

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22271

研究課題名（和文）転写因子TEADは初めてのタンパク質リジン長鎖アシル基転移酵素か？

研究課題名（英文）Is transcription factor TEAD a missing protein lysine fatty acyltransferase?

研究代表者

吉田 稔（YOSHIDA, Minoru）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：80191617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はがん抑制経路の1つであるHippo経路の下流で制御される転写因子TEADがこれまで未発見のリジン長鎖アシル基転移酵素として機能する、という仮説を検証することを目的としている。大腸菌から精製したリコンビナントTEADタンパク質を調製し、アシル化反応で新たに起こったアシル化修飾のみを検出するために、クリック反応を利用した検出系を構築した。これを用いてTEADによるアシル基転移反応を検討したところ、TEADはまず自身のシステイン残基を自己アシル化し、そこから他のTEAD分子のシステイン残基およびリジン残基への分子間アシル基転移反応を触媒するアシル化酵素であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、タンパク質リジン残基に多様なアシル化が起こっていることがわかってきた。これらの脱アシル化酵素の解析は進み始めているが、アシル化酵素についてはほとんどが不明のままである。そのため、リジン残基のアシル化はアシルCoAから非酵素的に転移しているという考えが定説化してきている。本研究は新規のリジンアシル化タンパク質として同定した転写因子TEADが自己アシル化するだけでなく、TEAD同士のアシル化も触媒する可能性を示したもので、学術上の大きな発見につながる可能性が高くなった。また、TEADはがん化に関与することから、その阻害剤の開発から医薬品への応用につながる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to test the hypothesis that TEAD, a transcription factor regulated downstream of the Hippo pathway, one of the cancer suppressor pathways, functions as a lysine long-chain acyltransferase, which has not been discovered so far. We prepared a recombinant TEAD protein purified from *E. coli* and constructed a click reaction-based system to detect only the acylation modifications that newly occurred in the acylation reaction. This system was used to study the acyltransfer reaction of TEAD, and it was suggested that TEAD is an acyltransferase that first self-acylates its own cysteine residues and then catalyzes intermolecular acyltransfer reactions from cysteine to lysine residue of other TEAD molecules.

研究分野：農芸化学

キーワード：TEAD Hippo経路 リジンアシル化 アシル基転移酵素 転写制御

1. 研究開始当初の背景

最近、構造的に多様なアシル化がリジン残基に起こっていることがわかってきた。ところがそれらのアシル基転移酵素(アシル化酵素)についてはほとんどが不明のままである。我々は長鎖アシル化タンパク質の網羅的な探索を行ったところ、転写因子 TEAD の1つのリジン残基がほぼ定量的にミリスチル化またはパルミトイル化されていることを見いだした。しかも立体構造上近接するシステイン残基の変異によってアシル化は完全に消失した。このような高効率のアシル化は、定説となっている非酵素的なアシル化反応では説明できないため、TEAD は自己長鎖アシル化酵素であると予想された。

2. 研究の目的

アセチル化はタンパク質リジン残基に起きる主要な翻訳後修飾であるが、近年、アセチル化以外にもタンパク質リジン残基に多様なアシル化が起こることがわかってきた。しかし、アセチル基転移酵素によって触媒されるアセチル化と異なり、アシル化はアシルCoAから非酵素的に転移しているという考えが定説化してきている。中でも長鎖アシル化は、最近注目されているものの一つであり、脱アシル化酵素としてSIRT2, SIRT6, HDAC8等が報告されているが、やはりアシル化酵素は不明である。我々は、転写因子TEADのリジン残基が自己アシル化されることを見だし、TEADこそがこれまで不明であった長鎖アシル基転移酵素なのではないかと考えた。そこでこの仮説を検証するとともにTEADと相互作用してアシル化を制御する因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

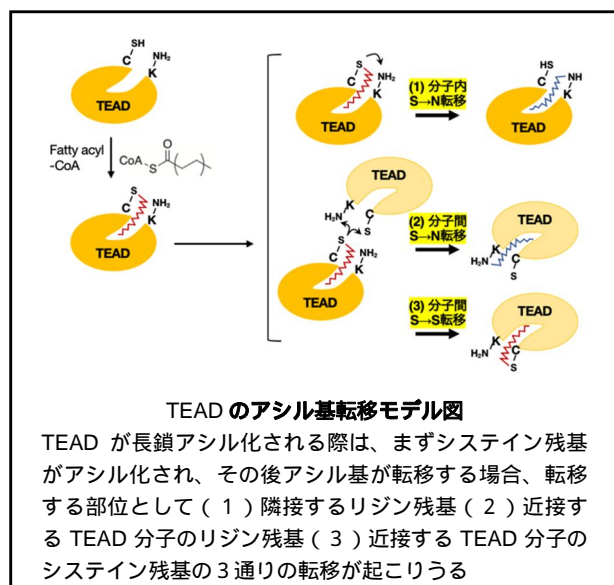
研究代表者は以下の課題(1)、研究分担者は課題(2)を中心に実施する。

(1)アシル化反応の検討:まず、野生型 TEAD1 および K336R、C359S などのアシル化部位欠損変異体 TEAD を大腸菌で作成、精製して試験管内でアシル CoA と混合してその自己アシル化反応を誘導したのちに、システイン残基のアシル基がリジン残基に転移することを証明する。さらに TEAD の自己アシル化を確認後、アシル化反応がトランスに進行するかどうかを野生型 TEAD と自己アシル化活性のない C359S を基質として混合し、C359S のリジン残基にアシル化が起こるかどうかを検討する。また、TEAD が一般的なアシル化酵素活性を有するかどうかを確認するため、ヒストン等のペプチドを基質としてアシル化反応を試みる。さらにゲノム編集等を用いて4つある TEAD 遺伝子の欠損または発現抑制によって変化するアシル化タンパク質を探索する。

(2)アシル化制御因子の探索:基質がチオエステル中間体を経てリジン残基へのアミド結合に至る酵素反応は、ユビキチン化等いくつか知られているが、効率的な反応が進行するために複合体を形成している場合が多い。核内、細胞質内の長鎖アシル CoA の濃度は高くないはずなので、効率的にアシル CoA を利用するための補助因子が必要ではないかと考えられる。そこで、TEAD 結合タンパク質を質量分析等で同定し、それらのアシル化反応に対する影響を調べる。また、それらの知見に基づいてアシル化阻害剤探索のための評価系を構築する。

4. 研究成果

転写因子 TEAD の自己アシル化活性を検討するうえで、大腸菌から精製したリコンビナント TEAD タンパク質がリジン、システインいずれにおいても精製した段階で長鎖アシル化修飾されていることが解析を困難にしていた。そこで、アシル化反応で新たに起こったアシル化修飾のみを検出するために、クリックケミストリーを利用した検出系の構築を試みた。本法では、パルミトイル基供与体としてパルミトイル CoA アルキンを利用することで、クリック反応によって精製タンパク質と反応して取り込まれたアシル化修飾のみを標識することができる。クリック反応で標識に用いるアジドプローブとしては、検討の結果、最も非特異的な標識が少なく感度が高かった FLAG ペプチドアジドプローブを使用した。はじめに野生型 TEAD1 に加えて、主要なアシル化リジン残基 K336 をアルギニンに置換することでアシル化されない TEAD1 K336R 変異体 (KR 変異体) 主要なアシル化システイン残基である TEAD1 C359S 変異体 (CS 変異体) を精製し、*in vitro* アシル化アッセイを行った。その結果、野生型と KR 変異体でアシル化の亢進が確認できた。さらに、S-パルミトイル化を選択的に還元して取り除くことができるヒドロキシルアミン (HAM) 処理を行ったところ、野生型ではアシル化が検出できたが、KR 変異体ではほとんど検出できなくなった。一方、CS 変異体ではアシル化は一切亢進しなかった。このことから、以前の検討結果と同様に TEAD1 はシステイン残基の自己アシル化が起こるとともに、リジン残基でも自己アシル化が起こり、いずれにおいても TEAD1 C359 が自己アシル化に必須であることが確認できた。システイン残基の重要性をさらに検証するため、システイン側鎖のチオール基を選択的に標識できる *N*-ethylmaleimide (NEM) と予め反応させた後に TEAD の自己アシル化を行った。その結果、NEM の処理によってリジン、システインいずれにおいても自己アシル化が起こらなくなった。このことから、TEAD の自己アシル化の活性中心がシステイン残基であることが確認された。そこで、この TEAD の自己アシル化が分子間でアシル基転移を引き起こしているのかをこの *in vitro* アッセイによって検討した。分子間アシル化を検討するうえで分子量によって TEAD タンパク質を区別するために、アシル基供与体として Trigger factor (TF) を融合した野生型 TEAD1 を、アシル基転移を受ける被アシル化体として KR、CS 各変異体を使用して、野生型の有無による各変異体のアシル化の亢進を比較した。その結果、KR、CS いずれにおいても単独での反応と比較して野生型存在下でアシル化が亢進した。このとき、HAM 処理後においても KR、CS 各変異体のアシル化が野生型存在下でより亢進していたことから、分子間でのリジンへのアシル基転移が示唆された。加えて、HAM 未処理でのアシル化も同様に野生型存在下での反応によって各変異体のアシル化が亢進していた。以上の結果から、TEAD のシステイン残基から他の TEAD 分子のリジン、システイン残基への分子間アシル化が示唆された。TEAD がリジン長鎖アシル化酵素として機能しているのであれば、TEAD 結合タンパク質での長鎖アシル化が検出されることが期待されるため、TEAD 結合タンパク質からのアシル化タンパク質の探索を実施中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

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 高瀬翔平、林瀬瑠奈、則次恒太、市川保恵、小川健司、吉田稔、伊藤昭博
2. 発表標題 TEAD-YAP相互作用を標的とした化合物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
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 発牛工学研究センターセミナー（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 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 Acetylation on Health and Disease (HDACs) (国際学会)
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

1. 発表者名 Minoru Yoshida
2. 発表標題 Fatty acyl metabolites as intrinsic inhibitors of SIRT2 deacetylase
3. 学会等名 FASEB Conference on The 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	伊藤 昭博 (ITO Akihiro) (40391859)	東京薬科大学・生命科学部・教授 (32659)	

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
---------	---------