

「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】

分裂酵母内でGFP融合タンパク質として発現させたときに核外輸送されるタンパク質を分裂酵母ゲノムライブラリーからゲノム全体の約1/3についてスクリーニングし、36株のポジティブクローンを得た。また、核外輸送の調節によって核タンパク質の局在が制御されるものを解析し、分裂酵母Pap1およびマウスBach2が酸化ストレスによって核外輸送が損なわれ核移行することを明らかにした。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を合成し、その構造活性相関を明らかにするとともに、これらがHDAC6に比べHDAC1に強く作用することを明らかにした。さらにアセチル化リジン含有ペプチドを抗原として用いてアセチル化ヒストンと強く反応する抗アセチルリジンモノクローナル抗体を作製した。

【今後の見通し】

ライブラリーからのスクリーニングには限界がある。そこで本年中にゲノムプロジェクトが終了すると考えられる分裂酵母のゲノムORFをすべてクローン化し、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の解析のため、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、非ヒストン蛋白に対してより反応性の強い抗体の取得を試みる。

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) 分裂酵母新規核外輸送タンパク質の解析

分裂酵母内で核外輸送されるタンパク質を網羅的に解析するため、分裂酵母のゲノム-GFPライブラリーを導入した酵母からレプトマイシンB (LMB) に応答して核内蓄積するものをスクリーニングした。ゲノムDNAの部分消化断片をフレームの異なる3種類のGFP発現ベクターに連結して作製されたライブラリーのうちの1つについて全ての形質転換株でのタンパク質の局在とLMB応答性を観察した結果、LMB処理によって核局在性が高まるものとして32種類の独立のDNA断片を取得した。そのうちの8種類の遺伝子については、ORF全長をクローン化して詳細な解析を行っているところである。

(2) 核外輸送の調節によるタンパク質局在性の制御

特定のタンパク質の核外移行の活性が細胞周期や刺激応答などによって低下し、核移行する例が知られている。そのような例の1つとして酸化ストレスによる転写因子の核移行について解析した。分裂酵母転写因子Pap1とマウス転写抑制因子Bach2は酸化ストレスに応答して核移行する。そのメカニズムをLMB処理、点変異導入などにより解析したところ、Pap1, Bach2いずれもC末端に存在する細胞質局在ドメインにLMB感受性の核外輸送に必要な配列が存在することがわかった。これらの配列中には、核外移行活性に必須のシステイン残基が存在し、マレイン酸ジエチルなどの酸化剤とこのシステイン残基が直接反応する可能性が示唆された。

(3) 新規脱アセチル化阻害剤CHAPの合成とその構造活性相関

強力なヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤であるTrapoxin A, B, Cyl-1, 2, Chlamydocin, WF3161等は、活性に必須のアミノ酸としてAoe ((2S,9S)-2-amino-8-oxo-9,10-epoxydecanoic acid)を含む環状テトラペプチドである。ヒストンデアセチラーゼ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、その構造活性相関を検討した。その結果、側鎖の長さは基質アセチルリジンと

同じ5が最も優れ、活性基としては酵素の活性中心亜鉛とのキレート活性を持つヒドロキサム酸、レトロヒドロキサム酸、ヒドラジドおよびメルカプトアニリド等を有するものにHDAC阻害活性が認められたが、ヒドロキサム酸の活性が最も強かった。また、各種HDACアイソザイムに対する活性を評価したところ、TSAがどのアイソザイムについても強く阻害するのに対し、CHAPIはいずれもHDAC1に対して強い一方でHDAC6に対しては弱く、選択的な阻害剤であることが判明した。

(4) 抗アセチルリジンモノクローナル抗体の作成

抗原としてKLHにコンジュゲートさせたGly-Lys (Ac)-Acp-Cys (Acp: アミノカプロン酸)を用い、マウスを免疫してアセチル化リジンを含むペプチドと強く反応するクローンを得た。作製した抗体の性能は、アセチル化ヒストン画分に対する反応性 (Western blot)、種々のアセチルリジン含有ペプチドに対する反応性 (ELISA)、免疫沈降したアセチル化p53分子に対する反応性、全細胞抽出物に対する反応性等により評価した。その結果、ペプチドに対する反応性では、隣接アミノ酸の種類によらず広い反応性を示すことが確認されたが、Western blotによる評価の結果、アセチル化ヒストンに対して非常に強い反応性を示す一方、天然非ヒストンタンパク質への反応性は弱いことがわかった。

【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、今回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て興味深いクローンが数個得られた。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、ORF全長をコードしているわけではない。また、得られたクローンの中には相当数の重複した遺伝子が含まれていた。今後こうした問題点を克服するためには、本年度中に終了すると予想される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することが望ましいと考えられる。今回アセチルリジンを抗原に得られたモノクローナル抗体は、アセチル化ヒストンを強く認識し、ヒストンアセチル化をモニターするのに有用なものであった。しかし、非ヒストンタンパク質のアセチル化に対しては反応性が弱かったので、より広範なアセチル化タンパク質をスクリーニングする本研究の目的のためには、アセチルリジンの周辺配列も考慮に入れた新たな抗原作製、抗体調整を行う必要がある。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Yoshida, M., and Horinouchi, S. Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 886: 23-36,

1999.

Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I B controls cytoplasmic localization of the inactive NF- B/I B complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 1014-1019, 2000.

Callanan, M., Kudo, N., Gout, S., Brocard, M.-P., Yoshida, M., Dimitrov, S., and Khochbin, S. Developmentally regulated activity of CRM1/XPO1 during early *Xenopus* embryogenesis. *J. Cell Sci.*, 113: 451-459, 2000.