

「ゲノムの構造と機能」

平成11年度採択研究代表者

吉田 稔

(理化学研究所 化学遺伝学研究室 主任研究員)

「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総合的な解析を行う。

【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て開始した分裂酵母ゲノム全ORFのクローン化をほぼ完了した。ORFごとに組換え反応で目的のベクターに移し換えができるGATEWAY法を利用し、エントリークローンとして全遺伝子中の99.4%についてクローン化した。得られたエントリークローンの大部分は我々が開発した多目的発現ベクターpDUAL-YFP1へ組換え反応でこのベクターへ導入した。その結果ORFはC末端に蛍光タンパク質YFP、FLAGタグ、ヒスチジンタグを有し、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。これら約5,000の発現ベクターを分裂酵母の*leu1*遺伝子座に組み込んだ形質転換株を作製し、それぞれの遺伝子産物の細胞内局在の決定を開始した。細胞内局在が明らかになったものについてそれぞれ高解像度の蛍光顕微鏡写真を取得し、データベースの作製を行っている。また、本研究で得られた抗アセチル化リジンモノクローナル抗体を用いた新規アセチル化タンパク質の同定作業を継続し、昨年明らかにした α -チューブリンに加えてさらに2種類のアセチル化タンパク質を同定した。

【今後の見通し】得られた分裂酵母全ORFのYFP融合タンパク質の細胞内局在を全て決定し、情報公開を行う予定である。また、核外輸送阻害剤レプトマイシンBを用いた核外移行タンパク質の網羅的な検索を開始する。また、タンパク質アセチル化については、より性能の高い抗アセチル化リジン抗体を開発し、さらに包括的なアセチル化タンパク質の解析を行う予定である。

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

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、昨年2月に決定、公開された分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の全ゲノム配列に基づき、ORFごとに組換え反応で目的のベクターに移し換えが可能な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することを目指した。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99.4%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。残ったクローンはサイズが10 kb超の長大なものやプライマー配列がたまたま他の遺伝子と同一のものなど、取得がきわめて困難なものに限られる。これらについても引き続き単離の努力を行っている。次にこれらの遺伝子を分裂酵母内でYFP融合タンパク質として発現させるため、昨年度開発した多コピー／染色体組込共用の多目的ベクターpDUALへ組換え反応により移し換えた。黄色蛍光を発するYFPを利用することにしたのは、細胞内局在の最終的な決定のためにCFP標識した局在マーカーとの共発現を利用できるからである。得られたpDUALによるYFP融合タンパク質発現ベクターをロイシン要求性株に導入し、1コピーで染色体上に組み込まれたことを確認した。こうして全遺伝子の約8割については、細胞への導入が完了し、順次各遺伝子産物の細胞内局在の決定を開始した。これらの局在データは、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡およびデコンボリューション蛍光顕微鏡によって取得された高精細画像として記録している。

(2) 抗アセチル化リジン抗体の用いたアセチル化タンパク質の網羅的解析

昨年、これまでに樹立した抗アセチル化リジンモノクローナル抗体と各種HDAC阻害剤を用いて α -チューブリンがトリコスタチンA (TSA) で特異的にアセチル化されることを見出し、最終的にHDAC6がチューブリン脱アセチル化酵素であることを証明した。そこで本年度は、同様にTSAや他のHDAC阻害剤でアセチル化が蓄積するタンパク質を2次元電気泳動、抗アセチル化リジンモノクローナル抗体によるウェスタンブロッティングによって探索した。得られたスポットを切り出し、LC-タンデムMS法によって同定することを試みた結果、新たなアセチル化タンパク質を2種類同定した。それらについて免疫沈降法により、細胞内でアセチル化されることの確認も行なった。今後はそれぞれのタンパク質の機能におけるアセチル化の意義を明らかにする予定である。

(3) タンパク質脱アセチル化酵素機能の解明のためのバイオプローブ設計

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の酵素間選択的な阻害剤を開発するため、新規に設計した含フッ素ケトン型官能基を持つ環状テトラペプチドHDAC阻害剤の設計合成を行った。これまで、CHAPのヒドロキサム酸を配置していた位置に CF_3CO -あるいは $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CO}$ -のように酸性度の高いケトン基を導入した環状テトラペプチドを合成した。具体的には側鎖をベンジルエステルで保護したアミノスベリン酸を用いて環状テトラペプチドを合成した後、保護基を除去し、トリフルオロ酢酸無水物あるいはペンタフルオロプロピオン酸無水物と反応させ目的物を得た。現在、活性の評価を行っている。

(4) 核内小構造の機能解析

転写抑制因子Bach2の局在制御を解析する過程で、本分子のN末端に存在するBTBドメインを介して、転写コリプレッサーSMRTやHDAC4を含んだ核内小構造が形成されることを見いだした。そこでその核内小構造の解析を行ったところ、その構造は核マトリックス上に形成され、PML bodyなどとは位置の異なる構造体であることがわかった。また、Br-UTPを用いた実験から、核内小構造周辺では転写が強く抑制されていることがわかった。

【結論と考察】

分裂酵母ゲノム全ORFのGATEWAY法によるクローニングがほぼ完了した。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、今後少なくともプライマー部分を含む両末端は塩基配列レベルでも確認する必要があると考えている。また、得られたエンタリークローンの大部分をYFP融合タンパク質として発現させるベクターに移し換え、酵母内での発現が可能になっており、計画は順調に伸展している。

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高性能な抗体が必要とされる。本研究で得られた抗アセチル化リジン抗体は、ウェスタンブロット等での検出にはきわめて有効であるが、タンパク質のアフィニティー精製に使用できる性能を持っていなかった。そこで今後、更に結合強度の強い抗体の取得を試み、アセチル化タンパク質の簡便な精製法を確立する予定である。新しい阻害剤については、活性中心亜鉛と相互作用する官能基の導入はほぼ完了した。今後は酵素の活性中心ポケット表面周辺と相互作用する環状テトラペプチド部分の改変を行っていく予定である。

転写抑制因子Bach2とHDACを含む核内小構造は、転写抑制に関わることが明らかになった。今後はその形成機構、構成因子、Bach2、HDACのアセチル化、ユビキチン化、SUMO化等の修飾との関連を明らかにする必要がある。

3. 研究実施体制

<核外移行及び機能解析グループ>

- ① 研究分担グループ長：吉田 稔（理化学研究所 化学遺伝学研究室、主任研究員）
- ② 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

<バイオプローブ設計グループ>

- ① 研究分担グループ長：西野 憲和（九州工業大学大学院 生命体工学研究科、教授）
- ② 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

<蛋白質アセチル化解析グループ>

- ① 研究分担グループ長：小松 靖彦（株式会社 先端生命科学研究所、主任研究員）
- ② 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

<核内小構造解析グループ>

- ① 研究分担グループ長：堀之内 末治（東京大学大学院 農学生命科学研究科、教授）
- ② 研究項目：核内小構造形成機構の解析とその阻害剤の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Matsuyama, A., Yoshimatsu, Y., Shimazu, T., Sumida, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., and Yoshida, M. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 21: 6820-6831, 2002.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., and Horinouchi, S. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res.* 62: 4916-4921, 2002.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455-458, 2002.
- 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 p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J. Biol. Chem.* 277: 2302-2310, 2002
- Westendorf, J. J., Zaidi, S. K., Cascino, J. E., Kahler, R., Wijnen, A. J. V., Lian, J. B., Yoshida, M., Stein, G. S., and Li, X. Runx2 (Cbfa1, AML-3)

interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21CIP1/WAF1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7982-7992, 2002.

- Sakai, Y., Tsujita, T., Akiyama, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Akinaga, S., Horinouchi, S., Yoshida, M., and Yoshida, T. Gex1 compounds, novel antitumor antibiotics related to herboxidiene, produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiotics* 55: 863-872, 2002.
- Okue, M., Watanabe, H., Kasahara, K., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Kitahara, T. Short-step synthesis of all stereoisomers of preussin and their bioactivities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1093-1096, 2002.
- Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418: 438-442 2002.
- Murakami, N., Te, Y., Kawanishi, M., Aoki, S., Kudo, N., Yoshida, M., Nakayama, E. E., Shioda, T., and Kobayashi, M. New rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from valerianae radix. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2807-2810, 2002.
- Rombouts, K., Niki, T., Greenwel, P., Vandermomde, A., Wielant, A., Hellems, K., Bleser, P. D., Yoshida, M., Schuppan, D., Rojkind, M., and Geerts, A. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF- β 1-induced fibrogenesis in skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 278: 184-197, 2002.
- Geerts, B.-C., Munoz-Najar, U., Paik, J.-H., Claffey, K., Yoshida, M., and Hla, T. Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression. *J. Biol. Chem.* 278: 2773-2776, 2003.
- Bradney, C., Hjelmeland, M., Komatsu, Y., Yoshida, M., Yao, T.-P., and Zhuang, Y. Regulation of E2A activities by histone acetyltransferases in B lymphocyte development. *J. Biol. Chem.* 278: 2370-2376, 2003.
- Komatsu, Y., Yukutake, Y., and Yoshida, M. Four different clones of mouse anti-acetyllysine monoclonal antibodies having different recognition properties share a common immunoglobulin framework structure. *J. Immunol. Methods* 272: 161-175, 2003.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数： 0 件（研究期間累積件数： 4件）