

氏名	Muhammad Ishfaq
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 882 号
学位授与年月日	平成 24 年 9 月 14 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Proteomics and Functional Analysis of Acetylated Proteins (アセチル化タンパク質のプロテオミクスと機能解析)
論文審査委員	委員長 連携教授 吉田 稔 委員 教授 円谷 陽一 委員 准教授 朝井 計 委員 連携教授 今本 尚子

## 論文の内容の要旨

Post-translational modifications have long been recognized as an important phenomenon in the regulation of protein function and until recently, phosphorylation has received the most interest and attention. Over the past few years, however, appreciation for the role of protein acetylation has increased rapidly. Protein acetylation plays a crucial role in regulating chromatin structure and transcriptional activity and is considered one of the important regulatory mechanisms that determine protein function, subcellular localization, protein-protein interactions and stability. Recently a large number of acetylated proteins involved in diverse cellular activities have been reported, suggesting that acetylation is as global as phosphorylation and should be studied in detail to unravel its cellular role.

To study the global acetylation events at cellular level with the aim to identify new acetylated proteins, I decided to choose a system with enhanced ectopic gene activation due to massive genomic demethylation. The HCT-116 double-knockout cancer cells for DNMT1 and DNMT3b (dnmt DKO cells), activate many germ cell-specific genes due to massive demethylation of their promoters, which is normally methylated in somatic cells. I developed a new technique where I treated the cells with HDAC inhibitors to enrich cellular acetylated proteins and immunopurified the in-solution trypsin-digested acetylated peptides with the help of anti-AcLys antibodies. These acetylated peptides were subjected to MS/MS analysis. This method allowed me identifying a significant number of new acetylated proteins both in parental and dnmt DKO cells. I have identified about 302 acetylated proteins in parental cell line while only 116 acetylated proteins was confirmed in cells not expressing DNMT. Only 43 proteins overlap between the two datasets while the rest are unique to corresponding cell lines. Among the data set, I identified 171 and 56 novel acetylated proteins in parental and DKO cells respectively, never reported before. In addition to this I have identified new acetylation sites for 131 and 56 acetylated proteins in parental and DKO cells respectively. This data demonstrates that aberrant epigenetic gene expression due to DNMT deregulation may lead to global changes in the patterns of protein acetylation either to compensate for the resultant deregulation of different cellular processes or act as homeostatic process to try to correct the aberrant gene expression by changing the acetylation status of different effector proteins involved in either transcription or translation.

In addition to a number of acetylated proteins identified, our laboratory recently demonstrated acetylation of an important cellular protein, eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), and studied its function in yeast cellular biology. eIF5A has been shown to be essential for eukaryotic cell growth and survival. It was originally presumed as one of the essential translation initiation factors. However, it is recently shown to be nonessential for translation initiation but is involved in many cellular processes such as translation elongation and mRNA transport. It is the only known protein that is modified with a unique polyamine derived amino acid, hypusine [N $\epsilon$ -(4-amino-2-hydroxybutyl) lysine], at a specific lysine residue i.e. lysine 50 in human eIF5A. Although our lab recently demonstrated the role of eIF5A acetylation in yeast cells, its cellular importance in mammalian cells is unknown. In humans, there exist two paralogues of eIF5A named eIF5A1 and eIF5A2. In this study I have investigated the role of eIF5A reversible acetylation in mammalian cellular physiology.

In order to elucidate the functional role of human eIF5A1 acetylation, I searched for the enzyme that drives this modification and investigated its functional significance. Knockdown and overexpression experiments identified PCAF as the major cellular acetyltransferase of eIF5A1 whereas histone deacetylase (HDAC) 6 and Sirtuin (SIRT) 2 as the major deacetylases of eIF5A1 while SIRT1 also bears moderate deacetylase activity. These results were confirmed with direct interactions in in-vitro assays. While eIF5A1 shows whole cell distribution, immunocytochemical-staining using an anti acetylated eIF5A1 antibody showed clear differences in cellular distribution of acetylated and unacetylated forms of eIF5A1 with the acetylated form primarily localized in the nucleus where translation does not occur. Indeed, treatment with HDAC inhibitors (HDACi) or replacement of the acetyltable lysine residue with glutamine that mimics the acetylation status induced nuclear accumulation of eIF5A1. eIF5A1 acetylation level and nuclear accumulation was increased in response to increasing glucose concentration in HeLa cells. Furthermore, I confirmed that mammalian target of rapamycin (mTor) kinase was up regulated parallel to eIF5A1 acetylation. Experiments on eIF5A1 knockdown confirmed that it indeed is critically required for mTor activation in response to high glucose concentration. My findings indicate that eIF5A1 acetylation dictates its subcellular distribution, thereby regulating eIF5A1 activity in the cytoplasm. mTor activation in response to eIF5A1 acetylation gives us a clue about the possible functional role of eIF5A1 in the nuclear compartment and should be studied in detail in the future.

Mammalian cells possess another paralogue of eIF5A named eIF5A2 that shows tissue specific expression. Indeed, it is highly expressed in testis and brain along with some cancer cell lines, suggesting that eIF5A2 is one of the “off-context” genes in tumours. The amino acid sequence of eIF5A2 shows over 80% homology with that of eIF5A1, including conserved hypusination and acetylation sites. Previously eIF5A2 had been identified as a tumorigenic protein that is involved in cell motility and metastasis. I for the first time identified that eIF5A2 also undergoes reversible acetylation at lysine 47. Interestingly, my results revealed that eIF5A2 acetylation somehow behaves differently from eIF5A1. I identified HDAC6 and SIRT2 as the deacetylase of eIF5A2, and found that the acetylated form was enriched in the nucleus. On the basis of my findings I am suggesting that acetylation may be an important phenomenon involved in oncogenic activity of eIF5A2 and can potentially be exploited for developing anticancer therapies.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 22 年 8 月 9 日（木）10：00～11：00 に埼玉大学理学部 2 号館（2 階）第 1 会議室で論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

タンパク質アセチル化は、1960 年代にヒストン修飾の 1 つとして見つかり、クロマチン構造を変換することによりエピジェネティックな遺伝子発現を調節する重要な翻訳後修飾であることは良く知られている。ヒストンアセチル化は、ヒストンアセチル化酵素（histone acetyltransferase：HAT）及びヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase：HDAC）により調節される。近年、多くの非ヒストンタンパク質のアセチル化が見いだされ、特に免疫アフィニティー精製と質量分析を組み合わせた網羅的アセチル化タンパク質解析「アセチローム解析」の進展により、膨大な数のアセチル化タンパク質が生物種を越えて見つかってきており、アセチル化はリン酸化に匹敵する生物界に共通した普遍的な翻訳後修飾である可能性が示唆されている。本研究では、DNA メチル化酵素をノックアウトした細胞を使用したアセチローム解析により複数の新規アセチル化タンパク質の同定に成功した。さらに翻訳因子の一つである eIF5A のアセチル化の役割を明らかにし、グルコース代謝における eIF5A の役割を示唆する結果を得た。学位論文は以下の項目からなっている。

### 1. DNA メチル化酵素ノックアウト細胞を使用した新規アセチル化タンパク質の同定

新規アセチル化タンパク質を同定するために、細胞内の主要な DNA メチル化酵素である Dnmt1 と Dnmt3 の両方をノックアウトした大腸がん細胞株 HCT116 細胞を用いてアセチローム解析を行った。Dnmt1 と Dnmt3 の両方をノックアウトした細胞を用いることにより、野生型の細胞ではサイレンシングを受けて発現が抑制されているタンパク質のアセチル化が検出出来ると期待された。その結果、野生型の細胞では 302 個のアセチル化タンパク質の同定に成功し、そのうち 171 個は新規アセチル化タンパク質であった。一方ノックアウト細胞では、112 個のアセチル化タンパク質を同定し、56 個が新規アセチル化タンパク質であり、両細胞株で共通のタンパク質は 43 個存在した。そこで、次に既知のアセチル化タンパク質の一つであるがアセチル化の生理的機能は全く不明である eIF5A に焦点を絞り、その機能解析を行った。

### 2. アセチル化による eIF5A1 の細胞内局在制御

翻訳開始や RNA 代謝に関与することが知られている eIF5A は二つのアイソフォーム（eIF5A1 と eIF5A2）が存在し、翻訳後ハイプシン化を受ける唯一のタンパク質である。ハイプシン化は deoxyhypusine synthase (DHS) と deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) の 2 つの酵素によりポリアミンである spermidine から 2 段階の反応を経て行われ、細胞内のほぼ全ての eIF5A 分子がハイプシン化を受け、eIF5A に機能に必須であることが知られている。また eIF5A1 が受ける翻訳後修飾はハイプシン化のみでなく、アセチル化もあることが近年報告されたが、その機能については全く不明である。まず eIF5A の脱アセチル化酵素の同定を目的として、最初にクラス選択性を有する HDAC 阻害剤の効果を検討した。その結果、クラス I/II の阻害剤であるトリコスタチン A (TSA)、クラス III の阻害剤であるニコチンアミド (NA) の両方で eIF5A のアセチル化レベルが上昇したことから、クラス I/II およびクラス III の HDAC が関与していることが示唆された。そこで、主要な 10 種類のクラス I、II、III の HDAC を過剰発現の効果を検討したところ、HDAC6（クラス II）、SIRT2（クラス III）の過剰発現は eIF5A1 の脱アセチル化を誘導することを見出した。加えて、HDAC6、SIRT2 のノックダウンは eIF5A1 のアセチル化レベルを上昇させたことから、HDAC6、SIRT2 は細胞内の主要な eIF5A 脱アセチル化であると結論づけた。一方、主要な 4 種類の HAT（CBP、

p300, PCAF, GCN5) のうち、PCAF をノックダウンした場合のみ eIF5A1 アセチル化の顕著な減少が見られた。*In vitro* において PCAF は eIF5A1 をアセチル化したことから、PCAF が eIF5A1 のアセチル化酵素であると結論した。次に、アセチル化の機能について検討した。以前の報告で、ハイプシン化は eIF5A の細胞内局在を制御するとされていたが、翻訳直後にほぼ全ての eIF5A1 は不可逆的にハイプシン化されることから、ハイプシン化がダイナミックな eIF5A の細胞内局在を制御しているとは考えにくい。そこでアセチル化による eIF5A の細胞内局在制御の可能性について検討した。アセチル化部位である 47 番目のリジン残基をグルタミンに置換し、アセチル化を模倣した変異体 (K47Q) の細胞内局在を検討したところ、野生型は細胞質に局在する一方、K47Q は核に局在した。加えて、アセチル化 eIF5A を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色法により、アセチル化 eIF5A1 は核に局在することが示された。以上の結果から、アセチル化は eIF5A1 の核移行を促進させることが明らかになった。

### 3. グルコース代謝における eIF5A1 のアセチル化に関する研究

eIF5A1 の脱アセチル化酵素の一つである SIRT2 は細胞内のエネルギー状態に反応して活性が制御されることから、細胞内のエネルギー状態に応じて eIF5A1 のアセチル化レベルが調節されている可能性がある。実際、高グルコース培地では、eIF5A1 のアセチル化が亢進し、その核局在が増加していた。細胞内の重要なエネルギーセンサー因子である mTOR は、インスリン刺激や窒素源、グルコースなどにより活性化されることが知られているが、グルコース刺激による mTOR 活性化機構はほとんど不明である。そこでグルコースによる mTOR 活性化に eIF5A1 が関与している可能性を検討したところ、eIF5A1 ノックダウンはグルコース刺激による mTOR の活性化を顕著に抑制したことから、eIF5A1 はグルコースによる mTOR 活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。mTOR は細胞質に局在しているが、高グルコース刺激は eIF5A1 の核局在を促進する。そこで、eIF5A1 は核での転写に関わる可能性を考え、eIF5A1 をノックダウンした細胞を用いて DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、高グルコース刺激により約 1,200 の遺伝子が eIF5A1 依存的に変化することが示され、グルコース刺激に反応した遺伝子発現調節に eIF5A1 が関与している可能性が示唆された。

### 4. eIF5A2 のアセチル化に関する研究

eIF5A の二つのアイソフォームのうち eIF5A1 は全組織に発現し、その機能について比較的明らかにされているのに対し、精巣、脳など組織特異的に発現している eIF5A2 については、アセチル化されるかどうかを含めその詳細はほとんど不明である。eIF5A1 と eIF5A2 は約 84% の相同性を有していることから、eIF5A2 もアセチル化をされ、eIF5A1 と同様な制御機構を受けている可能性が高い。実際、本論文ではアセチル化 eIF5A 特異的抗体を用いて eIF5A2 はアセチル化されることを明らかにした。HDAC 阻害剤、各 HDAC の過剰発現の効果を検討したところ、eIF5A1 と同様に HDAC6 と SIRT2 が eIF5A2 の脱アセチル化酵素として機能することを示した。加えて、K47Q 変異体は核に局在していることを見出し、アセチル化は eIF5A の両アイソフォームの細胞内局在を制御する共通な細翻訳後修飾であることが示唆された。

以上本論文は DNA メチル化酵素ノックアウト細胞を使用したアセチローム解析により複数の新規アセチル化タンパク質を同定し、さらに eIF5A の 2 つのアイソフォームのアセチル化の機能の解明に初めて成功したものである。mTOR はエネルギーセンサータンパク質として、細胞のストレス応答、老化、がん化などに非常に重要な役割を果たしていることから近年非常に注目されている因子であり、今後 mTOR の活性化経路における eIF5A1 アセチル化の生理的意義の解明が期待される。加えて、eIF5A2 は発がん因子であることが近年報告され、アセチル化による eIF5A2 の発がん活性制御についての解明も期待される。

本研究の成果は査読制のある国際誌に2編の論文（筆頭著者）として掲載決定されている。よって本審査員一同は、本論文が博士（理学）の学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と認めた。