

「ゲノムの構造と機能」
平成11年度採択研究代表者

吉田 稔

(東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授)

「核内因子の修飾と局在に関する化学遺伝学的研究」

1. 研究実施の概要

【研究のねらい】核タンパク質における核外輸送とアセチル化の意義を解明するため、核内・核外輸送阻害剤、アセチル化・脱アセチル化阻害剤、抗アセチルリジン抗体等、新しいバイオプローブの作製とその分子生物学への応用により、核外移行シグナル(NES)含有タンパク質、アセチル化タンパク質の網羅的な解析を行う。

【概要及び成果】核外輸送されるタンパク質やアセチル化されるタンパク質の網羅的解析を目指し、分裂酵母ゲノムプロジェクトの情報から全てのORFをクローン化することを計画した。クローン化に当たっては、ORFごとに組換え反応で目的のベクターに移し替えができるGATEWAY法を用い、エントリークローンとして全遺伝子中の約6割についてクローン化することに成功した。また、広範囲なアセチル化タンパク質の検出に有用な抗アセチルリジンモノクローナル抗体の作製に成功した。新規脱アセチル化阻害剤としてトリコスタチン/トラポキシンハイブリッド化合物CHAPの立体構造と活性の相関を明らかにするとともに、トラポキシンがHDAC6をほとんど阻害できないことを明らかにした。

【今後の見通し】GATEWAY法による分裂酵母のゲノムORFのクローン化を完成させ、それらのGFP融合タンパク質の局在性と核外輸送阻害剤応答性を網羅的に観察する予定である。また、今回作製された抗アセチルリジンモノクローナル抗体を利用してタンパク質アセチル化の解析を行なう。脱アセチル化酵素のアイソザイム選択的な阻害剤をコンピュータ分子モデリングを利用して設計するとともに、これを利用して特定のアイソザイムに対する細胞内基質を同定する。

2. 研究実施内容

【研究目的】

タンパク質の修飾や機能モチーフの同定と解析はゲノム塩基配列情報と相補的で重要である。本研究は核内因子の局在調節とアセチル化の意義の解明を中心に、核外移行シグナルを有するタンパク質と可逆的アセチル化を受けるタンパク質を申請者らが発見、開発した核外移行阻害剤レプトマイシン、ヒストンデア

セチラーゼ阻害剤、抗アセチル化リジン抗体などを用いる独特の方法によって検索し、それらの機能を明らかにすることを目的とする。この成果をもとにゲノム機能の人為的制御や治療法への可能性を探る。

【方法と結果】

(1) 分裂酵母全ORFのクローン化と新規核外輸送タンパク質の解析

分裂酵母内でのタンパク質の局在を網羅的に明らかにするとともに核外輸送されるタンパク質を同定するため、分裂酵母のゲノムORF全長を全てクローン化し、GFPとの融合タンパク質として発現させることを計画した。クローン化に当たっては、ORFごとに組換え反応で目的のベクターに移し替えができるGATEWAY法を用いることにした。現在、分裂酵母ではゲノム計画がほぼ最終段階を迎えており、全ゲノムの約95%程度が解読されている。この情報はインターネット上に公開されているため、それらの情報を解析し、各遺伝子を増幅するためのPCRプライマーを設計するプログラムを作成した。このプログラムで得られた配列情報を元に各遺伝子断片を増幅し、プラスミドベクターへのクローニングを行なった。これらのプラスミドを回収し、現在までに分裂酵母で予想されている全遺伝子の約6割について正しいORFがクローニングされていることを確認した。今後これらの遺伝子を酵母内でGFP融合タンパク質として発現させ、その局在を解析する予定である。

(2) 抗アセチルリジンモノクローナル抗体の作成

昨年までに樹立した抗アセチルリジンモノクローナル抗体はヒストン以外のアセチル化タンパク質の検出能力があまり高くなかったので、本年は免疫方法等に工夫を加えることにより、より広範なタンパク質のアセチル化を検出できる抗アセチルリジンモノクローナル抗体の樹立を試みた。今回樹立した抗体を用いることにより、Western blotting法でヒストン以外の複数のアセチル化タンパク質を検出することができた。また、昨年樹立の一つとあわせて計4種の抗アセチルリジンモノクローナル抗体の、可変領域のcDNA配列を決定したところ、いずれも共通のフレームワークを有していることが明らかになり、アセチルリジンを認識するためにはある特定のフレームワークを有する抗体である必要があることが示唆された。

(3) 新規脱アセチル化阻害剤の立体構造と活性の相関

昨年度、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の活性を制御するバイオプローブの設計合成の一環として、Trapoxin A, B, Cyl-1, 2, Chlamydocin, WF3161のそれぞれに対応する骨格を有し、活性基エポキシケトンの代わりにトリコスタチン(TSA)の活性基ヒドロキサム酸を導入したCHAP(cyclic hydroxamic acid-containing peptide)を合成し、その平面構造と活性の関係を明らかにした。今

年度はさらにD-アミノ酸の位置やProの位置を様々に変えたステレオイソマーを新たに合成することにより、立体構造と活性の相関を解析した。各種の生理活性を有する天然の環状テトラペプチドはTrapoxin A及びB以外にも複数知られており、D-アミノ酸の位置やProの位置が違う多様なイソマーが存在する。そこで、Trapoxin A及びBをモデルとした、立体配置及びアミノ酸配列の異なる15種類の環状テトラペプチドを合成し、そのHDAC阻害活性を測定した。ペプチドの自動固相合成には平成11年度導入のペプチドシンセサイザーを使用した。合成確認にはHPLC等の使用に併せて平成12年度導入の飛行時間型質量測定システムを用いた。HDAC阻害活性を調べた結果、LLLD-体(L-Asu(NHOH)を起点とする)、LDLL-体及びLDLD-体はHDAC活性を強く阻害した。LLDL-体及びLDDL-体等は、HDAC阻害活性が1/3～1/100倍に低下した。またLDLD-体のProの位置を変えたところ、Proが3位ではHDAC阻害活性が低下したが、2位のものは天然物のように4位にProを持つ場合と同様の強い活性を示した。これらのステレオイソマーの立体構造解析から、立体構造と活性との間に一定の法則性があることを見いだした。

(4) 脱アセチル化阻害剤の酵素阻害特異性の解析

HDACは複数のアイソザイムが存在し、それぞれ異なった機能を持つと考えられるが、特定のアイソザイムに対する選択的阻害剤は知られていない。そこでまずHDAC1, 2, 4, 6について組換え酵素を作製し、既存のHDAC阻害剤とCHAPの特異性について検討した。その結果、TSAはいずれの酵素に対しても強く阻害するのに対し、TPXはHDAC1, 2およびHDAC4を非常に強く阻害する一方、HDAC6をほとんど阻害しなかった。TPXは側鎖のエポキシケトン基を介して酵素と共有結合すると考えられるが、阻害可逆性の実験からTPXはHDAC6に対しては結合できないことが判明した。また、CHAPの多くはHDAC6に対して弱く、TSAに比べて大きなキャップ構造がその特異性の要因になっていることが示唆された。

【結論と考察】

核外輸送タンパク質のスクリーニングについては、昨年度分裂酵母ゲノムライブラリーを用いて行ない、ゲノム全体の1/3に相当するライブラリーの全ての形質転換株について観察した。しかし、ライブラリーの性質上C末端領域をコードする部分にGFPが融合するため、どのクローンもC末端を欠き、局在が本来のものとは一致しないものも認められた。そこで本年度から分裂酵母ゲノムプロジェクトの情報を基に全てのORF全長をPCRによってクローン化し、その局在をGFPとの融合によって観察する方法に変更した。開始から4ヶ月で約6割の遺伝子について正しいものを取得することができた。しかし、今後は取得できなかったもの

の再検討など、解決しなければならない問題もある。

今回非ヒストンタンパク質のアセチル化に対しても強く反応するモノクローナル抗体の作製に成功した。これによってすでにHDAC阻害剤のよって大きくアセチル化が促進するタンパク質が多数検出されることも明らかになった。今後はそれらをひとつひとつ同定するとともに、特異性の異なる阻害剤でアセチル化されるタンパク質を同定することで、個々の酵素に対する特異的基質の同定にもつながると期待される。

多様なCHAP化合物の合成研究から、強力なHDAC活性に必要な構造が明らかになってきた。今後は、酵素選択性を導きだす構造を明らかにする必要がある。包括的な構造・活性相関を行うためには、簡便なアッセイ系の開発、大量の酵素の調整法の開発などが必要である。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Ki, S. W., Ishigami, K., Kitahara, T., Kasahara, K., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Radicol binds and inhibits mammalian ATP citrate lyase. *J. Biol. Chem.* 275: 39231-39236, 2000.

Masuoka, Y., Shin-ya, K., Kim, Y.-B., Yoshida, M., Nagai, K., Suzuki, K.-i., Hayakawa, Y., and Seto, H. Diheteropeptin, a new substance with TGF- β -like activity, produced by a fungus, *Diheterospora chlamydosporia*. *J. Antibiot.* 53: 788-792, 2000.

Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biochem.* 127: 503-509, 2000.

Takizawa, T., Tatematsu, C., Watanabe, M., Yoshida, M., and Nakajima, K. Three leucine-rich sequences and the N-terminal region of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) are responsible for its cytoplasmic localization. *J. Biochem.* 128 : 471-476, 2000.

Davezac, N., Veronique, B., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yoshida, M., and Ducommun, B. Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene.* 19 : 2179-2185, 2000.

Hoshino, H., Kobayashi, A., Yoshida, M., Kudo, N., Oyake, T., Motohashi, H., Hayashi, N., Yamamoto, M., and Igarashi, K. Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach 2 that counteracts activation of Maf recognition element. *J. Biol. Chem.* 275 : 15370-15376, 2000.

Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.-P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M.,

and Khochbin, S. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* 10 : 747-749, 2000.

Kim, Y. B., Ki, S. W., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J. Antibiot.* 53 : 1191-1200, 2000.

Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 : 87-92, 2001.