

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02890

研究課題名（和文）リジン長鎖脂質修飾による細胞制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cell regulatory mechanism by lysine long-chain fatty modifications

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん抑制経路であるHippo経路下で働く転写因子TEADのリジン長鎖アシル化による活性調節機構の解明を目的に本研究を行った。その結果、リジン長鎖アシル化は極めて安定であり、TEADの転写共役因子であるYAPおよびTAZとの結合を促進することにより、TEADの転写活性化に寄与することを見出し、安定的なTEADの転写活性の維持に重要な翻訳後修飾であることを明らかにした。加えて、金属ビーズを用いたアルキン修飾ペプチド濃縮技術を応用することで、リジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索を可能とするアッセイ系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで報告されているリジン長鎖アシル化タンパク質は膜結合タンパク質である。今回、転写因子TEADの活性がリジン長鎖アシル化により制御されていることを明らかにし、リジン長鎖アシル化による新しい転写制御機構を世界で初めて示したことに学術的意義がある。加えて、申請者独自の技術を応用してリジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索を可能にした点にも学術的意義がある。がん抑制Hippo経路下で働くTEADは腫瘍形成と密接に関わることが知られていることから、今回の研究により明らかになったTEADのリジン長鎖アシル化調節機構は新しいがん治療法のための分子標的になる可能性があり、この点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the role of lysine long-chain fatty acylation in the regulation of the activity of the transcription factor TEAD that acts under the tumor suppressor Hippo pathway. We found that lysine long-chain fatty acylation of TEAD is extremely stable and contributes to the transcriptional activation of TEAD by promoting the binding to its transcriptional coactivators YAP and TAZ. Our findings revealed that lysine long-chain fatty acylation is an important post-translational modification for the maintenance of basal transcriptional activity of TEAD. In addition, we constructed the assay system that enables comprehensive exploration for lysine long-chain fatty acylated proteins by developing alkyne-tag technology with metal beads.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：翻訳後修飾 リジンアシル化 TEAD TAZ YAP Hippo経路

1. 研究開始当初の背景

近年、リジン残基はアセチル化に加えて様々なアシル化修飾を受けることが明らかになり、既存のリジン脱アセチル化酵素 (KDAC) が様々なアシル化修飾に対する脱アシル化酵素として機能する。リジンアシル化修飾の中には、ミリストイル化、パルミトイル化などの長鎖アシル化が含まれるが、我々を含む複数のグループがヒトサーチュインの一つである SIRT2 がリジン脱長鎖アシル化酵素活性を有することを明らかにした。加えて、SIRT2 以外にも合計 7 種類の KDAC が、少なくとも *in vitro* でリジン脱長鎖アシル化酵素活性を有することが示された。一方、基質となるリジン長鎖アシル化タンパク質は TNF- α および 2 種類の Ras ファミリータンパク質が同定されているのみであった。そこで、新規リジン長鎖アシル化タンパク質の同定を目的に、質量分析法を用いたランダム修飾プロテオーム解析を行った結果、がん抑制シグナル経路である Hippo 経路下で働く転写因子 TEAD の種を超えて保存されているリジン残基がミリストイル化およびパルミトイル化されていることを発見した。一方で、リジン長鎖アシル化タンパク質を網羅的に同定するためには、何らかの方法で効率よくリジン長鎖アシル化タンパク質を濃縮する必要があることが分かった。既存の濃縮方法としては、アルキン標識脂肪酸とビオチン標識アジドプローブによるクリック反応を用いた方法が知られているが、効率が悪く網羅的な探索には不適であり、本法に代わる新しい濃縮技術の開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

リジン長鎖アシル化による TEAD の活性調節機構を解明し、リジン長鎖アシル化修飾による新しい転写活性制御機構を明らかにすることを目的とした。さらに、申請者等が開発した独自の技術を用いて、リジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索法を開発することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) リジン長鎖アシル化修飾による TEAD の活性調節機構。修飾部位であるリジン残基をアルギニンに置換したアシル化出来ない変異体 (KR 変異体) を用いた免疫沈降-ウエスタンブロット法によりリジン長鎖アシル化が TEAD の転写共役因子である YAP および TAZ との結合に重要であることを示唆する結果を得ていた。そこで、NanoLuc Binary Technology (NanoBit) を用いた生細胞内で TEAD と YAP/TAZ の結合を定量的に測定可能なアッセイ系を確立し、YAP/TAZ との結合におけるリジンアシル化修飾の影響を検討する。さらに YAP/TAZ 依存的な TEAD 転写活性を検出可能なレポーターアッセイ系を構築し、リジン長鎖アシル化修飾が TEAD の転写活性に影響を与えるかどうか検討する。

(2) TEAD のリジン長鎖アシル化制御機構。最近、TEAD のシステイン残基が自己パルミトイル化されることが報告されたが、このシステイン残基をセリンに置換した CS 変異体は、リジンパルミトイル化されないことを示唆する結果を得ていた。そこで、CS 変異体に加えて、システイン修飾活性をもつ N-エチルマレイミド (NEM) や 2-bromopalmit (2-BP) 等を用いた *in vitro* および *in vivo* アシル化アッセイにより、リジン長鎖アシル化修飾におけるパルミトイル化されるシステイン残基の重要性について検討する。加えて、既存の KDAC が、TEAD のリジン脱長鎖アシル化酵素であるかどうか検討することにより、TEAD のリジン脱長鎖アシル化機構の解明を試みる。

(3) TEAD のリジン長鎖アシル化の生理的意義。高細胞密度などの刺激により Hippo 経路が活性化され、その結果、YAP/TEAD が細胞質に移行あるいは分解されることにより、TEAD の転写活性が低下することが知られている。そこで、Hippo 経路が活性化した細胞における TEAD のリジン長鎖アシル化レベルの変動を、作製し成功したリジン長鎖アシル化 TEAD を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により検討する。

(4) 網羅的なリジン長鎖アシル化タンパク質探索法の開発。申請者等が開発した金属ビーズを用いたアルキン修飾ペプチドの濃縮技術応用した方法で、網羅的なリジン長鎖アシル化タンパク質探索法の確立を試みる。

4. 研究成果

(1) リジン長鎖アシル化修飾による TEAD の活性調節機構。

TEAD、YAP、TAZ の NanoBit コンストラクトをそれぞれ作製し、生細胞内で最大の結合活性を示す最適な組み合わせを決定した。YAP および TAZ と結合できない TEAD 変異体 (YH 変異体) を用いて、NanoBit のシグナルは TEAD と YAP/TAZ の結合依存的であることを確認し、NanoBit を用いた生細胞内で TEAD と YAP および TAZ の結合を定量的に測定可能なアッセイ系を確立した。本アッセイ系を用いて、TEAD の KR

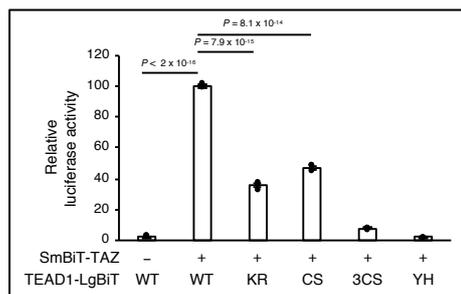


図1. 生細胞内の TEAD と TAZ の結合活性

変異は、YAP および TAZ との結合活性を優位に低下させることを明らかにした (図 1)。さらに、GAL4 のシステムを用いて YAP および TAZ 依存的な TEAD 転写活性を検出可能なレポーターアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用いて、KR 変異は、YAP および TAZ 依存的な TEAD の転写活性を優位に低下させることを明らかにした (図 2)。以上の結果から、リジン長鎖アシル化は YAP および TAZ との結合を促進することにより、TEAD の転写活性に寄与する重要な翻訳後修飾であることが示唆された。

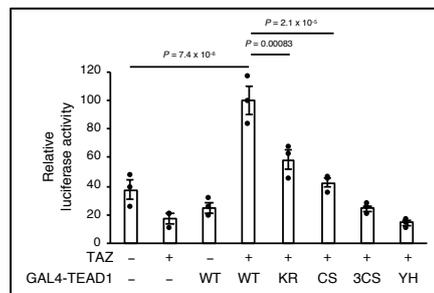


図 2. TAZ 依存的な TEAD の転写活性

(2) TEAD のリジン長鎖アシル化制御機構。

大腸菌から精製したリコンビナント TEAD タンパク質を用いた *in vitro* アシル化アッセイにより、CS 変異および NEM 処理は TEAD のリジンパルミトイル化を阻害することを明らかにした。さらに細胞内において、CS 変異および 2-BP 処理は TEAD のリジンパルミトイル化を阻害

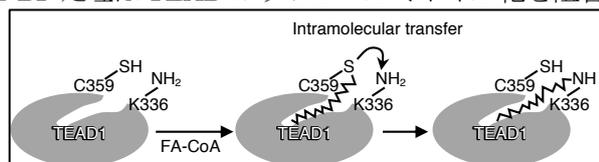


図 3. リジン長鎖アシル化の分子内転移モデル

することを明らかにし、*in vitro* および *in vivo* の両方で、パルミトイル化されるシステイン残基はリジンの長鎖アシル化に重要であることを見出した。以上の結果および、結晶構造中でパルミトイル化されるリジン残基とシステイン残基は近接していることが示されていることから、TEAD 分子内でシステイン残基からリジン残基へアシル基を転移されていると結論づけた (図 3)。一方、既存の 17 種類の KDAC の過剰発現させた実験では、細胞内で TEAD のリジン長鎖アシル化レベルを低下させる KDAC は存在しなかった。TEAD は既存の KDAC の基質にはならないことが示唆された。加えて、チェイス実験によりリジン長鎖アシル化はシステインのアシル化と比較して極めて安定なことを明らかにした。

(3) TEAD のリジン長鎖アシル化の生理的意義。

Hippo 経路を活性化した細胞での TEAD のリジン長鎖アシル化レベルを検討したところ、Hippo 経路を活性化する高密度培養は TEAD のリジン長鎖アシル化を増加させた (図 4)。また、高密度培養下においても、KR 変異は YAP および TAZ との結合活性および TEAD の転写活性を低下させたことから、Hippo 経路が活性化された細胞においても、リジン長鎖アシル化は YAP および TAZ との結合を促進し、TEAD の転写活性に寄与することが示唆された。以上の結果から、リジン長鎖アシル化は Hippo 経路が活性化された細胞において、TEAD の転写活性を最小限維持するのに重要な翻訳後修飾であることが示唆された。

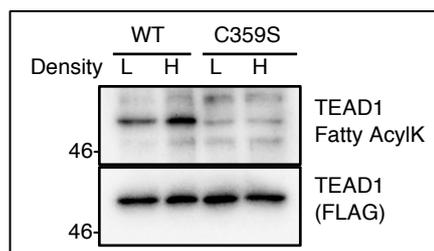


図 4. 高密度培養による TEAD のリジン長鎖アシル化レベルの増加

(4) 網羅的なリジン長鎖アシル化タンパク質探索法の開発。

アルキン標識した TEAD 由来のリジンミリストイル化ペプチドをモデルペプチドとして用いて、金属ビーズによる高効率な濃縮可能な条件を確立した。本条件を用いて、トリプシン消化した細胞抽出液に上記アルキン標識モデルペプチドを添加し、金属ビーズによる精製を試みたところ、モデルミリストイル化ペプチドの濃縮に成功した。以上の結果より、本法を用いてリジン長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索が可能であることを示すことが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤昭博
2. 発表標題 リジンアシル化修飾研究の新展開 - 食品成分カルボン酸によるリジンアダクトエキスポソームの可能性 -
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高瀬翔平、長田裕之、吉田稔、伊藤昭博
2. 発表標題 Hippo経路におけるYAP-TEAD相互作用を標的とした阻害剤探索
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤昭博
2. 発表標題 ケミカルバイオロジー研究から見出されたリジンアシル化修飾研究の新展開
3. 学会等名 発生工学研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤昭博
2. 発表標題 リジンアシル化修飾研究からリジンアダクトエキスポソームへ
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤昭博
2. 発表標題 リジン長鎖アシル化修飾の新規機能
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Ito, Ryu Kato, Kota Noritsugu, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Minoru Yoshida
2. 発表標題 Comprehensive screening for lysine long-chain fatty acyl proteins
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference: Reversible Protein Acetylation in Health and Disease（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Noritsugu, Kenji Ogawa, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Minoru Yoshida, Akihiro Ito
2. 発表標題 The role of lysine long-chain fatty acylation of TEAD transcription factors for transcriptional output of Hippo signaling pathway
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference: Reversible Protein Acetylation in Health and Disease（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤昭博
2. 発表標題 創薬研究から見出されたリジン長鎖アシル化修飾の新規機能と新たな創薬研究 への展開
3. 学会等名 BioJapan2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤竜、則次恒太、鈴木健裕、堂前直、吉田稔、伊藤昭博
2. 発表標題 リジン鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索法の開発
3. 学会等名 第24回 化学生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤昭博
2. 発表標題 リジン長鎖アシル化修飾による転写制御
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞情報科学研究室HP https://www.ls.toyaku.ac.jp/~cellsig/wp/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堂前 直 (Dohmae Naoshi) (00321787)	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 (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	どど 孝介 (Dodo Kosuke) (20415243)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関