

革新的化学遺伝学による内在性代謝物の新機能の解明と応用

Innovative chemical genetics on novel function of endogenous metabolites

課題番号：19H05640

吉田 稔 (YOSHIDA Minoru)

理化学研究所環境資源科学研究センター・副センター長



研究の概要（4行以内）

エネルギー代謝、低酸素応答、アミノ酸代謝、脂質代謝、RNA代謝における内在性代謝物の役割と新しい代謝制御機構の解明を目指した研究を行い、SIRT2の脱長鎖アシル化反応の産物が脱アセチル化反応の内在性阻害剤になること、N-アシルドーパミンが低酸素応答を誘導すること、解糖系と呼吸のバランス調節にホスホフルクトキナーゼが関与することなどを解明した。

研究分野：農芸化学およびその関連分野

キーワード：内在性代謝物、化学遺伝学、創薬標的分子、翻訳後修飾、代謝フェロモン

1. 研究開始当初の背景

多くの代謝物は、本来の代謝系での役割とは独立にタンパク質翻訳後修飾酵素の補因子や阻害剤として働くことで生体の機能を変換する例が知られている。しかし、それらはまだ氷山の一角に過ぎないと考えられる。近年、質量分析技術の進歩により、代謝物を網羅的に解析するメタボロームが容易になり、様々な代謝物の変動が理解できるようになってきた。しかし、個々の代謝物の固有の機能については、それぞれを単離して活性を測定する必要があり、そのほとんどが手つかずの状態である。

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母または動物細胞を材料に、(1) エネルギー代謝、(2) 低酸素応答、(3) アミノ酸代謝、(4) 脂質代謝のそれぞれについて阻害剤スクリーニングまたは変異株スクリーニングを実施して得られた申請者独自の材料を使って代謝物の新機能発見に迫ることを目的とする。さらに研究の進展に伴い、(5) タンパク質アシル化の化学遺伝学、(6) RNA代謝の化学遺伝学を加えて取り組むこととした。なお、本研究を進めるにあたり、きわめて重要なツールとなる内在性代謝物ライブラリーについては、すでに収集を完了し、利用を進めている。

3. 研究の方法

本研究では、通常分子生物学、細胞生物学、微生物学の手法に加え、化学遺伝学的なアプローチで代謝調節の本質に迫る。具体的

には、化合物ライブラリーまたは内在性代謝物ライブラリーから代謝関連の表現型変化を誘導する化合物を同定してその作用機序を解明していく方法（順化学遺伝学）により、ミトコンドリア活性化誘導化合物、低酸素応答誘導化合物、奇数鎖長脂肪酸等を同定し、その標的解明を進める。また、代謝機能に重要な因子に注目してその阻害剤を探索する方法（逆化学遺伝学）によってSIRT2阻害剤、TEADアシル化阻害剤等の解析を進める。

4. これまでの成果

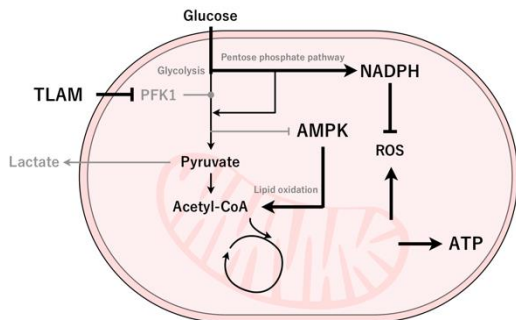
これまでに以下のような成果が得られ、一部は論文として公表した。

(1) エネルギー代謝の化学遺伝学

カロリー制限で活性化されるSIRT2は、脱アセチル化と脱長鎖アシル化の2つの活性を持つ。SIRT2に長鎖アシル化基質が近づくと、構造変化して長鎖アシル基のための疎水ポケットを作って脱アシル化反応を行う。同定したSIRT2阻害剤はこのポケットに入り、脱アセチル化反応を阻害するが、脱長鎖アシル化反応は阻害できなかった。その理由は、長鎖アシル基は効率よく阻害剤をキックアウトして入れ替わることが可能だったからである。一方、脱長鎖アシル化反応の産物O-アシル-ADPリボース(OA-ADPr)も阻害剤と同様、強く疎水ポケットに固定されて脱アセチル化反応を阻害していた。しかし、OA-ADPrも長鎖アシル化基質によってキックアウトされるため、脱長鎖アシル化反応は問題なく進行した。我々はこの反応機構をSubstrate-assisted product releaseと呼ぶことと

した。

ミトコンドリアを活性化し、ミトコンドリア病患者由来 iPS 細胞の表現型を回復する化合物 TLAM を同定し、その作用機序を解析した結果、TLAM は解糖系のゲートキーパー酵素ホスホフルクトキナーゼ PFK1 を阻害することがわかった。PFK1 の阻害により、解糖系が減衰し、AMPK が活性化することにより、脂肪酸β酸化が亢進してミトコンドリアに呼吸基質が供給される。また、代謝系がペントースリン酸経路に流れ、NADPH が生産されることにより不良ミトコンドリアで生ずる ROS を効率よく除去することがわかった。



Energy metabolism in cells treated with TLAM

図. TLAM によるミトコンドリア活性化機構

(2) 低酸素応答の化学遺伝学

翻訳因子 eIF5A の翻訳後修飾ハイブシン化が酸素濃度によって制御されている可能性を見いだした。そこでハイブシン化不全によって影響を受ける配列を解析するための方法を確立し、まず eIF5A によって翻訳促進される配列をゲノムワイドに同定した。また、内在性代謝物 *N*-アシルドーパミンが低酸素応答転写因子 HIF-1 α の安定化と DNA およびヒストン脱メチル化酵素の阻害をもたらすことがわかり、オンコメタボライトの可能性が浮上した。そこで、生合成酵素の特定を試み、候補遺伝子の同定に成功した。

(3) アミノ酸代謝の化学遺伝学

分裂酵母の窒素カタボライト抑制 (NCR) を制御するフェロモン様分子 NSF の受容・応答機構を解析するため、*leu1* 変異と 3,420 の非必須遺伝子破壊を組み合わせた 2 重変異株ライブラリーを作製し、受容体候補遺伝子等を同定した。また、野生株が分泌する新しい窒素代謝のフェロモン様分子として鉄イオン取込みに関わるシドロフォアを同定した。このことは鉄代謝とアミノ酸代謝の間にクロストークがある可能性を示唆する。

(4) 脂質代謝の化学遺伝学

奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の増殖阻害の機序をタンパク質局在解析とケミカルゲノミクス法によって解析した結果、細胞分裂の阻害によることが判明し、標的候補が同定された。

(5) タンパク質アシル化の化学遺伝学

長鎖アシル化のショットガン解析により、がん抑制経路である Hippo 経路により制御される転写因子 TEAD のリジン残基が長鎖アシル化されることを見出した。アシル化は転写共役因子 YAP との結合と転写調節に重要であることが判明したので、その内在性阻害剤の探索を実施し、ヒット化合物を得た。

(6) RNA 代謝の化学遺伝学

スプライシング調節薬 SSA が栄養代謝を制御する mTORC1 を抑制するという予想外の知見から、網羅的な解析を行ったところ、長鎖非コード RNA の MALAT1 および一部の mRNA の小分子化を見出した。これは RNA 代謝が変調して途中で切断され、ポリ A が付加されたものであることが明らかになった。

5. 今後の計画

それぞれの項目について、すでに明らかになった内在性代謝物や代謝フェロモンの機能を解明するとともに、さらに代謝物ライブラリーを用いた探索を推進する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1) Yoshimoto, R., Chhipi-Shrestha, J.K., Schneider-Poetsch, T., Furuno, M., Burroughs, A.M., Noma, S., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Mayeda, A., Nakagawa, S., Kaida, D., Iwasaki, S., Yoshida, M. Spliceostatin A interaction with SF3B1 limits U1 snRNP availability and causes premature cleavage and polyadenylation. *Cell Chem. Biol.*, in press (2021)

2) Kobayashi, H., Hatakeyama, H., Nishimura, H., Yokota, M., Suzuki, S., Tomabechi, Y., Shirouzu, M., Osada, H., Mimaki, M., Goto, Y., Yoshida, M. Chemical reversal of abnormalities in cells carrying mitochondrial DNA mutations. *Nat. Chem. Biol.*, 17(3):335-343 (2021)

3) Han, P., Shichino, Y., Schneider-Poetsch, T., Mito, M., Hashimoto, S., Udagawa, T., Kohno, K., Yoshida, M., Mishima, Y., Inada, T., Iwasaki, S. Genome-wide survey of ribosome collision. *Cell Rep.*, 31(5):107610 (2020)

4) Kanou, A., Nishimura, S., Tabuchi, T., Matsuyama, A., Yoshida, M., Kato, T., Kakeya, H. Serine catabolism produces ROS, sensitizes cells to actin dysfunction, and suppresses cell growth in fission yeast. *J. Antibiot (Tokyo)*. 73(8):574-580 (2020)

5) Yashiroda, Y., Yoshida, M. Intraspecies cell-cell communication in yeast. *FEMS Yeast Res.* 19(7), pii: foz071 (2019)

7. ホームページ等 (プレスリリース)

https://www.riken.jp/press/2021/20210330_1/

https://www.riken.jp/press/2020/20201110_1/

https://www.riken.jp/press/2020/20200506_1/