

## 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 白井 温子

指導教員 堀之内 未治

### 論文題目 分裂酵母全タンパク質の電気泳動位置情報および翻訳後修飾の網羅的解析

分裂酵母は出芽酵母と並び、古くより真核生物のモデルとして生物学の発展に貢献してきた生物であるが、その実験手法等の類似性とは裏腹に、ゲノム構造は出芽酵母とは大きく異なっている。出芽酵母の染色体が 16 本であるのに対し、分裂酵母はわずか 3 本であるが、高等生物にきわめて類似したゲノムの構造となっている。このような特徴を有する分裂酵母は長年にわたり改良されてきた多彩な実験手法と相まってポストゲノム時代において有用なモデル生物であり、特にわずか 5,000 遺伝子からなるその小さなゲノムは、遺伝子配列を出発点とする逆遺伝学的な視点から研究を行う上では非常に有用である。本研究ではこの分裂酵母を用いたリバースプロテオミクスにより、全タンパク質の電気泳動位置情報の網羅的解析および翻訳後修飾の解析を行った。

#### 分裂酵母全遺伝子産物の SDS-PAGE における泳動位置の決定と解析 (Mobilitome の作成)

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は分子サイズに基づいてタンパク質を分離する基本的な実験手法である。1960 年代初頭、デンブゲルをアクリルアミドゲルに変えた電気泳動法が開発され、続いて SDS を共存させた SDS-PAGE が提唱されて以来、数多くの研究者によって改良が加えられ、多くの研究者に一般的に利用されるようになった。現在では、タンパク質を分離するためだけでなく、泳動度の変化からタンパク質の物理化学的な特性および翻訳後修飾などの情報を知るためにも用いられるようになっている。本研究ではこの SDS-PAGE をプロテオームスケールで行なうことで、電気泳動におけるタンパク質の性質を包括的に解析し、さらに、その泳動位置情報を基にして標的タンパク質を同定するための系の構築を行った。

まず始めに、理化学研究所吉田化学遺伝学研究室との共同研究により作製された分裂酵母の全 ORF ライブラリーを用いて、分裂酵母の全 ORF に FLAG<sub>2</sub>-His<sub>6</sub> タグを融合させ、これをチアミン非存在下で発現誘導が可能なプロモーターにつないだプラスミドを作製した後、個別に分裂酵母のゲノムに挿入した株 4,916 種を構築した<sup>1)</sup>。これらの株を発現誘導培地で培養した後、全細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE を行った。抗 His タグ抗体を用いてタグ融合タンパク質をウエスタンブロットングで検出することにより、94.3% (4,635) のタンパク質の SDS-PAGE における泳動位置を決定し、この全タンパク質の泳動位置情報を「Mobilitome」と名付けた。

タンパク質のアミノ酸配列から算出される分子量 (予測分子量) と実際に泳動される位置から算出した見かけの分子量を比較したところ、全体の約 40% のタンパク質が予測分子量とは異なる位置に泳動された。統計学的にタンパク質の泳動度に影響を与える因子を解析したところ、泳動位置はタンパク質の疎水度および等電点などに影響を受けることが明らかになった。

さらに、Mobilitome の情報を標的タンパク質の同定に用いた。従来の手法では、SDS-PAGE やウエスタンブロットングによって標的タンパク質が検出された場合、それを精製して質量分析を用いて同定するという方法が主流である。しかしながらこの方法では精製が困難なタンパク質を同定するのは容易ではない。そこで、標的タンパク質の電気泳動位置を手がかりにして Mobilitome を用いて候補のタンパク質を絞り込み、各候補タンパク質を一つずつ個別に調べることによって標的タンパク質を同定するという新しい同定法を考案した。実際に、この同定法を用いて、NAD 依存的なヒストン脱アセチル化酵素をコードする *hst2* 遺伝子の破壊株でのみ検出される 2 種類のアセチル化タンパク質が翻訳開始因子 eIF5A であることを同定した。1) Nat. Biotechnol. 24, 841-7, 2006

#### メチル化タンパク質の網羅的な検索と同定

タンパク質のメチル化の研究は 60 年代から 70 年代にかけて盛んに行われていたが、リジン残基のメチル化の阻害剤がないために実験が困難であったことなどから、80 年代以降ほとんど研究が行われなくなった。ところが、2000 年にヒストンのメチル化酵素が発見されて以降メチル化の研究が再燃し、現在に至るまでヒストンのメチル化部位および機能が次々と明らかにされている。一方で、非ヒストンタンパク質に関しては研究がほとんど進んでいない。そこで本研究では、SDS-PAGE における泳動位置決定に用いたメンブレンを利用して、抗メチルリジン抗体を用いた網羅的なメチル化タンパク質のスクリーニングを行った。

網羅的なメチル化タンパク質のスクリーニングの結果、7 種類の新規メチル化タンパク質を同定した。なかでも、最も注目に値するのは翻訳に関係するタンパク質が複数含まれていたことである。翻訳伸長因子として有名な EF-1 $\alpha$  や EF2、さらにはリボソームタンパク質 L12 および L23 がメチル化されることから、メチル化修飾が翻訳と密接に関わっていることが示唆される。

また、ヒストンメチル化酵素に保存されている SET ドメインを有するタンパク質を分裂酵母のデータベースから全て抽出し、それらをコードする遺伝子 13 種類を破壊した。これらの遺伝子破壊株から全細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行って抗メチルリジン抗体で検出したところ、*set5*、*set9* および *SPBC1709.13c* の遺伝子破壊株において、それぞれ 50 kDa、10 kDa、15 kDa 付近のバンドが消失した。抗メチルリジン抗体を用いたスクリーニングで同定したメチル化タンパク質と合わせて解析したところ、少なくとも EF-1 $\alpha$  が Set5 に、RL23 が Set9 によってメチル化されることが明らかとなった。

#### 翻訳開始因子 eIF5A のアセチル化の解析

真核生物に広く保存されている翻訳開始因子 eIF5A は、スペルミジンのブチルアミンが NAD 依存的にリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基に転移されるハイプシン化と呼ばれる翻訳後修飾を受ける唯一のタンパク質として知られており、出芽酵母では細胞の生育に必須であることが報告されている。また、eIF5A は細胞の増殖のみならず癌との関係も示唆されているが、その機能については不明な点が多い。本研究では、Mobilitome を用いて同定した eIF5A のアセチル化に焦点を絞り、解析を行った。

まず、eIF5A は Hst2 以外の脱アセチル化酵素によっても脱アセチル化されるかを検討した結果、Hst2 同様に NAD 依存的な脱アセチル化酵素である Sir2 によっても脱アセチル化されることが明らかになった。一方で、eIF5A のアセチル化酵素を明らかにすることを目的として、アセチル化酵素の可能性のあるタンパク質を幅広く選出して検討を行った。その結果、eIF5A は Gcn5 もしくは Ada2 によってアセチル化されていることが明らかになった。

また、eIF5A のアセチル化される残基を明らかにするために、eIF5A に含まれる 9 個のリジン残基をそれぞれアルギニンに置換して検討した結果、49 番目のリジン残基がアセチル化されることが明らかになった。また興味深いことに、他の生物でハイプシン化されることが知られている 52 番目のリジン残基をアルギニンに置換した変異体でアセチル化が顕著に亢進した。そこでハイプシン化に必要な酵素（デオキシハイプシン水酸化酵素）を破壊してハイプシン化を消失させたところ、eIF5A のアセチル化が亢進した。一方、*sir2 hst2* 二重破壊株では eIF5A のハイプシン化の亢進は見られず、49 番目のリジン残基をアルギニンに置換した変異体でもハイプシン化の亢進は見られなかった。これらの結果から、ハイプシン化がアセチル化酵素を抑制するか、もしくは脱アセチル化酵素を活性化させていることが示唆された。

#### 翻訳後修飾を受けるタンパク質の網羅的検索

現在、翻訳後修飾を網羅的に同定する際には、質量分析を用いて解析する方法が主流である。しかしながら質量分析を用いた翻訳後修飾の解析は、遺伝子配列から予測されるペプチドの質量

と実際の質量との不一致を指標にして検索するために容易ではなく、特に一度に複数の翻訳後修飾を網羅的に同定するのは現時点では困難である。そこで本研究では、作製済みの FLAG<sub>2</sub>-His<sub>6</sub> タグ融合タンパク質過剰発現株 4,916 株から全細胞抽出液を調製し、変性条件下でハイスループットにタグ融合タンパク質のみを精製してプロテインアレイを作製し、翻訳後修飾特異的な抗体を用いて様々な修飾を網羅的に検出する系を構築した。

## 展望

本研究では、全タンパク質の泳動位置のデータベース Mobilitome の作成を行い、これを用いた標的タンパク質の新たな同定法を構築した。この同定法を用いて NAD 依存的な脱アセチル化酵素 Hst2 によって脱アセチル化される eIF5A を同定し、eIF5A のアセチル化を制御している因子を明らかにした。eIF5A のアセチル化が果たす新たな役割が明らかになると期待される。また、アセチル化のみならず様々な翻訳後修飾を同定する系を構築した。これにより、複数の翻訳後修飾の網羅的な解析も可能となる。現在、分裂酵母全過剰発現株 4,916 株を用いてプロテインアレイを作製中であるが、これにより様々な翻訳後修飾特異的な抗体を用いて翻訳後修飾を受けるタンパク質が同定されると期待できる。このような解析を通し、翻訳後修飾同士のネットワークが明らかになり、翻訳後修飾が生命現象に果たす役割について包括的な理解が得られると確信している。