

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790101

研究課題名（和文） ヒストン・p53 脱メチル化酵素複合体による転写制御機構解析

研究課題名（英文） Analysis of a transcriptional regulatory mechanism by histone/p53 demethylase complex

研究代表者

梅原 崇史 (UMEHARA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員

研究者番号：20415095

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ヒトクロマチン転写制御機構の分子機構解明とその制御研究を目的とした。ヒトヒストン H3 やがん抑制因子 p53 等の核内基質を脱メチル化する LSD1 について、取得済みの低分子阻害剤と LSD1 との複合体結晶構造を解析した。その結果、この阻害剤による LSD1 の脱メチル化阻害反応機構を解明した。また、この LSD1 阻害剤が細胞透過性に優れたヒストン脱メチル化阻害作用を持つとともに、遺伝子発現制御活性を持つことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to analyze a regulatory mechanism of human chromatin transcription. Pertaining to LSD1 that demethylates nuclear factors such as human histone H3 and tumor suppressor gene product p53, we solved LSD1 crystal structures in complex with small molecular weight inhibitors that had been previously identified by our group. We revealed that one of the LSD1 inhibitors showed good cell permeability and three of the inhibitors exhibited gene expression regulatory activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：遺伝子発現、エピジェネティクス、エピゲノム、クロマチン、染色体、ヒストン、ヌクレオソーム、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝子転写は、ゲノム DNA の配列情報に加えて、ヒストンの翻訳後修飾を実体とするエピジェネティック（後成的）情報によって制御される。エピジェネティック情報の制御因子は、ヒストンのアセチル化酵素

GCN5 (*Cell* 84, 843, 1996) と脱アセチル化酵素 RPD3 (*Science* 272, 408, 1996) の発見を契機として、メチル化・リン酸化・ユビキチン化等とその脱修飾に関わる因子群が特定化されている。これら因子間の連携によって染色体の局所的な転写活性化状態が規定され、その制御異常により Rubinstein-Taybi

症候群などの遺伝病、白血病などのがん発症や寿命が規定される。このようにエピジェネティック情報の制御はヒトの遺伝情報発現と疾患制御に中心的な役割を果たすが、その中でもヒストンのリジンメチル化修飾を除去する「脱メチル化反応」は、最初の脱メチル化酵素 LSD1/KDM1 (Lysine-Specific Demethylase-1)が 2004 年 12 月に発見されてから研究開始当初の時点で約 5 年しか経過していないことから、その制御機構には不明な点が多かった。さらに LSD1 はヒストン H3 だけでなく、がん抑制因子 p53 (*Nature* 449, 105, 2007) や、DNA メチル化酵素 Dnmt1 (*Nat. Genet.* 41, 125, 2009) を脱メチル化することが報告された状況にあった。従って、転写制御に中心的な役割を果たすヒストンと p53 等の脱メチル化反応の分子機構解析は、クロマチン転写の制御原理を理解する上で重要と位置づけられた。

本研究開始段階における国外の関連研究動向としては、米国で最初のヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の発見 (*Cell* 119, 941, 2004)、LSD1 結合因子の機能解析 (*Cell* 122, 654, 2005; *Nature* 437, 436, 2005)、構造解析 (*Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 626, 2006)、さらに第 2 の脱メチル化酵素 Jumonji ファミリー (*Cell* 125, 467, 2006) とその生理的意義 (*Cell* 128, 1077, 2007; *Nature* 450, 119, 2007) が報告されていた。ヒストン H3・p53 脱メチル化酵素 LSD1 については、難治性癌等の発症と関連することが近年示されつつあるが、LSD1 による基質・クロマチン認識機構はヒストン H3 の脱メチル化リジンを含む数残基のペプチド領域のみが判明していた。このような研究背景において、研究代表者らは、LSD1 の SWIRM ドメインの立体構造解析と機能解析 (2006 年)、および LSD1 に対する非特異的阻害剤の 1 種であるトラニルシプロミン (2-PCPA; tranilcypromine) と LSD1 との高分解能共結晶構造 (2008 年) を報告してきている段階にあった。

2. 研究の目的

上記の研究背景に基づいて、本研究では、ヒストン・p53 脱メチル化酵素 LSD1 とその制御複合体を中心とするエピジェネティクス制御因子の立体構造解析とその機能解析を通して、転写抑制機構におけるヒストン修飾反応の生理的役割およびその基質認識機構を分子・原子レベルで理解することを目的とした。また、LSD1 脱メチル化酵素活性等によるヒストン修飾・認識を調節する低分子化合物群の作用機序について結晶構造解析を通して明らかにすることにより、遺伝子転写や細胞制御活性を持つ新規エピジェネティクス制御分子の評価・機能解析と、その利用

による細胞機能のエピジェネティックな制御技術開発をめざした。上記に加え、ヒストン修飾やその修飾認識の分子標的となる真正翻訳後修飾ヌクレオソーム複合体「エピヌクレオソーム」の調製技術開発と、エピジェネティクス制御因子による基質複合体の制御分子機構解析を研究目的とした。

3. 研究の方法

ヒストン脱メチル化等の翻訳後制御・認識を制御する哺乳類クロマチン制御因子群を調製・再構成するために、大腸菌内発現・共発現ベクターに該当遺伝子領域を導入し、大腸菌発現・精製によりタンパク質を調製した。また、PCR により増幅した直鎖状の遺伝子カセット DNA またはその環状プラスミド DNA を鋳型として大腸菌抽出液を用いた無細胞転写翻訳系におけるタンパク質合成を行った。調製したタンパク質・複合体については、カラムクロマトグラフィー・分析超遠心・動的光散乱等による物性解析と酵素活性・分子間相互作用解析等による生化学的機能解析、およびタンパク質結晶構造解析を行った。さらにこれらの酵素活性・分子間相互作用等を制御する低分子化合物についても同様に生化学的機能解析と標的タンパク質群との構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の結晶構造解析

LSD1 による基質タンパク質の脱メチル化酵素活性中心に結合する新規阻害剤群と LSD1 タンパク質との複合体の X 線共結晶構造を明らかにすることにより、LSD1 が転写抑制に働くための基質脱メチル化反応の阻害機構を解明した。具体的には、LSD1 の酵素活性中心に存在する補酵素 FAD を含め、多種類の FAD 含有タンパク質に対して共有結合により酵素機能を阻害するトラニルシプロミン (2-PCPA; tranilcypromine) の構造に基づいた類縁体のうち、S1201 化合物と LSD1 との X 線共結晶構造解析を行った。その結果、S1201 がシクロプロピルアミン基を介して FAD に共有結合する阻害機構を保持するとともに、中央フェニル環の *ortho* 位に新たなフェニル環置換基を導入することにより、LSD1 の活性中心周辺に位置する V333、F538、L539、H564 等の残基群との疎水相互作用が形成され、阻害剤の LSD1 への結合が安定化されることが示唆された (図 1)。この構造解析に基づいて設計・合成した誘導体 S2101 が細胞内における LSD1 阻害により、核内ヒストン H3 の K4 のジメチル化を顕著に亢進させることを見出した。これらの知見

は、LSD1 による H3 基質タンパク質の脱メチル化反応を阻害する分子機構を構造的に明らかにした。また、LSD1 による脱メチル化基質となるヒストン H3 と p53 についても長鎖テイルペプチド等と LSD1 との複合体化および共結晶構造解析により、LSD1 と各基質との複合体共結晶構造解析を行っている。

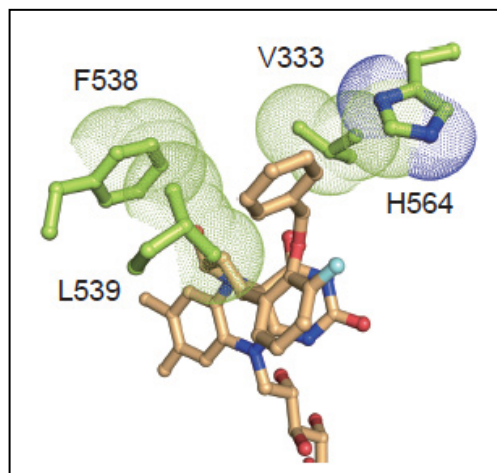


図 1 LSD1 と低分子阻害剤 S1201 との X 線共結晶構造

(2) ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の細胞内機能解析

上記の LSD1 結晶構造解析に基づいて取得・開発した低分子阻害剤について、熊本大学発生医学研究所の中尾光善教授および日野信次朗助教らの研究グループとの共同研究により、LSD1 による細胞内転写制御経路を共同解析した。その結果、LSD1 の特異的阻害剤が難治性がん細胞の増殖抑制だけでなく、これまで知られていなかった脂肪代謝経路の制御に関わることを見出した。具体的にはこれまでの準備研究において、発生研・中尾研究室の未発表データにより、ミトコンドリア機能を介したエネルギー代謝恒常性に LSD1 が寄与する可能性が強く示唆されたことから、この LSD1 阻害剤を用いて細胞内におけるエネルギー代謝への関与を検討した。LSD1 阻害剤 S2101, S2107 および S2111 を用いて LSD1 の脱メチル化酵素活性の阻害を検討したところ、LSD1 遺伝子のノックダウンで見られた事象と同様に、エネルギー代謝を促進する遺伝子群の発現上昇が確認された。また、LSD1 阻害剤の添加により、細胞内のミトコンドリア機能が亢進することが判明した。これら一連のデータは、LSD1 に対する非特異的阻害剤のトラニルシプロミン添加に比べて顕著であったことから、細胞内ミトコンドリアの機能亢進に LSD1 の脱メチル化酵素活性が関与することが強く示唆された。これら一連の阻害剤効果を動物実験での結果等と統合した結果、LSD1 による脱メチル化酵素活性の阻害が、エネルギー代謝

系遺伝子発現のエピジェネティックな制御を介して細胞代謝亢進に至る新規制御機構が明らかとなった。

(3) ヒストンテイル結合因子の結晶構造解析・機能解析

ヒストンに対する翻訳後修飾のうち、メチル化と並んで重要な細胞制御機能を持つアセチル化の修飾認識機構について、BRD2 (Bromodomain-containing protein-2) のプロモドメインと基質となるヒストン H4 ペプチドとの複合体構造を解明した。BRD2 の N 末端側に存在する BD1 プロモドメインについては K12 のアセチル化修飾を含む H4 ペプチドとの複合体結晶構造をこれまでの解析において解明していたが、本研究において BRD2 の C 末端側に存在する BD2 と K5/K12 di-アセチル化 H4 ペプチドとの複合体結晶構造を解明した。この共結晶構造において、BRD2-BD2 プロモドメインは、K5 アセチル化または K12 アセチル化されたリジン残基の両者と独立して結合することが判明した。また、この K5/K12 di-アセチル化の認識が、BRD2 による K5/K8 di-アセチル化認識で検出された近接 2 修飾の単独プロモドメインによる認識機構とは異なり、1 分子内における 2 修飾においても単独の修飾ごとに 2 個の独立したプロモドメインによって認識されることを見出した。さらに、BRD2-BD1 と結合する低分子化合物 BIC1 (BRD2-interactive compound-1) をこれまでの研究において取得していたが、本研究において BRD2-BD1 と BIC1 との共結晶構造解析を行った結果、この化合物がアセチル化 H4 テイルとは異なる結合様式で BRD2-BD1 に結合し、アセチル化 H4 との結合を阻害することを見出した。

(4) エピジェネティックなヌクレオソーム複合体の調製技術開発

エピジェネティクスの生化学解析では、これまでエピジェネティック情報を持つヌクレオソームを試験管内で均一・大量に再構成することが技術的に困難だった。そのため、エピジェネティクスの機能解析は大部分が修飾ペプチド等を疑似基質とした研究にとどまっている。本研究では、理化学研究所生命分子システム基盤研究領域の横山茂之領域長および坂本健作チームリーダーらが開発を進めてきた「遺伝暗号拡張技術」を「無細胞タンパク質合成技術」と組み合わせる手法より、ヒストンの任意の残基のみをアセチルリジンに置換したヒトヌクレオソームコア粒子「エピヌクレオソーム」の試験管内再構成技術を開発した。また、翻訳終結因子 RF1 を欠損させた大腸菌株の S30 抽出液を用いる手法により、ヒストン H4 の N 末端テイル領域の 4 箇所のリジン残基をアセチル化し

た K5/K8/K12/K16 テトラアセチル化ヌクレオソームを再構成した。さらに、メチルリジンヒストン等に遺伝的に導入する調製技術についても合成条件の検討を進めている。

(5) 光架橋によるタンパク質複合体の結晶構造解析技術の開発

ヒストンの修飾制御等の細胞内シグナル伝達制御に関わるタンパク質複合体の結晶構造解析では、安定なタンパク質複合体の取得・結晶化が困難な場合がある。本研究では、相互作用する2種類のタンパク質複合体間の一方のサブユニットに光反応性アミノ酸の *p*Bpa (*para*-benzoyl-L-phenylalanine) を遺伝的に導入してタンパク質複合体を光架橋する新規構造解析手法について、2分子間の光架橋反応が天然の複合体構造に影響を与えないことを結晶構造解析により明らかにした。具体的には、癌抑制遺伝子産物の p53 や Rb の分解に関わる gankyrin とプロテアソーム制御リング成分タンパク質との複合体について、両者を光架橋させるために gankyrin の特定残基に *p*Bpa を導入し、光架橋効率の良い2種類の gankyrin *p*Bpa 置換体を取得した。この光架橋複合体の1種類を大量調製して結晶構造解析した結果、光架橋した側鎖間の共有結合の電子密度を明瞭に検出した。この架橋複合体の全体構造を未架橋の天然複合体構造と比較した結果、2分子の全体構造はほぼ完全に合致し、全体および局所的な歪みが検出されないことを確認した。この知見は、残基特異的な光架橋によるタンパク質の複合体化手法が天然の複合体構造を反映した複合体構造決定に有効であることを初めて実証した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Hino, S., Sakamoto, A., Nagaoka, K., Anan, K., Wang, Y., Mimasu, S., Umehara, T., Yokoyama, S., Kosai, K.I., Nakao, M.
"FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure"
Nature Communications 3: 758. doi: 10.1038/ncomms1755 (2012) 査読有
- ② Wakamori, M., #Umehara, T., #Yokoyama, S.
"A tandem insertion vector for large-scale preparation of nucleosomal DNA" (#corresponding authors)
Anal. Biochem. 423 (1): 184–186 (2012) 査読有
- ③ Mukai, T., Yanagisawa, T., Ohtake, K.,

Wakamori, M., Adachi, J., Hino, N., Sato, A., Kobayashi, T., Hayashi, A., Shirouzu, M., Umehara, T., Yokoyama, S., Sakamoto, K.

"Genetic-code evolution for protein synthesis with non-natural amino acids"

Biochem. Biophys. Res. Commun. 411 (1): 757–761 (2011) 査読有

- ④ Ito, T., Umehara, T., Sasaki, K., Nakamura, Y., Nishino, N., Terada, T., Shirouzu, M., Padmanabhan, B., Yokoyama, S., Ito, A., Yoshida, M.
"Real-time imaging of histone H4K12-specific acetylation determines the modes of action of histone deacetylase and bromodomain inhibitors"
Chemistry & Biology 18 (4): 495–507 (2011) 査読有
- ⑤ *Sato, S., *Mimasu, S., *Sato, A., Hino, N., Sakamoto, K., Umehara, T., Yokoyama, S.
"Crystallographic study of a site-specifically cross-linked protein complex with a genetically incorporated photo-reactive amino acid"
Biochemistry 50 (2): 250–257 (2011) 査読有
- ⑥ Umehara, T., Nakamura, Y., Wakamori, M., Ozato, K., Yokoyama, S., Padmanabhan, B.
"Structural implications for K5/K12-di-acetylated histone H4 recognition by the second bromodomain of BRD2"
FEBS Lett. 584 (18): 3901–3908 (2010) 査読有
- ⑦ *Wakamori, M., *Umehara, T., Yokoyama S.
"A series of bacterial co-expression vectors with rare-cutter recognition sequences"
Protein Expr. Purif. 74 (1): 88–98 (2010) 査読有
- ⑧ Mimasu, S., Umezawa, N., Sato, S., Higuchi, T., #Umehara, T., #Yokoyama, S.
"Structurally designed *trans*-2-phenylcyclopropylamine derivatives potently inhibit histone demethylase LSD1/KDM1"

(#corresponding authors)
Biochemistry 49 (30): 6494–6503 (2010)
査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 梅原崇史, 横山茂之
「エピジェネティクス阻害剤開発のための新しいケミカルツール」
第 132 回日本薬学会年会 (札幌) 2012 年 3 月 30 日
- ② 梅原崇史
「エピヌクレオソームを標的とした構造生物学」
構造生物学社会連携講座 研究成果報告会 (東京) 2012 年 3 月 24 日
- ③ 梅原崇史, 中村祥浩, 寺田貴帆, 白水美香子, Padmanabhan B., 横山茂之
「アセチル化ヒストンを認識するプロモドメインの結晶構造解析と阻害剤の開発」
第 29 回 Photon Factory シンポジウム (つくば) 2012 年 3 月 15 日
- ④ 梅原崇史, 若森昌聡, 須賀則之, 安達仁朗, 向井崇人, 寺田貴帆, 白水美香子, 坂本健作, 横山茂之
「部位特異的なアセチル化を含む『エピヌクレオソーム』の試験管内再構成」
第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月 15 日
- ⑤ 梅原崇史
「KLF とエピゲノムを中心としたがん・心臓病関連因子複合体の構造・機能解析」
最先端研究開発支援プログラム 「未解決のがんと心臓病を撲滅する最適医療開発」
第 1 回公開シンポジウム (東京) 2011 年 9 月 28 日
- ⑥ Umehara, T., Wakamori, M., Sato, S., Terada, T., Shirouzu, M., Sakamoto, K., Yokoyama, S.
"In vitro reconstitution of 'epi-nucleosome' core particles for broad epigenetic analyses"
KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine (Kumamoto, Japan) (08-Sep-2011).
- ⑦ Umehara, T., Wakamori, M., Sato, S., Terada, T., Shirouzu, M., Sakamoto, K., Yokoyama, S.
"In vitro reconstitution of 'epi-nucleosome' core particles"
FASEB Summer Research Conference on Epigenetics, Chromatin &

Transcription (Snowmass Village, CO, USA) (04-Aug-2011).

- ⑧ 梅原崇史, 若森昌聡, 佐藤 心, 寺田貴帆, 白水美香子, 坂本健作, 横山茂之
「エピジェネティック情報を持つヌクレオソームコア粒子の試験管内再構成」
第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会 (熊本) 2011 年 5 月 19 日
- ⑨ 梅原崇史, 三桝信哉, 梅澤直樹, 佐藤 心, 樋口恒彦, 横山茂之
「ヒストン脱メチル化酵素 LSD1/KDM1 を阻害する化合物の開発」
第 33 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (神戸) 2010 年 12 月 10 日
- ⑩ Umehara, T., Yokoyama, S.
"Structural biology and molecular imaging" (招待講演)
6th Hangzhou International Molecular Imaging Conference (HIMIC2010) (Hangzhou, China) (12-Sep-2010).
- ⑪ Umehara, T., Mimasu, S., Umezawa, N., Sato, S., Higuchi, T., Yokoyama, S.
"Structure-based development of specific inhibitors for histone demethylase LSD1/KDM1"
9th EMBL Conference of Transcription and Chromatin (Heidelberg, Germany) (29-Aug-2010).
- ⑫ Umehara, T.
"Structural study on Krüppel-like factors and KLF-associated factors" (招待講演)
FASEB Summer Research Conference on Biology and Pathobiology of Krüppel-like Factors (KLFs) (Steamboat Springs, CO, USA) (09-Aug-2010).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
梅原 崇史 (UMEHARA TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・上級研究員
研究者番号: 20415095
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし