

「ゲノムの構造と機能」

平成11年度採択研究代表者

吉田 稔

(独立行政法人理化学研究所 化学遺伝学研究室 主任研究員)

「核内因子の局在と修飾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】核蛋白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、抗アセチル化リジン抗体等、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) 含有蛋白質、アセチル化蛋白質の総合的な解析を行う。

【概要及び成果】核外輸送される蛋白質やアセチル化される蛋白質の網羅的解析を目指してクローン化した分裂酵母ゲノム全ORFのそれぞれについて、YFP融合蛋白質の細胞内局在の決定を行い、データベースの作製を行なった。また、分裂酵母の全ORF産物の3'末端にFLAG-His6タグを融合させたライブラリーを作製し、個別にゲノムに挿入した株からそれぞれ全蛋白質を調製し、SDS-PAGE、ウェスタンブロットによってFLAG-His6タグ融合蛋白質を検出した。この電気泳動における各遺伝子産物の泳動度をデータベース化し、これを「Mobilome」と命名した。これまでに全遺伝子の約80%についてその産物の電気泳動度を決定した。一方、前年度までにクローン化した分裂酵母ゲノム全ORFの塩基配列を解析したところ、約400のORFについて、フレームシフト変異などの重大な問題があるものが見出された。そこでこれらについて、再クローニングを試みた。蛋白質アセチル化解析グループではこれまでに確立していたのよりも優れた抗アセチル化リジン抗体の樹立と新たに抗メチルリジン抗体の樹立にも成功した。一方、バイオプローブ設計グループでは、新規な官能基を持つ環状テトラペプチド性HDAC阻害剤の合成に成功したので、Mobilomeと組み合わせてアセチル化等の修飾蛋白質の解析を行う予定である。さらにHDAC4/Bach2を含む核内小構造体が酸化ストレスに応答してPML bodyと共局在すること、その局在にはBach2のSUMO化が重要であることを明らかにした。

【今後の見通し】一通りの観察を終了した分裂酵母全遺伝子ORFのYFP融合蛋白質発現ライブラリーについて、配列エラーや過剰発現等の問題点を解決し、より完成度の高い全蛋白質の局在決定を行う。また、Mobilome、新規抗体、新規阻害剤を応用して包括的なアセチル化蛋白質の解析が可能となったのでこれを推進する。

## 2. 研究実施内容

### 【研究目的】

蛋白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蛋白質と可逆的アセチル化を受ける蛋白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蛋白質の解析

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できるGATEWAY法を用いて分裂酵母のゲノムORF全長を約99%クローン化した。この全ゲノムORFクローンライブラリーを分裂酵母内でYFPおよびFlag-His6タグとの融合蛋白質として発現する形質転換体を作製した。本年度は、その形質転換作業が一通り終了し、これまでに4,655個(94.7%)のORFについて酵母形質転換体を得た。形質転換体の得られていないクローン、配列エラーのあるクローンについては、取得作業を継続している。YFP融合蛋白質の細胞内局在は、蛍光顕微鏡システムにて観察・記録を行い、80%以上にYFPシグナルが観察された。過剰発現により本来の局在を示していないと考えられるものについては、発現を抑える培地条件を用いての観察を行っている。そのものの観察だけでは、局在同定の困難な蛋白質については、CFP融合蛋白質として発現させた局在マーカー蛋白質との共局在を調べることにより詳細に同定する作業を現在続行中である。また、局在観察した全ての形質転換体をNES(核外輸送シグナル)の受容体Crm1と特異的に結合して蛋白質の核外移行を阻害する低分子化合物レプトマイシンB(LMB)で処理した場合の各蛋白質の局在を観察したところ、約250個の蛋白質について、処理前後での局在に変化が見られた。さらに分裂酵母において核-細胞質間輸送因子と考えられる13遺伝子のうち、必須遺伝子以外の10遺伝子の破壊株について、様々な環境ストレス感受性を確認したところ、そのうち、*sal3*破壊株は、温度、熱ショック、イオン、紫外線照射、酸化剤などに対して高い感受性が認められたことから、Sal3がそれらの環境ストレス応答経路に関わる因子の輸送に関与することが示唆された。

#### (2) 抗アセチル化リジン抗体の用いたアセチル化蛋白質の網羅的解析

分裂酵母の全ORF産物の3'末端にFLAG-His6タグを融合させたライブラリーを作製し、個別にゲノムに挿入した株4,410株を樹立した。これらの株から個別に全蛋白質を調製し、5-20%の濃度勾配ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで蛋白質を分離した後、抗Hisタグ抗体を用いたウェスタンブロットによってFLAG-His6タグ融合蛋白質を検出した。この電気泳動における各遺伝子産物の泳動度をデータベース化し、これを「Mobilitome」と命名した。これまでに全遺伝子の約80%にあたる3,871遺伝子について、その産物の電気泳動度を決定した。また、この解析と平行して、各遺伝子産物がアセチル化されているかど

うかを、抗アセチル化リジン抗体により網羅的に検索した。その結果、これまでに12種（遺伝子の重複があるため16蛋白質）のアセチル化蛋白質および7種（遺伝子の重複があるため14蛋白質）のメチル化蛋白質を同定した。

### (3) 蛋白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蛋白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、新規な官能基を持つ環状テトラペプチド性HDAC阻害剤について多様な化合物の合成を行った。これまでに合成したヒドロキサム酸型官能基を持つ環状テトラペプチド骨格 (*cyclo*(L-Xxx-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro)) をもとにして、チオエステルやフェニレンジアミンなど多様な官能基部分の構造を導入した化合物を設計し合成した。

### (4) 核内小構造の機能解析

HDAC4とともに核内小構造を形成する転写抑制因子Bach2がSUMO化されることを見いだした。この修飾には、4つのリジン残基が関与していた。すなわち、この4カ所をアルギニンに置換したBach2KR1-4では、SUMO化はほとんど検出されなかった。野性型は酸化ストレス時にPML bodyに集積するのに対して、このBach2KR1-4は核内でフォーカスをつくるものの、PML bodyには集積しなかった。このことから、Bach2のSUMO化は、核内におけるBach2の機能部位の決定に関わると推測された。

### 【結論と考察】

GATEWAY法によるクローニングがほぼ完了した分裂酵母ゲノム全ORFを用いた核遺伝子産物の網羅的な細胞内局在の同定である「Localizome」の観察が一通り終了した。さらにこれまでに全く例のない網羅的な電気泳動位置のデータベース「Mobilome」の作製を目指した実験を開始し、順調に進行している。これらのデータベースはきわめて有用な情報として役立つと考えられる。一方で、プライマー部分を含む両末端の塩基配列を確認したところ、約400クローンについて、重大なPCRエラーが見出され、再クローニングを行う必要が生じた。これはPCRを委託したGATEWAY法ライセンス保有会社の用いたポリメラーゼの品質によるところが大きいと考えられる。今後はこれらについて再クローニングを行うとともに全てのクローンの全長の塩基配列を決定し、より完全なライブラリー作製を目指す必要がある。また、データベースの完成度を高めるため、「Localizome」については発現量のコントロール、局在マーカーとの共発現によるデータの確認、「Mobilome」については多コピー発現によって不安定蛋白質の発現量増大などを試みる必要がある。

蛋白質アセチル化／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。今回、新たな抗体と阻害剤が得られたので、その性質を詳細に解析するとともにアセチル化蛋白質の同定に利用していく予定である。

転写抑制因子Bach2のSUMO化修飾がBach2/HDAC4を含む核内小構造の局在と機能に重要であることがわかったので、その分子機構について解析を進める予定である。さらにHDAC4

やHDAC6の細胞質における役割を明らかにするための研究を一層推進する予定である。

### 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（独立行政法人理化学研究所 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：抗アセチルリジン及び抗メチルリジンモノクローナル抗体の作製とそれを用いた新規アセチルリジン及びメチルリジン含有蛋白質の解析

#### 核内小構造解析グループ

- ① 研究分担グループ長：五十嵐 和彦（広島大学 大学院医歯薬学総合研究科、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) 論文発表

- Watanabe, L. A., Jose, B., Kato, T., Yoshida, M., and Nishino, N. Synthesis of L- $\alpha$ -amino- $\omega$ -bromoalkanoic acid for side chain modification. *Tetrahedron Lett.* 45: 491-494, 2004.
- Tajima, Y., Goto, K., Yoshida, M., Shinomiya, K., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Miyazono, K., and Imamura, T. CRM1-dependent nuclear export of Smurf1 is essential for negative regulation of transforming growth factor- $\beta$  signalling by Smad7. *J. Biol. Chem.* 278: 10716-10721, 2003.
- Nishino, N., Jose, B., Okamura, S., Ebisusaki, S., Kato, T., Tsukamoto, M., Sumida, Y., and Yoshida, M. Cyclic tetrapeptides bearing sulfhydryl group potently inhibit histone deacetylases. *Org. Lett.* 5: 5079-5082, 2003.

#### (2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：5件）