

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： タンパク質修飾の動態とネットワークの網羅的解析
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

吉田 稔((独)理化学研究所基幹研究所 主任研究員)

### 3. 研究実施概要

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ン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命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、イチョ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。

### 4. 事後評価結果

#### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

分裂酵母の約 5000 種類の全発現タンパク質アレイを作成し、種々の翻訳後修飾アミノ酸に対する抗体を用いることで翻訳後修飾を網羅的に解析する方法や分裂酵母の各遺伝子過剰発現酵母の細胞抽出液をスポットしたリバーアレイを作製し、翻訳後修飾を制御する上流因子を網羅的に同定する方法など、蛋白質翻訳後修飾に関する独創的な網羅的解析手法を開発し、1300 種もの蛋白質で何らかの翻訳後修飾があることなどを明らかにした。またこの方法を用い、翻訳開始因子 eIF5A が脱アセチル化酵素 Hst2 と Sir2 によって脱アセチル化を受けることを明らかにし、特異的なハイブシン化とアセチル化の両修飾により eIF5A が拮抗的に機能調節を受けることや Sir2 が細胞寿命に関わることなど優れた成果を挙げた。動物細胞での蛋白質翻訳修飾に関しては、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の阻害剤や siRNA を用いて、新規アセチル化タンパク質としてアクチン調節蛋白質 Cortactin やケトン体生成に関わるミトコンドリア酵素 HMGCL などを同定し、これら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。更に、翻訳後修飾関連酵素の阻害剤探索系を確立し、SUMO 化阻害剤ギンコール酸やスプライシング阻害剤 spliceostatin A を得た。研究の質と達成度は共に極めて高いものと判断する。レベルの高いジャーナルへの発表(欧文原著論文33件)も十分行われ、特許の出願(国内出願2件、海外出願1件)による知財の獲得も積極的に進められた。研究代表者は、平成21年度バイオインダストリー協会賞と平成22年文部科学大臣表彰科学技術賞し、15件のマスコミ報道も行われた。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

プロテインアレイとリバーアレイを用いる蛋白質翻訳後修飾の網羅的解析法の開発は大胆で且つスケールの大きい発想であり、また、日本では数少ない新規の方法論の開発でもあり、科学技術的に高く評価でき、今後多くの研究者により幅広く利用されることが期待される。ヒストンの翻訳後修飾などによるエピジェネティクスは、再生医療研究においても重要な課題であり、社会的インパクトも大きい。本研究は、典型的なメタボローム研究ではないが、蛋白質翻訳後修飾の網羅的研究から代謝制御とその意義の解明を目指したものであり、戦略目標に沿った成果が得られたものと判断する。

#### 4-3. 総合的評価

本研究は、研究代表者一人の研究室において、分裂酵母の蛋白質翻訳後修飾に関する網羅的研究、動物細胞の蛋白質アセチル化の機能に関する個別研究、および蛋白質翻訳後修飾関連阻害物質探索の応用研究という3つのテーマが相互に関連を持たせながら一つのまとまりを持って進められ、それぞれが質の高い研究成

果を挙げた。研究代表者の独創的な発想と共に、後半では動物細胞の研究も取り込み、成果を挙げるなど、しっかりとしたリーダーシップを高く評価する。上述したように、ヒストンの翻訳後修飾などによるエピジェネティクスは、再生医療研究においても重要な課題であるが、研究代表者は、今後、iPS細胞の研究に取り組むとのことであり、新しい分野での更なる発展が期待できる。また、本グループでも一次代謝産物のメタボローム解析が導入されてきており、タンパク質の翻訳後修飾とATP, NAD, アセチル CoA, SAMなどの鍵代謝産物の関係の全体像解明に向けてのメタボローム解析への取り組みも期待したい。