

平成30年6月10日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14674

研究課題名(和文) 長鎖アシル化リジン修飾タンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analyses of lysine long chain fatty acylated proteins

研究代表者

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：40391859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、がん抑制シグナル経路の一つであるHippo経路で働く転写因子TEADのリジン残基がミリスチル化されていることを発見した。本研究では、TEADのリジンミリスチル化の機能と制御機構の解明を目的とした。ミリスチル化TEADを特異的に検出するモノクローナル抗体を作製に成功した。本抗体を用いて、リジン残基の長鎖アシル化修飾はシステイン残基から分子内転移によって引き起こされていることを示唆する結果を得た。加えて、リジン残基の長鎖アシル化修飾はTEADの転写共役因子であるYAPとの結合に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The TEAD family of transcription factors regulated by the hippo pathway is crucial for development processes and also plays roles in tumorigenesis. The transcriptional activity of TEADs is generally regulated by their co-activators YAP/TAZ. However, little is known about posttranslational modifications of TEADs. In this study, we identified TEADs as novel lysine myristoylated proteins by means of shotgun analyses using LC-MS/MS. We succeeded in generating a mouse monoclonal antibody that specifically recognizes the myristoylated form of TEADs. Using this antibody, we found that the long chain fatty acylation of lysine may be mediated by intramolecular transfer from acylated cysteine residues in TEAD proteins. In addition, we showed that the long chain fatty acylation on lysine residue is important for the binding with YAP. Our results suggest the novel regulatory mechanism of TEADs by lysine long chain fatty acylation.

研究分野：分子細胞生物学、ケミカルバイオロジー

キーワード：ミリスチル化 パルミトイル化 TEAD Hippo経路 がん

## 1. 研究開始当初の背景

老化・寿命の制御因子として機能するサーチュインは NAD 依存的なリジン脱アセチル化酵素活性を有する。ヒトにおいてサーチュインは 7 種類のサブタイプ (SIRT1-7) が存在しているが、SIRT6 がリジン脱アセチル化酵素活性に加えて、リジン脱長鎖アシル化酵素活性を有することが報告され、サーチュインはこれまで考えられてきたよりも多彩な生命現象を制御する翻訳後修飾酵素である可能性が示唆された。

我々はこれまでケミカルバイオロジーの手法を主に用いて、タンパク質修飾の機能解析を行ってきた。その一貫として独自に同定した阻害剤と SIRT2 の共結晶構造解析を行ったところ、SIRT2 にはアセチル化リジン結合ポケットの奥に長鎖アシル鎖が結合可能な疎水的な空間が存在することを見出した。この結晶構造情報から SIRT2 も脱アシル化酵素活性を有するのではないかと考え、実際、申請者を含めた複数のグループが、SIRT2 も長鎖アシル化リジンを基質とすることを報告し (J. Biol. Chem. 288, 31350-6, 2013; Biochemistry. 54, 3037-50, 2015) SIRT2 も脱アシル化酵素として機能することが示唆された。しかしながら、基質となる長鎖アシル化リジン修飾を受けるタンパク質の存在はほとんど知られていなく、その生理的意義も不明である。少なくとも 2 種類の脱リジン長鎖アシル化酵素 (SIRT2, 6) が存在すると考えられることから、細胞内には未発見の長鎖アシル化タンパク質が存在している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

我々は、質量分析法を用いたランダムな修飾プロテオーム解析により、がん抑制シグナル経路の一つであり、器官サイズの制御に関わる Hippo 経路で働く転写因子 TEAD の種を超えて保存されているリジン残基がミリスチル化およびパルミトイル化されていることを発見した。本研究は、Hippo 経路における TEAD のリジン長鎖アシル化修飾の生理的意義および制御機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内リジンミリスチル化 TEAD の検出

ミリスチル化リジンペプチドを抗原として用いて、ミリスチル化 TEAD を特異的に検出するモノクローナル抗体を作製した。加えて、脂肪酸アルキンによる標識とクリック反応を用いた検出系を確立した。

### (2) TEAD リジン長鎖アシル化の制御機構の解析

システインからの分子内転移については、TEAD のミリスチル化/パルミトイル化を特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブ

ロット法により検討した。

TEAD の脱長鎖アシル化酵素の探索は、TEAD 由来のミリスチル化あるいはパルミトイル化ペプチドを基質として用いて、MS 解析により検討した。

### (3) リジンミリスチル化による TEAD の活性制御

TEAD の転写共役因子 YAP との結合は、免疫沈降法により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 迅速な細胞内リジンミリスチル化 TEAD の検出方法の確立

ミリスチル化リジンを含む TEAD 由来のペプチドを抗原として用いて、ミリスチル化 TEAD を特異的に検出するモノクローナル抗体の作製を行った。MS 解析により、TEAD はミリスチル化だけでなく、パルミトイル化修飾も受けることが分かったが、ペプチドを用いた ELISA アッセイにより作製したモノクローナル抗体は、ミリスチル化ペプチドを強く、パルミトイル化ペプチドをやや弱く認識する一方、アセチル化、N 末端ミリスチル化、システインパルミトイル化および非修飾のペプチドに対しては全く認識しなかったことから、リジン長鎖アシル化 TEAD を特異的に認識する抗体の取得に成功した。本抗体を用いて、細胞内の TEAD が長鎖アシル化されていることを確認し、抗体を用いたウエスタンブロット法により迅速且つ簡便に TEAD の長鎖アシル化を定量的に検出することを可能にした。加えて、従来法である脂肪酸アルキンによる標識とクリック反応を利用したリジン脂質修飾検出法においても、細胞内の TEAD が長鎖アシル化されていることを確認した。

これまでのリジン長鎖アシル化タンパク質の検出は、脂肪酸アルキンによる標識を必要とし、そのため生理的条件下のリジン長鎖アシル化修飾を検出することが出来なかった。我々が作製した抗体は、生理的条件下の TAD リジン長鎖アシル化修飾を簡便で定量的に検出することを可能にする世界初の方法である。

### (2) TEAD リジン長鎖アシル化の制御機構の解析

最近、TEAD のシステイン残基がパルミトイル化されることが報告された。X 線結晶構造においてこのシステイン残基は、我々が見出した長鎖アシル化部位であるリジン残基と近接していたことから、リジン残基上でおこる長鎖アシル化修飾は、システイン残基からの分子内転移によって引き起こされるのではないかと考えられた。本仮説を証明するために、パルミトイル化されるシステイン残基をセリンに置換した変異体 (CS 変異体) を作製したところ、CS 変異体のリジン残基は長鎖アシル化されなかった。以上の結果から、リ

ジン残基のアシル化修飾はシステイン残基から分子内転移によって引き起こされていることが示唆された(図1)。

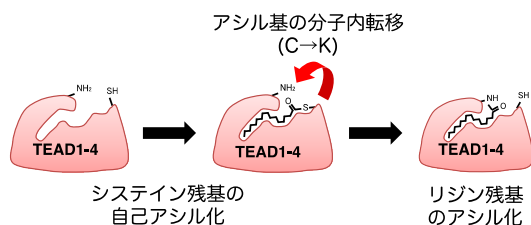


図1. アシル基の分子内転移モデル

一方、TEADの脱アシル化酵素を同定するために、TEAD由来のミリスチル化あるいはパルミトイル化ペプチドを基質とした *in vitro* の脱アシル化アッセイを行った。その結果、SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT6に *in vitro* でTEADに対する脱アシル化酵素活性を有することが明らかとなった。転写因子であるTEADは核に局在する。上記サーチチェーンのうち、SIRT1とSIRT6が主に核に局在していることから、TEADの脱長鎖アシル化酵素として、SIRT1あるいはSIRT6の可能性が高いと思われる。

### (3) リジンミリスチル化によるTEADの活性制御

TEADの転写活性は転写共役因子であるYAP/TAZとの結合依存的であることが知られている。長鎖アシル化されるリジン残基はYAP/TAZの結合ドメイン中に存在し、種を超えて保存されていることから(図2)、リジン長鎖アシル化修飾はYAP/TAZとの相互作用に影響することにより、TEADの転写活性を調節している可能性がある。リジン長鎖アシル化修飾がYAPとの結合に与える影響を明らかにするために、長鎖アシル化修飾されるリジン残基をアルギニンに置換した変異体(KR変異体)を作製し、YAPとの結合活性を免疫沈降法により解析した。その結果、還元剤存在下において、KR変異体とYAPの結合は顕著に低下した。この条件下で、TEAD野生型のリジン残基は長鎖アシル化されていたことから、リジン残基の脂質修飾はYAPとの結合に重要であることが示唆された。一方、還元剤非存在下では、KR変異はYAPとの結合活性に顕著な影響を与えなかった。

図2. TEADの長鎖アシル化されるアミノ酸残

Human	TEAD1	316	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	INRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	375
Human	TEAD2	337	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARLEDGRFVYR	LRSPMCEYLVNFI	IHLKHLPEK	396
Human	TEAD3	325	DSMTISVSTKVC	SFGKQVVE	WETEARLENGRFVYR	IHRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	384
Human	TEAD4	324	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	IHRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	383
Mouse	TEAD1	316	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	INRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	375
Zebrafish	TEAD1	310	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	ISRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	369
Xenopus	TEAD1	316	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	INRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	375
chicken	TEAD1	302	ENMTITGCTKVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	INRSPMCEYMINF	IHLKHLPEK	361
Drosophila	Sca11oped	330	ENVVLVCTIVC	SFGKQVVE	WETEARFENGRFVYR	IQRSPMCEYMINF	IQLKHLPEK	389



基

TEADのシステイン残基がパルミトイル化され、システインのパルミトイル化はYAPと

の結合に重要であることが報告されている。一方、我々は、リジン残基の長鎖アシル化修飾はシステイン残基から分子内転移によって引き起こされていることを示唆する結果を得ている。以上の知見から、TEADのシステインの長鎖アシル化修飾はYAPとの結合に十分である一方、還元条件下ではリジンの長鎖アシル化修飾がYAPとの結合に重要な役割を果たすことが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. #Kudo N, #Ito A, Arata M, Nakata A, Yoshida M. Identification of a novel small molecule that inhibits deacetylase but not defattyacylase reaction catalyzed by SIRT2. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 373, pii: 20170070, 2018 #equally contributed

[学会発表](計4件)

1. 則次恒太、伊藤昭博、工藤紀雄、鈴木健裕、堂前直、吉田稔、「新規リジン長鎖アシル化タンパク質TEADの機能解析」、日本農芸化学会2017年度大会、2017年3月、京女子大学、京都

2. Akihiro Ito, Kota Noritsugu, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Minoru Yoshida, "Long chain fatty acyl lysine modification of TEAD transcription factors", FASEB Science Research Conference, Reversible Acetylation on Health and Disease (HDACs), August 7, 2017, Big Sky, MT, USA

3. 則次恒太、伊藤昭博、小川健司、鈴木健裕、堂前直、吉田稔、「転写因子TEADのリジン長鎖アシル化修飾制御機構とその機能の解析」、2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年12月、神戸

4. 則次恒太、伊藤昭博、小川健司、鈴木健裕、堂前直、吉田稔、「リジン長鎖アシル化修飾による転写因子TEADの活性制御機構の解析」、日本農芸化学会2018年度大会、2018年3月、名古屋

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~cellsig/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：40391859

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

堂前 直 (Dohmae, Naoshi)  
国立研究開発法人理化学研究所・  
環境資源科学研究センター・  
ユニットリーダー  
研究者番号：00321787

### (4) 研究協力者

( )