

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658091

研究課題名(和文) 新たな翻訳後修飾の同定

研究課題名(英文) Identification of novel PTMs

研究代表者

横山 敦 (YOKOYAMA, Atsushi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20572332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において新規翻訳後修飾1種類の同定に成功した。修飾の探索に用いるモデルタンパク質としてはヒストンタンパク質を用いた。候補として同定された修飾が実際に細胞内において存在することを証明するため、放射性同位体ラベルされた化合物を用いてタンパク質への取り込み(修飾活性)を確認し、このような修飾がタンパク質上に生じていることを証明した。さらに、修飾アミノ酸を認識する特異的抗体を作製しドットプロットおよびウェスタンプロットによる検出に成功した。新規修飾を特異的に認識する抗体作製に成功したことは今後の解析にとって非常に有意義であり、翻訳後修飾研究において世界的にもリードしていると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this project, we succeeded to identify at least one novel PTM. As a substrate of the novel PTM, we utilized histone proteins. To validate the existence of the novel PTM, we performed *in vitro* modification assays with radio-active compounds. Furthermore, we succeeded to generate the antibodies recognizing the PTM. These results are significant for future experiments for analyzing the novel PTM.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：翻訳後修飾 細胞応答 プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾は、遺伝子数によらず生命現象の多様性を説明することのできる概念である。これまで、アセチル化やリン酸化をはじめとする翻訳後修飾がタンパク質相互作用の足場となることや、酵素活性の調節に働くことがわかってきている。しかしながら、タンパク質上の翻訳後修飾の同定を行うには大量のタンパク質を精製しアミノ酸シークエンス法を行う必要があったなど手法的に難しいこともあり、新しい翻訳後修飾を考慮した研究はほとんど存在しておらず、新規修飾の存在の有無もまったく不明であった。

申請者は、これまで、ヒストン修飾因子に着目し、生化学的にこれら修飾因子複合体を精製・同定してきた (Yokoyama et al., Mol Cell Biol, 2008, Yokoyama et al., Genes Cells, 2010)。また、最近では転写因子の一つである HNF4 $\alpha$ タンパク質をモデルに、そのタンパク質上に生じている翻訳後修飾を網羅的に同定する実験系を最近構築した (Yokoyama et al., Biochem Biophys Res Commun, 2011)。この過程で、多くのタンパク質上には既存の翻訳後修飾では説明のつかない分子量シフト、即ち新規修飾が多数存在することを見出している。さらに、高精度質量分析計を用いてこれらの未知修飾を解析することにより、いくつかの新規修飾候補を得ることに成功している。以上の経緯より、細胞内の新たな翻訳後修飾を同定し、その修飾を受けるタンパク質を網羅的に同定することで新たな生命現象を説明することができると考え本研究課題を着想した。同様の研究は皆無であり、国内外で先駆的研究と位置づけられると考える。

### 2. 研究の目的

遺伝子の数のみでは多様な生命現象を説明できないことがポストゲノムの一つの問題となっている。プロテオミクスの発展により、体内のタンパク質はアセチル化やリン酸化など多彩な翻訳後修飾を受け質的な多様性を獲得していることが明らかとなってきた。従って、タンパク質の翻訳後修飾による機能制御がこれら多様な生命現象を説明する一つの概念として認められつつある。しかしながら、これまで技術的な制約からタンパク質の新規翻訳後修飾の可能性について考慮した研究は少なかった。近年の質量分析技術の発展に伴って、これまで想定されて来なかった新規翻訳後修飾を無作為的に同定することが技術的に可能となってきた。

申請者は、最近特定のタンパク質上に生じている翻訳後修飾を網羅的に同定する実験系を確立した (Yokoyama et al., Biochem Biophys Res Commun, 2011)。また、上述のようにこの実験系を確立する過程でタンパク質上に未知修飾が多数存在することを予備的に見出すことに成功していた。そこで本

研究課題では、これら新規の翻訳後修飾を同定することを第一の目的としたさらに、その修飾を特異的に認識する抗体を作製し、細胞内でこれら修飾を受けるタンパク質を網羅的に同定することで、新たな翻訳後修飾による生命現象の制御機構を明らかにすることを最終的な目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、タンパク質の新規翻訳後修飾の同定とその生物学的意義を解明するため、以下3点の研究を計画した。

第一に、精密質量の測定が可能な質量分析計 (LC-MS/MS) によってタンパク質に生じる新規翻訳後修飾をプロテオミクスの手法により同定する。同定された新規翻訳後修飾が付加されたアミノ酸抗原を化学合成し修飾を認識するパン抗体 (ウサギポリクローナル抗体) の作製により、細胞内に実際に同定された修飾が存在することを証明する。

第二に、作製したパン抗体を用いて細胞内の新規修飾を受けるタンパク質群を、質量分析計を用いて網羅的に同定する。修飾タンパク質群を網羅的に同定するための実験系は既に構築済みであったためこれを用いる。

第三に、網羅的同定により取得された因子群の中からモデル因子を選択し、その機能制御に新規修飾がどのように関与するのかを詳細に解析する。モデル因子としては、既に解析系を構築済みである転写関連因子に絞り解析を行う (下スキーム図参照)。これにより、同定された新規修飾が細胞内の生命現象においてどのような作用点で関与しているのかを明らかにする。



### 4. 研究成果

本研究課題の実施期間において、大きな課題目標であるタンパク質上に生じる新規翻訳後修飾1種類の同定に成功した。具体的には、質量分析を用いて新規翻訳後修飾の候補を洗い出した。修飾の探索に用いるモデルタンパク質としては、主にヒストンタンパク質を用いた。候補として同定された修飾が実際

に細胞内において存在することを証明するために、以下の2つの手法を用いた。

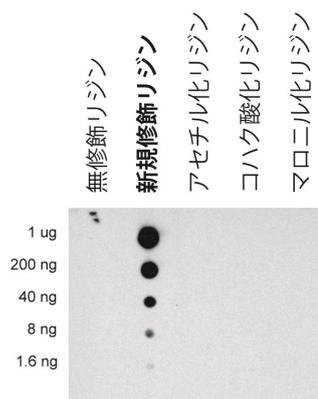
(1) 放射性同位体ラベルされた化合物を用いてタンパク質への取り込み(修飾活性)を確認し、このような修飾がタンパク質上に生じていることを *in vitro* の酵素活性測定実験系において証明した。

さらに、(2) 修飾アミノ酸を認識する特異的ポリクローナル抗体をウサギにて作製しドットプロット(下図差参照)およびウェスタンプロットによる検出を行った。

(1)において、種々の細胞由来抽出液から、同定した翻訳後修飾をヒストンタンパク質をはじめいくつかのタンパク質に付加する活性を見出すことに成功した。この結果から本研究課題において同定した新規翻訳後修飾は、細胞内において酵素的に生じているものであることが明らかとなった。また、この実験系を用いることで新規翻訳後修飾付加の責任酵素を生化学的に同定することが今後できると考えている。

さらに、(2)において、新規翻訳後修飾を付加したアミノ酸の化学合成に成功し、これを認識する抗体の作製を行った結果、特異的に目的の翻訳後修飾のみを認識する抗体を得ることに成功した。新規翻訳後修飾を特異的に認識可能な抗体の作製に成功したことは今後の解析にとって非常に有意義であり、翻訳後修飾研究において世界的にもリードしていると考えている。

最終年度では、作製した特異的抗体を用いて、同定された新規翻訳後修飾が細胞内に存在することをウェスタンプロットにより証明することができた。さらに、この抗体を用いた免疫沈降法と質量分析を組み合わせることによって、細胞内で新規翻訳後修飾を受けるタンパク質をプロテオミクスにて網羅的に同定しつつあり、近い将来この新規翻訳後修飾の細胞内の生命現象における作用点とその関わりを明らかにできるものと考えている。



作製抗体によるドットプロット

## 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9件)

Identification of Post-translational Modifications in Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Using Mass Spectrometry.

Katsura S, Okumura T, Ito R, Sugawara A, Yokoyama A.

PPAR Res, (査読有), in press

Identification of myelin transcription factor 1 (Myt1) as a Subunit of the Neural Cell Type-specific Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) Complex.

Yokoyama A., Igarashi K, Sato T, Takagi K, Otsuka I. M, Shishido Y, Baba T, Ito I, Kanno J, Ohkawa Y, Morohashi K, Sugawara A.

J Biol Chem, (査読有), in press

Retinoic acid receptor- up-regulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells.

Urano A, Saito-Hakoda A, Yokoyama A., Kogure N, Matsuda K, Parvin R, Shimizu K, Sato I, Kudo M, Yoshikawa T, Kagechika H, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A.

Endocr J, (査読有), in press

Is heparan sulfate in the glomerular basement membrane necessary for the etiology of diabetic nephropathy?

Saito-Hakoda A, Kogure N, Yoshikawa T, Shimizu K, Iki Y, Sato I, Kudo M, Urano A, Matsuda K, Parvin R, Sugawara K, Yokoyama A., Ito S, Sugawara A.

J Biomol Res Ther, (査読有), vol.3, e127, (2014), doi: 10.4172/2167-7956.1000e127

Angiotensin II receptor blockers differentially affect CYP11B2 expression in human adrenal H295R cells.

Matsuda K, Urano A, Kogure N, Sugawara K, Shimada H, Nezu M, Saito-Ito T, Iki Y, Kudo M, Shimizu K, Sato I, Yoshikawa T, Satoh F, Ito R, Yokoyama A., Rainey WE, Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A.

Mol Cell Endocrinol, (査読有), vol. 383, No. 1-2, 60-68, (2014), doi: 10.1016/j.mce.2013.12.004.

ARB affects nicotine-induced gene expression profile in human coronary artery endothelial cells.

Kudo M, Matsuda K, Sugawara K, Iki Y, Kogure N, Saito-Ito T, Shimizu K, Sato I, Yoshikawa T, Urano A, Yokoyama A.

Saito-Hakoda A, Ito S, Sugawara A.  
World Journal of Hypertension., ( 査読有 ),  
vo. 4, No. 1, 7-14, (2014), doi:  
10.5494/wjh.v4.i1.7.

TET3 - OGT Interaction Increases the  
Stability and the Presence of OGT in  
Chromatin.

Ito R, Katsura S, Tsuchiya H, Hada M,  
Okumura-Asatsuma T, Sugawara A,  
Yokoyama A.

Genes Cells, ( 査読有 ), vol. 19, No. 1, 52-65,  
(2014), doi: 10.1111/gtc.12107.

The androgen receptor in health and  
disease.

Matsumoto T, Sakari M, Okada M,  
Yokoyama A, Takahashi S, Kouzmenko A,  
Kato S.

Annu Rev Physiol, ( 査読有 ), vol. 75,  
201-224, (2013), doi:  
10.1146/annurev-physiol-030212-183656.

JMJD5, a JmjC-domain-containing  
protein, negatively regulates  
osteoclastogenesis through facilitating  
NFATc1 protein degradation.

Youn MY, Yokoyama A,  
Fujiyama-Nakamura S, Ohtake F,  
Minehata KI, Yasuda H, Suzuki T, Kato S,  
Imai Y.

J Biol Chem, ( 査読有 ), vol. 287, No. 16,  
12994-13004, (2012), doi:  
10.1074/jbc.M111.323105.

〔学会発表〕(計3件)

横山敦、組織特異的なヒストン修飾因子複  
合体の解析、第1回疾患エピゲノムコアセン  
ターミニシンポジウム～未知の生命現象・疾  
患の解明を目指して～、2013年10月26日、  
宮城

横山敦、遺伝子発現を制御する新たな翻訳  
後修飾の探索、第16回がん・エピゲノム研  
究会、2013年7月17日、宮城

横山敦、遺伝子発現を制御する新たな翻訳  
後修飾の探索、新学術領域研究「性差構築の  
分子基盤」領域会議、2012年10月15日、和  
歌山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 敦 (YOKOYAMA, ATSUSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20572332

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：