

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06499

研究課題名(和文) 神経細胞分化過程のヒストンセロトニン化の動態を可視化する蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Development of Fluorescent probe for Histone serotonylation

研究代表者

佐々木 和樹 (Sasaki, Kazuki)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：10415169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規ヒストン翻訳後修飾であるヒストンセロトニン化をリアルタイムに検出する蛍光プローブの開発を行った。TAF3のPHDドメインが、H3Q5ser及びH3K4me3Q5serと直接結合することを示した。この結合蛋白質を用いてFRET型蛍光プローブ候補を作製し、セロトニン処理により、作製した蛍光プローブがFRET変化する事わかった。並行して、GAS41のYEATSドメインを用いたFRET型蛍光プローブを作製した。GAS41のYEATSドメインはH3K14acと結合することがわかった。この蛍光プローブを用いてGAS41のYEATSドメイン阻害剤の細胞内での評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規ヒストン修飾の動態を観察するための蛍光プローブを開発した。従来法では、ヒストン修飾を観察するためには細胞を固定もしくは破碎する必要があるため、分化中のヒストン修飾の動態や薬剤処理によるヒストン修飾の変化をリアルタイムに観察することができなかった。申請者は新規ヒストン修飾であるセロトニン化のプローブを作製し、セロトニン処理による速やかなヒストンセロトニン化を観察することに成功した。さらに、GAS41のYEATSドメインを用いた蛍光プローブの開発も並行して進め、従来法では難しかった細胞内での新規YEATS阻害剤を評価することを可能にした。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent probes have been developed for real-time visualization of histone serotonylation. It has been demonstrated that the PHD domain of TAF3 binds directly to H3Q5ser and H3K4me3Q5ser, leading to the development of FRET-based fluorescent probe candidates. HeLaS3 cells stably expressing TGM2, an enzyme that induces histone serotonylation, were established for the evaluation of these probes. From a pool of potential candidates, the fluorescent probe exhibiting the most significant FRET change upon serotonin treatment was selected for further investigation. Fluorescent probes based on the YEATS domain were developed to detect novel histone acylation. The YEATS domain of GAS41 has been shown to specifically interact with histone H3K14ac. Using this developed fluorescent probe, an inhibitor of the YEATS domain of GAS41 was shown to effectively inhibit the binding of acetylated histone H3 to the YEATS domain in living cells.

研究分野：イメージング

キーワード：ヒストン修飾 蛍光プローブ FRET ヒストンセロトニン化 PHDドメイン ヒストンクロトニル化 GAS41 YEATSドメイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2019年に、抑制性の神経伝達物質として知られているセロトニンが細胞膜上の受容体を活性化して細胞内シグナル伝達を誘導するのみでなく、ヒストンH3の5番目のグルタミンと共有結合を形成し遺伝子発現制御及び細胞の分化誘導に関わっているという報告があり、セロトニンが細胞内でエピジェネティックな役割も担っている可能性を示唆した(*Nature* (2019) **567**, 535)。ヒストン修飾は、ヒストン修飾転移酵素によって“書きこまれ”、ヒストン脱修飾酵素にとって“消され”、そして、修飾ヒストン結合蛋白質によって“読まれる”ことで制御されている。セロトニンはトランスグルタミナーゼ2(TGM2)によるアミド基転移によって細胞内の特定蛋白質のグルタミンに“書き込まれる”ことが報告されており、ヒストンH3もTGM2によってセロトニン化されることがわかった。“書きこまれた”セロトニン化ヒストンH3はTFIID複合体によって“読まれている”ことが知られていた。

YEATSドメインは、アセチル化及びアシル化ヒストン認識ドメインである。ヒトに4種類存在しているYEATSドメインを持つ蛋白質のうち、GAS41は多くの種類のがん細胞に過剰発現しているがん遺伝子蛋白質であり、がん治療の分子標的として注目されている。

### 2. 研究の目的

ヒストンH3の5番目のグルタミン残基(Q5)は、TGM2によってセロトニン化され、隣接する4番目のリジンもトリメチル化されているヒストンH3(H3K4me3Q5ser)は、転写因子TFIID複合体の相互作用を促進し遺伝子発現制御に関わっていることが示された。しかし、未分化の神経細胞からセロトニンニューロンへの分化過程において、どのようにヒストンセロトニン化が起こっているかの詳細がわかっていなかった。申請者は、これまでアセチル化やメチル化などのヒストン修飾を検出する蛍光プローブの開発を行い、生細胞内でのヒストン修飾の動態を明らかにしてきた。本申請では、ヒストンのセロトニン化を観察対象とした新規蛍光プローブの開発を行い、神経細胞への分化過程を観察し、ヒストンセロトニン化がいつ・どこで起こっているか、その動態を明らかにする。

大規模スクリーニングでヒットしたGAS41のYEATSドメインの阻害剤、が生細胞内でGAS41のYEATSドメインを阻害剤するかどうかを調べるため、GAS41のYEATSドメインとアセチル化ヒストンの相互作用を生細胞内で検出する蛍光プローブを開発した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光ヒストンH3セロトニン化プローブの作製

HeLaS3細胞の核抽出液由来のTFIID複合体構成蛋白質は、ヒストンH3K4me3Q5serペプチドと結合することが示された(*Nature* (2019) **567**, 535)。これらのTFIID複合体構成蛋白質(TAF2、TAF3、TAF5、TAF7)を大腸菌から精製し、ビオチン化したヒストンH3Q5ser及びH3K4me3Q5serを用いたペプチドプルダウンアッセイをすることによって、直接結合する蛋白質を探索した。H3Q5serもしくはH3K4me3Q5serによってFRET変化が最大になるように蛍光プローブのリンカーの長さを最適化するために、様々な長さのリンカーの蛍光プローブを作製した。

#### (2) TGM2発現細胞作製

赤色蛍光蛋白質mCherryとTGM2の融合蛋白質のプラスミドを作製した。未分化の神経細胞RN46A-B13細胞にmCherry-TGM2融合蛋白質を過剰発現させ、蛍光活性化セルソーティング法(FACS)を用いて、mCherry-TGM2過剰発現細胞株を作製した。mCherry-TGM2過剰発現細胞株を用

いて、セロトニン(5-HT)添加により内在性ヒストン H3Q5ser が増えることをウェスタンブローディング解析によって確認した。

### (3) 蛍光プローブ発現細胞の作製

mCherry-TGM2 過剰発現細胞株に作製した蛍光プローブを発現させ、FACS を用いて定常的に蛍光プローブが発現する細胞を分取した。これらの細胞の中から、増殖速度が未発現の細胞と差がない細胞を選択した。共焦点顕微鏡を用いた FRAP 解析により、作製した蛍光プローブがクロマチンに取り込まれているか調べた。退色させた蛍光が回復しないことを確認する。蛍光プローブを定常的に発現している細胞に 5-HT を添加し、蛍光プローブ及び内在性のヒストン H3 がセロトニン化されるかをウェスタンブローディング解析により調べた。蛍光プローブを発現した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、5-HT を添加することにより FRET 効率が変化するか調べた。

### (4) YEATS ドメインを用いた蛍光プローブの作製

YEATS ドメインをもつ 4 つの蛋白質 (AF9、ENL、YEATS2、GAS41) を大腸菌から精製し、ビオチン化したヒストン H3ac を用いてペプチドプルダウンアッセイをすることによって、直接結合する蛋白質を探索した。さらに結合した蛋白質がヒストン H3 のどのサイトのアセチル化と結合するか調べた。結合した YEATS ドメインを用いて蛍光プローブの候補を作製した。FRET 変化が最大になるよう、蛍光プローブのリンカーの長さを最適化した。

### (5) GAS41 の YEATS ドメイン阻害剤の評価

蛍光プローブを定常的に発現している細胞に GAS41 の YEATS ドメイン阻害剤処理した後の蛍光強度比の変化を調べた。また、阻害剤処理後に HDAC 阻害剤 TSA によるヒストンアセチル化誘導後のシグナル変化を調べた。既に開発しているブロモドメインを用いた蛍光プローブと作製した YEATS ドメインを用いた蛍光プローブの応答を比較した。

## 4. 研究成果

新規ヒストン翻訳後修飾であるヒストンセロトニン化をリアルタイムに検出する蛍光プローブの開発を行った。蛍光プローブを開発するためにはセロトニン化したヒストンを認識する蛋白質が必要であるが、WDR5 及び TAF3 の PHD ドメインが、H3Q5ser 及び H3K4me3Q5ser と直接結合することを見出した。これらの結合蛋白質を用いて FRET 型蛍光プローブ候補を作製した。蛍光プローブの検証のためのセロトニン処理によってヒストンセロトニン化を起こす細胞が必要なため、セロトニン化を誘導する TGM2 が定常的に過剰発現している HeLaS3 細胞を作製した。この細胞に蛍光プローブ候補を発現させた。WDR5 を含む蛍光プローブは細胞毒性が高く蛍光プローブを発現する細胞を得ることができなかった。TAF3 の PHD ドメインを含むプローブは細胞毒性がみられなかったため、TAF3 の PHD ドメインを含む蛍光プローブ候補の中からセロトニン処理で FRET 変化する蛍光プローブを探し FRET 変化が最も大きいものを選んだ。

新規ヒストンアシル化を検出する YEATS ドメインを用いた蛍光プローブの開発も並行して進めた。ヒトに 4 種類存在している YEATS ドメインを持つ蛋白質のうち、GAS41 と AF9 の YEATS ドメインがペプチドプルダウンアッセイによってアセチル化ヒストン H3 と結合することがわかった。そのうち GAS41 が YEATS ドメインは、ヒストン H3K14ac と結合することがわかった。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA 処理による応答を指標に、GAS41 の YEATS ドメインを用いた複数の候補コンストラクトの中から蛍光プローブを選択し、最も応答性の高いものをその後の実験に用いた。この蛍光プローブは、クロトン酸処理によるヒストンクロトニル化修飾にも応答した。GAS41 は抗癌剤の分子標的として注目されているため、スクリーニングでヒットした新規 YEATS 阻害剤が細胞内で活性を持つかを作製した蛍光プローブを用いて調べた。新規 YEATS ドメイン

阻害剤処理後に TSA を加えても FRET の変化が見られなかったことから、細胞内で新規阻害剤が GAS41 の YEATS ドメインとアセチル化ヒストン H3 の結合を阻害することがわかった。他のプロモドメイン BRD4、BRDT を用いた蛍光プローブと比較し、新規 YEATS ドメイン阻害剤の選択性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木和樹、高瀬翔平、菊地正樹、梅原崇史、伊藤昭博、吉田稔
2. 発表標題 GAS41のYEATSドメインを用いた蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木和樹、高瀬翔平、菊地正樹、梅原崇史、伊藤昭博、吉田稔
2. 発表標題 YEATSドメインを用いたFRETプローブによる新規GAS41阻害剤の評価
3. 学会等名 第17回エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------