

堀越ジーンセクタープロジェクトの研究成果

目次

1. ヒストンアセチル化勾配による抗サイレンシング制御機構の発見	2
2. ヒストンアセチル化酵素とヒストンシャペロンによる 染色体末端制御の解明	4
3. 単細胞生物におけるアポトーシス様細胞死の発見	5
4. ヒストンアセチル化酵素と脱アセチル化酵素の共通モチーフ構造の発見	7
5. ヒストンの機能残基とヒストン相互作用因子の発見	8
6. 新規ヒストンシャペロンの発見	10
7. ジーンセクターCIA の三次構造解析	12
8. ジーンセクターCIB の三次構造解明	14
9. ガンキリン相同因子の三次構造解明	15
10. DNA 結合因子とクロマチン構造変換因子の相互作用解析	16
11. ジーンセクターによる発生制御機構の解明	17

1. ヒストンアセチル化勾配による抗サイレンシング制御機構の発見

研究成果の概要

染色体末端のテロメアは他の染色体より凝縮した構造になっている。この染色体凝縮がテロメアから離れた領域で起こらないように制御している蛋白質として Sas2 蛋白質を発見した。Sas2 はヒストンをアセチル化する活性があり、テロメアから離れたヒストンをアセチル化することで、テロメア以外の染色体領域が凝縮するのを防いでいた (図 1-1)。また、テロメアから離れた領域では Sas2 がヒストンをアセチル化することにより、テロメアに局在している凝縮蛋白質が他の領域まで拡散しないように防いでいるメカニズムを見出した。一方、テロメア近傍での遺伝子発現の不活性化には Sir2 が関わることを見出した。Sir2 はテロメア付近のヒストンがアセチル化しないように保つ酵素活性があり、この酵素を欠損するとテロメアの凝縮構造が解消した。このように、Sas2 と Sir2 によって形成されるヒストンのアセチル化勾配により遺伝子発現のサイレンシングに拮抗する分子メカニズムを初めて提唱した (図 1-2)

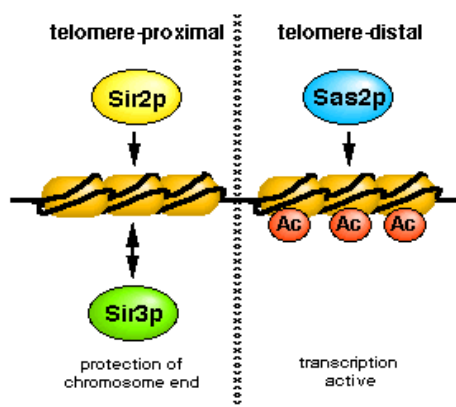


図 1-1

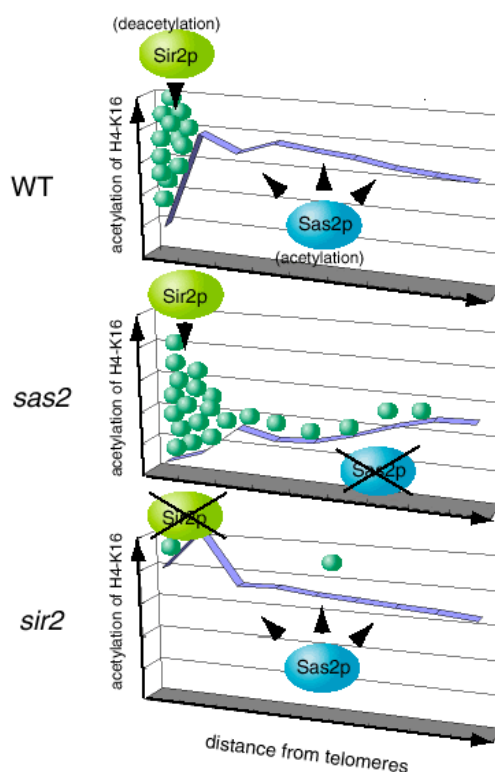


図 1-2

将来への展望、展開可能なシーズ等

テロメアは、がんなどの不死化した細胞や近年作製されているクローン動物などで異常があることが知られている。テロメア周辺の染色体構造の仕組みを明らかにした本研究は、細胞寿命を人為的に制御する応用展開につながるものと期待される。

特許出願

出願 1 件

発 明 者：木村 暁, 梅原 崇史, 堀越 正美

発明の名称：染色体末端構造を制御するヒストンアセチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2002-171823 号

出願年月日：2002 年 6 月 12 日

報告書他

- 1) Kimura, A.; Umehara, T.; Horikoshi, M. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nature Genetics*, 32, 370-377 (2002)
- 2) Ikura, T.; Ogryzko, V.V.; Grigoriev, M.; Groisman, R.; Wang, J.; Horikoshi, M.; Scully, R.; Qin, J.; Nakatani, Y. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 102, 463-473 (2000)
- 3) Kimura, A.; Horikoshi, M. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells*, 3, 789-800 (1998)
- 4) Kimura, A.; Horikoshi, A. How do histone acetyltransferases select lysine residues in core histones? *FEBS Lett.*, 431, 131-133 (1998)

〔研究者名〕 木村 暁、梅原 崇史

2. ヒストンアセチル化酵素とヒストンシャペロンによる染色体末端制御の解明

研究成果の概要

真核生物の染色体末端は、遺伝子発現だけでなくゲノムDNAの複製や修復反応の制御にも重要な役割を担っている。酵母の染色体末端はテロメアと遺伝子発現がサイレンシングを受けるサブテロメアから構成されているが、テロメア近傍の染色体領域がどのように特異的に凝縮するのかについての機構については不明な点が多い。染色体末端の構造的特徴を明らかにするためにヒストン作用蛋白質に対して遺伝学的機能解析を行った結果、染色体末端付近の凝縮には、クロマチン構造変換に関わるヒストンシャペロン CIA が関与していること、さらに染色体末端から離れた領域については MYST 型ヒストンアセチル化酵素とヒストンシャペロンが協調して染色体を脱凝縮させ、サイレンシングを防いでいることを発見した (図 2-1)。

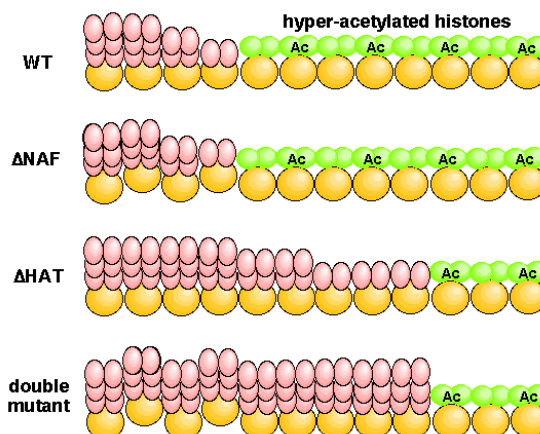


図 2-1

将来への展望、展開可能なシーズ等

テロメア近傍の染色体凝縮に関わる蛋白質は、細胞老化や細胞癌化を制御するターゲットとして有望であり、創薬研究への応用が期待される。

特許出願

準備中

報告書他

- 1) Umehara, T.; Kimura, A.; Horikoshi, M. Independent control of chromosome termini by histone acetyltransferase Sas2p and histone chaperone Cia1p/Asf1p. submitted.
- 2) Kimura, A.; Umehara, T.; Horikoshi, M. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. Nature Genetics, 32, 370-377 (2002)
- 3) Umehara, T.; Chimura, T.; Ichikawa, N.; Horikoshi, M. Polyanionic stretch-deleted histone chaperone cia1/Asf1p is functional both in vivo and in vitro. Genes Cells, 7, 59-73 (2002)

〔研究者名〕 梅原 崇史, 木村 暁

3. 単細胞生物におけるアポトーシス様細胞死の発見

研究成果の概要

出芽酵母ヒストンシャペロン CIA1 の欠損細胞において、核の断片化、クロマチンの分断などが観察され、さらに多細胞生物のアポトーシスの指標である TUNEL 染色陽性 (DNA 断裂)、Annexin-V 染色陽性 (細胞膜の反転)、ミトコンドリアからのチトクロム c の放出が検出された。このように CIA1 欠損細胞では、単細胞生物であるにも関わらず、多細胞生物のアポトーシスに見られる現象が確認された (図 3-1)。またカスパーゼをリクルートするドメイン (CARD ドメイン) と相同の領域を持つ出芽酵母因子 UNI1 を見出し、この因子を出芽酵母内で過剰発現させると、生存率の低下、核の断片化、クロマチンの分断、DNA の断片化、細胞膜の反転、ミトコンドリアからのチトクロム c の放出等が生じることが判明した (図 3-2)。この細胞は、細胞膨潤が確認されるなど部分的に多細胞生物のネクローシス様の表現型も見られたが、アポトーシスの基準を多く満たす細胞死を起こした。また、UNI1 を哺乳動物培養細胞内で過剰発現させたところ、典型的な多細胞生物のアポトーシスの表現型が確認され、染色体 DNA がラダー状に検出された。このことは、出芽酵母因子が出芽酵母、哺乳類細胞共にアポトーシスを誘導する機能を有することを示唆している。さらに、この因子を過剰発現させた大腸菌細胞も増殖が低下し、アポトーシス様の細胞死を起こしていることが示唆された。

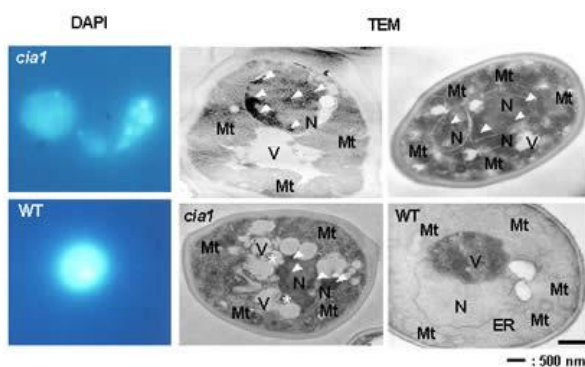


図 3-1

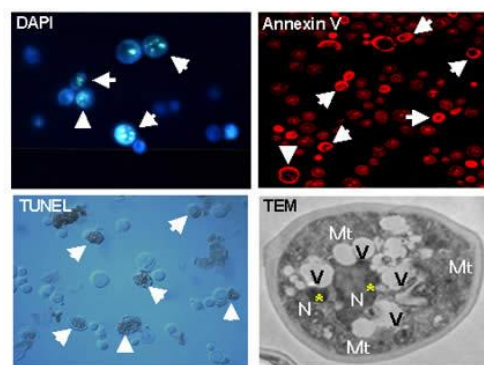


図 3-2

将来への展望、展開可能なシーズ等

新規の細胞死機構の解析を通して、有害細胞に自発的な細胞死を誘導するための薬理化合物のスクリーニングに有効な検定系となることが予想される。特に、真菌類や原核微生物の細胞死誘導剤の開発等に有効であることが予想される。

特許出願

出願 2 件

発 明 者：八巻 真理子, 梅原 崇史, 千村 崇彦, 堀越 正美

発明の名称：哺乳動物細胞の染色体分断と細胞死を促進する酵母蛋白質

出 願 人： 科学技術振興事業団

出願番号：特願 2002-213021 号

出願年月日：2002 年 7 月 22 日

発 明 者：八巻 真理子, 木島 暁子, 堀越 正美

発明の名称：真核細胞と原核細胞の細胞死を促進する因子

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2002-210002 号

出願年月日：2002 年 7 月 18 日

報告書他

- 1) Yamaki, M.; Kijima, K.; Horikoshi, M. Universal cell death promoted by a yeast factor in eukaryotic and prokaryotic cells. submitted.
- 2) Yamaki, M.; Umehara, T.; Chimura, T.; Horikoshi, M. Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes Cells*, 6, 1043-1054 (2001)
- 3) Ikura, T.; Ogryzko, V.V.; Grigoriev, M.; Groisman, R.; Wang, J.; Horikoshi, M.; Scully, R.; Qin, J.; Nakatani, Y. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 102, 463-473 (2000)

〔研究者名〕 八巻 真理子, 木島 暁子, 梅原 崇史

4. ヒストンアセチル化酵素と脱アセチル化酵素の共通モチーフ構造の発見

研究成果の概要

ジーンセクター同士のアミノ酸配列を比較することにより、ジーンセクターの分子内に新しいモチーフ構造を多数発見した。このうち、ヒストンアセチル化酵素 Esa1 およびヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 の両分子に共通する新規モチーフ構造（ER モチーフ）については、このモチーフが両酵素において機能的であることを発見した（図 4-1）。

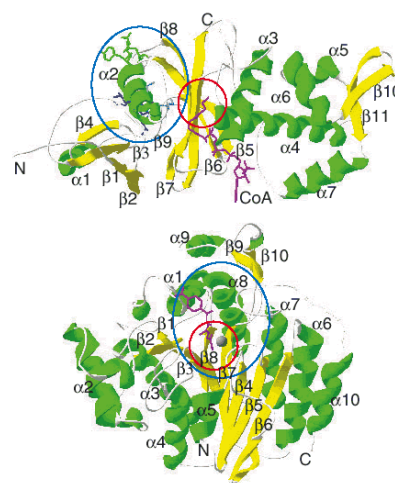


図 4-1

将来への展望、展開可能なシーズ等

ヒストンのアセチル化に関わる酵素だけでなく、広く酵素全般に新しい活性制御法を提供することが予想される。

特許出願

出願 2 件

発 明 者：木村 暁, 梅原 崇史, 堀越 正美

発明の名称：染色体末端構造を制御するヒストンアセチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2002-171823 号

出願年月日：2002 年 6 月 12 日

発 明 者：木村 暁, 安達 成彦, 堀越 正美

発明の名称：タグ付加タンパク質発現ベクター

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2002-292932 号

出願年月日：2002 年 10 月 4 日

報告書他

- 1) Adachi, N.; Kimura, A.; Horikoshi, M. A conserved motif common to the histone acetyltransferase Esa1 and the histone deacetylase Rpd3. J. Biol. Chem., 277, 35688-35695 (2002)

〔研究者名〕 安達 成彦, 木村 暁

5. ヒストンの機能残基とヒストン相互作用因子の発見

研究成果の概要

ヒストンは染色体を構成する基本的な構造蛋白質であるが、この蛋白質が DNA を鋳型とする反応をどのように制御するのかについては不明な点が多い。本研究グループでは、ヒストンのアミノ酸点変異体を包括的に作製・機能解析し、ヒストンが細胞増殖・RNA 転写・クロマチン構造変換などに関わるために必要なアミノ酸を特定化することに成功した（図 5-1）。また、ジーンセクターがヌクレオソーム構造の構築・維持・構造変換に関わる分子機構を明らかにするために、ジーンセクターと遺伝学的に相互作用するヒストン残基変異とヒストン相互作用因子を探索・同定した（図 5-2）。また、ヒストンの 1 アミノ酸の相違を選択的に認識する薬理化合物を発見することに成功した。

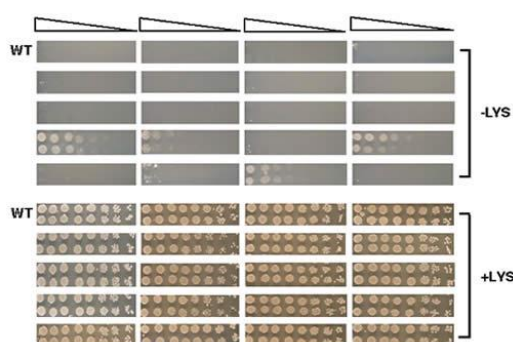


図 5-1

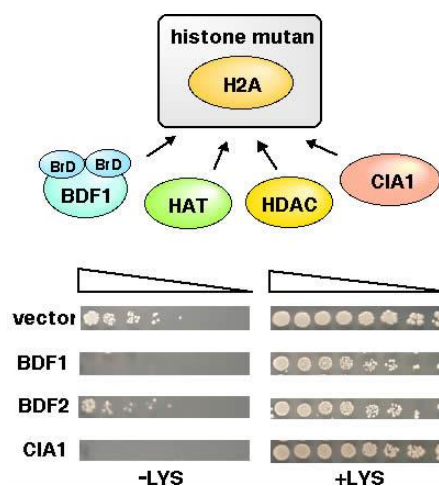


図 5-2

将来への展望、展開可能なシーズ等

保存性の高い核蛋白質を標的とした化合物探索の例はこれまでほとんど例がない。本研究で開発した高保存蛋白質を標的として種選択的な作用を与える化合物の発見方法は、抗菌化合物の探索研究において有意義であると考えられる。また、ヒストンのアセチル化修飾は抗がん化合物の作用点であることも踏まえると、人為的にアミノ酸変異を導入した本手法は、今後新薬のリード化合物探索などの応用的研究に新しい分野を切り拓いたものと言える。

特許出願

出願 2 件

発 明 者：松原和子，梅原崇史，堀越正美

発明の名称：変異酵母細胞と変異型ヒストン H2A および H2B、並びにそれらの用途

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2001-374806 号

出願年月日：2001 年 12 月 7 日

発 明 者：梅原崇史, 松原和子, 堀越正美

発明の名称：ヒストン H3 および H4 の 1 アミノ酸変異タンパク質とその変異細胞、並びに
それらの用途

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2002-96974 号

出願年月日：2002 年 3 月 29 日

報告書他

なし

〔研究者名〕 松原 和子, 梅原 崇史, 木村 暁

6. 新規ヒストンシャペロンの発見

研究成果の概要

CCG1 相互作用因子の 1 種として単離した CIA 蛋白質が新規のヒストンシャペロンであることを見出した (図 6-1)。既知ヒストンシャペロンの中で一次構造上進化的に最も保存された蛋白質である CIA の機能解析を通して、従来ヒストンシャペロンの活性に必要と考えられてきた分子内酸性領域について、CIA では試験管内機能・細胞内機能ともに不必要であることを見出した。(図 6-2)。さらに、転写開始制御の中心的因子である TFIID のサブユニットや DNA 複製開始制御因子のサブユニット等にヒストンシャペロン活性があることを見出した。

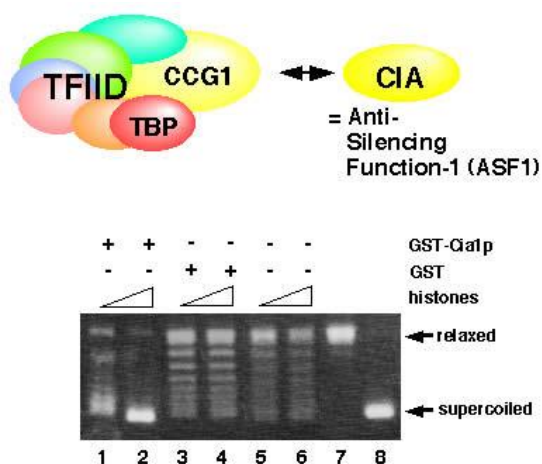


図 6-1

structures of WT and deletion mutants	lethality compensation	histone binding	nucleosome assembly	telomeric derepression
I II III D/E				
WT	+	H3/H4	+++	+++
ΔC1	+	H3/H4	+++	+++
ΔC2	+	H3/H4	++	++
ΔC3	-	-	-	-
ΔC4	-	-	-	-
ΔN1	-	H2A/H2B H3/H4	-	+/-
ΔN2	-	H2A/H2B H3/H4	+	++
ΔN3	-	H2A/H2B H3/H4	+	+
vector/mock	-	-	-	-

図 6-2

将来への展望、展開可能なシーズ等

これらヒストンシャペロン活性を有する蛋白質の機能解析は、分子シャペロンの構造と機能の共通性と多様性を理解する上で重要なテーマである。これら蛋白質の機能・構造解析を進展させることにより、蛋白質（ヒストン）の分子折り畳みの分子メカニズムが詳細に明らかとなり、今後、蛋白質構造を人為的に変換させることにつながると予想される。

特許出願

出願 1 件

発 明 者：梅原崇史, 千村崇彦, 堀越正美

発明の名称：ヌクレオソーム構造を制御する酵母因子とその遺伝子、並びにそれらの利用

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2001-401463 号

出願年月日：2001 年 12 月 28 日

報告書他

- 1) Umehara, T.; Chimura, T.; Ichikawa, N.; Horikoshi, M. Polyanionic stretch-deleted histone chaperone cia1/Asf1p is functional both in vivo and in vitro. *Genes Cells*, 7, 59-73 (2002)
- 2) Chimura, T.; Kuzuhara, T.; Horikoshi, M. Identification and characterization of ASF1/CIA1 as an interactor for bromodomains associated with TFIID. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 99, 9334-9339 (2002)
- 3) Yamaki, M.; Umehara, T.; Chimura, T.; Horikoshi, M. Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes Cells*, 6, 1043-1054 (2001)
- 4) Munakata, T.; Adachi, N.; Yokoyama, N.; Kuzuhara, T.; Horikoshi, M. A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes Cells*, 5, 221-233 (2000)

〔研究者名〕 梅原 崇史, 宗政 歆子

7. ジーンセレクターCIA の三次構造解析

研究成果の概要

CCG1 と相互作用する因子 CIA は、ヒストンシャペロン活性を持つ蛋白質であり、RNA 転写・DNA 複製・DNA 修復の制御や、単細胞におけるアポトーシス様の細胞死の制御に関わる。本グループでは、CIA の立体構造解析を試み、出芽酵母 CIA 蛋白質の結晶作製と X 線結晶回折パターンの取得に成功した (図 7-1)。

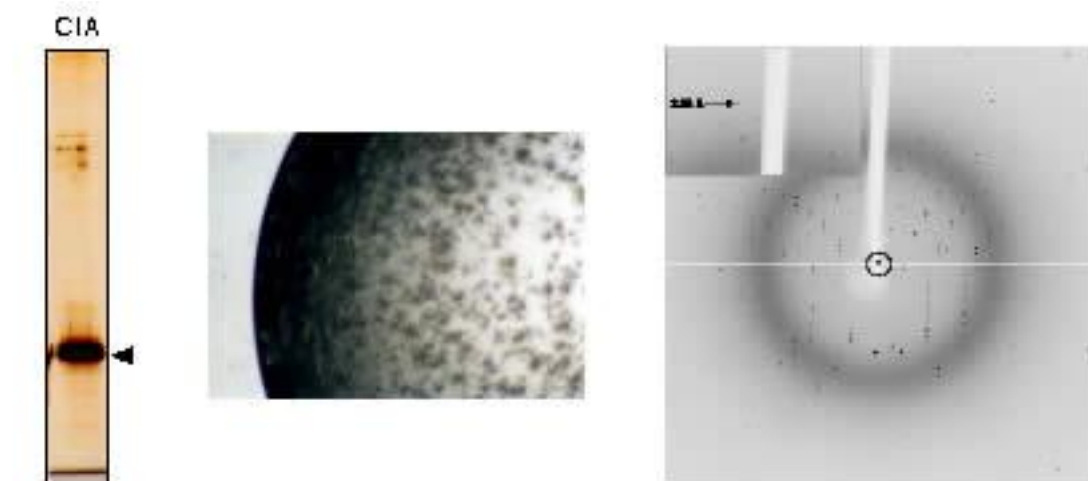


図 7-1

将来への展望、展開可能なシーズ等

CIA は最も保存されたヒストンシャペロンであり、CIA の X 線結晶構造解析は分子シャペロンの構造と機能の共通性と多様性を理解する上で重要なテーマである。この蛋白質の三次元構造を解明することにより、蛋白質 (ヒストン) の分子折り畳みの分子メカニズムが明らかとなり、蛋白質構造変換の人為的操作を目指した応用研究につながる事が予想される。

特許出願

出願 1 件

発 明 者：梅原崇史, 千村崇彦, 堀越正美

発明の名称：ヌクレオソーム構造を制御する酵母因子とその遺伝子、並びにそれらの利用

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2001-401463 号

出願年月日：2001 年 12 月 28 日

報告書他

- 1) Padmanabhan, B.; Kataoka, K.; Adachi, N.; Horikoshi, M. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of yeast nucleosome-assembly factor Cia1p. *Acta Cryst. D*, 58, 1876-1878 (2002)
- 2) Umehara, T.; Chimura, T.; Ichikawa, N.; Horikoshi, M. Polyanionic stretch-deleted histone chaperone cia1/Asf1p is functional both in vivo and in vitro. *Genes Cells*, 7, 59-73 (2002)
- 3) Munakata, T.; Adachi, N.; Yokoyama, N.; Kuzuhara, T.; Horikoshi, M. A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes Cells*, 5, 221-233 (2000)

〔研究者名〕 Padmanabhan, B, 安達 成彦, 片岡 和宏

8. ジーンセレクターCIBの三次構造解明

研究成果の概要

機能未知の蛋白質に対して、その立体構造解析から機能を推定することを試みるため、CCG1 相互作用因子 CIB の X 線結晶構造解析を行った (図 8-1)。その結果、CIB の立体構造が、細菌の α/β ハイドロラーゼの立体構造と類似しているという知見が得られた。さらにこの蛋白質の加水分解酵素活性を検定した結果、CIB が加水分解酵素活性を持つことが判明した。この解析から、CIB は α/β ハイドロラーゼフォールドを有する初めての転写因子と位置づけられた。



図 8-1

将来への展望、展開可能なシーズ等

CIB は加水分解酵素活性を持つ初めての蛋白質であることから、この蛋白質の三次元構造結果を利用することにより、核内における新規加水分解基質化合物の発見や分子デザインにつながる事が予想される。

特許出願 なし

報告書他

- 1) Padmanabhan, B.; Kuzuhara, T.; Horikoshi, M. Crystallization of human CCG1-interacting factor B. J. Crystal Growth, 232, 326-329 (2001)
- 2) Padmanabhan, B.; Kuzuhara, T.; Mizuno, H.; Horikoshi, M. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human CCG1-interacting factor B. Acta Cryst. D, 56, 1479-1481 (2000)

〔研究者名〕 Padmanabhan, B

9. ガンキリン相同因子の三次構造解明

研究成果の概要

細胞周期 G1→S 期は、細胞の増殖、死、分化、癌化を考える上で重要な位置を占める。癌抑制因子 RB には、CDK 抑制因子と同様にアンキリン様構造を持つと考えられるガンキリンが結合するという知見が得られてきたが、その構造と制御的役割は不明であった。本グループでは、ガンキリンの出芽酵母ホモログ Nas6p の立体構造解析を試み、Nas6p の構造を明らかにすることに成功した。Nas6p の構造から、ガンキリンと RB との相互作用を予想してみると、RB のリン酸化される部位が CDK の酵素活性中心側にあることが示唆され、三者間の相互関係を初めて立体構造レベルによって予想した。この知見は、CDK の RB へのリン酸化がどのように特異的制御を担っているかという疑問に対する解答を示唆しており、細胞周期 G1→S 期における CDK、RB、およびガンキリンとの対応関係を説明する端緒となった (図 9-1)。

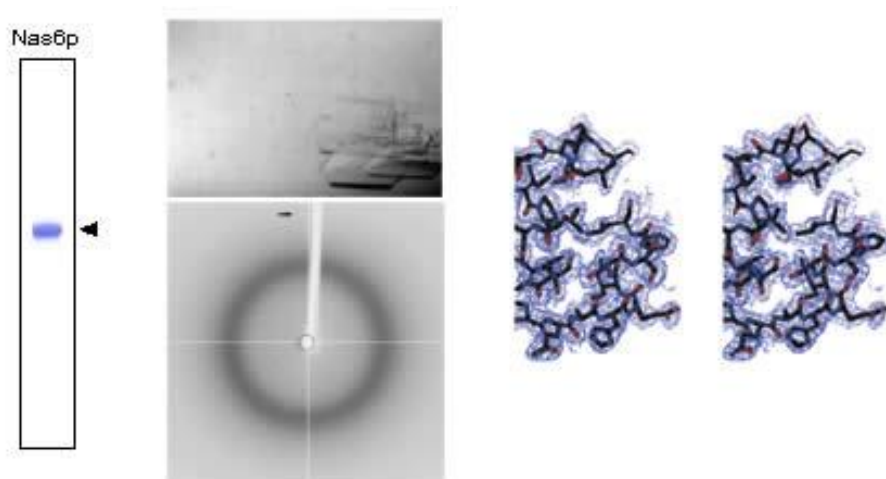


図 9-1

将来への展望、展開可能なシーズ等

細胞増殖を制御する癌抑制因子の作用メカニズムを解き明かすことにつながることから、抗がん作用活性を有する薬剤の開発等に有用性を発揮すると期待される。

特許出願 なし

報告書他

- 1) Adachi, N.; Padmanabhan, B.; Kataoka, K.; Kijima, K.; Yamaki, M.; Horikoshi, M. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of yeast regulatory particle non-ATPase subunit 6 (Nas6p). *Acta Cryst. D*, 58, 859-860 (2002)

〔研究者名〕 Padmanabhan, B, 安達 成彦, 片岡 和宏

10. DNA 結合因子とクロマチン構造変換因子の相互作用解析

研究成果の概要

クロマチンの構造変換反応には、DNA 結合因子とクロマチン構造変換因子との協調的な作用が重要であることを、転写調節因子とヒストンアセチル化酵素の機能解析実験から明らかにした。また DNA 結合性転写調節因子群とヒストンシャペロン間の分子間相互作用に特異性が見られることを明らかにした。

将来への展望、展開可能なシーズ等

クロマチン構造変換に関わるジーンセレクター間の作用メカニズムの理解を通して、染色体レベルからの遺伝子発現の制御機構が明らかになるだけでなく、クロマチン構造変換機構を利用した細胞機能の人為的な調節が可能になることが予想される。

特許出願

出願 1 件

発 明 者：梅原崇史, 千村崇彦, 堀越正美

発明の名称：ヌクレオソーム構造を制御する酵母因子とその遺伝子、並びにそれらの利用

出 願 人：科学技術振興事業団

出願番号：特願 2001-401463 号

出願年月日：2001 年 12 月 28 日

報告書他

- 1) Suzuki, T.; Miyamoto, S.; Munemasa, Y.; Muto, S.; Aizawa, K.; Horikoshi, M.; Nagai, R. Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the nucleosome assembly factor TAF-I. submitted.
- 2) Suzuki, T.; Kimura, A.; Nagai, R.; Horikoshi, M. Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells*, 5, 29-42 (2000)

〔研究者名〕 武藤 真祐, 木村 暁, 長谷川 聡

11. ジーンセレクターによる発生制御機構の解明

研究成果の概要

線虫においてジーンセレクター遺伝子の変異解析実験を通して、ジーンセレクターが多細胞生物の個体発生や生殖腺などの器官形成、細胞分化過程の制御に関与することを見出した。

将来への展望、展開可能なシーズ等

線虫モデル生物の解析を通して、ジーンセレクターがヒトを始めとする多細胞生物の発生を制御する機構が明らかにされることが期待される。

特許出願

なし

報告書他

なし

〔研究者名〕 木島 暁子, 早川 智英