

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26280108

研究課題名(和文)核輸送を介した転写因子およびエピジェネティック因子の制御と標的治療への応用

研究課題名(英文)Control of transcription factors and epigenetic factors via nuclear transport and its application to targeted therapy

研究代表者

金子 寛生 (KANEKO, Hiroki)

日本大学・文理学部・上席研究員

研究者番号：10349946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：次の3つのテーマについて研究を行い、核輸送機構の解明に貢献した。(1)転写因子 Oct3/4とインポーチン の複合体構造の予測を行った、(2)核局在化シグナル(NLS)の動的構造に関する網羅的解析を行った、(3)積み荷蛋白質が輸送蛋白質インポーチン からリリースされる機構を解明した。

また、エピジェネティック因子EZH2の2カ所のNLSを特定し、その核内輸送機構を推察した。さらに、EZH2を含むPRC2複合体の形成を阻害する化合物を設計・開発し、リンパ腫などに対する標的治療の可能性を探索した。

研究成果の概要(英文)：To contribute to the elucidation of nuclear transport mechanisms we have (1) predicted the structure of the complex formed between transcription factor Oct3/4 and importin ; (2) performed a comprehensive analysis of the dynamic structure of nuclear localization signals (NLS); and (3) elucidated the release mechanism of cargo proteins from importin . In addition, we identified two NLS sites in epigenetic factor EZH2 and inferred its nuclear import mechanism. Furthermore, we designed and developed chemical compounds that inhibit the formation of the PRC2 complex including EZH2 and then explored their potential for the targeted therapy of lymphomas and other cancers.

研究分野：計算構造生物学 生体生命情報学

キーワード：核輸送 NLS 生体生命情報学 発現制御 インポーチン 転写因子 エピジェネティクス 計算構造生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞・組織特異的な遺伝子の発現制御は、その場所で特異的に発現している転写因子の働きに加え、エピジェネティックな制御によるクロマチン構造の変化に基づくことがわかってきている。このメカニズムを正確に理解することは、発生学の進展のみならず、高品質な iPS 細胞の作製、ガンをはじめとする遺伝子発現の異常に基づく疾患の治療へと結びつく。これらの研究は近年精力的に行われているが、DNA、転写因子、ncRNA などがどのようにエピジェネティック因子と関わり、どのようなメカニズムで適切な時期に、適切な細胞・組織で、特定の遺伝子の発現を制御しているかについては、ほとんど未解明であると言ってよいだろう。

このような背景のもと、研究代表者らは、転写因子が核内にどのような機構で輸送され、それがどのように細胞の分化・未分化に影響を及ぼすかについて研究を続けてきた。その結果、転写因子の核内への輸送は、インポーチン α の種類の違いによって、制御されていて、その輸送形態も転写因子ごとに異なることを明らかにした。また、その制御が、未分化 ES 細胞の多能性維持や細胞運命の決定に関与していることを実験的に証明した。

しかし、転写因子以外にも、核内に運ばれ、遺伝子の発現を制御しているエピジェネティック因子(DNAメチル化酵素、ヒストン修飾酵素、クロマチンリモデリング因子など)が存在する。それらは、何らかの物質によって核内へ輸送され、何らかの機構によって標的遺伝子へ誘導されなければその機能を発揮できない。代表者は、このような機構の解明こそが、組織特異的な遺伝子の発現制御の真の理解につながると考えると同時に、核輸送が標的遺伝子への誘導になんらかの寄与をしているのではないかという仮説を立てた。

さらに、核輸送を介して、転写因子・エピジェネティック因子を制御することは、遺伝子発現の変化によって起こる疾患(ガン、生活習慣病、精神疾患など)の新規な標的治療法の開発につながると考え、これを目指すこととした。

2. 研究の目的

転写因子・エピジェネティック因子の核輸送機構の解明と輸送制御に基づく新規標的治療法の創出を目的とし、次の課題について研究を行った。

- (1) 転写因子の核内輸送機構について未解明な部分を明らかにする。
- (2) エピジェネティック因子の核内輸送機構を解明する。
- (3) 核輸送蛋白質インポーチンが転写因子・エピジェネティック因子を標的遺伝子へ誘導することにも関与しているかどうかについて調べ、様々な関連分子群との相互作用を解明する。

(4) 核輸送操作を利用した遺伝子特異的/組織特異的に制御可能なエピジェネティック治療法を探索する。

3. 研究の方法

蛋白質同士のドッキング計算は、主に ClusPro 2.0 を用いて行った。蛋白質と低分子リガンドとの 1:1 または in silico スクリーニングのドッキング計算は、myPresto を用いて行った。分子動力学計算は、すべて Amber 11 を用いて行った。これらの計算において、相互作用が実験的に明らかになっている部分については、それらをできるだけ再現するように拘束条件を加えた。低分子ドッキングおよび分子動力学の計算には、本研究課題において購入させていただいた高性能ワークステーション HPC5000-XI216TS-D8 を用いた。

分子の表示、構造の観察は、Insght II により、グラフィックスワークステーションと 3D ディスプレー装置を用いて行った。また、分子の重ね合わせ・比較、分子動力学ムービーの作成、分子の表示、構造の観察、論文作成には、Chimera を用いた。

蛋白質構造のデータベースとして PDB を用い、蛋白質の配列・機能の解析用データベースには、主に UnipPotKB を用いた。解析用のソフトは、一部、Python, R などを用いて自作した。計算およびデータ解析は、日本大学の山岸研究員と島田上席研究員の協力を得て行った。遺伝子発現およびパスウェイの解析は、GeneSpring, IPA, NextBio を用いて、大阪大学・奥崎助教と連携して行った。

インポーチン α の変異体作製、核輸送に関する全ての実験は、日本大学・安原准教授(連携研究者)が行った。EZH2の核輸送に関する実験は、名古屋大学・近藤教授(連携研究者)の研究室で行われた。リアルタイム PCR、ペプチド合成などを含むその他の実験は、外部受託にて行った。

4. 研究成果

(1) 転写因子の核内輸送機構について未解明な部分を明らかにする。

①核局在化シグナル(NLS)の動的構造に関する網羅的解析

NLS(Nuclear Localization Signal)の配列に関する網羅的研究や特定の NLS 部分が核輸送蛋白質インポーチン α に結合した際の構造を議論している研究等は存在するものの、NLS の立体構造を網羅的に研究した例は世界的にもほとんどない。そこで、本研究では、転写因子およびエピジェネティック因子を含む全蛋白質を対象として、X 線結晶構造を基に、それらの NLS 部分の動的構造について統計的な解析を行った。本研究を行うにあたり、我々は立体構造決定率(conformational determination rate)という指標を開発・導入した。立体構造決定率は、ペプチド鎖の任意の領域に対し、そこに含まれなおかつ立体構造が決定されているアミノ酸の数を、その

領域全体に含まれるアミノ酸総数で割ったときの値で定義される。この指標が高い (0 から遠く 1 に近い) ほどその領域の構造が X 線結晶構造解析によって決定されている割合が高いことを示す。

解析の結果、NLS は蛋白質の他の領域と比べて立体構造決定率が低く、立体構造が決定されにくいことがわかった (表 1)。また、単量体よりもヘテロ多量体において、NLS が立体構造を取りやすいという傾向が見られた。これらのことは、NLS が単独では構造を形成しにくい、ターゲット分子と相互作用すると規則正しく折り畳まれて特定の立体構造をとる天然変性領域 intrinsically disordered regions (IDRs) であることを強く示唆するものと考えられる。

今回のような NLS の立体構造、特に動的構造の特徴に関する網羅的解析データは国内外において希少であり、NLS の特性を解き明かした本研究成果は、核輸送機構のさらなる解明に貢献するものと考えられる。

表 1 NLS とポリペプチド chain 全体の立体構造決定率の比較 (下は温度因子 B-Factor)

		N	P-value	Mean
立体構造決定率	NLS	542	1.900E-03	0.7986
	Chain			0.9455
Normalized B-factor	NLS	463	< 2.2E-16	0.6855
	Chain			0

② 転写因子 Oct4 とインポーチン α の複合体構造の予測

これまで多くの核内蛋白質とインポーチン α の複合体構造が実験的に解かれてきたにも関わらず、核内蛋白質の NLS 部分のみがインポーチン α に結合した構造しか発表されていない。これは、先にも述べたように、多くの核内蛋白質が天然変性蛋白質であることに起因していると考えられる。

本研究では、細胞の多能性を維持するためのマスターレギュレータであり、他の蛋白質ファミリーでは代用できない唯一の多能性誘導転写因子である Oct4 (Oct3/4, Oct3) を用いて、インポーチン α との複合体構造を計算化学的手法により予測した (図 1)。



図 1 インポーチン α (シアン) と Oct4 (紫) の複合体モデル

予測した複合体モデルから、次のことがわかった。i) エボラウイルスの VP24 蛋白質が、ヒト importin $\alpha 5$ (KPNA5) による STAT1 の核輸送は阻害しても、Oct4 の輸送は阻害しないことが示された。このことから、VP24 は、抗ウイルス効果を発揮させるために必要な STAT1 シグナルは遮断するが、宿主細胞の成育に必要な最低限な蛋白質の核輸送は阻害しないという巧妙な機能を有していることを、構造生物学的に理解することができた。ii) importin $\alpha 2$ (KPNA2) に Oct4 と Nup50 が同時に結合した構造を発生させたところ、importin α の NLS minor binding site 付近で、Oct4 の POU homeodomain と Nup50 の N 末端が立体的にぶつかることが判明した。このことから、Nup50 は、直接的な steric inhibition により、積み荷蛋白質を importin α からリリースさせる働きを有すると考えられる。iii) Oct4 が DNA に結合している結晶構造と今回求めた Oct4 がインポーチン α に結合している複合体モデル構造を比較することにより、Oct4 の POU-specific domain と POU homeodomain をつなぐ flexible なリンカー部分 (206-230) の構造変化が、DNA とインポーチン α 双方との結合において重要な働きを担っていることがわかった。このリンカー部分は、NLS を含んでおり、天然変性領域であると考えられる。

本研究で求めた我々のモデルは、核輸送蛋白質と積み荷蛋白質の (NLS 部分のみではない) 全体の複合体構造を世界で初めて示したものであり、転写因子 Oct4 の核内への輸送過程や DNA への受け渡し過程の分子機構を解き明かすための一助となると考える。また、核輸送制御を介した新規な体細胞リプログラミング法やがんなどの遺伝子発現の異常に伴う病気の治療薬および抗ウイルス薬の開発につながるものと期待できる。

③ 積み荷蛋白質が輸送蛋白質インポーチン α からリリースされる機構の解明

代表者は、研究開始前に、インポーチン α の局所的構造変化が、積み荷蛋白質のリリース機構において重要な意味を持つことを計算構造生物学的見地から発見していた。本研究では、当該部位に変異を導入したインポーチン α 変異体を作製し、核輸送の変化を実験的に調べることで、支持データを得ることができた。現在、細胞内イメージングデータを取得中であり、さらなる検証を進めている。

①~③を通じて、転写因子を中心とした積み荷蛋白質の核内輸送機構について、多くの有用かつ独創性の高い成果を得ることができた。今後は、これらの知見を生かし、計算と実験の両面からさらなる基礎及び応用研究へと発展させていく予定である。

(2) エピジェネティック因子の核内輸送機構を解明する。

研究開始当初から現在に至るまで、エピジェネティック因子の核輸送機構については、ほとんど未解明といつてよいであろう。

本研究では、がんのエピジェネティック治療に主眼を置いているため、がんとの関連性が高いエピジェネティック因子として EZH2 を主な研究対象とした。

ヒト EZH2 のアミノ酸配列からの NLS 予測に加え、EZH1 の NLS 予測結果との比較、EZH2 と EZH1 の配列並置、リン酸化部位との位置関係性の分析など多角的な解析を行った結果、N 末端側(16-34 RKRVKSEYMRLRQLKRFRR: Bipartite type)と中央部(490-495 RKKKRK: Monopartite type)の2箇所に NLS が予測された。この予測に基づき、NLS のアラニン(Ala)置換変異体の作製と核輸送実験を行った。その結果、予測した2箇所の NLS 領域のいずれも、単独では Ala 置換変異による輸送への影響がみられなかった。このことから、別の NLS もしくは2つの NLS 配列が補完的に働いている可能性が示唆された。EZH2 のこれらの NLS が、アダプター分子としてのインポーチン α に結合し、さらにそれらがインポーチン β と結合して3者複合体を形成する“classical な機構”によって、核内へ輸送されているものと考えられる。今後、EZH2 の核輸送についてさらに詳細な解析を行っていく予定である。

- (3)核輸送蛋白質インポーチンが転写因子・エピジェネティック因子を標的遺伝子へ誘導することにも関与しているかどうかについて調べ、様々な関連分子群との相相互作用を解明する。

少なくとも *in vitro* においては、インポーチン α が、特定の遺伝子のプロモータに接近できることが、これまでの研究の中ですでに報告されている。ただ、本研究期間中に、インポーチン α が標的遺伝子へ誘導する機能を有していることを証明する直接的な実験的証拠を得るには至らなかった。しかし、研究成果(1)-②において得られた Oct4 がインポーチン α に結合しているモデルと、Oct4 が DNA に結合している結晶構造を比較したところ、NLS を含む一部のリンカーの効率的な構造変化(すなわち最低限のエネルギー変化)のみによって、転写因子が DNA に受け渡し可能であることがわかった。核内輸送後の DNA デリバリーのモデルを図2に示す。

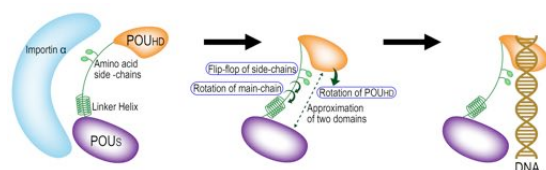


図2 転写因子 Oct4 をインポーチン α から DNA に引き渡す過程のモデル

このような積み荷蛋白質の効率的な構造

変化は、インポーチン α が積み荷を標的遺伝子へと誘導することを手助けしている潜在的な機能と密接に関わっていると推測される。

さらに、インポーチン α と関連がある分子群を網羅的に探索するため、インポーチン α 2(KPNA2)遺伝子をノックダウンした ES 細胞のマイクロアレイデータの解析および遺伝子パスウェイ解析を行った。その結果、特定の疾患、細胞増殖、神経分化などに関連する興味深い遺伝子を特定した。これらの一部については、リアルタイム PCR により発現の変動を確認することができた。本研究は継続中であり、今後はさらに、重要な遺伝子をパスウェイごとに整理し、発表していく予定である。

本成果は、核輸送制御を利用した標的遺伝子特異的な細胞リプログラミング技術や副作用の少ない標的治療法の開発のための突破口を開くことにつながると期待される。

- (4)核輸送操作を利用した遺伝子特異的/組織特異的に制御可能なエピジェネティック治療法を探索する。

研究開始当初は、エピジェネティック因子 EZH2 の核輸送を抑制することにより、がんの新規な標的治療法を探求することを計画していた。しかし、EZH2 の構造的な知見は開始当初から非常に乏しく、研究の進展を遅らせた。平成 27 年 10 月になってようやく、好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来の EZH2 全体構造が発表され、最終年度の 28 年 4 月にヒト由来 EZH2 の全体立体構造が発表された。さらに、発表されたヒト由来 EZH2 の構造には、我々が同定した NLS 領域(490-495 RKKKRK)の座標情報が欠落していた。そのため、EZH2 の核輸送を直接制御する化合物を本事業終了までに設計・開発することは、困難であると判断した。また、EZH2 の核輸送を阻害する化合物は、インポーチン α の NLS 結合部位と類似した構造を有するリスクがあることから、EZH2 の核輸送のみを厳密かつ特異的に阻害することは難しく、他の積み荷蛋白質の輸送を阻害してしまう副作用を完全に防ぎきれない可能性がある。

これらの状況を分析し、本研究では思い切って方針を変更し、全く新規な戦略により EZH2 の機能を選択的に抑制する治療法の探索を行うことにした。すなわち、PRC2 複合体(正確には EZH2, EED, SUZ12 の一部から構成される3者複合体)の結晶構造(図3)から得られる知見を利用し、PRC2 複合体の形成を阻害することにより特異的に H3K27me3 活性を抑える医薬品を創出することを新たな研究目標とした。計算機を用いて、PRC2 複合体の形成を阻害すると同時に、プロテアーゼ耐性と膜透過性を有することを期待できるペプチド化合物を設計し、実際にこれを受託合成した。現在、この化合物の有効性、すなわち H3K27me3 活性阻害作用、リン

パ腫への治療効果などについて、評価・検討を行っている段階である。

本研究で設計したペプチド化合物は、国内外を問わずこれまで全く提唱されていない発想と作用機序に基づいているため、新規ながん治療薬としての可能性を期待することができる。



図3 ヒト PRC2 複合体の結晶構造

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

① T. Okuyama, R. Yamagishi, J. Shimada, M. Ikeda, Y. Maruoka, H. Kaneko, Structural and mechanistic insights into nuclear transport and delivery of the critical pluripotency factor Oct4 to DNA, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 査読有, 2017
DOI: 10.1080/07391102.2017.1289124

② R. Yamagishi, H. Kaneko, Data from comprehensive analysis of nuclear localization signals, *Data in Brief*, 査読有, Vol 6, 2016, 200-203
DOI: 10.1016/j.dib.2015.11.064

③ R. Yamagishi, T. Okuyama, S. Oba, J. Shimada, S. Chaen, H. Kaneko, Comprehensive analysis of the dynamic structure of nuclear localization signals, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 査読有, Vol 4, 2015, 392-396
DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.11.001

[学会発表] (計 6 件)

① 山岸 良介, 金子 寛生, 核移行シグナル NLS の動的構造に関する網羅的解析: NLS の天然変性領域としての可能性, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 1 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

② 趙 娟, 畑中 彬良, 勝島 啓佑, 大岡 史治, 出口 彰一, 市村 典久, 金子 寛生, 新城 恵子, 近藤 豊, がん細胞における EZH2

の細胞内局在制御機構の解明, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015 年 5 月 25 日, 学術総合センター 一橋講堂 (東京都千代田区)

③ 安原 徳子, 山岸 良介, 金子 寛生, 米田 悦啓, 核輸送による遺伝子発現制御と細胞運命決定のメカニズム, 第 87 回日本生化学会大会 (招待講演), 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

④ 奥山 隆英, 山岸 良介, 島田 次郎, 安原 徳子, 米田 悦啓, 金子 寛生, 転写因子と核内輸送因子の複合体構造の予測, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 16 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑤ 金子 寛生, 医学研究分野への計算構造生物学の応用, 第 50 回分子研セミナー (招待講演), 2014 年 8 月 7 日, 名古屋市立大学大学院医学研究科 (愛知県名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nibiohn.go.jp/activities/nuclear-transport.html>

<http://www.oka-lab.info>

<http://bio.phys.chs.nihon-u.ac.jp/teacher/kaneko/>

<http://w3p.phys.chs.nihon-u.ac.jp/~kaneko/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 寛生 (KANEKO, Hiroki)

日本大学・文理学部・研究員

研究者番号: 10349946

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

米田 悦啓 (YONEDA, Yoshihiro)

医薬基盤・健康・栄養研究所・研究所長

研究者番号: 80191667

安原 徳子 (YASUHARA, Noriko)

日本大学・文理学部・准教授

研究者番号: 90423152

近藤 豊 (KONDOU, Yutaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00419897

奥崎 大介 (OKUZAKI, Daisuke)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号: 00346131

(4) 研究協力者

山岸 良介 (YAMAGISHI, Ryosuke)

島田 次郎 (SHIMADA, Jiro)