

農学博士吉田 稔氏の「微生物由来活性物質を用いる真核生物の遺伝子発現機構の解析と創薬への応用」に対する授賞審査要旨

微生物が生産する膨大な種類の二次代謝産物は生理活性の宝庫であるが、その中で作用標的が分子レベルで解明された例はごく僅かで、巨大な資源の多くはまだ半ば眠ったままになっていると言っても過言ではない。吉田 稔氏は、わが国が高い技術と伝統を誇る抗生物質を始めとする微生物起源の生理活性物質の研究を基盤として、真核生物の核内で制御される特異的な遺伝子発現機構を阻害するいくつかの新規活性物質を発見し、その新しい作用機構の解明を通じて生命現象の根幹となる重要な概念を生み出すとともに、創薬開発に向けた基盤構築においても独創的な貢献をした。

1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の発見とその作用機構の研究

フレンド白血病細胞は、赤血球に分化する幹細胞にフレンド白血病ウイルスが感染したことによって無限増殖するようになった血液

系のがん細胞の一種であり、dimethylsulfoxide (DMSO) によって赤血球に再分化する性質を有する。吉田氏は、この細胞の分化をDMSOに代わって誘導する物質としてトリコスタチンA (TSA) を土壌より分離した放線菌から発見し、その作用機構解明に取り組んだ。まず、TSAが動物培養細胞の細胞周期を特異的に阻害することに着目して標的分子を絞り込み、最終的にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害することを明らかにした。さらに、TSA耐性の変異培養細胞を分離するとそのHDAC酵素活性がTSA耐性となつていくことから、TSAの標的がHDACであることを遺伝学的に証明した。この成果をもとに、TSAは世界初の特異的なHDAC阻害剤として、基礎生物学の広い分野で利用されるようになった。

吉田氏は引き続き微生物由来のHDAC阻害剤の探索を押し進めて多数の活性物質を発見し、例えばHDACと共有結合して阻害するトラポキシンがその特性にもとづいてHDAC遺伝子のクロール化に利用されるなど、ヒストンの修飾が真核生物の遺伝子発現の制御に果たす役割を解明するのに貢献し、エピジェネティクスといわれる新しい分野の誕生とその発展に先導的な役割を果たした。また、環状デプシペプチドで作用機構不明のまま米国で臨床試験が始められていたFK228が、その分子内S-S結合が細胞内で還元、開環されてHDACを阻害する、天然のプロドラッグであることを明ら

かにした。本物質は二〇〇九年に米国で皮膚性T細胞リンパ腫の治療薬として承認されるとともに、エピジェネティクス制御に関わる分子が新たな治療標的となることを明示するものとなった。

2. タンパク質の核外移行阻害剤の発見とケミカルゲノミクスへの展開

吉田氏は、カビの形態異常を引き起こす抗真菌抗生物質として発見されたレプトマイシン B (LMB) の作用標的が、分裂酵母の LMB 耐性遺伝子として得た染色体高次構造維持に関連する *crml1* であることを発見した。次いでヒト相同遺伝子 CRMI を用いた種々の機能解析から、LMB がタンパク質の核外移行シグナル (NES) の受容体である CRMI に特異的に共有結合することにより、NES を持つタンパク質の核外移行を強力に阻害することを証明した。この発見により、LMB はタンパク質の核-細胞質間輸送を解析するための必須試薬として広く利用される一方、CRMI は抗がん剤の標的としても注目され、新規医薬の開発が進められつつある。

さらに吉田氏は、LMB の作用機構研究で培った分裂酵母全遺伝子 ORF の個別強制発現システムを利用して、分子標的にもとづく組織的な新規生理活性物質の作用機構の解析システムを構築した。それを用いて、海綿に共生する難培養微生物が生産する巨大な抗真

菌環状ペプチドであるセオネラミドの標的がエルゴステロールであり、その結合によって細胞壁の 1,3-β-D-グルカンの異常蓄積をもたらすという新しい抗真菌作用機構を明らかにし、化学的手法とゲノム情報を組み合わせるケミカルゲノミクスの有効性を示した。同じ手法は、一〇、〇〇〇以上の完全長ヒト cDNA を個別に分裂酵母に導入してヒト遺伝子機能の阻害剤を探索する、ヒト標的遺伝子を指向する新しい探索システムへと発展している。

3. スプライシング阻害剤の発見

真核生物において DNA 転写産物からイントロン部分を切り縮めて成熟 mRNA とするスプライシング反応にはこれまで阻害剤が知られていなかったが、吉田氏は微生物由来の抗がん抗生物質として報告されていた FR901464 が特異的にスプライシングを阻害する初めての物質であることを見いだした。本物質は化学的に不安定であったが、新規に創製した安定で高活性の誘導体スプライソスタチン A (SSA) を用いて結合タンパク質を単離することにより、スプライシングに関わる構造体スプライソソームの構成因子 SEC5 を作用標的として同定した。さらにその阻害様式を解析する過程で、SSA の存在下にスプライシングが阻害されて細胞内に蓄積する未成熟 mRNA の一部が、そのまま翻訳されて余剰なイントロン配列を持つ

ポリペプチドが生成するという全く新しい現象を見出した。この発見により、未成熟 mRNA が核から翻訳の場である細胞質に輸送されないように核内に保持するという、スプライソソームの新しい機能が明らかになった。

以上、吉田 稔氏による業績は、真核生物に特異的な遺伝子発現機構を阻害する新規の微生物由来活性物質の作用機構を解明して、エピジェネティクスを始めとする生物学の新しい領域を切り開くことで先導的役割を果たしたものであり、抗がん剤を始めとする新しい医薬開発に向けた基礎的貢献とあわせて、その成果は国際的に高く評価されている。

主要な論文目録

〈原著論文〉

1. **Yoshida, M.**, Nomura, S., and Beppu, T. (1987) Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.*, 47: 3688-3691.
2. **Yoshida, M.** and Beppu, T. (1988) Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A. *Exp. Cell Res.*, 17: 122-131.
3. **Yoshida, M.**, Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.*, 265: 17174-17179.
4. **Yoshida, M.**, Nishikawa, M., Nishi, K., Abe, K., Horinouchi, S., and Beppu, T.

- (1990) Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Exp. Cell Res.*, 187: 150-156.
5. **Kijima, M.**, **Yoshida, M.**, Sugita, K., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1993) Tapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J. Biol. Chem.*, 268: 22429-22435.
 6. **Nishi, K.**, **Yoshida, M.**, Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) Leptomycin B targets a regulatory cascade of Crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.*, 269: 6320-6324.
 7. **Kudo, N.**, Knochlin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., **Yoshida, M.**, and Horinouchi, S. (1997) Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J. Biol. Chem.*, 272: 29742-29751.
 8. **Fomerod, M.**, Ohno, M., **Yoshida, M.**, and Matraj, I. W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, 90: 1051-1060.
 9. **Fukuda, M.**, Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., **Yoshida, M.**, Yanagida, M., and Nishida, E. (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, 390: 308-311.
 10. **Kudo, N.**, Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (1998) Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp. Cell Res.*, 242: 540-547.
 11. **Kudo, N.**, Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., **Yoshida, M.**, and Horinouchi, S. (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9112-9117.
 12. **Kim, Y. B.**, Lee, K.-H., Sugita, K., **Yoshida, M.**, and Horinouchi, S. (1999) Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone

- deacetylase. *Oncogene*, 18: 2461-2470.
13. Akakura, S., **Yoshida, M.**, Yoneda, Y., and Horinouchi, S. (2001) A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Vall35). *J. Biol. Chem.*, 276: 14649-14657.
 14. Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., **Yoshida, M.**, and Horinouchi, S. (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 87-92.
 15. Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., **Yoshida, M.**, and Horinouchi, S. (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrg that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res*, 62: 4916-4921.
 16. Hubbard, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., **Yoshida, M.**, Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417: 455-458.
 17. Yoshida, Y., Chiba, T., Tokunaga, F., Kawasaki, H., Iwai, K., Suzuki, T., Ito, Y., Matsuoaka, K., **Yoshida, M.**, Tanaka, K., and Tai, T. (2002) E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature*, 418: 438-442.
 18. Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berry, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.*, 21: 6820-6831.
 19. Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (2006) ORFome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Biotechnol.*, 24: 841-847.
 20. Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K. I., Fukazawa, H., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (2006) Regulation of SV40 large T antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene*, 25: 7391-7400.
 21. Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (2007) Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nature Chem. Biol.*, 3: 576-583.
 22. Shimazu, T., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (2007) Multiple histone deacetylases and the CREB-binding protein regulate pre-mRNA 3'-end processing. *J. Biol. Chem.*, 282: 4470-4478.
 23. Shirai, A., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Arai, R., Komatsu, Y., Horinouchi, S., and **Yoshida, M.** (2008) Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *J. Biol. Chem.*, 283: 10745-10752.
 24. Ho, C. H., Magtanong, L., Barker, S. L., Gresham, D., Nishimura, S., Natarajan, P., Koh, J. L. Y., Proter, J., Gray, C. A., Andersen, R. J., Giaeffer, G., Nislow, C., Andrews, B., Botstein, D., Graham, T. R., **Yoshida, M.**, and Boone, C. (2009) A molecular barcoded yeast ORF library enables mode-of-action analysis of bioactive compounds. *Nature Biotechnol.*, 27: 369-377.
 25. Sasaki, K., Ito, T., Nishino, N., Khochbin, S., and **Yoshida, M.** (2009) Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 16257-16262.
 26. Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Kakeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S., and **Yoshida, M.** (2010) Marine antifungal theconellamides target β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nature Chem. Biol.*, 6: 519-526.
 27. Ito, T., Umehara, T., Sasaki, K., Nakamura, Y., Nishino, N., Terada, T., Shirouzu, M., Padmanabhan, B., Yokoyama, S., Ito, A., and **Yoshida, M.** (2011) Real-time imaging of histone H4K12-specific acetylation determines the modes of ac-

- tion of histone deacetylase and bromodomain inhibitors. *Chem. Biol.*, 18: 495-507.
28. Arita, Y., Nishimura, S., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Usui, T., Boone, C., and **Yoshida, M.** (2011) Microarray-based target identification using drug hypersensitive fission yeast expressing ORFeome. *Mol. Biosyst.*, 7: 1463-1472.
 29. Takahashi, H., Sun, X., Hamamoto, M., Yashiroda, Y., and **Yoshida, M.** (2012) The SAGA histone acetyltransferase complex regulates leucine uptake through the Agp3 permease in fission yeast. *J. Biol. Chem.*, 287: 38158-38167.
 30. Nishimura, S., Ishii, K., Iwamoto, K., Arita, Y., Matsunaga, S., Ohno-Iwashita, Y., Sato, S.B., Kakeya, H., Kobayashi, T., and **Yoshida, M.** (2013) Visualization of sterol-rich membrane domains with fluorescently-labeled theonellamides. *PLoS One*, 8: e83716.

< 総括 >

1. **Yoshida, M.**, Horinouchi, S., and Beppu, T. (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays*, 17: 423-430.
2. Yashiroda, Y., Matsuyama, A., and **Yoshida, M.** (2008) New insights into chemical biology from ORFeome libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12: 55-59.
3. Schneider-Poetsch, T., Usui, T., Kaida, D., and **Yoshida, M.** (2010) Garbled messages and corrupted translations. *Nature Chem. Biol.*, 6: 189-198.
4. Seto, E. and **Yoshida, M.** (2014) Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 6: a018713.