

課題番号 41

ガン細胞にみられる解糖系の亢進(Warburg 効果)の発生機構の 解明

[1] 組織

代表者：増本 博司
(長崎大学・医学部共同利用研究センター)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：なし

研究費：物件費 19 万 9 千円，旅費 10 万 1 千円

[2] 研究経過

本研究ではWarburg効果の主体である解糖系の亢進を引き起こす機構について解析する。申請者は解糖系の亢進を引き起こす主因として解糖系代謝酵素のアセチル化/脱アセチル化に着目した。代謝酵素のアセチル化は酵素活性に影響し、代謝産物の生産量に影響を与える。NAD⁺依存性デアセチラーゼ(通称サーティエン)は様々な生物種で代謝酵素の脱アセチル化に関与しており、その遺伝子欠損はエネルギー代謝異常を引き起こす。本研究では研究材料として遺伝学的・生化学的解析が容易な出芽酵母を使用し、その遺伝子欠損により糖代謝産物が蓄積するサーティエン Hst3、Hst4およびSir2の標的タンパクの同定を中心に糖代謝経路の制御機構を解明していく。

サーティエンと結合する糖代謝酵素を同定する。

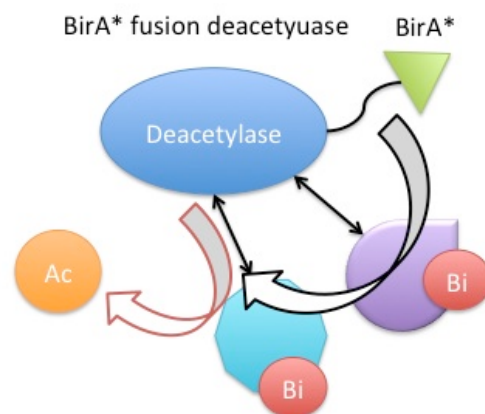
サーティエンHst3、Hst4、Sir2と結合する因子を同定する。本研究ではProximity-dependent Biotin Identification (BIO-ID)法を採用した。Hst3、Hst4、Sir2タンパクに大腸菌のビオチン化修飾酵素BirA変異体(BirA*)との融合タンパクを作製し、サーティエンと接触するタンパクをビオチン化修飾し、ビオチン化されたタンパクをストレプトアビジン担体を使って精製し、質量分析によってタンパクを同定する。

この解析に関して2017年2月に東北大学を来訪し、安井教授および菅野講師と質量分析法を使ったタンパク同定に関する詳細な技術的指導を受けた。

サーティエンのアセチル化基質を同定する。

同定したタンパクのアセチル化の有無、アセチル化されているリジン残基の決定にはStable Isotope labeling of amino acids using cell culture (SILAC)法を使用する。この方法では野生株およびサーティエン欠損

研究概略



1. BirA*を使った結合タンパクの同定

2. 同定した結合タンパクからdeacetylaseの脱アセチル化基質を決定

株で異なった安定同位体を持つアミノ酸でタンパクを標識し、アセチル化されたペプチドを質量分析法で同定するとともに、二細胞間の同一ペプチドの存在量を定量する。この方法を使ってサーティエン欠損によってアセチル化レベルが上昇するタンパクを同定していく。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度では以下に示す研究成果を得た。

第一に、BIO-ID法を用いてHst3、Hst4に結合するタンパクとして解糖系代謝酵素であるP_{gk1}、タンパク、DNAのメチル化修飾の際の基質となるS-adenoyl methionine (SAM)の合成酵素であるSah1が同定することができた。

第二にSILAC法を利用してSir2の脱アセチル化基質候補として、解糖系代謝酵素であるHxk1およびRibosomal 60S L20A、Hst3/Hst4の基質としてHistone H3、Sir2およびHst3/Hst4の共通の基質としてRibosomal 60S L3および解糖系代謝酵素であるTdh1/2/3 (GAPDH)が同定された。

残念ながら BIO-ID 法および SILAC 法では共通して同定できたタンパク因子が存在しなかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究で採用した大腸菌由来 BirA 変異体は接触したタンパクを無作為にビオチン化修飾できる方法である。元来培養細胞で開発された手法であるが、酵母などの他のモデル生物でも利用可能であることが示された。また本研究で構築した BirA 融合タンパク構築用プラスミドは現在東北大学内だけでなく神戸大学でもタンパク間相互作用を検出するために利用されている。

[4] 成果資料

1. Ota Y, Chinen T, Yoshida K, Kudo S, Nagumo Y, Shiwa Y, Yamada R, Umihara H, Iwasaki K, **Masumoto H**, Yokoshima S, Yoshikawa H, Fukuyama T, Kobayashi J, Usui T (2016) Eudistomin C, an Antitumor and Antiviral Natural Product, Targets 40S Ribosome and Inhibits Protein Translation. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 17, 1616-1620.