

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名「核内因子の局在と修飾に関する化学遺伝学的研究」

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 吉田 稔（理化学研究所 主任研究員）

主たる研究参加者

西野 憲和（九州工業大学大学院生命体工学研究科 教授）

小松 靖彦（株式会社 先端生命科学研究所 主任研究員）

五十嵐 和彦（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）

堀之内 末治（東京大学大学院農学生命科学研究科 教授）

H14年度のみ参加

### 3. 研究内容及び成果：

遺伝子から転写・翻訳を経て作られた蛋白質は翻訳後、修飾を受け、ある特別の機能を持った分子へ変換される場合が多いが、吉田グループの核内因子の局在と修飾に関する化学遺伝学的研究は、この修飾のメカニズムおよび細胞内への局在に関する分子メカニズムを追求することを目的としている。吉田グループの成果を箇条書きでまとめると、以下のようになる。

(1) 吉田グループは、既にレプトマイシン B(LMB)が蛋白質の核外移行を阻害することを明らかにしたが、分裂酵母をモデル生物として蛋白質核外輸送を網羅的に解析した。本プロジェクトは、一時平岡グループとの一部共同研究として遂行されたが、吉田グループは分裂酵母のゲノムプロジェクトの情報を活用し、すべての完全長 ORF のクローン化を行うことを計画し、これを完成させるによって全ゲノム遺伝子産物の細胞内の局在情報をカタログ化、更に LMB を用いることにより、核外移行シグナル受容体(CRM1) 依存的な核外輸送蛋白質の同定をした。更に、他の輸送因子を用いる蛋白質についてもそれぞれの破壊株で全遺伝子を発現させ、発現パターンを野生株と比較することによりそれら蛋白質の同定を行った。この解析によりアセチル化、メチル化、ユビキチン化などの蛋白質修飾、蛋白質間相互作用、低分子と蛋白質の相互作用など、プロテオミクスの研究にも発展することが可能になった。まず、分裂酵母のゲノム ORF 全長クローン化であるが、最終的には全遺伝子の 98%以上の 4,838 個の遺伝子についてクローン化した。これらの全ゲノム ORF クローンライブラリーを分裂酵母内で発現させた形質転換体を作製した。これらのクローンは、その形質発現体における細胞内局在を可視化するために YFP 融合蛋白質として発現させているが、顕微鏡下の観察により、それらの細胞内における局在性が大部分のクローンについて判明した。これらのクローンの局在情報は個々のクローンの配列情報、機能情報と併せて総合的なデータベースとして整理した。さらに、局在性が認められたすべての形質転換について LMB を用いて核蛋白質の細胞内位置を観察し、約 270 の蛋白質について LMB によって細胞内局在に変化が見られたことから、これらの蛋白質は LMB に感受性のある核外移行メカニズムによって細胞内の特定位置に局在化することが判明した。(2)これらの LMB に感受性のある核外輸送蛋白質の解析により、約 30 以上もの蛋白質が核内の紡錘体様微小管に集積することが明らかになった。これに関して、チューブリンそのものの細胞内局在変化を観察した結果、チューブリンは M 期開始時と同時に LMB 添加後、速やかに核に移行し、核内で紡錘体様の束状微小管を形成することが明らかになった。これらのことは、チューブリンの細胞質局在を維持し、核内での微小管の重合を防ぐ機構が存在していることを強く示唆している。(3)吉田グループは、分裂酵母の全 ORF 産物に FLAG-His6 タグを融合させたライブラリーを作製し、個別にゲノムに導入した株を樹立した。これらの株から蛋白質を抽出し、ウェスタンブロットにより解析し、これらの蛋白質の電気泳動における泳動度をデータベース化した。各遺伝子産物(4,352 遺伝子)として、またこれらの蛋白のうちアセチル化またはメチル化されている蛋白質も同定した。(4)吉田グループは、アセチル化の生物学的意義を明らかにするため、動物細胞におけるアセチル化蛋白質の同定を試みた。そのために細胞を HDAC 阻害剤、トリコスタチン(TSA)で処理し、その細胞抽出液を抗アセチル化リジン抗体で処理し、アセチル化

蛋白質の検出を試みた。COS7 細胞において得られたアセチル化蛋白質を LC-MS/MS 解析によって同定したところ、従来知られていないアセチル化蛋白質を発見し、これらの蛋白質について蛋白質のアセチル化部位も同定した。吉田グループは、バイオプローブ設計グループと共同で HDAC 阻害剤の特異性の検討も行った。その結果、HDAC6 の阻害剤の感受性は、阻害剤の種類によって大きく異なることを見出した。(5) 吉田グループは、また動物細胞において核外に輸送される蛋白質のうちで酸化ストレスに応答する核外移行活性を持つ転写制御因子 (Bach2) が HDAC 4 とともに局在し、核内においてある種の構造体を形成することを見出した。この複合体をさらに様々な角度から解析したところ、この複合体はクロマチン上の遺伝子の発現を抑制するための機能を持っている可能性があることを強く示唆する実験結果が得られた。(6) 吉田グループは、また転写制御に影響を与える2種の化合物 FK228 と FR901464 の作用機構に関する研究を行った。まず、FK228 は HDAC を阻害することが明らかになったが、その作用機構は TSA など従来の HDAC と異なることが判明した。また、FR901464 は HDAC を阻害せず、mRNA の成熟機構に作用することが明らかになった。(7) 吉田グループは、10 種類あるとされている HDAC のサブタイプ蛋白質の個々の酵素の活性を測定するのに有用な新しい HDAC の阻害剤についてバイオプローブ設計グループと共同研究を行った。その結果、いくつかの阻害物質がある種の HDAC のサブタイプにより強く反応することが見出されたので、これらの HDAC 阻害剤を使うことにより HDAC サブタイプの活性阻害を通じ、これらの HDAC サブタイプがどのような役割を果たしているか解明できる道筋が得られたと推定される。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

吉田グループは、分裂酵母のゲノムデータに基づいて予想された遺伝子のほとんどすべてをクローン化した。この成果について事後評価において高い評価が与えられた。吉田グループが従来から興味を持っていた核内蛋白質のアセチル化・脱アセチル化など修飾のメカニズムについて多くのその蛋白質の網羅的解析を行い、多くの成果を得られたことも一様に評価された。このように吉田グループの成果について概して高い評価が与えられたが、今後の研究について期待はするものの、まだこの段階で吉田グループの研究成果が将来バイオサイエンス・バイオテクノロジーにどのようなインパクトを与えるかについては、まだ未知の点が多いというコメントもあった。

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

吉田グループの分裂酵母全ゲノム ORF クローニングは、既に出芽酵母において同様な成果が出されていたとは言え、今後の研究への貢献は極めて大きいと考えられる。特に、分裂酵母はヒトなど哺乳類細胞と類似点が多い為、これらのクローンはヒト疾患遺伝子の機能を研究するためにおいても有効であることが期待される。また、本分裂酵母における遺伝子のクローニングは、GATEWAY 法に基づいているが、これはそれ以外の発現ベクターへ移行可能な点において有用性が高い。出芽酵母において既に同様な報告がなされたとは言え、吉田グループの細胞内蛋白質局在情報は質的レベルの極めて高いものである。また、核外輸送蛋白質の網羅的解析は核外移行阻害剤を用いることにより、200 以上の核外移行蛋白を同定したが、これは世界的に見て新しい同定方法であり、その成果が高く評価される。他にも吉田グループは細胞内蛋白質の網羅的な電気泳動の挙動をデータベース化、 $\alpha$ -チューブリン脱アセチル化酵素の発見など独自の研究成果を挙げていることは高く評価されよう。

##### 4 - 3. その他の特記事項(受賞歴など)

なし