

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770009
 研究課題名（和文）SODをアセチル化するミトコンドリアの酵素のハイスループット探索
 研究課題名（英文）High-throughput screening for the mitochondrial enzyme that acetylates SOD
 研究代表者
 高橋 秀和 (Takahashi Hidekazu)
 独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・基礎科学特別研究員
 研究者番号：90450402

研究成果の概要（和文）：

ミトコンドリアに局在する Superoxide dismutase (SOD) は酸化ストレスへの耐性に重要である。SOD はリジン残基でアセチル化されており、その生理的意義や分子機構を明らかにすることを目的に研究を行なった。その結果、代謝に関連する二つの遺伝子が分裂酵母の SOD のアセチル化に重要であった。アセチル化の低下した SOD は酵素活性がやや上昇していたものの、同定したアセチル化部位を変異しても酵素活性は変化しなかった。

研究成果の概要（英文）：

The mitochondrially-localized superoxide dismutase (SOD) is vital for oxidative stress response. SOD seem to be acetylated at lysine residues. I have studied functional significance and molecular mechanism of the SOD acetylation. I found that two metabolic genes were important for the acetylation of SOD in fission yeast. Reduction in acetylation made SOD slightly more active, but the mutation of the defined acetylated residues did not affect the activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：アセチル化・ミトコンドリア・SOD・活性酸素・翻訳後修飾・分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のアセチル化はリジン残基で起こり、タンパク質の機能を様々な形で制御する。アセチル化されるタンパク質としてはヒストンが有名である。ヒストン以外では、p53 など 10 種類ほどのタンパク質が解析さ

れている。これら核や細胞質に局在するアセチル化タンパク質の多くも PCAF や p300 などヒストンアセチル化酵素によって修飾される。しかし、核や細胞質以外の場所に局在するタンパク質がアセチル化によって制御されるのか最近まで不明であった。

2006 年に、網羅的な質量分析解析により、哺

乳類培養細胞から数百種類のアセチル化タンパク質を推定する論文が出版された(Kim et al., “Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey.” Mol Cell. 2006. 23: 607-618)。驚くべきことに、ミトコンドリアに局在する全タンパク質の 1/5 以上もがアセチル化されていると示唆された。

申請者の所属する研究室では、分裂酵母の全 ORF を発現・ウエスタンブロットしてアセチル化されているタンパク質をゲノムワイドに検索している。その結果、分裂酵母では少なくとも約 20 種のタンパク質がアセチル化されていることが示唆された。興味深いことに、ミトコンドリアに局在する superoxide dismutase (SOD) がその中に含まれていた。SOD は活性酸素を酸素と過酸化水素に変換する酵素であり、酸化ストレスからの防御や細胞の生存に重要な役割を果たす。ミトコンドリア SOD は哺乳類細胞でもアセチル化されると上記の論文で報告されており、アセチル化による制御が進化的に保存されていると想定される。

予備的な知見として、分裂酵母のミトコンドリア SOD のアセチル化部位を質量分析で同定した。その結果 5 か所のリジン残基をアセチル化部位の候補として同定した。このうちの 1 か所については、抗アセチル化リジン抗体によるウエスタンブロットによって、確認できた。また N 末端にあるミトコンドリア局在シグナル配列を除去した SOD は *in vivo* でアセチル化されていなかった。このことから、SOD は細胞質でアセチル化されてからミトコンドリアに輸送されるのではなく、ミトコンドリア内でアセチル化されると示唆される。

ミトコンドリアのタンパク質をアセチル化する機構は酵母からヒトまで全く不明である。核や細胞質の基質の多くはヒストンアセチル化酵素によって修飾されるが、ミトコンドリアの基質タンパク質は未知のファミリーのアセチル化酵素によって修飾されると考えられる。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの SOD はストレス耐性に重要な酵素である。SOD は寿命に重要であり (Melov et al., “Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics.” Science. 2000. 289:1567-1569)、抗がん剤の標的にもなり得る (Huang et al., “Superoxide dismutase as a target for the selective

killling of cancer cells.” Nature. 2000. 407:390-395)。SOD の転写レベルでの制御は多数報告されているが、翻訳後修飾に関してはかなりの部分が未解明である。出芽酵母においてマンガニンイオンの SOD 活性中心への取り込みによる制御が知られているものの、共有結合修飾による制御の意義は不明である。本研究では、ミトコンドリアの SOD がアセチル化される生理的な意義を明らかにすることを第一の目的とした。また、分裂酵母の SOD をモデル基質として、ミトコンドリアのタンパク質をアセチル化する未知の酵素を同定することを第二の目的とした。哺乳類細胞でアセチル化されるミトコンドリアの基質タンパク質の多くは寿命などに重要であるので、ミトコンドリアのアセチル化酵素は重要な役割を持っていると考えられる。さらに、ミトコンドリアのアセチル化酵素は既知のヒストンアセチル化酵素とは相同性のない未知のファミリーである可能性があり、同定する意義は小さくない。

3. 研究の方法

(1) SODアセチル化部位の変異による表現型への影響の解析

ミトコンドリアSODの 18 個のリジン残基をそれぞれアルギニン(R)およびグルタミン(Q)に置換したコンストラクトを作成した。アルギニン・グルタミン残基はそれぞれ非アセチル化・アセチル化リジン残基に化学的性質が似ている。これらのコンストラクトを分裂酵母に導入して、酸化ストレス耐性などの表現型を調べた。酸化ストレス耐性は、メナジオンやアンチマイシンなどの薬剤を培地中に添加することによってアッセイした。

(2) SOD酵素活性のアッセイ

それぞれのSOD変異体を分裂酵母からHis-tag精製して、*in vitro*でSOD活性を調べた。SOD活性の測定は市販のキットを用いた。各サンプル中のSODの相対量はウエスタンブロットによって比較した。このようにして、SOD単位量あたりの相対的な比活性を算出した。

(3) SODのアセチル化部位に対する抗体の作成

SODのアセチル化リジン残基周辺のアミノ酸残基を含む抗原ペプチドに対するポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、培地などの外的条件の変化によってSODのアセチル化レベルが変動するかを調べた。

(4) SODのアセチル化に重要な遺伝子のスクリーニング

ミトコンドリアSODをアセチル化する酵素や*in*

vivoにおける制御因子を同定するために、ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする数百の遺伝子を過剰発現する分裂酵母株から粗抽出液を調製して、抗アセチル化SOD抗体によるイムノブロットによって、SODのアセチル化レベルが変化する酵母株をスクリーニングした。過剰発現株のみならず、数百の遺伝子の欠損株についても同じ方法で探索した。

4. 研究成果

(1) SODアセチル化の酸化ストレス耐性への影響

ミトコンドリアSODの18個のリジン残基をそれぞれアルギニン(R)およびグルタミン(Q)に置換した分裂酵母株の酸化ストレス耐性を調べた。酸化ストレスを生じる薬剤であるメナジオンを含む完全培地や最小培地において、SODの各リジン残基のアルギニン・グルタミン変異株は顕著な感受性の変化を示さなかった。活性中心部位のヒスチジン残基を変異した株は酸化ストレスに対する超感受性を示したので、実験そのものはうまくいっていると言える。興味深いことに、SODのN末端のミトコンドリア局在シグナル配列を欠損させた分裂酵母株は酸化ストレスに対する超感受性を示した。このことから、分裂酵母においてはSODのミトコンドリアへの局在がSOD活性に必須であるか、ミトコンドリアにSODが存在しないと酸化ストレスに超感受性になることが示唆された。質量分析によって同定されたSODのアセチル化部位の候補の5か所のリジン残基を同時にアルギニンまたはグルタミン残基に置換した分裂酵母株の酸化ストレス耐性も調べたが、野生株と比べて顕著な変化は見られなかった。

(2) SODアセチル化部位の変異による酵素活性への影響

これらのSOD変異体の一部を分裂酵母からHis-tag精製して、In vitroでSOD活性を調べた。コントロールとして用いた活性中心部位のヒスチジン残基の変異体は、SOD活性はほぼゼロであったので、実験系が機能していることをまず確認できた。アセチル化部位の候補である5つのリジン残基を同時にアルギニンまたはグルタミン残基に置換したSODは、野生型SODと比べて顕著な活性の変化が見られなかった。この結果は上記の酸化ストレス耐性のデータと合致する。SODのアセチル化は

酵素活性には重要でないか、もしくはアルギニンやグルタミン残基への置換が非アセチル化・アセチル化状態をうまく模倣できていないという可能性もある。ちなみに本研究開始後に、ヒトのミトコンドリアSODのアセチル化も酵素活性には影響を与えないという結果が報告された(Neumann et al., "Genetically encoding N(ϵ)-acetyllysine in recombinant proteins." Nat. Chem. Biol. 4:232-4. 2008)。N末端のミトコンドリア局在シグナル配列を欠損したSODにおいては、酵素活性が野生型SODのやや低下していた。なぜ酵素活性が低下するのか定かではないが、アセチル化など翻訳後修飾の変化による可能性やマンガニオンの結合の減少による可能性もある。ミトコンドリア局在シグナル配列を欠損させると、酵素活性はかなり残っているにもかかわらず、酸化ストレス耐性はSOD欠損株と同等の超感受性を示すので、ミトコンドリアへのSODの局在も酸化ストレス応答に重要であると示唆された。

(3) SODアセチル化レベルの変動

SODのアセチル化部位に対する抗体を作成して、ウェスタンブロットによって様々な培地条件でのアセチル化レベルの変動を調べた。その結果、培地によってアセチル化レベルの変化が見られた。酸化ストレス存在下ではアセチル化レベルがやや上昇した。

(4) SODのアセチル化に重要な遺伝子の同定

ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子を過剰発現する数百の分裂酵母株の中には、SODのアセチル化レベルが変動する株は同定できなかった。原因としては、アセチル化酵素などが複数のサブユニットからなる場合には一つのサブユニットだけ過剰発現してもアセチル化は亢進しない可能性が考えられる。また、遺伝子によっては過剰発現そのものが成功しない例も多数見受けられた。

そこで、過剰発現のみならず非必須遺伝子についてはその欠損株もスクリーニングした。その結果、SODのアセチル化が減少する欠損株が2つ同定できた。驚くべきことに、いずれもアミノ酸代謝に関連した遺伝子であった。これらの遺伝子がSODのアセチル化反応に直接かかわっている可能性もゼロではないが、間接的な制御因子として作用している可能性の方が高い。アセチル化には必ずアセチルCoAが供与基として用いられるが、これらの2つの遺伝子のコードするタンパク質は、アセチルCoAの合成や輸送に重要なものかもしれない。実際に2つのうち1つの欠損株では、細胞内のアセチルCoAやCoAの濃度が減少していた。もしくはアミノ酸代謝とアセチル化を結ぶ未知の経路があるのかも

しれない。SODのアセチル化が減少する機構は不明だが、この2つの欠損株のうち1つは、酸化ストレスに対する耐性が野生株よりもやや強まっていた。しかも、この欠損株から精製したミトコンドリアSODは野生型に比べてやや強い活性を示した。これらの結果は、SODのアセチル化は酵素活性を弱めることを示唆する。尚、これらの成果の一部についてはすでに学会で公表し、論文投稿の準備中である。

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)

[学会発表] (計 2件)

- ① Takahashi H., Shirai A., Matsuyama A., Yoshida M.: “ Screening for the mitochondrial SOD acetyltransferase”, 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium. Sep 25, 2008. Atami, Japan.
- ② 高橋 秀和, 鈴木 健裕, 白井 温子, 松山 晃久, 堂前 直, 吉田 稔 “分裂酵母のミトコンドリアSODの翻訳後修飾の解析” 酵母遺伝学フォーラム第42回研究報告会 つくば 日本 2009年7月30日

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 秀和 (Takahashi Hidekazu)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：90450402