

# ゲノムの機能を制御する核内因子の局在と修飾に関する 化学遺伝学的研究

吉田 稔 (CREST・東京大学大学院農学生命科学研究科)  
西野憲和 (九州工業大学)、小松靖彦 (ジャパンエナジー)

蛋白質の核への局在や核蛋白質の翻訳後修飾は、増殖・分化・ストレスなどの刺激に応答した核／ゲノム機能の制御に重要な役割を担うと考えられる。なかでも核外移行シグナル (NES) による蛋白質核外移行や核蛋白質のアセチル化は最近知られるようになった制御機構であり、我々はこれらが核内シグナル伝達においてきわめて重要な役割を果たしているかと推定している。そこでそれを検証するため、NESを持つ、あるいはアセチル化を受ける核蛋白質を網羅的に同定し、個々の機能を解明することによってゲノムの機能制御にアプローチしようと考えた。

## (1) 分裂酵母全ゲノム ORF の GATEWAY 法によるクローン化

我々はモデル生物として分裂酵母を選び、可逆的なアセチル化を受ける蛋白質、能動的に核-細胞質間をシャトルする蛋白質の網羅的解析を目指した。クローン化に当たっては、ORF ごとに組換え反応で目的のベクターに移し替えが可能な GATEWAY 法を用いることにした。現在、分裂酵母ではゲノム計画がほぼ最終段階を迎えており、全ゲノムの約 95% 程度が解読されている。この情報はインターネット上に公開されているため、それらの情報を解析し、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た。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っている。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ている全遺伝子の約 6 割について正しい ORF がクローニングされていることを確認した。今後これらの遺伝子を酵母内で GFP 融合蛋白質として発現させ、その局在を解析するとともに抗アセチル化リジン抗体を用いたウェスタンブロットティングにより、アセチル化蛋白質を同定していく予定である。

## (2) アイソザイム特異的ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の合成と特異的基質の同定

ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) は複数のアイソザイムが存在し、それぞれ異なった機能を持つと考えられる。HDAC 阻害剤としては、演者らが発見したトリコスタチン (TSA)、トラポキシシン (TPX) をはじめいくつかの阻害剤が知られているが、アイソザイム間の特異的阻害剤は知られていない。そこでまず HDAC1, 2, 4, 6 について組換え酵素を作製し、既存の HDAC 阻害剤と新たに合成した TSA/TPX ハイブリッド阻害剤 CHAPs の特異性について検討した。その結果、TSA はいずれの酵素に対しても強く阻害するのに対し、TPX は HDAC1, 2 および HDAC4 を非常に強く阻害する一方、HDAC6 をほとんど阻害しなかった。TPX は側鎖のエポキシケトン基を介して酵素と共有結合すると考えられるが、阻害可逆性の実験から TPX は HDAC6 に対しては結合できないことが判明した。また、CHAP の多くは HDAC6 に対して弱く、TSA に比べて大きなキャップ構造がその特異性の要因になっていることが示された。こうした著しい選択性の差を利用して HDAC6 の細胞内基質の同定が可能になると考え、新規に調製した抗アセチル化リジン抗体を用いて TSA によって著しくアセチル化が蓄積し、TPX では全くアセチル化が促進されない蛋白質をいくつか見いだした。これらの蛋白質は HDAC6 の生理的な細胞内基質であると考えられ、最も主要な HDAC6 基質蛋白質を同定したので報告する。

### (3) 温度感受性 p53 の細胞内局在制御機構

我々はレプトマイシン B (LMB) 耐性遺伝子として取得された CRM1 がその標的分子であることをすでに示したが、これを用いることにより蛋白質核-細胞質間輸送における核外移行の役割を簡便に調べることが可能となった。がん細胞においてしばしばがん抑制蛋白質 p53 の細胞質局在がみられるが、そのメカニズムは不明な点が多い。温度感受性変異型 p53 は 32°C で野生型として核で機能するが、37°C では変異型として細胞質に局在する。この細胞質局在は、従来細胞質でのアンカーによるものと考えられてきた。ところがこの変異型 p53 は LMB 処理すると 37°C で核へ移行し、自身の核外移行シグナル (NES)、核移行シグナル (NLS) によって細胞内局在が規定されることが示された。37°C で LMB によって核外移行を阻害した際の核移行は 32°C の時に比べて約 6 倍遅かったこと、p53 と核移行受容体との結合が減少したことから、37°C では NLS がマスクされていることが示された。p53 の C 末端 60 アミノ酸残基を除去すると核移行受容体との結合が回復したことから、この NLS マスクには自身の C 末端領域が関与する。37°C で変異型 p53 はシャペロン複合体と結合しているが、核外移行を阻害すると Hsc70 を含まない複合体が核に蓄積する。*in vitro* 合成系を用いて実験系から Hsc70 を除去した場合、37°C でも核移行受容体と p53 との結合は回復するが、ここに組換え Hsc70 を添加しても結合阻害はみられなかった。以上より 37°C では Hsc70 に結合する因子が p53 の C 末端領域と協調して変異型 p53 の NLS をマスクし、その結果細胞質に局在していることが示された。

#### 参考文献

1. Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. & Horinouchi, S. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9112-9117 (1999).
2. Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M. & Horinouchi, S. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 87-92 (2001).
3. Akakura, S., Yoshida, M., Yoneda, Y. & Horinouchi, S. A role for Hsc70 in regulating nucleo-cytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53<sup>Val135</sup>). *J. Biol. Chem.* (in press, 2001).