

「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、昨年度開始した分裂酵母ゲノム上の全ての ORF をクローン化することを継続・推進した。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 法によるエントリークローンとして全遺伝子中の約9割についてクローン化することに成功した。また、これを発現させるための目的発現ベクター(デスティネーションベクター)として分裂酵母内でプラスミドとして複製して高発現させると同時に宿主と形質転換方法を変えるだけで染色体組込型としても導入することができる多目的 GATEWAY ベクター pDUAL-GFP1 を開発した。組換え反応でこのベクターへ導入した ORF は C 末端に蛍光タンパク質 GFP、ヒスチジンタグ、FLAG タグを有し、局在観察、プロテオーム解析など多目的に利用することが可能になった。また、昨年度樹立した4種の抗アセチルリジンモノクローナル抗体のアセチルリジン含有ペプチドとの結合の kinetics を明らかにするとともに、アセチル化タンパク質の網羅的解析に用いるための二次元電気泳動-Western blotting の手技を確立し、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理により多数のアセチル化タンパク質のスポットが検出できることを確認した。これらの情報と薬剤感受性の差を利用してヒストンデアセチラーゼ 6 (HDAC6) の基質を探索したところ、 α -チューブリンを同定した。HDAC6 はチューブリンの脱アセチル化を行うことによって、微小管の安定性の低下、細胞運動性の上昇を引き起こすことを明らかにした。さらに蛍光標識ペプチドを応用した新しい HDAC 活性検出系の開発に成功した。これにより酵素の基質特異性などの解析が容易になると期待される。

【今後の見通し】GATEWAY 法による分裂酵母のゲノム ORF のクローン化がほぼ完了したので、今後はそれらの 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、タンパク質アセチル化については、今後微小管のアセチル化機構の詳細を明らかにするとともに、非ヒストンタンパク質アセチル化の解析をさらに推進する予定である。

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おき、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

本年2月、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の全ゲノム配列が決定された。酵母としては出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に続き2例目であるが、高等動物の病因遺伝子などで保存された遺伝子を多く有し、従来から想像されていたとおり、モデル生物として極めて有用な酵母であることが確認された。我々は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、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 法を用いて分裂酵母のゲノム 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行っている。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、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る全遺伝子の約9割について正しい長さの断片がクローニングされていることを確認した。次にこれらの遺伝子を分裂酵母内で GFP 融合タンパク質として発現させ、その局在を解析するための最適なベクターの開発を行った。組織的な予備検討を行ったところ、プラスミドベクターからの融合蛍光タンパク質の発現は、個々の細胞によって発現量(蛍光量)が異なること、発現量が多いと形態異常などの好ましくない形質が生じやすいことから、染色体組込型のベクターの方がよいと思われた。しかし、タンパク質によっては発現量が少なく、1コピーの染色体組込型ベクターでは十分な蛍光が得られない場合があった。また、並行して行うアセチル化タンパク質などのプロテオーム解析を行う場合には、発現量が高い方が有利であり、プラスミドベクターとしての利用も可能なものが求められた。そこでこのような多目的に利用できる単一ベクターを考案した。すなわち、両端に稀少制限酵素切断サイト(*NotI*, *SacII*, *ApaI*)を持ち、栄養要求マーカー *ura4* と自立複製配列 *arsI* を含むカセットを栄養要求マーカー *leu1* の中央領域に挟み込んだ。得られたベクターはそのままプラスミドとしてウラシル要求性株に導入すれば多コピーベクターとして機能し、*NotI* 等で切断して *ura4-arsI* フラグメントを遊離させてからロイシン要求性株に導入すれば、宿主の変異ロイシン生合成遺伝子と相同組み換えを起こして染色体組込型ベクターとして機能する。本ベクターのマルチクローニングサイトに GATEWAY 用の *attR* 配列に挟まれた致死遺伝子 *ccdB* を挿入しておけば、エントリークローンは1回の LR クローニング反応によって多目的発現ベクターへと変換される。この原理に基づいて、ORF の下流に GFP(または CFP)、ヒスチジンタグ、FLAG タグを連結した発現ベクターを構

築した。本ベクターを用いることにより、一つの発現ベクターによって局在観察、プロテオーム解析など多目的に利用することが可能になったので、今後は順次この発現ベクターへの変換を行い、実際の解析に利用していく予定である。

(2) 抗アセチルリジン抗体のプロファイリングとそれを用いたアセチル化タンパク質の網羅的解析

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と各種 HDAC 阻害剤を用いて細胞内で特異的にアセチル化されるタンパク質を探索した。その結果、クラス I、クラス II のすべての HDAC を阻害できる TSA で強くアセチル化が誘導され、HDAC6 のみを阻害することのできない TPX を用いた場合には全くアセチル化の促進が見られない 54 KD のタンパク質を同定し、解析を行ったところ、このタンパク質は α -チューブリンであることを見いだした。HDAC6 は *in vitro*、*in vivo* でチューブリンの脱アセチル化を行うが、他の酵素ではチューブリンのアセチル化レベルの減少は認められなかった。HDAC6 の過剰発現によるチューブリンの低アセチル化、TSA 処理による高アセチル化を比較することにより、アセチル化チューブリンは細胞質微小管を安定化させることが示唆された。また、重合状態の微小管でのみアセチル化が起こり、脱重合すると速やかに脱アセチル化されることも明らかとなり、微小管のダイナミクスとアセチル化、脱アセチル化がカップルすることも示された。さらに、Duke 大の Yao らと共同し、HDAC6 によるチューブリン脱アセチル化の結果として細胞の運動性が上昇することも明らかにした。

(3) 脱アセチル化酵素基質特異性解明のためのバイオプローブとなるペプチジル MCA の発明

HDAC には 10 種類以上の類縁酵素が存在し、ヒストンのみならず様々なタンパク質の脱アセチル化に関わっていると考えられる。しかし、それぞれの固有の基質や機能についてはほとんど分かっておらず、また、それぞれに対する特異的な阻害剤も知られていない。HDAC の酵素反応が放射能標識した基質を使わなくてはならないという技術的な制約がその大きな理由であった。今回、様々なオリゴペプチドのカルボキシ末端に Lys(Ac)-methyl coumarinamide (MCA) を結合した Peptidyl-Lys(Ac)-MCA を基質とした HDAC 活性測定法を検討し、非放射能標識の HDAC 活性測定法を確立した。Peptidyl-Lys(Ac)-MCA を基質として HDAC による脱アセチル化反応を行った後、trypsin を作用させると AMC (7-amino-4-methyl-coumarin) が生成する。生成した AMC をプレートリーダー式蛍光測定装置で測定することにより HDAC 活性を簡便に測定することができる。オリゴペプチド部分の配列をヒストン H4, tubulin, p53 等のアセチル化部位近傍配列にした Peptidyl-Lys(Ac)-MCA を用いて幾つかの HDAC サブタイプの活性を測定したところ、酵素間で基質特異性に違いがあることが示された。

【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、昨年度から開始した分裂酵母ゲノム全 ORF の GATEWAY 法によるクローニングが順調に進行し、ゲノムプロジェクトが終了した本年2月には既に90%を超えるクローンの取得に成功した。残るクローンについては、プライマー配列や ORF 長などに問題があるものを含んでおり、最終的に数%は取得不可能なものとして残存する可能性が高い。取得クローンの正確性については、現在のところ予算の制限から断片サイズの確認のみにとどまっているが、今後少なくとも一部については塩基配列レベルでも評価する必要があると考え

ている。これらのエントリークローンをどのような発現ベクターに移し替えていくかが次の重要な問題であったが、今回多コピープラスミドベクターとしても染色体組込型ベクターとしても利用可能な多目的ベクターの開発に成功したので、今後は順次全てのエントリークローンを発現ベクターへと変換し、酵母内での発現を行っていく予定である。

昨年、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ので、これを用いて特異性の異なる HDAC 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た。今回我々は HDAC のなかで一次構造、局在性、阻害剤感受性などが他のものと大きく異なる HDAC6 に興味を持ち、得られたモノクローナル抗体を用いてその機能解析を行ったところ、 α -チューブリンがその特異的な基質のひとつであることを明らかにした。チューブリンのアセチル化は、古くから知られる現象であったが、その機能や触媒する酵素の実体も含めて、多くが謎であった。今回の発見により、微小管のアセチル化の制御機構とその生物学的意義の解明が大きく進展すると思われる。特に微小管の機能の中で、物質輸送、ユビキチン化蛋白質のセントロソーム近傍での分解、細胞運動などとアセチル化がどう関わるのかが興味深い。また、タキソールなどチューブリンの安定化を引き起こす抗がん剤は、同時にチューブリンのアセチル化を引き起こす。したがって、チューブリンのアセチル化を制御することで薬効の調節や副作用の軽減などにつながる可能性もあると思われる。

タンパク質アセチル化/脱アセチル化の研究を推進するに当たり、特異的な阻害剤の開発とともに、酵素特異的な反応を簡便に検出できるようなバイオプローブの開発が望まれていた。今回我々ははじめて Peptidyl-Lys(Ac)-MCA を用いて蛍光による酵素反応の簡便な検出に成功した。本系はマルチウェルプレートでアッセイを行うことができるため、薬剤開発のためのハイスループットシステムとしても極めて有効である。今後はこの系を有効に利用し、各酵素間での基質特異性の違いの解明や特異的阻害剤の開発に応用していきたい。

3. 研究実施体制

(1) 核移行および機能解析グループ

グループ長名: 吉田 稔 (東京大学大学院農学生命科学研究科、助教授)

研究項目

核外移行蛋白質の検索と同定・機能解析、阻害剤等化学プローブを用いたアセチル化・脱アセチル化酵素の機能解析

(2) バイオプローブ設計グループ

グループ長名: 西野 憲和 (九州工業大学大学院生命体工学研究科、教授)

研究項目

各種バイオプローブの設計合成と蛍光消光基質等を用いた酵素活性検出法の開発

(3) 蛋白質アセチル化解析グループ

グループ長名: 小松 靖彦 (株式会社医薬分子設計研究所、分子機能部長)

研究項目

各種アセチル化関連抗体の作製とそれを用いたアセチル化蛋白質の同定、アセチル化部位の同定

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Akakura, S., Yoshida, M., Yoneda, Y., and Horinouchi, S. A role for Hsc70 in regulating nucleo-cytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53^{Val135}). *J. Biol. Chem.* 276: 14649-14657, 2001.
- Forgues, M., Marrogi, A. J., Spillare, E. A., Wu, C.-G., Yang, Q., Yoshida, M., and Wang, X. W. Interaction of the Hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 22797-22803, 2001.
- Eleftheriou, A., Yoshida, M., and Henderson, B. R. Nuclear export of human β -catenin can occur independent of CRM1 and APC. *J. Biol. Chem.* 276: 25883-25888, 2001.
- Komatsu, Y., Tomizaki, K.-y., Tsukamoto, M., Kato, T., Nishino, N., Sato, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Hayashi, H. Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res.* 61: 4459-4466, 2001.
- Ki, S. W., Kasahara, K., Kwon, H. J., Ishigami, K., Kitahara, T., Beppu, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Raicol binds Swi1/Hsp90 and inhibits growth of specific temperature-sensitive cell cycle mutants of fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2528-2534, 2001.
- Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 36431-36437, 2001.
- Ueki, M., Takayuki, T., Nie, L., Usami, R., Yoshida, M., and Osada, H. A new trichostatin derivative, trichostatin RK, from *Streptomyces* sp. RK98-A74. *J. Antibiot.* 54: 1093-1095, 2001.
- Yoshida, M., Furumai, R., Nishiyama, M., Komatsu, Y., Nishino, N., and Horinouchi, S. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 48 (Suppl 1): S20-S26, 2001.
- Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N., and Kato, J.-y. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27^{Kip1} mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J. Biol. Chem.* 277: 2302-2310, 2002.

(2) 特許出願(当面公開は考えていません。)

国内特許 2 件

外国特許 1 件