

平成23年6月3日現在

機関番号： 82401
研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2008～2010
課題番号： 20611022
研究課題名(和文)
核機能の解明を目指した分裂酵母のケミカルローカリゾーム解析
研究課題名(英文) Chemical localizome analysis using fission yeast for understanding nuclear function
研究代表者
八代田 陽子 (YASHIRODA YOKO)
独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員
研究者番号： 60360658

研究成果の概要(和文)：

抗癌活性をもつ化合物 Spliceostatin A (SSA) はスプライシングに必要な SF3b 複合体に結合し、スプライシング機能を阻害する。本研究では、SSA による分裂酵母全タンパク質の細胞内局在(ローカリゾーム)に対する影響を網羅的に解析する「ケミカルローカリゾーム」解析を実施した。SSA 処理後に核小体へ移行するタンパク質にはリボソーム生合成に関与するものが多く存在していた。この結果より、Spliceostatin A がリボソームプロセッシング過程に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Spliceostatin A (SSA), a methylated derivative of a potent antitumor microbial metabolite FR901464, was found to cause pre-mRNA accumulation and translation in mammalian cells. SSA inhibits splicing and nuclear retention of pre-mRNA binding to the splicing complex. In this study, I performed chemical localizome analysis using fission yeast for identifying proteins whose subcellular localizations were changed upon treatment with SSA. I found that significant number of proteins altered their localization to the nucleolus and that those proteins were involved in ribosomal biogenesis, suggesting that SSA impinges on ribosomal processing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学遺伝学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：分裂酵母、ローカリゾーム、スプライシング

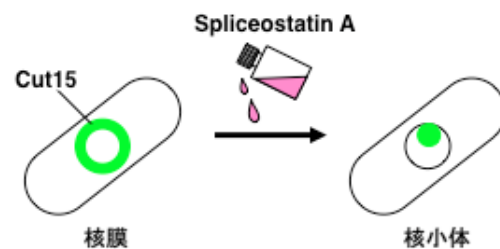
1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において、すべての遺伝子産物（タンパク質）に対する低分子化合物を網羅的にスクリーニングし、それらの化合物を用いて生命現象を解明する「ケミカルプロテオミクス」研究は、創薬分野のみならず基礎生物科学分野においても有益な情報・新たな知見をもたらす重要な学問分野であることは言うまでもない。研究代表者らはこれまでに、分裂酵母の約 5,000 個の全遺伝子をクローニングし、YFP (Yellow Fluorescent Protein) 融合型遺伝子ライブラリーを作製し、生細胞中の YFP 蛍光像を検出することで分裂酵母全タンパク質の局在決定（ローカリゼーション）を行い、このライブラリーと低分子化合物を組み合わせた「ケミカルプロテオミクス研究」を行ってきた (Matsuyama *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2006)。タンパク質の核外輸送因子 Crm1 は核外移行シグナル (NES; nuclear export signal) と呼ばれるロイシンが豊富な疎水性のコンセンサス配列を認識して核から細胞質へとタンパク質を輸送する。研究代表者の所属研究室では、強力な細胞周期停止作用、抗腫瘍作用などを持つ放線菌由来の抗真菌抗生物質 Leptomycin B (LMB) が Crm1 を阻害することを報告していた (Fornerod *et al.*, *Cell*, 1997)。申請者らは LMB を用いて、Crm1 により局在が制御される分裂酵母タンパク質の網羅的同定を行った (Matsuyama *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2006)。YFP 融合型遺伝子ライブラリーを導入した分裂酵母形質転換体に LMB を処理し、その局在の変化するタンパク質をスクリーニングした結果、285 個のタンパク質が LMB により局在が変化することがわかった。これらのうち、転写因子 Pap1 や MAP キナーゼキナーゼの Wis1 など、すでに Crm1 の基質として同定されていたタンパク質も含まれていたが、前述の NES コンセンサス配列をもたないタンパク質が約半数以上存在した。しかも驚くべきことに 80 個のタンパク質が LMB 処理した場合に核内で紡錘体様の微小管構造上に局在化した。この結果は、Crm1 が微小管構築およびそれに関与したタンパク質の核膜を介した移行に関与するという、Crm1 の新たな機能を浮かび上がらせた。一つの生物の全タンパク質局在の化合物による影響を調べた研究は、国内外を問わずこの研究以外に報告された例はなかった。このような、1 つの化合物を起点としてタンパク質の細胞内局在の変化を指標として全タンパク質の局在（ローカリゼーション）の可視化スクリーニングを実施する「ケミカルローカリゼーション」解析は、「局在制御」という観点から新たな機能を導き出す極めて有効なスクリーニング法といえる。

抗がん活性を有する、緑膿菌からの単離化

化合物 FR901464 (FR) の作用機序解明を目的とし、FR のメチルアセタール改変体 Spliceostatin A (SSA) を用いた解析の過程で、FR および SSA は動物細胞において pre-mRNA の蓄積と翻訳を引き起こすことがわかり、SSA の標的タンパク質としてスプライシング因子 SF3b 複合体が単離された (Kaida *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007)。実際に SSA は *in vitro* でのスプライシング反応を阻害し、蓄積した pre-mRNA の一部が核外に輸送、もしくは漏れだしていることが明らかとなった。以上のことから、SF3b 複合体が mRNA および翻訳異常の監視機構に関与していることがわかった (Kaida *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007)。一方、全ゲノム中の約 43% の遺伝子にイントロンが存在している分裂酵母を用いた解析から、分裂酵母細胞でも動物細胞と同様に SSA 処理により pre-mRNA の蓄積と翻訳が起こることが明らかになった (Lo *et al.*, *BBRC*, 2007)。さらに非常に興味深いことに、SSA 処理によって、核膜孔複合体に繫留し主に核膜上に局在化している核輸送担体 importin α (Cut15) (核局在シグナル NLS をもつタンパク質を認識し細胞質から核へ輸送する) が核小体に局在するという劇的な局在変化が見出された (図 1)。これまでに核一細胞質間輸送を担う importin α の mRNA・翻訳監視機構への関与や核小体への局在化についての報告はない。

図 1 SSA 処理による Cut15 の局在変化



2. 研究の目的

YFP 融合型遺伝子ライブラリーを導入した分裂酵母形質転換体を、スプライシング因子を標的とする化合物 Spliceostatin A (SSA) で処理することにより、局在の変化するタンパク質探索を行う「ケミカルローカリゼーション」研究を展開し、この化合物の作用機序解明を行うことにより、SSA の作用機序解明および核機能の理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 薬剤感受性株を宿主とした YFP 融合遺伝子導入株ライブラリーの作製

多剤耐性遺伝子 *pmd1* (薬剤排出ポンプをコードする) は SSA 耐性を担う (Lo *et al.*, *BBRC*, 2007)。

一方、薬剤排出ポンプをコードする別の遺伝子 *bfr1* は SSA 以外の薬剤に対して耐性付与することがわかった (Arita *et al.*, *Mol. BioSyst.*, 2011)。そこで両遺伝子 (*pmd1*, *bfr1*) を破壊し、SSA をはじめとする多様な薬剤に対する超感受性株を宿主とした YFP 融合遺伝子導入株ライブラリーを構築した。*pmd1 bfr1* 二重遺伝子破壊株に所属研究室所有の 4,848 個の YFP 融合遺伝子を導入する。4,848 個の YFP 融合遺伝子のうち、野生型株に導入した際に実際に蛍光が確認できた遺伝子数は 4,431 個であったが (Matsuyama *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2006)、すでに全クローンプラスミドは 96 穴プレートフォーマットで分注済みのため、YFP 蛍光ポジティブな遺伝子を選別せず、そのフォーマットのままで全遺伝子を用いて形質転換を行うこととした。

(2) SSA により細胞内局在の変化するタンパク質の可視化スクリーニング

①のライブラリーの各細胞株を発現誘導培地で一晚培養し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SSA で 3 時間処理後、YFP 蛍光像をコントロール (溶媒=メタノールのみで処理した細胞) と比較する。

4. 研究成果

様々な薬剤に超感受性を示す分裂酵母株を宿主に用いて、YFP 融合型の全タンパク質可視化ライブラリーを完成させた。それを用いて、SSA により局在変化の起こるタンパク質を網羅的に探索したところ、4,489 タンパク質のうち、全体の約 3% にあたる 141 タンパク質が局在変化を示した (図 2)。変化するタンパク質の中には、すでに研究代表者らが発見していた核輸送担体 importin α (Cut15) も含まれていた。

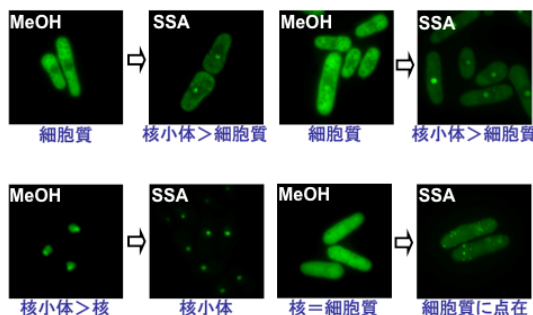


図 2 SSA 処理により局在の変化したタンパク質の例

局在変化のパターンとして、細胞質のドットや核小体に移行するタンパク質が多く見られた (図 2, 3)。局在変化を示したタンパク質をコードする遺伝子群について、Gene Ontology (GO) Term の統計学的抽出を行った

ところ、「Biological process」において「RNA 代謝」、「核酸代謝」、「転写」関連遺伝子が有意に濃縮されていることがわかった。特に核小体へ移行するタンパク質にはリボソーム生合成に関与するものが多く存在していた。この結果より、Spliceostatin A がリボソームプロセッシング過程に影響することが示唆された。

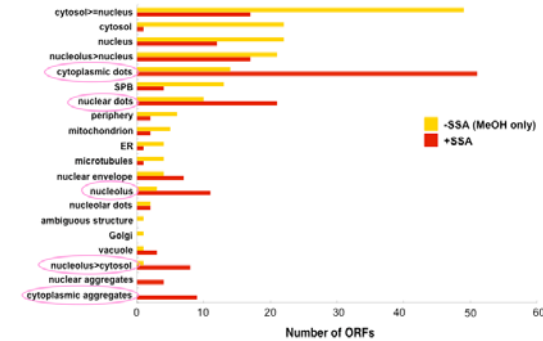


図 3 141 タンパク質の細胞内局在変化パターンの傾向

次に、SSA 処理による局在変化が SSA の標的分子である SF3b 複合体に依存するかどうかを確認するため、SF3b 複合体因子である Prp10 および Prp12 をコードする遺伝子の高温感受性変異株における Cut15 の局在を観察した。YFP 融合型 Cut15 タンパク質発現クローンを導入した *prp10-1* 変異株および *prp12-1* 変異株を発現誘導培地で非制限温度下 (26°C) で一晚培養後、制限温度下 (37°C) に温度シフトし、3 時間培養してから Cut15 タンパク質の局在を観察したところ、どちらの変異株においても制限温度下で、SSA 処理時と同様に核小体への移行がみられた。

また、上記 SF3b 複合体の因子をコードする遺伝子変異株を用いて、リボソーム生合成に変化が見られるかどうかポリソーム解析を行ったところ、一部の變異株においてポリソーム形成が減少していることが見出された。よって、SF3b 複合体はポリソーム形成に関与することが示唆された。

一つの生物の全タンパク質の細胞内局在を同定するという網羅的解析 (ローカリゾム) は出芽酵母においても行われていたが (Huh *et al.*, *Nature*, 2003)、出芽酵母において、その局在情報のケミカルローカリゾムへの応用例は国の内外を問わずこれまでに報告されていない。本研究計画は、申請者らがこれまでに報告してきた局在情報をもとにしたケミカルローカリゾムの第 1 例 (LMB を用いた核外輸送タンパク質の同定) に次ぐ例として実施された。本研究結果より、SSA の標的分子であるスプライシング因子の「リボソームプロセッシング」への関与を示唆することができた。今後、このメカニズムを詳細に解析することにより、スプライシング因子の新たな機能の発見および「核小体」機能の理解へもつながると考える。また、本研究計画において作製された薬剤感受性分裂酵母株を宿主とした YFP 遺伝子導入株

ライブラリーはこれからのケミカルバイオロジーの発展に寄与する重要なツールとなるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

① Yoko Yashiroda, High-throughput phenotypic screening for small molecules using fission yeast, The 1st RIKEN Chemical Biology Department International Symposium, September Sep. 25th, 2008, Atami, Japan.

② 吉岡幸江、八代田陽子、関戸茂子、小林ゆみ子、松山晃久、川崎寿、吉田稔、化合物処理によるタンパク質局在変化を指標とした Spliceostatin A の作用機序解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京

[図書] (計 1 件)

Shinichi Nishimura, Yoko Yashiroda, and Minoru Yoshida, Chemical Genomics Based on Yeast Genetics, in *Protein Targeting with Small Molecules: Chemical Biology Techniques and Applications*, ed. H. Osada, John Wiley and Sons, Hoboken, 2009, pp. 223-237

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八代田 陽子 (YASHIRODA YOKO)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

60360658