

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23116003

研究課題名(和文)メチオニン代謝回路とエピゲノムの共役機構とそのがん化への関与

研究課題名(英文)Coupling mechanism of methionine metabolism and epigenome

研究代表者

五十嵐 和彦(IGARASHI, Kazuhiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00250738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 94,860,000円

研究成果の概要(和文)： エピゲノム制御の根幹をなすDNAやヒストンなどのメチル化修飾はS-adenosyl-L-methionine (SAM)をメチル基供与体とする。SAMはメチオニンとATPを基質としてmethionine adenosyltransferase (MAT) により合成される。本研究では、MATのアイソザイムであるMATIIが核に分布する分子機構を解明し、核内MATIIが転写制御やヘテロクロマチン形成に重要な役割を担うことを明らかにした。SAM地産地消機構が実在することを証明したことを受け、今後はこの機構の細胞分化や増殖における役割やシグナル応答性などが重要な課題となる。

研究成果の概要(英文)： Regulation of epigenome relies on methylation of DNA and histones, which utilizes S-adenosyl-L-methionine (SAM) as a sole methyl donor. SAM is synthesized by methionine adenosyltransferase (MAT) using methionine and ATP as substrates. In this research project, we discovered the molecular mechanism for the nuclear accumulation of MATII, one of the isozyme of MAT in higher eukaryotes. We also found that nuclear MATII interacted with various chromatin and transcription regulators, promoted histone H3 lysine 9 trimethylation of its target genes, and thus repress their expression. MATII also promoted formation of heterochromatin structure of certain chromatin subregions. These observations support our original contention that SAM is synthesized in nuclei for chromatin and gene expression ("local synthesis of SAM for local consumption" model). Next important step will be to understand how the activity of nuclear SAM is regulated during cell differentiation and/or proliferation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：発現制御 発生・分化 プロテオーム マイクロアレイ 免疫学

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム制御において、DNA やヒストンなどのメチル化修飾は根幹的な役割を担う。これら核内におけるメチル化反応は、他の多くの生体内メチル化反応と同様に S-adenosyl-L-methionine (SAM) をメチル基供与体とする。SAM はメチオニン代謝回路のハブ代謝物であり、メチオニンと ATP を基質として methionine adenosyltransferase (MAT) により合成される。申請者は、そのアイソザイム MATII α がメチル化酵素やクロマチン構造制御因子と共に複合体 (SAMIT と命名) を形成し、転写因子により特定の標的遺伝子へ動員され、周辺ヒストンのメチル化を促進することを見いだした。そして、局所的 SAM 合成酵素動員はエピゲノム制御の基本原則であることを提唱した (*Mol. Cell*, 2011)。

2. 研究の目的

上に述べた概念をさらに発展させ、本領域が掲げる目標の一つ、「転写環境・代謝ネットワーク」の理解に貢献するためには、SAMIT のクロマチン上での作用機構、ならびに、このエピゲノム制御の生物学的・病理学的アウトプット、の二点を解明することが重要である。そこで本計画研究では、細胞分化に伴うエピゲノムリモデリングの優れたモデルとなる B リンパ球-形質細胞分化を取りあげ、SAMIT 複合体の機能、構造、生物・医学的意義を明らかにすること、メチオニン代謝回路とエピゲノムの共役機構を理解することを目的とした。また、エピゲノムにおける鉄の役割が注目され始めたことを踏まえ、鉄代謝と遺伝子発現の関係についても取りあげることとした。

3. 研究の方法

本計画研究では、B リンパ球-形質細胞分化における SAMIT およびエピゲノムの変動に注目し、大きく二つの観点から研究を進める。

(1) エピゲノム制御における SAM 合成酵素複合体 (SAMIT 複合体) の機能と作用機構の解明

MATII の核移行シグナルや核外排出シグナルの同定など、核局在の制御機構の理解

chromatin immunoprecipitation-sequence (ChIP-Seq) を用いた MATII のクロマチン結合部位やヒストン修飾のマッピングとその分化段階に応じた変動の検討

分化段階に応じた SAMIT 複合体組成の変動とその意義に関する検討

線虫でのノックダウンによる SAMIT 複合体因子ホモログの機能評価

MATII の触媒 α および機能未知 β サブユニットの単独およびヘテロオリゴマーの立体構造解析による作用機構の解明

(2) SAM 合成酵素複合体 (SAMIT 複合体) の

液性免疫における生理機能の解明とその異常

核局在能を欠く変異 MATII α あるいは β の B リンパ球特異的ノックインマウスの作成、および免疫系異常の解析による核内機能の検証

B リンパ球やリンパ腫などを用いたノックダウンと ChIP-Seq の統合による SAMIT 複合体の機能とその異常の検討

DNA 修復における SAMIT 複合体機能の検討

(3) SAM に加え、重要な代謝関連物質として鉄に注目し、鉄による遺伝子発現制御機構を明らかにする。特にその作用点として Bach1 および Bach2 に注目する。

4. 研究成果

24年度は、methionine

adenosyltransferase II (MATII) について、以下の実験を行った。(1) 細胞内局在の制御: MATII は触媒サブユニット と機能未知サブユニット のヘテロオリゴマーとして存在する。分子上で核局在に必須の7アミノ酸領域を同定し、これが との結合に必須であることを証明した。(2) 複合体構成因子の同定とその機能: サブユニットを線維芽細胞で発現し、その複合体構成因子を免疫沈降法で調べた。MATII はヒストンメチル化酵素 SETDB1 と複合体を形成することを見いだした。さらに、アレイ実験により MATII-SETDB1 複合体の標的遺伝子として、これまで知られていたヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子に加え、シクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2/Ptgs2) を見いだした。MATII は Cox-2 遺伝子領域のヒストン H3K9 トリメチル化に必要であること、プロモーターやエンハンサー領域に MATII と SETDB1 が動員されることも証明した。これらの知見は、クロマチン上で MATII による

S-adenosylmethionine (SAM) 生合成と SAM を基質とするヒストンメチル化の共役機構を初めて示したものである。クロマチン制御における SAM の地産地消機構を提唱した。さらに、サブユニットを形質細胞株で発現し、その複合体を精製、構成因子を高感度質量分析計にて同定した。転写因子、クロマチン制御因子に加え、DNA 複製や修復に関わる因子を多数同定した。

25年度は特記すべき成果として以下の結果を得た。MATII α および β について、種間の保存性や既知ドメインを参考に多数の欠失変異体を作成し、293T 細胞や HeLa 細胞などで細胞内分布を比較した。まず、予想外な知見として、 α と β はそれぞれ単独で過剰発現した場合、全く異なる細胞内分布を示すことを見いだした。 α は主に細胞質に分布するのに対して、 β はほとんどの細胞で核に局在した。両者を同時に発現させると、 α も核に局在する細胞が著しく増加した。 α 単独で発現した場合には上述のごとく細胞質に主に

分布するが、一部(約10%程度)の細胞では細胞質+核の分布を示したことから、これを指標に α の欠失変異の分布を比較した。そして、 α のC末端7アミノ酸の領域が核分布に必須であることを見いだした。以上の結果から、 β は α の核移行を制御する調節サブユニットであること、そして α のC末端領域と結合することにより核への分布を調節することが考えられた。 α と β がヘテロオリゴマーとして分布する細胞内部位を特定することをsplit venus系を応用して進めた。この系では蛍光蛋白質Venusが二つに分断され、それぞれを相互作用を調べたいタンパク質に融合して発現させる。相互作用が細胞内で生じた場合にはVenusが再構成され、相互作用形成部位にて蛍光が観察される。この系を α および β の細胞内オリゴマー形成の解析に用いた。 α 全長を改良Venus系で調べると、 α は細胞内でホモオリゴマーを形成すること、これは主に細胞質に分布することがわかった。一方、 β のホモオリゴマーは検出されなかった。 α と β の相互作用は改良Venus系でも確認され、さらに、このヘテロオリゴマーは主に核に分布することがわかった。以上の結果から、 β サブユニットの機能がMATIIの核移行にあることが結論できた。現在、共同研究論文を執筆しており、近々投稿予定である。

26年度は特記すべき成果として以下の結果を得た。の複合体をHepal細胞から精製し、その翻訳後修飾状態を質量分析により検討した結果、数カ所のセリンおよびスレオニン残基がリン酸化を受けることを見いだした。の核移行がリン酸化により制御される可能性を調べるために、これらリン酸化アミノ酸に変異を導入し、その細胞内分布やに対する応答を調べる実験系を立ち上げた。このような過剰発現を用いた実験を進める過程で、同酵素のタンパク質量が転写後のいずれかの段階でも制御されていること、この制御は細胞内SAMレベルを感知していることを見いだした。そこで、mRNAレベルの制御、翻訳の制御、タンパク質安定性の制御について、それぞれ検証を進めた。次世代シーケンサーを用いた実験結果からは、細胞内ではMATIIを含むごく限られた遺伝子のmRNAのレベルがSAM濃度により制御されていることを見いだしている。タンパク質安定性については、シクロヘキシミド等を用いた系で検討を進めた。

27年度は、およびサブユニットにそれぞれ直接結合するタンパク質を酵母two hybrid法を用いて探索した。その結果、サブユニットは核膜孔タンパク質のいくつかと直接結合する可能性を見いだした。一方、サブユニットについては、ユビキチンE2リガーゼと相互作用することを見いだした。また前年度までに、同酵素のタンパク質量が転写後のいずれかの段階でも制御されていること、この制御は細胞内SAMレベルを感

知していることを見いだしていたので、この分子機構についても検討を進めた。RNAシーケンスの結果、SAM添加3時間後にmRNA量が上昇する遺伝子はごく少数であり、この調節は極めて特異性の高いものであると考えられた。アクチノマイシンDを用いた実験により、この調節はmRNA安定性の変化によることを見いだした。そこでリポーターアッセイを用いてこの調節に関わるmRNAシス領域の同定を進め、3'非翻訳領域に関わることを見いだした。現在、この領域に結合する調節タンパク質を、RNA-タンパク質複合体の解析などにより進めている。MATIIの細胞分化における役割を明らかにするために、試験管内筋分化系を用いてMATII阻害剤(MATIも阻害するので実験結果の解釈には注視する必要あり)を用いてその効果を調べた。SAM合成は筋細胞分化において必須であることを見いだした。その分子機構に関する検討を進めていく。

ChIP-Seqを用いたMATII結合部位のマッピングも実施したが、予想に反してエンハンサー領域等への有意な集積は認めなかった。最近酵母MAT(SAMS1およびSAMS2)のChIP-Seqの報告がなされたが、予想に反してコード領域への集積が認められており、我々の結果とも矛盾しないものであった。コード領域におけるエピゲノム制御についても現在研究を進めている。

線虫を用いた研究は領域代表者・深水教授らとの共同研究として進めたので、具体的な成果については深水教授の報告書に委ねる。

の立体構造については、組換えタンパク質の安定性、特にサブユニットは発現は容易であるものの、著しく不安定であり、様々試行錯誤はしたものの十分高品質の試料を得ることができず、結晶化に至っていない。

核局在不全MATII発現マウスの作製については、ロックアウトES細胞に変異MATII遺伝子導入を進めたが、その発現を期待通りに操作することができず、発現システムの変更が必要となっている。

Bリンパ球でのロックダウン実験は順調に進み、その重要性も明確に示すことができている。現在、Bリンパ球複合体に含まれるDNA修復因子や転写因子側の解析を進めており、その結果とあわせて論文化の予定である。

鉄とエピゲノムの関係については、マウス鉄欠乏モデルを用いてDNAメチル化の測定や、鉄ヘムBach1/2制御系の役割を検討し、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 46件)

全て査読あり

Dhanasekaran, K., Kumari, S., Boopathi, R., Shima, H., Swaminathan, A., Bachu, M., Ranga, U., Igarashi, K., and Kundu, T.K. Multifunctional human transcriptional coactivator protein PC4 is a substrate of Aurora kinases and activates the Aurora enzymes. *FEBS J.* 283, 968-985, 2016
DOI: 10.1111-febs.13653.

Ando, R., Shima, H., Tamahara, T., Sato, Y., Watanabe-Matsui, M., Kato, H., Sax, N., Motohashi, H., Taguchi, K., Yamamoto, M., Nio, M., Maeda, T., Ochiai, K., Muto, A., and Igarashi, K. The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 291, 1826-1840, 2016
DOI: 10.1074/jbc.M115.661702.

Tanaka, H., Muto, A., Shima, H., Katoh, Y., Sax, N., Tajima, S., Brydun, A., Ikura, T., Yoshizawa, N., Masai, H., Hoshikawa, Y., Noda, T., Nio, M., Ochiai, K. and Igarashi, K. Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3. *J. Biol. Chem.* 291, 6316-6330, 2016
DOI: 10.1074/jbc.M116.713842.

Jang, K.J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S.L., Igarashi, K., Shimizu, A., and Sugai M. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nature Commun.* 6, 6750, 2015
DOI: 10.1038/ncomms7750.

Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A. and Muto, A. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunol. Rev.* 261, 116-125, 2014
DOI: 10.1111/imr.12201.

Itoh-Nakadai, A., Hikota, R., Muto, A., Kometani, K., Matsui-Watanabe, M., Sato, Y., Kobayashi, M., Nakamura, A., Miura, Y., Yano, Y., Tashiro, S., Sun, J., Ikawa, T., Ochiai, K., Kurosaki, T. and Igarashi, K. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing myeloid program. *Nature Immunol.* 15, 1171-1180, 2014
DOI: 10.1038/ni.3024.

Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T.,

Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., Wang, L., Egawa, T., Igarashi, K., Baltimore, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages. *Cell* 156, 1223-1234, 2014
DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.069.

Ichikawa, S., Fukuhara, N., Katsushima, H., Takahashi, T., Yamamoto, J., Yokoyama, H., Sasaki, O., Fukuhara, O., Nomura, J., Ishizawa, K., Ichinohasama, R., Muto, A., Igarashi, K., and Harigae, H. Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 105, 437-444, 2014
DOI: 10.1111/cas.12361.

Hada, H., Shiraki, T., Watanabe-Matsui, M., and Igarashi, K. Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1840, 2351-2360, 2014
DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.02.029.

Nakanome, A., Brydun, A., Matsumoto, M., Ota, K., Funayama, R., Nakayama, K., Ono, M., Shiga, K., Kobayashi, T., and Igarashi, K. Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by Ras(V12) and maintains ERK signaling. *Oncogene*, 32, 3231-3245, 2013
DOI: 10.1038/onc.2012.336.

Kera, Y., Katoh, Y., Ohta, M., Matsumoto, M., Takano-Yamamoto, T. and Igarashi, K. Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J. Biol. Chem.* 288, 12592-13601, 2013
DOI: 10.1074/jbc.M112.429738.

Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Bonelli, M., Sciume, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J. G., Punkosdy, G., Bedognetti, D., Wand, E., Hoffmann, V., Rivera, J., Marinocola, F. M. Nakamura, A., Sartorelli, V., Kanno, Y., Gattinoni, L., Muto, A., Igarashi, K., O'Shea, J. J., and Restifo, N. P. Bach2 represses effector programmes to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature*, 498, 506-510, 2013
DOI: 10.1038/nature12199.

Swaminathan, S., Huang, C., Geng, H., Chen, Z., Harvey, R., Kang, H., Ng, C., Titz, B.,

Hurtz, C., Sadiyah, M. F., Nowak, D., Thoennissen, G. B., Rand, V., Graeber, T. G., Koeffler, H. P., Carrooll, W. L. Willman, C. L., Hall, A. G., Igarashi, K., Melnick, A. and Muschen, M. BACH2 mediates negative selection and p53-dependent tumor suppression at the pre-B cell receptor checkpoint. *Nature Med.*, 19, 1014-1022, 2013

DOI: 10.1038/nm.3247.

Tsukumo, S., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, K., Kurosaki, T., Igarashi, K. and Saito, T. Bach2 maintains T cells in a naïve state by suppressing effector memory-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 10735-10740, 2013

DOI: 10.1073/pnas.1306691110.

Okita, Y., Kamoshida, A., Suzuki, H., Itoh, K., Motohashi, H., Igarashi, K., Yamamoto, M., Ogami, T., Koinuma, D., and Kato, M. Transforming Growth Factor- β Induces transcription factors MafK and Bach1 to Suppress Expression of the Heme Oxygenase-1 Gene. *J. Biol. Chem.* 288, 20658-20677, 2013

DOI: 10.1074/jbc.M13.450478.

Nakamura, A., Shibuya, R. E., Itoh-Nakadai, A., Muto, A., Shima, H., Saigusa, D., Aoki, J., Ebina, M., Nukiwa, T. and Igarashi, K. The transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *J. Exp. Med.* 210, 2191-2204, 2013

DOI: 10.1084/jem.20130028.

Shima, H., Suzuki, H., Sun, J., Kono, K., Shi, L., Kinomura, A., Horikoshi, Y., Ikura, T., Ikura, M., Kanaar, R., Igarashi, K., Saitoh, H., Kurumizaka, H., and Tashiro S. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites containing DNA damage. *J Cell Sci.* 126, 5284-5292, 2013

DOI: 10.1242/jcs.133744.

〔学会発表〕(計 45 件)

五十嵐和彦、local synthesis of S-adenosylmethionine for local consumption, version 2: methylation of chromatin and beyond、転写代謝システム国際シンポジウム、2016年2月17日、東京大学(東京都文京区)

五十嵐和彦、Local production of S-adenosylmethionine for local consumption to promote and to regulate methylation of chromatin and beyond、日本生化学会分子

生物学会合同年会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

五十嵐和彦、S-アデノシルメチオニンの核内産生機構とそのエピゲノム制御における役割、第26回フォーラム・イン・ドージン、2015年11月13日、熊本ホテルキャッスル(熊本県熊本市)

五十嵐和彦、S-アデノシルメチオニン合成酵素のクロマチン RNA 制御における機能と肝再生におけるクロマチン転写ネットワーク、長崎医学会特別講演、2015年9月18日、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科(長崎県長崎市)

A Ito-Nakadai, A Muto, M Watanabe-Matsui, K Kometani, Y Sato, T Ikawa, K Ochiai, T Kurosaki, K Igarashi. “The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program”, 2015 Keystone Symposia Conference : The Golden Anniversary of B Cell Discovery, 2015年3月24日, Fairmont Banff Springs (バンフ、カナダ)

Kazuhiko Igarashi, Local synthesis of S-adenosylmethionine for local consumption: how metabolism is coupled with epigenomic regulation., 5th Meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology, 2015年1月16日, Jawaharlal Nehru Center for Advanced Scientific Research (バンガロール、インド)

Masayuki Ebina, Yasutake Katoh, Kazuhiko Igarashi, Contribution of nuclear localized MAT1 α to nuclear SAM pool., 5th Meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology, 2015年1月16日, Jawaharlal Nehru Center for Advanced Scientific Research (バンガロール、インド)

K. Igarashi, The function of methionine adenosyltransferase 2 in plasma cell differentiation., 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

五十嵐和彦、SAM 合成酵素の核内局在によるエピゲノムの制御、第二回がん代謝研究会、2014年7月10日、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)

五十嵐和彦、落合恭子、加藤恭文、武藤哲彦、転写因子によるB細胞-形質細胞分化調節ネットワーク、国際高等研究所クロマチンデコーディング集会、2014年3月29日、国際高等研究所(京都府木津川市)

Kazuhiko Igarashi, Nuclear localization of methionine adenosyltransferase II and its function in B cell response., 17th Chromatin Assembly Meeting, 2014 年 3 月 17 日、Jawaharlal Nehru Center for Advanced Scientific Research (バンガロール、インド)

五十嵐和彦、転写因子—エピゲノムネットワークによる遺伝情報のプログラミング、日本人類遺伝学会、2013 年 11 月 22 日、江陽グランドホテル(宮城県仙台市)

Kazuhiko Igarashi, Regulation of B cell activation and differentiation by methionine adenosyltransferase □., International Symposium on Transcription and Metabolism, 2013 年 11 月 12 日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

M.Kobayashi., H.Hada., A.Muto.,H.Harigae. K.Igarashi, Heme as a signaling molecule for globin gene regulation and iron homeostasis., Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Metabolic Signaling & Disease:From Cell to Organism, 2013 年 8 月 15 日、Cold Spring Harbor Laboratory (コールド・スプリング・ハーバー、アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：抗リン酸化 Bach2 抗体および抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法

発明者：五十嵐和彦、武藤哲彦、落合恭子、島弘季、安藤亮、佐藤好宏、玉原亨、佐藤勇樹

権利者：国立大学法人東北大学

種類：産業財産権

番号：特願 2015-219945

出願年月日：2015 年 11 月 9 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 和彦 (Kazuhiko Igarashi)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00250738

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：