNA 導入培養細胞の作製による動物細胞を用いた評価系を構築する代わりに、より直接的な翻訳後修飾検出系であるセミインタクト細胞を用いた SUMO 化阻害剤探索系の構築や翻訳後修飾を変化させる天然生理活性物質の作用機構解析を実施した。

### § 3 研究実施体制

(1)「吉田」グループ（研究機関:独立行政法人理化学研究所）

#### ① 研究参加者

| 氏名     | 所属         | 役職        | 参加時期          |
|--------|------------|-----------|---------------|
| 吉田 稔   | 吉田化学遺伝学研究室 | 主任研究員     | H17.10～H23.03 |
| 堂前 直   | バイオ解析チーム   | チームヘッド    | H17.10～H23.03 |
| 鈴木 健裕  | バイオ解析チーム   | 技師        | H17.10～H23.03 |
| 益田 晶子  | バイオ解析チーム   | 協力研究員     | H18.05～H23.03 |
| 松山 晃久  | 吉田化学遺伝学研究室 | 専任研究員     | H17.10～H23.03 |
| 伊藤 昭博  | 吉田化学遺伝学研究室 | 専任研究員     | H17.10～H23.03 |
| 八代田 陽子 | 吉田化学遺伝学研究室 | 専任研究員     | H17.10～H23.03 |
| 荒井 律子  | 吉田化学遺伝学研究室 | 協力研究員     | H17.10～H21.03 |
| 西村 慎一  | 吉田化学遺伝学研究室 | 基礎科学特別研究員 | H17.10～H19.09 |
| 白井 温子  | 吉田化学遺伝学研究室 | 協力研究員     | H17.10～H20.07 |
| 前田 和宏  | 吉田化学遺伝学研究室 | 特別研究員     | H18.04～       |
| 小橋 信行  | 吉田化学遺伝学研究室 | 協力研究員     | H18.04～H21.03 |
| 高橋 秀和  | 吉田化学遺伝学研究室 | 基礎科学特別研究員 | H18.08～H21.04 |
| 西野 智則  | 吉田化学遺伝学研究室 | 協力研究員     | H17.10～H20.03 |
| 甲斐田 大輔 | 吉田化学遺伝学研究室 | 協力研究員     | H19.04～H19.09 |
| 関戸 茂子  | 吉田化学遺伝学研究室 | 専任技師      | H17.10～H23.03 |
| 小林 裕美子 | 吉田化学遺伝学研究室 | 専任技師      | H17.10～H23.03 |
| 河村 優美  | 吉田化学遺伝学研究室 | 協力技術員     | H18.09～H23.03 |
| 橋本 敦史  | 吉田化学遺伝学研究室 | 研究補助員     | H17.10～H23.03 |
| 中老 薫   | 吉田化学遺伝学研究室 | 派遣職員      | H18.04～H20.03 |
| 福田 勲   | 吉田化学遺伝学研究室 | 研修生(D3)   | H19.04～H21.03 |
| 島津 忠広  | 吉田化学遺伝学研究室 | 研修生(D3)   | H17.10～H19.03 |
| 中澤 由希  | 吉田化学遺伝学研究室 | 研修生(M2)   | H17.10～H19.03 |
| 伊藤 環   | 吉田化学遺伝学研究室 | 研修生(D4)   | H20.04～H23.03 |

#### ② 研究項目

1. 翻訳後修飾の網羅的解析
2. 翻訳後修飾のネットワーク解析
3. 動物細胞の修飾タンパク質解析
4. 代謝関連因子阻害剤探索系の構築

## § 4 研究実施内容及び成果

### 4. 1 翻訳後修飾の網羅的解析(堂前サブグループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

タンパク質に起こる翻訳後修飾はタンパク質の種類・性質に多様性を与えるだけでなく、細胞の構築・維持や細胞分裂など様々な生命現象を司るタンパク質の機能を調節する上でも非常に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、どのような制御機構に関与しているのかを包括的に理解することは複雑な生命現象を理解する上で避けては通れない重要な命題だと考えられる。しかし、DNA とは違って性質が一様でないタンパク質を包括的に扱う研究は極めて難しく、現在のところ、リン酸化やユビキチン化、アセチル化など、一部の主要な翻訳後修飾について網羅的に調べた報告例が存在するに過ぎない。これまでに 200 種類を超える翻訳後修飾が確認されているが、まだ未発見の翻訳後修飾も数多く存在することが予想されており、その総数は未知である。平均すると1タンパク質につき少なくとも1つ以上の翻訳後修飾があると見積もられているものの、実際に翻訳後修飾を受けるタンパク質がどれほど存在するかについてはまったく知見がないのが実情である。

我々はモデル真核生物である分裂酵母の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、タグを融合させたタンパク質として発現させることに成功した(文献 5)。そこで本研究ではさらにこの全 ORF クローンの発現系を応用し、タンパク質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した。

まず我々はこの発現系を用いて His タグを融合させた各タンパク質を個々に発現させ、SDS-PAGE により解析し、その泳動度をまとめた新規データベース「Mobilitome」を作成した(文献 15)。SDS-PAGE では単に分子のサイズだけでなく、修飾などによっても泳動度に差が生じることが知られている。実際に各タンパク質を抗タグ抗体により検出すると、主要なバンドとは泳動度の異なるバンドが多数のタンパク質において観察され、これらは一部のタンパク質の修飾により生じたと考えられた。全てのタンパク質についてこのような泳動度に影響を及ぼす修飾の存在を検出したところ、全体の少なくとも約3割のタンパク質で確認された。泳動度に影響しない修飾の存在を考え合わせると、細胞内では極めて多くのタンパク質が翻訳後修飾を受けていることが推測される。さらにその統計学的解析から、翻訳後修飾を受けるタンパク質が特に代謝関連因子に多いことも明らかとなった。

そこで、さらにこれらのタンパク質が具体的にどのような翻訳後修飾を受けているのかを包括的に明らかにするために、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、株の培養法ならびに 96 穴プレートを用いたハイスループットな精製法の開発を行った。条件検討の結果、酵母の培養は寒天プレート上でおこなうのが最も省スペースで比較的安定して大量のサンプルを回収できることがわかり、96 穴プレート単位での精製にもスムーズに移行できる実験系とすることができた。さらに、タンパク質の精製においては、特にバッファーの組成や用いるニッケルビーズの種類について詳しく検討し、SDS-PAGE による解析では、目的のタグ融合タンパク質以外のバックグラウンドをほぼ検出限界以下にすることに成功した。また、この際に目的タンパク質と相互作用するタンパク質が共精製されないように、強力な変性剤であるグアニジンを用い、実際に細胞内で複合体を形成しているタンパク質について、その結合パートナーが混入してこないことを確かめた。ニッケルビーズを用いた精製では除去できないタンパク質が唯一存在したが、質量分析によってそのタンパク質を同定し、仮にプロテインアレイにおいて検出されたシグナルがそのタンパク質に由来したとしても、後の解析で確認できるようになった。さらに抗体による検出においてもバッファーの組成などを検討し、従来の約 10 倍以上の感度でシグナルを検出できるようになった。このように実験系の基本的な技術がほぼ確立したところで、始めに約 400 種類のタンパク質を用いて実現可能性試験をおこなったところ、市販のマイクロアレイヤーを利用したマイクロアレイ法では、当初想定した十分な再現性と定量性が得られないことがわかった。そこで、ニトロセルロースメンブ

レンを用いたマクロアレイ法に切り替えたところ、本実験系の実用性が確認できた。そこで、実際にこの条件を用いて約 5,000 種類からなる分裂酵母全タンパク質の精製を開始し、384 ピンレプリケーターを用いて精製したタンパク質をニトロセルロースメンブレンにスポットすることによって、メンブレン1枚当たり 1,536 スポットからなるプロテインマクロアレイを作製することに成功した。これらのアレイに対し、独自に作製または市販されている合計約 150 種類の翻訳後修飾特異的な抗体による検出を行い、各修飾を受ける候補タンパク質を統計学的処理により選出した。この結果、200 種類以上の新規ビオチン化タンパク質の候補を見出したのを筆頭に、これまでほとんど解析されていないニトロ化や D 体のアミノ酸を含むタンパク質の候補などが多数見出された(図1)。本研究期間中に検出を行なった約 150 種類の抗体のうち、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。しかし、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、非階層的クラスターリング等の統計学的処理により最終的に候補タンパク質を約 1,300 タンパク質に絞り込んだ。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た。ただし、D 体のアミノ酸など、質量分析では検出が難しいと考えられるものについては検討項目から外した。

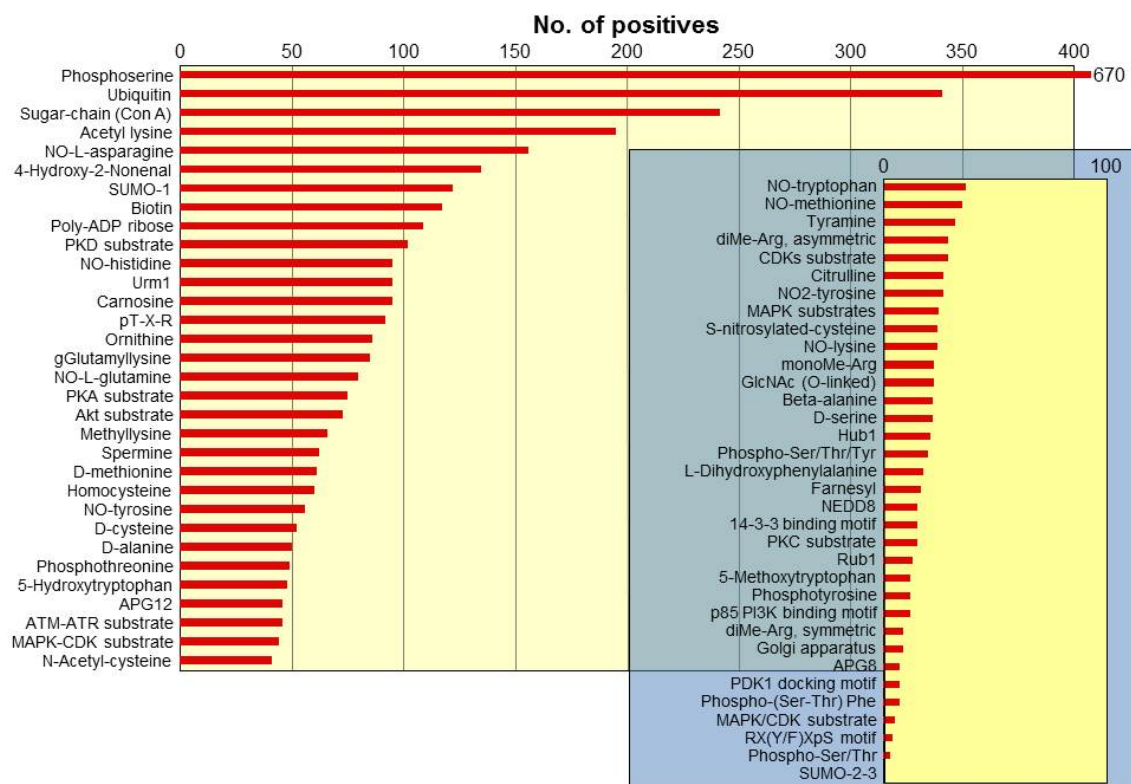
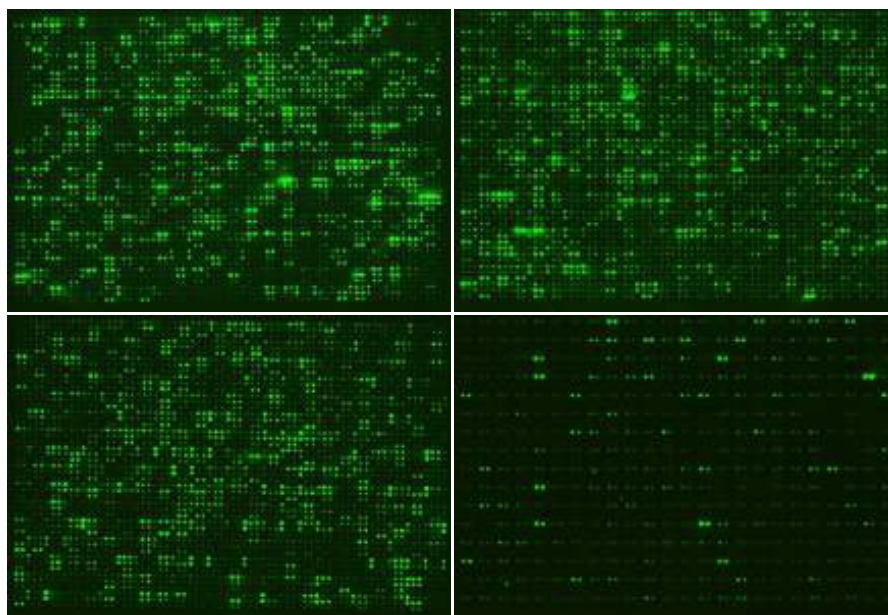


図1. プロテオームアレイによるスクリーニングで検出された翻訳後修飾の数

His<sub>6</sub>タグを利用して約5,000種類におよぶ分裂酵母の全タンパク質を精製し、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。

この過程において、これまでは384ピンのスポッターを用いて1枚のメンブレンについて4回のスポットを行い、1,536 (384×4) スポットからなるプロテインアレイを作製していたが、さらにスクリーニングのスピードを上げるために、これを9回スポットできるような装置をベンチャー企業とともに共同開発し、3,456 (384×9) スポットからなるプロテインアレイを作製することに成功した(図 2)。これにより、これまでは全タンパク質を7枚のメンブレンにスポットして検出する必要があったが、それが4枚のメンブレンでカバーできるようになり、検出時に生じるメンブレン間のシグナル強度のぶれも低減することができた。特に二次スクリーニングでは検討するタンパク質の数も1,300に減ったため、各タンパク質のスポット数を2にしてもわずか2枚のメンブレンで遂行することが可能になった。また、スポットに必要なタンパク質溶液の量も大幅に減らすことができるようになったことから、少ない試料でより多くのプロテインアレイを作製することが可能となった。



**図 2. 分裂酵母プロテオームマクロアレイ(3,456 スポット)**

スポットティング装置の開発により、メンブレン当たり 384×9 のスポットが作製可能になった。写真は約 5,000 種類におよぶ分裂酵母の全タンパク質を His<sub>6</sub> 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後、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した例。

二次スクリーニングでも多数の陽性タンパク質は得られたが、その後の解析のことを考慮し、比較的シグナルが強いものだけに的を絞り、電気泳動とウェスタンブロッティングによる検出で確認実験を行った。しかし、本研究において条件検討の末に開発したタンパク質精製用のバッファーは通常タンパク質の電気泳動に用いられる SDS-PAGE とは相性が悪く、直接電気泳動に使うことができなかったため、バッファー置換を行わなくてはならず、SDS-PAGE 用のサンプルを調製する方法を模索せざるを得なかった。最終的にピロガロールレッドを用いることにより、大量のサンプルを安価に、かつ少ないステップで処理し、SDS-PAGE に供することができるようになった。SDS-PAGE/WB においても翻訳後修飾特異的の抗体によって検出されたタンパク質については、個別に大量培養を行ない、His タグ融合タンパク質を精製後、一部を用いて SDS-PAGE/WB で修飾を確認し、質量分析に順次回した。本作業は現在もおこなっており、今後翻訳後修飾が確認されるタンパク質が逐次増えていく予定である。

このような抗体を用いた検出系の開発を進める一方で、タンパク質の翻訳後修飾を機器分析で確認するための方法について開発も行ってきた。アレイでは、抗原以外にクロスして反応する翻訳後修飾なども予想されるため、ターゲットを絞らないで新規な構造の修飾も含めて解析できるような

翻訳後修飾の解析システムの構築を目的とした。このような試みを成功させるために、通常のショットガン LC-MS のみに偏らず、全体を分析する方法を構築した。それは、1. タンパク質全体の質量分析を行い、遺伝子より予想される理論値との差を知る。2. 網羅率の高い LC-MS 分析を行う。3. アミノ酸に加水分解して部品としての修飾アミノ酸を同定・定量することの3つを併用することであった。

1. のタンパク質全体の質量分析は、通常は MALDI-TOFMS を用いることが多かったが、精度・分解能が不足することが多かったため、ナノ LC-ESI MS を用いて測定する方法と併用することを検討した。MALDI-TOFMS では分子量 10 kDa から 100 kDa の間で分解能が 1,000 から 100 に減少するが、ナノ LC-MS では 1,000 以上の分解能を保持できた。特にナノ LC-MS では、カラムに吸着したタンパク質のキャリーオーバーがあるため、自動切換バルブによるナノスプレーカラムの自動切換え装置を開発した。

2. の網羅率の高い LC-MS のためには、タンパク質の消化効率を高める必要がある。HAMILTON 製の自動分注ロボット STARLET をプログラムし、ゲル内消化を自動で行わせた。また、トリプシンのみならず、API、Asp-N など複数の酵素消化を行い、多くの断片を利用することでシーケンスカバレッジを高めた。さらにイオン化の方式の違い MALDI-TOFMS も行うことで通常の LC-MS で苦手な断片（分子量が小さいが多価イオンを生じるものや、逆に一価イオンしか生じないやや大きな断片）を捕捉可能となった。MALDI-TOFMS でもいわゆるペプチドマスフィンガープリント法 (PMF) のみならず、LC で分離した LC-MALDI-TOFMS も確立した。

3. のアミノ酸分析法はタンパク質の構造解析法としては質量分析の発達に反比例して衰退の一途を辿っていたが、まだまだ高感度化の余地が十分にあり、質量分析を補完する方法として特に今回開発に力を入れた。質量分析法では、修飾部位を含めた詳細な解析が可能であるが、逆にひとたび検出できない部分がアレイでは全く見落とされてしまう。アミノ酸分析は、全体としてどんな修飾がどの位存在するかをきちんと定量できるため、質量分析の補完として最適であった。また、クロマトグラフィーの溶出時間という情報は質量情報と原理的に全く異なり、同じ質量数の同位体の分析など質量分析では区別できない修飾の決定に威力を発揮する。このアミノ酸分析を高感度化するために、アミノ酸分析の最大のネックであるタンパク質の加水分解に対する開発と、アミノ酸分析自体の高感度化の両方を進めた。現在利用している気相塩酸化水分解法は、密閉したバイアルの中の蒸発した気相の塩酸が作用するため、加水分解後に減圧乾燥することで塩酸を除くことが出来、環境からの汚染も少なく微量分析には適していた。しかし、現在までのバイオ機器の多くは、自動化することで、環境からの汚染を減らしマニュアル操作のときとは桁違いに高感度化してきた。従って、加水分解も自動化が必要と考えた。しかし、揮発性のハロゲンを含む酸である塩酸は接液部のみならずガスで拡散して装置そのものを腐食させる。過去に、アプライドバイオシステムズ社も当時のプロテインシーケンサーの耐酸性のバルブの技術を用いて自動化を試みたが、やはりバルブの腐食によるトラブルのため、すぐに生産停止になった。酸加水分解の自動化のためには根本的な発想の転換が必要と考え、我々は汚染の影響を考慮しながらも不揮発性の酸に着目した。しかし、不揮発性の酸では、加水分解後に中和する必要がある、次のアミノ酸の分析を大きく阻害する。従って、中和の必要が無く、揮発しない酸という矛盾に陥りかけていた。これを打開したのは、酵素反応などで良く用いられる固定化という技術である。酸を固定化すれば、揮発しない酸の除去が出来ると考えるに至った。固定化された酸は、固体酸として今までに色々な分野で利用されていたが、タンパク質を微量で加水分解するための道具としては、誰も考えていなかった。我々は、この発想に基づきイオン交換樹脂を固体酸として牛血清アルブミンを試料として加水分解する条件を検討し、塩酸加水分解と同等になる条件を見つけ（文献 35）、特許申請した。また、膜状の固体酸触媒も作製し、イオン交換樹脂と同様にタンパク質を加水分解することに成功した。この触媒を用いると、高い耐熱性のため、通常 110 度、20 時間程度行っている加水分解を 150 度、2 時間で行うことができる。イオン交換樹脂の方式も膜の方式のいずれもバルブを用いた自動加水分解装置を作成し、自動化を行うことが可能となった。今後微量加水分解可能な固体酸触媒のマイクロリアクターの開発が必要である。

ハイスループットで高感度なアレイ分析の結果を生かすためにも、機器分析による翻訳後修飾の確定は重要な事項である。今まで、金属カラムを用いたリン酸化プロテオミクスや抗体カラムをア

セチル化プロテオミクスなど、翻訳後修飾の特異的精製法とショットガンプロテオミクスを組み合わせた修飾に特異的なトップダウン的なプロテオミクスは数多くなされてきたが、ボトムアップ的な個別のタンパク質からの翻訳後修飾解析はなかなか進んでいない。翻訳後修飾という、微量で多様な成分の本格的な構造解析にはまだ若干の時間がかかると考えている。しかし、本質的に重要な課題であることには変わりはない。今回開発した方法は、全ての翻訳後修飾の解析に適応でき、尚且つ新規な修飾にも対応でき、多種多様でヘテロな翻訳後修飾解析には大変画期的である。

機器分析による網羅的解析では、アレイ分析を行った試料について順次分析を行った。まず、全 ORF コレクションから発現精製した分裂酵母タンパク質を 96 種について上記の分析を行った。96 個の試料は発現量が異なっており、発現量の高い試料(電気泳動後 CBB 染色で可視化可能) 19 試料と発現量の低い試料(同じく銀染色で可視化可能、または LC-MS で消化断片を確認可能) 48 試料、発現が確認できなかった試料(同じく銀染色で確認できない、かつ LC-MS で消化断片を検出不可) 29 試料と分類した。ある程度の時間を要したが、これらの試料の全体の質量測定に関しては、発現量が高い 19 試料に対して行い、8 試料が測定可能であった。アミノ酸分析では、発現量が高い 19 試料に対して行い、6 試料がプロット後にバンドを検出できた。LC-MS、MS/MS 分析は、電気泳動を介さないものは 96 試料すべて、電気泳動を介したものは 62 試料分析した。シーケンスのカバー率は発現量が高い 19 試料で 16-62% 平均 37%、低い 48 試料で 0-50% 平均 8% であった。結果として、11 個の試料に翻訳後修飾を検出した。そのうちの多くは N 末端のアセチル化などであった。その効率を考え、更なる高感度化を図るとともにアレイ分析で陽性になったもののうち、ウェスタンなどで再度修飾を確認した試料についてさらに分析を続けた。現在までにリン酸化などの修飾をいくつか同定したが、新規なものも含めて現在解析中である。

この一連の過程では、プロテインアレイで得られた結果と SDS-PAGE/ウェスタンブロッティングから得られた結果との不一致が随所で観察された。その多くはプロテインアレイでは陽性となっても、電気泳動後にはそれが確認できないものであった。さらに、質量分析においても修飾が検出されたものとなるとかなり数が減ってしまった。一般的にはアレイは試料の全成分がスポットされていることから、混入物との交差反応によってバックグラウンドが高くなり、擬陽性の割合も増える傾向にあるとされる。したがって、一般的には電気泳動法、または質量分析で得られた結果の方が信頼される傾向があるが、本研究で構築したタンパク質の精製法は、電気泳動及びタンパク質染色から判断する限りではかなり精製度が高く、また、サンプル間で His タグ融合タンパク質の濃度の差はあっても、夾雑物の量はそれほど大きく変動しているようには見えない。SDS-PAGE/ウェスタンブロッティングによる検出は実験の工程が多く、特にポリアクリルアミドゲルからメンブレンへのタンパク質の転写の際は効率のぶれが非常に大きい。また、本研究では精製タンパク質を SDS-PAGE にかける際にいったんバッファーを置換する操作を行っているが、本操作中、およびバッファーを置換してグアニジンを除去したことによるチューブ壁面への試料の吸着などによる試料のロスも看過できないものであり、結果として電気泳動後の検出効率が低下する要因となってしまうのではないかとと思われる。本操作は、一般的なタンパク質のバッファー置換法としては十分有効であると考えられるが、翻訳後修飾を受けているタンパク質がどのような振る舞いをするのかについては、それぞれ性質の異なる翻訳後修飾のそれぞれについて検討するのが困難であり、修飾の種類によっては、修飾された分子特異的に操作中に損失している可能性がある。また、Mobilitome の作成によって明らかになったが、翻訳後修飾によって泳動度がずれる分子は、明確なバンドとして観察されないことも非常に多い。このような場合は検出されるシグナルもレーン上に長くうすすらと出る傾向にあり、アレイではそれらが全て一点に濃縮されるために検出できるが、電気泳動では確認できない可能性が増える。さらに、その一部のゲルから試料を取り出す質量分析は、目標を定めるのが難しく、検出がさらに困難になると考えられる。このような観点から、今回、プロテインアレイにおいては陽性になったものの、その後の試験で陽性とならなかったタンパク質については単純に偽陽性と判断するのは妥当とは言えず、十分に再考の余地があるものと思われる。

また、今回使用した抗体はすべて基本的にアミノ酸配列に依存せず、特定の残基の翻訳後修飾を認識する抗体として開発されているものである。翻訳後修飾の種類によっては、認識可能な抗体が複数あるものが多数存在する。例えば抗アセチルリジン抗体は今回用いたものだけでも 19 種類もある。今回のスクリーニングにおいてはこのような場合、ある程度の数の抗体で共通に陽性と

るタンパク質のみを陽性として扱った。その結果として、かなりの数まで候補が絞られたが、これらの抗体は実際にはある程度の配列指向性を持っており、反応性が修飾された残基の周辺配列に依存する傾向が強い。したがって、ある特定の抗体でない限り検出できないタンパク質(修飾)が存在するのも事実である。この観点からすれば、アレイによるスクリーニングでは、たった一つの抗体でも陽性になったものについては研究対象として考慮していくべきであろう。ただし、アレイではその性質上、ゴミや汚れなどによる偽陽性の問題も常に付きまとうため、今回の研究では複数の認識抗体があるにもかかわらず1種類の抗体でしか陽性とならなかったタンパク質(修飾)については候補としなかった。

一方で、逆にプロテインアレイでは陽性とならず、SDS-PAGE/ウェスタンブロットングでは検出される翻訳後修飾もあった。その典型例が後述する eIF5A のアセチル化であり、本タンパク質は、精製タンパク質の量は十分であったにもかかわらず、アレイではまったく抗アセチルリジン抗体でシグナルが検出されず、バッファー置換後に電気泳動して検出してみるとアセチル化のシグナルが観察された。同様の挙動を示すタンパク質が他にもいくつか偶然見出している。このような実験結果を考え合わせると、プロテインアレイ・電気泳動法・質量分析のそれぞれが得意とするタンパク質(修飾)は異なり、各方法に共通に検出されなくても、どれか1つの分析によって陽性となったタンパク質の翻訳後修飾については、将来的に詳細に解析していく必要があると思われる。

さらに一方で、これらの研究とは別に Mobilitome データベースの完成により、泳動度を元にして標的タンパク質をスクリーニングすることが可能となったことから、個別のタンパク質の解析も並行して行った。クラス III 脱アセチル化酵素(Sirtuin)の一つをコードする *hst2* の遺伝子破壊株において特異的にアセチル化が亢進する分子量約 22 kDa のタンパク質を泳動度を元にして候補を絞って同定したところ、翻訳開始因子 eIF5A であることが明らかになった(文献 15)。アセチル化について詳細な解析を進めた結果、eIF5A は 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。eIF5A がアセチル化されることは知られていたが、そのアセチル化に関与する因子は報告例がなく、今回初めてアセチル化を制御する酵素が明らかとなった。アセチル化され得る残基を別のアミノ酸に置換することによって検討したところ、ハイプシン化を受ける部位とアセチル化を受ける部位が近接していたことから、その相互作用について解析した。ハイプシン化とは、スペルミジンのブチルアミン部分が eIF5A の特定のリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基へ NAD 依存的に転移された後、側鎖の一部が水酸化されて生じる 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、その生理的意義はよくわかっていない。本研究において、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。Sirtuin は多種の生物において寿命制御に関わることから、分裂酵母において eIF5A のアセチル化にかかわる Sir2、Hst2 と定常期における寿命との関連を検討した。まず *sir2*、*hst2* の過剰発現の影響を検討したところ、これらの過剰発現は長命化を引き起こした。このことは分裂酵母においても Sirtuin が寿命に影響を及ぼすことを示唆している。次にそれぞれの遺伝子破壊株の検討を行った結果、通常の培地では、eIF5A のアセチル化が過度に亢進される *sir2 hst2* 二重破壊株は野生株に比べ短命であった。また、アセチル化状態を模倣するグルタミン変異株(eIF5A-KQ 変異株)も短命になった。一方、*sir2 hst2* 二重破壊株において eIF5A のアセチル化部位のリジン残基をアセチル化できないアルギニン残基に置換した KR 変異体を発現させたところ、*sir2 hst2* 二重破壊株の短命化が抑圧された(図 3A)。さらに eIF5A-KR 変異体を野生株に導入すると、高グルコース培地において長命の表現型を示した(図 3B)。

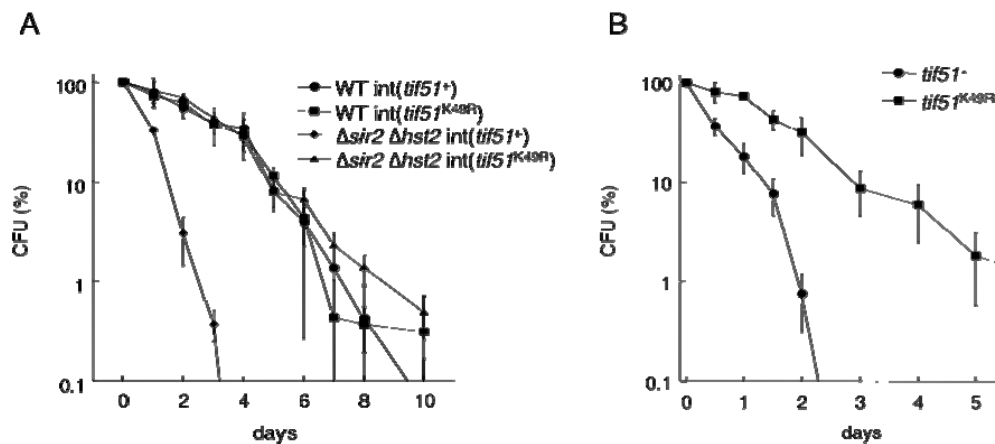


図 3. 定常期における分裂酵母の寿命

- (A) eIF5A のアセチル化が亢進している  $\Delta sir2 \Delta hst2$  株 ( $\Delta sir2 \Delta hst2$  int(*tif5I*<sup>+</sup>)) は野生株 (WT int(*tif5I*<sup>+</sup>)) に比べて短命であるが、アセチル化できない *tif5I*<sup>K49R</sup> の発現 ( $\Delta sir2 \Delta hst2$  int(*tif5I*<sup>K49R</sup>)) により短命は相補される。
- (B) 高グルコース濃度の培地においてアセチル化できない *tif5I*<sup>K49R</sup> 発現株は野生型 *tif5I* 発現株よりも長命になる。

次にアセチル化 eIF5A が短命を引き起こす機構について検討した。eIF5A のタンパク質翻訳への関与が示唆されていることから、新生タンパク質の合成について検討したところ、eIF5A のアセチル化が亢進している株 (*sir2 hst2* 二重破壊株) ならびに eIF5A-KQ 変異株では野生株に比べ、定常期における翻訳効率の上昇が見られた。さらに *sir2 hst2* 二重破壊株で見られた定常期でのタンパク質合成率の上昇はアセチル化できない eIF5A-KR 変異体を導入することによって抑圧された。今回観察されたタンパク質合成と寿命との関係は、他の生物種で観察されている、TOR (target of rapamycin) 経路の阻害やリボソームタンパク質の変異がタンパク質合成の低下を引き起こすことによって長命を引き起こす現象とよく一致している。また、タンパク質の翻訳には ATP が必要であることから ATP レベルの検討を行ったところ、野生株では定常期においても ATP レベルの維持が観察されたのに対し、短命となる *sir2 hst2* 二重破壊株では ATP レベルの減少が見られ、この現象もまた eIF5A KR の発現によって抑圧された。また、代謝物のメタボローム解析から、細胞内のアミノ酸やトリカルボン酸の低下が観察された。さらに、細胞死の原因の一つと示唆される活性酸素の発生レベルについて検討したところ、短命株 (*sir2 hst2* 二重破壊株、eIF5A-KQ 変異株) では定常期における活性酸素レベルの増加が見られ、この増加もまた、アセチル化できない eIF5A-KR 変異体の発現によって抑圧された。これらの結果から、アセチル化 eIF5A は定常期におけるタンパク質合成の促進、ATP レベルの減少、活性酸素の増加を引き起こし、結果、短命をもたらすことが示唆された。本研究の結果は、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。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究において構築されたタンパク質のハイスループット精製系、ならびにプロテオームアレイ作製技術は他の生物においても同様の大規模研究に応用可能である。特に、本研究課題において確立されたハイスループットなタンパク質精製法は、通常核酸などと違って個々の性質があまりに異なるためにまとめて扱えないタンパク質について、膨大な数の試料を研究者個人のレベルで実験可能にした。本来、このような研究は、国際コンソーシアムが結成されてもおかしくないような規模の研究であるが、それをわずか数名のチームで実現可能にできたことは非常に意義が大きい。本研究において作製されたプロテオームアレイは、長期間保存することも可能であるため、将来的にも独自に開発した翻訳後修飾特異的抗体などを所有していればそのまま利用できる。実際に紙

上発表前であるが、すでに特定の翻訳後修飾について研究している研究者から、本アレイを用いた共同研究が提案されている。実際にタンパク質をスポットティングするところも今回新たに独自開発し、市販のスポットターでは1,536 スポットが限界であるところを、その2倍以上である3,456 スポットまで作製できるようになった。高価なロボットを使わずとも、それを遙かに凌ぐスピードで誰でも簡単に高密度アレイを作製できることから、今後、非常に汎用性の高い装置であると考えられる。また、これによって、今後わずかな試料で、かつ検出もより少ない試薬・時間で行えるようになった。今回は主に市販されている翻訳後修飾特異的抗体を用いて研究を行ったが、その結果から考えると、現状ではまだそれらの抗体の質はあまり高くないと言わざるを得ない。しかし、翻訳後修飾に対する抗体は多くの企業で非常に精力的に開発が進められており、今後、良い抗体が出てくる可能性が大きいことから、翻訳後修飾の研究の発展に大いに貢献できると期待される。また、抗体の質の問題だけでなく、現状では300種類を超えるとされる翻訳後修飾に対して、検出可能な抗体(もしくはそれに代わる化合物等)は非常に限られている。これらのツールの開発が翻訳後修飾の解析において非常に重要なポイントとなるだろう。

また、機器分析においても、本課題の研究成果は翻訳後修飾解析に大きな道筋を立てたことにある。翻訳後修飾の網羅的解析はモディフィコミクスとも呼ばれ、現在精力的に研究が進められているが、そのほとんどがリン酸化などといった特定の修飾に関する網羅的解析であり、どのような修飾が入っているか不明なものは、その対象となっていない。本課題のようにアレイなどの付加的な情報がある場合でも、抗体が他の修飾とクロスして認識している例も多々あり、対象を決めないで行うことは新たな発見のためには欠かせない要件である。我々の翻訳後修飾の解析法は、未知の翻訳後修飾にも対応する点が特徴であり、今後さらに多くのニーズが生じられると思われる。現に本課題の開発の途中で行った実試料の解析も LC-MALDI 及び ESIMS によるタンパク質の微量同定(文献 27、28)以外の各種翻訳後修飾解析は糖鎖解析(文献 11、12)、ジスルフィド結合の解析(文献 20、31)、アクロレイン化(文献 32)、SUMO 化(文献 33)、メチル化(文献 38)などであり、今までのモディフィコミクスの対象ではないものばかりである。特に超高感度アミノ酸分析は、これらの構造解析の中でも特に重要で、膜タンパク質の透過機構トランスロコンの溶液構造の解明(文献 31)や新規脳梗塞マーカーのタンパク質結合型アクロレインの結合タンパク質の同定(文献 32)、ペプチドグリカン中の非天然アミノ酸の定量(文献 35)など、今後大きな発展が見られるであろう重要な発見に大きく寄与できた。さらに、今後もこれらの方法によって重要な発見が次々なされていくことが期待される。

個別の因子の解析においては、細胞寿命に対してこれまでにわかっていなかった sirtuin の責任因子が eIF5A であることを明らかにできたことから、今後 sirtuin が関係する寿命制御あるいは疾患における eIF5A のアセチル化の役割が明らかにされると期待される。特に高等生物における eIF5A のアセチル化の解析は寿命の研究において重要であると考えられる。なかでもカロリー制限による寿命延長は酵母から哺乳動物において広く明らかにされており、この寿命延長に sirtuin は重要な役割を担っていることから、カロリー制限下での eIF5A のアセチル化の動態を研究することは長命の機構を知る上で重要な課題となりうる。また、ヒト sirtuin の一つである SIRT1 の活性は肥満や糖尿病といった代謝疾患と関係していることが示唆されている。さらに最近 SIRT1 が記憶においても重要な働きをしていることが示され、SIRT1 の活性化が老化疾患の一つであるアルツハイマー病の治療に有望と考えられている。SIRT1 と eIF5A のアセチル化との関係ならびに、これら疾患と eIF5A のアセチル化との関係は報告されていないが、sirtuin が関係する代謝疾患、あるいは老化疾患における eIF5A のアセチル化の解析は重要な課題であると考えられる。また、ヒト eIF5A のホモログである eIF5A-2 の過剰発現は p53 を欠失させた幹細胞においてがんを誘導することが報告されている。これらの疾患に eIF5A のアセチル化が重要な役割を果たしていることが示されたなら、eIF5A のアセチル化の制御を目的とした薬剤の開発、さらにはこれら疾患の治療薬の開発につながると期待される。

#### 4. 2 翻訳後修飾のネットワーク解析(松山サブグループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

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这其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。

分裂酵母の約 5,000 遺伝子過剰発現の影響を検討するため、本研究ではリバースアレイの手法を用いた。リバースアレイは細胞抽出液をガラススライドやニトロセルロース膜などにスポットして作製する単純なアレイであるが、例えば特定のタンパク質の翻訳後修飾に対する抗体を用いることにより、その翻訳後修飾のレベルの変化を非常に迅速に調べることができる。本研究では全細胞抽出液を調製するにあたり、まず抽出方法の検討を行った。出芽酵母において細胞をアルカリ溶液で処理し、その後 SDS-PAGE サンプルバッファーで処理することによって、ガラスビーズで破碎する必要なく全タンパク質の抽出が行える方法が報告されていたことから、分裂酵母でも同様の方法を試した。分裂酵母の細胞抽出液調製に適したアルカリ溶液を検討した結果、容易に全タンパク質を抽出する方法を確立できた(文献 5、技術資料 1)。また、タンパク質の抽出バッファーについて検討したところ、SDS-PAGE サンプルバッファーと比較して 6 M グアニジンを含むバッファーの方がタンパク質の抽出効率が優れていたことから、本研究に用いた細胞抽出液の調製はグアニジンバッファーを用いて行った。また、細胞の培養は寒天プレートで行った。予備実験から、*nmt1* プロモーター発現誘導プレートでの 22 時間培養によりタンパク質の発現が確認され、さらに 4 cm<sup>2</sup> の培養で十分量の細胞が回収できた。これらの方法により、一度に多くの種類の細胞の培養が可能になり、迅速な全細胞抽出液の調製が可能となった。本研究では、シグナル伝達系の明らかにされていないヒストンの翻訳後修飾と、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ブシン化の翻訳後修飾間に関連があることが示唆された eIF5A について翻訳後修飾を引き起こす上流因子の同定を試みた。リバースアレイの検討では全細胞抽出液を分子量などで分離することなく検出を行うという特徴から、抗体の特異性が重要となる。そこで、翻訳後修飾を受けるアミノ酸残基に点変異を入れたタンパク質を発現させ、抗体の特異性を検討した。その結果、ヒストンのアセチル化認識抗体として、ヒストン H3Lys9、14、18、23、56、ヒストン H4Lys5、8、12 がリバースアレイに利用可能であった。また、eIF5A についても、リバースアレイで利用可能なアセチル化認識抗体とハイブシン化認識抗体を得ることができた。シグナルの検出には蛍光イメージアナライザー Odyssey を利用した。Odyssey は同時に2色の蛍光を検出できることから、この装置を用いることにより同時に2つの翻訳後修飾特異的な抗体を用いた検出が可能となり、作業効率の上昇が期待できる。予備実験として、細胞内で 1:1 の比で結合して存在していると考えられているヒストン H3 とヒストン H4 のタンパク質レベルを約 5,000 の遺伝子(ORF)の過剰発現株に対して検討したところ、H4/H3 の相関係数が 0.98 という高い相関性を示すという結果が得られた。この結果からリバースアレイを用いての検討方法は有効であると判断した。

リバースアレイを用いて約 5,000 の遺伝子過剰発現株を検討したところ、ヒストンのアセチル化を上昇させる因子として H3-Lys9 に対して 59 因子、H3-Lys14 に対して 72 因子、H3-Lys18 に対して 38 因子、H3-Lys23 に対して 23 因子、H3-Lys56 に対して 22 因子、H4-Lys5 に対して 5 因子、H4-Lys8 に対して 52 因子、H4-Lys12 に対して 83 因子が陽性因子として得られた。また過剰発現でヒストンのアセチル化レベルを下げる因子として H3-Lys9 に対して 10 因子、H3-Lys14 に対して 6 因子、H3-Lys18 に対して 52 因子、H3-Lys23 に対して 78 因子、H3-Lys56 に対して 20 因子、H4-Lys5 に対して 79 因子、H4-Lys8 に対して 17 因子、H4-Lys12 に対して 20 因子を陽性因子として得た。これら因子の過剰発現によるヒストンアセチル化への影響をウェスタンブロットティングで検討した。その結果、2 倍以上の変動を引き起こすものとして、16 因子を同定した。この中には既に報告のあるものとして、ヒストンシャペロン Cia1 の過剰発現による H3-Lys56 のアセチル化の上昇、NAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 の過剰発現による H3-Lys9 のアセチル化レベルの減少が観察されている。他の因子としては、 $\beta$ -グルコシダーゼ、システイン合成酵素、ミトコンドリア GTPase、mRNA 輸送タンパク質、GINS 複合体構成因子、タンパク質の核-細胞質輸送に関与する因子、オートファジーに関与する因子、脱リン酸化酵素、snoRNP アセンブリ因子が同定された。また、Cia1 や Sir2 においてもこれまでに報告のない残基に対する影響を示唆する結果が得られた。

eIF5Aの翻訳後修飾についてはリバースアレイの結果、eIF5Aのアセチル化レベルを上昇させる因子として 45 因子、ハイプシン化レベルを低下させる因子として 37 因子を同定した。サブテーマ1「翻訳後修飾の網羅的解析」における研究からハイプシン化レベルの低下がアセチル化レベルの上昇を引き起こすことを明らかにしている。そこで、過剰発現によりハイプシン化レベルを低下させ、アセチル化レベルを上昇させる因子に注目したところ、15 因子が相当した。

本研究では分裂酵母の全ゲノムを対象とした解析を行い、ヒストン H3、H4 のアセチル化に影響を及ぼす因子として 16 因子の同定に成功した。また、制御機構が明らかでない eIF5A のハイプシン化とアセチル化の解析に手がかりを得た。全遺伝子の過剰発現によるタンパク質翻訳後修飾への影響を検討した報告は本研究が初めてであり、また、この研究で開発したリバースアレイを用いた方法は他の生物にも利用できる汎用性の高いものである。

## (2)研究成果の今後期待される効果

今後期待される効果としては、この方法の他の生物種への応用である。今回、分裂酵母を用いて解析を行ったが、この方法は動物細胞などにも応用でき、薬剤やストレス処理後の翻訳後修飾の検討が可能である。また、分裂酵母では非必須遺伝子の破壊株のコレクションが市販されていることから同じ方法で遺伝子破壊の翻訳後修飾に対する影響を検討することができ、遺伝子過剰発現のケースと比較することができる。また、本研究ではヒストンのアセチル化と eIF5A のアセチル化、ハイプシン化を重点的に検討したが、他の翻訳後修飾因子、例えばストレスに応答して活性化する MAPK の活性化をモニターできるリン酸化抗体など、多くの有用な抗体を幅広く利用することで、その修飾並びに活性調節に至る細胞内のタンパク質間のネットワークを包括的に明らかにしていくことができると期待される。

## 4. 3 動物細胞の修飾タンパク質解析 (伊藤サブグループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

アセチル化、ユビキチン化、メチル化などの多様なリジン残基の翻訳後修飾は、相互に作用しながら代謝を含む様々な生命現象を制御していることが明らかになってきた。その中でもアセチル化は、ヒトにおいてリン酸化にも匹敵する重要な翻訳後修飾であることが明らかになりつつある。その制御の中心は、アセチル化酵素 (HAT) と脱アセチル化酵素 (HDAC) である。タンパク質のアセチル化の生物学的意義として、エピジェネティックな遺伝子発現制御が良く知られているが、HDAC はヒトで少なくとも 3 つのクラス、18 種類のパラログが存在し (図 4)、多様な基質特異性と遺伝子発現の制御以外の生体内機能を有していると考えられているが、現在までにその全貌の一端が明らかになったに過ぎない。我々は独自に発見、開発した特異的抗体 (文献 1)、阻害剤 (文献 2、3) などを利用し、クラス I および II の HDAC の機能をその局在や結合タンパク質等を解析することによって明らかにした (文献 13、14、16、21、24、29、30、36、37、39)。例えば HDAC4 が Bach2 と相互作用することによって核内フォーカスを形成すること (文献 13)、その核移行は PKC 経路の活性化によって負に制御されていることを明らかにした (文献 23)。一方、以前に我々がチューブリン脱アセチル化酵素であることを示した HDAC6 は、微小管を介したエンドサイトーシスに影響を与え、がん細胞における EGF 受容体などの代謝を制御していること (文献 16)、タンパク質ファルネシル化酵素と微小管上で結合し、活性調節を受けることもわかった (文献 28)。こうした研究を行う中で、HDAC の基質はヒストン以外にも多様なものが存在し、それら非ヒストンタンパク質のアセチル化を解明する必要があることがわかってきた。加えて HDAC サブタイプの中でもクラス III に属する SIRT は、ヒトにおいて 7 種類のサブタイプ (SIRT1-7) が存在し、酸化還元反応の補酵素である NAD 依存的な脱アセチル化酵素活性を有することから、細胞内の代謝レベルによりその酵素活性が制御されていると考えられている。興味深いことに、SIRT3、SIRT4、SIRT5 がエネルギー代謝の場であるミトコンドリアに局在することが最近報告され、ミトコンドリアタンパク質のアセチル化と代謝の密接な関係が推測されるが、その詳細はほとんど不明である。そこで、阻害剤や特異的修飾抗体を組み合わせ、基質であるアセチル化タンパク質、メチル化タンパク質等を同定し、それらの解析を通じて翻訳後修飾による新規の制御機構を見出す研究を行った。さらに、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 など、アセチル化・脱アセチル化酵素等の解析からそれ

らの新しい機能、特に代謝制御についての発見を目指した。

| group            | <i>S. cerevisiae</i>                 | human                                                                  | dependence | inhibitor            |
|------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------|
| Class I          | Rpd3                                 | HDAC1<br>HDAC2<br>HDAC3<br>HDAC8                                       | Zn         | Trichostatin A (TSA) |
| Class II         | Hda1                                 | HDAC4<br>HDAC5<br>HDAC6<br>HDAC7<br>HDAC9<br>HDAC10                    | Zn         | Trichostatin A (TSA) |
| Class III (Sir2) | Sir2<br>Hst1<br>Hst2<br>Hst3<br>Hst4 | SIRT1<br>SIRT2<br>SIRT3<br>SIRT4<br>SIRT5<br>SIRT6<br>SIRT7<br>hHDAC11 | NAD        | Nicotinamide (NA)    |

図 4. ヒト HDAC ファミリー

ヒトでは 18 種類の HDAC サブタイプの存在が知られており、3つのクラスに分類されている。SIRT3 は NAD 依存的なクラス III の脱アセチル化酵素である。

#### 新規アセチル化タンパク質の同定と機能解析

新規アセチル化タンパク質を同定する目的で、クラス I、II の HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) および、クラス III の HDAC (Sir2) 阻害剤であるニコチンアミド (NA) 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で免疫沈降し質量分析法により探索した。その結果、SV40 ウイルスの T 抗原、mRNA プロセシングに関わる CFIm2、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 を新規アセチル化タンパク質として同定に成功した(図 5)。次に得られたアセチル化タンパク質のアセチル化酵素、脱アセチル化酵素の同定、質量分析法を用いたアセチル化部位の同定、アセチル化部位変異体などを用いた機能解析を順次行った。

#### SV40 ウイルスの T 抗原

SV40 ウイルスの T 抗原のアセチル化酵素として CBP を、脱アセチル化酵素として HDAC1、HDAC3、SIRT1 を同定した。さらにアセチル化部位変異体を用いた解析から、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明らかにした。これらの結果から、アセチル化は、SV40 ウイルスの T 抗原の安定性を減少することにより SV40 ウイルスのトランスフォーム活性を制御することが示唆された(文献 4)。

#### mRNA プロセシング因子 CFIm2

CFIm2 のアセチル化酵素として CBP を、脱アセチル化酵素として HDAC1、HDAC3、HDAC10、SIRT1、SIRT2を同定した。さらに、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。これらの結果からアセチル化は、PAP の細胞内局在を制御することにより mRNA 3' 末端のプロセシングを調節することが示唆された(文献 8)。

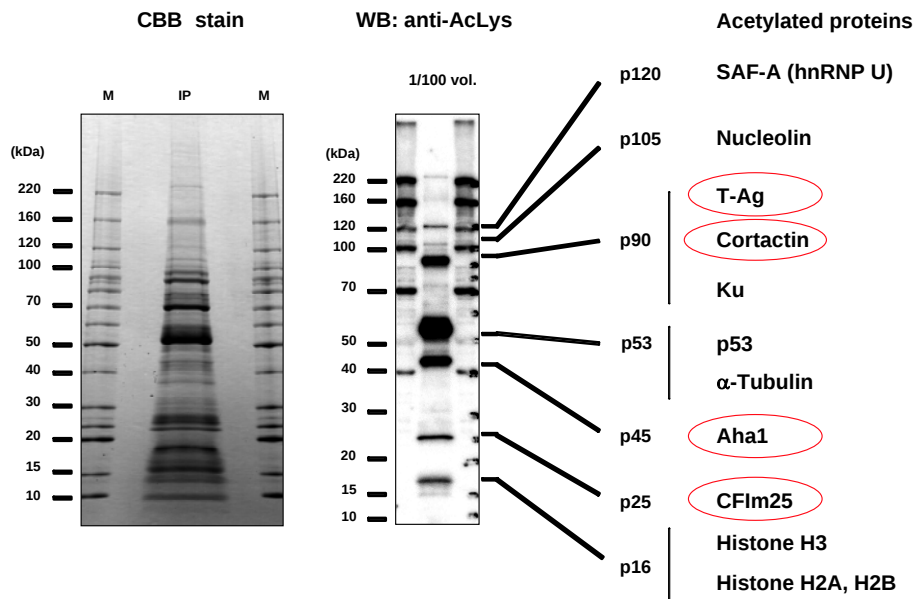


図 5. 新規アセチル化タンパク質の同定

TSA およびニコチンアミド処理した細胞からアセチル化タンパク質を検出し、質量分析によって同定した。

細胞運動性制御因子 cortactin

アクチン調節タンパク質である cortactin は、細胞の運動性を制御していることが知られており、がん細胞の転移に重要な役割を果たしていることが示唆されている。MS 解析および mutagenesis 解析によりヒト cortactin のアセチル化部位は、アクチン結合に重要な領域の繰り返し配列中に 7 箇所存在することを明らかにした。さらに、アセチル化はアクチン結合を低下させることにより細胞の運動性を低下させることを見出した。我々が得た結果と同様な結果が、マウス cortactin において報告されたが、我々が独自に作製したアセチル化 cortactin を特異的に認識する抗体を用いた免疫染

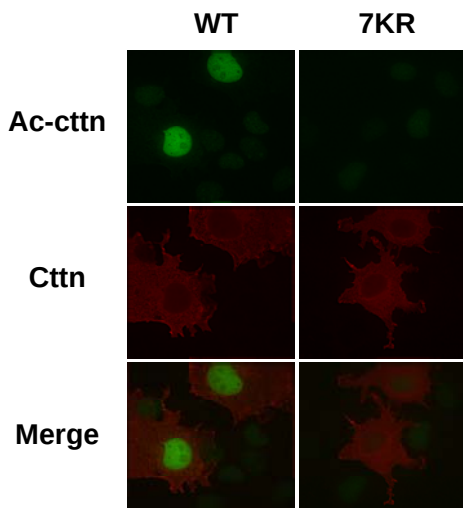


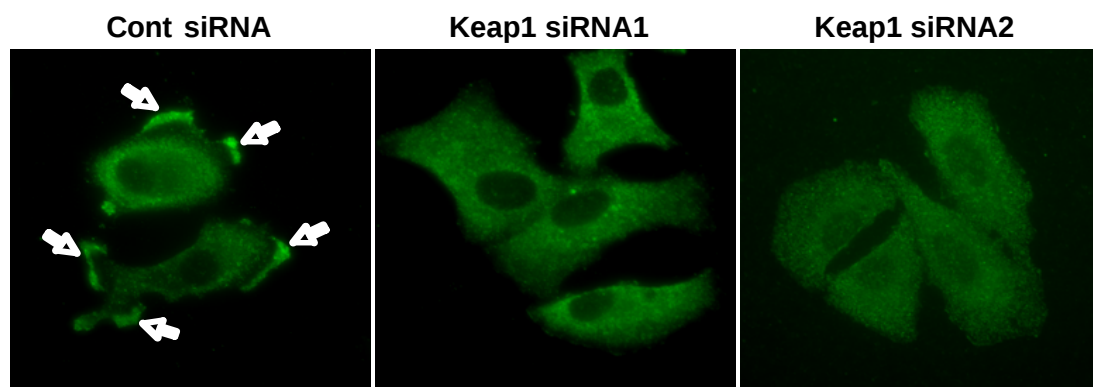
図 6. アセチル化 cortactin の核局在

cortactin の野生型 (WT) あるいは 7 つのアセチル化リジンをアルギニンに置換した変異体 (7KR) を細胞に発現させた後、アセチル化 cortactin を特異的に認識する抗体 (Ac-cttn) で免疫染色した。Ac-cttn は 7KR には全く反応しなかったことから、アセチル化 cortactin のみ認識していることが確認された。

色法により、アセチル化 cortactin は主に核に局在していることを明らかにし (図 6)、cortactin アセチル化の新規制御機構の存在を示唆する結果を得た。そこで、cortactin のアセチル化調節酵素の同定を試みたところ、マウス cortactin の脱アセチル化酵素として同定された細胞質タンパク質である HDAC6、SIRT2 に加えて、脱アセチル化酵素として SIRT1、アセチル化酵素として CBP を新たに同定した。興味深いことに SIRT1 および CBP は核タンパク質である。実際、従来細胞質タンパク質として考えられてきた cortactin は核と細胞質をシャトルするタンパク質であり、cortactin は核においてアセチル化されることを明らかにした。

そこで、cortactin の細胞内局在を制御する因子を同定することを目的とし、結合タンパク質の探索を行ったところ、酸化ストレス応答因子である Nrf2 の負の制御因子である Keap1 を cortactin の結合タンパク質として同定した。Keap1 ノックアウト MEF 細胞において、定常状態における cortactin の核局在が増加していたことから、Keap1 は cortactin の細胞内局在を制御する因子であることが示唆された。Cortactin は細胞の辺縁部に局在し、細胞の運動性を制御していることが知られている。そこで、ホルボールエステルで誘導される cortactin の細胞辺縁部の局在に Keap1 が必要であるかどうか検討したところ、Keap1 ノックダウンは cortactin の細胞辺縁部への局在を顕著に低下させた(図 7)。さらに、Keap1 は cortactin と共に細胞辺縁部へ移行したことから、cortactin の細胞辺縁部への局在に Keap1 は必至な因子であることが示唆された。加えて、Keap1 ノックダウンは、癌細胞の浸潤能を顕著に低下させた。以上の結果から、Keap1 は cortactin の細胞内局在制御因子として機能することにより、細胞の運動性を制御していることが示され、Keap1 はがん転移抑制の標的になる可能性が示唆された。

次に、Keap1 が酸化ストレス応答制御因子であることから、酸化ストレス応答における cortactin の新たな役割について検討した。まず酸化ストレスによって cortactin の細胞内局在が変化するかどうか検討したところ、酸化ストレス刺激により cortactin の核局在が顕著に増加した。さらに、酸化ストレス刺激により cortactin のアセチル化が誘導されたことから、cortactin は酸化ストレスにより核に移行し、アセチル化されることが示唆された。興味深いことに酸化ストレスは、cortactin と Keap1 の結合を解離させた。さらに、Keap1 ノックアウトは、酸化ストレスによる cortactin の核移行とアセチル化の顕著に増加させた。これらの結果から、Keap1 は Nrf2 と同様、酸化ストレスによる cortactin の核移行を制御していることが示唆された。以上の結果から、新規酸化ストレス応答制御機構として、Keap1-cortactin 経路の存在が示唆された。



**図 7. Cortactin の細胞辺縁部への局在に対する Keap1 ノックダウンの影響**

A549 細胞に、コントロールあるいは Keap1 siRNAs をトランスフェクションした後、血清を除去した培地で 24 時間培養した。PMA を 20 分間添加した後、細胞を固定し、cortactin 抗体で免疫染色した。矢印は、細胞辺縁部に局在している cortactin を示している。2 種類の異なる配列の Keap1 siRNA をトランスフェクションした細胞では、細胞辺縁部に局在している cortactin はほとんど存在しなかった。

#### ミトコンドリア SIRT ファミリーの機能解析

ミトコンドリアはエネルギー代謝を担うとともにアポトーシスや老化などにもかかわる重要なオルガネラである。機能未知の NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRTs のいくつかがミトコンドリアに特異的に局在することに着目し、これらの酵素のミトコンドリアでの役割を検討した。各 SIRT の機能を明らかにする目的で、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。その結果、SIRT3 ノックダウン細胞の培養液のみが急速に酸性化することを見出した。そこで培養液中の有機酸の濃度を調べたところ、SIRT3 ノックダウン細胞の培養液中に乳酸と

酢酸が顕著に蓄積していることを見出した。乳酸および酢酸はエネルギー代謝産物であることから、SIRT3 はエネルギー代謝に関与していることが示唆された。

さらに、SIRT3 の基質であるアセチル化タンパク質を同定するために、SIRT3 と結合するタンパク質を単離し、その中からアセチル化タンパク質を探索するアプローチを最初に試みた。TAP 法を用いて、SIRT3 と結合するタンパク質を複数同定したが、そのいずれもアセチル化タンパク質ではなかった。そこで、TSA およびニコチンアミドを処理した細胞、あるいは SIRT3 ノックダウン細胞のミトコンドリア画分から、抗アセチル化リジン抗体を用いたアフィニティー精製と LC-MS/MS を用いた解析により、アセチル化タンパク質の同定を試みた。その結果、48 個のミトコンドリアに局在するアセチル化候補タンパク質を得た。cDNA クローニングとアセチル化リジン抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果から、少なくとも 5 つのアセチル化タンパク質の同定に成功した。得られたアセチル化タンパク質は、ケトン体生成に関わる HMG-CoA lyase (HMGCL)、TCA サイクルで働く  $\alpha$  ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の構成因子である dehydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST)、好氣的呼吸に重要なピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) の構成因子である pyruvate dehydrogenase  $\alpha$  1 (PDHA1)、dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT) など、全てエネルギー代謝に関わる酵素であった。しかもこれらは全て SIRT3 の基質であることも明らかになった。そこで、HMGCL に直目し、アセチル化による活性制御機構について解析した。

質量分析法と変異体を用いた解析により HMGCL のアセチル化部位の同定を行った結果、48 番目と 56 番目のリジン残基がアセチル化部位であることを明らかにした。56 番目のリジン残基をアルギニンに置換したアセチル化欠損変異体の酵素活性は顕著に減少したことから、アセチル化部位である 56 番目のリジン残基は HMGCL の酵素活性に重要であることが示唆された。さらに、SIRT3 が HMGCL の酵素活性を制御しているかどうか検討したところ、SIRT3 ノックダウン細胞中の内在性の HMGCL の酵素活性が上昇していることを見出した。加えて、SIRT3 の発現低下による HMGCL の酵素活性増加は、野生型の SIRT3 を導入することにより抑制されたが、酵素活性欠失変異体ではされなかった。以上の結果から、SIRT3 は脱アセチル化酵素活性依存的に HMGCL の酵素活性を負に制御していること、即ち、アセチル化は HMGCL の活性を正に制御していることが示唆された。

次に、HMGCL のアセチル化を正に制御する因子の探索を行った。約 21,000 のヒト遺伝子を標的としたダーマコン社のゲノムワイドな siRNA ライブラリーから、Gene Ontology および、mitop2 データベースのどちらか一方でミトコンドリアに局在すると予測された 1,373 のタンパク質をコードする遺伝子の中で、ノックダウン依存的に HMGCL のアセチル化レベルを減少する遺伝子を探索した。その結果、PDHC の構成因子である PDHA1 および DLAT のノックダウンにより HMGCL のアセチル化レベルが減少することを見出した。PDHC は好氣的呼吸においてピルビン酸からアセチル CoA を産生する酵素である。アセチル CoA はアセチル基の供与体であることから、PDHA1 および DLAT のノックダウンによりミトコンドリア内のアセチル CoA の濃度が減少し、その結果、HMGCL のアセチル化レベルが減少したと考えられる。興味深いことに、PDHA1 のノックダウンは、ヒストンのアセチル化レベルにはほとんど影響を与えなかった。この結果は、アセチル CoA 濃度の減少は、優先的にミトコンドリア内のタンパク質アセチル化に影響を与えることを示唆している。また、PDHA1 のノックダウンは、HMGCL の酵素活性を有意に低下させた。以上の結果から、HMGCL のアセチル化レベルと活性は、ミトコンドリア内のアセチル CoA 濃度によって制御されていることが示唆された。

次に、ミトコンドリアの局在が HMGCL のアセチル化レベルに影響を及ぼすかどうか検討した。ミトコンドリア局在化シグナルを欠損させ、ミトコンドリアに局在できなくなった HMGCL 変異体のアセチル化レベルは顕著に低下し、その酵素活性も減少した。以上の結果から、HMGCL のミトコンドリア局在は HMGCL のアセチル化と酵素活性の両方に必要なことが示唆された。さらにこの結果は、HMGCL はミトコンドリアでアセチル化されることを示しており、ミトコンドリア内に未同定のアセチル化酵素が存在をしていることを示唆している。

これまでの結果から、細胞レベルにおいてアセチル化は HMGCL の酵素活性を正に制御していることが示された。そこで、生理的な条件下、特に個体レベルでアセチル化は HMGCL の活性を制御しているかどうか検討した。絶食あるいは飢餓などによりケトン体生成が促進される。肝臓で生成されたケトン体は血液中に放出され、脳などの組織でグルコースの代替エネルギー源として使用されることが知られている。そこで、48 時間絶食させたマウス肝臓の HMGCL のアセチル化レベルを調べたところ、絶食により顕著にアセチル化が増加していることを見出した(図 8)。また、絶食により HMGCL だけでなくグローバルなミトコンドリアタンパク質のアセチルレベルも上昇していた。重要なことは、48 時間の絶食により HMGCL の酵素活性も有意に増加していたことである。興味深いことに、ケトン体生成が起こらない心臓においては、絶食によって HMGCL のアセチル化、酵素活性とも変化しなかった。以上の結果から、アセチル化が絶食応答における HMGCL 活性制御の一端を担うことが明らかになった。

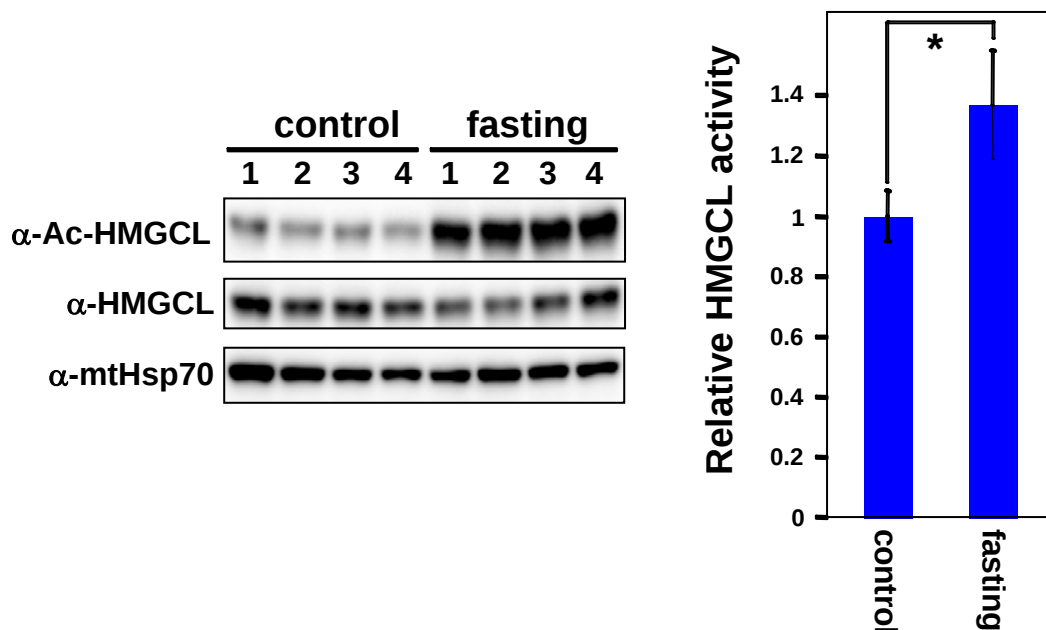


図 8. 絶食マウス肝臓における HMGCL のアセチル化レベルと酵素活性の上昇  
48 時間絶食させたマウス(n=4)から肝臓を摘出し、ミトコンドリア画分を精製した。精製したミトコンドリア画分の一部をウェスタンブロット(上の図)に、残りを HMGCL の活性測定に用いた。

## (2)研究成果の今後期待される効果

今回の研究結果から、アセチル化による様々なタンパク質の活性制御機構の存在が明らかになった。今後期待される波及効果として、疾患の原因究明とアセチル化を標的とした創薬への応用が挙げられる。

Cortactin は多くのがん細胞で過剰に発現しており、がんの転移、浸潤に重要な役割を果たすことが知られているが、これまで cortactin を標的としたがん転移阻害薬は存在しなかった。今回の成果から、cortactin のアセチル化を標的としたがん転移阻害薬の開発が可能になったと考える。すなわち、HDAC6 と SIRT2 が cortactin の脱アセチル化酵素として機能し、運動性を正に制御することが証明された。したがって、これらを阻害する化合物は有望な抗がん剤になりうると考えられ、がん治療における分子標的としての HDAC6 と SIRT2 の重要性を提示することができた。さらに我々は、cortactin の新規制御因子として Keap1 を同定することに成功した。Keap1 は多くのシステイン残基を有し、これらを介してさまざまなタイプの酸化ストレスを認識し、ストレス応答遺伝子 Nrf2 を活性化することが知られていた。今回の発見は、Nrf2 とは独立に Keap1 が cortactin と結合することに

より、がん細胞の浸潤を制御することを示している。生体内では糖代謝、エネルギー代謝の過程で多くの酸化ストレスが生み出される。また、環境中には危険な酸化剤が存在しており、Keap1 は細胞の運動性を制御することによって酸化ストレス防御に重要な役割を果たしている可能性があり、今後疾患との関連を注意深く観察する必要がある。

SIRT3 ノックダウン細胞の結果および絶食マウスを用いた結果により、ミトコンドリアのタンパク質アセチル化は、絶食・飢餓などのエネルギー変化に応答してエネルギー代謝を制御していることが示唆された。アセチル CoA は代謝の鍵物質であると同時にアセチル化の基質でもあり、その存在量とミトコンドリアタンパク質のアセチル化との相関関係も明らかになった。このことは、タンパク質アセチル化は本来、代謝活性と深く関連することを示している。アセチル CoA の生産とエネルギー代謝は、肥満、糖尿病などの疾患と密接に関わっていることから、今回の成果は、SIRT3 を標的としたケミカルバイオロジーが肥満予防薬、糖尿病薬など、エネルギー代謝に関わる疾患の治療薬開発へ繋がる可能性があることを示したものと言える。

#### 4. 4 代謝関連因子阻害剤探索系の構築

##### (1)研究実施内容及び成果

サブテーマ4では、Gateway 化された完全長ヒト cDNA を用いて代謝関連因子の分裂酵母での過剰発現の表現型を明らかにすることにより、将来の阻害剤開発のための探索系の構築を目指した。例えば増殖阻害を引き起こす遺伝子の場合、その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。この方法を適用すると、特定の酵素活性など、試験管内で測定可能な具体的機能が不明の遺伝子産物についても、その表現型を利用した阻害剤探索系が構築可能な点が画期的であり、本研究では、代謝関連重要遺伝子について、その産物の阻害剤探索系を構築し、阻害剤による代謝の人為的制御法の確立を目指した。

予備実験として、Gateway 化された完全長ヒト cDNA クローンを LR 反応によって分裂酵母用発現ベクター pDUAL にクローン化するための条件検討を行い、もっとも効率よく変換できる条件を策定した。薬剤探索という観点から、宿主となる分裂酵母として多剤感受性となるような分裂酵母株を作製した。具体的には、分裂酵母において薬剤排出ポンプをコードする 11 種の遺伝子の一つずつ破壊した株を作製し、それぞれの薬剤感受性を検討した。その結果、たった 2 種類の遺伝子破壊株が野生型株より薬剤感受性を示し、しかも感受性を示す薬剤の種類が 2 種の遺伝子破壊株それぞれで異なることがわかった(文献 41)。そこで、2 種の遺伝子を同時に破壊した二重破壊株を作製することにより、目的の多剤感受性株を得ることができた。この二重遺伝子破壊株は形質転換効率もよく、本系で問題なく使用できた。また、増殖阻害の回復を指標とした阻害剤探索系を構築するため、96 穴プレートや 384 穴プレートを用いてハイスループット化できるような条件検討を行った。

最終的に、Gateway 化された完全長ヒト cDNA の中から代謝関連因子を中心に重要な遺伝子を選択し、過剰発現条件下にて増殖阻害を示した遺伝子のうち、翻訳後修飾関連遺伝子産物である Tankyrase 1 及び PARP10 を選び、その過剰発現株の増殖阻害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 (PARP) 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、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(文献 33)。フラボンもクマリン骨格含有化合物もポリフェノール的一种であるが、同じ PARP である Tankyrase 1 と PARP10 では、阻害活性をもつ化合物の基本構造が異なる。阻害活性を示した化合物はそれぞれの PARP の NAD 結合部位に結合すると予測されるが、その NAD 結合部位の構造の相違により特異的阻害剤の構造が決定されることが示唆された。

また、翻訳後修飾と代謝制御に関わる新たな阻害剤探索のための分子標的を同定することを目的に、ヒストン修飾に影響を与え、細胞周期停止を引き起こす化合物 FR901464 の作用機構を解析した。FR901464 は細胞周期阻害因子である p27 の増加と C 末端欠失型の p27 (p27\*と命名)の

蓄積をもたらした。FR901464 の安定誘導体 (spliceostatin A) を合成し、それを固定化して結合タンパク質を単離したところ、スプライソソームの構成因子である SF3b 複合体を見いだした。結局、FR901464 と spliceostatin A はスプライシング因子 SF3b に結合し、スプライシングを阻害することが明らかになった。また、p27\* は p27 の前駆体 mRNA から翻訳されたものであることも判明し、SF3b がスプライシングだけでなく、前駆体 mRNA の核内保持にも重要な役割を果たすことが明らかになった (文献 9)。さらに分裂酵母でも spliceostatin A は SF3b を阻害し、イントロン配列の翻訳を引き起こすこと、その作用は核膜孔でのゲートキーパーである Mlp1 とは独立したものであることを示した (文献 10)。

そして、これらとは別に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である SUMO 化酵素の阻害剤探索系を構築した。ユビキチン様タンパク質である SUMO によるタンパク質修飾は、標的となるタンパク質の活性、細胞内局在、安定性などを制御することにより様々な生命機能発現に関与していることが知られている。そこで *in situ* SUMO 化アッセイ系を応用した SUMO 化反応検出のためのイメージング法を用いて SUMO 化阻害剤探索系を構築した。実際にスクリーニングを行った結果、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、ギンコール酸が 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 (文献 24)。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 (文献 25)。

サブテーマ間をまたぐ研究として、サブテーマ3で明らかになった分子標的に対する阻害剤探索系の構築にも着手した。具体的には、将来の代謝異常治療薬の開発にもつながる標的としてミトコンドリアの SIRT3 を選び、その特異的な阻害剤探索系を構築した。

## (2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、代謝の人為的制御を可能とする阻害剤探索系の構築に成功し、実際にいくつかの阻害剤を同定した。これらの阻害剤の使用により、遺伝子のノックアウトなどのオンオフ制御とは異なる、代謝制御に関与する因子の段階的制御が可能となることから、代謝制御を理解する上での新たな解析法の開発に貢献すると考えられる。

## § 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1 件、国際(欧文)誌 39 件)

1. 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.
2. 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: 4809-4812, 2006.
3. 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.
4. 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.
5. 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*. **Nature Biotechnol.**, 24: 841-847, 2006.
6. Margolis, S. S., Perry, J. A., Weitzel, D. H., Freel, C. D., Yoshida, M., Haystead, T. A., and Kornbluth, S. A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. **Mol. Biol. Cell**, 17: 1779-1789, 2006.

7. Tokunaga, K., Shibuya, T., Ishihama, Y., Tadakuma, H., Ide, M., Yoshida, M., Funatsu, T., Ohshima, Y., and Tani, T. Nucleocytoplasmic transport of fluorescent mRNA in living mammalian cells: nuclear mRNA export is coupled to ongoing gene transcription. **Genes Cells**, 11: 305-317, 2006.
8. 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: 4470-4478, 2007.
9. Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., and Yoshida, M. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. **Nature Chem. Biol.**, 3: 576-583, 2007.
10. Lo, C.-W., Kaida, D., Nishimura, S., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Taoka, H., Ishigami, K., Watanabe, H., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., and Yoshida, M. Inhibition of splicing and nuclear retention of pre-mRNA by spliceostatin A in fission yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 364: 573-577, 2007.
11. Masuda A, Baba T, Dohmae N, Yamamura M, Wada H, Ushida K. Mucin (qniumucin), a glycoprotein from jellyfish, and determination of its main chain structure. **J. Nat. Prod.**, 70: 1089-1092, 2007.
12. Many H, Suzuki T, Akasaka-Many K, Ishida HK, Mizuno M, Suzuki Y, Inazu T, Dohmae N, Endo T. Regulation of mammalian protein O-mannosylation: Preferential amino acid sequence for O-mannose modification. **J. Biol. Chem.**, 282: 20200-20206, 2007.
13. Hoshino, H., Nishino, T. G., Tashiro, S., Miyazaki, M., Ohmiya, Y., Igarashi, K., Horinouchi, S., and Yoshida, M. Corepressor SMRT and class II histone deacetylases promote Bach2 nuclear retention and formation of nuclear foci that are responsible for local transcriptional repression. **J. Biol. chem. (Tokyo)**, 141: 719-727, 2007.
14. Kimata, Y., Matsuyama, A., Nagao, K., Furuya, K., Obuse, C., Yoshida, M., and Yanagida, M. Diminishing histone deacetylases by drugs or mutations promotes normal and abnormal sister chromatid separation via affecting APC/C and Mis4/Adherin. **J. Cell Sci.**, 121: 1107-1118, 2008.
15. 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: 10745-10752, 2008.
16. Kamemura, K., Ito, A., Shimazu, T., Matsuyama, A., Maeda, S., Yao, T.-P., 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.
17. Matsuyama, A., Shirai, A., and Yoshida, M. A novel series of vectors for chromosomal integration in fission yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 374: 315-319, 2008.
18. Matsuyama A, Shirai A, Yoshida M. A series of promoters for constitutive expression of heterologous genes in fission yeast. **Yeast**, 25: 371-376, 2008.
19. 堂前直, 益田晶子. SIトレ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トレサブルなアミノ酸標準の提唱—. **アミノ酸研究**, 1巻: 45-47, 2008.
20. 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.
21. Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Katoh, Y., Ota, K., Nakanome, A., Muto, A., Omura, S., Ohta, T., Ito, A., Yoshida, M., Noda, T., and Igarashi, K. Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. **Nature Str. Mol. Biol.**, 15: 1246-1254, 2008.
22. 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.

23. 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.
24. 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: 133-140, 2009.
25. Fukuda, I., Ito, A., Uramoto, M., Saitoh, H., Kawasaki, H., Osada, H., Yoshida, M., Kerriamycin B inhibits protein SUMOylation. **J. Antibiotics**, 62: 221-224, 2009.
26. 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: 4524-4530, 2009.
27. 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: 2251-2261, 2009.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.**, 147: 833-842, 2010.
33. 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.**, 394: 569-573, 2010.
34. Yu, Y., Park, J.-W., Kwon, H.-M., Hwang, H.-O., Jang, I.-H., Masuda, A., Kurokawa, K., Nakayama, H., Lee, W.-J., Dohmae, N., Zhang J., and Lee, B.-L. Diversity of innate immune recognition mechanism for bacterial polymeric diaminopimelic avid-type peptidoglycan in insects. **J. Biol. Chem.**, 285(43):32937-45, 2010
35. Masuda, A. and Dohmae, N. Automated Protein Hydrolysis Delivering Sample to a Solid Acid Catalyst for Amino Acid Analysis. **Anal Chem.**, 82(21): 8939–8945, 2010
36. Oiso, H., Furukawa, N., Suefuji, M., Shimoda, S., Ito, A., Furumai, R., Nakagawa, J., Yoshida, M., Nishino N, Araki, E. The role of class I histone deacetylase (HDAC) on gluconeogenesis in liver. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, 404(1):166-72, 2011
37. Furumai, R., Ito, A., Ogawa, K., Maeda, S., Saito, A., Nishino, N., Horinouchi, S., Yoshida, M. Histone deacetylase inhibitors block nuclear factor- $\kappa$  B-dependent transcription by interfering with RNA polymerase II recruitment. **Cancer Sci.** in press.
38. Cho, H.S., Suzuki, T., Dohmae, N., Hayami, S., Unoki, M., Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Takawa, M., Chen, T., Kurash, J. K., Field, H., Ponder, B. A., Nakamura, Y., Hamamoto, R. Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. **Cancer Res.** in press.
39. Ito, T., Umehara, T., Sasaki, K., Nakamura, Y., Nishino, N., Terada, Y., Shirouzu, M., Padmanabhan, B., Yokoyama, S., Ito, A., Yoshida, M. Real-time imaging of histone

- H4K12-specific acetylation determines the modes of action of histone deacetylase and bromodomain inhibitors. *Chem. Biol.* in press.
40. Takahashi, H., Suzuki, T., Shirai, A., Matsuyama, A., Dohmae, N., and Yoshida, M. Mitochondrial localization of fission yeast manganese superoxide dismutase is required for its lysine acetylation and for cellular stress resistance and respiratory growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
  41. Arita, Y., Nishimura, S., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Usui, T., Boone, C., and Yoshida, M. Microarray-based target identification using drug hypersensitive fission yeast expressing ORFeome. *Mol. Biosyst.*, in press.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

<総説> (国内(和文)誌 12 件、国際(欧文)誌 3 件)

1. 荒井 律子, 松山 晃久, 八代田 陽子, 吉田 稔. 分裂酵母の全タンパク質大規模解析ローカリゼーションとその利用. *バイオサイエンスとインダストリー*, 64(12): 687-691, 2006.
2. 古米 亮平, 伊藤 昭博, 吉田 稔. エピジェネティクス制御化合物と創薬. *実験医学*, 24(8): 1240-1245, 2006.
3. 佐々木 和樹, 吉田 稔. ヒストン修飾酵素. *蛋白質 核酸 酵素*, 51(14): 2069-2075, 2006.
4. 伊藤 昭博, 吉田 稔. アセチル化. *分子細胞治療*, 6(1): 16-22, 2007.
5. Matthias, P., Yoshida, M., and Khochbin, S., HDAC6 a new cellular stress surveillance factor. *Cell Cycle*, 7: 7-10, 2008.
6. Yashiroda, Y., Matsuyama, A., and Yoshida, M. New insights into chemical biology from ORFeome libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12: 55-59, 2008.
7. 吉田 稔. スプライシング阻害剤とイントロンの翻訳をひき起こす化合物スプライソスタチン スプライシングの謎を解き明かす低分子プローブの発見. *化学と生物*, 46(6): 368-370, 2008.
8. 吉田 稔. スプライソスタチン-スプライシング阻害剤の発見とその生理作用. *実験医学*, 26(10): 1637-1643, 2008.
9. 吉田 稔. HDAC を標的とするケミカルバイオロジー. *日本薬理学雑誌 くすりとからだ*, 132(1): 18-21, 2008.
10. 甲斐田大輔, 吉田 稔. 新たな分子標的としてのスプライシング反応とその阻害剤. *がんの分子標的治療*, 325-331, 2008.
11. 竹本靖, 伊藤昭博, 福田勲, 吉田稔. 創薬標的としてのエピジェネティクス制御機構. *実験医学増刊 分子標的薬開発への新たな挑戦*, 27(5): 204-212, 2009.
12. 吉田 稔. ケミカルジェネティクス: 化学が教えてくれる生命機能 [基礎の基礎]. *細胞工学*, 28(4): 326-331, 2009.
13. 西村慎一, 吉田 稔. 酵母を用いた大規模プロファイル解析によるケミカルジェネティクス. *細胞工学*, 28(4): 379-385, 2009.
14. 竹本 靖, 伊藤昭博, 福田 勲, 吉田 稔. 創薬標的としてのエピジェネティクス制御機構. *実験医学 (増刊): 分子標的薬開発への新たな挑戦*, 24(5): 204-212 (816-824), 2009.
15. Nishimura, S., Arita, Y., and Yoshida, M. Chemical genomics based on Yeast genetics. *Protein targeting with small molecules (Chemical biology techniques and applications)*: 223-238, 2009.

<技術資料> (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 1 件、インターネット 1 件)

1. Shirai A., Matsuyama A., Yashiroda Y., Arai R., and Yoshida M. Rapid and reliable preparation of total cell lysates from fission yeast. *Nat. Protocols* [http://www.Natureprotocols.com/2006/07/21/rapid\\_and\\_reliable\\_preparation.php](http://www.Natureprotocols.com/2006/07/21/rapid_and_reliable_preparation.php), 2006.
2. Matsuyama, A. and Yoshida, M. Systematic cloning of an ORFeome using the gateway system. *Reverse chemical genetics (Methods and protocols)*: 11-24, 2009

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 17 件、国際会議 20 件)

1. Yoshida M. Chemical genomics of histone deacetylase inhibitor. 18th Asia Pacific Cancer Conference, Seoul Korea, September 2005.
2. Yoshida M. From chemical genetics to chemical genomics. 21st Conference on Combinatorial Chemistry Japan, Tokyo Japan, September 2005.
3. Yoshida M. Chemistry and biology of histone deacetylase inhibitors. The University of Tokyo International Symposium Genome-Wide Epigenetics 2005, Tokyo Japan, November 2005.
4. Yoshida M. Chemical genetic approach to functional analysis of histone deacetylases. PACIFICHEM 2005, Honolulu U.S.A, December 2005.
5. Yoshida M. Fission yeast reverse proteomics based on ORFeome. Cell Regulation in Division and Arrest Workshop, Uruma-shi Japan, March 2006.
6. 吉田 稔, 西野憲和. ヒストン脱アセチル化酵素のケミカルバイオロジー. 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
7. 吉田 稔. ポストゲノム情報を利用したケミカルジェネティクス. 日本薬学会第 126 年会, 仙台, 2006 年 3 月.
8. Dohmae N. Characterization of post-translational modification using amino acid analysis. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, 79<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kyoto Japan, June 2006.
9. Yoshida M. Chemical genetics merged with proteomics. 3rd Biwako Bio Seminar: From Genome to Business- Innovative Approach for Drug Discovery and Medicine, Nagahama Japan, December. 2006.
10. Yoshida M. Protein lysine acetylation as a molecular modulator for cellular functions. 4th NIBB-EMBL Symposium on Biology of Protein Conjugation: Structure and Function. Okazaki Japan, December. 2006.
11. Yoshida M. Chemical biology of non-histone protein acetylation. RIKEN International Symposium on Chemical Biology 2007 (RIKEN ISCB 2007), Hakone-machi Japan, January. 2007.
12. 堂前 直. 質量分析におけるイオン化法の現状. 文部科学省 X 線自由電子レーザー利用推進課題“バイオタスクホース”第二回会合, 和光市, 2007 年 3 月.
13. Yoshida M. Extracellular signal-dependent protein lysine acetylation as a molecular modulator for cellular functions. FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Summer Research Conferences, Snowmass Village USA, June 2007.
14. Yoshida M. Reverse proteomics and chemical genomics based on fission yeast ORFeome. 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen Denmark, June 2007.
15. 吉田 稔. ケミカルゲノミクスを目指したリバースプロテオミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
16. 吉田 稔. ヒストンアセチル化を標的としたケミカルバイオロジー. 薬理学サマーセミナー 2007 「ケミカルバイオロジーに基づいた新しい薬理学的展開」, 三島, 2007 年 8 月.
17. 吉田 稔. Identification of a spliceosome sub-complex SF3b as a novel target for cancer therapy. 第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007 年 10 月.
18. Yoshida M. Chemical genetics based on fission yeast ORFeome. International Symposium on Advanced Functional Genomics, Kisarazu Chiba Japan, October 2007.
19. Yoshida M. Chemical genetics of a small molecule cell cycle inhibitor that inhibits pre-mRNA splicing. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences On the Frontiers of Chemical Biology, Tokyo Japan, December 2007.
20. 吉田 稔. スプライシング因子複合体 SF3b を標的とする小分子スプライシング阻害剤の発見. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会 合同大会 (BMB2007), 横浜, 2007 年 12 月.
21. 伊藤昭博. 新規アセチル化タンパク質の同定と機能解析. 愛知県愛知県心身障害者コ

ロニー発達障害研究所公開シンポジウム 2007「可逆的アセチル化による新たな細胞機能制御」, 愛知, 2007 年 12 月.

22. 吉田 稔, 八代田陽子, 田岡 洋, 岡本怜衣香, 小林裕美子, 関戸茂子, 倉本 亮, 西村慎. リバースケミカルゲノミクス: 致死遺伝子の網羅的解析とそれを用いた薬剤探索. 第 4 回ケミカルバイオロジーシンポジウム -化学-生物融合領域創成の奇跡-, 熱海, 2008 年 2 月.
23. 吉田 稔. ケミカルジェネティクスによる新規標的分子の発見と展開. 日本化学会第 88 春季年会, 東京 2008 年 3 月.
24. 吉田 稔, 西村慎一, 松永茂樹. フォワードケミカルゲノミクス -天然生理活性物質の細胞内標的解明に向けて-. 日本農芸化学会 2008 年度大会, 名古屋, 2008 年 3 月.
25. Yoshida M. Identification of a splicing factor SF3b a novel target for cancer therapy. The 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Nikko-shi Tochigi Japan, May 2008.
26. Yoshida M. Chemical genomics of bioactive natural products based on the fission yeast ORFeome. 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, Sapporo, Japan, August 2008.
27. Yoshida M. Chemical genetics for novel anticancer microbial products. The 4th Finland-Japan Meeting on Biotechnology, Sapporo, Japan, October 2008.
28. 吉田 稔. 天然物化学からケミカルゲノミクスを基盤とする新しい生命科学への展開. 第 75 回岩手大学 COE フォーラム, 盛岡, 2008 年 10 月.
29. 吉田 稔. 多様な生命現象を制御するタンパク質アセチル化とそのネットワーク. 第 73 回日本生化学会中部支部 例会・シンポジウム, 名古屋, 2009 年 5 月.
30. Yoshida, M. Forward and reverse proteomic approaches for functional analysis of non-nuclear sirtuins. FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Summer Research Conferences, Lucca, Italy, August 2009.
31. 吉田 稔. ヒストンアセチル化のリアルタイムイメージングとケミカルバイオロジー. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
32. Yoshida, M. A role of SIRT3 in regulating protein acetylation and metabolic control. The 4th International workshop on cell regulations in division and arrest, Onna-Son Kunigami Okinawa Japan, November 2009.
33. 吉田 稔. ヒストン脱アセチル化酵素による分裂酵母のエピジェネティクス調節. エピゲノム研究会, 柏, 2009 年 11 月.
34. Yoshida, M. Real-time imaging of histone acetylation and its application to chemical biology. The 5th Japan-Korea Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules, Pusan Korea, January 2010.
35. Yoshida, M. Fission yeast collections expressing yeast and human ORFeomes as the bases for chemical genomics. Systems biology towards biomedical applications, Seoul, Korea, May 2010.
36. 吉田 稔. タンパク質アセチル化が制御する多様な生命機能. 第 2 回シグナルネットワーク研究会, 豊中市, 2010 年 5 月.
37. 吉田 稔. 分裂酵母 ORFeome プロジェクトから見てきた新しい世界. 第 19 回酵母合同シンポジウム イノベーションを推進する酵母研究, 東京, 2010 年 6 月.

② 口頭発表 (国内会議 27+1 件、国際会議 2 件)

1. 島津忠広, 吉田 稔. 新規アセチル化蛋白質の探索と機能解析. 第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2005 年 9 月.
2. Dohmae N. and Nishimura T., Detection of Post-Translational Modifications on PVDF Membrane. 第 78 回日本生化学会大会 (78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society), 神戸, 2005 年 10 月.
3. 松山晃久, 八代田陽子, 荒井律子, 白井温子, 吉田 稔. 分裂酵母のリバースプロテオミクスを用いたポストゲノム研究. 第 79 回日本薬理学会年会, 横浜, 2006 年 3 月.
4. 白井温子, 松山晃久, 堀之内末治, 吉田 稔. 分裂酵母由来の全蛋白質の電気泳動

- 位置情報の網羅的解析. 日本農芸化学会 2006 年度(平成 18 年度)年会, 京都, 2006 年 3 月.
5. 島津忠広, 堀之内 末治, 吉田 稔. アセチル化による pre-mRNA プロセッシング複合体の制御. 日本農芸化学会 2006 年度(平成 18 年度)年会, 京都, 2006 年 3 月.
  6. 島津 忠広, 堀之内 末治, 吉田 稔. Cortactin のアセチル化による細胞の運動性制御. 日本農芸化学会 2007 年度大会, 東京, 2007 年 3 月.
  7. 白井 温子, 松山 晃久, 堀之内 末治, 吉田 稔. リバースプロテオミクスを用いた翻訳後修飾を受けるタンパク質の網羅的検索. 日本農芸化学会 2007 年度大会, 東京, 2007 年 3 月.
  8. 八代田 陽子. 分裂酵母のリバースプロテオミクスとタンパク質局在情報. 平成 18 年度 JBA 新資源生物変換研究会バイオ動脈産業シンポジウム, 東京, 2007 年 3 月.
  9. 甲斐田 大輔, 中島 秀典, 萩原 正敏, 吉田 稔. スプライソスタチン A は SF3b 複合体に結合し pre-mRNA のスプライシングと核内繫留を阻害する. 第 9 回 RNA ミーティング(第 9 回日本 RNA 学会年会), 名古屋, 2007 年 7 月.
  10. 伊藤 昭博, 島津 忠広, 前田 里子, 吉田 稔. HDAC 分類と HDAC6 の新規基質の同定. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 (BMB2007), 横浜, 2007 年 12 月.
  11. 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 -SI トレーサブルなアミノ酸国家標準の提唱-. 日本アミノ酸学会第 1 回学術集会 (JSAAS2007), 東京, 2008 年 1 月.
  12. 福田 勲, 伊藤昭博, 斉藤寿仁, 木村賢一, 西村慎一, 平井 剛, 袖岡幹子, 吉田 稔. イチョウ活性成分であるギンゴール酸はタンパク質 SUMO 化を選択的に阻害する. 日本ケミカルバイオロジー研究会 第 3 回年会, 東京, 2008 年 5 月.
  13. Dohmae, N., Proteomics tools for chemical biology. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  14. 益田晶子, 堂前直. 固体酸触媒によるタンパク質の加水分解法の発展. BMB2008/第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
  15. 伊藤昭博, 鈴木健裕, 堂前 直, 高橋伸一郎, 吉田 稔. ミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素 SIRT3 の機能解析. BMB2008/第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
  16. 八代田陽子, 亀村和生, 岡本怜衣香, 吉田 稔. 分裂酵母を用いた o-G1cNAc 転写酵素の阻害剤探索系の構築. 酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会, 筑波, 2009 年 7 月.
  17. 高橋秀和, 鈴木健裕, 白井温子, 松山晃久, 堂前 直, 吉田 稔. 分裂酵母のミトコンドリア SOD の翻訳後修飾の解析. 酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会, 筑波, 2009 年 7 月.
  18. Ito, A. SIRT3 regulates ketogenesis. FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Summer Research Conferences, Lucca Italy, August 2009.
  19. 古園さおり, 吉田 稔. 枯草菌におけるタンパク質アセチル化. 2009 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議, 神戸, 2009 年 9 月.
  20. 益田 晶子, 堂前 直. タンパク質加水分解のための新規固体酸触媒の検討/Protein hydrolysis by solid-phase catalyst. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
  21. 古米亮平, 吉田 稔. 炎症性遺伝子の発現誘導に HDAC 活性が必要である. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
  22. 伊藤昭博, 鈴木健裕, 堂前 直, 高橋伸一郎, 吉田 稔. 脱アセチル化酵素 SIRT3 によるケトン体生成制御. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
  23. 伊藤昭博. タンパク質 SUMO 化阻害剤の開発. 第 7 回 SUMO 研究会, 三田, 2009 年 11 月.

24. 伊藤昭博. ミトコンドリアにおける脱アセチル化酵素 SIRT3 による新規エネルギー代謝制御. 日本農芸化学会 2010 大会, 東京, 2010 年 3 月.
25. 堂前 直, 鈴木健裕, 益田晶子. タンパク質の翻訳後修飾解析とその応用. 第 58 回質量分析総合討論会 第 1 回アジア・オセアニア質量分析会議, つくば, 2010 年 6 月.
26. 堂前 直. タンパク質の翻訳後修飾を解析する. 日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 (日本プロテオーム学会 2010 年大会) 第 6 回日本臨床プロテオーム研究会 連合大会, 浦安, 2010 年 7 月.
27. 伊藤昭博, 前田里子, 吉田 稔. Keap1 によるアクチン結合タンパク質 cortactin の新規制御機構. 日本がん分子標的治療学会第 14 回学術集会, 東京, 2010 年 7 月.
28. 竹本 靖, 伊藤昭博, 吉田 稔. 蛍光ペプチドを用いたヒストンリシンメチル化酵素活性測定法の開発. 日本がん分子標的治療学会第 14 回学術集会, 東京, 2010 年 7 月.
29. 伊藤 環, 伊藤昭博, 吉田 稔. 新規蛍光プローブを用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の生細胞内作用機序解析. 日本がん分子標的治療学会第 14 回学術集会, 東京, 2010 年 7 月.

③ ポスター発表 (国内会議 27 件、国際会議 37 件)

1. Dohmae N. and Nishimura T., Detection of Post-Translational Modifications on PVDF Membrane. 第 78 回日本生化学会大会 (78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society), 神戸, 2005 年 10 月. (ワークショップとポスターの同時採択)
2. Arai R., Yashiroda Y., Matsuyama A., Kamata A., Watanabe K., Shirai A., Hiraoka Y., Horinouchi S., and Yoshida M. Localizome: global analysis on protein localization in fission yeast. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto Japan, June 2006.
3. 島津 忠広, 吉田 稔. アセチル化による SV40 large T antigen の制御機構. 第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006 年 9 月.
4. Ito A., Nakazawa Y., Nakayama H., and Yoshida M. Regulation of the mitochondria by histone deacetylases, SIRT6s. 4th NIBB-EMBL Symposium on Biology of Protein Conjugation: Structure and Function, Okazaki Japan, December 2006.
5. 益田 晶子, 堂前 直. アミノ酸組成分析によるタンパク質のメチル化翻訳後修飾の検出. 第 7 回日本蛋白質科学会年会, 仙台, 2007 年 5 月.
6. Ito A., Kamemura K., Shimazu T., Matsuyama A., Yao T.-P., Horinouchi S., Khochbin S., and Yoshida M. Histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates endocytosis of receptor tyrosine kinases. FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Summer Research Conferences, Snowmass Village USA, June 2007.
7. Maeta K., Matsuyama A., Shirai A., Hashimoto A., Kawamura Y., and Yoshida M. Reverse array analysis for understanding signaling pathways. 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen Denmark, June 2007.
8. Shirai A., Matsuyama A., Horinouchi S., and Yoshida M. Eukaryotic translation initiation factor 5A is deacetylated by an NAD-dependent histone deacetylase. 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen Denmark, June 2007.
9. Matsuyama A., Shirai A., Hashimoto A., Kawamura Y., and Yoshida M. A pilot study for fission yeast modificomics. 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen Denmark, June 2007.
10. Arai R., Kamata A., Horinouchi S., and Yoshida M. Regulatory role of nucleo-cytoplasmic transport in microtubule organization in fission yeast. 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen Denmark, June 2007.
11. Lo C.-W., Kaida D., Ishigami K., Watanabe H., Nakajima H., Tani T., Horinouchi S., and Yoshida M. Studies on the mode of action of spliceostatin A that inhibits pre-mRNA processing in fission yeast. 4th International Fission Yeast Meeting, Copenhagen Denmark, June 2007.

12. 堂前 直, 益田 晶子, 西村 友枝. 翻訳後修飾解析のためのアミノ酸分析法. 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
13. 高橋 正成, 小松 靖彦, 吉田 稔. Discovery of gliotoxin as a novel inhibitor of the histone methyltransferases. 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
14. 鈴木 健裕, 益田 晶子, 堂前 直. Development of an analytical method for post-translational modifications combined with mass spectrometry and amino acid analysis. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (BMB2007), 横浜, 2007年12月.
15. Ito T., Sasaki K., Umehara T., Yokoyama S., Ito A., Yoshida M. Development of a new fluorescent probe for visualizing K12 of histone H4 acetylation in living cells. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences On the Frontiers of Chemical Biology, Tokyo Japan, December 2007.
16. Arita Y., Nishimura S., Matsuyama A., Toda H., Giga-Hama Y., Yoshida M. Chemical genomics for exploring mode of action of small molecules in fission yeast. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences On the Frontiers of Chemical Biology, Tokyo Japan, December 2007.
17. Fukuda I., Ito A., Saitoh H., Kimura K., Nishimura S., Hirai G., Sodeoka M., Yoshida M. Selective inhibition of protein SUMOylation by ginkgolic acid. The 4th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences On the Frontiers of Chemical Biology, Tokyo Japan, December 2007.
18. 益田 晶子, 堂前 直. 新規なタンパク質の自動加水分解装置の開発. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 (BMB2007), 横浜, 2007年12月.
19. 伊藤 環, 佐々木和樹, 梅原崇史, 横山茂之, 伊藤昭博, 吉田 稔. FRETを用いたヒストン H4K12 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発. 日本ケミカルバイオロジー研究会 第3回年会, 東京, 2008年5月.
20. Ritsuko Arai, Akihisa Matsuyama, Yoko Yashiroda, Ayako Kamata, Sueharu Horinouchi and Minoru Yoshida, Chemical genetic approach using *S. pombe* localizome: effects of Leptomycin B on protein localization and cellular function. The 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Nikko-shi, Tochigi, Japan, May 2008.
21. Akihiro Ito and Minoru Yoshida, Chemical proteomics of novel acetylated proteins. The 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Nikko-shi, Tochigi, Japan, May 2008.
22. Tamaki Ito, Kazuki Sasaki, Takashi Umehara, Shigeyuki Yokoyama, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Development of a novel fluorescent probe for visualizing K12 of histone H4 acetylation in living cells. The 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Nikko-shi, Tochigi, Japan, May 2008.
23. Yuko Arita, Shinichi Nishimura, Akihisa Matsuyama, and Minoru Yoshida, A pilot study to identify drug targets using fission yeast ORFeome. The 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, Nikko-shi, Tochigi, Japan, May 2008.
24. 伊藤昭博, 吉田稔. Cortactinのアセチル化は細胞の運動性を制御する. 第12回がん分子標的治療研究会総会, 東京, 2008年6月.
25. 益田晶子, 堂前直. タンパク質からアミノ酸へ:新しい固相加水分解法の開発. 第8回日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008年6月.
26. 伊藤 昭博. 可逆的アセチル化によるコータクチンの活性抑制. がん特定領域研究若手研究者ワークショップ, 茅野市, 2008年9月.
27. 荒井律子, 鎌田綾子, 佐藤政充, 登田 隆, 吉田 稔. 核-細胞質間輸送を介した微小管ネットワーク制御機構. 酵母遺伝学フォーラム, 札幌, 2008年9月.
28. Dohmae, N., Suzuki, T., Masuda, A., and Usui, T., Proteomics tools for chemical biology, The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
29. Suzuki, T. and Dohmae, N., Mass determination of proteins using LC-MS for chemical biology, The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
30. Masuda, A. and Dohmae, N., Identification of post-translational modifications of proteins

- by amino acid analysis, The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
31. Nobuyuki Kobashi and Minoru Yoshida, Structures of HDAC-inhibitor complexes. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  32. Yumi Kawamura, Akihisa Matsuyama and Minoru Yoshida, Prediction analysis of protein post-translational modifications. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  33. Maeta, K., Matsuyama, A., and Yoshida, M., Reverse array analysis for post-translational modification of proteins induced by chemical treatment. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  34. Ito, A., Suzuki, T., Masuda, A., Dohmae, N., and Yoshida, M. Functional analysis and exploration of inhibitors of the mitochondrial deacetylase, SIRT3. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  35. Maeda, S., Shimazu T., Ito, A., and Yoshida, M. Regulation of the activity of cortactin by reversible acetylation. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  36. Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kimura, K., Saito, H., Sodeoka, M., and Yoshida, M. Inhibitory mechanism of protein SUMOylation by ginkgolic acid. The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, Atami Japan, September 2008.
  37. 益田晶子, 堂前直. 固体酸触媒によるタンパク質の加水分解法の発展. BMB2008/第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月.
  38. 伊藤昭博, 鈴木健裕, 堂前直, 高橋伸一郎, 吉田 稔. ミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素 SIRT3 の機能解析. BMB2008/第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月.
  39. 荒井律子, 鎌田綾子, 佐藤政充, 登田 隆, 吉田 稔. 分裂酵母の微小管ネットワーク形成機構における核-細胞質間輸送の役割. BMB2008/第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月.
  40. 古米亮平, 吉田 稔. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による炎症性遺伝子の転写抑制機構. 日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会, 神戸, 2009年5月.
  41. 伊藤昭博, 吉田 稔. Nocardione A およびその類縁体によるタンパク質 SUMO 化阻害. 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会, 徳島, 2009年6月.
  42. Furumai, R. and Yoshida, M. HDAC activity is required for proper induction of inflammatory genes. FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Summer Research Conferences, Lucca Italy, August 2009.
  43. Ito, A., Fukuda, I., Hirai, G., Saitoh, H., Kimura, K., Uramoto, M., Osada, H., Sodeoka, M., and Yoshida, M. Chemical biology of inhibitors of protein SUMOylation. The 25th Naito Conference Chemical Biology[II], Sapporo Japan, September 2009.
  44. 益田 晶子, 堂前 直. 非対称ジメチルアルギニンおよび対称ジメチルアルギニンの分離と定量. 日本アミノ酸学会 第3回学術大会 (JSAAS2009), 京都, 2009年9月.
  45. Matsumura, T., Nakaseko, Y., Nakamura, T., Matsuyama, A., Yanagida, M., Yoshida, M. Identification of genetic loci of temperature-sensitive mutations that are rescued by a deacetylase inhibitor. The 5th International Fission Yeast Meeting (Pombe 2009), Tokyo Japan, October 2009.
  46. Yashiroda, Y., Takemoto, Y., Nishimura, S., Okamoto, R., Kobayashi, Y., Sekido, S., Taoka, H., Kawamura, Y., Matsuyama, A., and Yoshida, M. Construction of genome-wide overexpression collections enabling high-throughput phenotypic screening for bioactive small molecules using fission Yeast. The 5th International Fission Yeast Meeting (Pombe 2009), Tokyo Japan, October 2009.
  47. Matsuyama, A., Shirai, A., Nukigi, Y., Hashimoto, A., and Yoshida, M. Modificomics in

- fission yeast. The 5th International Fission Yeast Meeting(Pombe 2009), Tokyo Japan, October 2009.
48. Maeta, K., Shirai, A., Matsuyama, A., and Yoshida, M. Chronological aging in sirtuin mutants. The 5th International Fission Yeast Meeting(Pombe 2009), Tokyo Japan, October 2009.
  49. Kawamura, Y., Matsuyama, A., and Yoshida, M. Computational feature analysis for post-translational modifications of proteins. The 5th International Fission Yeast Meeting(Pombe 2009), Tokyo Japan, October 2009.
  50. 益田 晶子, 堂前 直. タンパク質加水分解のための新規固体酸触媒の検討/Protein hydrolysis by solid-phase catalyst. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
  51. 古米亮平, 吉田 稔. 炎症性遺伝子の発現誘導に HDAC 活性が必要である. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
  52. 伊藤昭博, 鈴木健裕, 堂前 直, 高橋伸一郎, 吉田 稔. 脱アセチル化酵素 SIRT3 によるケトン体生成制御. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
  53. Ito, A., Maeda, S., and Yoshida, M. Regulation of cell motility by reversible acetylation of cortactin. The 4th International workshop on cell regulations in division and arrest, Onna-Son Kunigami Okinawa Japan, November 2009.
  54. Maeta, K., Shirai, A., Matsuyama, A., and Yoshida, M. Chronological life span regulated by acetylation of eIF5A. The 4th International workshop on cell regulations in division and arrest, Onna-Son Kunigami Okinawa Japan, November 2009.
  55. 伊藤 環, 佐々木和樹, 伊藤昭博, 吉田 稔. FRET を用いたヒストン H4K12 のアセチル化を検出する蛍光プローブの開発. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月.
  56. 佐々木和樹, 伊藤 環, 吉田 稔. 生細胞内におけるヒストン H4 高アセチル化のリアルタイムイメージング. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月.
  57. Ito, A., Takahashi, S., and Yoshida, M. Regulation of energy metabolism by SIRT3. The 5th Japan-Korea Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules, Pusan Korea, January 2010.
  58. Matsuyama, A., Shirai, A., Nukigi, Y., Hashimoto, A., and Yoshida, M. Global analysis of protein posttranslational modifications in fission yeast. The 5th Japan-Korea Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules, Pusan Korea, January 2010.
  59. Maeta, K., Shirai, A., Matsuyama, A., Arita, Y., and Yoshida, M. Basic study for developing anti-aging agents using *Schizosaccharomyces pombe*. The 5th Japan-Korea Joint Symposium Chemical Biology for Bioactive Molecules, Pusan Korea, January 2010.
  60. 有田祐子, 西村慎一, 松永茂樹, 掛谷秀昭, 吉田 稔. 海洋天然物 Theonellamie の表現型解析. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会, 横浜, 2010 年 5 月.
  61. 堂前直. ケミカルバイオロジーのためのプロテオミクス. 第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 東京都, 2010 年 7 月.
  62. 八代田陽子, 竹本 靖, 杉本芳一, 長田裕之, 清宮啓之, 吉田 稔. 分裂酵母を用いたタンキラーゼ 1 阻害剤のハイスループットスクリーニングシステムの構築. 日本がん分子標的治療学会第 14 回学術集会, 東京, 2010 年 7 月.
  63. 有田祐子, 西村慎一, 吉田 稔. 分裂酵母を用いた抗がん剤標的分子の網羅的な同定法の開発. 日本がん分子標的治療学会第 14 回学術集会, 東京, 2010 年 7 月.
  64. 益田 晶子, 堂前 直. 固体酸触媒によるタンパク質の加水分解法と従来法の比較 BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会) 兵庫 2010 年 12 月.

#### (4)知財出願

##### ①国内出願（２件）

1. 発明の名称:タンパク質加水分解方法および装置、ならびに、タンパク質分析方法および装置

発明者:堂前直、益田晶子

出願人:独立行政法人理化学研究所

出願日:2007 年 11 月 13 日

出願番号:特願 2007-294377

2. 発明の名称:タンパク質の加水分解方法、加水分解装置、及び加水分解産物の分析装置

発明者:堂前直、益田晶子

出願人:独立行政法人理化学研究所

出願日:2008 年 11 月 19 日

出願番号:特願 2008-296025

##### ②海外出願（１件）

1. 発明の名称:タンパク質の加水分解方法、加水分解装置、及び加水分解産物の分析装置

発明者:堂前直、益田晶子

出願人:独立行政法人理化学研究所

出願日:2009 年 11 月 19 日

出願番号:PCT/JP2009/006247

#### (5)受賞・報道等

##### ①受賞

1. 平成 21 年度バイオインダストリー協会賞

微生物由来抗がん活性物質の作用機序解明に基づく創薬基盤研究

吉田 稔

2009.10.07.

2. 文部科学省 文部科学大臣表彰 科学技術賞 研究部門

化学遺伝学による遺伝子発現制御機構の研究

吉田 稔

2010.04.13

3. 日本農芸化学会賞

分子遺伝学を基盤とした天然生理活性物質の化学生物学的研究

吉田 稔

2011.03.25

##### ②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 理研の最前線 翻訳後修飾ータンパク質の機能をつかさどるアクセサリ分子ーの解析. 日刊工業新聞, 2006.01.12.
2. 分裂酵母内のたんぱく質解析. 日本経済新聞, 2006.06.26.
3. 分裂酵母の構成たんぱく質 90%の存在位置特定. 日刊工業新聞, 2006.06.26.

4. たん白質細胞内局在 カタログ DB を構築 分裂酵母菌 9 割カバー. 化学工業日報, 2006.06.26.
5. 分裂酵母のたんぱく質ネットに「地図」. 朝日新聞, 2006.06.27.
6. 分裂酵母のオーフィオーム解析系を確立 薬剤探索システムとして期待. 薬事日報, 2006.07.12.
7. 分裂酵母のタンパク質コードする遺伝子取得 細胞内局在カタログ完成. 科学新聞, 2006.07.14.
8. 抗がん剤、新たな候補物質. 日経新聞, 2007.07.23.
9. DNA の遺伝子切り出し妨害 新型抗がん剤へ一歩. 日経産業新聞, 2007.07.23.
10. 抗がん剤候補の改变化合物 遺伝「編集」機能を阻害. 日刊工業新聞, 2007.07.23.
11. 抗がん物質のスプライシング機能阻害を確認. 化学工業日報, 2007.07.23.
12. 遺伝情報編集を邪魔. 2007 年 7 月 24 日 (火) フジサンケイビジネスアイ, 2007.07.24.
13. 進む作用機序の解明、スプライシング阻害は抗がん剤の新標的か?. 日経バイオテク, 2007.07.30.
14. 「スプライシング」阻害物質を発見 インтроンの謎解明に新たな糸口. 薬事日報, 2007.09.03.
15. 「ヒストンアセチル化の様子ー生きた細胞でリアルタイム観察」理研グループ成功. 科学新聞, 2009.10.02.

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

該当無し

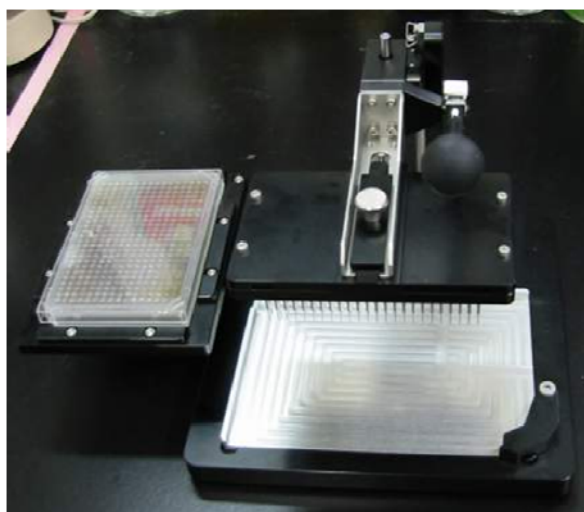
§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

| 年月日          | 名称                           | 場所      | 参加人数 | 概要                                                                                       |
|--------------|------------------------------|---------|------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2007. 12. 06 | 和光市民大学 2007 B-2 コース 「加齢学、再び」 | 和光市民会館  | 80 人 | 「目で見える薬のはたらきーケミカルバイオロジーの世界ー」と題して一般市民向けに講演を行った。この中で、タンパク質アセチル化と健康との関係を分かりやすく説明した。         |
| 2011. 2. 26  | 三省堂サイエンスカフェ                  | 三省堂書店本店 | 25 人 | 「クスリが働くミクロの世界」と題して、抗生物質の開発の歴史、作用メカニズムを解説するとともに、近年の医薬品開発の現状を脱アセチル化酵素阻害薬、促進薬を例に分かりやすく説明した。 |

## § 7 結び

《研究の目標等から見た達成度、得られた成果の意義等の自己評価、今後の研究の展開、研究代表者としてのプロジェクト運営について(チーム全体の研究遂行、研究費の使い方、若手研究者の育成等)、その他戦略的創造研究推進事業に対する意見、要望を自由に記入してください。また、公開して良い研究室の雰囲気が伝わるようなメンバーの集合写真、実験室や作製した主な研究設備のスナップ写真等あれば添付してください。》

本研究は「翻訳後修飾から代謝を見る」ということを主題に提案いたしました。しかし、実際のところ、当初はタンパク質翻訳後修飾が一次代謝、エネルギー代謝とどれほど関連しているのか、そしてそれが生理的にどれほど重要なのかよくわかっていませんでしたので、本研究の開始に当たっては、期待と不安が入り交じっていました。また、当時はモデル生物分裂酵母の全 ORF のクローニングが終了したばかりで、ORF から実際に全タンパク質を完全精製してそれぞれのタンパク質に起こっている翻訳後修飾を高感度で検出するシステムはゼロから立ち上げる必要もありました。幸いにも実に 150 種類もの異なる翻訳後修飾を分裂酵母の全タンパク質について実施するという膨大な解析を達成することができ、細胞内では想像を超える数の翻訳後修飾が起こっている実像が見えてきました。この過程では、当初期待した最新型のマイクロアレイ作製機が高品質のプロテインアレイを作製できないことがわかり、暗澹として気持ちになったこともありましたが、しかし、ピンの先端形状を一定にし、コーティングした特注の 384 ピンレプリケーターを用い、さらにメンブレン1枚あたり 384×9 の約 3,500 スポットを打てるスポッティング装置を開発することにより(写真)、これ乗り越えることができました。



多くの翻訳後修飾の中でも特に我々が力を入れて解析したのはアセチル化です。これは我々が過去に世界初の特異的脱アセチル化阻害剤 TSA を発見したという経緯があるだけでなく、遺伝子破壊株や特異的抗体、阻害剤などの材料が揃っていたことに加え、我々が 2002 年には  $\alpha$ -チューブリン、2005 年には Hsp90 がそれぞれアセチル化を受け、その脱アセチル化酵素が HDAC6 であることを示し、非ヒストンタンパク質の多くがアセチル化されるという確信を得ていたからであります。実際、本研究によって分裂酵母 eIF5A のアセチル化が定常期でのタンパク質合成を制御し、寿命調節に重要な働きをすること、アクチン調節タンパク質 cortactin が実は核と細胞質をシャトルし、核内でアセチル化を受け活性調節され、その細胞内局在には Keap1 が重要であることなど、アセチル化の新しいタンパク質機能調節機構を明らかにすることができました。

一方、この間海外でもタンパク質アセチル化に関する包括的な研究が盛んになり、ここ数年のうちで nano LC-MS/MS を用いた大規模解析が複数行われ、動物細胞において 2,000 以上ものタン

パク質がアセチル化を受けることがわかってきました。しかもその中には、我々が当初から注目してきたミトコンドリアの代謝酵素が多数含まれることがわかってきました。すなわち、少なくともタンパク質アセチル化とミトコンドリアにおけるエネルギー代謝は、代謝鍵因子アセチル-CoA を介して密接につながっていることが明らかになってきました。このことは、我々が当初期待した翻訳後修飾と代謝の不可分な関係を実証するものだったと思います。

本研究を遂行するに当たっては、研究総括であられた鈴木絃一先生に終始温かいご指導を頂きました。本来メタボローム解析を中心とした研究領域であったにもかかわらず、プロテオームを中心に据えた本研究が順調に実施できたのは、ひとえに鈴木絃一先生の励ましのお言葉と適切なアドバイスがあったからこそです。特にメタボローム技術を取り入れるように、というアドバイスにより、一次代謝物のメタボローム解析を導入し、脱アセチル化酵素の変異やノックダウンでアミノ酸代謝の異常が顕著に起こることを見いだしたのは、本研究にとって決定的に重要な知見となりました。当領域の発展に傾注された鈴木先生のご尽力に深く感謝するとともに先生のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

