

「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成24年度終了研究課題－

研究総括 向井 常博

1. 研究領域の概要

「細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出」

本研究領域は、エピジェネティクスの制御と生命機能の解明という視点をもった研究を対象とします。より詳しくは、エピジェネティクスの制御機構の解明、様々な生命現象とエピジェネティクスの関わり、エピジェネティクスの多様性や異常がかかわる疾患の解析を対象とします。それらの研究を通してエピジェネティクスの生命機能としての分子基盤を明らかにする事で、細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出を目指します。

具体的な研究内容としては、1)動植物を問わずさまざまなモデル生物を用いてエピジェネティクスの制御機構をいろいろな角度から追求し、明らかにする、2)エピジェネティクスの個体差・多様性を探るとともに、エピジェネティクスの異常にもとづく疾患の解析を行なう、3)エピジェネティクスの解析や制御に資する技術の開発を行う、といった課題が考えられます。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 8件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域に設けた選考委員10名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryoku4.html>) の他、以下の点を重視した。
 - ①DNAメチル化、様々なヒストン修飾、小分子RNAを初めとする機能性非コードRNAなどの諸因子群の解析を通して、そのクロストーク、ネットワーク化による調節機構の統合的理解
 - ②環境の変化に伴う個体差・多様性があることも観察されています。多様性の頻度、その意義なども明らかにされるべき課題です
 - ③エピジェネティクスの異常による疾患の解明
 - ④エピジェネティクス解析にブレークスルーをもたらす技術開発

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー10名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選考	書類選考	面接選考	採択数			
			13件	内訳	3年型	11件(1件)
対象数	161件	30件			13件	内訳

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1)平成21年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
 - ・浦研究者、岡田研究者
 研究期間が5年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:
http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/42epigenetic_H24mid_ev.pdf)

- ・岡本研究者(大挑戦型)、立花研究者、東田研究者
最先端・次世代研究開発支援プログラムに採択され、研究を中断したため。

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議: 7 回

企業見学: 1 回(武田薬品工業(株)湘南研究所見学)

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 18 回

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成25 年1 月 評価会開催(兼成果報告会)

平成25 年3 月 研究総括による事後評価

平成25 年3 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 事後評価

【総論】・・・「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域では、モデル生物によるエピジェネティクスの制御機構、疾患、技術開発を研究対象とした。その中でもエピジェネティクスの制御機構解明に最も力を入れた。その理由は人類福祉の未来を見据え、エピジェネティクスが医療として役に立つにはエピジェネティクスを自在に操作することが必要であり、そのためには制御調節を初めとする原理解明が重要と考えたからである。

初年度はモデル生物による制御機構 5 件、疾患(がん)1 件、技術・方法論(創薬、幹細胞維持化遺伝子探索法の開発)分・2 件であった。モデル生物は酵母、ホヤ、植物、マウスなどであり、それぞれ重要な生命現象を発見した。特筆すべきは以下のとおりである。酵母を用いてユークロマチンとヘテロクロマチンの境界領域における発現動態を単一細胞系で確立したこと、植物モデルを用いて遺伝子内における発現妨害因子を抑制する機構を発見したことなどである。疾患ではがんの解析が行われた。細胞老化の実証—Ras 変異による細胞老化のシグナルネットワークの解明と、その破たんによるがん化仮説の提唱はさらなる発展を期待させた。技術・方法では創薬に向けての開発が行われた。創薬ではエピジェネティクス創薬ターゲット(脱アセチル、脱メチル化酵素)の阻害薬探索に取り組み、多くの化合物の創出に成功し、特許出願、製品開発、商品化まで行い、社会への還元を果たせたと思う。

このように新しい成果が十分に発信された。しかしながらその割には外部発表、特に論文発表が十分とは言いがたく、総じて低調と言わざるを得ない。確かに 3 年間で研究成果が得られ、しかも上質の論文がアクセプトされているというのは大変嬉しいことである。もちろん質の高い論文を多く発表している研究者もいることではあるし、中にはデータはあるがよりよい論文を目ざして頑張っている研究者もいるのでもう少し長い目で見たいと思う。

(1) 有吉眞理子研究者 「DNA メチル化・脱メチル化ニヨルエピジェネティクス制御の分子基盤」

【評価結果】・・・ダイナミックな DNA メチル化の制御機構の分子基盤を明らかにするために、DNA メチル化維持に関与する UHRF1 タンパク質と DNA メチル化領域の DNA 修復に関わる MBD4 に着目し、構造生物学的手法を用いて DNA メチル化やヒストン修飾を認識する複数の重要なドメインの構造解析に成功した。UHRF1 に関しては、複数のヒストン修飾を認識することを見いだした。MBD4 に関して、MBD ドメインが寛容性を示す基質認識の構造的基盤を明らかにしたことは、ミスマッチ修復、脱メチル化の機構解明の基礎となる。

目標達成にはまだ残されている課題が多くあり、引き続きメカニズム解明に資する構造解析と、低分子化合物のスクリーニングに取り組んで欲しい。



(2) 沖 昌也研究者「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解明」

【評価結果】…モデル生物の出芽酵母を用い、エピジェネティックな制御の動態を全く新しい手法を構築することで可視化し、しかも単一細胞レベルでの分析を可能とした。ヘテロクロマチンとユークロマチンの境界で遺伝子発現状態の変化について領域により規則性がみられること、ON⇄OFF 切替えに遺伝子制御があることなどが明らかにされた。これらの結果の再現性、一定の規則性に関して統計処理を用いた解析を共同研究として進め、成果に結びつけたことは評価したい。

今後の展開として、揺らぎに干渉する環境要因の同定へと研究を進められることを期待したい。また、今後の課題として、見いだされた現象は酵母にとどまらず他の生物にも適用できるものなのか大いに関心があるところである。

(3) 加藤 太陽研究者「ヘテロクロマチン確立メカニズムの解明」

【評価結果】…分裂酵母のヘテロクロマチン領域をモデル遺伝子座として、ヘテロクロマチン構築に異常を示す変異のスクリーニングからヘテロクロマチン確立機構の解明をめざしている。この仕組みに関わる因子として新規 X を同定し、X が働かなければすべての転写領域のヒストン修飾が失われることを示す結果を得た。X 因子はヘテロクロマチン形成時にポリメラーゼ II と共に働く因子として同定され、ヒストンのエピジェネティックマークの入ったヌクレオソームを保つ働きがあることを示した。この X 因子をコードしている遺伝子の変異により、ヘテロクロマチン内の転写領域でのヒストン H3 の減少が観察され、ヘテロクロマチンの確立に必須であることが分かった。

これまでは遺伝学的解析が中心であったが、今後 X 因子の分子機能解析にどのようにアプローチするのか、アッセイ系を工夫する必要がある。また、哺乳類でも同じような働きがあるのか大いに関心があるところである。

(4) 金田 篤志研究者「細胞老化ノエピジェネティクスとその破綻による発癌機構」

【評価結果】…当初大腸がん、胃がん症例の解析を行うことでエピジェノタイプを明らかにし、その解析結果を元にがん化の仮説を立て、老化のメカニズム、細胞のがん化、特にエピゲノム変化と遺伝的变化、シグナル経路との関係などについて研究を進めた。細胞老化に関しては、そのシグナルネットワークを解明し、Bmp2-Smad1 系の活性化が Ras 誘導性細胞老化に必須であることを示した。次いで活性化されたシグナルの標的遺伝子も明らかにした。がん化に関しては、老化の破綻によるがん化という仮説を支持する結果を得た。また、胃がん発症における EB ウイルス感染と DNA メチル化のかかわりを示すデータも得た。このように研究課題のねらいは、積極的な研究の展開のもと目標通りに十分達成されており、高く評価する。

これら課題を達成する中で次ぎにめざす課題も見えてきた。細胞老化におけるエピゲノム変化を制御している因子や機構の存在である。仮説に関わる因子の同定とその機能解析に進んで欲しい。また、EB ウイルスについても一部のヒトしか発症しないメカニズムを明らかにして欲しい。一山超えたら、また次の山が見えてきた。理想的な研究の展開である。

(5) 佐瀬 英俊研究者「ヘテロクロマチン修飾除去メカニズムの解析」

【評価結果】…動植物に共通のヘテロクロマチン修飾除去を理解することはエピジェネティクス研究の基盤として重要である。モデル植物シロイヌナズナを用いて異所的に DNA の高メチル化を引き起こす変異体を複数分離した。その中の ibm 1 は報告済みの H3K9 脱メチル化酵素遺伝子であるが、新たに ibm 2 および ibm 3 の原因遺伝子を同定した。その結果 ibm 2 は ibm 1 を介して表現型をもたらすことから、ibm 1 の上位に位置し、遺伝子内のヘテロクロマチン領域をマスクする機能があることが分かった。ヘテロクロマチン修飾除去を理解する上で今までにないヘテロクロマチン領域の形成や消失のメカニズムの一端を明らかにした意義は大きい。

今回の成果は評価に値するが、ヘテロクロマチンがマスクされる分子機構を明らかにする課題が残されており、今後他の変異体の解析も含めてヘテロクロマチン修飾除去機構の実態に迫る研究を進めて欲しい。

(6) 鈴木 孝禎研究者「エピジェネティクス制御化合物の創製と応用」

【評価結果】…一貫してエピジェネティック創薬ターゲットの阻害薬探索に取り組んで、新たな化合物の創出を行った。対象となる各酵素について、構造やケミストリーを考慮して特異性の高い阻害剤を同定していることは高く評価できる。特に、HDAC8 と LSD1 に関しては、細胞実験に使用できる活性と選択性を持つ化合物の創出に成功し、ターゲットの生物学的機能の役割解明に貢献してきている。3 年間という短い研究期間の間に研究課題を目標通りに達成し、創製したエピジェネティクス制御化合物の製品化、ならびに多数の特許出願

まで至った実績は称賛に値する。

今後、より広い基礎生物学者とのネットワークを作ってターゲットのバイオロジーを明らかにし、研究の標準となるツール化合物や治療に使えるような化合物を創出していただきたい。また、一方では創出された化合物を医薬品として成長させるべくその努力もお願いしたい。

(7) 鈴木 美穂研究者「Gene Body メチル化の生物学的意義と分子機構の解明」

【評価結果】・・・DNA メチル化は通常遺伝子の発現に抑制的に働くと考えられている。ところが DNA メチル化が集中している遺伝子転写領域 (gene body) ではどのような働きがあるのか理解されていない。ここでは gene body に DNA メチル化が局在している無脊椎動物 (カタユレイボヤ) をモデルにメチル化模様の意義を探った。その結果、DNA メチル化は恒常的に発現する遺伝子でのみ見られること、プロモータ配列に依存すること、組織特異性はなく同じ遺伝子で観察されることなどを明らかにした。その意義は大きいですが研究はまだ緒にすぎたばかりである。

このテーマは DNA メチル化の本質に迫るという点で、チャレンジングなテーマである。重要なテーマであるので今後とも gene body メチル化の機能とその分子機構の解明に向け更なる発展を期待したい。

(8) 西岡 憲一研究者「新規ポリコム群・トリソラックス群の探索」

【評価結果】・・・哺乳類の新規ポリコム群・トリソラックス群の遺伝子を得るために新たなスクリーニング系を開発した。開発した方法は次の通りである。F9 細胞に shRNA ライブラリー由来のレンチウイルスを感染させ、培養後得られた細胞を 4 型コラーゲン蛍光染色後、FACS にかけて細胞を分離し、ついで細胞よりゲノム DNA を採取しバーコード付きレンチウイルスを増幅し、次世代シーケンサーで解析した。その結果、ポリコム系遺伝子の候補遺伝子として 34 種類、トリソラックス系遺伝子候補として 25 種類を取りあげた。方法の確立に時間がかかったが、当初の目的に到達したことは評価したい。

今回のスクリーニングで新規のポリコム遺伝子群が得られたのか、その検証並ならびに機能解析はこれからである。今後の解析の進展に期待したい。

10. 評価者

【研究総括】 向井 常博 西九州大学 学長

【領域アドバイザー】(五十音順。所属、役職は平成 25 年 3 月末現在)

牛島 俊和	国立がん研究センター・上席副所長
角谷 徹仁	国立遺伝学研究所総合遺伝研究系・教授
金児-石野 知子	東海大学 健康科学部 教授
古関 明彦	理化学研究所 免疫アレルギー化学総合研究センター グループディレクター
佐々木 裕之	九州大学 生体防御研究所 所長
白髭 克彦	東京大学 分子細胞生物学研究所 教授
眞貝 洋一	理化学研究所基幹研究所 主任研究員
田嶋 正二	大阪大学蛋白質研究所 教授
中西 理	武田薬品(株) 研究本部 主席部員
広瀬 進	国立遺伝学研究所 名誉教授

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	14	18	32
口頭	38	24	62
その他	36	5	41
合計	68	57	135

(2)特許出願件数

国内	国際	計
10	0	10

(3)受賞

- ・沖 昌也研究者
日本遺伝学会 奨励賞(H22/9)
- ・佐瀬 英俊研究者
日本遺伝学会 奨励賞(H23/9)
平成 24 年度科学技術分野の文部科学大臣表象若手科学者賞(H24/4)
- ・鈴木 孝禎研究者
平成 23 年度科学技術分野の文部科学大臣表象若手科学者賞(H23/4)
平成 24 年度長瀬研究振興賞(H24/4)

(4)招待講演

- 国際 4件
- 国内 29件

別紙

「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成25年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
有吉 真理子 (専任)	DNA メチル化・脱メチル化によるエピ ジェネティック制御の分子基盤 京都大学 物質—細胞統合システム拠 点(iCeMS)	科学技術振興機構さきがけ研究者 (京都大学 物質—細胞統合システ ム拠点(iCeMS) 特任准教授) (京都大学工学研究科 助教)	40
沖 昌也 (兼任)	エピジェネティックな遺伝子発現切り替わ りメカニズムの解明 (福井大学福井大学 大学院工学研究科)	福井大学 大学院工学研究科 准教授 (同上)	49
加藤 太陽 (兼任)	ヘテロクロマチン確立メカニズム の解明 (島根大学 医学部)	島根大学 医学部 助教 (同上)	40
金田 篤志 (兼任)	細胞老化のエピジェネティクスとその破 綻による発癌機構 (東京大学 先端科学技術研究センタ ー)	東京大学 先端科学技術研究セン ター 特任准教授 (同上)	45
佐瀬 英俊 (兼任)	ヘテロクロマチン修飾除去メカニズムの 解析 (沖縄科学技術大学院大学)	沖縄科学技術大学院大学 准教 授 (情報システム研究機構国立遺伝 学研究所 助教)	39
鈴木 孝禎 (兼任)	エピジェネティクス制御化合物の創製と 応用 (京都府立医科大学大学院医学研究 科)	京都府立医科大学大学院医学研 究科 教授 (名古屋市立大学大学院薬学研究 科 講師)	43

鈴木 美穂 (専任)	Gene body メチル化の生物学的意義と 分子機構の解明 (自然科学研究機構 基礎生物学研究所)	科学技術振興機構 さきがけ研究者(自然科学研究機構 基礎生物学研究所 特別訪問研究員) 科学技術振興機構 さきがけ研究者(愛知県心身者コロニー発達障害研究所 研究員)	47
西岡 憲一 (兼任)	新規ポリコーム群・トリソラックス群の探索 (佐賀大学 医学部)	佐賀大学 医学部 助教 (同上)	43

研究報告書

「DNAメチル化・脱メチル化によるエピジェネティック制御の分子基」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 有吉真理子

1. 研究のねらい

哺乳動物において、CpG配列中のシトシン塩基のメチル化は唯一DNA上のエピジェネティックマーカーであり、細胞分化と分化状態の維持に密接に関わっている。細胞種に特有なDNAメチル化パターンは、新規DNAメチル化によって形成され、維持型DNAメチル化によって細胞分裂を経ても忠実に維持される。一方、発生初期の胚細胞におけるエピジェネティックなリプログラミング過程や分化した細胞における特定のゲノム領域の周期的なメチル化様式の変化においては、DNA脱メチル化がおこることが明らかになってきた。本研究では、ダイナミックなDNAメチル化制御機構の分子基盤を理解するため、DNA維持メチル化に関わるUHRF1たんぱく質とDNAメチル化領域のDNA修復に関わるMBD4に注目し、X線結晶解析および核磁気共鳴法(NMR)などの構造生物学的手法を用いて、これらたんぱく質のメチル化DNA認識機構やDNAメチル化とヒストン修飾の構造機能相関を原子レベルで明らかにする。このような原子レベルでの構造知見は、DNAメチル化・脱メチル化を制御するための低分子化合物の探索、設計およびたんぱく工学的アプローチの確立に貢献するものと考えられる。また、DNAメチル化・脱メチル化は修飾されたヒストンを含むクロマチンの高次構造のコンテキストで起こる現象であり、個々のたんぱく質因子の構造解析だけでは全貌を明らかにすることはできない。本研究では、X線結晶解析を用いた原子レベルでの構造解析に加え、クロマチン構造を視野に入れたより細胞内状態に近い状態でのDNAメチル化制御因子の挙動を捉えることを試みる。そのためにX線結晶解析とその相補的な解析手段であり、分子の動的解析が可能な磁気共鳴計測手法であるNMRや一分子解析の技術を併用する。これらの測定技術とクロマチン再構成系を組み合わせることでクロマチンの高次構造の動的挙動を視野にいれた構造機能解析を行い、より高次のDNAメチル化制御機構を理解する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、構造生物学的手法を用いて、DNAメチル化・脱メチル化制御の分子基盤の解明に向け、DNA維持メチル化因子であるUHRF1[研究テーマA]および能動的DNA脱メチル化への関与が示唆されていたミスマッチ除去修復酵素MBD4[研究テーマB]の構造機能解析を行った。X線結晶解析と*in vitro*分子間相互作用実験法による構造機能相関研究及びクロマチン再構成系を組み合わせることでクロマチンの高次構造の動的挙動を視野にいれた構造機能解析を行った。

[研究テーマA]については、UHRF1のヒストン結合領域の結晶構造解析と生化学的な相互作用解析から、UHRF1による2つのヒストン残基上のエピジェネティックマークをコードとして読み取っていることが明らかになった。また、リン酸化によるUHRF1のヒストン認識モードの変換機構があきらかとなった。また、再構成モノヌクレオソームを用いた相互作用解析の結果から、UHRF1とヌクレオソームの結合には、ヒストン結合ドメインだけではなく、DNA結合ドメインであるSRAドメイン

が必要であることが明らかになった。この結果は、ヒストン結合ドメインと片鎖 CpG 結合ドメインのクロマチン上での協調的な機能発現を示唆するものである。

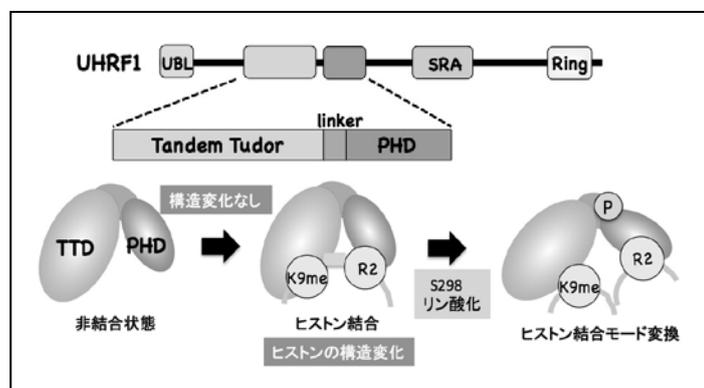
5-メチルシトシンは哺乳動物における DNA 上のエピジェネティックマークであるが、能動的脱メチル化過程においては、5-メチルシトシンの酸化もしくは脱アミノ化によって生じる修飾塩基の能動的DNA脱メチル化への関与が注目されている。[研究テーマ B]においては、MBD4 のメチル化 CpG 結合ドメインの構造機能解析を行い、MBD4 がこれら修飾塩基に対して寛容な結合能を示すことを明らかにした。本研究結果に基づき、ダイナミックに変化する DNA メチル化様式の制御における MBD4 の役割を検証した。

(2) 詳細

研究テーマA 受動的DNA脱メチル化の制御機構:UHRF1 の構造機能解析

1) 維持型 DNA メチル化制御因子 UHRF1 のヒストン認識機構

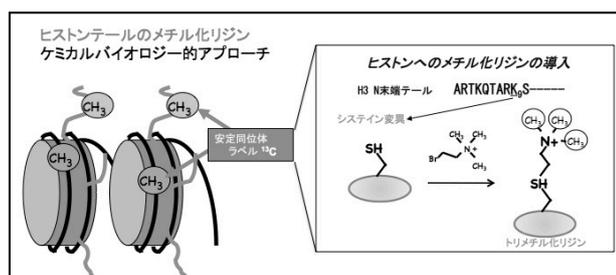
UHRF1 は、DNA複製時の維持メチル化の最初のステップにおいて、片鎖メチル化CpG部位とヒストンH3 の修飾状態を認識し、メチル化維持と受動的脱メチル化を決定する重要な因子である。UHRF1 には、片鎖メチル化CpG (5^mCG/CG) 部位との結合を担うSRAドメインとともにヒ



ストン結合ドメインであるTandem Tudorドメイン(TTD)およびPHDドメイン(TTD-PHD_{UHRF1})が存在する。TTD-PHD_{UHRF1}とヒストンH3 のN末端テールの複合体の結晶構造を決定し、TTDとPHDのドメイン間の領域のリン酸化によってUHRF1 のヒストン認識モードが制御されていることを明らかにした。また、UHRF1 がジメチルもしくはトリメチル化されたH3K9 (H3K9me_{2/3})を特異的に認識することは既に報告されていたが、今回の解析結果からH3K9me_{2/3} と非修飾状態のH3R2 を組み合わせとして認識することが明らかになった。さらに、立体構造と生化学的な実験結果から、H3S10 のリン酸化によるネガティブなUHRF1:ヒストンH3 結合制御の可能性が示唆され、H3K9me_{2/3} 単独ではなく、複数のヒストン残基の修飾状態がDNAメチル化様式の形成に関わっていると考えられる。

2) H3K9me₃を含む再構成ヌクレオソームと UHRF1 の相互作用解析

UHRF1 が認識するヒストンH3K9 をシステイン残基に置換し、メチル化リジンアナログ(H3K9Cme₃)を導入した再構成ヌクレオソームの大量調製系を確立した(右図)。H3K9Cme₃-モノヌクレオソームとUHRF1 のヒストン結合ド



メインを含む様々な領域のフラグメントを用いてヌクレオソームとの結合実験を行った。その結果、TTD-PHD_{UHRF1}だけでは、モノヌクレオソーム上のH3K9me2/3との安定な結合はみられなかった。TTD-PHD_{UHRF1}を含む様々な領域のUHRF1フラグメントとH3K9Cme3-モノヌクレオソームの相互作用を検証した。その結果、UHRF1とヌクレオソームの結合が、ヒストン結合ドメインだけではなく、DNA結合ドメインであるSRADドメインが必要であることが明らかになった。この結果は、ヒストン結合ドメインと片鎖CpG結合ドメインのクロマチン上での協調的な機能発現を示唆するものである。

研究テーマB 能動的脱メチル化の制御機構:MBD4の構造機能解析

1) メチル化 CpG 結合たんぱく質 MBD4 の寛容な基質認識の構造基盤

メチル化CpG結合ドメイン(MBD)タンパク質ファミリーのメンバーであるMBD4は、MBDに加え、T/Gミスマッチ中のチミン塩基を切除するglycosylaseドメインを持ち、メチル化CpG配列に生じたミスマッチ塩基を除去する修復酵素として機能する。MBD4のMBD(MBD_{MBD4})は、メチル化DNAに加え、T/Gミスマッチ塩基対を認識できることが知られていたが、どのように多様な基質を認識するのかは不明であった。本研究では、生化学的な実験とX線結晶構造解析法を用いて、MBD_{MBD4}による基質認識機構を明らかにした。

まず、MBD_{MBD4}と^{5m}CG/^{5m}CG、^{5m}CG/TGを含むDNA断片との複合体の結晶構造を決定した。立体構造既知の他のファミリータンパク質のMBDに比べると、MBD4のDNA結合表面には広範な水和水のネットワークが存在し、柔軟な構造的な特徴を持つことがわかった。そのため^{5m}CG/^{5m}CG、^{5m}CG/TG、両方の配列を効率よく認識できると考えられる。MBD_{MBD4}の可塑的なDNA結合面の構造から、^{5m}Cの5位のメチル基がさらに酸化を受けたヒドロキシメチルシトシン(^{hm}C)、ホルミルシトシン(^{fo}C)、ヒドロキシメチルウラシル(^{hm}U)との結合も可能であると推測された。実際に、等温滴定カロリーメトリーやEMSAを用いた定量的なDNA結合実験の結果から、MBD_{MBD4}が酸化塩基を含むDNAとも結合することが示され、MBD4の寛容な基質認識が明らかになった。さらに、MBD_{MBD4}と^{hm}Cを含むDNAの複合体結晶構造解析により、MBD_{MBD4}のDNA結合表面の隙間に存在する水和水のネットワーク構造が柔軟に変化することによって、^{hm}Cを含むDNAとの結合が可能になっていることが明らかになった(図1)。

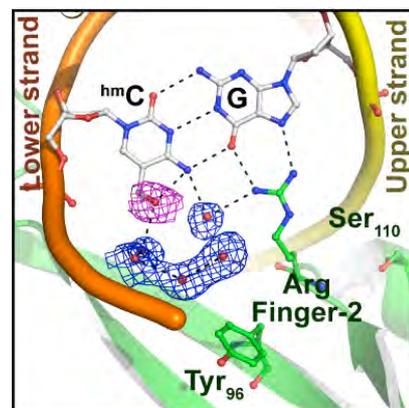


図1 MBD4のMBDによる5-ヒドロキシメチルシトシンの認識

2) MBD4の基質認識と塩基除去活性

MBD4との結合が確認された^{5m}Cの酸化や脱アミノ化によって生じる修飾塩基は、塩基除去修復を介したDNAの脱メチル化過程に関わる可能性が示唆されており、これらの修飾塩基に対するMBD4の塩基除去活性の解析を行った。その結果、MBD4はシトシンもしくはメチル化シトシンの脱アミノ化生成産物であるチミンや^{hm}U特異的な塩基除去活性を示したが、^{hm}Cなどの酸化修飾塩基に対する活性は有していなかった。一方、同様にDNA脱メチル化経路に関与

するとされる塩基除去修復酵素、チミンDNAグリコシラーゼ(TDG)においては、¹⁴Cやカルボキシシルシトシンに対する塩基除去活性が報告されている。これらのことから、MBD4 がTDGとは異なる脱メチル化経路に関与している可能性が示唆される。MBD4の酸化修飾塩基への寛容な基質認識の役割については、^{5m}Cの酸化・脱アミノ化をエピジェネティックシグナルとして認識している可能性が考えられるが、さらなる検証が必要である。

また、高速 AFM(原子間力走査型顕微鏡)による全長 MBD4 の構造解析、変異体解析の結果、基質 DNA が基質認識ドメインである MBD から glycosylase 活性ドメインへと効率的に受け渡される機能モデルを提唱した。

3. 今後の展開

本研究で明らかにしたUHRF1によるヒストン修飾認識およびMBD4によるメチル化DNAと脱アミノ化、酸化誘導体認識の原子レベルでの構造知見は、細胞内機能の解析の足がかりとなるとともに細胞内のDNAメチル化の人為的制御につながる低分子化合物の探索やたんぱく工学的アプローチの確立のための構造基盤となりうる。今回の研究期間中では、有意な結果を得るに至らなかったが、UHRF1のSRAドメインやTTD-PHDを標的とした低分子、またはペプチド性阻害剤の探索を継続して行っていく。UHRF1の^{5m}CG/CG結合阻害剤が得られれば、受動的DNA脱メチル化経路の分子機構研究、人為的制御に有効であると考えられる。また、今回確立したH3K9Cme3-ヌクレオソームの大量調製系を用いて、UHRF1やその他のエピジェネティック因子との複合体の構造機能解析に発展させていくことが可能であると考えている。

4. 自己評価

X線結晶解析、NMR法および生化学的実験手法を用いて、DNAメチル化制御の要となるたんぱく質UHRF1およびMBD4の構造基盤を明らかにすることができた。本研究結果は、DNA上のエピジェネティックマークであるシトシンの修飾読み取り機構を明らかにし、DNAメチル化・脱メチル化制御の分子基盤解明に貢献できたと考える。より細胞内に近い状態での構造機能解析として、再構成ヌクレオソームを用いた構造機能解析を試みた。これに関しては、当初の目的であるクロマチン上の機能反映を定量的な構造情報として解析するには至っていないが、生化学的な手法を用いた解析からは有用な知見を得られており、今回の研究を今後発展させることは十分可能であると考ええる。

5. 研究総括の見解

ダイナミックなDNAメチル化の制御機構の分子基盤を明らかにするために、DNAメチル化維持に関与するUHRF1タンパク質とDNAメチル化領域のDNA修復に関わるMBD4に着目し、構造生物学的手法を用いてDNAメチル化やヒストン修飾を認識する複数の重要なドメインの構造解析に成功した。UHRF1に関しては、複数のヒストン修飾を認識することを見いだした。MBD4に関して、MBDドメインが寛容性を示す基質認識の構造的基盤を明らかにしたことは、ミスマッチ修復、脱メチル化の機構解明の基礎となる。

目標達成にはまだ残されている課題が多くあり、引き続きメカニズム解明に資する構造解析と、低分子化合物のスクリーニングに取り組んで欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Otani, J., Arita, K., Kato, T., Kinoshita, M., Kimura, H., Suetake, I., Tajima, S., **Ariyoshi, M.*** and Shirakawa, M.* (2013) Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4. **J Biol Chem.** in press doi/10.1074/jbc.M112.431098.
2. Arita, K., Isogai, S., Oda, T., Unoki, M., Sugita, K., Sekiyama, N., Kuwata, K., Hamamoto, R., Tochio, H., Sato, M., ***Ariyoshi, M.** and *Shirakawa, M. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, Vol. 109, 12950-12955
3. Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., *Inamoto, S., ***Ariyoshi, M.** and *Shirakawa, M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNMT3A ADD domain. **EMBO report.** 2009, Vol. 10, 1235-1241.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **Ariyoshi, M.**, Arita, K., Isogai, S., Tochio, H. and Shirakawa, M.: Structural insight into epigenetic marker readout by UHRF1. 第6回ナノメディシン国際シンポジウム(2012年11月 松江) 招待講演
2. **Ariyoshi, M.**, Otani, J., Kinoshita, M. and Shirakawa, M. : Structure basis for regulation of DNA methylation. 第34回分子生物学会年会, Workshop “Molecular basis of gene regulation and genome maintenance in chromosomes” (2011年12月 横浜)
3. **Ariyoshi, M.**, Otani, J., Kinoshita, M. and Shirakawa, M. : Structural Basis of versatile DNA recognition of MBD4. XXII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography (Mini Symposium “Nucleosome Processing and Epigenetics”), (2011年8月 Madrid, Spain)
4. **Ariyoshi, M.**, Arita, K., Kikugawa, Y., Tochio, H. and Shirakawa, M. : Structural Insight into hemi-methylated CpG DNA recognition by SRA domain of human NP95 (poster presentation) Gordon Research Conference “Chromatin Structure & Function”, (2010年7月 Bryant University, USA)

総説



1. 有吉真理子 白川昌宏 (2011) エピジェネティクス制御におけるメチル化DNAの認識。生物物理 Vol. 51 124-127
2. 有吉真理子 白川昌宏 (2010) エピジェネティクス制御における分子認識: DNAメチル化制御の構造生物学。実験医学 9月増刊号「疾患解明とその基盤としてのエピジェネティクス」Vol. 28

研究報告書

「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 沖 昌也

1. 研究のねらい

我々は、出芽酵母をモデル生物として用い、エピジェネティックな制御をうけるヘテロクロマチン領域の形成及び維持に関して、分子レベルでのメカニズム解明に向けて研究を行ってきた。その過程で、ヘテロクロマチン領域の伸長が停止する境界領域が存在し、境界領域は個々の細胞間で変動し、下流にレポーター遺伝子を挿入すると、細胞分裂に伴って遺伝子発現の ON と OFF がエピジェネティックに切り替わることを見出した。

そこで、単一細胞における世代を越えた遺伝子発現切り替わりの状態を、蛍光タンパク質を用い可視化するシステムを確立し、エピジェネティックな遺伝子発現状態は数世代維持された後に切り替わり、再び同様の発現状態が数世代維持された後に切り替わることを明らかにした。この結果は、境界領域の形成が何かしらの影響により個々の細胞において揺らいでおり、結果として遺伝子の発現状態が変動していることを示唆した。

本研究では、この細胞分裂に伴い境界領域が揺らぎ遺伝子の発現が変動するエピジェネティックな現象について、(1) 世代を越えた発現状態の揺らぎに規則性があるか、(2) 同一細胞内の異なる領域での揺らぎは同調しているのか、(3) 揺らぎは遺伝子により支配されているのか、(4) 外的要因によって揺らぎは変動するのか、(5) 実際の生体内において揺らぎにより制御されている遺伝子は存在するのか等、様々な角度から解析することにより、ヘテロクロマチン領域の揺らぎに関する分子レベルでのメカニズム解明を目指した。

また、「状況に応じたヘテロクロマチン領域の揺らぎによる遺伝子発現制御機構」が存在すれば、新規の遺伝子発現調節機構であり、少ない遺伝子で、如何に生物の多様性を生み出すかという問題に対しての1つの答えを導き出せると期待し、本研究を提案した。

2. 研究成果

(1) 概要

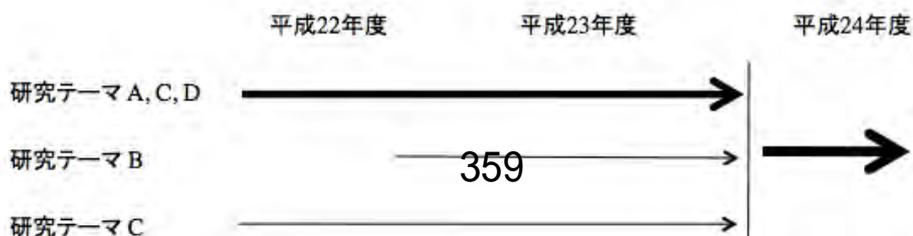
本研究では、下記4つのテーマを提案し、最終的には各年度で得られた結果を融合し、テロクロマチン領域の揺らぎに関する分子レベルでのメカニズム解明を目指し研究を進めた。

[研究テーマ A] 世代を超えた発現揺らぎメカニズムの解析

[研究テーマ B] 揺らぎ領域を可視化するシステムの開発

[研究テーマ C] 揺らぎをコントロールする遺伝子の探索

[研究テーマ D] 個々の細胞内で同様にエピジェネティックな発現調節を受けるか？



(2) 詳細

[研究テーマ A] 世代を超えた発現揺らぎメカニズムの解析

(a) エピジェネティックな発現調節を受ける領域の同定

染色体上には、高度にクロマチン構造が凝集したヘテロクロマチン領域と、緩んだ状態のユークロマチン領域が存在する。最初に我々は、出芽酵母ヘテロクロマチン領域として知られている *HMR* 遺伝子座に注目し、レポーター遺伝子として *URA3* を用いることにより、ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の境界部分に遺伝子を導入すると、個々の細胞によって遺伝子の発現状態がエピジェネティックに変化することを見出した(図1)。個々の細胞間で発現状態が変動するため、混ざりの集団ではなく、単一細胞での解析が重要であると考え、蛍光タンパク質を用い、世代を越えた単一細胞での発現状態変化を追跡するシステムを確立した。

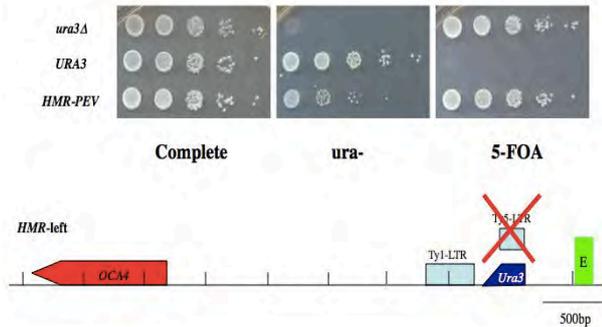


図1: エピジェネティックに発現状態が変化する領域の同定

(b) 単一細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現状態追跡システムの確立

蛍光顕微鏡下で細胞を分裂させ、世代を超えた発現状態変化の規則性に関してタイムラプスシステムを用い解析した。発現状態の変化は蛍光タンパク質の細胞内存在量で定量した。

出芽酵母では性決定に関わる *HMR*、*HML* 領域、テロメア領域、*rDNA* 領域がヘテロクロマチン構造を形成し、内部に存在する遺伝子がサイレンシングされていることが知られている。*HMR* 領域左側、*HMR* 領域右側、*HML* 領域右側、テロメア領域の境界でエピジェネティックに発現状態が切り替わる領域にレポーター遺伝子として *H2B-EGFP* を挿入し、世代を超えた発現状態変化について解析を行った。その結果、*HMR* 領域左側ではランダムに発現状態の変化が起こり(図2)、*HMR* 領域右側と *HML* 領域右側は変化のパターンが類似しており ON または OFF の状態が数世代継続し、テロメアでは ON または OFF の状態が *HMR* 領域右側と *HML* 領域右側よりも更に安定で、世代を越えた発現状態の切り替わりが起こりにくいという一定の規則性が見られた。

他のレポーター遺伝子でも同様の傾向が見られるかを明らかにするため、同じ場所に *ADE2* 遺伝子を挿入し解析した。*ADE2* 遺伝子は発現すると酵母のコロニーは白くなり、*ADE2* 遺伝子が発現しないと赤色のコロニーを形成する。

HMR 領域左側では、ピンク色のコロニー、HMR 領域右側、HML 右側ではピンクのバックの中にセクター、テロメア領域では、綺麗なセクターを形成した。この結果は、世代を越えた発現状態の変化の安定性の差を示しており、単一細胞での解析結果と一致した。

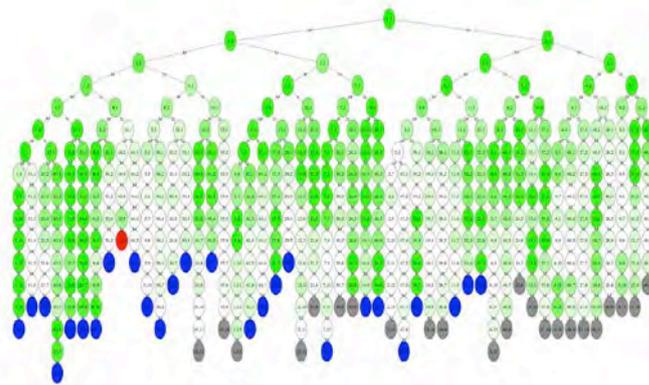


図2: 世代を越えたエピジェネティックな発現状態の変化

(c) 統計処理を用いた解析

単一細胞での追跡結果にはきちんと再現性があるのか、またランダムではなく、一定の規則性があるのか等を明らかにするために統計処理を行った。統計処理はさがけ研究員である東京大学の小林徹也先生との共同研究である。その結果、高い再現性が見られ、またランダムだけではなく、一定の規則性が存在することが明らかとなった。

図2: 世代を越えたエピジェネティックな発現状態の変化

[研究テーマ C] 揺らぎをコントロールする遺伝子の探索

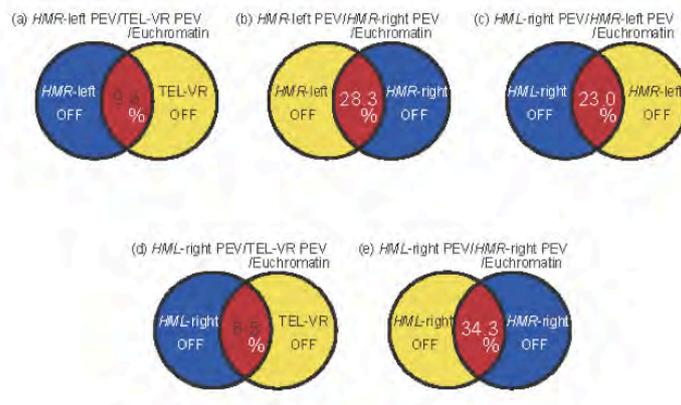
我々は既に出芽酵母全遺伝子約 6000 個の中からスクリーニングによりエピジェネティクスコントロール遺伝子を分離している。それらは同一の機能を持つタンパク質複合体の構成因子が多数含まれており、大きく8つのグループに分類出来た。最初に、ヒストン修飾酵素に注目し、破壊株を作製後、上記蛍光タンパク質を用いたタイムラプス実験を行った。その結果、*sas2* 破壊株では、発現状態の ON と OFF の切り替わり頻度が上昇していることが明らかとなった。一方、ターゲットの異なる SAGA ヒストンアセチル化酵素複合体因子の *gcn5* 破壊株では、世代を越えたエピジェネティックな発現状態変化が起こりにくくなり、固定されていることを示唆する結果が得られた。この結果は、*ADE2* をレポーター遺伝子として用いて行った解析結果とも一致した。

[研究テーマ D] 個々の細胞内で同様にエピジェネティックな発現調節を受けるか？

同一細胞内で異なるヘテロクロマチン領域の伸縮に規則性があるか解析した。具体的には、同一細胞内の1つの境界領域には *H2B-ECFP* を、異なる境界領域には *H2B-EYFP* を挿入し、コントロールとしてユークロマチン領域に *H2B-mcherry* を挿入しタイムラプス実験を行った。同一細胞内の異なる領域、HMR 左側境界領域とテロメア境界領域、HMR 左側境界領域と HMR 右側境界領域、HMR 左側境界領域と HML 左側境界領域、HML 右側境界領域とテロメア境界領域での解析を行った。その結果、同一細胞内の HMR 領域の右側と左側、HMR 領域と HML 領域では同期している細胞が多く、HMR 領域と テロメア領域、HML 領域とテロメア領域では、片方のサイレンシング領域が伸長すれば他方は縮むという相反す

る関係があることを示唆する実験結果が得られた(図3)。この結果は、同一細胞内のエピジェネティックな遺伝子発現調節機構には、細胞内においてサイレンシングされている領域のバランスにも支配されていることを示唆した。

図3: 同一細胞内の異なるエピジェネティック



制御領域の機能的相関

[研究テーマ B] 揺らぎ領域を可視化するシステムの開発
計画通りには進まず今後の検討が必要である。

3. 今後の展開

現在までの解析により、エピジェネティックな発現状態の変化には、同一細胞内でも、幾つかのパターンが存在し、遺伝子によっても制御を受けていることが明らかとなった。ターゲットの異なるヒストン修飾酵素を破壊すると、切り替わりの早くなるパターン、切り替わりが起これにくく世代を越えたエピジェネティックな発現状態が固定されるパターン等が見られたが、今後は、なぜ、ヒストンの修飾状態の違いによりこのような変化が見られるのか分子レベルでのメカニズム解明を目指したい。

また、出芽酵母ヘテロクロマチン領域形成因子である Sir タンパク質を用い ChIP on chip 解析を行った結果、新規の Sir タンパク質存在領域を多数同定した。これらの近傍には多数の遺伝子が存在し、ヘテロクロマチン領域の揺らぎにより、発現状態がコントロールされている可能性が示唆された。異なる染色体上に存在しているために同時制御が難しいと考えられていた遺伝子群においても、「ヘテロクロマチン領域の揺らぎの制御」という共通のメカニズムにより同時制御が可能となり、生体内で、ヘテロクロマチン領域が揺らぐことにより制御される新たな遺伝子発現調節機構の存在も期待できる。

我々は酵母を用いて研究を行ってきたが、ヘテロクロマチン領域は生物種を越えて保存されており、「ヘテロクロマチン領域の揺らぎ」という同様なメカニズムで遺伝子発現が制御されている可能性があり、分子レベルでのメカニズムを解明することにより、生物の多様性を生み出す新たな可能性を提示できると考えている。

4. 自己評価

本研究は、単一細胞を追跡するシステムを確立する前の段階で提案しており、研究を進める上で幾つかの問題点が予測された。予測された問題点を1つずつ改良し、計画よりも順調に研究が進んだことは評価出来る。

また、単一細胞を追跡したことにより、従来まではランダムだと考えられていたエピジェネテ

ィックな発現状態の揺らぎに一定の規則性があること、また遺伝子により規則性が変化すること、同一細胞内でも異なる領域間では独立して制御されているところと、協調して働いているところが存在することを明らかに出来たことは大きな成果であったと考えている。

更に、さきがけ研究者交流会を通じて、統計処理の専門家である小林先生と知り合う機会があり、共同研究を進めることにより、統計的にもエピジェネティックな発現状態の揺らぎに有意差を見出すことが出来、また、統計処理をすることにより新たに興味深い現象も見出した。

本研究の成果により、研究のねらいで記載した「状況に応じたヘテロクロマチン領域の揺らぎによる新たな遺伝子発現制御機構」の存在が示唆され、今後の研究の発展が期待出来る大きな成果を上げることが出来たと考えている。

5. 研究総括の見解

モデル生物の出芽酵母を用い、エピジェネティックな制御の動態を全く新しい手法を構築することで可視化し、しかも単一細胞レベルでの分析を可能とした。ヘテロクロマチンとユークロマチンの境界で遺伝子発現状態の変化について領域により規則性がみられること、ON⇔OFF切替えに遺伝子制御があることなどが明らかにされた。これらの結果の再現性、一定の規則性に関して統計処理を用いた解析を共同研究として進め、成果に結びつけたことは評価したい。

今後の展開として、揺らぎに干渉する環境要因の同定へと研究を進められることを期待したい。また、今後の課題として、見いだされた現象は酵母にとどまらず他の生物にも適用できるものなのか大いに関心があるところである。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hatanaka A, Chen B, Sun JQ, Mano Y, Funakoshi M, Kobayashi H, Ju Y, Mizutani T, Shinmyozu K, Nakayama J, Miyamoto K, Uchida H and Oki M. (2011) protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. <i>Genes Genet. Syst.</i> , 86, 305-314
2. Doubayashi D, Ootake T, Maeda Y, Oki M. , Tokunaga Y, Sakurai A, Nagaosa Y, Mikami glucose-methanol-choline oxidoreductase family has a distinct catalytic site. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 75, 1662-1667.
3. Sun JQ, Hatanaka A and Oki M. (2011) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Genes Genet. Syst.</i> , 86, 73-81.
4. Maeda Y, Dobayashi D, Ootake T, Oki M. , Mikami B and Uchida H. (2010) Crystallization and preliminary X-ray analysis of formate oxidase, an enzyme of the glucose-methanol-choline oxidoreductase family. <i>Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.</i> , 66, 1064-1066.
5. Mizutani T, Yazawa T, Ju Y, Imamichi Y, Uesaka M, Inaoka Y, Matsuura K, Kamiki Y, Oki M. , Umezawa A and Miyamot K. (2010) Identification of a novel distal control region

upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (STAR) gene that participates in SF-1 dependent chromatin architecture. J. Biol Chem. 285, 28240-28251.

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

○ 投稿中論文

1. Mano Y, Kobayashi T, Nakayama JI, Uchida H and **Oki M**. Changes in epigenetic gene expression in single cells was correlated *HM* region, but not in the telomere, and are controlled by a histone acetyltransferase. Submitted.
2. Kamata K, Hatanaka A, Goswami G, Kaori Shinmyozu, Nakayama JI, Urano T, Hatashita M, Uchida H and **Oki M**. The C-terminus of Sgf73 is important for SAGA and SLIK interaction and boundary function. Submitted.

○ 招待講演

1. **沖昌也**「単一細胞追跡システムを用いたエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解明」第5回定量生物学の会 2012年11月25日(東京)
2. **沖昌也**「出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解明」第72回酵母研究会 黄桜株式会社 2011年3月11日(京都)
3. **沖昌也**「出芽酵母染色体上における境界形成機構とエピジェネティックな遺伝子発現調節機構との関わり」第21回フォーラム・イン・ドージン「エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ」熊本キャッスルホテル 2010年11月26日(熊本)
4. **Masaya Oki** 「Analysis of the Epigenetic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*」Drexel University (Philadelphia, USA) August 2, 2010
5. **沖昌也**「新たなアプローチからのエピジェネティクスの解明」(独)産業技術総合研究所 北海道センター 2010年2月19日(札幌)

○ 学会発表

(国際学会)

1. **Masaya Oki**, Naohiro Terada, Risa Mitsumori, Kazuma Kamata, Hiroyuki Uchida (2012 September 13) "The transcriptionally s the situation" Cold Spring Harbor Meeting (New York, USA)
2. **Masaya Oki**, Akira Hatanaka, Yasunobu Mano and Hiroyuki Uchida (2010 July) "Analysis of the Epigenetic gene expression in *S.cerevisiae*" Gordon Research Conferences (Rohde Island, U.S.A)
3. **Masaya Oki**, Yasunobu Mano, Akira Hatanaka and Hiroyuki Uchida (2009 July) "Analysis of the heredity change of the ger cell" FASEB summer research conference (Colorado, USA)
4. **Masaya Oki** "Analysis of the heredity change of the boundary" Chromatin domains and Insulators Baeza, Spain, Nov 9, 2009



(国内学会)

1. 沖昌也、寺田尚弘、内田博之「ヘテロクロマチン領域は状況に応じて多様な変化を示す」日本遺伝学会第84回大会(福岡)2012年9月
2. 眞野恭伸、内田博之、沖昌也「世代を越えたエピジェネティックな遺伝子発現はヒストン修飾酵素により制御されている」第45回 酵母遺伝学フォーラム(京都)2012年9月
3. 畑中彬良、横山慶人、内田博之、沖昌也「外的要因により変化するエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解析」第44回 酵母遺伝学フォーラム(福岡)2011年9月
4. 眞野恭伸、内田博之、沖昌也「個々の細胞において揺らぐサイレンシング領域の機能解析」第28回 染色体ワークショップ(加賀)2011年1月
5. 沖昌也、畑中彬良、眞野恭伸、光森理紗、内田博之「出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」第33回 日本分子生物学会年会(神戸)2010年12月
6. 沖昌也「出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解析」日本遺伝学会 第82回大会(シンポジウム)(札幌)2010年9月
7. 畑中彬良、眞野恭伸、内田博之、沖昌也「エピジェネティックな遺伝子発現状態変化メカニズムの解析」第43回 酵母遺伝学フォーラム(奈良)2010年9月
8. 畑中彬良、光森理紗、眞野恭伸、大橋友恵、内田博之、沖昌也「出芽酵母におけるエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりと境界形成機構の関与」第9回 核ダイナミクス研究会(修善寺)2010年5月
9. 眞野恭伸、山口さやか、坂季美子、小林武彦、内田博之、沖昌也「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」第27回 染色体ワークショップ(御殿場)2010年1月

○ 受賞

2010年度 日本遺伝学会奨励賞受賞

「ヘテロクロマチン領域境界のエピジェネティックな調節機構の解析」

○ その他

1. 2013年6月にシンガポールで開催される「Single cell Genomics& Transcriptomics」国際会議で招待講演予定
2. 2013年11月に中国で開催される「Gene Convention: Single Cell genomics」国際会議で招待講演予定
3. 2013年9月に JST の支援を頂き福井で「Message from yeast to Epigenetics～Yeast clarifies the frontiers of life science～」というタイトルで国際会議を開催予定

研究報告書

「ヘテロクロマチン確立メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 加藤 太陽

1. 研究のねらい

細胞のエピジェネティック制御機構を理解するためには、遺伝子の活性化だけでなく不活性化メカニズムの理解も欠かせない。なかでも、特定遺伝子座を転写活性化要因から隔離するエピジェネティック・サイレンシングの理解は非常に重要である。真核細胞におけるエピジェネティック・サイレンシングは、分裂酵母のヘテロクロマチンをモデルとして詳細に解析されてきた。ヘテロクロマチンとは、高度に凝集し、転写活性が積極的に抑えられた、サイレントな高次クロマチン構造である。ゲノム上のヘテロクロマチン領域に位置するヒストン H3 は、その N 末端の Lys-9 がメチル化修飾(K9me)を受け、その修飾を認識する HP1 タンパク質の局在をもたらす。HP1 は、転写不活性化に関わるヒストン脱アセチル化酵素などの足場となることで、その領域のサイレントな性質決定に寄与する。これまでヘテロクロマチンの構築システムに関して得られた知見は主にエピジェネティックな「維持」に関するものであり、ヘテロクロマチンを新規に「確立」するメカニズムについては未だ不明確な点が多かった。申請者は本研究において、分裂酵母のヘテロクロマチンをモデルとしてエピジェネティック・サイレンシングの「確立段階」の本質的理解を目指した。

本研究では、分裂酵母のヘテロクロマチン領域をモデル遺伝子座として、ヘテロクロマチン構築に異常を示す新規変異の順遺伝学的スクリーニングからヘテロクロマチン確立メカニズムの解明を目指した。ヘテロクロマチンを特徴づける K9me 修飾を担う酵素は、ヒトにおいては Suv39h と呼ばれるヒストンメチルトランスフェラーゼであるが、その分裂酵母ホモログは Clr4 である。よって、Clr4 の条件的失活と再活性化によってヘテロクロマチンの確立をモニタリングできれば、確立に関わる因子の同定が可能であり、それらの因子の機能解析によってヘテロクロマチンの確立メカニズムを解明できると考えた。しかしながら、Clr4 の温度感受性変異を利用したヘテロクロマチン確立モニタリング系は、様々な条件検討の結果、当初計画した順遺伝学的スクリーニングには不向きであることが判明した。そのため、本研究では類似したスクリーニングで代用した。ある因子がヘテロクロマチンの確立に関与するならば、その変異によって一端ヘテロクロマチンの性質が失われると再確立ができないはずである。この観点から、徐々にサイレンシングが失われ、ふたたび不活性化状態を再構築できない変異のスクリーニングを行い、同定した因子の解析を行った。

2. 研究成果

本研究での成果については、2報の論文が投稿中であり、現時点で公表できない。未発表のためタンパク質因子の名前を伏せて記載する。

(1) 概要



すべての真核生物はヒストンを介した遺伝子制御を行う。ヒストン(特に H3 と H4)はヌクレオソームの構成要素として特定の遺伝子座に長期的に局在し、その翻訳後修飾が当該遺伝子座にシスに作用して固有の性質を付与する。タンパク質をコードする遺伝子の転写を担う RNA ポリメラーゼ II(Pol II)は、ヒストンを利用した長期的なクロマチン記憶を保つために、固有の翻訳後修飾を受けたヒストン H3 と H4 の散逸を伴わずに転写を行わなければならない。しかしながら、その仕組みに貢献する因子は不明であった。今回、この仕組みに関わる因子として X を同定し、X が働かなければすべての転写領域のヒストン修飾が失われることを示す結果を得た。また、別のタンパク質複合体のサブユニットである2つの因子を同定して解析した。現在、これらの結果について論文にまとめ投稿中である。

3. 今後の展開

順遺伝学的な手法と高速シーケンシング技術の相性が非常によい、ということが本研究を通して明らかになった。順遺伝学的手法は、興味ある生理機能が失われることを指標として、その生理機能に重要な役割を果たす因子の同定を目指す。しかも、無作為にゲノムに変異を導入するために予備知識のバイアスがかからず、新規の重要因子の同定に優れる。しかしながらこの手法には重要な欠点があり、変異は見つかったとしても遺伝子の同定が困難であるケースがこれまでに多々あった。高速シーケンシング技術は、全ゲノムを対象としてリファレンスゲノム(野生型ゲノム)との違いを一塩基レベルで明らかにすることができるので、順遺伝学的手法がもつ欠点を補うことができる。特に、今回モデル生物として採用した分裂酵母は、ゲノムサイズが小さいだけでなく一倍体であるために変異同定が容易であった。本研究では、246 bp という比較的長い領域の欠失が表現型につながる特殊な事例でも、それを同定することができた。今後は益々、種々の重要経路の解明に順遺伝学的な手法を適用することが再評価され、そこには本研究で得たノウハウが反映されると期待される。

本研究では、クロマチン免疫沈降産物の高速シーケンシング後の解析を行うソフトウェア環境の開発も行った。遺伝学的な背景の異なるサンプル間での正規化と、アノテーション情報を加味した解析ができる。このソフトウェア環境はクロマチンに関係する様々な因子の分布解析に利用可能であり、今後のエピジェネティクス研究に貢献できると思われる。

未発表のため詳細を公開できないが、転写領域におけるヒストン修飾の保護に関わる因子を見いだしたことは非常に重要である。この因子はあらゆる真核生物に保存されており、分裂酵母で確認した機能の重要性を考えると、真核生物のエピジェネティック制御の根幹に関わる因子であると言ってよい。今後は、この因子を中心に、転写領域におけるヒストン修飾の保護についての詳細な解析を継続すべきである。

4. 自己評価

本研究は、真核生物のエピジェネティック制御を理解するため、遺伝子の発現が強く抑制されたクロマチンであるヘテロクロマチンの確立の仕組みを分子レベルで理解することを目標とした。当初計画したスクリーニング手法は、モニタリング系は作動したが、想定した通りに生物が振る舞わず、順遺伝学で遺伝子を同定するにはノイズが高過ぎた。具体的には、Clr4 の温

度感受性変異では一過的にヘテロクロマチンが緩む頻度が高くなっているためにサイレンシングの脱抑制を指標とする一次スクリーニングの偽陽性の出現率が高まり、元々のヘテロクロマチンの再構築効率の低さの故に確立異常の検出に時間を要し、しかも戻し交配後に低頻度で出現する二倍体細胞が、あたかも期待した表現型をもつ変異株のように振る舞った。このような諸悪条件を回避するために別のスクリーニング系を考案したことが、新規因子の同定につながった。同定した新規因子は、それまでヘテロクロマチンへの関与が知られていなかったものばかりであったため、十分に独自のスクリーニングを遂行できたと考えている。

転写領域においてヒストンの流失を防ぐことで、その遺伝子座のヒストン修飾を正常に保つ因子(未発表なので因子 X とする)が同定できたことは、非常に有益であった。この因子 X は、一義的にはヘテロクロマチンの Maintenance に関与すると言えるだろう。しかしながら、この役割が損なわれるならば Spreading も困難であり、Nucleation の成功頻度も低下すると考えられる。その意味では、転写によるヒストン交換を如何に抑えるか、ということが確立に至るまでの重要なステップのひとつであると考えられる。また、この因子 X の働きはヘテロクロマチンに限定したものではなく、ゲノムの全領域の転写される場所のヒストン修飾保護に関わるものなので、やはりエピジェネティクスを理解する上で大変重要な因子 X の役割を見いだしたと考えている。

5. 研究総括の見解

分裂酵母のヘテロクロマチン領域をモデル遺伝子座として、ヘテロクロマチン構築に異常を示す変異のスクリーニングからヘテロクロマチン確立機構の解明をめざしている。この仕組みに関わる因子として新規 X を同定し、X が働かなければすべての転写領域のヒストン修飾が失われることを示す結果を得た。X 因子はヘテロクロマチン形成時にポリメラーゼ II と共に働く因子として同定され、ヒストンのエピジェネティックマークの入ったヌクレオソームを保つ働きがあることを示した。この X 因子をコードしている遺伝子の変異により、ヘテロクロマチン内の転写領域でのヒストン H3 の減少が観察され、ヘテロクロマチンの確立に必須であることが分かった。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Okazaki K, Nakayama N, Nariai Y, Kato H, Nakayama K, Miyazaki K, Maruyama R, Kosugi S, Urano T, Sakashita G., Nuclear localization signal in a cancer-related transcriptional regulator protein NAC1. *Carcinogenesis* 2012, Oct; 33(10): 1854-62.
2. 加藤太陽、浦野：緑色蛍光タンパク質を用いた細胞内タンパク質のダイナミクス解析：島根医学 2010 年 vol.:30 89-97 頁

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:分裂酵母のヘテロクロマチン制御を理解するための順遺伝学的挑戦:高次クロマチン研究会、福井、2010年8月
2. Naomi Nakayama, Gyosuke Sakashita, Hiroaki Kato, Kentaro Nakayama and Takeshi Urano:第69回日本癌学会学術総会2010年
3. 浦野健、中山真美、加藤太陽、成相裕子、岡崎宏亮、坂下暁介:第9回核ダイナミクス研究会2010年
4. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:転写と共役したヘテロクロマチン構築:高次クロマチン研究会、蒲郡、2011年8月
5. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:分裂酵母における転写と共役したヘテロクロマチン構築機構:日本遺伝学会・第83回大会、京都、2011年9月
6. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:転写装置とエピゲノムの恒常性について:高次クロマチン研究会、神戸、2012年8月

研究報告書

「細胞老化のエピジェネティクスとその破綻による発癌機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 金田 篤志

1. 研究のねらい

発癌にはエピジェネティックな異常が深く関与することが知られている。これまで申請者は、エピジェネティック異常の1つである IGF2 遺伝子インプリンティング消失(Loss of imprinting, LOI)の関与についてマウスモデルを用いて研究を行った。Igf2 の LOI が腸管に起きると、腸管前駆細胞がより未分化な状態となり、腸管腫瘍発症リスクを上昇させることを同定した。LOI(+)細胞は IGF2 刺激に対し鋭敏な状態となっており、IGF2 シグナルを受容体阻害剤投与により遮断すると、Igf2 LOI(+)マウス特異的に細胞増殖関連遺伝子の発現が減少し腸管腫瘍リスクが低下するがわかった。エピジェネティック異常が発癌リスクなど発癌に原因として関わり、特異的な治療標的とすることが可能であることを示唆している。つまり癌はエピゲノム異常特性によって異なる治療が可能であり、癌症例をエピゲノム異常特性によって分類する必要性を考えた。

まずは大腸癌について、代表的エピジェネティック異常である DNA メチル化異常に関して、MeDIP-chip 法を用いて DNA 異常メチル化部位をゲノム網羅的に同定した。その結果大腸癌新規のメチル化マーカー数十個を樹立し、大腸癌症例におけるそれらマーカーのメチル化を定量的に解析した。すると、大腸癌症例は3つのエピジェノタイプに分類され、各メチル化エピジェノタイプは癌遺伝子変異と強く相関するデータを得た。これらのエピジェノタイプはどのように成立し、何故癌遺伝子変異と相関するのか。癌遺伝子活性化はそもそも早期細胞老化を誘導することが知られるが、その際にエピゲノム変化を誘導した結果がこれらのエピジェノタイプなのか。細胞老化とは並行して DNA メチル化異常が起きて、細胞老化に重要な因子が DNA メチル化異常のため破綻し細胞老化できずに癌化しているのか。これらを解明する目的に、癌遺伝子変異による早期細胞老化において網羅的エピゲノム解析・発現解析を行い重要な因子を同定すること、その破綻による大腸癌発生機構を解明すること、大腸癌を含めて癌のエピジェノタイプの原因を解明することをねらいとした今研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

大腸癌症例の DNA メチル化を網羅的解析し、階層的クラスタリングを用いて3つのエピジェノタイプに分類した。高メチル化群は癌遺伝子 BRAF 変異と、中メチル化群は癌遺伝子 KRAS 変異と、それぞれ強く相関し、発癌機構が全く異なる3群の大腸癌の存在が示唆された(論文1)。これら相関の原因はわかっていないが、i)癌遺伝子変異が特定のエピジェノタイプを誘導する、ii)エピジェネティクス異常の蓄積が遺伝子変異を誘導する、iii)癌遺伝子変異とエピジェネティクス異常はそれぞれ独立事象であるが重なることで癌化している、などの可能性を考えた(総説1)。

大腸前癌病変の解析の結果、エピジェノタイプの形成と癌遺伝子変異との相関は腺腫の段階ですでに完成していた。癌遺伝子変異による限局的増殖にとどまっている異常陰窩と、そこにメチル化異常が加わり腫瘍性増殖を呈した腺腫・癌、という構図が考えられた(論文5)。

そこで癌遺伝子が活性化した際に起きる早期細胞老化において、誘導されるエピゲノム変化、早期細胞老化における重要な因子を探索した。MeDIP-seq 解析の結果、Ras 活性化で DNA メチル化変化が誘導されることはなかった。一方ヒストン修飾は、活性化マーク H3K4me3、不活化マーク H3K27me3 を含めてダイナミックに変化した。発現との統合解析の結果、Bmp2-Smad1 シグナルを活性化する分泌蛋白 Bmp2 の発現上昇、阻害する因子である Smad6, Noggin の発現低下が重要であることが示唆され、Bmp2-Smad1 シグナルを活性化することが Ras 誘導性細胞老化に必須であることが示された。シグナル下流標的因子探索の結果、ネガティブフィードバックを形成していた Smad6 を含め、細胞老化の誘導に対して負の調節因子は動的エピゲノム変化により不活化し、正に調節する下流標的因子を選択的に持続的に活性化していることが示唆された(論文3)。これら細胞老化に重要な因子が、DNA メチル化異常により破綻することが大腸発癌に重要であると考えた。

胃癌を同様に DNA メチル化網羅的解析し階層的クラスタリングすると、胃癌は我々が以前同定していた低メチル化群と高メチル化群だけでなく、もう1つ超高メチル化群が存在することがわかり、EB ウィルス感染が超高メチル化を誘導する原因であることを証明した(論文4)。

(2) 詳細

(1) 研究テーマ「エピゲノム変化とそれに制御されるシグナルネットワークの解明」

マウス胎児線維芽細胞(MEF)にレトロウィルスをを用いて活性化癌遺伝子を導入し早期細胞老化を誘導した。エピゲノム変化を MeDIP-seq 法・ChIP-seq 法により、発現変化を発現アレイを用いて系統的に解析した。

DNA メチル化は Ras 変異で誘導されることはなかった。少なくとも MEF を用いた系では、癌遺伝子 Ras の変異により DNA メチル化異常が誘導されることも否定された。

一方ヒストン修飾は、活性化マーク H3K4me3、不活化マーク H3K27me3 を含めてダイナミックに変化した。発現との統合解析を行うと、H3K27me3 マークが消失し H3K4me3 マークが上昇する遺伝子は優位に発現上昇し、最も発現上昇する遺伝子群に分泌蛋白 Bmp2 が含まれていた。逆に、H3K27me3 マークを新たに獲得し H3K4me3 マークが消失する遺伝子は有意に発現低下し、最も発現低下した遺伝子 Smad6 や、Nog など Bmp2-Smad1 シグナルを阻害する因子が含まれていた(図1)。Bmp2 のノックダウン、Smad6, Nog の発現誘導により細胞老化の回避を認め、Bmp2-Smad1

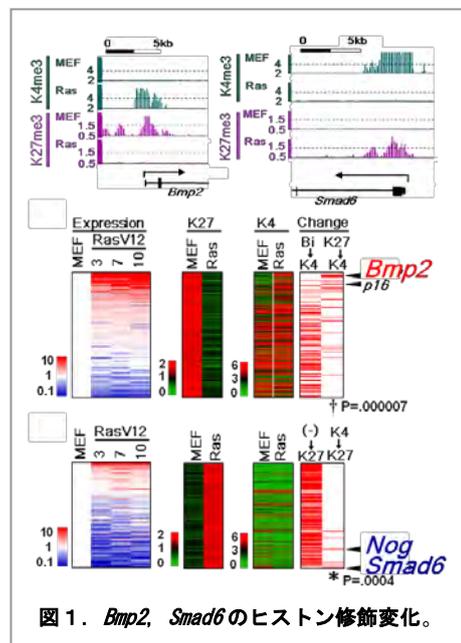


図1. Bmp2, Smad6のヒストン修飾変化。

シグナルの活性化が Ras 誘導性細胞老化に必須であることを示した。

(2) 研究テーマB「活性化されたシグナルの標的遺伝子の解明」

Bmp2-Smad1 シグナルの下流標的遺伝子を探るため、抗 Smad1 抗体を用いた ChIP-seq 法により Smad1 結合部位をゲノムワイドに同定した。Smad1 結合部位は転写開始点近傍に濃縮し、Smad1 標的遺伝子は発現上昇と有意に相関した。Smad6 は Smad1 標的遺伝子の1つであり、すなわちネガティブフィードバックを形成する。Smad6 を含め、Bmp2-Smad1 の下流遺伝子の一部を H3K4me3 消失や H3K27me3 獲得など動的・緻密なエピゲノム制御により発現抑制し、残る標的遺伝子を選択的に発現上昇させていることを明らかにした(図2) [Kaneda et al, *PLoS Genet* 2011]。

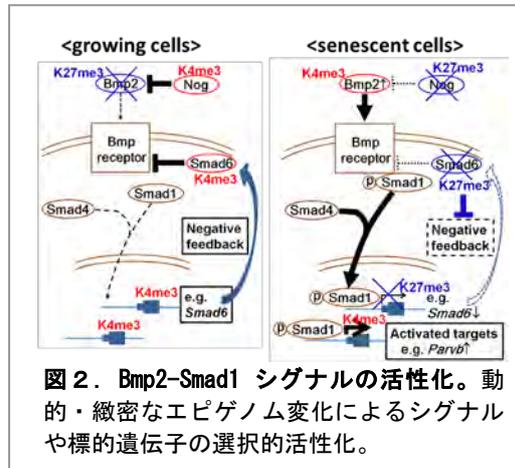


図2. Bmp2-Smad1 シグナルの活性化。動的・緻密なエピゲノム変化によるシグナルや標的遺伝子の選択的活性化。

(3) 研究テーマC「癌におけるエピジェノタイプの解明」

(3)-1 大腸癌エピジェノタイプ

大腸癌 149 症例における DNA メチル化を網羅的・定量的に解析し、階層的クラスタリングを用いて大腸癌を3つのエピジェノタイプに分類した。高メチル化群は癌遺伝子 BRAF 変異と、中メチル化群は癌遺伝子 KRAS 変異と、それぞれ強く相関し、大腸癌発生機序が全く異なる3グループの存在が示唆された(図3) [Yagi et al, *Clin Cancer Res* 2010]。これら相関の原因はわかっていないが、i)癌遺伝子変異が特定のエピジェノタイプを誘導する、ii)エピジェネティクス異常の蓄積が遺伝子変異を誘導する、iii)癌遺伝子変異とエピジェネティクス異常はそれぞれ独立事象であるが重なることで癌化している、などの可能性を提唱した [Kaneda & Yagi, *Cancer Sci* 2011]。

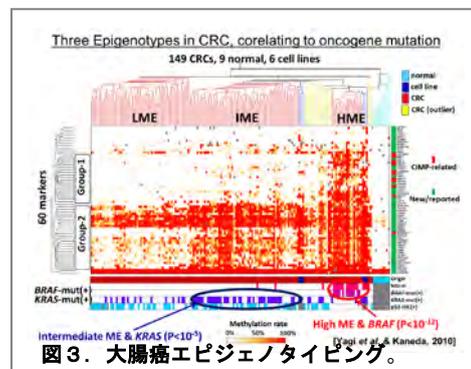


図3. 大腸癌エピジェノタイプ化。

大腸前癌病変の解析の結果、定量的なメチル化量は腺腫と癌では全く差がなく、エピジェノタイプの形成は腺腫の段階で完成しており、3つのエピジェノタイプおよび癌遺伝子変異との相関も癌と同様に認められた。癌遺伝子変異による限局的増殖にとどまっている異常陰窩と、そこにメチル化異常が加わり腫瘍性増殖を呈した腺腫・癌、という構図が考えられた[Yagi et al, *Am J Pathol* 2012]。

(3)-2 胃癌エピジェノタイプ

胃癌は、以前のメチル化網羅的解析で新規メチル化標的遺伝子の同定や高メチル化症例群と低メチル化症例群の存在を報告している[Kaneda et al. *Cancer Res* 2002]。今回、Infinium ビーズアレイを用いて 51 症例の胃癌の DNA メチル化を網羅的に解析した。階層的クラスタリ

ングを行うと、高メチル化群と低メチル化群に加えて、超高メチル化群ともよぶべき第3番目のエピジェノタイプの存在がわかった(図4)[Matsusaka et al. *Cancer Res* 2011]。エピジェノタイプと多因子との相関を解析すると、超高メチル化群の胃癌症例は全てEB ウィルス陽性胃癌であり、逆にEB ウィルス陽性胃癌は1例の例外もなく超高メチル化を呈した。低メチル化群の胃癌細胞株にEB ウィルスを感染させると、18週以内に超高メチル化が誘導され、新規メチル化標的遺伝子は発現抑制された。胃癌の二大病因としてピロリ菌とEB ウィルスが知られるが、その病因の1つが胃癌エピジェノタイプの成立に原因として深く関わっていることが証明された。

EB ウィルス感染がDNA 異常メチル化を誘導する分子機構を解明する目的にEB ウィルスが胃癌細胞に潜伏感染した際に発現している潜伏遺伝子を1つ1つ胃癌細胞で強制発現しても異常メチル化は誘導されなかった。各ウィルス遺伝子よりむしろ、ウィルス感染そのもの、ウィルス感染に対する宿主細胞の防御機構が重要と考えられた。胃癌だけでなく他のEB ウィルス感染細胞を解析しても、ウィルスゲノムのメチル化状態と宿主ゲノムのメチル化状態はよく相関していた。ウィルス感染に対し、ウィルスゲノムをメチル化する宿主細胞の防御機構が過って宿主ゲノムにまで及ぶことが、新規メチル化に関与している可能性を考えた[Kaneda, et al. *Cancer Res* 2012]。

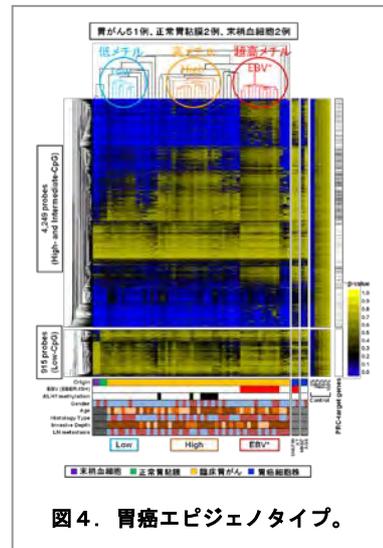


図4. 胃癌エピジェノタイプ。

3. 今後の展開

正常細胞で癌遺伝子変異が起きると、細胞は発癌を回避するために早期細胞老化する。このとき細胞は、ダイナミックなヒストン修飾変化を生理的に行い細胞老化に重要なシグナルを緻密に制御していた。このように細胞は、発癌ストレスに対し発癌しないよう生理的にエピゲノム変化させることを明らかにしたが、そのために必要な因子や機構は何であろうか。その因子が破綻すると発癌するのか、因子の破綻は大腸癌のエピジェノタイプと関連があるのか。これらの解明が、大腸癌の高リスク因子や癌細胞を細胞老化させる手法の確立につながるだろう。

EB ウィルスは成人のほとんどが潜伏感染で保持しているウィルスである。ここで疑問なのは、EB ウィルスが高い再現性で複数の癌抑制遺伝子を含む遺伝子群をメチル化するならば、なぜ一部の人しかEB ウィルス陽性胃癌を発症しないのだろうか。胃上皮細胞への感染が稀にしか成立しないのか。それとも感染そのものは稀ではなく、通常の正常細胞は感染したとしても異常メチル化しないような機構を持っていて、その機構が破綻しているときのみ異常メチル化が誘導されるのか。これらの解明は、ピロリ菌除菌という胃癌予防策が普及している現在、胃癌を完全に予防するための重要な知見となるだろう。

4. 自己評価

正常細胞で癌遺伝子変異が起きると、細胞は発癌を回避するために早期細胞老化する。このとき細胞は、ダイナミックなヒストン修飾変化を生理的に行い細胞老化に重要なシグナルを

緻密に制御していた。テーマ A「エピゲノム変化とそれに制御されるシグナルネットワークの解明」、テーマ B「活性化されたシグナルの標的遺伝子の解明」により、早期細胞老化における重要因子を解明するねらいは果たされた。

もう一つのねらい、研究テーマC「癌におけるエピジェノタイプの解明」については、大腸癌エピジェノタイプは腺腫の段階ですでに成立しており、癌遺伝子変異がDNAメチル化を誘導するのではなく、詳細な原因は不明だがおそらく癌遺伝子変異と並行して蓄積していて、癌遺伝子変異による細胞老化を回避させて癌化するのに必要な形質だと考えられた。Raf/Ras 変異が多いことで知られる甲状腺癌など他の癌種でもエピジェノタイプについて検討を加えたところ、同じ消化管腫瘍である胃癌において、3つの明瞭に異なるエピジェノタイプを同定した。胃癌においては、超高メチル化群と相関する EB ウィルス感染そのものが、超高メチル化を誘導する原因であることを証明できた。

総じて今研究課題のねらいはほぼ目標通りに達成したと思われる。また今後の展望に上述したように新たな発展的課題を2つ得、それぞれの実験モデルも構築できたことは、持続的に科学技術イノベーションを創出していく上での源泉を創出する「さきがけ」の目的と照らし合わせても、目標を達成できたのではないかと思われる。

5. 研究総括の見解

元来大腸がん、胃がん症例の解析を行うことでエピジェノタイプを明らかにし、その解析結果を元にごん化の仮説を立て、老化のメカニズム、細胞のがん化、特にエピゲノム変化と遺伝的変化、シグナル経路との関係などについて研究を進めた。細胞老化に関しては、そのシグナルネットワークを解明し、Bmp2-Smad1 系の活性化が Ras 誘導性細胞老化に必須であることを示した。次いで活性化されたシグナルの標的遺伝子も明らかにした。がん化に関しては、老化の破綻によるがん化という仮説を支持する結果を得た。また、胃がん発症における EB ウィルス感染とDNAメチル化のかかわりを示すデータも得た。このように研究課題のねらいは、積極的な研究の展開のもと目標通りに十分達成されており、高く評価する。

これら課題を達成する中で次ぎにめざす課題も見えてきた。細胞老化におけるエピゲノム変化を制御している因子や機構の存在である。仮説に関わる因子の同定とその機能解析に進んで欲しい。また、EB ウィルスについても一部のヒトしか発症しないメカニズムを明らかにして欲しい。

一山超えたら、また次の山が見えてきた。理想的な研究の展開である。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yagi K, Akagi K, Hayashi H, Nagae G, Tsuji S, Isagawa T, Midorikawa Y, Nishimura Y, Sakamoto H, Seto Y, Aburatani H, Kaneda A†. Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. Clin Cancer Res, 16:21-33, 2010.
2. Deng YB, Nagae G, Midorikawa Y, Yagi K, Tsutsumi S, Yamamoto S, Hasegawa K, Kokudo N, Aburatani H, Kaneda A†. Identification of genes preferentially methylated in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Cancer Sci, 101:1501-10, 2010.

3. Kaneda A†, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, Aburatani H. Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. *PLoS Genet*, 7:e1002359, 2011.
4. Matsusaka K, Kaneda A†, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res*, 71:7187-97, 2011.
5. Yagi K, Takahashi H, Akagi K, Matsusaka K, Seto Y, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A†. Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am J Pathol*, 180:616-25, 2012.

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

1. Kaneda A., et al. “Cancer Epigenotyping.”第68回日本癌学会学術総会シンポジウム「From cancer genomics to cancer pathway analysis」, 2009.
2. Kaneda A. “Epigenotypes in gastrointestinal cancer and their causes/roles in carcinogenesis.” 13th Japanese-German Cancer Workshop, 2011.
3. Kaneda A., et al. “Harmonized epigenomic regulation of secreted protein signal in Ras-induced senescence and its disruption in cancer.” 第70回日本癌学会総会シンポジウム「Cancer microenvironment: Biology and its application」, 2011.
4. Kaneda A. “Cancer epigenotypes and tumor development mechanisms.” 第71回日本癌学会学術総会シンポジウム「Recent progress of epigenetics and cancer biology」, 2012.
5. Kaneda A. “Infection of Epstein-Barr virus is epigenetic driver of tumorigenesis.” 2nd Japanese-French Cancer Workshop, 2012.

総説論文

1. Kaneda A†, Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci*, 102: 18-24, 2011.
2. Kaneda A†, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res*, 72:3445-50, 2012.

英文著書

1. Kaneda A. Cancer classification by genome-wide and quantitative DNA methylation analyses. In “Epigenomics From Chromatin Biology to Therapeutics”, Krishnarao Appasani Ed. Pp. 293-305, 2012.

和文著書

1. 金田篤志:「DNA メチローム会式技術の発展と最新ストラテジー」, 実験医学, 28:1765-73, 2010.
2. 金田篤志:「がん診断とエピゲノム」, 医学のあゆみ, 235: 1038-44, 2010.
3. 金田篤志:「HCC とエピゲノム」, 肝胆膵, 62: 933-43, 2011.
4. 金田篤志、油谷浩幸:「がんのエピゲノム異常」, 細胞, 43: 504-7, 2011.
5. 金田篤志:「がんエピゲノムマーカー」. 日本臨床. 70:749-53,2012.

研究報告書

「ヘテロクロマチン修飾除去メカニズムの解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 9 月～平成 25 年 3 月

研究者: 佐瀬 英俊

1. 研究のねらい

真核生物ゲノムではその大部分をトランスポゾンなどのリピート配列が占めているが、これらの配列はヘテロクロマチンと呼ばれる高度に凝集した構造をとって不活化されている。これまでの研究により、このヘテロクロマチン形成には DNA シトシン塩基のメチル化やヒストン H3Lys9 メチル化(H3K9me)そして低分子 RNA の生成などの抑制的なエピジェネティック修飾がその制御に関与していることが明らかになっている。一方、これら抑制的なエピジェネティック修飾は一般的に活発に転写される遺伝子領域からは排除されている。しかしながら、細胞がどのような機構によってリピート配列と遺伝子配列を識別し領域特異的なエピジェネティック修飾を導入しているのかについてはいまだ不明な点が多い。

我々は遺伝子発現に対して抑制的に働く DNA メチル化やヒストン H3K9 メチル化を遺伝子領域から積極的に排除するメカニズムに注目して研究を行っている。我々はこれまでにモデル植物シロイヌナズナを用いて遺伝子領域に異所的に DNA メチル化と H3K9 メチル化の蓄積を引き起こす変異体を単離し、その原因遺伝子の1つとして H3K9 脱メチル化酵素遺伝子 Increase in BONSAI Methylation 1 (IBM1)を同定している。IBM1 は jmjC ドメインを持つタンパク質であり、哺乳類の KDM3/JHDM2 クラスの H3K9 脱メチル化酵素と高い相同性を持つ。ibm1 変異体では BONSAI と呼ばれる遺伝子領域に H3K9me とそれに依存した DNA メチル化が蓄積するのに加えて、DNA 脱メチル化酵素の変異体などよりむしろ多面的で重篤な発生異常の表現型を示すことが明らかになった。

本研究課題では上述のように異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体群の Forward genetics による単離とその詳細な解析を通し、このヘテロクロマチン修飾除去機構の実態を明らかにすることを目的としている。これら変異体の解析結果は動植物に共通のヘテロクロマチン修飾除去メカニズムを理解する上で基盤となる知見を与えるものと考え。異所的なヘテロクロマチン修飾は動植物においてエピジェネティック疾患や発生異常の要因となるが、本研究の成果はこれらエピジェネティック修飾異常の形成プロセスやその制御についても重要な示唆を与えるものであると考える。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題ではモデル植物シロイヌナズナにおいて異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体群の Forward genetics による単離とその詳細な解析を通し、このヘテロクロマチン修飾除去機構の実態を明らかにすることを目的としている。さきがけ研究期間、具体的には以下に挙げた3つのテーマに取り組んだ。

1) Forward Genetics により単離されてきた新規高 DNA メチル化変異体群の原因遺伝子の同定と解析

2) 1)から単離されてきた新規因子 IBM2 の詳細な解析

3) jmjC ドメインタンパク質 IBM1 と相互作用する因子の生化学的・遺伝学的な手法による同定と解析

結果の詳細は以下の通りである。

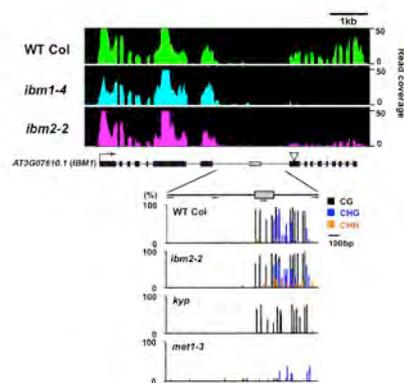
(2) 詳細

1) 新規高 DNA メチル化変異体の選抜と原因遺伝子の同定

シロイヌナズナゲノム中に異所的に DNA の高メチル化を引き起こす変異体のスクリーニング系から複数の高 DNA メチル化変異体を得られ、ibm1 に加えて ibm2, ibm3, ibm4 と名付けて解析を行った。これら変異体を順次遺伝的背景の異なる野生系統に掛け合わせ、F2 集団において SNP 多型を用いて連鎖解析を行い、ibm2, ibm3 について変異が起きている原因遺伝子座を同定した。ibm3 は既に報告がある既知の遺伝子であったが、これまで遺伝子のエピジェネティック制御への関与は示唆されていない。この IBM3 については後述する IBM2 と同じ経路で機能していることを示唆するデータが得られている。Ibm4 と呼ぶ変異体については、ibm2, ibm3 とは異なる経路で高メチル化を引き起こしているという結果を得ている。

2) 1)から単離されてきた新規因子 IBM2 の詳細な解析

IBM2 と呼ぶ因子について、次世代シーケンサーによる mRNA-seq 発現解析を行った。その結果、ibm1 と ibm2 における遺伝子発現変化には正の相関があることが明らかになった。また、ibm1 変異体と同様に ibm2 変異体でも non-CG メチル化の上昇が観察されたことから ibm2 が IBM1 と同一の経路で機能していることが示唆された。その後、ibm2 では IBM1 遺伝子の 3' 領域において発現が減少することを見だし(下図)、IBM2 が IBM1 遺伝子の発現をポジティブに制御している可能性が示唆された。IBM1 遺伝子内には高度に DNA メチル化を受けたオルガネラ由来の DNA 配列が挿入されており、この配列を削除した IBM1 トランスジーンで ibm2 の高メチル化表現型が相補されたことから、ibm2 変異体で見られた高メチル化表現型は IBM1 の発現阻害によるという事が明らかになった。また、IBM1 は H3K9 脱メチル化酵素であるため、IBM1 遺伝子内ヘテロクロマチンがゲノム中の DNA メチル化減少を感知して IBM1 の発現を減少させ、結果的にゲノムワイドに補償的なメチル化上昇が引き起こされる DNA メチル化のフィードバックループの存在が示唆された。



3) jmjC ドメインタンパク質 IBM1 と相互作用する因子の生化学的・遺伝学的な手法による同定と解析

FLAG-HA エピトープタグを融合した jmjC ドメインタンパク質 IBM1 の形質転換体を ibm1 変

異体に導入して変異を相補した形質転換体を作製し、IBM1 複合体の精製条件を検討した。しかしながら本研究期間では目的の IBM1 複合体を同定するには至らなかった。

3. 今後の展開

ヘテロクロマチン修飾が遺伝子内に存在する事で遺伝子の機能阻害を引き起こすことがこれまでの研究から知られている。今回の我々の研究結果から生物がヘテロクロマチン修飾を遺伝子領域から特異的に排除する経路を進化させてきた事が示唆された。また、今回我々が発見した IBM2 が関与する経路がヘテロクロマチンを内包する遺伝子の制御にどの程度貢献しているかを探るのが今後の課題である。

4. 自己評価

真核生物の多くは巨大なゲノムを持つが、そのほとんどが転移因子からなっており、複雑な構造ゆえにその解析と理解はいまだに困難をきわめている。本研究課題の中で我々の発見した機構は今後動植物のゲノム進化と動態を理解する上で重要な知見となったと考えている。異所的な DNA メチル化は動植物において疾患や発生異常の要因となるが、本研究の成果はこれらエピジェネティック修飾異常の形成プロセスやその制御についても重要な示唆を与えるものであると考える。

5. 研究総括の見解

動植物に共通のヘテロクロマチン修飾除去を理解することはエピジェネティクス研究の基盤として重要である。モデル植物シロイヌナズナを用いて異所的に DNA の高メチル化を引き起こす変異体を複数分離した。その中の ibm 1 は報告済みの H3K9 脱メチル化酵素遺伝子であるが、新たに ibm 2 および ibm3 の原因遺伝子を同定した。その結果 ibm 2 は ibm 1 を介して表現型をもたらすことから、ibm 1 の上位に位置し、遺伝子内のヘテロクロマチン領域をマスクする機能があることが分かった。ヘテロクロマチン修飾除去を理解する上で今までにないヘテロクロマチン領域の形成や消失のメカニズムの一端を明らかにした意義は大きい。

今回の成果は評価に値するが、ヘテロクロマチンがマスクされる分子機構を明らかにする課題が残されており、今後他の変異体の解析も含めてヘテロクロマチン修飾除去機構の実態に迫る研究を進めて欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. (Review) Saze, H. (2012). Transgenerational Inheritance of Induced Changes in the Epigenetic State of Chromatin in Plants. *Genes Genet Systems*, 87(3):145-52..
2. (Review) Saze, H., Tsugane K, Kanno T and Nishimura T. (2012). DNA Methylation in Plants: Relationship with Small RNAs and Histone Modifications, and Functions in Transposon Inactivation. *Plant Cell & Physiol.*, 53(5): 766-84.

- | |
|---|
| 3. Sasaki T, Kobayashi A, <u>Saze H</u> , Kakutani T. (2012) RNAi-independent de novo DNA methylation revealed in Arabidopsis mutants of a chromatin remodeling gene DDM1. <i>Plant J.</i> , 70(5): 750–758. |
| 4. (Review) <u>Saze, H</u> and Kakutani T. (2011) Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. <i>Curr Opin Plant Biol.</i> , 14(1):81–7. |
| 5. Inagaki S, Miura-Kamio A, Nakamura Y, Lu F, Cui X, Cao X, Kimura H, <u>Saze H</u> , Kakutani T. (2010). Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. <i>EMBO J.</i> , 29(20):3496–506. |

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<招待講演>

1. 佐瀬英俊 “植物における遺伝子発現のエピジェネティック制御”、日本食品科学工学会第59回大会シンポジウム、藤女子大学、札幌市、2012年8月30日。

2. Saze H. (MIPI seminar series) “Epigenetic control of genes and transposable elements in Arabidopsis thaliana”. Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colonge, Germany. June 27, 2012

3. (Symposium co-organizer/speaker) Tamada Y and Saze H. Symposium: Response to environmental/developmental signals and regulation of epigenetic state of chromatin. Regulation of Intragenic Heterochromatin in Arabidopsis thaliana. The 53rd Annual Meeting of 4. The Japanese Society of Plant Physiologists, Kyoto Sangyo University, Kyoto, Japan. March 16, 2012.

5. Saze H. Symposium: Plant Stress Research Symposium. Epigenetic regulation of Heterochromatin and Stress Response. Kurashiki-ai-theater, Okayama, Japan. March 8, 2012.

6. 佐瀬英俊. 「シロイヌナズナを用いた新たな DNA メチル化制御機構の研究」日本遺伝学会 第 83 回大会 日本遺伝学会奨励賞受賞講演、京都大学、2011 年 9 月 21 日。

<受賞>

平成24年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

平成23年度 日本遺伝学会奨励賞



研究報告書

「エピジェネティクス制御化合物の創製と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 鈴木 孝禎

1. 研究のねらい

本研究では、エピジェネティクス制御化合物を創製し、その化合物を生物学研究のツールとして用いることで、生命機能、特に疾患に関与するエピジェネティクス機構を明らかにするとともに、それらの疾患の治療指針を提示することを目的とする。

本研究で行うような、低分子化合物を用いて標的タンパク質の機能を解明する手法は、「ケミカルジェネティクス」と呼ばれている。従来の遺伝学では、目的の遺伝子の機能を調べるのに遺伝子に変異を与える「ノックアウト」法が用いられてきた。最近では、RNA干渉の技術を用いた「ノックダウン」法も用いられている。これらの手法に対し、ケミカルジェネティクスは、標的タンパク質の特異的阻害剤を用いることにより、そのタンパク質の機能を理解しようとする新たな研究手法である。ノックアウト法やノックダウン法とは異なり、ケミカルジェネティクスでは、同じ機能の遺伝子が複数存在しても容易に表現型が観察できる、変異体が生存するために起こる代償(compensation)作用がない、タンパク質の中の特定のドメインの機能だけを標的にできる、操作が簡便である、などの利点がある。また、得られた化合物が直接創薬につながる可能性があるということが、ケミカルジェネティクスの最大の利点である。

本研究では、エピジェネティクス制御化合物を創製し、その化合物を生物学研究のツールとして用いることで、生命機能、特に疾患に関与するエピジェネティクス機構を明らかにするとともに、それらの疾患の治療指針を提示することを目的とする。具体的には、エピジェネティクス機構において重要な役割を担うヒストンリシン残基のアセチル化あるいはメチル化に関与する酵素を標的とし、それらの酵素の特異的阻害剤を創製する。つぎに、得られた低分子阻害剤を疾患の関与する細胞に投与し表現系を観察することで、エピジェネティクスと疾患の関係を調べる。さらに、それら低分子阻害剤の作用機構を解析することで、より詳細な疾患のメカニズムを理解し、エピジェネティクスが関与する疾患の治療指針を導き出す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、生物学を化学の切り口からアプローチする「ケミカルジェネティクス」によりエピジェネティクスの関与する疾患のメカニズムを解明すること、それらの疾患の治療指針を導き出すことを目的とした。ケミカルジェネティクスとは、古典遺伝学における変異の代わりに標的タンパク質の特異的阻害剤を用いることにより、そのタンパク質の機能を理解しようとする研究手法である。具体的には、エピジェネティクス制御化合物として、ヒストンのアセチル化修飾に関与するアイソザイム特異的なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC3 選択的阻害剤、HDAC8 選択的阻害剤)、ヒストンのメチル化修飾に関与するヒストン脱メチル化酵素阻害剤(JMJD2 選択的阻害剤、PHF8 阻害剤、LSD1 阻害剤)を化合物ライブラリーからの探索、合理

的な分子設計などにより創製した。そして、得られた低分子化合物を疾患の関与する細胞あるいは動物モデルに投与し、表現系を観察することで、エピジェネティクスとがんや HIV 感染などの疾患との関係を明らかにした。本研究により、新たな疾患の治療法を提示することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「アイソザイム選択的ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の創製と応用」

HDAC は、ヒストンのアセチル化されたリシン残基を脱アセチル化する反応を触媒し、エピジェネティックに多くの遺伝子発現を制御している。HDAC には 18 種類のアイソザイムが知られているが、それぞれの詳細な機能は明らかになっていない部分が多い。本研究では、有用な阻害剤が報告されていない HDAC3 と HDAC8 にターゲットを絞り、その選択的阻害薬の探索および応用研究を行った。

一般に HDAC 阻害薬は、酵素活性中心の亜鉛イオンに配位する Zinc-Binding Group (ZBG) と HDAC の酵素表面のアミノ酸残基と相互作用する Cap 部位、ZBG と Cap 部位をつなぐ Linker 部位から構成される。本研究では、Cap 部位と ZBG をクリックケミストリーと呼ばれる手法により連結するために、トリアゾール Linker を有する HDAC 阻害薬を設計した。ZBG を有するアルキン体 9 個と Cap 部位をもつアジド体 56 個をクックケミストリーにより連結させる事で、短時間に 504 個の HDAC 阻害薬用ライブラリーを構築した。HDAC 蛍光アッセイを用いて、そのライブラリーのスクリーニングを行った結果、それぞれ HDAC3、HDAC8 を選択的に阻害する化合物 T247、C149 を見出した(図 1)(論文 1, 5、特許 2, 5)。

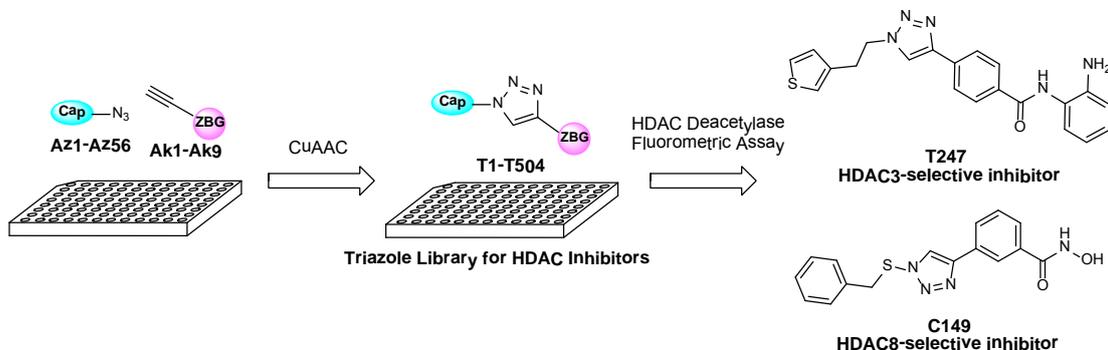


図 1. HDAC 阻害薬用ライブラリーの構築と HDAC3 選択的阻害薬 T247、HDAC8 選択的阻害薬 C149 の同定

さらに、これらのアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬を用いたケミカルジェネティクス研究により、HDAC3 が大腸がん細胞、前立腺がん細胞の増殖に関与すること、HDAC3 が HIV-1 の転写活性化に関与すること、HDAC8 が T 細胞性リンパ腫の増殖に関与することを示すとともに、それらアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬の治療薬としての可能性を示した。

研究テーマ B「Jumonji C-domain を含むヒストン脱メチル化酵素(JHDM)阻害剤の創製と応用」

JHDM は、メチル化されたヒストンリシン残基の脱メチル化反応を触媒することにより、

エピジェネティックな遺伝子発現を制御する酵素である JHDM の一種である KDM4 (JMJD2) や KDM7B (PHF8) の発現は、がん細胞の増殖に關与する可能性も示唆されている。従って、JHDM 阻害薬は、その酵素の働きを調べるためのバイオプローブとしてだけでなく、新たな作用機序の抗がん剤としても期待できる。しかしこれまでに、高活性かつ高選択的な JHDM 阻害薬は報告されていない。そこで、KDM4 (JMJD2) および KDM7B (PHF8) 選択的阻害薬の創製研究を行うこととした。

JMJD2A および PHF8 の X 線結晶構造を基に、活性中心に存在する鉄イオン、アミノ酸残基との相互作用を考慮し、JMJD2 および PHF8 選択的阻害薬の設計、合成、活性評価を行った。その結果、高活性、高選択的な JMJD2 選択的阻害薬 **NCDM-32** および PHF8 選択的阻害薬 **NCDM-64** を見出した (図 2) (論文 4、特許 1, 6)。さらに、これらの阻害薬を用いたケミカルジェネティクス研究から、PHF8 ががん細胞の増殖に關与することが示唆された。

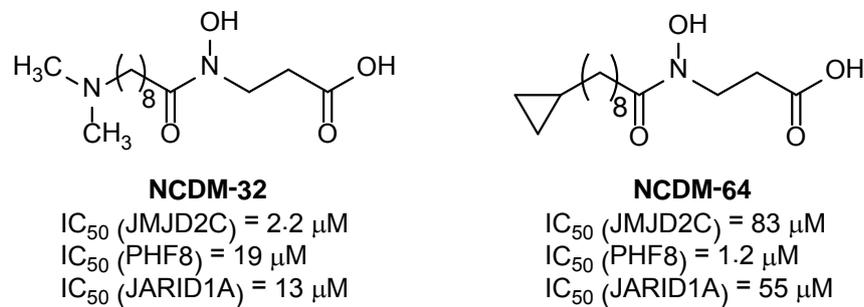


図 2. JMJD2 選択的阻害薬 NCDM-32 および PHF8 選択的阻害薬 NCDM-64 の構造と活性

研究テーマC「フラビン依存性ヒストン脱メチル化酵素 Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) 阻害剤の創製と応用」

LSD1 は、ヒストン H3 の 4 番目のリシン残基のモノまたはジメチル体 (H3K4me1/2) をフラビン依存的に脱メチル化する酵素で、遺伝子発現をエピジェネティックに制御している。しかしこれまでに、高活性かつ高選択的な LSD1 阻害薬は報告されていない。そこで、本研究では、LSD1 選択的阻害薬の創製研究を行うこととした。

LSD1 中の FAD と monoamineoxidase (MAO) 阻害剤である tranylcypromine の複合体の X 線結晶構造および LSD1 の触媒メカニズムを基に新規 LSD1 選択的阻害薬を設計、合成し、酵素阻害活性評価を行った。その結果、高い LSD1 阻害活性、選択性を有する **NCL-1** (Ueda, R.; Suzuki, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17536–17537.) および **NCD-38** を見出した (図 3) (論文 3、特許 7)。さらに、**NCL-1** および **NCD-38** を用いたケミカルジェネティクス研究により、LSD1 選択的阻害薬が抗がん効果を示すこと (論文 2)、HIV 潜伏感染細胞において HIV の転写を活性化すること (特許 3)、iPS 細胞の樹立効率を上げること (特許 4) などが明らかとなった。また、これらの結果から、LSD1 選択的阻害薬の治療薬としての可能性が示された。

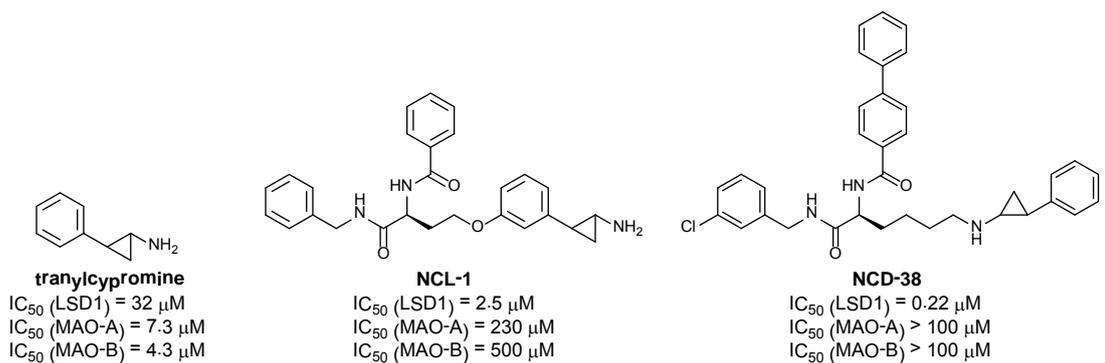


図 3. LSD1 阻害薬 tranylcypromine、NCL-1、NCD-38 の構造と活性

(3) 創製したエピジェネティクス制御化合物の製品化
 次の化合物が試薬として商品化され、発売されている。

エピジェネティクス制御化合物の種類	製品名	関連特許	発売会社
リジン特異的脱メチル化酵素 1 (LSD1) 選択的阻害薬	NCL-1	PCT Int. Appl. (2010), WO2010143582. 特開 2012-036124. PCT Int.Appl. (2012), WO 2012128343.	東京化成工業、 和光純薬
α -ケトグルタル酸依存性ヒストン脱メチル化酵素 (JHDM) 阻害剤	NCDM-32b	特開 2011-168581	東京化成工業、 和光純薬
ヒストン脱アセチル化酵素 8 (HDAC8) 選択的阻害剤	NCC-149	PCT Int. Appl. (2011), WO 2011089995	東京化成工業、 和光純薬



エピジェネティクス研究用試薬

DNA メチル化阻害剤

A2033	5-Azacytidine (>95.0%)	100mg 5,000円 / 1g 25,900円
New A2232	5-Aza-2'-deoxycytidine	20mg 9,800円 / 100mg 34,300円
G0272	Genistein (>96.0%)	100mg 7,300円 / 1g 26,500円
A1163	Procaine Hydrochloride (>98.0%)	25g 2,300円
E0694	(-)-Epigallocatechin Gallate Hydrate (>98.0%)	100mg 12,300円

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤

New H1340	NCC-149 ¹⁾ (>95.0%)	5mg 19,900円
New H1388	Vorinostat (=SAHA) (>98.0%)	200mg 13,900円
New A2501	Acetyldinaline (>98.0%)	10mg 9,800円 / 50mg 34,300円
New D4188	M 344	20mg 16,600円 / 100mg 58,000円
T2477	Trichostatin A (>98.0%)	10mg 36,700円
B3803	Butein (>98.0%)	100mg 7,100円 / 1g 35,400円
P0042	Quercetin Hydrate (>95.0%)	25g 4,900円
P1928	Piceatannol (>98.0%)	100mg 11,500円 / 1g 68,800円
R0071	Resveratrol (>98.0%)	1g 8,700円 / 5g 28,900円
S0519	Sodium Butyrate (>98.0%)	25g 3,100円 / 100g 6,400円
P0823	Valproic Acid (>99.0%)	25mL 5,300円 / 500mL 44,300円

ヒストン脱メチル化酵素阻害剤

New A2411	NCL-1-HCl ²⁾ (>97.0%)	5mg 27,700円
New D4078	NCDM-32b ³⁾ (>97.0%)	5mg 15,000円
P0553	2,4-Pyridinedicarboxylic Acid Hydrate (>98.0%)	5g 7,500円 / 25g 22,300円
New D4015	Daminozide (>98.0%)	5g 4,800円 / 25g 16,800円

¹⁾²⁾³⁾名古屋市立大学 富田直樹先生、京都府立医科大学 鈴木孝禎先生らのご指導のもと製品化いたしました。
(各製品の詳細につきましては裏面をご覧ください。)

これらの製品はすべて“試薬”です。試験・研究用にご使用ください。

上記以外の化合物についてもお問合せください。受託合成での対応も可能です。

エピジェネティクス研究に

ヒストン修飾酵素

阻害剤 活性化剤

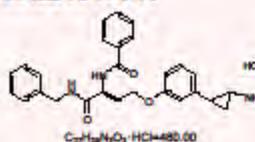
エピジェネティクスとはDNAの塩基配列によらない遺伝子発現調節制御のことで、ヒストンの化学修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化など)やDNA塩基のメチル化による調節機構が知られています。個体発生や細胞分化に大きく貢献すると同時に、エピジェネティクスの異常がさまざまな疾病に関与していることが報告されています。

当社ではヒストン脱メチル化酵素(LSD1:Lysine-specific Histone Demethylase 1, JHDM:Jumonji C domain-containing Histone Demethylase)、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC:Histone Deacetylase)に作用する試薬及び修飾ヒストンに対するモノクローナル抗体を取り揃えています。

◇ ヒストン脱メチル化酵素LSD1 阻害剤

① NCL-1 *New!*

本品はヒストン脱メチル化酵素LSD1の阻害剤です。LSD1は遺伝子発現の調節のほか、前立腺がん細胞の増殖に関与します。本阻害剤はLSD1と相関性が高いMonoamine Oxidase(MAO)への選択性が低いことが確認できています。



■ IC₅₀: 2.5 μmol/L(LSD1)
[230 μmol/L(MAO-A),
500 μmol/L(MAO-B)]
■ CAS No. 1196052-98-8

[参考文献] Ueda, R. et al.: J. Am. Chem. Soc., 131, 17536(2009)

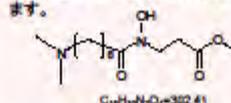
◆ヒストンのメチル化



⇒ 遺伝子発現 OFF

② NCDM-32b *New!*

本品はヒストン脱メチル化酵素JHDMの一種であるJMJD2Cの阻害剤です。JMJD2Cは食道がんや前立腺がんに関与することが示唆されています。



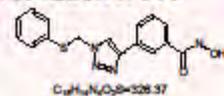
■ IC₅₀(NCDM-32bのヒストンH3-メチル化阻害剤として):
0.5 μmol/L(JMJD2C)
[>185 μmol/L(LSD1)]

[参考文献] Hamada, S. et al.: J. Med. Chem., 53, 5629(2010)

◇ ヒストン脱アセチル化酵素 阻害試薬

③ NCC-149 *New!*

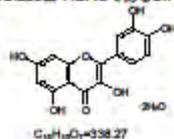
本品はHDACの一つ、HDAC8の選択的な阻害剤です。HDAC8はT細胞性腫瘍や神経芽細胞腫に関与することが報告され、抗がん剤開発ターゲットとして注目されています。



■ IC₅₀: 0.07 μmol/L(HDAC8)
[38 μmol/L(HDAC1),
>100 μmol/L(HDAC2),
44 μmol/L(HDAC5),
2.4 μmol/L(HDAC6)]
[国際公報番号: WO 2011/066905 A1]

④ Quercetin Dihydrate

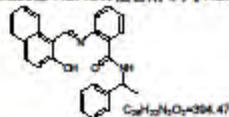
本品はClass III HDACであるSIRT1の阻害剤です。



■ CAS No. 6151-25-3

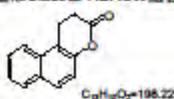
⑤ Sirtinol

本品はClass III HDACの阻害剤です。HDAC1には作用しません。



⑥ Splitomicin

本品はClass III HDACの阻害剤です。



■ CAS No. 5695-03-0

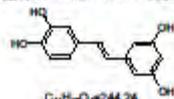
◆ヒストンのアセチル化



⇒ 遺伝子発現 ON

⑦ Piceatannol

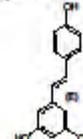
本品はClass III HDACであるSIRT1の活性化剤です。



■ CAS No. 10083-24-8

⑧ Resveratrol

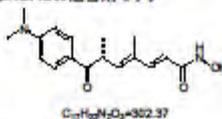
本品はClass III HDACであるSIRT1の活性化剤です。



■ CAS No. 501-36-0

⑨ Trichostatin A

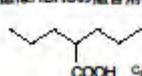
本品はHDACの阻害剤です。



■ CAS No. 56950-19-8

⑩ Valproic Acid

本品はHDACの阻害剤です。



■ CAS No. 99-86-1



3. 今後の展開

本研究では、エピジェネティクスに関与する酵素の新しい阻害剤を開発し、それらをケミカルツールとして用いることで、エピジェネティクスに関与する酵素のバイオロジーを明らかにし、病態との関連を示した。エピジェネティクスに関連するタンパク質は他にも数多く存在しているが、阻害剤が存在しないタンパク質も多い。今後、ケミストがそれらのタンパク質に対するケミカルツールを開発し、バイオロジカルな手法と組み合わせた研究が進展することで、多くのエピジェネティクスが関与する生命現象が解明されることが考えられる。また、それらの研究で用いられた化合物は、今後の創薬のヒントとなる化合物であり、将来の治療薬開発に大きく貢献することも期待される。

4. 自己評価

本研究では、化合物ライブラリーからの探索、標的酵素の X 線結晶構造を基にしたドラッグデザイン、酵素の触媒機構を基にしたドラッグデザインにより、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のアイソザイムである HDAC3、HDAC8 に対する選択的阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素 (KDM) のアイソザイムである JMJD2、PHF8、LSD1 に対する選択的阻害薬を首尾よく見出すことが出来た。さらに、それらの低分子阻害薬を用いたケミカルジェネティクス研究により、HDAC3 が前立腺がん、大腸がんの増殖、HIV の潜伏感染に関与すること、HDAC8 が T 細胞リンパ腫、神経芽細胞腫の増殖に関与すること、PHF8 が固形がん細胞の増殖に関与すること、LSD1 が血液系がん、固形がんの増殖、HIV の潜伏感染に関与することを示すことが出来た。これらの結果から、本研究のねらいである、がんや HIV 感染などの疾患に対して新たな治療指針を提示することが出来たと考えている。本研究で見出した「化合物」をいかにして「医薬品」へと成長させるかが、今後の課題である。

5. 研究総括の見解

一貫してエピジェネティック創薬ターゲットの阻害薬探索に取り組んで、新たな化合物の創出を行った。対象となる各酵素について、構造やケミストリーを考慮して特異性の高い阻害剤を同定していることは高く評価できる。特に、HDAC8 と LSD1 に関しては、細胞実験に使用できる活性と選択性を持つ化合物の創出に成功し、ターゲットの生物学的機能の役割解明に貢献してきている。3 年間という短い研究期間の間に研究課題を目標通りに達成し、創製したエピジェネティクス制御化合物の製品化、ならびに多数の特許出願まで至った実績は称賛に値する。

今後、より広い基礎生物学者とのネットワークを作ってターゲットのバイオロジーを明らかにし、研究の標準となるツール化合物や治療に使えるような化合物を創出していただきたい。また、一方では創出された化合物を医薬品として成長させるべくその努力もお願いしたい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. [Suzuki T](#), Ota Y, Ri M, Bando M, Gotoh A, Itoh Y, Tsumoto H, Tatum PR, Mizukami

T, Nakagawa H, Iida S, Ueda R, Shirahige K, Miyata N. Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 9562–9575.

2. Cortez V, Mann M, Tekmal S, Suzuki T, Miyata N, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Sood AK, Vadlamudi RK. Targeting PELP1-KDM1 axis as a potential therapeutic strategy for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012, 14, R108.

3. Ogasawara D, Suzuki T, Mino K, Ueda R, Khan MNA, Matsubara T, Koseki K, Hasegawa M, Sasaki R, Nakagawa H, Mizukami T, Miyata N. Synthesis and biological activity of optically active NCL-1, a lysine-specific demethylase 1 selective inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 3702–3708.

4. Hamada S, Suzuki T, Mino K, Koseki K, Oehme F, Flamme I, Ozasa H, Itoh Y, Ogasawara D, Komaarashi H, Kato A, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Design, synthesis, enzyme-inhibitory activity, and effect on human cancer cells of a novel series of jumonji domain-containing protein 2 histone demethylase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 5629–5638.

5. Suzuki T, Ota Y, Kasuya Y, Mutsuga M, Kawamura Y, Tsumoto H, Nakagawa H, Finn MG, Miyata N. An unexpected example of protein-templated click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6817–6820.

(2)特許出願

研究期間累積件数:7件 (内 国際出願2件)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・主要な学会発表

1. 「触媒メカニズムに基づいた酵素阻害薬の創製研究」創薬懇話会 2009;2009年12月11日(岐阜)(招待講演)
2. 「標的誘導型合成による酵素阻害薬の創製研究」第29回メディシナルケミストリーシンポジウム;2010年11月17日(京都)(招待講演)
3. 「エピジェネティクス機構を分子標的とする治療薬の進展」第25回インターフェックスジャパン / 第6回 ファーマ ジャパン～医薬品原料 国際展～;2012年6月28日(東京)(特別講演)

・受賞

1. 平成23年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞
2. 平成24年度長瀬研究振興賞



研究報告書

「Gene body メチル化の生物学的意義と分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 鈴木 美穂

1. 研究のねらい

DNAメチル化は、DNA分子に直接付加されるエピジェネティック修飾である。DNAメチル化は遺伝子発現を制御する重要な役割をもっており、哺乳類の正常な発生には不可欠である。DNAメチル化による遺伝子発現制御機構としてよく知られているのは、遺伝子の転写開始に関与する上流プロモーター領域のメチル化修飾である。プロモーターのDNAメチル化は、遺伝子の発現を強く抑制することができる。しかし近年の次世代シーケンサー技術によってゲノム全体のDNAメチル化パターンが詳細に解析されるようになると、「DNAメチル化はプロモーターより下流の遺伝子転写領域 (gene body) に集中している」ことが明らかになった。Gene body 領域を修飾するDNAメチル化の機能はどのようなものであろうか？ Gene body メチル化は、植物、無脊椎動物、脊椎動物のゲノムに存在することから、おそらく真核生物の進化を通して最も原始的かつ広く用いられている重要なメカニズムだと考えられる。本研究のねらいは、gene body メチル化のパターンが顕著な無脊椎動物カタユレイボヤを用いて、gene body メチル化の機能と分子機構を明らかにすることである。

2. 研究成果

(1) 概要

gene body メチル化の機能を明らかにするために、カタユレイボヤDNAメチル化修飾の組織による違いを詳細に解析した。DNAメチル化の高い組織(精子)と低い組織(成体筋肉)でゲノムワイドにDNAメチル化を調べたところ、修飾されている遺伝子に組織特異性はなく全く同一であることがわかった。また、修飾されている遺伝子群は、どのような組織でも恒常的に発現している遺伝子であった。次に、gene body メチル化パターンが構築される分子機構を明らかにするためにトランスジェニック遺伝子の解析を行い、gene body メチル化修飾の有無を決定する塩基配列がどこにあるかを調べた。解析の結果、恒常的に発現している遺伝子のプロモーターに、下流の遺伝子領域をメチル化する特性があることを明らかにした。

(2) 詳細

1-1. 発生過程におけるメチル化レベルの変化

発生過程においてカタユウレイボヤのDNAメチル化修飾はどのように変化するだろうか？カタユウレイボヤのさまざまな初期発生ステージと成体組織からゲノムDNAを抽出し、ゲノム中に存在するDNAメチル化の総量の違いを調べた。すると、DNAメチル化は初期発生ステージを通して常に高いレベルでゲノムに存在し、哺乳類で見られるような受精後の脱メチル化は起こっていないことがわかった。また、成体組織のDNAメチル化レベルは内臓や生殖細胞では高く、筋肉を含む体壁組織では低くなっており、組織によって大きな差があることがわかった。



図1 脊索動物門 尾索動物亜門 カタユウレイボヤ

1-2. 精子と筋肉のメチル化パターンの比較

成体組織ではDNAメチル化レベルが大きく異なることがわかったので、DNAメチル化パターンをより詳細に解析した。均一な細胞からなる精子（高メチル化）と筋肉（低メチル化）を用いて、それぞれのDNAメチル化ターゲット領域をゲノムワイドに決定した。CXXC affinity purification (CAP)という方法で精子DNAの非メチル化領域のみを濃縮し、Illumina シークエンスでその塩基配列を決定した。筋肉は全ゲノムバイサルファイトシークエンス法で詳細なメチル化パターンを決定した。データ解析の結果、以下の事柄が明らかになった。

- ・gene body メチル化されている遺伝子は、精子と筋肉で同一である。全ゲノムメチル化解析実験の結果、精子と筋肉でメチル化状態が異なる遺伝子が全遺伝子の約 5%見つかったが、異なる実験法による確認によりこれらはすべて artifact (偽陽性)であることが示された。つまり、精子と筋肉でメチル化状態が変化する遺伝子は一つも発見されなかった。

- ・精子と筋肉のDNAメチル化レベルの差は、メチル化されている遺伝子群の違いではない。筋肉ではメチル化領域のメチル化レベルが精子と比べると低く、これがゲノム全体のメチル化レベルが低い原因である。DNAメチル化レベルとDNAメチル基転移酵素の発現量には相関がないが、メチル化遺伝子の発現量とは相関がある。

- ・精子と筋肉は発生過程において別々に分化した全く性質の異なる組織である。それぞれの組織で発現している遺伝子群は大きく異なるため、gene body メチル化は遺伝子の発現 ON/OFF を制御しているのではないということがわかった。

- ・これまでDNAメチル化は、細胞の分化にともなってダイナミックに変化し発生・分化を制御していると考えられてきたが、常に一定の遺伝子を修飾しているカタユウレイボヤの gene body メ

チル化には、分化で発現が変動する遺伝子の発現を制御するのとは異なる機能があるだろう。

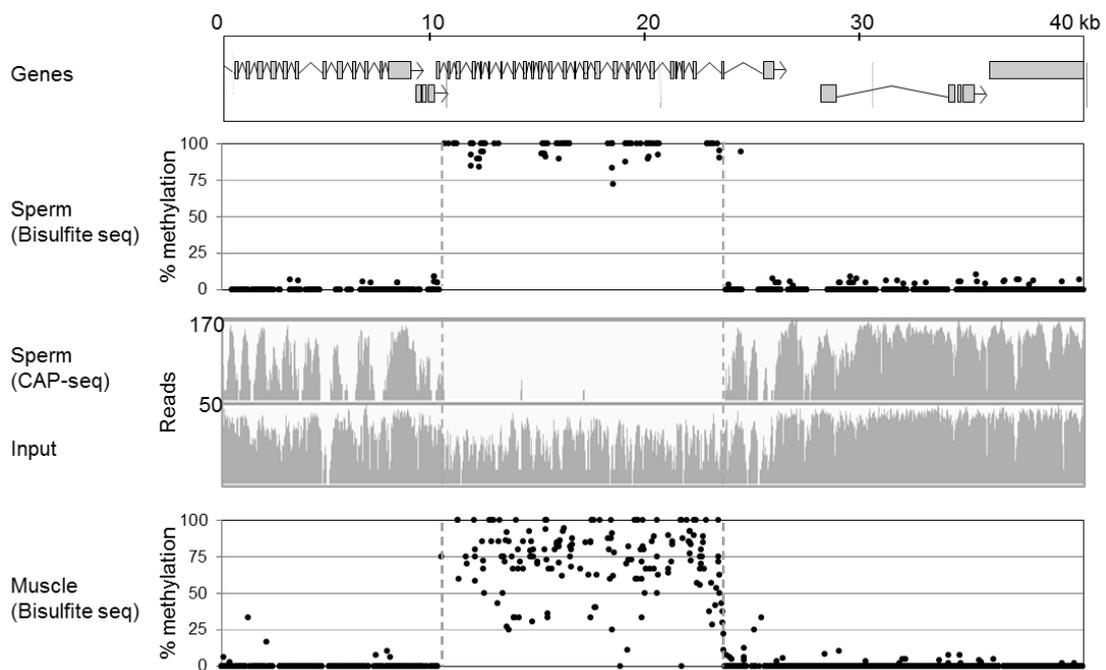


図2 精子と筋肉のメチル化パターンの比較

1-3.メチル化遺伝子の特徴

Gene body メチル化は遺伝子の発現 ON/OFF を制御しているのではない。では、どのような遺伝子がDNAメチル化されているのだろうか？ gene body メチル化されている遺伝子群の特徴を解析したところ、卵細胞に mRNA が蓄えられる母性遺伝子と、すべての細胞で発現している遺伝子が多く含まれていた。つまり常に発現し細胞が必要とする必須タンパク質をつくっている遺伝子は gene body メチル化修飾されており、反対に時期・組織特異的な発現を示す遺伝子は gene body メチル化されていないという結論を得た。

2.トランスジェニック動物ゲノムを用いた gene body メチル化構築の解析

Gene body メチル化パターンは遺伝子の発現様式(常に発現しているか、時期・組織特異的か)に関連していることがわかった。遺伝子の発現様式は、通常それぞれの遺伝子の上流プロモーターの特性によって決められている。そこで、遺伝子が gene body メチル化修飾を受けるかどうか、DNAメチル化修飾を受けた転写環境を構築するかどうかプロモーターによって決められているという仮説を立てた。常に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP をつないだ外来遺伝子をゲノムに挿入したトランスジェニックカタウレイボヤを解析したところ、GFP の gene body 領域に新規の gene body メチル化が入っていることが示された。しかし、組織特異的な発現を示す遺伝子のプロモーターの下流に GFP をつないだ外来遺伝子を用いた場合では、トランスジェニックカタウレイボヤのゲノムに挿入されたあと、GFP が gene body メチル化修飾を受けることはなかった。この結果から、gene body メチル化状態はメチル化を受ける gene body 領域の塩基配列ではなく、上流プロモーターによって決定される機構であることがわかった。

た。

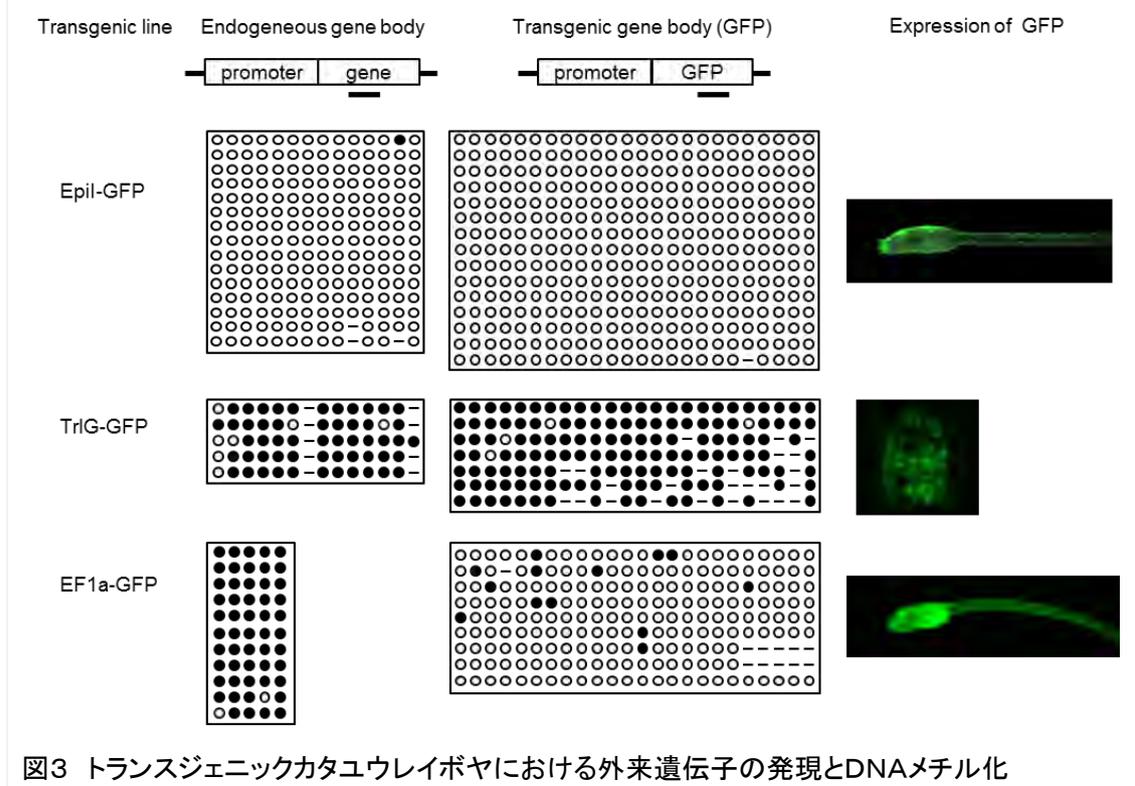


図3 トランスジェニックカタユウレイボヤにおける外来遺伝子の発現とDNAメチル化

3. 今後の展開

本研究により、無脊椎動物における gene body メチル化の特徴を明らかにすることができた。今後も引き続きヒストン修飾やメチル化結合タンパク質の分布を解析し、gene body メチル化の機能の解明を行う。また、gene body メチル化が遺伝子の発現 ON/OFF を制御しているのではなく転写反応を調整している可能性について、さきがけ期間中に着手した研究をさらに進めていきたい。

4. 自己評価

研究期間内には本研究のねらいである gene body メチル化の機能と分子機構の全解明には至らなかったが、ターゲット遺伝子の詳細な解析から gene body メチル化の機能が恒常的に発現している遺伝子にあることがわかった。また計画に基づいてさまざまな実験に挑戦し、機能解明の手がかりとなる予備データを得ることができた。今後この手がかりをもとに研究をさらに発展させたい。

5. 研究総括の見解

DNA メチル化は通常遺伝子の発現に抑制的に働くと考えられている。ところが DNA メチル化が集中している遺伝子転写領域 (gene body) ではどのような働きがあるのか理解されていない。ここでは gene body に DNA メチル化が局在している無脊椎動物 (カタユウレイボヤ) をモデルにメチル化模様の意義を探った。その結果、DNA メチル化は恒常的に発現する遺伝子でのみ見られること、プロモータ配列に依存すること、組織特異性はなく同じ遺伝子で観察されることなどを明らかにした。その意義は大きいが研究はまだ緒についたばかりである。

このテーマはDNAメチル化の本質に迫るという点で、チャレンジングなテーマである。重要なテーマであるので今後とも gene body メチル化の機能とその分子機構の解明に向け更なる発展を期待したい

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Sasakura Y., Suzuki M.M., Hozumi A., Inaba K. and Satoh N. Maternal factor-mediated epigenetic gene silencing in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular Genetics and Genomics* 2010 283 pp. 99-110.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Suzuki M., Yoshinari A., Obara M., Shigenobu S., Nakayama A. カタユウレイボヤのgene bodyメチル化と遺伝子発現 日本遺伝学会第83回大会 京都 2011年9月20日
2. Suzuki M. and Takahashi H. 尾索動物のエピジェネティクス:遺伝子内部のDNAメチル化は種内変異の原因である 日本進化学会第14回大会 東京 2012年8月23日
3. Suzuki M. Gene bodyメチル化の機能の解明 日本発生生物学会 夏季シンポジウム2012 静岡 2012年9月4日
4. Suzuki M. and Ueno N. Nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in mouse ES cells. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 2012年12月13日

研究報告書

「新規ポリコーン群・トリソラックス群の探索」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 西岡 憲一

1. 研究のねらい

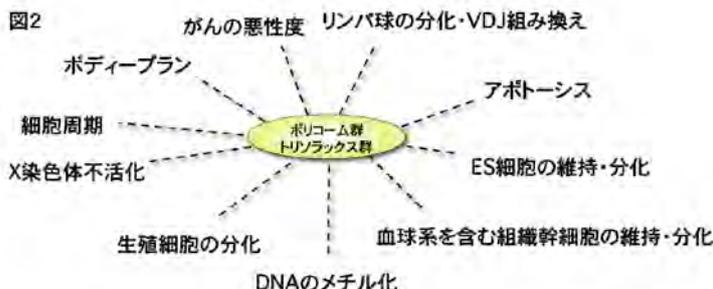
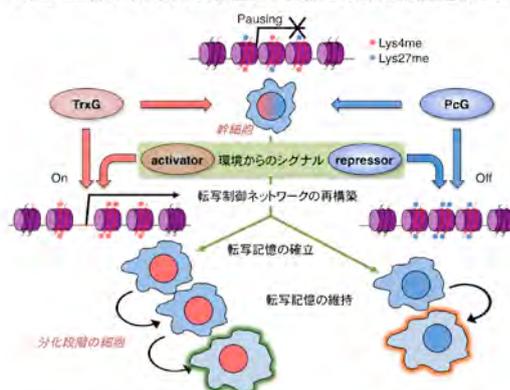
ヒトをはじめとする生物の体の組織は、それぞれ役割が異なる多くの細胞の協調の上に成り立っている。それでは個々の細胞はどのようにしてそれぞれの役割を記憶しているのだろうか？細胞記憶の本体はそれぞれの細胞に特異的な転写制御ネットワークであると考えられる。近年、iPS細胞を含む幹細胞研究の成果から、この転写制御ネットワークを支える基盤的な役割を担う遺伝子群が明らかになってきた。これらの中心的な役割を担う遺伝子群は、ポリコーン群・トリソラックス群と呼ばれる多細胞生物に特有の一連の遺伝子群で、もともとはショウジョウバエ個体の前後軸パターン形成における異常を示す変異遺伝子の遺伝学的解析から同定されたものである(図1)。一般にポリコーン群遺伝子産物は標的遺伝子の抑制を行い、トリソラックス群遺伝子産物は標的遺伝子の活性化を行うとされている。それら多くの特徴としては、いずれも標的遺伝子を含むクロマチンを足場としてその構造を制御し、転写調節に寄与しているということである。

ポリコーン群・トリソラックス群遺伝子の解析が進むにつれて、これら遺伝子産物は予想以上に多くの生物現象に関与していることがわかってきた

(図2)。これは幹細胞におけるこれら遺伝子群の基盤的役割からすれば、当然のことなのかもしれない。したがってこれからは、臨床等への種々の応用を踏まえ、これら遺伝子産物の詳細な機能とそれが寄与する転写メカニズムの解明が急務となるだろう。

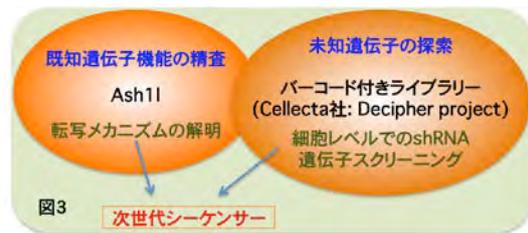
前述の通り、転写の抑制・活性化という大まかな役割はわかっており、また近年の生化学的解析の進展のおかげでメカニズムの一部もわかってきた。しかし、その情報は断片的で、全体のメカニズムを理解するにはまだまだ十分な情報が得られておらず、全容が明らかになったわけではない。例えるとこれは、パズルにおいて一部のピースが欠落しているのと、一方である特定のパズルピースの台紙への組み込み方がわからないの

図1 ポリコーン群・トリソラックス群遺伝子産物による分化関連遺伝子の制御



と類似している。

本研究課題においては(図3)、まず欠落したピースを探す方法として、レンチウイルスによる shRNA 発現ライブラリー (Collecta 社) を用いた遺伝子スクリーニングを細胞レベルで行った。ここではもちろん、ショウジョウバエ個体で行われた古典的なスクリーニング方法によるバイアスを避けることがひとつのポイントである。しかし、



今回最も重要なポイントは、対象遺伝子の同定に次世代シーケンサー解析を組み合わせることによって、ハイスループットな定量性を得ることである。ライブラリーの組み換えウイルスのコンストラクト中にバーコード配列が挿入されており、この配列を解析することによって対象となる shRNA コンストラクトが同定・定量できるという仕組みである。選抜したサンプルのバーコード配列のリード数を解析し、母集団からの濃縮率を計算することによって、同定した対象遺伝子のランキング化を行う。本方法によってこれまでの方法によるものと異なるものが見えてくるのか、検討・考察する。

また今回、特定のパズルピースの解析として、まだ転写制御メカニズムにおける役割が確立されていないトリソラックス群遺伝子産物のひとつ、マウス Ash11 について解析を行った。その詳細は割愛するが、遺伝学的・生化学的解析に加えて、これについても次世代シーケンサー解析を導入することによって、データの深みが飛躍的に向上し、主張の一般化ができた。本件についてはすでに論文を投稿中である。

2. 研究成果

(1) 概要

前述のように、ポリコム群・トリソラックス群遺伝子産物は幹細胞の維持・分化に重要な役割を担っている。この性質を踏まえ、マウス F9 幹細胞を用いてその表現型を解析することによってスクリーニングを行うこととした。F9 細胞は分化誘導実験において比較的好くモデル細胞として用いられるマウス胎仔性癌細胞株であり、レチノイン酸によって内胚葉系細胞へすみやかに分化する。ここでは分化マーカーとして4型コラーゲンを検出した。

今回用いた shRNA ライブラリーは 4,520 種類の疾患関連遺伝子に対する 27,122 種類の shRNA をコードしたレンチウイルスコンストラクトである。F9 細胞に shRNA ライブラリー由来のレンチウイルスを感染させ、ある一定の条件下で培養した。細胞を固定・4型コラーゲン蛍光染色後、FACS にかけて蛍光強度に従って細胞を分離した。細胞よりゲノム DNA を採取し、感染したレンチウイルスを特定するために PCR で組み換えウイルスに付けられたバーコード配列を増幅し、これを次世代シーケンサーで解析した。実験はウイルス感染から 3 回繰り返した。

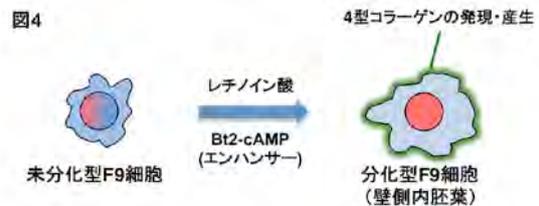
各 shRNA コンストラクトについて投入群と選抜群のリード数の比率を算出し、3 回分を平均した。この値によって shRNA コンストラクトの ID を並べ直し、ランキング化した。これまでの報告をもとに、既知ポリコム群・トリソラックス群遺伝子との関連が明確に示唆されていない核タンパク質をコードする新規候補として、数種類の遺伝子を同定した。

Ash11については、in vitro および in vivo レベルでの基本的な解析を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A「新規ポリコム群・トリソックス群の探索」

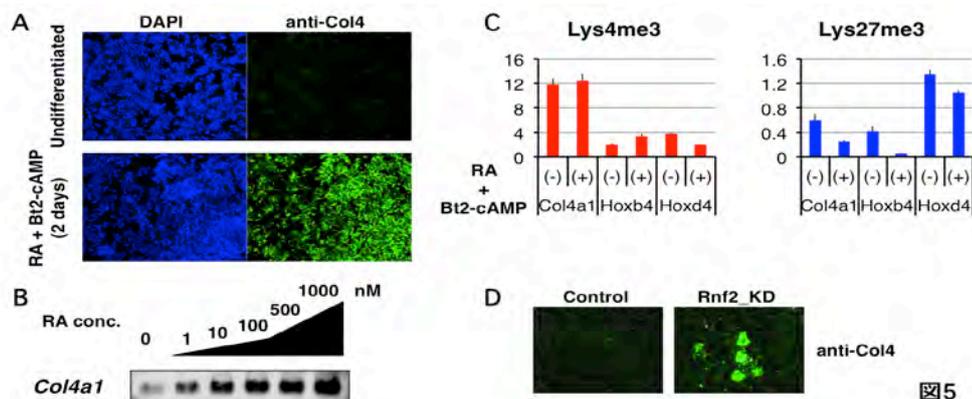
F9 細胞は分化誘導実験において比較的良好なモデル細胞として用いられるマウス胎仔性癌細胞株で、未分化幹細胞としての性質を持っている。レチノイン酸によって内胚葉系細胞へすみやかに分化誘導することができる。この時よく用いられる分化マーカーとして4型コラーゲンがある(図4)。ここではこの内在性4型コラーゲンをレポーターとして検出し、FACS を使用してスクリーニングを行うこととした。方法論の考察は後述する。



まず、スクリーニングを実施する前にいくつかの予備的な確認実験を行った。

- ① 4型コラーゲンの発現レベルはレポーターとして十分か？
- ② 4型コラーゲンの発現はレチノイン酸濃度に依存するか？
- ③ 4型コラーゲンの発現のダイナミックレンジは十分広いか？
- ④ 4型コラーゲン遺伝子はポリコム群遺伝子産物の制御下にあるか？

図5は上記①②③④を確認したものである。図5Aはレチノイン酸およびエンハンサーであるジブチリル cAMP を用いて分化誘導後に免疫染色で4型コラーゲンを検出した。図5Bはレチノイン酸の濃度を変えて分化誘導を行い、RT-PCRで4型コラーゲンの $\alpha 1$ アイソフォームの発現を検出したものである。図5Cはクロマチン免疫沈降-定量 PCR 解析で、4型コラーゲンの $\alpha 1$ アイソフォーム遺伝子クロマチンにおけるヒストン修飾パターンを調べたものである。特にポリコム群遺伝子産物の標的遺伝子のマークであるヒストン H3 Lys27 のトリメチル化が存在するかどうかを調べた。図5Dは代表的なポリコム群遺伝子である Rnf2 のレンチウイルス shRNA ノックダウン実験を行い、免疫染色で4型コラーゲンを検出した。ただし全ての細胞ではなく、一部の細胞でのみ、4型コラーゲンの脱抑制が見られた。このことについては後で考察する。以上の実験結果から、4型コラーゲンをレポーターとした本研究課題のスクリーニングは可能であると判断した。また、ここでは示さなかったが、細胞密度やエンハンサーの有無によっても分化誘導に影響が出現することも確認し、スクリーニングとして最適な条件を調整した。



次に、ライブラリーウイルスの感染条件を検討した。ただし、これは一般的なものである。

① ウイルスは単純に Polybrene を使って濃縮し(100X)、PBS-3%血清に懸濁して凍結・保存。

② 解凍したウイルスを使って MOI<0.2 となるように細胞とウイルスの濃度を調整した。

この条件ではおよそ 20%弱の細胞が感染し、そのほとんどがウイルスひとつだけに感染する。今回の場合はウイルス濃度を 0.1X で使用し、Polybrene (5 μ g/ml)存在下で 2×10^6 個の細胞を 100mm プレートに撒いた。

27,122 種類の各 shRNA コンストラクトはそもそも 100-200 倍程度の存在比のバラツキがある。それゆえ、最も少ないコンストラクトでもこれを含む細胞が最低1個存在するようにするには、独立感染クローンをおよそ 5×10^6 種類得る必要がある。今回は上記 100mm プレートを 18 枚準備した。さらに実際には Puromycin 選択の過程で細胞数はこの 100 倍ほどに増幅される。一旦およそ 10^8 個程度ずつをストックし、これを各一回の実験に使用することとした。

次に、機能試験の条件を選定した。以下を検討する必要があった。

① 総細胞数は濃縮率を計算するために独立クローン数 5×10^6 の 20 倍以上の数が必要。

② 細胞密度は低い方が望ましいが、上記必要細胞数との兼ね合いがある。

③ 培養期間は長い方が総細胞数を確保しやすいが、細胞密度との兼ね合いがある。

④ レチノイン酸やエンハンサーを使用するかどうか。

今回は最終総細胞数が 2×10^8 個超(独立クローン数の 40 倍以上)となるように、 2×10^6 個の細胞を 100mm プレートに撒いたものを 70 枚(計 1.4×10^8 個の細胞を播種)準備し、全てを翌日(24 時間以内)に回収した。本条件により、各細胞は比較的ばらけており、均一な条件下で培養できていると推察する。これ以上細胞密度を上げると細胞間接触が増えることにより分化誘導が阻害されるようである。また、本条件下では意外に、レチノイン酸を使用しなくてもごく軽度の分化誘導がかかり、4 型コラーゲンが発現することがわかった。したがって、レチノイン酸は用いる必要がないと考え、エンハンサーのみを用いることとした。これでポリコム系・トリソラックス系の両方が一度にスクリーニングできる。

固定・染色方法についても新規に検討する必要があった。以下にポイントを挙げる。

① 固定については 4 型コラーゲンの検出感度と形態の保持がポイントであるが、今回はゲノム DNA の回収も考慮に入れる必要がある。種々の方法を検討した結果、90%メタノールによる固定が最も適当であることがわかった。本方法は同時にウイルスの感染マーカーである TagRFP の構造を破壊するので、FACS の蛍光バックグラウンドを下げることに貢献している。

② 染色において工夫が必要であったのは、染色操作時における細胞の大量喪失をどのように抑えるかであった。細胞が多量にあるので、コニカルチューブを複数使ったり、チューブを移し替えたりする操作が不可欠である。細胞の喪失は、この際に細胞がチューブ壁へ吸着することに起因する。一般的な染色法をそのまま適用すると 90%以上の細胞を喪失することもある。吸着を抑えるには、一般に低吸着のチューブまたはシリコンコートしたチューブを使うこと、Tween などの界面活性剤を 0.1%程度加えることをよく行うが、これらに

よる効果は限定的であった。今回、最も効果が高かったのは血清を 10%混在させることであった。それゆえ、染色操作は常に血清共存下 (10% serum-PBS-EDTA) で行った。また、Tween20はブロッキングの直前の膜透過処理時にしか使用していない。

- ③ 蛍光標識は2次抗体法を採用した。今回は FACS 期間が長いこともあり、可視光による蛍光の減衰率が比較的低い Alexa488 を採用した。

次に、実際の FACS 時のデータを示す (図6)。ネガティブコントロールと比較すると、shRNA 発現サンプル群では全体的に 4 型コラーゲンの発現が少し下がる傾向にあることがわかる (図6Aと6Bを比較)。しかし、若干ではあるが、逆に発現が上がったものも存在するようであった。また図6Cでは、図6Bと比較して細胞密度を5倍高くしたサンプルであるが、上述したように細胞密度の違いによって分化誘導のかかり方に違いがあることがわかる。

結局、母集団細胞群の合計 2×10^8 細胞を2日間にわたって選別し、ここから投入群として 10%、高発現群として 10%、そして低発現群として 10%をそれぞれ回収した。

このような実験をウイルス感染過程より3回行い、ゲノム DNA を抽出、PCR にてウイルスバーコード領域を増幅してライブラリーを作製し、次世代シーケンサーで解析した。

図7は次世代シーケンサーによる解析結果をプロットしたものである。今回の実験では投入群において 27,122 種類の shRNA コンストラクトを全て検出 (8-2,806 リード) できており、実験のスケールとしては適切であったことがわかった。計算上、FACSに投入した 2×10^8 個の細胞の中に同一クローンが少なくとも 100 個程度は存在したことになる。図7はそれぞれ横軸に投入群の正規化したリード数を \log_2 値で示し、縦軸には選抜群の正規化したリード数を投入群の正規化したリード数で割り算してこれを \log_2 値で示した。すなわち、縦軸の 0 は投入群と選抜群とで差がないことを示しており、プラス値は選抜群でより濃縮を受けていることを示す。ここでは示していないが、3 回の実験における各 shRNA コンストラクトの密度分布の差異は顕著ではなかった。これはそれぞれの実験間の誤差が小さいことを示している。実際、ランキング化した場合の標的遺伝子セットは実験間で類似していた。ただし、前項図6における FACS でのヒストグラムの広がり具合からも予想された通り、今回の実験ではそれほど濃縮率が上がっているわけではなく、高々 2~3 倍までだった。

実際の結果であるが、現時点ではそれらをここに公開することはできないので、具体的なものは非公開項目に示し、ここでは概要を示す。

まずポリコム系遺伝子として、切りのよいところで 34 種類の遺伝子を挙げた。スクリーニン

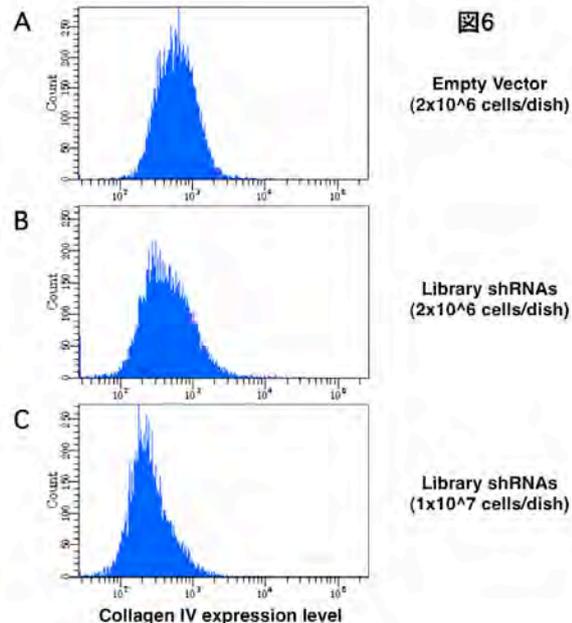


図6

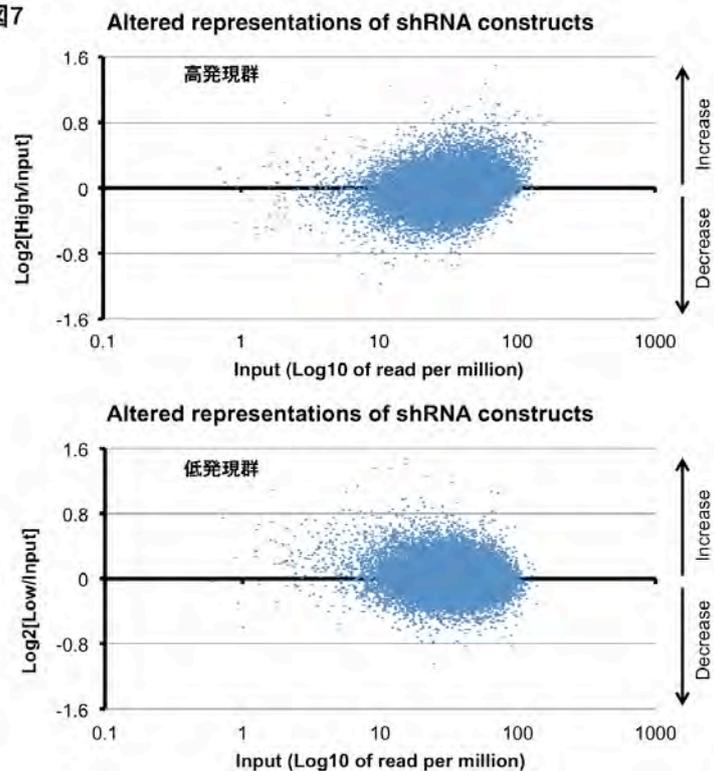
Empty Vector
(2×10^6 cells/dish)

Library shRNAs
(2×10^6 cells/dish)

Library shRNAs
(1×10^7 cells/dish)

グの母集団中には既知ポリコーム群遺伝子に対する shRNA コンストラクトは含まれていなかったので評価は難しいが、これまでに幹細胞の維持に重要であると報告されたものや実際にポリコーム群遺伝子産物と直接的な関係が報告されたものが、かなりの数でトップヒットとして挙がってきている。このことから、微妙な FACS データから想像されるより、思いのほか信頼できる結果が得られているのではないかと考えられる。逆にポリコーム群遺伝子産物と何らかの関係が

図7



報告されていない遺伝子で核タンパク質をコードしているもの、解析報告、特に幹細胞分化制御因子としての報告がほとんどないもの、すなわち、本研究課題の目的である新規ポリコーム群遺伝子の候補遺伝子としては 7 種類ほどあると思われる。いくつかの遺伝子についてのノックダウンを個別に行い、Col4a1 遺伝子・Hoxd4 遺伝子が脱抑制されることを確認した。

次にトリソックス系遺伝子としては 25 遺伝子を挙げた。ここには転写調節因子、mRNA プロセッシング因子、翻訳因子が比較的多く含まれる。上記ポリコーム系と同様、一見問題ないように思えたが、しかし、スクリーニングの母集団中に含まれるはずの Mll2/Mll3/Ash2l などの代表的な既知トリソックス群遺伝子は選抜群で濃縮されなかった。このことに関して、とりもなおさず今回のスクリーニングがうまくいかなかったという結論にはならない。それはいくつかの遺伝子について幹細胞分化制御に関する報告があるからである。しかしながら、これから新規参入して自らの手で解析を進めるに値する興味深い新規遺伝子候補に乏しかったこともあり、今後のトリソックス系遺伝子としての解析はより慎重にならざるを得ない。

スクリーニング方法論に関する考察

前述のように、今回最も重要なポイントは、対象遺伝子の同定に次世代シーケンサー解析を組み合わせることによって、ハイスループットな定量性を得たことである。

まず、これまでのプール型ライブラリーを用いたスクリーニングにおける問題点であった個々のコンストラクト存在比によるバイアスを克服できるようになった。具体的には、機能試験後に分離・回収した選抜 shRNA コンストラクトの母集団に対する濃縮率を算出することによってランキング化できるようになったのである。例えば、従来の方法で細胞のコロニー形成によって機能試験を行い、各コロニーを分離後、付随する shRNA コンストラクトを同定したとする。この場合、ライブラリー中のもともとの存在比が多い shRNA コンストラクトが機能試験後に分離・

回収した群に相応な量で存在することがある。このコンストラクト存在比のバイアスによって擬陽性を得る場合は実際に少なくなく、このことがスクリーニングの成功率を大きく下げると考えられている。一般にプール型ライブラリーの場合、コンストラクト存在比は数百から、場合によっては数千以上に及ぶので、この問題がどれほど大きいかは容易に想像できるだろう。上述の濃縮率を算出できればこのようなバイアスの効果は極めて低く抑えられる。さらに言えば、これまでは実験者側でライブラリーの質を検証することは困難であったが、次世代シーケンサーを使用することで個々の実験の質的管理が容易にできるようになったことは革新的であろう。

実は、上述のようなコロニー形成させる場合でも、機能試験で非選抜群を同様に播種し、これを母集団サンプル群として濃縮率を計算することが可能である。しかし、対象 shRNA が細胞の生存や分裂能に影響を及ぼす場合、長い期間コロニーを形成させているとそのコンストラクトの全体に対する存在率は刻々と変化していくというバイアスが少なからず発生することが予測される。細胞培養の経験者であれば、細胞密度の違いが播種性・増殖性・生存率に影響を及ぼすことは周知であるので、容易に想像できよう。このような場合は例え選抜 shRNA コンストラクトの濃縮率が算出できたとしても、意味のある結果ではない恐れがある。このような観点から、一般にコロニー形成という機能試験は問題があるとも考えられる。結局、理想的な機能試験とは、種々のバイアス発生を回避するために短期間で施行可能なもので、かつ母集団を代表する投入サンプル群が選抜サンプル群と同一サンプルから回収できる方が望ましいということになる。

選抜 shRNA コンストラクトの濃縮率を算出できることの利点をもうひとつ挙げておく。実は、計算により選抜サンプル群でランキング化ができるようになったことで、細胞集団を機能的にクリアに分離できないような条件、具体的には、細胞周期や生存への影響のために選抜にあまり時間がかげられないような条件下でも、一定の結果が得られるようになったのである。このことは大変な意義があるだろう。

追記

当初の計画では Hoxd4 遺伝子にレポーター遺伝子をノックインして連結した ES 細胞を用いる予定であった。Hox 遺伝子はポリコム群遺伝子産物の代表的な標的遺伝子であるので、以後の解析がスムーズにいくと考えられたからである。また、shRNA ライブラリーも他社製のものを用いる予定であった。しかし、以下の問題点のために変更した。

- ① Hoxd4 遺伝子はレチノイン酸で誘導されるが、結果的なタンパク質発現レベルはスクリーニングで使用できるほど高くなかった。
- ② IRES や 2A 配列などの翻訳に関する制御についても検討したが、レポータータンパク質の発現は十分に検出できなかった。①に関連して、内在性 Hoxd4 プロモーターの使用は困難である可能性が大きくなった。Transgene 利用についても検討を行ったが、うまくいかなかった。
- ③ In situ hybridization 法を用いて Hoxd4 mRNA を検出する系を確立することも試みたが、感度が低く、やはりスクリーニングでの使用に耐えられなかった。この時点で Hoxd4 の使用は断念した。
- ④ スクリーニングではある程度の細胞増殖能が維持された方がやりやすい。幹細胞は分化

した場合に極端に増殖能が落ちることもあり、shRNA コンストラクトの representation の変動が起きやすいと考えられた。加えて、播種効率が極めて悪くなる場合がある。これらに関して、ES 細胞を使う場合においても考慮しなければならず、ある特定の株を使う必要があっただろう。しかし、系をよりシンプルにするため、今回は F9 細胞を用いた。この細胞は幹細胞的性質を持ち、増殖能・播種効率ともに申し分なかった。ゲノムへの変異導入も可能な細胞であるので、後々の解析においても有利であった。また、シンプルな分化誘導の系も確立しているので、解析も容易と考えられた。ウイルスの感染効率も ES 細胞より優れていた。

- ⑤ shRNA ライブラリーに関して、当初は SBI 社製のものを使用予定していた。このライブラリーは Affimetrix のマイクロアレイで解析することによって選抜群の濃縮率を計算できるようになっていることがこれまでのライブラリーになかったポイントである。しかし、薬剤耐性マーカーが CMV プロモーターで制御されるためか、ウイルスは分化型細胞にしか感染できなかった。そうこうしているうちに昨年暮れくらいに Celecta 社の shRNA ライブラリーが入手できた。Celecta 社は SBI 社のスピンオフ会社みたいなもので、ライブラリーの基本コンセプトは踏襲していた。ただし、解析は次世代シーケンサーを用いることができるようにコンストラクト内部にバーコード配列を挿入するという工夫が施されていた。しかも、Celecta 社のライブラリーでは薬剤耐性マーカーが UbiC プロモーターで制御されるので、幹細胞にも使用できる。何より、オープンリソースとなっており、無料で入手できる場所は大変魅力的であろう。

研究テーマ B「Ash1l によるヒストン H3 Lys36 のメチル化の生物学的役割」

詳細は割愛した。これまでは酵母で得られた知見から、一般にヒストン H3 Lys36 のメチル化は転写伸長反応に依存すると考えられていたが、哺乳類では必ずしもそうではなく、両者が独立したメカニズムで生じ得ることを明らかにした。すでに論文を投稿中である。

3. 今後の展開

今回使用した shRNA ライブラリーは、実は 2 部 (Module 1&2) 構成になっており、4,625 遺伝子スクリーニングする別 Module が存在する。この別 Module には、今回コントロールとして用いた Rnf2 など、既知ポリコム群遺伝子を標的とした shRNA コンストラクトが多数含まれているので、これを解析すれば本当にポリコム群遺伝子のスクリーニングに適していたのかどうか分かるだろう。3 月 1 日現在、前回の Module の時と同様に 3 回の実験を完了した。今後、次世代シーケンサー解析を行う予定である。それら結果を見て総合的に判断し、すぐ論文にまとめるのか、または新規遺伝子の解析を進めてからまとめるのか、検討して結論を出す。

もちろん、今回同定した遺伝子についてはさらに慎重に解析の是非を F9 細胞で検討し、その後まずは ES 細胞において未分化性の維持・分化誘導能について RNA-Seq や ChIP-Seq などの次世代シーケンサー解析やプロテオミクス解析を行うことになるだろう。その後はマウスの解析も視野に入れたい。

4. 自己評価

本研究課題のような新規ポリコム群遺伝子を採ろうという遺伝子スクリーニングは、目的がシンプルなだけに、これまで多くの研究者が水面下で挑んできたものだろうと推察する。しかしながら、その多くは不毛に終わったようで、これまでにまだ際立った報告がほとんどない。そう言う意味ではかなり挑戦的な課題だったのかもしれないと感じている。

幸い、今回は研究計画にほぼ沿うような形で、結果を出すところまで漕ぎつけることができた。そして、今後の糧となる研究対象を得ることができたことは大変喜ばしいことであると思う。本研究課題ではこれまでに研究者自身が行ってこなかった多くのテクノロジーにチャレンジし、触れることができた。それらの全てが今回の成果に現れているわけではないが、それらを会得できたことはよかったと思う。

ただ、実績を論文という形で出せなかったのは残念なことだ。しかしながら、そもそもスクリーニングの結果がよい場合にはいずれにせよすぐに論文にまとめることは困難なので、それは覚悟しなければいけなかったことなのかもしれない。

視点を変え、本研究課題が社会へ、または研究者コミュニティーへ如何に貢献できたかを考えてみる。今回のスクリーニングはいわゆる次世代型スクリーニングを採用している。本方法の利点は前述したが、最も重要な点は、これまでの遺伝子スクリーニングにおける基本コンセプトを変えることができたことではないだろうか。これまで選抜群の選抜基準というものはかなり厳密である必要があった。そうでないとスクリーニングがうまくいかないと信じられていたからである。実際、今回のようなFACSによる分離が微妙だと、選抜群の再分離を余儀なくされたり、またそれを提案されたりすることも少なくないだろう。しかしながらこれからは、次世代シーケンサーによるハイスループットな定量性のおかげで、選抜群の分離がそれほど厳密でなくても、煩雑な追加実験をすることなく、濃縮率を計算することで信頼性の高い結果を比較的容易に手に入れることができるようになったのである。一般的に遺伝子スクリーニングは「難しい・運次第」とよく言われる。しかし、結果的に本研究課題は、このような革新的な次世代型遺伝子スクリーニングを採用することによって、これまでスクリーニングそのものを不安視していた研究者たちが割と容易に高精度の機能遺伝学を展開できるようにするための礎を築いたと言える。本報告書を読んだ研究者が、「よし、それなら私も遺伝子スクリーニングをやってみよう」という気持ちがかもし起きたのなら、本研究課題は成功したのだ、と考えてもよいだろうと私は考える。

5. 研究総括の見解

哺乳類の新規ポリコム群・トリトラックス群の遺伝子を得るために新たなスクリーニング系を開発した。開発した方法は次の通りである。F9細胞にshRNAライブラリー由来のレンチウイルスを感染させ、培養後得られた細胞を4型コラーゲン蛍光染色後、FACSにかけ細胞を分離し、ついで細胞よりゲノムDNAを採取しバーコード付きレンチウイルスを増幅し、次世代シーケンサーで解析した。その結果、ポリコム系遺伝子の候補遺伝子として34種類、トリソラックス系遺伝子候補として25種類を取りあげた。方法の確立に時間がかかったが、当初の目的に到達したことは評価したい。

今回のスクリーニングで新規のポリコム遺伝子群が得られたのか、その検証並ならびに能解析はこれからである。今後の解析の進展に期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ken Higashimoto, Yukari Yada, Toshiharu Komori, Masashi Matsuda, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Hiroshi Handa, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose, Kenichi Nishioka. A Role of Histone Methylation by ASH1L in the Establishment of Transcriptional Memory. Cold Spring Harbor Conferences Asia (Epigenetics, Chromatin&Transcription). 2010,5,17-5,21. P113.
2. Ken Higashimoto, Yukari Yada, Toshiharu Komori, Masashi Matsuda, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Hiroshi Handa, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose, Kenichi Nishioka. Histone H3 Lys36 methylation by Ash1l triggers a regulatory cascade of the chromatin reprogramming that counteracts Polycomb silencing. 第34回・日本分子生物学会年会・シンポジウム. 2011,12,13-12,16. 4S1pII.
3. Hitomi Miyazaki, Ken Higashimoto, Yukari Yada, Toshiharu Komori, Masashi Matsuda, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Hiroshi Handa, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose, Kenichi Nishioka. Ash1l Methylates Histone H3 Lys36 Independent of Transcriptional Elongation to Counteract the Polycomb Silencing. Cold Spring Harbor Meeting-Asia (Epigenetics, Chromatin & Transcription) 2012,4,23-4,27. P87.
4. 西岡憲一: 第12章 トリソラックス群タンパク質による転写制御, エピジェネティクス, 269-290, 培風館. 東京. 2010.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)