

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 白井 温子

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。

(1) 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。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 FLAG₂-His₆ タグを融合させ、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。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ティ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 の情報を用いて、標的タンパク質の電気泳動位置を手がかりにし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で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。

(2) タンパク質のメチル化の研究は、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が、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、最も注目にな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 α 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。

(3) 真核生物に広く保存されている翻訳開始因子 eIF5A は、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、その機能については不明な点が多い。本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素の破壊株およびアセチル化酵素の破壊株を用いて、eIF5A が 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、および Gen5 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。さらに、ハイプシン化に必要な酵素 (Mmd1) 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。さらに、mmd1 と脱アセチル化酵素をコードする遺伝子の多重遺伝子破壊株の結果から、ハイプシン化とアセチル化に遺伝学的な相互作用が存在すること初めてが明らかになった。

(4) 本研究では、作製済みの FLAG₂-His₆ 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。

本研究では、従来のプロテオミクスとは逆のリバースプロテオミクスの手法を用いて、電気泳動位置のデータベースの構築を行い、また分裂酵母の全タンパク質の翻訳後修飾を網羅的に解析する系を確立した。本研究で構築したデータベースは Web 上で公開されており、世界中の研究者に利用されている。また近い将来、分裂酵母全タンパク質が受ける様々な翻訳後修飾を記載したデータベースも作成できると考えられ、生物学の更なる進展に貢献するものである。よって、審査委員一同は、本論文が、博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。