

独立行政法人理化学研究所
主任研究員

吉田 稔

「 核内因子の局在と修飾に関する
化学遺伝学的研究 」

研究期間：平成 1 1 年 1 1 月 1 日～平成 1 7 年 3 月 3 1 日

1. 研究実施の概要

【基本構想】

遺伝子から転写・翻訳を経て細胞質で合成された蛋白質は、それぞれが機能する場所へ移行し、機能を果たす。そのような細胞内局在の決定機構には、蛋白質の一次配列や立体構造の情報に規定されたシグナルが存在し、それによって正しい細胞内コンパートメントへ輸送されるものと考えられている。また、正しい位置に局在化した蛋白質は合成されたときのままではなく、さまざまな翻訳後修飾を受けて最終的な機能分子へと変換されるものが多い。さらに、蛋白質は常に同じ場所に局在し続けるのではなく、増殖刺激やストレスに応答してその存在位置を変化させ、速やかな細胞応答を可能にしている。こうした制御にはやはり蛋白質の持つシグナル配列や翻訳後修飾が重要な働きをすると考えられている。

本研究では、これらの蛋白質局在や修飾に関するものの中から特に最近になって明らかになってきた蛋白質の核外輸送とアセチル化に焦点を当て、それらが果たす役割を網羅的に解析し、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ことを目標に掲げた。そのため、すでに研究代表者らが発見、解析を行ってきた蛋白質核外輸送阻害剤レプトマイシン B (LMB)、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤トリコスタチン A (TSA)、トラポキシシン (TPX) などを活用するとともに新たに独創的な研究手法を可能にするための新しいバイオプローブや抗体の作製とそれら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ことを計画した。

【材料及び成果】

生物材料としては、本研究開始当時ゲノムプロジェクトが進行中であった分裂酵母と培養動物細胞の両方を用いることとした。また、化学的な材料としては、2 種の異なる HDAC 阻害剤トリコスタチン、トラポキシシンのハイブリッド型阻害剤である CHAP などの環状テトラペプチド誘導体の設計合成や蛍光性 HDAC 基質の開発を中心に新たなバイオプローブの合成、さらにはアセチル化リジン、メチル化リジン抗体の作製などを行った。

まず、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分裂酵母ゲノム全 ORF のクローン化を試みた。GATEWAY 法を用いることによってさまざまな発現ベクターへの挿入を可能にしたクローンを全体の 98% 以上について取得し、全ての塩基配列を確認した。それぞれの遺伝子について、YFP 融合蛋白質の細胞内局在の決定を行い、蛋白質局在データベース (Localizome) の作製を行なった。この情報に基づき、全ての発現蛋白質について、核外輸送阻害剤 LMB によって細胞内局在が変化するかどうかの解析を行い、ゲノム全体の約 5.5% にあたる約 270 の遺伝子産物を同定した。これらの蛋白質の解析から、いくつかの微小管結合蛋白質が核移行し、核内で紡錘体様構造に集積することがわかり、これをきっかけに分裂酵母において微小管構成蛋白質であるチューブリンが LMB 処理によって核内に蓄積し、強固な細胞質型の束化微小管を形成することが明らかになった。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個別に全蛋白質を調製し、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「Mobilitome」と命名した。さらに、これらの蛋白質中でアセチル化やメチル化を受ける蛋白質を抗体によるウェスタンブロット法によって網羅的に明らかにした。

一方、動物細胞を用いた解析からは、各種阻害剤処理細胞からアセチル化リジン抗体による免疫沈降、2次元電気泳動、質量分析解析などにより、新たなアセチル化蛋白質として SV40 large T 抗原、CPSF5 などを同定し、既知のアセチル化蛋白質である α -チューブリンを含めてそれらの脱アセチル化に関わる酵素を同定した。その結果、 α -チューブリンの脱アセチル化酵素が HDAC6 であること、アセチル化によって微小管の機能が制御されることを見出した。HDAC6 は分子内に2つの HDAC ドメインと1つのユビキチン結合ドメインを持つユニークな酵素であるが、その HDAC 活性とユビキチン結合活性に依存して増殖因子受容体のエンドサイトーシスを負に制御することを明らかにした。興味深いことに HDAC6 をノックダウンすると EGF 受容体のエンドサイトーシスが亢進し、ダウンレギュレーションされた。別のクラス II の HDAC の一つである HDAC4 については、酸化ストレスに応答する転写抑制因子 Bach2 と転写共役抑制因子 SMRT を介して強く結合するとともに核内でフォーカスを形成することを見出した。この複合体はさらに酸化ストレスに応答して PML body へと移行し、ローカルな転写を抑制することを明らかにした。この PML body への局在化には、Bach2 が SUMO 化修飾を受けることが重要であること示された。一方、Bach2 に近縁の Bach1 はヘム分解に関わる遺伝子発現を抑制する転写抑制因子であるが、その調節機構は不明であった。本研究では、Bach1 はヘムと結合したときにのみ強く核外輸送される蛋白質であり、その核外移行活性にはヘム結合ドメインが必須であることが明らかにした。すなわち、ヘム依存性の核外移行シグナルの存在をはじめて見出すことに成功するとともにその意義としてヘム存在下では Bach1 が核外に輸送されて転写抑制が解除され、ヘムの分解系を誘導する働きを有することを示している。

化学的なアプローチからは、環状テトラペプチド骨格に活性基としてエポキシケトンを含む HDAC 阻害剤である TPX の化学的に不安定なエポキシケトンを TSA が持つ安定な亜鉛キレート構造であるヒドロキサム酸に変換したところ、強力に安定な新しい HDAC 阻害剤 CHAP を創製することに成功した。また、作用機構が不明であった抗癌剤 FK228 が細胞内で活性化される新しいタイプの HDAC 阻害剤であることを見いだした。FK228 の活性基は、分子内のジスルフィドが細胞内の還元力によって還元されて生ずるチオールであることがわかった。このことを利用し、TPX のエポキシケトンをチオールに変換した新しい HDAC 阻害剤 SCOP の創製にも成功した。SCOP は2分子がジスルフィド結合することでホモダイマーとして、また、他のチオール基を持つ分子と結合することでヘテロダイマーを形成させることができ、これらはいずれも FK228 と同様、細胞内の還元力で活性化されるタイプのプロドラッグとして機能することが明らかになった。さらにヒドロキサム酸やチオールに代わる活性基として、レトロヒドロキサム酸、フェニレンジアミン、トリフルオロメチルケトンなどが強い HDAC 阻害活性を付与することのできるものであることを明らかにし、新たな阻

害剤開発の基盤を完成した。一方、基質ペプチドの C 末端に 7-アミノメチルクマリンをアミド結合させることにより、HDAC の蛍光性基質の創製にも成功した。これらは、HDAC の機能解析にきわめて有効なバイオプローブとなった。蛋白質上で生じるアセチル化、メチル化といった化学修飾の検出法としては、周辺配列に依存しないモノクローナル抗体がきわめて有効である。本研究ではこれらを初めて取得することに成功し、修飾蛋白質の網羅的解析への道を開き、実際本研究で発見された多くの新規修飾蛋白質の同定に用いられた。

2. 研究構想

【当初目標と計画】

膨大な遺伝情報を包含するゲノムの機能が正確にかつタイムリーに発現するためには、ゲノム DNA が収納される核と染色体そのものの構造と機能の制御が重要であることはいうまでもない。例えば、外界の刺激に応答して特定の遺伝子発現が行われる場合、細胞膜から細胞質に伝達されたシグナルは最終的にシグナル伝達分子の核移行により核内へ伝えられるが、核膜を乗り越えて蛋白質が往来するためにはエネルギー依存的な輸送システムが必要である。多くの重要な制御因子は核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) の両方を持ち、核内外をシャトルする。最近、このような外界の刺激やシグナル伝達に依存的した蛋白質核移行の分子機構において刺激に応答した核外輸送の阻害という新しいメカニズムが注目されている。さらに核内へ伝えられたシグナルは、直接または間接的に標的遺伝子のプロモーター活性を制御すると考えられているが、原核生物における単純なモデルと異なり、真核生物のゲノムではヌクレオソーム構造とさらなる高次構造をとるために遺伝子発現調節を理解する上でクロマチンの構造調節の理解が不可欠である。遺伝子発現に先立つクロマチン構造変化の最も重要な制御の一つにヒストンアセチル化がある。転写因子によってリクルートされたコアクチベーターはヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を有し、発現されるべき領域のヒストンをアセチル化する。

一方、転写抑制因子によってヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がリクルートされ、領域特異的な脱アセチル化が誘導される。こうして特異的に転写された RNA 分子は未同定のガイド蛋白質により核膜孔を通過して細胞質へと運ばれる。さらに役割を終えたシグナル伝達分子は、細胞質へリサイクルされると考えられるがこの機構にも NES が重要な役割を果たしていると考えられる。このように刺激や細胞周期に応答した遺伝子発現調節には、NLS や NES による蛋白質の核への局在性の制御とリン酸化・アセチル化のような蛋白質修飾が重要な役割を果たしていると考えられる。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と推定してきた。そこで研究開始当初の目標としては、核外移行と蛋白質アセチル化の重要性を検証するため、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。

本研究は以上のような背景と着眼点に基づき、核内因子の局在調節とアセチル化の意義の解明を研究の中心におくこととした。具体的には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 B、HDAC 阻害剤、抗アセチル化リジン抗体、各種機能性合成ペプチドなど独自の生化学プローブを用いる独特の方法によって検索し、それらの機能を遺伝子破壊、過剰発現、変異解析、阻害剤開発などの手法により明らかにすることを計画した。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については、分裂酵母のゲノム情報を活用することを計画し、当初の数年間にゲノムにコードされる ORF をすべてクローン化し、

それらを蛍光蛋白質として発現させ、その局在を網羅的に解析することを第一の目標とした（核外移行及び機能解析グループ）。並行してアセチル化リジン、メチル化リジンに対するモノクローナル抗体（蛋白質アセチル化解析グループ）、新たな特異性を有する脱アセチル化酵素阻害剤の設計合成（バイオプローブ設計グループ）を行うことで修飾蛋白質の網羅的スクリーニングの準備を進めることとした。

【研究の進展と新展開】

研究提案採択後に分裂酵母全遺伝子のクローン化に関する方法を十分に検討した結果、インビトロジェン社の GATEWAY システムが最適と判断したため、すべての ORF を一旦エントリークローンとして得た後、これを組み換え反応で蛍光蛋白質 YFP と融合発現できるベクターに導入することとした。GATEWAY 法を用いると組換え反応により他の発現ベクターへの変換も容易である。そのおかげで蛍光蛋白質のみならず、他のタグ（Flag-His6 等）との融合蛋白質も同様の方法で発現させることができるようになり、これを用いて全遺伝子産物を本来のサイズのままウェスタンブロットによって解析することが可能となった。そこで全遺伝子産物の電気泳動上の位置、アセチル化、メチル化の修飾の有無を決定することを新たに計画した。さらにプロジェクト中盤からは HDAC4 が SMRT を介して転写抑制因子 Bach2 ととともに核内フォーカスに共局在することを見出したので、新たにこの構造体形成の意義とアセチル化等との関連を明らかにするため、核内小構造解析グループを新たに設定して機能解析を開始した。

本研究推進の過程で、HDAC6 が CRM1 依存的な核外移行によって細胞質に局在し、 α -チューブリンの脱アセチル化をすること、Bach1 がヘム結合と Crml に依存した核外移行を受けることなど、当初予想もしなかった核外移行とアセチル化の関連が明らかになり、それらの機能解析が本研究後半の重要なテーマとなった。

本研究の成果は将来、ゲノム機能の人為的制御や翻訳後修飾の異常に起因する疾病への治療法へつながる可能性があると考えている。

3. 研究成果

3. 1 核外移行及び機能解析グループ

(1) 研究内容及び成果

1) 分裂酵母全 ORF のクローン化と蛋白質細胞内局在の決定

核外移行及び機能解析グループは放線菌の生産する抗腫瘍活性物質レプトマイシン B (LMB) が蛋白質核外移行シグナル (NES) 受容体 CRM1 と直接結合し、CRM1 依存的な核外移行を阻害することを明らかにしたことを契機に、分裂酵母をモデル生物として蛋白質核外輸送の重要性を網羅的に解析することを目指した。研究プロジェクト応募段階の計画では、平岡泰博士と共同し、ランダムなゲノム DNA 断片と GFP を融合したライブラリーを利用した解析を行う予定であった。しかし、本研究の目的には完全長 ORF を持つライブラリーが望ましいことから、当時進行中であった分裂酵母のゲノムプロジェクトの情報を活用し、全ての完全長 ORF のクローン化を行うこととした。この方法の利点は、全ゲノム遺伝子産物の細胞内局在をカタログ化できること、LMB を用いた解析から簡便に CRM1 依存的核外輸送蛋白質の同定が可能であること、さらに importin β ファミリーに属する他の輸送因子の積み荷蛋白質についても、それぞれの破壊株で全遺伝子を発現させ、野生株と比較することにより同定できる点にある。さらにアセチル化、メチル化、ユビキチン化などの蛋白質修飾や蛋白質間相互作用、低分子-蛋白質間相互作用などさまざまなプロテオミクス解析にも応用可能となる。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の全ゲノム配列に基づき、ハイスループット PCR と 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 全長クローン化した。実際には、PCR と BP 反応は外部に委託し、その後のエンタリークローンの取得、検定を行ったところ、全遺伝子のうちの約 7 割については速やかに取得に成功した。しかし、残り 3 割については PCR、BP 反応、形質転換体の分離などを繰り返し行いながら取得につとめ、最終的に全体の 98% 以上にあたる 4,838 個の遺伝子についてエンタリーベクターにクローン化した。これらはすべてについて全長の塩基配列決定を行ったところ、1.3 kbp に一つの割合で PCR エラーが存在し、一定の割合で点変異が存在していることが明らかになった。その結果、フレームシフトなどの重大な問題が見られたものについては、再クローン化し、正しいものが取得されたことを確認している。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。これを作製するにあたっては、多コピーでの発現と染色体上の変異 *leu1* 遺伝子座にロイシン要求性を回復する形でインテグレートさせることのできる発現ベクター pDUAL を考案した。最終的に pDUAL を用いて YFP および Flag-His6 の融合遺伝子を染色体上で発現する酵母形質転換体をそれぞれ 4,807 個 (97.8%)、4,836 個 (98.4%) 得た。YFP 融合蛋白質は全体の 85% について YFP シグナルが観察され、それぞれの細胞内局在は、蛍光顕微鏡システムにて観察・記録を行なった。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

て再観察を行った。結果はできるだけ高精細の画像として保存し、個々の局在によって分類した（図1）。核内ドットとSPB、ゴルジ体と細胞内凝集体など、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した。本報告書提出時点では、このYFP/CFP共局在観察の一部がまだ継続中である。局在の分布をまとめたものを図2に示す。

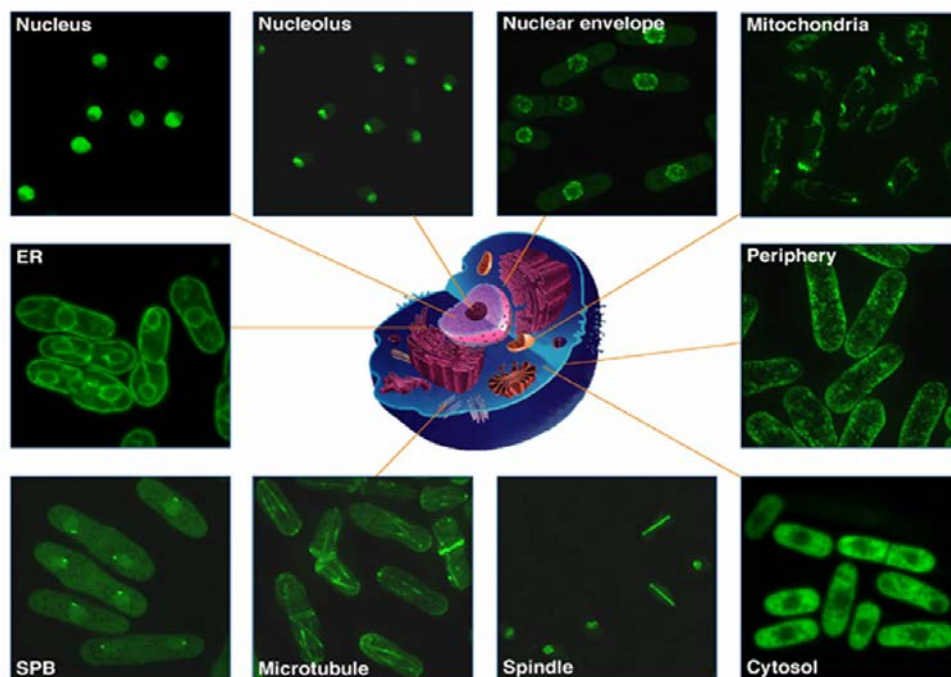


図1 各遺伝子産物の局在決定「Localizome」

The *S. pombe* localizome

~ classification based on localization patterns of ORF-YFP fusions

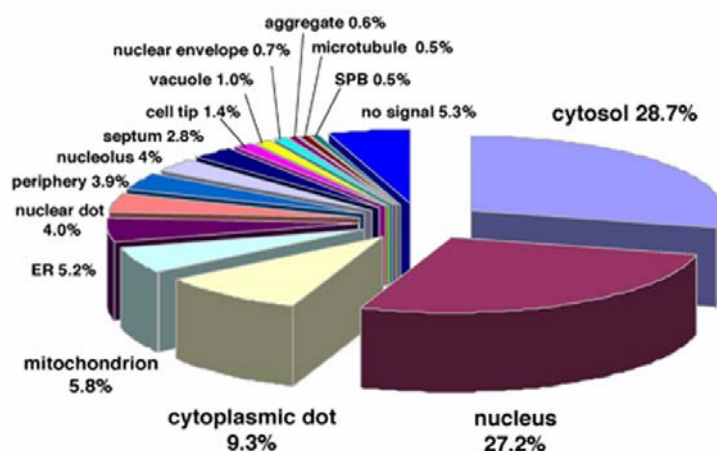


図2 全ゲノム遺伝子産物の細胞内局在の分布

今回クローン化した ORF は全て本来の終止コドンを除き、C 末端にタグを融合できるように設計したため、本来の C 末端が蛋白質の局在に必須の場合（例えばプレニル化修飾）は正しい局在を示さないことがある。しかし、実際の局在は Gene Ontology や Gene DB で予測された細胞内局在とよい一致を示したことから、C 末端配列が正しい局在に必要な蛋白質は全体からみれば少数であり、C 末端融合蛋白質による局在決定はかなり信頼性の高い情報となることが示された（図 3）。

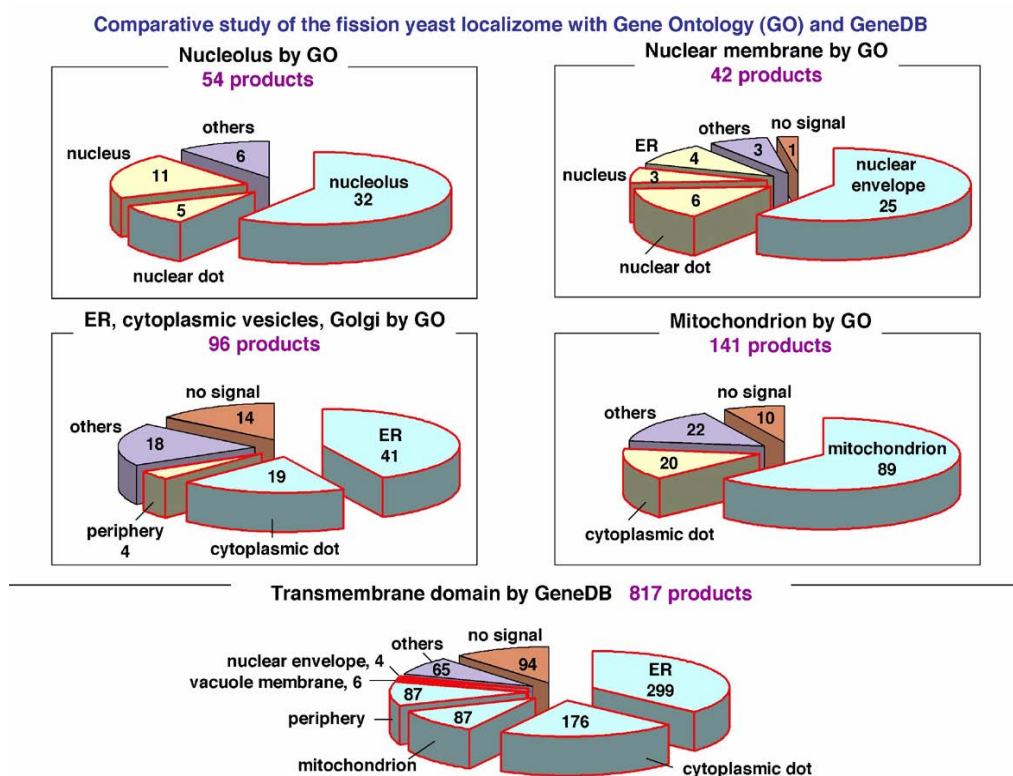


図 3 局在データと局在予測データベースとの比較
青色の円グラフは予測と一致した部分を示す。

これらの局在情報は、個々の配列情報、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（図 4）。さらに、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 270 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。Crm1 以外の輸送因子によって局在が調節されている分子については、LMB を用いた解析では明らかにならない。そこで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 遺伝子の破壊株を取得した。

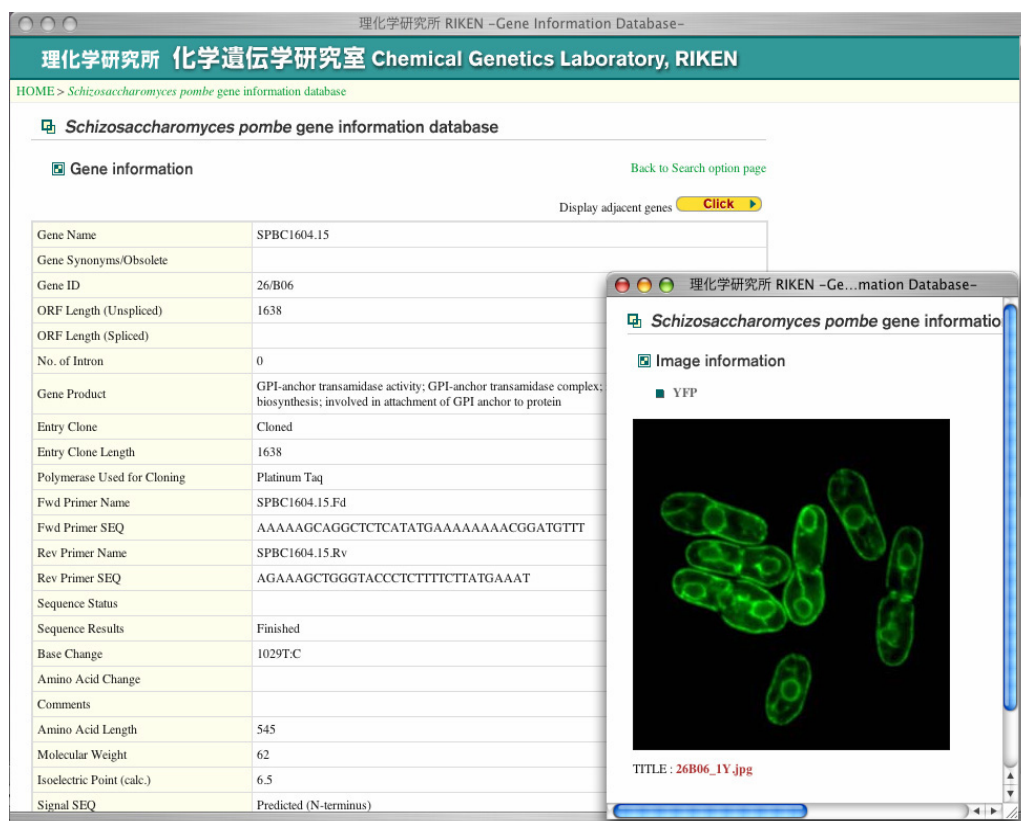


図4 分裂酵母全遺伝子、配列情報、局在情報、電気泳動位置、修飾等の総合的データベース

これらについて、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。今後、これらの破壊株中で YFP 融合蛋白質を発現させることで、それぞれの輸送因子によって輸送される積み荷蛋白質の同定が可能になると考えられる。

2) 分裂酵母における核外輸送因子 Crm1 を介した微小管局在制御の解析

上記の LMB を用いた核外輸送蛋白質の網羅的解析から、LMB に応答して 30 以上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。このことから、チューブリンそのものの局在変化を観察したところ、チューブリンは M 期開始時と同様に LMB 添加後速やかに核移行し、核内で紡錘体様の束化微小管を形成することが明らかになった。興味深いことにこの微小管の両端には SPB や γ -チューブリンは存在せず、間期微小管の性質を示した。しかし、この構造は LMB 処理中に伸長を続け、核膜を突き破って細胞両端にまで達する。この表現型では Crm1 変異体でも見られることから、間期においてチューブリンの細胞質局在を維持し、核内での間期微小管の重合を防ぐ機構が存在し、Crm1 がその機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

3) Mobilitome と分裂酵母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を作製し、個別にゲノムに挿入した株 4,836 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（図 5）。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。クローン化された全遺伝子の産物について電気泳動を行い、全体の約 89%にあたる 4,352 遺伝子について、その産物の発現を確認し、電気泳動度を決定した。また、この解析と並行して、各遺伝子産物がアセチル化されているかどうかを、後述する蛋白質アセチル化解析グループによって作成された新規抗アセチル化リジン抗体を利用して網羅的に検索した。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。

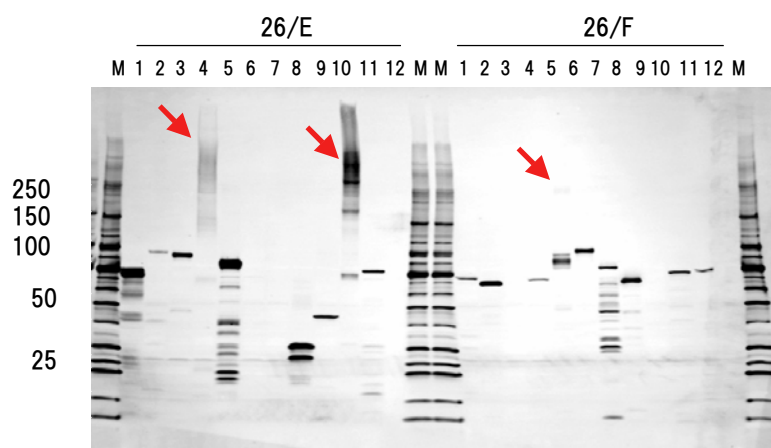


図 5 Mobilitome の一例。矢印は修飾を受けて高分子側にシフトしたものの。検出は His タグ抗体。

4) 動物細胞における新規アセチル化蛋白質の同定と脱アセチル化酵素の機能解析

リン酸化にも匹敵すると予想される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。まず、さまざまな細胞に広く HDAC サブタイプを阻害する HDAC 阻害剤 TSA を処理し、それらの細胞抽出液を蛋白質アセチル化解析グループによって作成された新規抗アセチル化リジン抗体によってアセチル化蛋白質を検出したところ、COS7 細胞（SV40 でトランスフォームされたサル細胞）で最も多数のアセチル化蛋白質が観察されたので、この細胞からアセチル化蛋白質を免疫沈降法によって濃縮し、得られたバンドを LC-MS/MS 解析によって同定した。その結果、既存の p53 や α -チューブリンに加えて SV40 由来の癌蛋白質 large T 抗原と mRNA のポリアデニル化に関わると考えられる CPSF5 を同定した。さらに質量分析によってこれらの蛋白質のアセチル化部位を同定した。それらのリジン残基をアルギニンに置換することによって抗アセチル化リジ

ン抗体に対する反応性を失うかどうかを検討することにより、最終的にアセチル化部位を確認した。さらに各種アセチル化酵素、脱アセチル化酵素の強制発現や免疫沈降実験により、それらのアセチル化酵素がともに CBP、脱アセチル化酵素が HDAC1 と SIRT1 であることを証明した。

現在、それぞれの蛋白質のアセチル化の意義について検討中であるが、large T 抗原については、アセチル化によって蛋白質の安定性が低下することを見出しており、アセチル化が蛋白質分解に関与する可能性が示されている。また、本研究によって HDAC と複合体を形成し核内小構造を作ることが見出された転写抑制因子 Bach2 とその類縁蛋白質 Bach1 については、核内小構造解析グループによって同様な解析が行われ、それぞれアセチル化を受けることが明らかになっている（後述）。

バイオブローブ設計グループと共同して、HDAC 阻害剤の特異性を検討したところ、HDAC6 の阻害剤感受性が阻害剤の種類によって大きく異なることを見出した。すなわち、TSA が HDAC6 を含むクラス I/II のほぼ全ての酵素を同程度に阻害するのに対し、TPX、FK228、MS-275 など、大きなキャップ構造を持つ阻害剤は HDAC6 をほとんど阻害できなかった。この選択性を利用し、TSA でアセチル化されるが、TPX によってはアセチル化が蓄積しないような蛋白質は、HDAC6 の基質であると考え、そのような蛋白質のスクリーニングを行った。その結果、得られた蛋白質は 2 次元電気泳動などの解析から α -チューブリンであることが判明した。そこで、in vitro および in vivo でさまざまな解析を行った結果、最終的に HDAC6 がチューブリン脱アセチル化酵素であることを証明した。HDAC6 によるチューブリンの脱アセチル化は微小管の脱重合に依存し、微小管の動的安定性と細胞の運動性を制御することが明らかになった（図 6）。

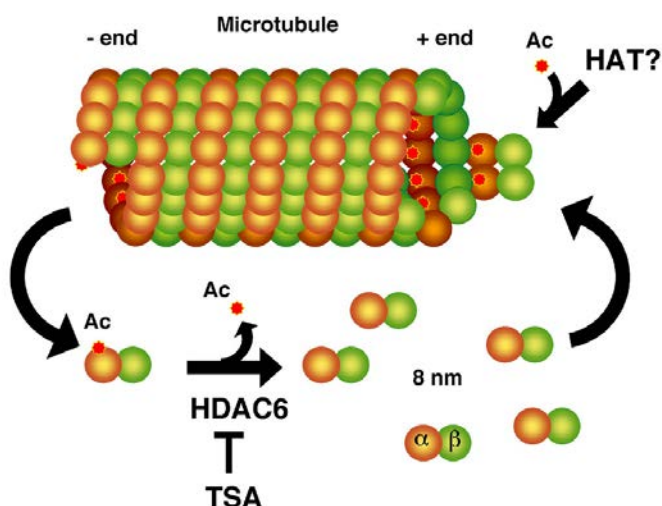


図 6 HDAC6 による微小管の脱アセチル化と TSA による脱アセチル化の阻害

さらに HDAC6 の細胞における機能を詳細に解析した結果、HDAC6 はエンドサイトーシスを負に制御していることが明らかになった。この活性には HDAC6 の脱アセチル化酵素活性が必要であることから、微小管のアセチル化と関連する可能性が高いと考えられる。また、HDAC6 はエンドソーム形成に関わるユビキチン化蛋白質である EPS15 と強く結合することから、エンドソーム形成制御にも関与することが示唆された。実際、EGF 依存的に増殖する肺がん細胞などで HDAC6 をノックダウンすると EGF 受容体などのエンドサイトーシスとターンオーバーが促進されて著しく低下するとともにそれを補償するために下流の MAPK などが高発現することから、HDAC6 は増殖因子受容体のエンドサイトーシスを介してシグナル伝達にも関与していることが示唆された。

5) 核内小構造の機能解析

動物細胞において核外に輸送される蛋白質の中で酸化ストレスに応答するユニークな核外移行活性を持つ転写制御因子 Bach2 が HDAC4 と共局在し、さらに核内で小構造を形成することを発見した。そこでこの構造体の形成機構、核外移行との関連、構造体の機能について明らかにすることを目指して Bach2/HDAC4 複合体の核内での局在、転写後リプレッサー SMRT の影響、複合体周辺部での転写活性等について検討を行なった。Bach2/HDAC4 複合体は SMRT 共存下で核移行し、高度な高次構造をとらない真正クロマチンの核マトリックス上に構造体を形成した。この複合体は SMRT の発現量を高めると巨大な球状構造となり、その近傍はヒストンが低アセチル化状態であることがわかった。この構造体形成には、SMRT との結合に関与すると考えられる Bach2 の N 末端領域の BTB ドメインが必要であった。さらに BrUTP を用いた転写部位標識法によってこの構造体内部およびその周辺では転写が行われないことを明らかにした。したがってこの構造体は真正クロマチン上の遺伝子の発現を抑制するためのセンターとして機能し、Bach2 等の配列特異的な転写抑制因子は遺伝子領域をこの構造体に近づける役割を持つ可能性が示された。これらの知見は、以後、広島大における核内小構造解析グループに引き継がれて研究が推進された（後述）。

6) 核の機能を制御する新規生理活性物質の作用機構解析

転写など核内で起こる現象に作用する生理活性物質の標的分子は核蛋白質等の輸送やアセチル化などの蛋白質修飾に関わる可能性が高い。そこで、SV40 ウイルスの初遺伝子プロモーターを活性化作用を有すると報告された2種の化合物FK228とFR901464(図7)の作用機構に関する研究を行った。その結果、まずFK228はTSAやTPXと同様、HDACを阻害することが明らかになった。ところが、既存のHDAC阻害剤と異なり、FK228には深いHDAC活性中心ポケットに入って活性中心亜鉛と相互作用するような構造が見え、その作用機構は謎であった。

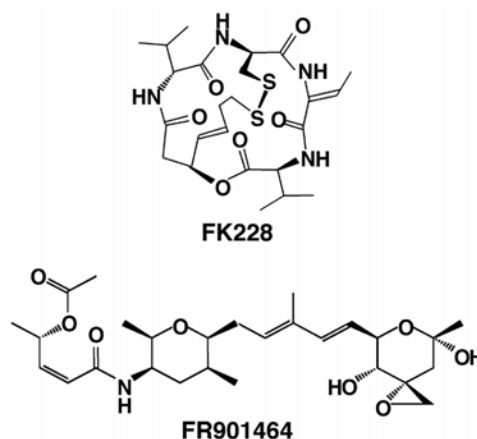


図7 転写制御に影響を与える化合物

さまざまな検討の結果、FK228は分子内ジスルフィド構造を持つ安定な不活性型であり、細胞内に取り込まれると細胞内の還元力によってジスルフィドが開裂し、活性中心亜鉛にアクセスできる長さのスペーサーと亜鉛と相互作用するチオールが出現し、これが酵素活性を阻害することを明らかにした。すなわち、FK228は天然のプロドラッグであった(図8)。一方、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。すなわち、FR901464を処理した細胞ではスプライシングが不完全なmRNA前駆体が蓄積し、それらの一部が翻訳された。FR901464の結合蛋白質を分離、同定した結果、いずれもCXXCモチーフを持つ数種の蛋白質が同定され、CXXC配列のシステイン残基と共有結合することが明らかになった。これらの結合蛋白質の中にFR901464の標的分子が存在すると考え、確認のための実験を行っている。

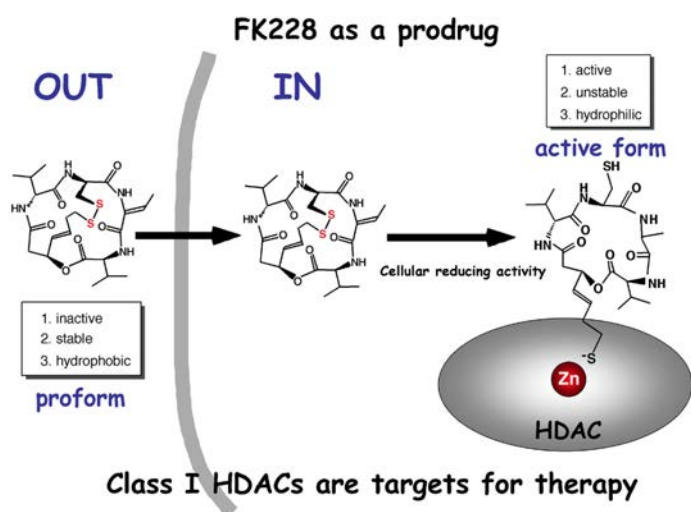


図8 FK228の作用機構

7) HDAC サブタイプ特異的阻害活性の検討

HDAC は 10 種類以上のサブタイプが存在し、機能分担が行われていると推定されているが、HDAC1 や HDAC6 など一部の分子について限られた情報が得られているにとどまっている。本研究では、従来困難とされてきたこれら個々の酵素の活性を簡便に測定する系を確立し、後述のバイオプローブ設計グループによって合成された新規構造の HDAC 阻害剤について、選択性の評価を試みた。

まず、酵素源は従来、動物細胞に個々の HDAC の cDNA を導入し、免疫沈降法によって精製したものが用いられてきた。しかし、この方法では HDAC 複合体中に内在性の別の HDAC が含まれるため、正しい活性を検出しているかどうかについては不明確であった。一方、大腸菌等で発現させたリコンビナント HDAC については、ほとんどが正しいコンフォメーションをとらず、HDAC8 以外は活性検出が困難である。そこで、本研究ではバキュロウイルスを用いたリコンビナント酵素の調製を試みた。この方法で得られた酵素は、免疫沈降したものに比べて比活性は低い、純度は高かった。また、ペプチド基質を用いた解析から、例えば HDAC6 はアセチル化チューブリンペプチドをよい基質とするが、他の酵素はこれを基質にできないなど、基質特異性も細胞内酵素の性質と同等であった。この方法によって HDAC1, HDAC4, HDAC6, HDAC8 について特異的な活性を測定することが可能となった。基質としては、バイオプローブ設計グループによって考案された蛍光性基質を用いることで放射性基質を使うことなく簡便なアッセイが可能となった。この酵素-基質系を用いて CHAP、SCOP など新たに合成されたさまざまな亜鉛配位子を有する環状テトラペプチド化合物の HDAC 阻害活性を評価したところ、興味深いことに活性基としてチオールを含有する SCOP は最も選択性が高く、HDAC4>HDAC1>HDAC6 の順に強く作用することがわかった。また、SCOP は FK228 と同様、自身のチオールを酸化的にジスルフィドにすることによりホモダイマーを、他のメルカプタン化合物とともにヘテロダイマーを形成させることができ、これらはいずれも血中安定性が高まるとともに細胞内で還元されて活性化されるプロドラッグとして機能し、今後有望なリード化合物となることが確かめられた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) 分裂酵母全ゲノム ORF クローン化のインパクト

本プロジェクト研究開始時には分裂酵母のゲノムプロジェクトは進行中であったが、その途中段階の公開情報から各 ORF の PCR クローニング用のプライマーを設計し、順次 GATEWAY 法によるクローニングを行い、2002 年のゲノムプロジェクトの終了とほぼ同時にクローン化自体は完了した。その後、全てのクローン化された ORF を全長にわたって塩基配列決定してクローンの確認を行い、正しい遺伝子が得られていなかったクローンについてはさらに再クローニングを試みた。その結果、研究プロジェクト終了までに全体の 98% 以上に当たる 4,838 個の遺伝子のクローン化に成功した。一生物のゲノム ORF の全てについてクローン化が行われた例は出芽酵母について 2 例目である。一方、組換え反応によって多様な発現ベクターへ乗せ換え可能な GATEWAY 法によるクローン化はいくつかの生物で進行中ではあるが、完了した例は出芽酵母ですら報告がなく、今回の我々の研究が世界初となる。分裂酵母は細胞周期調節、転写調節、シグナル伝達、イントロンなど、多くの制御機構の中で出芽酵母に比べてヒトと類似しており、そのゲノム中には実に 100 以上ものヒト疾患遺伝子ホモログが存在する。こうしたことから、ヒト疾患遺伝子の機能を研究するためのモデル生物としてきわめて優れている。1 ステップで目的の融合蛋白質を発現できるように設計された我々の全遺伝子ライブラリーは、単に個々の遺伝子の機能解析にとどまらず、今後ケミカルゲノミクスなどの網羅的な解析にきわめて有用となると考えられ、その波及効果はきわめて大きい。本研究で GATEWAY 法による分裂酵母全遺伝子のクローン化が成功した成果は世界に誇るべきものであると考えている。

2) 細胞内蛋白質局在情報の有用性と核外輸送蛋白質の網羅的解析

我々はさらに分裂酵母ゲノム全 ORF を用いた各遺伝子産物の網羅的な細胞内局在の同定である「Localizome」をほぼ完了した。蛋白質の局在情報は、その機能を推定する上できわめて重要である。全遺伝子産物の局在解析については、昨年、出芽酵母の例が報告された (Nature 425, 686, 2003)。この報告では、個々のゲノム遺伝子の 3' 末端に染色体上で GFP を融合しているため、発現制御が正しいプロモーターで行われるという利点がある一方で、発現量が低く、蛍光シグナルが観察された遺伝子は全体の 6.7% にとどまっている。それに対し、本研究では誘導型発現プロモーターである *nmt1* を用いたおかげで全体の約 85% について蛍光シグナルを観察し、その局在を決定することができた。

また、生体内の本来の発現レベルよりも高発現したことによる局在異常が疑われる例については、全て発現を抑制する条件（チアミンを含む培地）で再観察しており、偽局在は最小限に防いだと考えている。しかし、出芽酵母の場合も本研究における分裂酵母の場合も蛋白質の C 末端に蛍光蛋白質が融合しているため、C 末端配列が正しい局在化に必要な蛋白質は偽局在してしまうことはやむを得ない。これについては、N 末端融合蛋白質の発現など、今後他の方法を検討する必要がある。この分裂酵母 Localizome をベースに、我々は核外移行阻害剤レプトマイシン B 処理を全ての発現株について行い、約 270 の核外移行蛋白質を同定した。このような研究はもちろん前例がない。その結果、核外移行の阻害により、チ

チューブリンが核内蓄積し、異常な束化微小管が核内に形成され、多くの微小管結合蛋白質がこの核内微小管に集積することを見出した。このことは、蛋白質核外移行が間期での核内チューブリンの量と重合を制御することを示唆しており、そのメカニズムに興味を持たれるところである。

3) 新たなポストゲノムデータベース「Mobilitome」の有用性

さらに本研究の当初計画にはなかった網羅的な電気泳動位置のデータベース「Mobilitome」の作製を目指した実験を開始し、すでに完了した。このような情報はいかなる生物でも前例がない。それぞれの遺伝子産物の SDS-PAGE 上での移動位置をウェスタンブロットで決定するという一見単純なデータベースであるが、その情報ははきわめて有用である。まず、アミノ酸配列から推定される位置に正しく（前後 10 %以内）移動するものは全体のわずか半数しかなく、個々の遺伝子産物の泳動位置をあらかじめ知っておくことは重要であることがわかった。

また、2割以上の蛋白質に翻訳後修飾と思われるマイナーバンドが観察された（図5）。これは前述の局在情報を組み合わせることによってどのような翻訳後修飾かを推定することが可能である。さらに全ての遺伝子産物について、抗アセチル化リジン抗体、抗メチル化リジン抗体による修飾蛋白質の検出も同時に行い、全ゲノム中からいくつかの新規修飾蛋白質を同定するに至った。こうした情報は、遺伝子産物の最終形である修飾蛋白質の全貌を明らかにする「Modificome」へ進むための最も重要な新しい方法論になると考えられ、今後のポストゲノム領域の先駆的な研究例であることはいうまでもない。

4) 非ヒストンアセチル化蛋白質の同定とその重要性

本研究における新規アセチル化蛋白質探索の過程で α -チューブリン脱アセチル化酵素を発見したのは特筆に値する。微小管のアセチル化はその役割が不明であり、少なくともきわめて安定な微小管の形成には関与しないと考えられていた。我々は HDAC6 が α -チューブリン脱アセチル化酵素であることを明らかにし、TSA が HDAC6 を阻害することにより高アセチル化微小管を形成できることを示した。高度にアセチル化された微小管は、予想通り安定化微小管にはならず相変わらず動的であったが、脱重合速度が低下し、動的安定性に影響があることをはじめて示した。さらに HDAC6 過剰発現によって低アセチル化した微小管を持つ細胞ではエンドサイトーシスが著しく抑制、または遅延されたことから、アセチル化微小管は細胞内小胞輸送に関与することも示された。こうした研究から、HDAC6 は今後の創薬標的の1つとしても重要になると考えられる。

3. 2 バイオプローブ設計グループ

(1) 研究内容及び成果

1) 環状テトラペプチドヒドロキサム酸の設計合成

HDAC に対する阻害活性を有することが、最初に見出された TPX は、それまでに天然物として発見されていた一群の環状テトラペプチド、Cyl-1, Cyl-2, chlamydocin, および WF3161 と共通して、側鎖末端に epoxyketone を有する特殊アミノ酸 Aoe (2-amino-8-oxo-9,10-epoxydecanoic acid) を含有する (図 9)。Epoxyketone 原子団は種々の親核攻撃を受けやすい欠点があるため、以前より HDAC の阻害剤として知られていた TSA の、酵素阻害反応基であるヒドロキサム酸をこれと置き換えた新規ハイブリッド阻害剤 CHAP (cyclic hydroxamic acid-containing peptide) (図 9) を多種類合成した。これらは TSA に匹敵する阻害活性を示し、「HDAC は活性中心に亜鉛原子を有する加水分解酵素であり、メタロプロテアーゼと同様の反応機構によってアセチル基の切断を触媒する、従って Aoe 末端の epoxyketone をヒドロキサム酸に置換すれば、取り扱い容易なバイオプローブを得ることができる」との仮説を証明することに成功した。また、天然の環状テトラペプチド中の特殊アミノ酸 Aoe 以外のアミノ酸の種類が多様であるのみならず、その立体配置も相互に異なることに着目して、有機合成化学を駆使した結果、天然には見出されない立体配置の組み合わせ、LDLD-体が高い活性を示すことを新たに発見した。これは、天然には LLLD-体や LDLL-体が主として存在しているのに対して、酵素との結合特異性の設計に当たって新たに LDLD-体を加えることができたので、分子設計上の多様性を増加した意義は大きい。

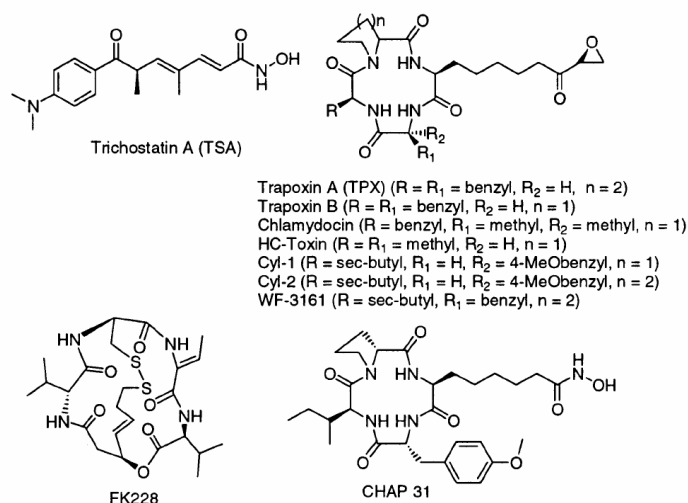


図 9 天然に存在する HDAC 阻害剤と CHAP31

2) Chlamydocin 関連環状テトラペプチドヒドロキサム酸の設計合成

これまで環状テトラペプチドとしては、TPX, Cyl-1、あるいは WF3161 のように、含有アミノ酸が全てキラルであるものを扱ってきたが、一連の天然由来の Aoe を含む環状ペプチ

ドにはアキラルなアミノイソ酪酸を含有する Chlamydocin がある。この特殊な構造のアミノ酸に着目し、異なる α, α -ジ置換アミノ酸を導入した、多種類の CHAP を設計合成した。これらもやはり、HDAC の強力な阻害剤であり、特に当該位置に芳香環を導入した場合に活性がより強くなることを見出した。これは Cyl-1 や TPX がこの位置に芳香族アミノ酸を配置していることと関係していると考えられる。また、NMR による Chlamydocin のヒドロキサム酸アナログの立体構造解析を行い、X 線解析による結晶構造とは異なることを確認した (図 10)。

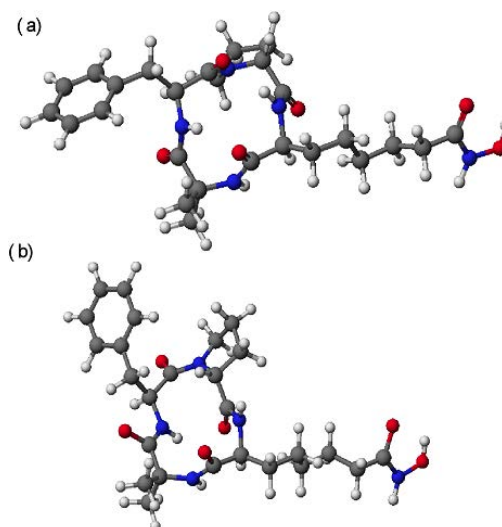


図10 NMRによる解析で得られたChlamydocin ヒドロキサム酸アナログの立体構造
(a) bis- γ -turn 型, (b) β -ターン型

3) チオール基を有する環状テトラペプチドの設計合成

HDAC は既に述べたように、亜鉛を含有する金属酵素である。このような酵素に対しては、チオール基やレトロヒドロキサム酸等の適当な亜鉛配位子を導入すれば阻害剤の設計が可能だが、既にサーモリシンやマトリックスメタロプロテアーゼの例によって知られている (図 11)。

そこで、その 1 例としてチオール基の導入を実施した。

チオール基の前駆体として、アミノ酸側鎖末端に Br を有する新規アミノ酸を設計し、簡便な方法でこれを光学活性体として調整し、加えて容易に環状テトラペプチド中に導入することに成功した。これらを SCOP (sulfur-containing cyclic peptide) と命名した。SCOP は遊離のチオール基を有するため、血液中では蛋白質にトラップされる欠点がある。そこでチオール基の特性を利用し、SS-ホモダイマーや SS-ハイブリッドを開発し、使い易いバ

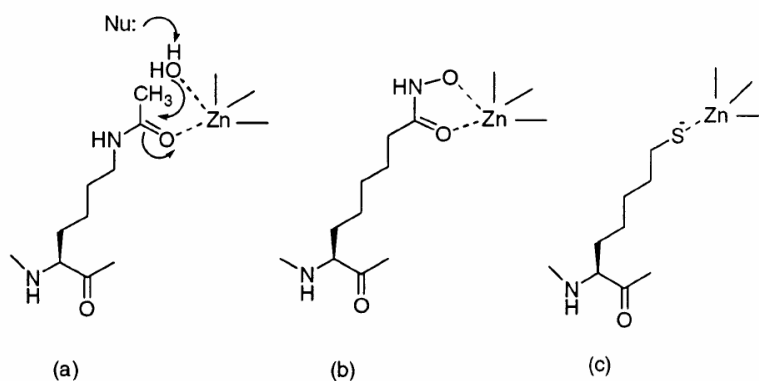


図 11 基質(a)、ヒドロキサム酸型阻害剤(b)、チオール基導入阻害剤(c)によるHDAC酵素亜鉛イオンとの結合模式図

4) 環状テトラペプチドレトロヒドロキサム酸の設計合成

5) トリフルオロメチルケトン原子団を有する環状テトラペプチドの設計合成

- 289 -

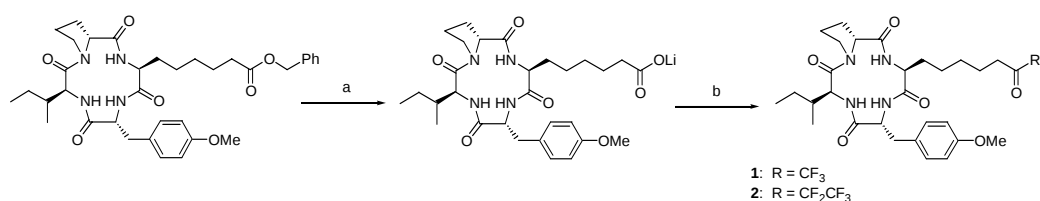


図 13 トリフルオロメチルケトン原子団を有する環状テトラペプチドの合成スキーム
(a) LiOH, H₂O, THF (b) for 1, pyridine, trifluoroacetic anhydride. for 2, pyridine, pentafluoropropionic anhydride.

6) HDAC6 の特異的阻害剤設計合成の試み

HDAC6 はアセチル化された α -チューブリンを脱アセチル化することが吉田らによって明らかにされた。 α -チューブリンの結晶構造を検討したところ、アセチル化される Lys は蛋白質表面にロープ状に突き出した位置に存在していた。そこで、このロープ部分を小分子化して酵素との結合部位を保存した阻害剤の創製を試みるために、環状ヘキサペプチドを設計し、この Lys 相当位置にヒドロキサム酸を側鎖に有するアミノスベリン酸を導入した。意外なことにヒドロキサム酸原子団を有するにもかかわらず、この環状ヘキサペプチドは全く HDAC6 の阻害活性を示さなかった。そこで、環状ペプチドの設計の際に意図した、蛋白質上でのコンフォメーションが保持されていないことに原因があると考え、NMR 解析を行った結果、重要と思われるアミノ酸のカルボニル基が、 α -チューブリン中の配向と大きく異なることを見出し、これが結合力を持たないことの主因であろうと推論した (図 14)。

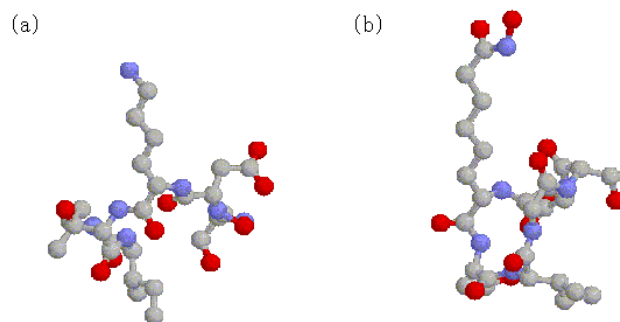


図 14 (a) α -tubulin fragment (-Ser-Asp-Lys⁴⁰-Thr-Ile-Gly-) の X 線結晶解析による立体構造; (b) 合成した阻害剤の NMR 解析による立体構造

7) HDAC の蛍光性基質の設計合成

HDAC の活性試験には、従来放射ラベルしたヒストンや合成ペプチドが用いられて来た。しかし、この方法は特別な装置や放射活性物質を扱う等の不便があり、HDAC 研究の迅速化の障害となっていた。そこで、HDAC がアセチル基を切断後、遊離のアミノ基に選択性を有するトリプシンを作用させること、およびトリプシン分解によって蛍光特性が変化するアミノメチルクマリンの蛍光特性が変化することを原理とする簡便な蛍光性の短鎖ペプチド基質を開発した (図 15)。

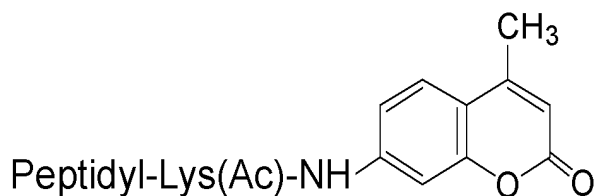


図 15 ヒストン脱アセチル化酵素蛍光性基質の一例

(2) 研究成果の今後期待される効果

TPX、Cyl-1、Cyl-2、chlamydocin、HC-toxin、WF3161 のような、天然より発見された環状テトラペプチドは、特殊なアミノ酸(Aoe)の含有のみに共通性を有しており、アミノ酸配列のみならず個々のアミノ酸の立体配置にまで、興味深い多様性を持つ生物活性物質の一群に属する。特殊アミノ酸 Aoe の epoxyketone は、HDAC の活性中心近傍の求核原子団の攻撃を受け、結果として当該酵素を失活させる機能を持っており、そのケトンのカルボニル炭素の位置は、正しく本来の基質である Lys(Ac) のそれと重なる位置にある。天然物の本来の酵素阻害反応部位 epoxyketone を亜鉛配位子であるヒドロキサム酸に置換しても、TSA と同等の阻害活性を示すことを確認した。これにより Aoe の機能は酵素化学的・有機化学的に理解が進んだが、では環状テトラペプチドのその他の部分の機能は、何であるか？一言で表現すれば、この部分は 10 種類を超える HDAC パラログの阻害剤特異性決定部位と想定される。この部分のアミノ酸を多様に変化させることによって、HDAC パラログごとの高度に特異的な阻害剤を設計することが可能となり、その結果、細胞周期に関する生物学の発展を促すツールとしてのバイオプローブが提供されるのみならず、HDAC を原因とする疾病に関する医薬品の発見にも期待が持たれる。

一方、これまでに設計合成した環状テトラペプチドヒドロキサム酸や含硫環状ペプチド等々は、今後研究試薬として広く研究者に提供される。これによりこれらバイオプローブを用いた研究が容易になり、化学遺伝学の研究が加速されるであろう。このような阻害剤に加え、HDAC の活性を検出するための蛍光性基質も、研究者の実験時間の短縮をもたらし、益々この酵素に関わる分子生物学の展開を加速すると考えられる。

3. 3 蛋白質アセチル化解析グループ

(1) 研究内容及び成果

1) HDAC 阻害剤の制癌剤としての開発

本共同研究プロジェクトの前半では、環状テトラペプチド構造を有する HDAC 阻害剤の構造活性相関に関する研究を実施した。アッセイ系として、細胞レベル及び酵素レベルの二種類を用いて、バイオプローブ合成グループにより合成された種々の構造を有する化合物の活性を評価した。HDAC 酵素活性阻害の評価のほか、細胞レベルのアッセイとしては、一つは B16/BL6 細胞表面の MHC class-1 分子の発現促進活性を用いた。MHC class-1 の発現レベルは、抗体を用いた cell ELISA で行った。更に、細胞増殖に及ぼす効果を Promega CellTiter™ 96 Aqueous Nonradioactive Cell Proliferation Assay kit を用いて評価した。

本研究により、酵素レベルのみならず細胞レベルで強い活性を示すための条件として、以下の諸点が明らかになった。(1)環状テトラペプチド部分は LDLD 型の configuration が優れている、(2)テトラペプチドはオクタペプチドより優れている、(3)環状テトラペプチドの側鎖には疎水性残基がある方が良い。(4)ヒドロキサム酸と環状テトラペプチドコアの間はメチレン 5 個が最適である。以上の条件を満たす代表例が、図 9 に示される CHAP31 である。CHAP31 に関して、更に詳しく調べた結果、この化合物は同じくヒドロキサム酸残基を活性部位に有する HDAC 阻害剤である TSA に比べて、細胞存在下での安定性に圧倒的にすぐれ、図 16 に一例が示される様に、マウスを用いた移植癌の系で実際に抗腫瘍効果を発揮した。これらの結果は、環状テトラペプチド構造を有する HDAC 阻害剤が、有効な抗がん剤の基本構造となりうることを示しており、本プロジェクトのその後の研究へと発展した。

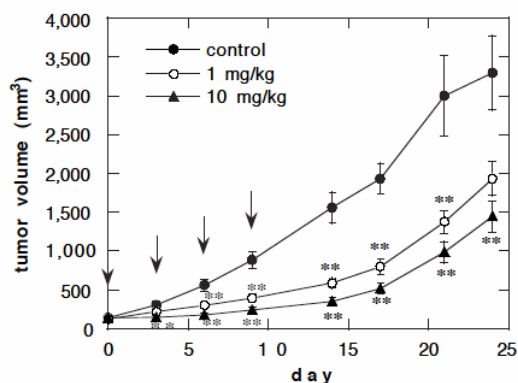


図 16 BSY-1 乳癌における CHAP31 の抗腫瘍効果

2) 抗アセチル化リジン抗体の樹立

新規アセチル化リジン含有蛋白質を検出するために、新たな抗アセチル化リジンマウスモノクローナル抗体及びウサギポリクローナル抗体の樹立を行った。今回必要な抗体は、蛋白質内で周辺配列に余り影響されずにアセチル化リジン残基を認識できる抗体であるので、何通りかの免疫/スクリーニング戦略を工夫し、抗体を得た。採用した免疫/スクリーニングのストラテジーは、次の 3 通りである。(1)免疫用抗原として、アセチルリジン含有合成ペプチド、具体的には、Gly-Lys(Ac)-Aca-Cys (但し Aca は ϵ -アミノカプロン酸) を KLH とコンジュゲートしたものを、スクリーニング用抗原としてアセチル化ヒストン H3

ペプチド、具体的には、Thr-Ala-Arg-Lys (Ac)-Ser-Thr-Gly-Gly-Lys (Ac)-Ala-Pro-Arg-Lys (Ac) -Gln-Leu-Ala-Thr-Lys (Ac)-Ala-Ala-Arg-Lys (Ac)-Ser-Ala-Cys をそれぞれ使用、(2)免疫用抗原としては(1)と同様にアセチルリジン含有合成ペプチド、スクリーニング用抗原として無水酢酸で化学的にアセチル化した BSA を使用、(3)免疫用抗原として、化学的にアセチル化した KLH を、スクリーニング用抗原として、化学的にアセチル化した BSA をそれぞれ使用。これらの3つのストラテジーで抗体を作製したところ、いずれのストラテジーを用いても蛋白質中のアセチル化リジン残基に反応性を示す抗アセチルリジンモノクローナル抗体を得ることが出来た。また、第三のストラテジーを用いて抗アセチルリジンポリクローナル抗体も取得できた。ポリクローナル抗体はアセチル化リジン含有ペプチドを固相化したアフィニティーカラムにより効果的に精製できた。

樹立したモノクローナル抗体の性質を詳しく調べると、いずれも抗原として用いた $N\epsilon$ -アセチルリジンによる競合は起こるが、 $N\alpha$ -アセチルリジンやリジンによっては競合されなかった（これらのアミノ酸の構造を図17に示した）。このことは、これらの抗体がリジン側鎖のアセチル化を選択的に認識するものであることを示している。また、樹立したモノクローナル抗体の可変領域をクローニングして配列を調べると、3つの独立のストラテジーで樹立した合計5クローンのいずれもが共通のフレームワーク配列を有していることが明らかとなった（図18）。このことは、蛋白質中のアセチルリジン残基の認識の上で、ある特定のフレームワーク構造により形作られた抗体の構造が重要な役割を果たしていることを示唆している。

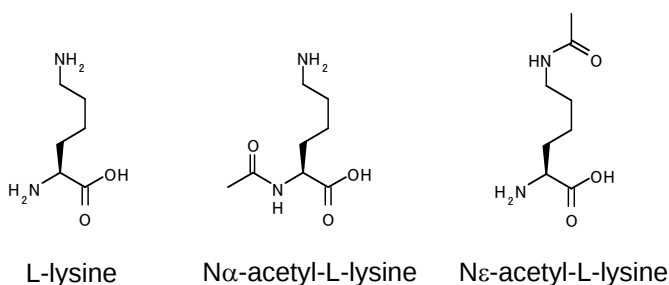


図 17 リジン及びアセチルリジンの構造

実用的な観点で言うと、第一

A. Light-chain

ACK2F12-L	1	GAVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLNSNGNTYLNWYLOKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCL
AL3D5-L	1	DAVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLNSNGNTDLNWYLOKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCL
AL11-L	1	DAVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLNSNGNTDLNWYLOKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCL
AKL3H6-L	1	DAVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLNSNGNTYLNWYLOKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCL
AKL5C1-L	1	DAVMTQTPLSLPVSLGDOASISCRSSQSLNSNGNTYLNWYLOKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDKFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYFCL

ACK2F12-L	96	ITHVPWTFGGGKLEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNS
AL3D5-L	96	VTHVPWTFGGGKLEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNS
AL11-L	96	VTHVPWTFGGGKLEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNS
AKL3H6-L	96	VTHVPWTFGGGKLEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNS
AKL5C1-L	96	VTHVPWTFGGGKLEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSEKQNGVLNS

B. Heavy-chain

ACK2F12-H	1	QVQLQQSGAELVRPGETSVKMSCKAAAGYFTFTNYWIGWVKQRPQGHLEWIGDIYPGGSYVYNEKFKGKATLTADTSSITAYMQLSSLTSEDSAIY
AL3D5-H	1	QVQLQQSGAELVRPGETSVKMSCKAAAGYFTFTNYWIGWVKQRPQGHLEWIGDIYPGGSYVYNEKFKGKATLTADTSSITAYMQLSSLTSEDSAIY
AL11-H	1	QVQLQQSGAELVRPGETSVKMSCKAAAGYFTFTNYWIGWVKQRPQGHLEWIGDIYPGGSYVYNEKFKGKATLTADTSSITAYMQLSSLTSEDSAIY
AKL3H6-H	1	QVQLQQSGAELVRPGETSVKMSCKAAAGYFTFTNYWIGWVKQRPQGHLEWIGDIYPGGSYVYNEKFKGKATLTADTSSITAYMQLSSLTSEDSAIY
AKL5C1-H	1	QVQLQQSGAELVRPGETSVKMSCKAAAGYFTFTNYWIGWVKQRPQGHLEWIGDIYPGGSYVYNEKFKGKATLTADTSSITAYMQLSSLTSEDSAIY

ACK2F12-H	96	CAWFS--APECAWFAWQGGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGS
AL3D5-H	96	CAWFS--YYSNFAWFAWQGGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGS
AL11-H	96	CAWFS--NYGAWFAWQGGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGS
AKL3H6-H	96	CAWFS--YGGAWFAWQGGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGS
AKL5C1-H	96	CAWFSYFADGPAWFAWQGGTLVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGS

図 18 抗アセチル化リジンモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列
A, 軽鎖、B, 重鎖

のストラテジーで樹立した抗体 AL3D5、第二のストラテジーで樹立した AL11、第三のストラテジーで樹立した AKL3H6、AKL5C1、及び ACK2F12 の内、第三のストラテジーで樹立した抗体が最も多くのアセチル化蛋白質を検出できた。中でも、ACK2F12 の能力が特に優れていた。

3) 抗メチル化リジン抗体の樹立

蛋白質中のリジン残基の修飾としては、アセチル化に加えて、メチル化がある。抗アセチル化リジン抗体を樹立したのと同様のストラテジーで抗メチル化リジン抗体を樹立できるかどうか試みた。免疫用抗原としては、 NaBH_4 存在下でホルマリンにより化学的にメチル化した KLH を、スクリーニング用抗原としては、同様の方法で化学的にメチル化した BSA をそれぞれ使用した。その結果、抗アセチルリジン抗体と同様、蛋白質内のメチル化リジン残基を認識できるモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を樹立できた。

樹立した抗体の特異性を競合実験で調べると、ジメチルリジン>モノメチルリジン>トリメチルリジンの順で反応性が高く、この方法で作製できる抗体は、主にジメチルリジンを認識することが分かった。

4) 新規アセチル化、メチル化蛋白質の探索

樹立した抗体を用いて新規アセチル化蛋白質及びメチル化蛋白質の探索を開始している。一例として、図 19 に 2 種類の HDAC 阻害剤 TSA または TPX で処理した MOLT-4F 細胞抽出液を二次元電気泳動で展開後、抗アセチル化リジン抗体 AKL5C1 で検出した結果を示した。AKL5C1 抗体は、TSA 処理により蓄積する多くのスポットを検出できることが分かる。一方、TPX によって蓄積するスポットは少ない。隣の抗 α -チューブリン抗体及び抗アセチル化 α -チューブリン抗体での検出を見ると分かる様に、これらの大部分のスポットはアセチル化した α -チューブリン及びその断片であることが分かる。しかし、 α -チューブリン関連抗体で検出されないスポットも複数認められ、これらは未知のアセチル化蛋白質である可能性がある。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で樹立した抗アセチル化リジン抗体及び抗メチル化リジン抗体は、今後新たなアセチル化リジン含有蛋白質、メチル化リジン含有蛋白質を探索してゆく上で有用なツールである。実際、抗アセチル化リジン抗体に関しては、外部の研究者にも供給され、新規アセチル化リジン含有蛋白質の検出に役立っている。同様の抗体はいくつか市販されているが、我々の抗体はそれらに比べて検出力に優れており、未知修飾蛋白質の探索に有用である。我々のグループでもこれらを駆使して、新規疾患関連蛋白質の発見につなげる研究を展開中である。

今後は、これらを用いて見出した新規疾患関連蛋白質を、治療薬の開発に利用し、また診断薬として実用化してゆくとともに、樹立した抗体自体も市販することで社会に貢献することを計画している。

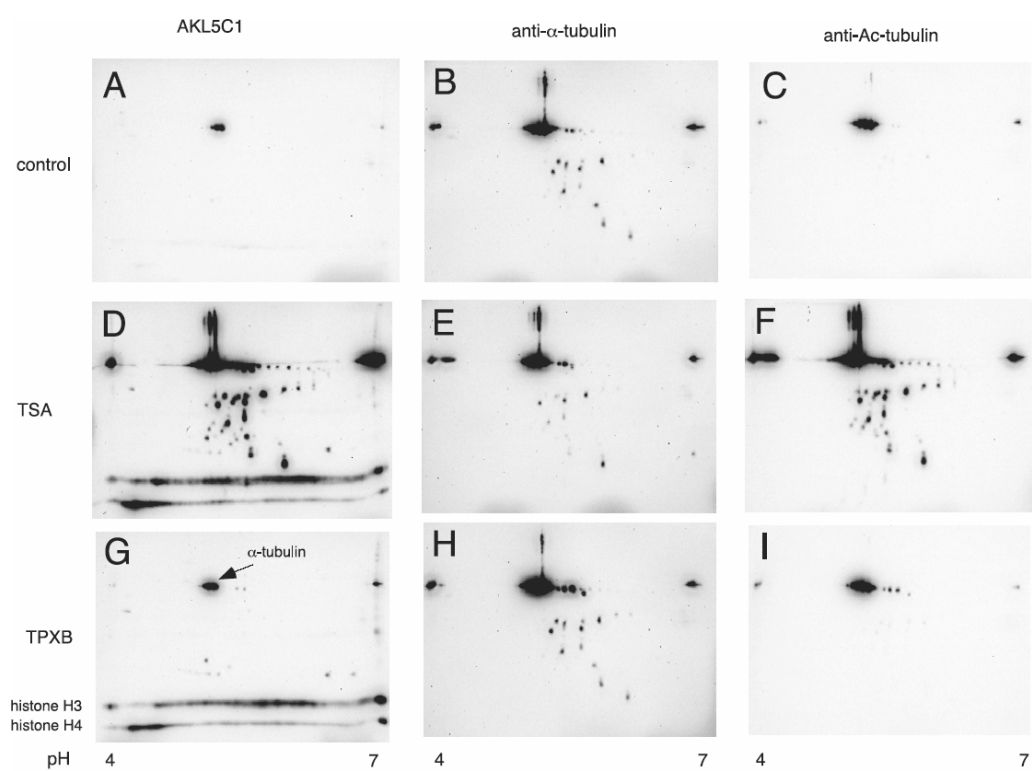


図 19 抗アセチル化リジン抗体によるアセチル化蛋白質の検出

3. 4 核内小構造解析グループ

(1)研究内容および成果

核内小構造解析グループは核外移行及び機能解析グループと密接に連携して核内小構造の機能解析を行うことを目的とした。特に核内小構造解析グループでは、核内での転写部位を可視化する技術を有しているため、核内小構造中の HDAC の機能と転写との関連を直接解析することが可能になる。具体的には、Promyelocytic leukemia body (PML)やBach2を含む核内小構造体の構成要素を同定し、その転写制御における機能を検討した。また、核内小構造体に位置する遺伝子の同定を試みるとともに核外移行阻害剤等の効果を検討した。

1) Bach2 と PML が形成する核機能構造体の解析

DNA、染色体、そして核内蛋白質などが細胞核内で高次構造体を形成することが明らかに、このような構造体がゲノム機能の維持や遺伝子発現の調節に重要であることが予想されるようになってきた。代表的な核内構造体の一つである PML ボディは、直径 200 nm から 1 μ m 程度の球状、あるいはリング状の高次構造体で、通常核内に数個から十数個認められる。その中心的構成因子である PML は、インターフェロンのメディエーター、アポトーシス関連因子、細胞増殖や癌抑制因子としての働きを持つことが知られている。また AP-1、CBP、p53、pRB、Daxx といった細胞増殖、細胞死などに関連する転写因子は PML と結合し PML ボディに局在する。しかし、PML ボディが遺伝子発現調節にどのように関わっているかについては、不明な点が多く残っている。

本研究で取り上げた転写因子 Bach2 (BTB and CNC homology 2) は、造血系では B リンパ球特異的に発現し、抗体クラススイッチなどを制御する BTB ドメインと塩基性ロイシンジッパードメインを有する転写因子であり、小 Maf 因子とヘテロ二量体を形成し MARE (Maf recognition elements)配列に特異的に結合し、転写抑制を行う。Bach2 は、C 末端に存在する cytoplasmic localization signal (CLS) の作用で通常は細胞質に存在するが、酸化ストレスにより核に蓄積し増殖抑制、細胞死誘導を行う。また、核内に移行した Bach2 は、PML ボディ周辺に集積する。

そこで、Bach2 の PML ボディにおける機能と集積機構を最新のバイオイメーキング技術を用いて検討した。その結果、内在性 Bach2 は PML ボディと近接した、また時に取り囲むような核内ドメイン (フォーカス) を形成していることが明らかになった。そこで、ヒト線維芽細胞株に Bach2 を発現させ、酸化ストレス誘導後で詳細な Bach2 フォーカスの局在解析を行った。その結果、Bach2 フォーカスは PML ボディとの位置関係から、1 型 ; PML ボディと全く関連しないもの、2 型 ; PML ボディに隣接しているもの、3 型 ; PML ボディを取り囲むもの、の 3 つのタイプに分類されることが示された (図 20)。

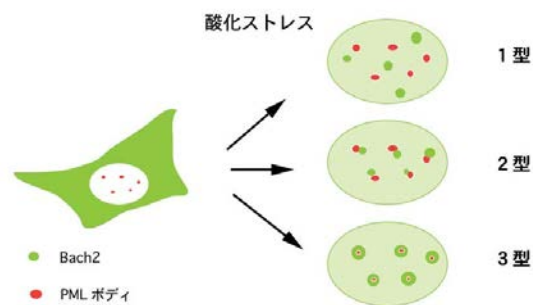


図 20 Bach2 と PML の形成する核内小構造体の分類

また、酸化ストレス誘導前は、多くの細胞で Bach2 は細胞質もしくは核に均一に分布しているが、一部の細胞では 1 型の Bach2 フォーカスが認められた。Diethyl maleate (DEM) による酸化ストレス誘導後、約 60% の細胞で 2 型および 3 型の Bach2 フォーカスが形成され、特に 3 型 Bach2 フォーカスがほぼ半数を占めることが明らかになった。Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いた FcRed/Bach2 融合蛋白質の動態解析により、Bach2 フォーカス内の Bach2 は速やかに入れ替わっていることが確認され、Bach2 フォーカスは極めてダイナミックな構造体であることが理解された。ついで、PML ボディに関連した転写活性を解析するために、BrUTP を用いた *in situ* での転写部位可視化技術確立した。この方法を用いて PML ボディ周辺は活発な転写活性を示すことを確認した。興味深いことに、酸化ストレス時に 3 型 Bach2 フォーカスに取り囲まれた PML ボディ周辺では、転写活性が選択的に抑制されていた (図 2 1)。

このことから、Bach2 は、MARE 配列特異的な転写調節に加えて、PML ボディという核高次構造に関連して核内構造体特異的な転写調節という機能も有することが示唆された。

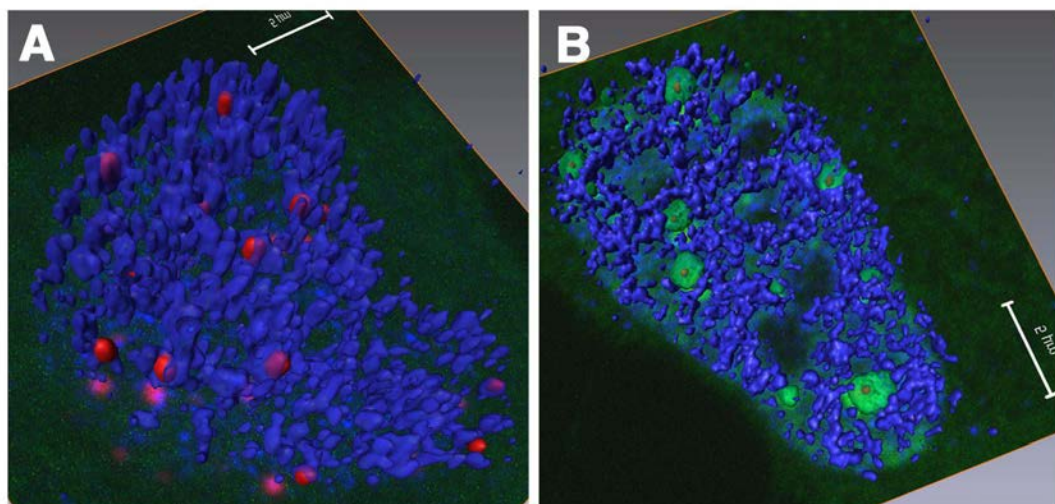


図 21 転写部位の可視化による転写抑制領域の解析

赤, PML; 青, RNA 転写部位; 緑, Bach2 をそれぞれ示す。A, Bach2 非発現細胞。B, Bach2 発現細胞で DEM 処理をしたもの。

次に Bach2 が核内フォーカスを形成するために必要な領域を同定するために、様々な変異を有する Bach2 を作成・発現し、その局在解析を行なった。その結果、Bach2N 末端側の BTB ドメインを含む領域がフォーカス形成に必須であることが明瞭に示された。最近、蛋白質修飾、特に Ubiquitin 様蛋白質 SUMO-1 の共有結合 (SUMO 化) が核内蛋白質の機能制御に重要であることが理解されつつある。PML ボディの形成においても、PML などの構成因子が SUMO 化されることが重要であることが報告されている。そこで、Bach2 の機能も SUMO 化で制御される可能性を追求した。

まず、HA-SUMO との共発現実験により、Bach2 が培養細胞内で SUMO 化されることを確認した。Bach2 にはマウスとヒトで保存されている SUMO 化コンセンサス配列が 4 カ所存在するので、これら部位に全て変異を導入したところ (Bach2KR1-4)、SUMO 化は完全に消失したので、これら 4 カ所のいずれか (あるいは全て) が Bach2 の SUMO 化部位と予想された。ついで、野生型と Bach2KR1-4 の形成する核内フォーカスと PML ボディの位置的関係を比較した。Bach2KR1-4 のフォーカス形成は、野生型 Bach2 と同様に酸化ストレスにより強く増強された。しかし、これらのフォーカスはほとんど 2 型であり、PML ボディを取り囲む 3 型フォーカスは 10% 以下であった。3 型フォーカスや PML ボディが環状の構造を示すことと合わせて考えると、Bach2 や PML が集積する「場」には SUMO 化された蛋白質が集積するための共通の「足場」構造が存在する可能性が示唆された。

以上の 2 つの結果は、Bach2 のフォーカス形成は BTB ドメインを介する蛋白質間相互作用によること、一方、このフォーカスの形成部位 (核内アドレス?) は SUMO 化により規定されることを示す。したがって、核内における Bach2 の機能部位は二重の制御により決定されているものと考えられる。

2) Bach2 および Bach1 のアセチル化に関する検討

ヒストンのアセチル化は、遺伝子発現を調節する重要な化学修飾の一つである。近年、ヒストン以外の核内蛋白質についても、アセチル化修飾により制御される例が報告されている。前述のようにこれまでの結果から Bach2 は HDAC4 などと複合体を形成することも示されている (核外移行および機能解析チーム参照)。そこで、Bach2 やその関連因子 Bach1 自体がアセチル化修飾される可能性を検討した。293T 細胞に FLAG-Bach2、FLAG-Bach1、FLAG-Nrf2、FLAG-MafK の発現プラスミドをそれぞれ導入し、免疫沈降物を小松らが開発した抗アセチル化リジンモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った (図 2 2)。この実験から、Bach2 と Bach1 はいずれもアセチル化されることが明らかになった。現在、アセチル化部位の同定を試みている。

3) ヘムによる Bach1 の活性制御

Bach1 は Bach2 の近縁転写因子であり、Bach2 と同様に Crm1 依存性の核外輸送により活性が制御されている。その核内動態を比較解析する過程で、ヘム (酸素代謝や電子伝達などに関わる生命に必須の補欠分子) が Bach1 の核外輸送を著しく促進することを見いだした。吉田チームは Crm1 阻害剤 LMB を発見するとともに、LMB 耐性 Crm1 なども開発している。

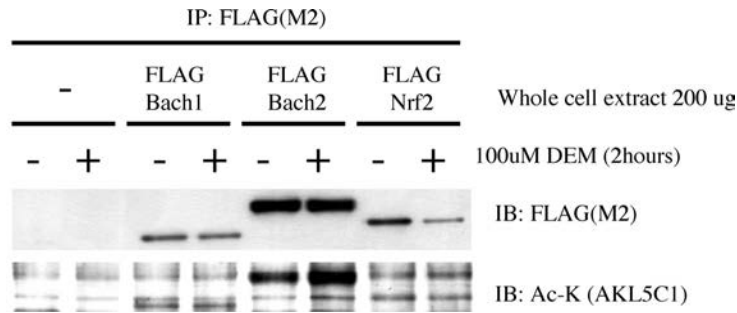


図22 Bach1 およびBach2 はアセチル化される。293T 細胞に FLAG 標識した Bach1 あるいは Bach2 発現プラスミドを導入後、FLAG 抗体で免疫沈降し、AKL5C1 抗体でアセチル化リジンを検出した。Nrf2 ではアセチル化は認められなかった。

そこで、これら試料を組み合わせることでヘムによる核外移行制御の分子機構を追求した。Bach1 は 6 ヶのヘム結合モチーフを有する。そこで、様々な組み合わせでヘム結合モチーフに変異を有する Bach1 を培養細胞で発現し、ヘム添加時の細胞内分布を比較したところ、隣り合わせで存在する 2 ヶのヘム結合モチーフがヘム応答性細胞質分布に関与することが示された。そこで、このヘム結合モチーフ 2 カ所を含む短い断片を EGFP-GST との融合蛋白質として発現し、その分布に対するヘムと LMB の効果を検討した。

その結果、図 23 に示すように、この領域は確かに Crm1 依存性の核外輸送を受けること、そしてこの核外輸送はヘムにより活性化されることを確認した。さらに断片化することにより、2 ヶのヘム結合モチーフを含む 36 アミノ酸を最小配列として決定した。この領域は典型的な核外移行シグナルとは類似しないことから、この配列は新しいタイプの核外移行シグナルであること、そしてこのシグナルと Crm1 との結合がヘムにより制御されることが考えられる (図 24)。もう一つの可能性としては、この領域は核外輸送を受ける別の蛋白質 (アダプター様分子) と結合すること、そしてこの結合がヘムにより制御されることが考えられる。

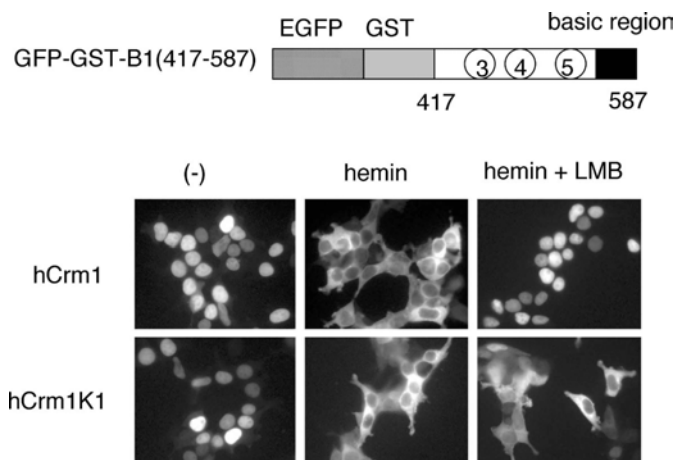


図23 Bach1 におけるヘム依存的な核外移行 EGFP と GST の C 末端に Bach1 のヘム結合モチーフ 3 ヶ (CP3-CP5) を含む 417-587 番アミノ酸残基を連結した。塩基性領域は核移行シグナルとしても機能する。このリポーターを野性型ヒト Crm1 (hCrm1) あるいは LMB 耐性 Crm1 (hCrm1K1) とともに 293T 細胞で発現し、ヘミン処理前後の分布を比較した。さらに、LMB の作用を調べた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1) 転写制御と核構造の統合的理解

本研究から、転写因子の機能が核構造と密接に関わる可能性が示された。今後は、このような分子機構が生命現象とどのように結びつくのかを、転写因子バイオロジーに立脚して統合的に理解することが重要となる。特に Bach2 がこの遺伝子プログラムを実行する上で、Bach2 フォーカスおよび PML ボディなどの核内ドメインの果たす役割が注目される。この課題に取り組む上では、Bach2 フォーカスに存在する標的遺伝子の同定が大きな問題になる。例えば、Bach2 ノックアウト B リンパ球と野生型 B リンパ球とで発現の異なる遺伝子を同定し、その遺伝子の核内局在と Bach2 フォーカスの関連を RNA-FISH と蛋白質染色などで比較検討することが可能であろう。このようなアプローチにより、転写制御と核構造との関連がより深く理解できるであろう。

2) 化学修飾ネットワークと転写因子機能の理解

アセチル化は、様々な核内蛋白質の活性制御に関わることが内外の多くの研究により示されている。しかしながら、蛋白質量の制御との関連はまだ十分には理解されておらず、Bach1 や Bach2 の研究が一つの突破口になる可能性がある。特に Bach2 複合体の解析をさらに発展させることにより、この点を追求していきたい。

3) 核内シグナリング因子としてのヘムの機能と病態への関与

ヘムは生命にとって必須の補欠分子であるが、それ自体プロオキシダントでもあり、その量は厳密に制御される必要がある。これが乱れ細胞内外の量が上昇すると、様々な酸化障害が蓄積し細胞・組織の機能異常が生じる。実際、アルツハイマーなどの神経変性疾患にヘム代謝系の異常が関与することが最近注目されつつある。一方、ヘムは抗酸化ストレスシステム（ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ 1）の発現を誘導することが長く知られていた。ヘムオキシゲナーゼはヘムを分解し、抗酸化物質ビリルビンを産生することにより細胞・組織を防御する。本研究で Bach1 がヘムオキシゲナーゼの抑制因子でもあることを見いだしているため、ヘムは Bach1 を不活性化、すなわち、核外への排出を促進することにより、ヘムオキシゲナーゼを誘導するものと予想される（図 24）。このようなシステムは、アルツハイマー病や酸化ストレス障害に関わる病態（例えば心筋梗塞や脳梗塞など）にも関与する可能性がある。今後はこのような病態におけるヘム-Bach1 の機能とその異常をさらに検討することにより、新しい薬剤標的などを同定できる可能性がある。

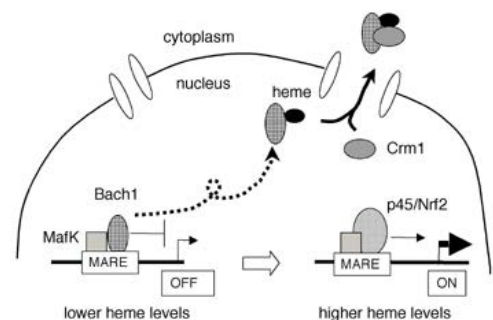
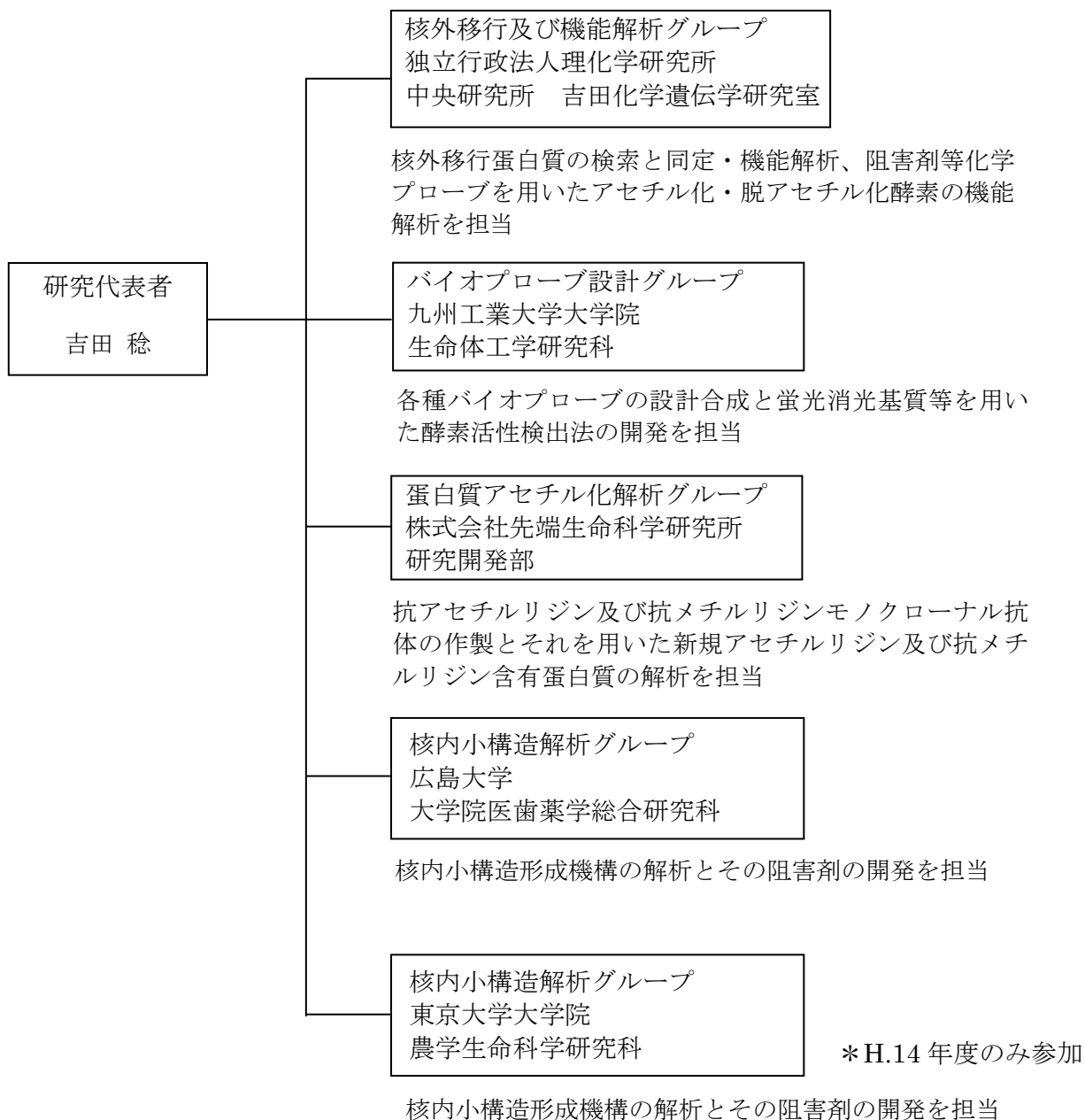


図 24 Crm1 による Bach1 の核外移行のモデル
ヘムの作用として、Bach1 と Crm1 の結合を制御する可能性、そして Bach1 と Crm1 の間に介在するアダプター分子と Bach1 の結合を制御する可能性が考えられる。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

① 核外移行及び機能解析グループ

氏 名	所 属	役職	研究項目	参加時期
吉田 稔	独立行政法人 理化学研究所	主任研究員	核外移行蛋白質の検 索と全体の統括	平成11年11月～ 平成17年3月
松山 晃久	独立行政法人 理化学研究所	CREST研究員	分裂酵母HDACの機能 解析とアセチル化蛋 白質の同定	平成12年4月～ 平成17年3月
八代田 陽子	独立行政法人 理化学研究所	CREST研究員	Gateway cloning法に よる核外輸送蛋白質 の検索	平成12年8月～ 平成17年3月
亀村 和生	独立行政法人 理化学研究所	CREST研究員	HDAC6, HDAC10の細胞 内基質の同定	平成14年12月～ 平成17年3月
星野 英人	東京大学大学院	CREST研究員	転写因子の核内小構 造局在の制御機構解 析	平成12年4月～ 平成14年3月
田代 悦	独立行政法人 理化学研究所	CREST研究員	mRNAの成熟、核外輸送 の機構解析	平成14年4月～ 平成15年3月
甲斐田 大輔	独立行政法人 理化学研究所	CREST研究員	小胞体ストレスに関 わる蛋白質の細胞内 局在制御機構の解析	平成15年4月～ 平成16年3月
西野 裕子	独立行政法人 理化学研究所	CREST技術員	HDACおよびHATアッセ イ	平成12年4月～ 平成15年9月
吉成 隆二	東京大学大学院	研究補助員	PCR、クローニング等 の実験補助	平成12年4月～ 平成13年3月
高瀬 恵	独立行政法人 理化学研究所	研究補助員	チーム内の庶事、 クローニングの実験 補助	平成11年12月～ 平成17年3月
崔 仁權	東京大学大学院	農学特定研究員	蛋白質核移行阻害剤の 探索	平成14年4月～ 平成17年3月
鎌田 綾子	東京大学大学院	博士課程3年	微小管結合蛋白質の 核局在制御の解析	平成14年4月～ 平成17年3月
西野 智則	東京大学大学院	博士課程2年	クラスIIヒストンデ アセチラーゼの細胞 内局在機構	平成15年9月～ 平成17年3月
島津 忠広	東京大学大学院	博士課程1年	新規アセチル化およ びメチル化蛋白質の 同定と機能解析	平成16年4月～ 平成17年3月
白井 温子	東京大学大学院	博士課程1年	分裂酵母メチル化蛋 白質の同定と機能解 析	平成16年4月～ 平成17年3月
田岡 洋	東京大学大学院	博士課程3年	ストレス応答性NESの 機能解析	平成12年4月～ 平成16年3月
古米 亮平	東京大学大学院	東京大学農学 特定研究員	CHAPのHDAC阻害にお ける構造活性相関	平成11年11月～ 平成14年9月

② バイオプローブ設計グループ

氏 名	所 属	役職	研究項目	参加時期
西野 憲和	九州工業大学大学院生命体工学研究科	教 授	新規 HDAC 阻害剤開発のための設計及び合成法開発	平成11年11月～平成17年3月
加藤 珠樹	九州工業大学大学院生命体工学研究科	助 教 授	新規 HDAC 阻害剤の構造解析、計算化学	平成11年11月～平成17年3月
田中 雄二	九州工業大学工学部	CREST 研究員	HDAC 用新基質の分子設計およびペプチドライブラリーの作成	平成11年12月～平成12年7月
ジョス ビノイ (Binoy, Jose)	九州工業大学大学院生命体工学研究科	CREST 研究員	HDAC 用新基質の分子設計およびペプチドライブラリーの作成	平成13年10月～平成16年6月
塚本 牧子	九州工業大学大学院生命体工学研究科	CREST 技術員	新規 HDAC 阻害剤の設計合成	平成14年5月～平成15年5月
李 曉輝	九州工業大学工学部	外国人特別研究員	新規 HAT 阻害剤の設計合成	平成13年4月～平成14年3月

③ 蛋白質アセチル化解析グループ

氏 名	所 属	役職	研究項目	参加時期
小松 靖彦	株式会社先端生命科学研究所	主任研究員	モノクローナル抗体の作製と新規アセチル化／メチル化蛋白質解析	平成11年11月～平成17年3月
岩端 寿子	株式会社先端生命科学研究所	研 究 員	モノクローナル抗体の作製と新規アセチル化／メチル化蛋白質解析	平成15年4月～平成17年3月
行武 良哲	株式会社医薬分子設計研究所分子機能部	研 究 員	抗アセチル化リジン抗体を用いた新規アセチル化蛋白質の探索	平成13年4月～平成14年3月
佐々木 敦子	株式会社ジャパンエナジー 医薬・バイオ研究所	社 員	モノクローナル抗体の作製及びキャラクタリゼーション	平成11年11月～平成13年3月

④ 核内小構造解析グループ

氏 名	所 属	役職	研究項目	参加時期
五十嵐 和彦	広島大学大学院医歯薬学総合研究科	教 授	Bach2 結合因子および修飾因子の同定	平成15年4月～平成17年3月
孫 継英	広島大学大学院医歯薬学総合研究科	研 究 員	Bach2 の SUMO 化システム	平成15年4月～平成17年3月
小野 厚	広島大学大学院医歯薬学総合研究科	博士課程3年	核内小構造体に位置する遺伝子の検討	平成15年4月～平成17年3月
善家 由香里	広島大学大学院医歯薬学総合研究科	博士課程3年	核内小構造体の転写関連因子の同定	平成15年4月～平成17年3月

⑤ 核内小構造解析グループ (H.14年度のみ参加)

氏 名	所 属	役職	研究項目	参加時期
堀之内 未治	東京大学大学院	教 授	MAD body 等核内小構造形成機構とその機能解析	平成15年4月～平成17年3月
星野 英人	東京大学大学院	CREST 研究員	転写因子の核内小構造局在の制御機構解析	平成14年4月～平成15年3月
崔 仁權	東京大学大学院	博士課程3年	蛋白質核移行阻害剤の探索	平成14年4月～平成15年3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成11年10月 7日	チーム内研究打合せ	東京大学 農学部	3	各グループ代表者による 研究計画の具体的な打合 せ
平成12年 5月18日	第1回CREST吉田チー ム研究会議	東京大学 農学部	19	チーム内の研究発表と H.12年度の戦略会議
平成14年 5月16日 ～17日	第2回CREST吉田チー ム研究会議	理化学研究所	17	チーム内の研究発表と H.14年度の戦略会議
平成15年 5月 1日	第3回CREST吉田チー ム研究会議	理化学研究所	13	チーム内の研究発表と H.15年度の戦略会議
平成16年 2月25日	PROBRAIN and CREST symposium「DNA Methylation and Histone Modifications」	国立がんセン ター 国際交流会館	120	CREST研究テーマの外部 成果発表

(2) 招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Saadi Khochbin (INSERM U309, France、所長)	Symposium「DNA Methylation and Histone Modifications」での講演および研究代 表者との研究打合せ	東京、埼玉	平成16年 2月23日 ～27日
Xiaodong Cheng (Emory University School of Medicine, U. S. A.、教授)	Symposium「DNA Methylation and Histone Modifications」での講演および研究代 表者との研究打合せ	東京、埼玉	平成16年 2月23日 ～28日
Tso-Pang Yao (Duke University, U. S. A.、助教授)	CREST共同研究代表者および研究代表者 との研究打合せ	広島、埼玉	平成16年 3月28日 ～4月4日

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内 9 件、海外 5 4 件)

<原著論文>

- 1) 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.
- 2) Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IκBα controls cytoplasmic localization of the inactive NF-κB/IκBα complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 1014-1019, 2000.
- 3) 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.
- 4) Ki, S. W., Ishigami, K., Kitahara, T., Kasahara, K., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Radicicol binds and inhibits mammalian ATP citrate lyase. **J. Biol. Chem.** 275: 39231-39236, 2000.
- 5) Masuoka, Y., Shin-ya, K., Kim, Y.-B., Yoshida, M., Nagai, K., Suzuki, K.-i., Hayakawa, Y., and Seto, H. Diheteropeptin, a new substance with TGF-β-like activity, produced by a fungus, *Diheterospora chlamydosporia*. **J. Antibiot.** 53: 788-792, 2000.
- 6) Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. **J. Biochem.** 127: 503-509, 2000.
- 7) Takizawa, T., Tatematsu, C., Watanabe, M., Yoshida, M., and Nakajima, K. Three leucine-rich sequences and the N-terminal region of double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) are responsible for its cytoplasmic localization. **J. Biochem.** 128: 471-476, 2000.
- 8) Davezac, N., Veronique, B., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yoshida, M., and Ducommun, B. Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. **Oncogene** 19: 2179-2185, 2000.
- 9) Hoshino, H., Kobayash, A., Yoshida, M., Kudo, N., Oyake, T., Motohashi, H., Hayashi, N., Yamamoto, M., and Igarashi, K. Oxidative stress abolishes leptomycin B-sensitive nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element. **J. Biol. Chem.** 275: 15370-15376, 2000
- 10) Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.-P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. **Curr. Biol.** 10: 747-749, 2000.
- 11) Kim, Y. B., Ki, S. W., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. **J. Antibiot.** 53: 1191-1200, 2000.
- 12) Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and 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.
- 13) Akakura, S., Yoshida, M., Yoneda, Y., and Horinouchi, S. A role for Hsc70 in

- regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53^{Val135}). **J. Biol. Chem.** 276: 14649-14657, 2001.
- 14) Forgues, M., Marrogi, A. J., Spillare, E. A., Wu, C.-G., Yang, Q., Yoshida, M., and Wang, X. W. Interaction of the Hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. **J. Biol. Chem.** 276: 22797-22803, 2001.
 - 15) Eleftheriou, A., Yoshida, M., and Henderson, B. R. Nuclear export of human β -catenin can occur independent of CRM1 and APC. **J. Biol. Chem.** 276: 25883-25888, 2001.
 - 16) Komatsu, Y., Tomizaki, K., Tsukamoto, M., Kato, T., Nishino, N., Sato, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Hayashi, H. Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. **Cancer Res.** 61: 4459-4466, 2001.
 - 17) Ki, S. W., Kasahara, K., Kwon, H. J., Ishigami, K., Kitahara, T., Beppu, T., Yoshida, M., and Horinouchi, S. Raicicol binds Swi1/Hsp90 and inhibits growth of specific temperature-sensitive cell cycle mutants of fission yeast. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 2528-2534, 2001.
 - 18) Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by ubiquitin-proteasome pathway. **J. Biol. Chem.** 276: 36431-36437, 2001.
 - 19) Ueki, M., Takayuki, T., Nie, L., Usami, R., Yoshida, M., and Osada, H. A new trichostatin derivative, trichostatin RK, from *Streptomyces* sp. RK98-A74. **J. Antibiot.** 54: 1093-1095, 2001.
 - 20) Yoshida, M., Furumai, R., Nishiyama, M., Komatsu, Y., Nishino, N., and Horinouchi, S. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 48(Suppl 1): S20-S26, 2001.
 - 21) Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N., and Kato, J. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27^{Kip1} mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. **J. Biol. Chem.** 277: 2302-2310, 2002.
 - 22) Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K.-I. Phosphorylation of p27^{Kip1} on serine-10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. **J. Biol. Chem.** 277: 14355-14358, 2002.
 - 23) Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Ito, A., Nixon, A., Dongen, A. V., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature** 417: 455-458, 2002.
 - 24) Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K.-I., and Watanabe, S. Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in cytokine-dependent and independent manners. **J. Immunol.** 168: 4567-4575, 2002.
 - 25) Matsuyama, A., Yoshimatsu, Y., Shimazu, T., Sumida, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., and Yoshida, M. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. **EMBO J.** 21: 6820-6831, 2002.
 - 26) Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., and Horinouchi, S. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. **Cancer Res.** 62: 4916-4921, 2002.
 - 27) Westendorf, J. J., Zaidi, S. K., Cascino, J. E., Kahler, R., Wijnen, A. J. V., Lian, J. B., Yoshida, M., Stein, G. S., and Li, X. Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with

- histone deacetylase 6 and represses the p21CIP1/WAF1 promoter. **Mol. Cell. Biol.** 22: 7982-7992, 2002.
- 28) Sakai, Y., Tsujita, T., Akiyama, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Akinaga, S., Horinouchi, S., Yoshida, M., and Yoshida, T. Gex1 compounds, novel antitumor antibiotics related to herboxidiene, produced by *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.** 55: 863-872, 2002.
 - 29) Okue, M., Watanabe, H., Kasahara, K., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Kitahara, T. Short-step synthesis of all stereoisomers of preussin and their bioactivities. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66: 1093-1096, 2002.
 - 30) Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoka, K., Yoshida, M., Tanaka, K., and Tai, T. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. **Nature** 418: 438-442 2002.
 - 31) Murakami, N., Te, Y., Kawanishi, M., Aoki, S., Kudo, N., Yoshida, M., Nakayama, E. E., Shioda, T., and Kobayashi, M. New rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from valerianae radix. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 12: 2807-2810, 2002.
 - 32) Rombouts, K., Niki, T., Greenwel, P., Vandermomde, A., Wielant, A., Hellemans, K., Bleser, P. D., Yoshida, M., Schuppan, D., Rojkind, M., and Geerts, A. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF- β 1-induced fibrogenesis in skin fibroblasts. **Exp. Cell Res.** 278: 184-197, 2002.
 - 33) Jang, B.-C., Munoz-Najar, U., Paik, J.-H., Claffey, K., Yoshida, M., and Hla, T. Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression. **J. Biol. Chem.** 278: 2773-2776, 2003.
 - 34) Bradney, C., Hjelmeland, M., Komatsu, Y., Yoshida, M., Yao, T.-P., and Zhuang, Y. Regulation of E2A activities by histone acetyltransferases in B lymphocyte development. **J. Biol. Chem.** 278: 2370-2376, 2003.
 - 35) Komatsu, Y., Yukutake, Y., and Yoshida, M. Four different clones of mouse anti-acetyllysine monoclonal antibodies having different recognition properties share a common immunoglobulin framework structure. **J. Immunol. Methods** 272: 161-175, 2003.
 - 36) 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- β signalling by Smad7. **J. Biol. Chem.** 278: 10716-10721, 2003.
 - 37) 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.
 - 38) Watanabe, L. A., Jose, B., Kato, T., Yoshida, M., and Nishino, N. Synthesis of L- α -amino- ω -bromoalkanoic acid for side chain modification. **Tetrahedron Lett.** 45: 491-494, 2004.
 - 39) Tashiro, S., Muto, A., Tanimoto, K., Tsuchiya, H., Suzuki, H., Hoshino, H., Yoshida, M., Walter J., and Igarashi, K. Repression of PML nuclear body-associated transcription by oxidative stress-activated Bach2. **Mol. Cell. Biol.** 24: 3473-3484, 2004.
 - 40) Nishino, N., Yoshikawa, D., Watanabe, L. A., Kato, T., Jose, B., Komatsu, Y., Sumida, Y., and Yoshida, M. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of cyclic tetrapeptides containing a retrohydroxamate as zinc ligand. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 14: 2427-2431, 2004.

- 41) Yoshida, M. and Sazer, S. Nucleocytoplasmic transport and nuclear envelope integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Methods** 33: 226-238, 2004
- 42) Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., Ikeda-Saito, M., Yoshida, M., and Igarashi K. Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. **EMBO J.** 23: 2544-2553, 2004.
- 43) Jose, B., Okamura, S., Kato, T., Nishino, N., Sumida, Y., and Yoshida, M. Toward an HDAC6 inhibitor: synthesis and conformational analysis of cyclic hexapeptide hydroxamic acid designed from α -tubulin sequence. **Bioorg. Med. Chem.** 12: 1351-1356, 2004.
- 44) Nishino, N., Jose, B., Shinta, R., Kato, T., Komatsu, Y., and Yoshida, M. Chlamydocin-hydroxamic acid analogues as histone deacetylase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.** 12: 5777-5784, 2004.
- 45) Jose, B., Oniki, Y., Kato, T., Nishino, N., Sumida, Y., and Yoshida, M. Novel histone deacetylase inhibitors: cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 14: 5343-5346, 2004
- 46) Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagawa, H., Matsunaga, T., Yoshida, M., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Nuclear export signal in CDC25B. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 316: 226-32, 2004.
- 47) Nishimura, S., Matsunaga, S., Lee, K.-H., Yoshida, M., Hirota, H., Yokoyama, S., and Fusetani, N. 13-Deoxytedanolide, a marine sponge-derived antitumor macrolide, binds to 60S large ribosomal subunit. **Bioorg. Med. Chem.** in press, 2004.
- 48) Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27Kip1 at G1 phase. **Nature Cell Biol.** in press, 2004.
- 49) Matsuyama, A., Shirai, A., Yashiroda, Y., Kamata, A., Horinouchi, S., and Yoshida, M. pDUAL, a multipurpose, multicopy vector capable of chromosomal integration in fission yeast. **Yeast** in press, 2004.

<その他の著作>

- 1) 吉田 稔 抗腫瘍活性ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の作用機構 遺伝子医学 6: 88-92, 2002.
- 2) 松山 晃久、吉田 稔 分裂酵母のゲノムとポストゲノム研究 生体の科学 53: 532-536, 2002.
- 3) 松山 晃久、八代田 陽子 ポストゲノム時代の大規模遺伝子機能解析 日本農芸化学会 76: 736-739, 2002.
- 4) Yoshida, M., Shimazu, T., and Matsuyama, A. Protein deacetylases: enzymes with functional diversity as novel therapeutic targets. **Progress in Cell Cycle Research** 5: 269-278, 2003.
- 5) 吉田 稔 化学遺伝学：生物学と創薬への新しいアプローチ 細胞工学 22: 136-140, 2003.
- 6) Yoshida, M., Matsuyama, A., Komatsu, Y., and Nishino, N. From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors. **Curr. Med. Chem.** 10: 2351-2358, 2003.
- 7) Yashiroda, Y. and Yoshida, M. Nucleo-cytoplasmic transport of proteins as a target for therapeutic drugs. **Curr. Med. Chem.** 10: 741-748, 2003.

- 8) 吉田 稔 化学遺伝学：生物学と創薬への新しいアプローチ 細胞工学 22: 136-140, 2003.
- 9) 吉田 稔 ヒストンデアセチラーゼ Drug Delivery System 18: 343-350, 2003.
- 10) 吉田 稔 エピジェネチクスにおけるヒストン修飾とその調節物質 分子細胞治療 2: 462-468, 2003.
- 11) 松山 晃久、吉田 稔 タンパク質アセチル化による細胞機能制御 日本農芸化学会誌 78: 27-30, 2004.
- 12) 吉田 稔 ヒストンデアセチラーゼ阻害活性の検定 癌と化学療法 31: 507-511, 2004.
- 13) Komatsu, Y., Iwabata, H., and Yoshida, M. Anti-Acetyllysine Antibody: A Useful Tool for Listening Posttranslational Language. In: Progress in Monoclonal Antibody Research, Columbus, F. ed., Nova Science Publishers, Inc., New York, in press.
- 14) Ito, A., Nishino, N., and Yoshida, M. HDAC inhibitors: Discovery, Development, and Clinical Impacts. Histone Deacetylases: Transcriptional Regulation and Other Cellular Functions, in press.

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 51 件、海外 20 件)

- 1) 新田 龍三、加藤 珠樹、小松 靖彦、吉田 稔、西野 憲和
「ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を示すクラミドシンヒドロキシザム酸アナログ」日本化学会第 78 春季年会、船橋、2000 年 3 月 28 日
- 2) 吉川 大介、渡邊 路維、加藤 珠樹、西野 憲和、小松 靖彦、吉田 稔
「アシルヒドロキサメートを導入した Cyl-2 アナログの合成とヒストンデアセチラーゼ阻害活性」日本化学会第 78 春季年会、船橋、2000 年 3 月 28 日
- 3) 西野 憲和、新田 龍三、吉川 大介、加藤 珠樹、小松 靖彦、吉田 稔
「ヒストンデアセチラーゼを阻害する環状テトラペプチドの分子設計と構造活性相関」日本生化学会九州支部例会、福岡、2000 年 5 月 14 日
- 4) 加藤 珠樹、新田 龍三、吉川 大介、小松 靖彦、吉田 稔、西野 憲和
「ヒストンデアセチラーゼ阻害環状テトラペプチドの NMR による立体構造解析」日本生化学会九州支部例会、福岡、2000 年 5 月 14 日
- 5) 西野 憲和、富崎 欣也、塚本 牧子、吉川 大介、新田 龍三、西野 秀和、田中 雄二、加藤 珠樹、小松 靖彦、西山 真、古米 良平、吉田 稔
「Hydroxamic Acid Analogs of Naturally-Occurring Cyclic Tetrapeptides, Trapoxin, WF-3161, Cyl-1, HC-Toxin and Chlamydocin Inhibit Histone Deacetylases」第 26 回ヨーロッパペプチドシンポジウム、モンペリエ フランス、2000 年 9 月 11 日
- 6) 小松 靖彦、吉田 稔「ヒドロキサム酸含有環状ペプチド (CHAP) 構造を有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤」第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000 年 10 月 5 日
- 7) 吉田 稔、堀之内 末治「抗腫瘍性細胞周期阻害剤の標的分子とその機能」第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000 年 10 月 6 日
- 8) 吉田 達彦、上田 奈緒子、酒井 康、吉田 哲朗、水上 民夫、吉田 稔、堀之内 末治「抗腫瘍活性物質ハーボキシジエンによる細胞周期阻害の作用機構」2001 年度日本農芸化学会大会、京都、2001 年 3 月 24 日
- 9) 吉田 達彦、上田 奈緒子、酒井 康、吉田 哲朗、水上 民夫、吉田 稔、堀之内 末治「抗腫瘍活性物質ハーボキシジエンによる 22kDa の C 末端切断型 p27(p27^{*})の生成機構の解析」2001 年度日本農芸化学会大会、京都、2001 年 3 月 24 日
- 10) 鎌田 綾子、工藤 信明、田岡 洋、平岡 泰、吉田 稔、堀之内 末治
「レプトマイシン B を用いた分裂酵母の核外移行蛋白質の同定」2001 年度日本農芸化学会大会、京都、2001 年 3 月 24 日
- 11) 古米 亮平、中島 秀典、小橋 信行、西山 真、吉田 稔、堀之内 末治
「ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 FK228 の阻害機構」2001 年度日本農芸化学会大会、京都、2001 年 3 月 25 日
- 12) 赤倉 新、吉田 稔、米田 悦啓、堀之内 末治
「NLS マスクによる変異型 p53 の細胞内局在性制御」2001 年度日本農芸化学会大会、京都、2001 年 3 月 26 日
- 13) 吉川 大介、新田 龍三、加藤 珠樹、小松 靖彦、吉田 稔、西野 憲和
「トラポキシシンヒドロキサム酸アナログの多種ステレオイソマーの合成とヒストンデアセチラーゼ阻害活性」日本化学会第 79 春季年会、神戸、2001 年 3 月 28 日
- 14) 加藤 珠樹、吉川 大介、新田 龍三、小松 靖彦、吉田 稔、西野 憲和
「トラポキシシンヒドロキサム酸アナログの多種ステレオイソマーの立体構造」日本化学会第 79 春季年会、神戸、2001 年 3 月 28 日

- 15) 吉田 稔 「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」CREST 公開シンポジウム「ゲノムの構造と機能」、東京、2001 年 4 月 20 日
- 16) 西野 憲和、加藤 珠樹、小松 靖彦、吉田 稔
「DESIGN OF ANALOGS OF TRAPOXIN, CYL-1, AND CHLAMYDOCIN FOR MHC CLASS-I MOLECULE UP-REGULATION」Peptides 2001, Proceedings of 17th American Peptide Symposium、San Diego, U.S.A、2001 年 6 月 10-14 日
- 17) 鎌田 綾子、工藤 信明、田岡 洋、平岡 泰、吉田 稔、堀之内末治
「レプトマイシン B を用いた分裂酵母の核外移行蛋白質の同定」酵母遺伝学フォーラム、京都、2001 年 7 月 27 日
- 18) M. Yoshida 「Chemistry and biology of HDAC inhibitors: probes for analyzing functional diversity of deacetylases」Joint International Congress on APL and Differentiation Therapy、Rome, Italy、2001 年 10 月 4 日
- 19) 吉田 稔、小松 靖彦、堀之内 末治 「ヒストンデアセチラーゼ分子種の多様性と機能分担」第 74 回日本生化学会大会シンポジウム、京都、2001 年 10 月 28 日
- 20) 吉田 稔 「レプトマイシンと FK288 の標的蛋白質 (Exportin 1 および HDAC) 認識機構」第 26 回日本分子生物学会年会ワークショップ、横浜、2001 年 12 月 11 日
- 21) 吉田 稔 「分裂酵母全ゲノム ORF のクローン化と細胞内局在、翻訳後修飾の解析」文部省科学研究費補助金・特定領域研究「統合ゲノム」主催第 4 回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」、木更津、2002 年 2 月 16 日
- 22) 住田 裕子、岡村 真二、蛭崎 修徳、西野 憲和、堀之内 末治、吉田 稔
「ジスルフィド結合を有する環状テトラペプチドのヒストンデアセチラーゼ阻害作用」日本農芸化学会 2002 年度 (平成 14 年度) 大会、仙台、2002 年 3 月 25 日
- 23) 星野 英人、白井 温子、五十嵐 和彦、三輪 佳宏、堀之内 末治、吉田 稔
「Bach2 を用いた核内転写抑制複合体の形成を阻害する物質の探索系の構築」日本農芸化学会 2002 年度 (平成 14 年度) 大会、仙台、2002 年 3 月 28 日
- 24) 松山 晃久、吉松 康裕、島津 忠広、住田 裕子、白井 建郎、小松 靖彦、長田 裕之、吉田 稔、堀之内 末治
「 α -チューブリンのアセチル化制御機構とその意義」日本農芸化学会 2002 年度 (平成 14 年度) 大会、仙台、2002 年 3 月 28 日
- 25) 斎藤 明子、松山 晃久、吉田 稔、堀之内 末治
「新規ヒストンデアセチラーゼ HDAC10 の機能解析」日本農芸化学会 2002 年度 (平成 14 年度) 大会、仙台、2002 年 3 月 28 日
- 26) 吉田 稔
「分裂酵母全ゲノム融合遺伝子ライブラリーを用いた蛋白質機能の化学遺伝学的解析」第 2 回国際分鉄酵母会議、京都、2002 年 3 月 28 日
- 27) 星野 英人、吉田 稔 「HDAC4 は転写抑制化因子 Bach2 と核内斑点状構造体に共局在する」第 6 回 がん分子標的治療研究会総会、札幌、2002 年 6 月 28 日
- 28) 住田 裕子、西野 憲和、吉田 稔 「ジスルフィド結合を有する環状テトラペプチドのヒストンデアセチラーゼ阻害作用」第 6 回がん分子標的治療研究会総会、札幌、2002 年 6 月 28 日
- 29) 星野 英人、吉田 稔 「Formation of a transcriptional repressive subnuclear structure by Bach2 and HDAC4」第 3 回 文部科学省特定領域研究「がん」6 領域 若手研究者ワークショップ、茅野市、2002 年 8 月 31 日
- 30) 西野 憲和、岡村 真二、蛭崎 修徳、加藤 珠樹、住田 裕子、吉田 稔
「DESIGN SYNTHESIS OF SS-DIMERS AND SS-HYBRIDS BASED ON CYL-1 (CYCLIC TETRAPEPTIDE) AS ANTI-CANCER PRODRUGS」The 27th

- Symposium of the European Peptide Society, Napoli, Italy, 2002 年 9 月 4 日
- 31) Minoru Yoshida 「Histone deacetylases: A family of enzymes with functional diversity as a novel therapeutic target」 Assembly Modulation and optimization of biological functions in time and space, Wako-shi, Japan, 2002 年 9 月 26 日
 - 32) Minoru Yoshida 「Mechanisms of Action of Microbial Inhibitors of Histone Deacetylase, a Novel Therapeutic Target for Cancer Treatment and Prevention」 Frontiers in Cancer Prevention Research, Boston, U.S.A., 2002 年 10 月 15 日
 - 33) Minoru Yoshida and Sueharu Horinouchi
「Identification of Novel Biological Function of HDAC6 by Differential Chemical Proteomics」 7th International Conference on the Biotechnology of Microbial Products, Honolulu, U.S.A., 2002 年 10 月 29 日
 - 34) 吉田 稔、五十嵐 和彦 「クラス II ヒストンデアセチラーゼの多様性とその機能」 第 25 回 日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 11 月 11 日
 - 35) 吉田 稔、五十嵐 和彦 「ヒストンデアセチラーゼの細胞内局在・機能・およびその阻害剤」 京都大学ウイルス研究所コロキウム「クロマチン構造変換と生命機能」、京都、2003 年 2 月 17 日
 - 36) 吉田 稔、西野 憲和 「ヒストンデアセチラーゼ阻害剤開発の現状と次世代阻害剤への展望」 第 123 年会日本薬学会、長崎、2003 年 3 月 27 日
 - 37) Minoru Yoshida 「Chemical proteomics: a new approach to chemical and molecular biology」 化学と生物国際シンポジウム Molecules in Action (international Chemistry and Biology Symposium), Fujisawa, Japan, 2003 年 3 月 30 日
 - 38) 鎌田 綾子, 吉田 稔, 堀之内 末治 「分裂酵母の Mitosis における Crm1 機能の解析」 2003 年度 農芸化学学会大会、藤沢、2003 年 4 月 2 日
 - 39) 吉田 稔 「タンパク質アセチル化による細胞機能制御」 2003 年度 農芸化学学会大会、藤沢、2003 年 4 月 3 日
 - 40) 吉田 稔 「分子標的としての核・クロマチン機能」 第 7 回がん分子標的治療研究会総会、東京、2003 年 6 月 3 日
 - 41) Minoru Yoshida and Kazuhiko Igarashi 「Functional analysis of nuclear subdomains containing histone deacetylases and Bach2」 JBS Bio-Frontier Symposium, Tsukuba, Japan, 2003 年 6 月 6 日
 - 42) Kamemura Kazuo, Atsuko Shirai, Tadahiro Shimazu, Akihisa Matsuyama, Yukiko Yoshida and Minoru Yoshida 「A role of ubiquitination and sumoylation in regulating HDAC6, a cytoplasmic histone deacetylase」
「総合がん」若手研究者ワークショップ、蓼科、2003 年 8 月 29 日
 - 43) 吉田 稔、住田 裕子、矢守 隆夫、西野 憲和 「ヒストンデアセチラーゼ阻害剤のトランスレーショナルリサーチ」 第 3 回トランスレーショナルリサーチ ワークショップ、淡路、2003 年 9 月 1 日
 - 44) 吉田 稔 「タンパク質の局在と修飾：化学遺伝学的アプローチ」 理化学研究所中央研究所生物系シンポジウム Live Cell Science へ向けて、和光、2003 年 9 月 16 日
 - 45) 吉田 稔 「がん化における転写シグナルとその抑制剤」 第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003 年 9 月 26 日
 - 46) Minoru Yoshida and Norikazu Nishino 「FUNCTIONAL DIVERSITY OF HISTONE DEACETYLASES AND THEIR INHIBITORS WITH ANTITUMOR ACTIVITY」 8th World Congress on Advances in Oncology and 6th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece, 2003 年 10 月 18 日
 - 47) Minoru Yoshida 「Chemical Genetics: a new approach to molecular and cellular biology, KCIST-2003 Cancer Research」 Cheju-Do (済州島), Korea,

2003 年 11 月 23 日

- 48) 松山 晃久、八代田 陽子、荒井 律子、鎌田 綾子、白井 温子、浜本 牧子、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母のポストゲノムサイエンス」第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月 12 日
- 49) Minoru Yoshida 「Histone code as a therapeutic target: chemistry and biology of histone deacetylase inhibitors」PROBRAIN and CREST symposium DNA Methylation and Histone Modifications、Tokyo, Japan、2004 年 2 月 25 日
- 50) Lo Chor Wai、田岡 洋、松山 晃久、谷 時雄、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母における新規な mRNA 品質管理機構に関する研究」日本農芸化学会 2004 年度（平成 16 年度）年会、東広島、2004 年 3 月 30 日
- 51) 崔 仁權、吉田 稔、堀之内 末治「B-カテニンの局在と安定性に影響を与える生理活性物質の探索」日本農芸化学会 2004 年度（平成 16 年度）年会、東広島、2004 年 3 月 30 日
- 52) Minoru Yoshida 「A NOVEL MECHANISM FOR CELL CYCLE ARREST BY A SMALL MOLECULE: TRANSLATION OF P27 PRE-mRNA BY FR901464」The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop The Cell Cycle、Nara, Japan、2004 年 4 月 14 日
- 53) 伊藤 昭博、吉田 稔「可逆的アセチル化による p53 の細胞内局在の制御」第 8 回がん分子標的治療研究会総会、鹿児島、2004 年 5 月 31 日
- 54) 吉田 稔「化学遺伝学：生物学と創薬への新しいアプローチ」生物科学セミナー（東京大学理学部）、東京、2004 年 5 月 19 日
- 55) 吉田 稔「化学遺伝学による分子標的研究と医薬への応用」第 2 回生命構造化学セミナー（東北大学農学部）、仙台、2004 年 5 月 31 日
- 56) 吉田 稔「化学遺伝学的アプローチによるヒストン脱アセチル化酵素の機能解析」大阪大学蛋白質研究所セミナー ヒストンの修飾とその機能、吹田、2004 年 5 月 31 日
- 57) Minoru Yoshida 「Chemical Genetics on novel antitumor agents」Global Trends in Cancer Research、Tokyo, Japan、2004 年 7 月 2 日
- 58) 甲斐田 大輔、田代 悦、中島 秀典、井本 正哉、吉田 稔「mRNA 品質管理機構を抑制する抗腫瘍活性物質 FR901464」第 6 回 RNA ミーティング、熊本、2004 年 8 月 5 日
- 59) 吉田 稔「エピジェネティクス制御に基づく癌治療の可能性」第 15 回日本消化器癌発生学会総会、札幌、2004 年 8 月 20 日
- 60) Akihiro Ito、Yoshiharu Kawaguchi、Tso-Pang Yao and Minoru Yoshida 「Regulation of subcellular localization of p53 by reversible acetylation」第 5 回「総合がん」若手研究者ワークショップ、茅野、2004 年 8 月 26 日
- 61) Minoru Yoshida 「LOCALIZOME: A GLOBAL ANALYSIS OF PROTEIN LOCALIZATION IN FISSION YEAST」The Third International Fission yeast Meeting POMBE 2004、San Diego, U.S.A.、2004 年 8 月 26 日
- 62) 松山 晃久、八代田 陽子、荒井 律子、白井 温子、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母の全遺伝子のクローニングとその応用」第 37 回酵母遺伝学フォーラム年会、松江、2004 年 9 月 10 日
- 63) 吉田 稔「エピジェネティクス制御に基づく創薬」第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、2004 年 10 月 1 日
- 64) 亀村 和生、吉田 稔「ユビキチン結合活性を有するヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 によるエンドサイトーシス制御」第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、2004 年 10 月 1 日
- 65) 田代 悦、中島 秀典、井本 正哉、吉田 稔「抗腫瘍活性物質 FR901464 の細胞内標的分子の同定と小胞体ストレス誘導」第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、

2004 年 10 月 1 日

- 66) 吉田 稔 「核の機能を標的とする天然物の化学遺伝学」シンポジウム：ファーマコゲノミクスの新展開 ゲノムとネットワークからケミカルゲノミクスへ、京都、2004 年 11 月 5 日
- 67) 吉田 稔 「微生物由来抗腫瘍活性物質のケミカルジェネティクス」ケムバイオシンポジウム、東京、2004 年 10 月 22 日
- 68) Minoru Yoshida 「Chemical Genetic approach to cancer therapy」Cancer and Epigenetics –Basic Research and Clinical Implication-, Hiroshima, Japan、2004 年 10 月 31 日
- 69) Minoru Yoshida 「Chemical genetics on novel anti-tumor microbial products」Current Topics on Trends in Molecular Medicine、Daegu, Korea、2004 年 11 月 5 日
- 70) Minoru Yoshida 「Chemical genetics on novel anti-tumor microbial products」UWM-RIKEN Mini Symposium on Chemical Biology、Wako-shi, Japan、2004 年 11 月 12 日
- 71) Minoru Yoshida 「Chemical Genetics on Microbial Metabolites Affecting Eukaryotic Nuclear Function」GMBIM/BMP Conference、San Diego, U.S.A.、2004 年 11 月 16 日

② ポスター発表 (国内 22 件、海外 11 件)

- 1) 小松 靖彦、諸橋 直子、深澤 富長、西野 憲和、古米 亮平、吉田 稔
「ヒドロキサム酸含有環状ペプチド (CHAP) 構造を有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤の癌化学療法剤としての可能性」日本薬学会第120年会、岐阜、2000年3月29日～31日
- 2) 西野 憲和、塚本 牧子、新田 龍三、吉川 大介、田中 雄二、加藤 珠樹、小松 靖彦、吉田 稔 「Substitution of epoxyketone moiety in naturally-occurring cyclic tetrapeptides to hydroxamic acid gives histone deacetylase inhibitors」2000環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2000)、Honolulu, U.S.A.、2000年12月17日
- 3) 田岡 洋、工藤 信明、吉田 稔、堀之内 末治
分裂酵母核外移行受容体Crm1の核外移行シグナル認識機構に関する解析」酵母遺伝学フォーラム、京都、2001年7月25日～27日
- 4) 松山 晃久、八代田 陽子、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母全遺伝子のクローニング」酵母遺伝学フォーラム、京都、2001年7月25日～27日
- 5) 星野 英人、田代 聡、五十嵐 和彦、堀之内 末治、吉田 稔「転写抑制化因子Bach2はHDAC4と核内斑点状構造体に共局在する」第26回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月10日
- 6) 松山 晃久、吉松 康裕、島津 忠広、住田 裕子、臼井 建郎、小松 靖彦、長田裕之、吉田 稔、堀之内末治「 α -チューブリンのアセチル化制御機構とその意義」第26回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月10日
- 7) 八代田 陽子、松山 晃久、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母全タンパク質可視化へ向けてのライブラリー作製」第26回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月10日
- 8) 住田 裕子、原中 沙緒理、李 曉暉、西野 憲和、堀之内 末治、吉田 稔
「合成蛍光基質を使用した新しいHDAC活性測定法の確立」第26回日本分子生物学会年会、横浜、2001年12月12日
- 9) 松山 晃久、八代田 陽子、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母の全遺伝子のクローニング」第2回国際分裂酵母会議、kyoto, Japan、2002年3月26日～27日
- 10) 八代田 陽子、松山 晃久、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母GFP融合タンパ

- ク質ライブラリーを用いて全タンパク質の細胞内局在を同定する」第2回国際分裂酵母会議、kyoto, Japan、2002年3月26日～27日
- 11) 松山 晃久、八代田 陽子、鎌田 綾子、吉田 稔「ゲノム挿入型に変換可能な多コピー型分裂酵母ベクターの開発」第35回酵母遺伝学フォーラム、広島、2002年7月25日
 - 12) 鎌田 綾子、平岡 泰、吉田 稔、堀之内 末治「レプトマイシンBを用いた分裂酵母の新規核外移行蛋白質の解析」第35回酵母遺伝学フォーラム、広島、2002年7月25日
 - 13) 住田 裕子、吉田 稔「ジスルフィド結合を有する環状テトラペプチドのヒストンデアセチラーゼ阻害作用」第61回日本癌学会総会、東京、2002年10月2日
 - 14) 古米 亮平、中島 秀典、吉田 稔「FK228(depsipeptide)のヒストン脱アセチル化酵素阻害の分子機構」第61回日本癌学会総会、東京、2002年10月2日
 - 15) 岡村 真二、蛭崎 修徳、加藤 珠樹、西野 憲和、住田裕子、吉田 稔「硫黄原子含有環状ペプチド (SCOPs) の設計合成とヒストンデアセチラーゼ阻害」第75回生化学会大会、京都、2002年10月17日
 - 16) 原中 沙緒理、加藤 珠樹、西野 憲和、住田 裕子、吉田 稔「HDAC活性測定を目的とした蛍光基質の設計合成」第75回生化学会大会、京都、2002年10月17日
 - 17) 八代田 陽子、松山 晃久、吉田 稔「Protein Localizome Analysis in Fission Yeast」The 4th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress、Taipei, Taiwan、2002年11月4日
 - 18) 松山 晃久、島津 忠広、住田 裕子、小松 靖彦、西野 憲和、吉田 稔「ヒストン脱アセチル化酵素HDAC6による α -tubulinの脱アセチル化と微小管の不安定化」第25回 日本分子生物学会年会、横浜、2002年11月13日
 - 19) 李 鍵炯、松永 茂樹、伏谷 信宏、吉田 稔、堀之内 末治「抗腫瘍活性物質13-deoxytedanolideによるストレス応答性MAPキナーゼの活性化」第25回 日本分子生物学会年会、横浜、2002年11月11日
 - 20) 松山 晃久、八代田 陽子、荒井 律子、鎌田 綾子、吉田 稔「分裂酵母全遺伝子産物の局在決定とその利用」第56回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月15日
 - 21) B. Jose、T. Kato、Y. Sumida、M. Yoshida and N. Nishino「CYCLIC TETRAPEPTIDES CONTAINING A ZINC LIGAND AS NOVEL HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS」 The 18th American Peptide Symposium、Boston, U.S.A.、2003年7月20日
 - 22) T.Kato、B. Jose、S. Okamura、S. Sumida、M. Yoshida and N. Nishino「ENDEAVORS TOWARD A SPECIFIC INHIBITOR FOR HDAC6」 The 18th American Peptide Symposium、Boston, U.S.A.、2003年7月20日
 - 23) 島津 忠広、松山 晃久、堀之内 末治、吉田 稔「新規アセチル化蛋白質の検索と同定および機能解析」 第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月10日
 - 24) 松山 晃久、白井 温子、浜本 牧子、八代田 陽子、岩端 寿子、小松 靖彦、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母のプロテオーム解析：SDS-PAGE上での全タンパク質の泳動位置決定と新規化学修飾タンパク質の検索」 第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月11日
 - 25) 亀村 和生、白井 温子、島津 忠広、松山 晃久、吉田 雪子、吉田 稔「ヒストン脱アセチル化酵素HDAC6はエンドサイトーシスを負に制御している」第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月11日
 - 26) Yoko Yashiroda、 Eriko Kibe and Minoru「Importin β Family Proteins in Schizosaccharomyces pombe」 43rd Annual Meeting The American Society

- for Cell Biology, San Francisco, U.S.A., 2003年12月17日
- 27) Ritsuko Arai, Akihisa Matsuyama, Yoko Yashiroda, Ayako Kamata and Minoru Yoshida 「Global analysis of protein localization in fission yeast」 43rd Annual Meeting The American Society for Cell Biology, San Francisco, U.S.A., 2003年12月17日
- 28) Kazuo Kamemura, Atsuko Shirai, Sandrine Curtet, Tadahiro Shimazu, Akihisa Matsuyama, Yukiko Yoshida, Saadi Khochbin and Minoru Yoshida 「HDAC6, a cytoplasmic histone deacetylase, negatively regulates endocytosis of growth factor receptors」 The 8th Korea-japan Cancer Research Workshop, Naha, Japan, 2003年12月20日
- 29) Akihisa Matsuyama, Atsuko Shirai, Sueharu Horinouchi and Minoru Yoshida 「MOBILITOME: A GLOBBAL ANALYSIS OF THE GEL MOBILITY OF PROTEINS ENCODED BY THE FISSION YEAST GENOME」 The Third International Fission yeast Meeting POMBE 2004, San Diego, U.S.A., 2004年8月27日
- 30) N. Nishino, B. Jose, T. Kato, M. 「A BRIDGE BETWEEN NATURAL PRODUCTS TO CANCER DRUGS: TOWARD SUBCLASS SELECTIVE CYCLIC-PEPTIDE-INHIBITORS OF HISTONE DEACETYLASES」 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Prague, Czech Republic, 2004年9月5日～10日
- 31) 白井 温子、松山 晃久、堀之内 末治、吉田 稔「分裂酵母におけるプロテオーム解析：SDS-PAGEにおける泳動位置決定」第37回酵母遺伝学フォーラム年会、松江、2004年9月9日～10日
- 32) 荒井 律子、松山 晃久、八代田 陽子、吉田 稔「分裂酵母全遺伝子産物の局在決定」第37回酵母遺伝学フォーラム年会、松江、2004年9月10日
- 33) 甲斐田 大輔、田代 悦、中島 秀典、井本 正哉、吉田 稔「抗腫瘍活性物質FR901464はpre-mRNAの翻訳を引き起こす」第63回日本癌学会学術総会、福岡、2004年10月1日

③ プレス発表

なし。

(3) 特許出願（国内 5 件、海外 1 件）

① 国 内

発明者：小松靖彦、吉田 稔

発明の名称：アセチルリジン認識モノクローナル抗体及びその製造方法

出願番号：特願 2001-74263

出願日：2001 年 3 月 15 日

出願人：科学技術振興事業団、株式会社ジャパンエナジー

発明者：吉田 稔、西野憲和、堀之内末治

発明の名称：蛍光又は発光基質を用いたヒストンデアセチラーゼ活性測定法

出願番号：2001-358583（優先権主張番号特願）、2002-335851（特願）

出願日：2001 年 11 月 22 日

出願人：科学技術振興事業団

発明者：吉田 稔、松山晃久

発明の名称：多コピー型・ゲノム挿入型の選択両用ベクター

出願番号：特願 2002-81360
出願日：2002 年 3 月 22 日
出願人：科学技術振興事業団

発明者：小松靖彦、岩端寿子
発明の名称：メチルリジンを認識する抗体及びその製造方法並びにその利用
出願番号：特願 2003-403313
出願日：2003 年 12 月 2 日
出願人：株式会社先端生命科学研究所

発明者：小松靖彦、岩端寿子
発明の名称：アセチルリジンを認識するマウスモノクローナル抗体、標識抗体及びその利用
出願番号：特願 2004-203648
出願日：2004 年 7 月 9 日
出願人：株式会社先端生命科学研究所

② 海 外

発明者：小松靖彦、吉田 稔
発明の名称：アセチルリジン認識モノクローナル抗体及びその製造方法
出願番号：PCT/JP02/02330
出願日：2002 年 3 月 13 日
出願人：科学技術振興事業団

(4)新聞報道等

① 新聞報道 2 件

- (ア) 第60回日本学会総会からがんの診断、治療、予防の最新情報として報道された。(2001年9月29日 日刊ゲンダイ)
- (イ) αチューブリンの脱アセチル化に関わるタンパク質を特定したことについて報道された。(2002年5月23日 日刊工業新聞)

② 受賞

なし。

③ その他

なし。

(5)その他特記事項

海外特許「アセチルリジン認識モノクローナル抗体及びその製造方法」(出願番号：PCT/JP02/02330)について、米国サンタクルーズ社へ技術移転許諾中。

7. 結び

本研究の大きな目標の1つであった分裂酵母の全ゲノム ORF のクローン化と蛍光蛋白質との融合蛋白質発現による核外移行蛋白質の網羅的な解析は達成することができた。単独の研究室で行うには、無謀とも思われる巨大プロジェクトであったが、GATEWAY 法の採用、多コピー・染色体挿入両方ベクターの開発などを通じて期間内に完了できたことは我々にとって大きな自信につながった。また、これらの ORF は単に分裂酵母のコミュニティーだけでなく、広く細胞生物学領域における貴重な研究材料として今後利用されていくことは間違いないと思われる。今後クローンの効率のよい分譲のために、独立行政法人理化学研究所のバイオリソースセンターで取り扱いが可能になるようにしていきたい。

今回のプロジェクトでは、同様に分裂酵母からのアセチル化蛋白質のスクリーニングについても全遺伝子産物をウェスタンブロット解析することによって一通りの探索が終了した。分裂酵母内でのアセチル化蛋白質が7種（14 遺伝子）という結果は、当初の想像よりも少なかった。これはアセチル化酵素の活性が律速となっているため、基質蛋白質の過剰発現が必ずしもアセチル化の上昇にはつながらず、多くのアセチル化蛋白質が検出限界以下だった可能性、用いたアセチル化リジン抗体の特異性がまだ十分低くなく、一定の配列を持ったアセチル化蛋白質が優先的に検出された可能性などが考えられる。そこで現在はアセチル化酵素の過剰発現、個々の遺伝子産物の質量分析やアセチルリジンの化学定量などさらなる方法論の開発を検討している。一方、同様のメチル化リジン抗体による探索により、これまでほとんど未踏の領域である非ヒストンメチル化蛋白質の解析も行い、多数の非ヒストンメチル化蛋白質を同定できたのは、当初の研究目標を超えた成果であった。

これらの成果は元 CREST 研究員松山、八代田両博士をはじめ、多くの研究員、技術員、学生の力を結集したものである。また、研究代表者が 2002 年 4 月に理化学研究所に異動したあとは、理化学研究所の職員、特に基礎科学特別研究員荒井博士、理化学研究所技師小林、関戸両氏など、多

くの方々の協力を仰いでここまでたどり着いたものであることを銘記したい。一方でこれらの分裂酵母ポストゲノム研究の成果を報告書提出までに出版できなかった点はきわめて残念である。現在、Localisome、

Mobilisome 双方のプロジェクトとも最終



2002 年理化学研究所における新研究室発足時のメンバー
前列中央が研究代表者

的な仕上げを行っており、是非研究期間の最終的な終了となる平成17年3月までには成果を論文発表とホームページによって公開したいと考えている。

本プロジェクトは九州工業大学西野憲和教授、ジャパンエナジー株式会社小松靖彦博士を共同研究グループリーダーとして加えて発足した。研究開始当初まだHDAC酵素の立体構造は不明であり、西野教授の阻害剤研究から亜鉛酵素であることが推定された。環状テトラペプチドをベースにTPXの活性基であるepoxyketoneを他の亜鉛配位子と置き換えることによって強力なHDAC阻害活性を与えることから、その仮説の妥当性が示された。最終的には、

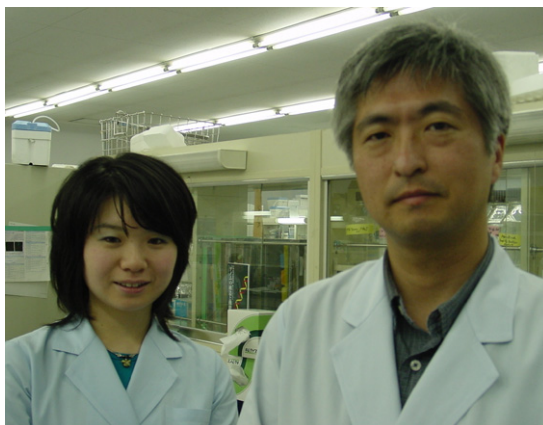
1999年に細菌由来の関連酵素HDLPについて、2004年に真のHDAC酵素の1つHDAC8のX線結晶構造解析が報告され、当初の仮説が正しかったことが証明された。さらに得られた各種亜鉛配位子を持つ環状テトラペプチド系HDAC阻害剤は、酵素阻害に関する特異性を有すること、チオールのようにジスルフィド形成することによってプロドラッグ化できるなど、多様な特徴を持つものを得ることができた。これらは現在、世界中で競争となっている治療薬としてのHDAC阻害開発研究のトップをいくものとなった。小松博士の樹立したいくつかの抗アセチル化リジンモノクローナル抗体は本研究におけるアセチル化蛋白質の検出に不可欠であっただけでなく、アセチル化研究全体の必需品として世界的に多数の分譲依頼を受けている。さらに本抗体の特許は米国試薬メーカーへの実施許諾を行い、本研究における実用化の第1号となっている。本プロジェクトは基礎研究の推進を担うこうした新しい研究材料の開発に大きな成果があり、それに支えられる形で進展したといえる。

本研究の過程でHDAC4と転写抑制因子

Bach2が複合体を形成し、それが核内で構造体（フォーカス）を形成することを見出したことをきっかけに、核内構造と核機能の解析へも踏み込むことができた。この分野については、2003年からチームに参加した広島大学医学部五十嵐和彦教授によって精力的に進められ、期待通りの成果が挙げられた。五十嵐教授が以前から研究対象としていたBach1やBach2は、研究代表者との共同研究の結果、Bach2/HDAC複合体が酸化ストレスに応答して核内を

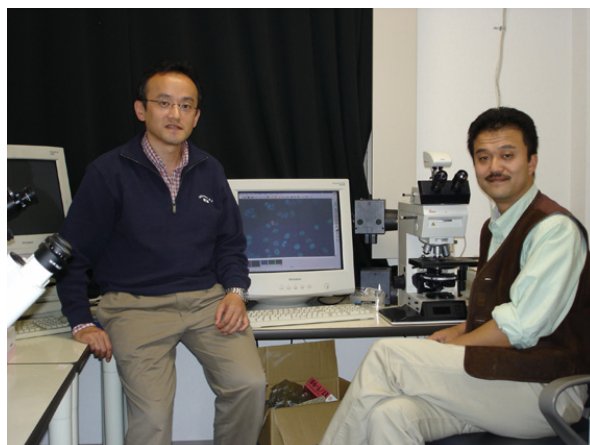


西野研究室における合成研究風景
一番奥が西野教授



蛋白質アセチル化解析グループの小松博士
(右) および岩端氏(左)

移動し、PML ボディでの転写抑制に関わること、Bach1 についてはヘム結合に依存した核外移行を受けることなどが明らかになり、転写制御因子のユニークな挙動としてトピックとなった。また、ともにアセチル化や SUMO 化などの翻訳後修飾によって制御されることが明らかになりつつあり、本研究プロジェクトが目指した核内因子の局在と修飾に関する化学遺伝学的研究にふさわしい成果となった。



2003 年より核内小構造グループのリーダーとして本研究に加わった広島大学五十嵐教授（左）と田代助教授（右）

5 年間にわたる CREST 研究による支援により、ゲノム機能の領域に対してある程度十分な貢献ができたと考えている。一方で中間評価の際の指摘にもあったように、研究代表者グループの大部分のエネルギーが分裂酵母の全 ORF のクローン化とその発現、観察に注がれたため、この間に決して多数の論文発表ができたわけではなかった点が残念な点の 1 つである。しかし、この 5 年間の支援により、さまざまな研究に利用可能なシステムと材料が整ってきており、今後の研究展開は爆発的であろうと考えている。その点からいえば、今後の論文発表には大きな期待と自信を持っている。

研究費の使用に関しては、JST 側から十分な配慮があり、大変運用しやすいと感じた。したがって個人的には、JST がより大きな予算を獲得し、広範な支援活動を行っていただきたいと感じている。また、特許に関しても途中からではあったが、日本版バイドール法が採用され、よりスムーズに知財権の獲得・保護が可能になったことは大変喜ばしいことであった。

1 つ心残りなのは、本研究によって特に分裂酵母の全 ORF の単離とその発現系という世界でも唯一の実験系がここに誕生したにもかかわらず、これを活用していくためのプロジェクト研究の予定がないという点である。例えば、世界的にもポストゲノム研究の潮流は、蛋白質へ移行しており、しかも蛋白質の最終形ともいえる翻訳後修飾の網羅的解析は、機能解析・創薬の両面から世界的な競争が始まっている。その中で分裂酵母の全遺伝子の発現系は、いわゆるリバースプロテオミクスを可能にする点で、また、翻訳後修飾と密接に関連する蛋白質の局在情報が全ての蛋白質について存在する点から大きな優位性を持っており、このまま研究が滞るのは大きな損失と思われる。現在の CREST のシステムでは、過去の支援によって得られた成果を次のステップへ進めるための方策に若干不足しているように思われる。例えば、継続課題の拡充や、その後の進捗に応じて複数回の継続申請を認めるなどの方策を考えていただけるとありがたい。

最後にご支援いただいた大石道夫総括をはじめとする評価委員の先生方、JST 関係者、牧口信義技術参事をはじめとするゲノム事務所の方々、当研究室において日頃から献身的に本研究を支えてくださった事務担当高瀬恵氏に深く感謝いたします。