2020年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	希少修飾を介した革新的なチロシナーゼ活性制御メカニズムの解明 ー肌色をコントロールする薬剤の新規標的開発を目指した研究ー
キーワード	① 希少タンパク質修飾、②美白、③タンパク質分解

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	マエモト ユウキ 前本 佑樹
配付時の所属先・職位等 (令和2年4月1日現在)	東京薬科大学 生命科学部 助教
現在の所属先・職位等 (令和4年7月1日現在)	東京薬科大学 生命科学部 助教
プロフィール	2014年に名古屋大学大学院生命農学研究科博士後期課程を修了。博士(農学)。2014年より大阪大学にて学振特別研究員(PD)にてオートファジーの研究に従事。2016年より東京薬科大学生命科学部助教(現在に至る)。メンブレントラフィックを中心に研究をおこなっており、2017年からは翻訳後修飾による細胞内膜輸送制御機構の研究、リン脂質関連酵素の研究を行う。

1. 研究の概要

リジンのアセチル化は、真核生物タンパク質の機能や局在を調節する重要なタンパク質翻訳後修飾で、遺伝子発現やエネルギー代謝を制御している。近年リジンはアセチル化だけでなく、ミリスチル化やパルミトイル化のような長鎖アシル化修飾を受けることがわかっている。リジンの長鎖アシル化を担う酵素は未だ同定されていないが、脱長鎖アシル化は亜鉛依存的なリジン脱アセチル化酵素や、 NAD^+ 依存的なサーチュインが担う。このような多様な脱長鎖アシル化制御の存在は複数の長鎖アシル化タンパク質の存在を示唆している。そこで新規のリジン長鎖アシル化タンパク質の探索を目的に、マウスメラノーマB16細胞を用いたランダム修飾プロテオーム解析を行った。するとメラニン合成に関わる酸化酵素であるチロシナーゼのリジン残基がパルミトイル化されていることを発見した。チロシナーゼはリボソームで合成されるとゴルジ体を通してメラノソームと呼ばれる細胞小器官に輸送され、そこでメラニン合成の中心的な役割を果たす。本研究ではチロシナーゼの長鎖アシル化修飾による新規活性制御メカニズムの解明を目的とした。

2. 研究の動機、目的

昨今の化粧品には美白を謳ったものがほとんどで、日本は今空前の「美白ブーム」である。肌の色調の原因物質はメラニンであり、メラニンはチロシンを原料として生合成されるが、その生合成経路の中でも、律速酵素として注目されているのがチロシナーゼである。チロシナーゼの活性を制御することは人々のQuality of life (QOL)の向上につながる。多くのタンパク質は翻訳後修飾によってその生理的機能が調節されている。代表的な翻訳後修飾に、直鎖脂肪酸が付加する長鎖アシル化がある。数多くのシステイン残基へのS-パルミトイル化とN末端のアミノ基へのミリスチル化が報告されている。

一方、同じく1級アミンをもつリジン残基はミリスチル基などの長鎖アシル基を含む

様々なアシル修飾を受けることが少しずつ明らかになっており、TNF- α および R-Ras2、K-Ras4a、SHMT2、RalB、ARF6 の 6 種類のタンパク質はでリジン長鎖アシル化が報告されている。チロシナーゼは膜貫通タンパク質であり、脂肪酸付加によって活性、機能、局在に影響を与える可能性がある。そこで、本研究ではこれら 3 つの側面からアプローチをし、チロシナーゼパルミトイル化の意義の解明を目的とする。

3. 研究の結果

質量分析によってチロシナーゼの 507 番目のリジン残基がパルミトイル化されることが明らかになった。リジン残基の長鎖アシル化の検出を、クリックケミストリーを用いた手法にて行った。本法は、末端がアルキンである脂肪酸類縁体とアジド Biotin による Huisgen 環化付加反応を利用した方法である。アシル化修飾依存的に目的タンパク質に脂肪酸アルキンを取り込ませ、標的タンパク質を精製し、*in vitro* でアジド Biotin と反応させ標識する。その後、還元剤であるヒドロキシルアミン処理を行うことで、システイン残基に取り込まれた脂肪酸アルキンを除去し、リジンのアシル化特異的なシグナルを検出する。その結果、野生型ではリジンアシル化修飾依存的なバンドを検出することができたが、修飾されたリジンをアルギニンに変異した KR 変異体ではバンドシグナル強度の低下が見られた。その一方、その変異体を用いてチロシナーゼの活性測定実験を行ったところ、活性の大幅な変化は検出されなかった。

また、KR 変異体の細胞内局在を観察したところ、その局在も目立った変化が観察できなかった。

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究ではチロシナーゼのリジンアシル化を同定し、解析をおこなってきたが、残念ながらメカニズムの解明には至らなかった。

申請者は今回の研究以外にも、多くのリジンの長鎖アシル化修飾タンパク質を明らかにしている。リジンの長鎖アシル化修飾は数例のみが報告されている修飾であり、本研究を通して、確立したリジンの長鎖アシル化修飾検出方法を通じて、リジンの翻訳後修飾によるタンパク質制御メカニズムを明らかにしたい。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、コロナ禍により大学での実験が十分に行うことができない中、柔軟な予算対応をしていただきありがとうございました。本研究は目的の一つである長鎖アシル化の検出を行うことができましたが、期間内にその明確な機能にまで迫ることができませんでした。

一方で、まだまだ研究の余地は多く残されている状態です。本研究のような、基礎的で萌芽的な研究のサポートをしていただける若手・女性研究者奨励金はとても尊い存在であると痛感しております。

私自身は、引き続き、翻訳後修飾に関する研究に邁進したいと考えています。改めまして、今回ご支援くださいました皆様に感謝申し上げます。