

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成16年度博士課程進学

氏名 島津 忠広

指導教員名 堀之内 末治

論文題目

Studies on biological diversity of protein lysine acetylation

(タンパク質のリジン残基アセチル化の生物学的多様性に関する研究)

タンパク質のリジン残基に起こるアセチル化修飾はタンパク質の機能や局在、安定性において重要な役割を果たすことが知られている。最近では、ヒストンあるいは p53 を始めとした転写因子のみならず細胞質微小管タンパク質である α -tubulin や、分子シャペロンである Hsp90 など、細胞内の数多くのタンパク質がアセチル化による制御を受けることが判明しつつある。本研究は動物細胞において、アセチル化タンパク質を網羅的に探索、同定し、そのアセチル化の生理的意義を解明することを目的としたものである。

脱アセチル化酵素 (HDAC) の特異的阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) およびニコチンアミド (NA) を処理し、アセチル化を亢進させた動物細胞からアセチル化リジン (AcLys) を特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降によりアセチル化タンパク質を精製し、質量分析により同定した。その結果、ヒストンや p53 などの既知アセチル化タンパク質のほか、多くの新規アセチル化タンパク質を同定することに成功した。本研究では、特に新規アセチル化タンパク質について各々のアセチル化が果たす役割を解明することで、リジンアセチル化修飾の生物的多様性を明らかにした。

1. 細胞質微小管のアセチル化

当研究室の吉松らにより、微小管構成タンパク質の一つである α -チューブリンのアセチル化が、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤トリコスタチン A (TSA) 処理により亢進す

る一方で、トラポキシン (TPX) 処理では亢進しないことが示されていた。 α -チューブリンのアセチル化自体は以前から知られていたが、その機構および生理的意義については不明であった。そこでまず、未同定であった α -チューブリンの脱アセチル化酵素の同定を試みた。HDACファミリーの中でも、HDAC6は細胞質に局在し、TSAに感受性である一方TPX耐性の酵素であることが当研究室の古米らによって見出されていたことから、HDAC6が α -チューブリンの脱アセチル化酵素であることが考えられた。そこでHDAC1からHDAC10までのうち9種類のHDACを動物細胞で過剰発現させ、 α -チューブリンのアセチル化に対する影響を観察した。その結果、HDAC6によってのみアセチル化 α -チューブリンの減少が観察され、HDAC6が α -チューブリン脱アセチル化酵素であることが明らかとなった。また、アセチル化による生理的意義に関しては、アセチル化された微小管は安定化し、薬剤が引き起こす微小管の脱重合に対して遅延が生じることを見出した。さらにHDAC6による脱アセチル化は主に脱重合状態のチューブリンで引き起こされ、逆にアセチル化は重合状態で起きることを明らかにした。

2. ウイルスタンパク質のアセチル化

TSAを動物細胞に処理することでアセチル化が亢進するタンパク質を、抗AcLys抗体を用いた免疫沈降による精製後、質量分析によって同定した。この解析により、新規アセチル化の一つとしてSV40 large T antigen (T-Ag)を同定した。T-AgはDNAウイルス発癌タンパク質であり、p53やRbと結合するなど、細胞の癌化を考える上で鍵となる重要なタンパク質の一つである。MS/MS解析で予測されたアセチル化部位Lys697が実際にアセチル化部位であることを変異実験によって確認した。そのアセチル化修飾機構を解析した結果、T-Agのアセチル化酵素としてCBPを、また脱アセチル化酵素としてHDAC1, HDAC3およびSIRT1を同定した。また、アセチル化修飾の役割として、T-Agはアセチル化により分解が促進されることを見出した。さらにNIH3T3細胞にアセチル化を模した変異体であるT-Ag-K697Q変異体を安定発現させた細胞株では、野生型T-Agを発現させた細胞に比べ、足場非依存的な増殖が抑制された。以上から、T-Agのアセチル化はタンパク質の安定性を低下させ、これにより癌化を制御していることが示唆された。

3. mRNA プロセッシング複合体のアセチル化

上記の手法により、mRNAのプロセッシング因子であるcleavage factor Im 25 kDa (CFIm25)を同定した。このタンパク質のアセチル化部位はlysine-23であることをMS解析と変異実験によって明らかにした。さらに、プロセッシング複合体の解析を進めた結果、mRNAのpoly(A)付加酵素であるpoly(A) polymerase (PAP)もlysine-635/644/730/734がアセチル化されることを見出

した。二種のタンパク質の修飾酵素は共通しており、アセチル化酵素として CBP を、脱アセチル化酵素として HDAC1, 3, 10, SIRT1 および SIRT2 を同定した。CFIm25 は CFIm 複合体の大サブユニットである CFIm68 を介して CBP と結合することでアセチル化が亢進したことから、CFIm25 のアセチル化はプロセシング複合体の形成に依存して起こることが明らかとなった。また、アセチル化部位は共に、タンパク質相互作用に必要な領域であったことから、CFIm25 と PAP の結合がアセチル化で変化するのか検討したところ、アセチル化により CFIm25 と PAP の結合が解離することを見出した。さらにアセチル化が PAP と importin β との結合を阻害し、PAP の細胞内局在を制御していることを明らかにした。

4. 分子シャペロンのアセチル化

Hsp90 は分子シャペロンとして ATP 依存的な基質タンパク質の折り畳みあるいはユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解に重要な役割を果たす。近年、Hsp90 のアセチル化によりコシャペロン p23 との結合が阻害され、Hsp90 の活性が抑制されることが示されたが、本研究では Hsp90 のコシャペロンの一つである activator of Hsp90 ATPase (Aha1) をアセチル化タンパク質として同定した。Aha1 のアセチル化部位は N-末端領域の lysine-3 であり、アセチル化酵素は CBP および TIP60、脱アセチル化酵素は HDAC6 および SIRT1/2 であった。HDAC6 ノックダウンにより Aha1 のアセチル化レベルが顕著に増加したことから、特に HDAC6 による Aha1 の脱アセチル化を詳細に解析した結果、Aha1 は熱ショックやプロテアソーム阻害などの刺激により HDAC6 との結合が解離し、アセチル化が亢進することが判明した。Hsp90 も HDAC6 により脱アセチル化修飾を受けることが報告されており、このことから Hsp90:Aha1 複合体が HDAC6 による機能調節を受けることが考えられた。実際、Hsp90 と Aha1 の結合はアセチル化によって阻害され、また Aha1 による Hsp90 活性化もアセチル化により抑制された。以上から、HDAC6 によるアセチル化調節は Hsp90 のみならず、Aha1 にも起こり、Hsp90 複合体の活性を調節していることが明らかになった。

5. アクチン結合タンパク質のアセチル化

アセチル化タンパク質の探索の結果、アクチン結合タンパク質 cortactin を同定した。Cortactin は F-actin 結合ドメインを有し、また Arp2/3 や WASP などと相互作用することでアクチン形成に重要な役割を担っている。実際、cortactin のノックダウンにより細胞の運動性が低下することが報告されている。MS 解析によりアセチル化部位は F-actin との結合に必須な cortactin repeat 領域であることが判明した。このリピートドメインは 6+1/2 の繰り返し配列からなり、7 カ所の lysine (lysine-87/124/161/198/235/272/309) が全てアセチル化されることを確認した。HAT 過

剰発現による *in vivo* アセチル化を調べたところ、アセチル化酵素は CBP であることが示された。また、同様の方法により脱アセチル化酵素が class III HDAC である SIRT1 であることを明らかにした。Cortactin は細胞質に局在するタンパク質であるにも関わらず、そのアセチル化/脱アセチル化酵素が核タンパク質であったことから、cortactin が核・細胞質間をシャトルしている可能性が考えられた。そこで核外輸送タンパク質 CRM1 の特異的阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) を処理し、cortactin の局在を観察したところ、cortactin は核に蓄積した。さらに、LMB を処理した HeLa 細胞では SIRT1 ノックダウンにより顕著にアセチル化が亢進したことから、cortactin が核内でアセチル化、脱アセチル化修飾を受けることが示された。また、アセチル化部位は F-actin 結合ドメインであったことから、アセチル化部位の変異体を用いて F-actin 結合実験を行った。その結果、アセチル化は F-actin との結合を阻害することが判明した。shRNA ベクターを用いて cortactin をノックダウンした後、WT および 7KR, 7KQ 変異体を過剰発現させた安定発現細胞を作製し、運動性を boyden chamber assay により測定した。その結果、WT に比べ 7KQ では顕著に運動性の低下が観察された。以上から、cortactin のアセチル化は F-actin との結合を阻害し、細胞の運動性を低下させることが明らかとなった。

まとめ

1. ヒストン・転写因子では重要な役割を果たすことが知られているリジンアセチル化修飾が、細胞骨格と細胞運動性 (α -チューブリン、cortactin)、シャペロン (Aha1)、mRNA プロセッシング (CFIm25、PAP) やウイルスタンパク質 (T-Ag) の制御にも関わっていることを明らかにし、タンパク質アセチル化の多様性を示した。
2. クラス I/II HDAC のみならず、クラス III HDAC もタンパク質の脱アセチル化に関与し、共役的に細胞内アセチル化レベルを調節していることが示唆された。

