

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Acetylation and Transcriptional Regulation of KLF5/IKLF/BTEB2
by the Histone Acetyltransferase p300

和訳 ヒストンアセチル化酵素 p 300によるKLF5/IKLF/BTEB2
のアセチル化と転写調節

指導教官 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士過程

内科学専攻

氏名 武藤真祐

KLF5/IKLF/BTEB2 は Sp/KLF ファミリーに属する転写因子である。Sp/KLF ファミリーは C 末端部に、システインとヒスチジン2つずつが亜鉛イオンをキレートして三次構造を形成する、C₂H₂タイプの zinc finger が3個並ぶ DNA 結合ドメインをもつことが特徴である。ヒトの Sp/KLF ファミリーには現在 Sp1 から Sp4 の4個と KLF1 から KLF12 までの 12 個の計 16 個が属している。特に KLF1 から KLF12 はその DNA 結合ドメインがショウジョウバエの転写因子 Krüppel のものに高い相同性をもつことから Krüppel-like factor (KLF)と呼ばれている。KLF ファミリーは空間的特異性や組織特異性をもつものが多いのも特徴の一つである。KLF5 は最初 BTEB2 (basic transcription element binding protein 2)としてクローニングされた。BTEB2 はラットの大動脈の新生内膜でバルーン傷害後に誘導される遺伝子である。動脈硬化巣やヒトの冠動脈拡張術の再狭窄病変で発現される、正常血管にはない、ミオシン重鎖遺伝子のアイソフォーム SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B 遺伝子の発現を BTEB2 は制御していることから、BTEB2 は血管の病的狭窄部位の平滑筋増殖に関わる因子であると考えられている。また BTEB2 は分化、発生、癌化に関与する

Wnt-1 のシグナル伝達において下流の標的遺伝子の一つであることも明らかにされている。IKLF (Intestinal Krüppel-like factor)は、KLF2/LKLF (Lung Krüppel-like factor)の zinc finger ドメインと相同性の高い因子として dbEST (expressed sequence tag database)を用いてクローニングされたものである。IKLF は消化管上皮の増殖している細胞に多く発現しており、NIH3T3 細胞に IKLF を過剰発現させると細胞の増殖速度が上昇することが報告され、IKLF も細胞増殖に関与する因子であると考えられている。BTEB2 はその後 IKLF の一部であることが判明し (IKLF は 446 アミノ酸、BTEB2 は 219 アミノ酸からなる) 現在では KLF5 と統一して呼ばれている。

p300 はさまざまな転写因子と相互作用し、転写コアクチベーターとして機能する核内因子であり、細胞周期、分化、アポトーシスなどの生物現象において大変重要な役割を担っている。p300 は多くの遺伝子発現制御を行っているがその機序としては、(1)転写制御因子と基本転写因子を橋渡しする、(2)多くの転写に関わる因子が複合体を形成する際の足場となる、(3)ヒストンをアセチル化することによりクロマチン構造を壊し転写因子が目標 DNA に結合できるようにする、などが挙げられる。最近では p300 はヒストン以外の p53、MyoD、E2F などもアセチル化しその転写活性を制御することが報告されている。

私は今回 p300 のヒストンアセチル化ドメイン(HAT)が KLF5 を *in vitro* でアセチル化し、KLF5 と結合することを初めて見出した。このアセチル化は別のヒストンアセチル化酵素である Tip60 や GCN5 では見られず酵素特異性がある。私はまず KLF5 の全長及びその一部を精製し、アセチル化される部位が DNA 結合ドメインであることを *in vitro* HAT assay を用いて決定した。その後 zinc finger 毎のタンパクと合成ペプチドを用いてさらにアセチル化リジン残基のある部位を局限した。アセチル化リジン残基を含む合成ペプチドをアセチル化後精製し、TOF-MS spectrometer で質量を測定した。その結果アセチル化されていないペプチドの質量と、アセチル基1個分が追加された質量に相当する2つのピークが検出され、アセチル化されるリジン残基数は 1 個と同定できた。次にアセチル化された合成ペプチドをエンドペプチダーゼである Lys-C で切断後 TOF-MS spectrometer で断片の質量を測定した。Lys-C はアセチル化されていないリジン残基の C 末端側でペプチドを切断する酵素である。この方法により KLF5 の 369 番目のリジン残基のみが p300 によりアセチル化されることを見出した。このリジン残基は 1 番目の zinc finger を構成する 375 番目のシステイン残基の N 末端側に位置する。

KLF ファミリー因子の中で最初にクローニングされた KLF1/EKLF (Erythroid Krüppel-like factor)は β グロビン遺伝子の転写制御に関わる赤血球特異的な遺伝子である。KLF1 も p300 でアセチル化されることが知られそのリジン残基も同定されている。アセチル化されるリジン残基は2つあり、1 つは 1 番目の zinc finger 内に位置する。HIV-1 遺伝子プロモーターの GC に富む領域に結合する KLF6/GBF の DNA 結合ドメインは p300 によりアセチル化されないことが報告されている。私は KLF5、

KLF1, KLF6 の 1 番目の zinc finger 内にある 9 つのリジン残基で、アセチル化されるリジン残基 1 つとアセチル化されないリジン残基 8 つの周囲のアミノ酸配列を比較した。私の研究室の同僚は以前に、ヒストンアセチル化酵素 (p300/CBP, Hat1p, Gcn5p, TAF230, SRC-1) がアセチル化するヒストンテイルにあるリジン残基 15 個を、その周囲にあるアミノ酸の配列パターンで 6 種類に分類した。この分類は酵素の特異性と一致した。この分類により、p300 はモチーフ GXGKXG と GGKXXXK の下線を引いたリジン残基をアセチル化することが明らかになった。私は Sp/KLF ファミリー因子の 1 番目の zinc finger 内では、アセチル化されるリジン残基は N 末端側にグリシンがあるが、アセチル化されないリジン残基の N 末端側はグリシンではないことを見出した。従ってヒストンで提唱された法則と類似した法則が Sp/KLF ファミリー因子でもあるのではないかと考えた。Sp1 の DNA 結合ドメインは p300HAT でアセチル化されることが過去に *in vitro* で示されていたが、そのリジン残基はまだ同定されていなかった。Sp1 の 1 番目の zinc finger 内には GK と並ぶ配列が 2 ヶ所あり、私の仮説が正しければこの 2 ヶ所とも p300 によりアセチル化されるのではないかと予想した。私は KLF5 同様に Sp1 でも zinc finger 毎の 3 つのペプチドを合成した。ペプチドをアセチル化後精製し、TOF-MS spectrometer で質量を測定したところ、1 番目の zinc finger は 2 ヶ所、3 番目の zinc finger は 1 ヶ所アセチル化され、2 番目の zinc finger はアセチル化されないことが示された。その後 Lys-C で切断しアセチル化リジン残基を決定したところ、1 番目の zinc finger 内では、私の提唱した法則どおり GK と並ぶ 2 つのリジン残基であった。3 番目の zinc finger 内では SK と並ぶリジン残基がアセチル化されていた。これらの結果より、Sp/KLF family 因子の 1 番目の zinc finger においては GK と並ぶ K が p300 によりアセチル化されると推測できる。この法則により、他の Sp/KLF ファミリー因子の p300 によるアセチル化の有無とその部位を予想することが可能となった。

特異的 DNA 結合因子のアセチル化は DNA 結合能を上げることが p53, GATA1 などで知られている。Sp/KLF ファミリー因子では、KLF1 はアセチル化されても DNA 結合能が上昇せず、Sp1 では p300 との結合は DNA 結合能を上昇させるがアセチル化自体は影響しないことが報告されている。私は KLF5 が転写制御をしていることが示されている SMem 遺伝子プロモーターの *cis*-element をプローブとして用いて、KLF5 の DNA 結合能に及ぼす p300 HAT とアセチル化の影響を gel shift assay で検討した。その結果 KLF5 の DNA 結合能は p300 HAT 存在下でわずかに上昇したが、acetyl-CoA を加えたアセチル化条件では相乗的な結合能の上昇は認められなかった。Sp1 と KLF5 の差異は、アセチル化されるリジン残基の位置が、Sp1 では zinc finger 内にあるのに対し、KLF5 では zinc finger 外にあることが影響していると考えられる。

Platelet-derived growth factor (PDGF)-A は血管の狭窄病変の開始と進行において重要な役割を演じている増殖因子である。今回私は初めて KLF5 が用量依存的に

PDGF-A のプロモーター活性を上げることを reporter gene assay で示した。さらにこの転写活性化は p300 の共発現により相乗的に上昇した。KLF5 を細胞に導入していない条件下では p300 の影響は認められないことより、この効果は KLF5 依存であることが示唆される。また、アセチル化酵素ドメインを欠損させた p300 ではこの相乗的効果はないことから、KLF5 のアセチル化を介した機序であると考えられる。

p300 が KLF5 のアセチル化を介して PDGF-A 遺伝子の転写制御に関与するメカニズムは、p300 との結合や p300 によるアセチル化が KLF5 の DNA 結合にほとんど影響しないというデータから、分子内相互作用もしくは分子間相互作用によるものと考えられる。癌遺伝子である c-Myb はヒストンアセチル化酵素である CREB binding protein (CBP) によりアセチル化され、アセチル化された c-Myb は CBP との相互作用を増強する。CBP は筋分化のマスター遺伝子である MyoD もアセチル化し、アセチル化されたリジン残基は CBP の HAT ドメインの N 末端側に位置するプロモドメインに認識される。この結果 CBP と MyoD の結合は増強され、CBP は MyoD の標的遺伝子のプロモーターにリクルートされやすくなる。KLF5 のアセチル化も p300 との結合能を上昇し PDGF-A プロモーターへ p300 が接近することを容易にしている可能性がある。KLF1 の zinc finger 内のリジン残基はアセチル化されると、KLF1 と SWI/SNF 複合体との結合を強くすることが報告されている。SWI/SNF 複合体はクロマチンリモデリング因子の一つである。クロマチンリモデリング因子はヌクレオソームの破壊を行い、標的となる DNA からヒストンをどかす役割を担う。KLF5 が PDGF-A プロモーターに結合する際にはその *cis*-element から障害物となっているヒストンをどかす必要がある。従って KLF5 のアセチル化リジン残基はクロマチンリモデリング因子が認識する標識となり転写制御に関与していることも考えられる。basic helix-loop-helix 型の転写因子である TAL1/SCL はアセチル化されると、転写抑制因子である Sin3A との結合が抑制され転写は活性化される。Sp1 の DNA 結合ドメインには、転写抑制作用をもつヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 が結合することが報告されている。KLF5 のアセチル化は、KLF5 と転写抑制因子の結合を抑制することにより転写活性化に寄与している可能性がある。最後に KLF5 のアセチル化される 369 番目のリジン残基は、KLF4/GKLF (Gut Krüppel-like factor) から推定される nuclear localization signal (NLS) の近傍に存在する。class II transactivator (CIITA) や hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) においてアセチル化されるリジン残基はそれぞれの NLS に存在し、このリジン残基を他のアミノ酸に置換すると核内移行が阻害されると報告されている。従って KLF5 のアセチル化は核内移行に関与していることも考えられる。

今回私は、動脈硬化形成に重要な役割を果たしていると考えられる KLF5 が p300 によるアセチル化を介して PDGF-A 遺伝子の転写制御を行っているという知見を得た。今後はアセチル化されない KLF5 の遺伝子導入などが細胞レベルや個体レベルに及ぼす影響を検討し、この知見の臨床的有用性を示すことを目標としている。