

## 論文の内容の要旨

論文題目 **The deacetylase HDAC1 negatively regulates the cardiovascular transcription factor Krüppel-like factor 5 through direct interaction**

和訳 脱アセチル化酵素 HDAC1 は心血管系転写因子 Kruppel-like factor 5 を直接的に抑制する

指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科 平成14年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 松村 貴由

### 背景

転写反応は基本転写因子とともに機能する様々な転写因子とそれに関連した補因子のネットワークにより制御されている。補因子は転写促進因子あるいは抑制因子として蛋白-蛋白間相互作用及び（リン酸化・アセチル化などの）化学的修飾を通してその活性を示すため、その正確な機序を明らかにすることが転写制御機構の解明に必須といえよう。

最近我々は、Sp/KLF 型転写因子群の一員である Kruppel 型転写因子 KLF5 が心血管リモデリングにおいて中心的役割を果たすことを示した。更に、その転写活性調節機構を探究する過程で、KLF5 が直接的相互作用およびアセチル化の制御を通してアセチル化酵素 p300 により活性化され癌関連遺伝子 SET にて抑制されることを見いだした。ここにおいて私は、KLF5 が心血管リモデリングの中心的転写因子であることを鑑みるとその活性を抑制する機構を検討することこそが臨床応用を考える上で重要であると考え、本論文にて脱アセチル化酵素 HDAC1 が KLF5 の転写活性を直接的に抑制しうるかについての検討を行った。

## 方法及び結果

最初に、KLF5 と HDAC1 が細胞内で相互作用しうるかを確認するため免疫沈降法を行い、両蛋白が細胞内環境で結合することを示した。次にその結合が直接的なものかを確認するため組み替え蛋白質による *in vitro* 結合試験を施行、両者は他の因子を介さず直接的に結合することが判明した。更に、両者の結合部位を確認すべく両蛋白質の変異体を作成、KLF5 の C 末端にある DNA 結合領域と HDAC1 の N 末端の調節領域が結合することが示された。

HDAC1 は KLF5 の DNA 結合領域に結合することが判明したため、次に、私は両者の結合が KLF5 の DNA 結合活性に与える影響を検討した。ゲルシフト DNA 結合試験で両者の結合は KLF5 の DNA 結合活性を阻害することがわかった。これは HDAC1 が転写因子の DNA 結合活性を直接阻害する働きを有することを示すこれまでにない知見であった。

HDAC1 が KLF5 の DNA 結合活性を抑制するという結果から次に想定されたのは、HDAC1 は KLF5 のプロモーター活性作用を抑制するであろうということであった。そこで KLF5 の下流遺伝子であり心血管リモデリングに重要である血小板由来成長因子 A 鎖 (PDGF-A) 遺伝子のプロモーター領域を使用したレポーターアッセイを行った。その結果、予想通り HDAC1 は KLF5 依存性のプロモーター活性作用を容量依存性に抑制した。

次に、HDAC1 による転写活性抑制効果の細胞レベルの意義を検討するにあたり、HDAC1 が内因性の KLF5 下流遺伝子を抑制することを確認する必要がある。KLF5 は phorbol ester による活性化に続いてその下流の PDGF-A 遺伝子を活性化することが知られていたため、HDAC1 の過剰発現が phorbol ester 刺激後の PDGF-A 遺伝子の発現上昇に及ぼす影響を調べた。やはり HDAC1 は PDGF-A 遺伝子の発現上昇を抑制した。

HDAC1 と KLF5 の相互作用機序を更に詳しく解明するため、KLF5 の DNA 結合領域のうちどの小領域が HDAC1 に結合するかを確認した。KLF5 の DNA 結合領域は 3 つの Zinc-フィンガー型配列 (ZF1-3) からなる。この 3 つの配列間の HDAC1 結合活性を比較したところ、3 つの配列は類似性が高いにも関わらず予想外に HDAC1 はその最も N 末端側の ZF1 のみに結合した。この部位は KLF5 を活性化させることが知られていたアセチル化酵素 p300 が KLF5 をアセチル化する部位と同一であった。このため私は HDAC1 と p300 は KLF5 の同一部位に結合し、前者は後者の結合を競合的に阻害するのではないかと考えた。組み替え蛋白質を用いた *in vitro* 結合試験を行ったところ、期待された通り HDAC1 は KLF5 と p300 の相互作

用を容量依存性に阻害した。アセチル化酵素と脱アセチル化酵素が転写因子の特定の領域に競合的に結合することの直接的証明はこれが初めてであった。

最後に HDAC1 と p300 の競合的結合の KLF5 依存性転写活性への影響をレポーターアッセイにて確認した。結果、予想通り HDAC1 の過剰発現は p300 による KLF5 転写活性化作用を完全に抑えた。

### 考察

KLF5 の転写活性調節機構を解明する過程において本論文は脱アセチル化酵素の新しい調節様式を証明することができた。すなわち、脱アセチル化酵素 HDAC1 は転写因子 KLF5 に直接的に結合し KLF5 の DNA 結合活性を阻害し、その結果 KLF5 のプロモーター活性化作用を抑制した。更に HDAC1 と KLF5 活性化因子である p300 は KLF5 上の同一部位 (ZF1) に結合するため、HDAC1 は p300 と KLF5 の相互作用をも阻害することがわかった。

まず本論文では HDAC1 による KLF5 抑制作用の比較的詳細な機序が明らかになった。HDAC1 は転写抑制因子として広く知られているにも関わらず、HDAC1 による転写因子の DNA 結合活性への影響についてはこれまでほとんど報告されていなかった。本論文のゲルシフト DNA 結合試験の結果は、HDAC1 の KLF5 への結合自体が *in vitro* において KLF5 の DNA 結合活性抑制に充分であることを示した。これはこれまで知られていなかった HDAC1 の特性である。更に HDAC1 と p300 の競合的結合試験の結果は脱アセチル化酵素による新たな転写制御様式を提案するに至った。HDAC1 は p300 の KLF5 への作用を阻害することによっても KLF5 の転写活性化作用を抑制しうる。両者の結合部位が 1 つの Zinc-フィンガー型配列であり、そこへ同時に結合できる因子はおそらく 1 つであろうことを考えると、HDAC1 の効果はおそらく単純に p300 の KLF5 への結合部位を隠すことによると思われる。脱アセチル化酵素とアセチル化酵素が転写因子の特定の小領域に競合的に結合することは両者の酵素活性を考えた時ごく当然に予想されることではあるが、組み替えタンパク質を用いた直接的証明は本論文が初めてであった。

次に KLF5 側の要素を考えると本論文は 2 つの分子生物学的知見を持つ。まず、転写因子の DNA 結合領域は一般には転写因子とその DNA 認識配列を連結させる受動的な役割のみを持つと考えられがちである。しかし、最近の報告では、特に Sp/KLF 型転写因子群においては DNA 結合領域が DNA に結合するのみならず他の補因子との相互作用、化学修飾の場となり、従って転写活性の重要な調節領域になりうる可能性が示されている。本論文も DNA 結合領域が脱アセチル化酵素、アセチル化酵素との作用により転写調節の役割を果たすことを示し、これ

までの報告を支持するものとなった。更に、本論文では複数の Zinc-フィンガー型配列を持つ転写因子における個々の Zinc-フィンガー型配列の役割の違いを示した点で重要である。KLF5 の3つの Zinc-フィンガー型配列は類似性が高いにも関わらず最も N 末端よりの ZF1 のみが HDAC1 及び p300 との蛋白-蛋白間相互作用に関与することが示された。このことから少なくとも Sp/KLF 型転写因子群においては同様に個々の Zinc-フィンガー型配列が異なった役割を担っている可能性が示唆された。

KLF5 と HDAC1 の相互作用の生物学的意義を考えるには、KLF5 の転写活性がどのような時にどのように複数の補因子間で制御されているかを考慮する必要がある。一つの可能性は補因子の相対的発現量による調節であろう。以前我々は障害血管の新生内膜において KLF5 の発現量増加と一致して KLF5 の抑制因子である SET も増加することを示した。また、KLF5 を誘導する phorbol ester は同様に KLF5 の活性促進因子である p300 を誘導することが知られている。これら SET や p300 と比較した時、HDAC1 はこれらの病態・刺激では誘導されず、普遍的・恒常的に発現している補因子と特徴づけられ、各種病態・刺激により転写活性がおきた時必要以上の活性化がおきないように基礎的な抑制機構としての働きがあるのかもしれない。

最後に、KLF5 と HDAC1 の相互作用の治療的介入を考えた時の意義としては、本論文に置いて HDAC1 が KLF5 の活性を長時間にわたり抑制できたことは注目に値する。また、KLF5 のうち1個の Zinc-フィンガー型配列のみがその転写活性制御に非常に重要な役割を果たすことを示し得たことは、その部位が治療的介入の目標部位となりうるという意味で非常に有意義である。転写活性に重要な蛋白-蛋白間相互作用部位を正確に同定できたことは、そこに結合して転写活性を制御しうる薬剤をスクリーニングできるという点で非常に有利である。今後そのような薬剤の局所投与が KLF5 に関連する心血管系病態の制御に役立つかもしれない。

## 結語

心血管系転写因子 KLF5 は脱アセチル化酵素 HDAC1 により抑制され、それは DNA 結合活性、プロモーター活性化作用に対する直接的抑制効果によるだけでなく、アセチル化酵素 p300 との相互作用を阻害する効果にもよることがわかった。これは脱アセチル化酵素による転写制御機構に関する新たな知見である。また、KLF5 の転写活性に重要な領域を同定し得たことにより、将来の薬剤開発のための重要な情報をえることができたと考えられる。