

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790321

研究課題名（和文）エピゲノム制御におけるSAM合成とメチル基転移酵素共役機構の解明

研究課題名（英文）Epigenome regulation for coupling of SAM synthesis and histone methylation

## 研究代表者

加藤 恭丈 (KATOH YASUTAKE)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：40397914

研究成果の概要（和文）：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。これら核内のメチル化反応は、他の多くの生体内メチル化反応と同様に S-アデノシルメチオニン（SAM, または AdoMet）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 SAM 合成酵素（MAT）により生成される。MAT アイソザイムである MATII は、触媒サブユニット $\alpha$ と機能未知のサブユニット $\beta$ から構成され、いずれも酸化ストレス応答や細胞分化に関わる MafK による転写抑制に関わる。本研究では、MafK-MATII によって制御される遺伝子の探索と、エピゲノム制御に関与するメチル基転移酵素の同定をおこなった。そして、MATII とヒストンメチル基転移酵素 SETDB1 が相互作用して、COX-2 遺伝子のエピゲノムと転写抑制化との共役制御の存在が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Histone and DNA methyltransferases utilized S-adenosyl-L-methioine (SAM, or AdoMet), a key intermediate of sulfur amino acid metabolism, as a donor of methyl group. SAM is biosynthesized by methionine adenosyltransferase (MAT) using two substrates, methionine and ATP. Three distinct forms of MAT (MATI, MATII and MATIII), encoded by two distinct genes (*MAT1A* and *MAT2A*), have been identified in mammals. MATII consists of  $\alpha$ 2 catalytic subunit encoded by *MAT2A* and  $\beta$  regulatory subunit encoded by *MAT2B*, but the physiological function of the  $\beta$  subunit is till unknown. MATII serves as a transcriptional corepressor in the oxidative stress response and forms the SAM-integrating transcription regulation module (SAMIT), affecting histone methyltransferase activities. However, the identities of genes regulated by MATII $\alpha$  and  $\beta$  or its associated methyltransferases are unclear. My collaborators and I show that MATII represses the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) encoded by *Ptgs2*, by specifically interacting with histone H3K9 methyltransferase SETDB1, thereby promoting the trimethylation of H3K9 at the COX-2 locus. We discuss both gene-specific and epigenome-wide functions of MATII.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ゲノム医化学・エピゲノム制御・転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティクスとメチル化反応  
細胞内外のシグナルに対する細胞の応答は単一ではなく、細胞の状況により多彩な応答が

産み出される。この細胞応答性が変化する仕組みの一つとして、DNA の修飾（メチル化）やヒストンテールの修飾（メチル化やアセチル化など）により遺伝子のクロマチン構造が

変化し、その結果、ゲノムのシグナル応答性が変化するというエピジェネティック機構が注目されている。これまでに、タンパク質アミノ酸残基特異的なメチル化酵素やアセチル化酵素が多数同定され、それぞれの機能が解明されつつある。また、がんなど、様々な疾患にエピジェネティック機構の変化が伴うことから、これら酵素を標的とする薬剤開発も進みつつある。現在までに同定されている核内メチル化酵素は、全てメチル基供与体としてS-アデノシルメチオニン (SAM) を利用する。しかし、核内においてメチル化酵素にSAMがどのように供給されるのか、この点は全く解明されていない。SAMはアルキル化剤としての作用を有することから、遊離のSAMは変異原性を有すると考えられる。したがって、SAM合成とメチル基転移反応を共役する仕組みが存在すると予想できるが、この観点からの研究は、全く行われていない。

### (2) MATIIBとヒストンメチル化反応

SAMを合成する3種類のメチオニン・アデノシル転移酵素 (MAT) の中で、唯一、MATIIは酵素活性をもつ $\alpha$ サブユニット (MATII $\alpha$ ) と、非触媒 $\beta$ サブユニット (MATII $\beta$ ) から構成されている。私は、MATIIの2つサブユニットが転写因子 MafK の複合体に含まれていること、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子の発現制御領域に動員されることを見いだした。このことから、MafKをはじめとする転写因子群により、MATIIがクロマチン上にリクルートされ、局所的にSAMが供給され、その結果、MTやDNAメチル基転移酵素 (DNMT) といったメチル化酵素が機能し、標的遺伝子周辺のヒストンのメチル化とクロマチン構造が、ダイナミックに変化するモデルを提唱した。MATII $\alpha$ ノックダウンの細胞では、H3K9などのヒストンメチル化が、MATII $\beta$ ノックダウンの細胞では、H3K27のメチル化やH2Aのユビキチン化が著しく低下していた。また、これらの修飾に作用するMTとMATII $\alpha$ との相互作用も見出している。したがって、MATIIは様々な核内メチル化酵素と共役してメチル化反応に寄与すること、この共役は核内メチル化反応全体を制御する分子機構となっていることが予想される。

## 2. 研究の目的

メチオニン・アデノシル転移酵素 II (MATII) は、触媒サブユニット ( $\alpha$ ) と機能不明な非触媒サブユニット ( $\beta$ ) から構成され、S-アデノシルメチオニン (SAM) の生合成を触媒する。合成されたSAMはメチル基転移酵素 (MT) の基質として利用され、そのメチル基はDNA中のシトシンやヒストンのリジン残基などへ転移され、クロマチンレベルでのエピジェネティクスを支配する。本研究の主

題は、クロマチン制御において、SAM合成とメチル化反応が共役する可能性を検証して、MATIIの作用機構を理解することである。そのために、MATIIがメチル基転移酵素活性や遺伝子発現に及ぼす影響を探る。そして、MATIIがクロマチン構造や転写制御において担う機能を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 安定発現細胞株の作製：不死化したマウス胚性繊維芽細胞 (iMEF) や、ヒト単球性白血病細胞株 (THP-1)、マウス肝癌細胞株 (Hepa1)、マウス赤白血病細胞株 (MEL) を用いて、FLAGタグとビオチン化認識配列をN末端側に融合したMATII $\alpha$ タンパク質 (FLBio-MATII $\alpha$ ) の発現プラスミドを、iMEF細胞に遺伝子導入した。

(2) MATII $\alpha$ 複合体の精製：FLBio-MATII $\alpha$ 安定発現iMEF細胞から、核分画のタンパク質を調製し、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いて、FLBio-MATII $\alpha$ を精製した。この時、FLBio-MATII $\alpha$ とともに共沈するタンパク質群も同時に精製された。

(3) 一過性のノックダウン細胞の作製：iMEFやHepa1、THP-1細胞に、MATII $\alpha$ やSETDB1のmRNAを標的にしたsiRNAを導入して、一過性のノックダウン細胞を作製した。

(4) DNAマイクロアレイによる発現プロファイリング：コントロールとMATII $\alpha$ ノックダウンiMEF細胞から、RNA isolation and purification kit (アジレント社) を用いて、全RNAの単離と精製をおこなった。これらのRNAを用いて、マウス全ゲノム (4 $\times$ 44K, G4122F, アジレント社) によるDNAマイクロアレイをおこなった。遺伝子の発現やクラスター解析はGeneSpringソフトウェア (アジレント社) を利用した。そして、MATIIによって制御を受ける遺伝子群の発現を、定量RT-PCR法を用いて、検証した。

(5) クロマチン免疫沈降実験 (ChIP)：Ethylene glycol bis (EGS) を用いて、コントロールとMATII $\alpha$ ノックダウンiMEF細胞のクロマチン固定を施し、超音波破碎により、ゲノムDNAを断片化した。これらの産物を抗MATII $\alpha$ 抗体または、抗MafK、抗SETDB1、抗Suv39h、抗ヒストンH3K4トリメチル化、H3K9トリメチル化、H3K9アセチル化、H3K27アセチル化抗体から1つを選択利用して、免疫沈降をおこない、RNA除去、脱クロスリンクとタンパク質除去の処理を施した、DNA断片を鋳型にして、COX-2遺伝子領域を検出するためのプライマーセットとともに、定量PCRをおこなった。

## 4. 研究成果

(1) MATII 標的遺伝子の同定: 不死化 MEF 細胞 (iMEF) を用いて、MATII $\alpha$  の一過性ノックダウンをおこない (図 1A と 1B)、DNA マイクロアレイ実験から、MATII 標的遺伝子の探索をおこなった。その際、コントロールと MATII $\alpha$  ノックダウン iMEF 細胞で発現している全 RNA を、マウス全ゲノムの 41,252 遺伝子プローブと照合した。その結果、コントロールと比較して、MATII $\alpha$  ノックダウン iMEF 細胞では、発現レベルが 2 倍以上変動した遺伝子プローブは 1,597 種あり、そのうち、増加したのが 776、減少したのが 821 遺伝子プローブであった (図 1C)。これらの変動遺伝子の遺伝子オンロジー (GO) を解析してみると、MATII は多様な細胞調節に関与することが明らかになり、その中でも、アラキドン酸カスケードに属する COX-2 遺伝子 (COX-2) や、プロスタグランジン E2 合成酵素遺伝子 (Ptges) の、MATII $\alpha$  ノックダウンによる発現増加に注目した。他にも、p53 の標的遺伝子である Noxa や、Fas、Igfbp3、Gadd45b 遺伝子の発現量も増加していた (図 1D)。mRNA レベルだけでなく、COX-2 のタンパク質発現も、MATII $\alpha$  ノックダウン iMEF 細胞では増加していた (図 1E)。COX-2 や HO-1 遺伝子は、ジェチルマレイン酸などの酸化ストレス誘導剤によって、発現誘導されることがわかっているため、iMEF 細胞における検証もおこない、予想通りに各遺伝子の発現が誘導された (図 1F と 1G)。

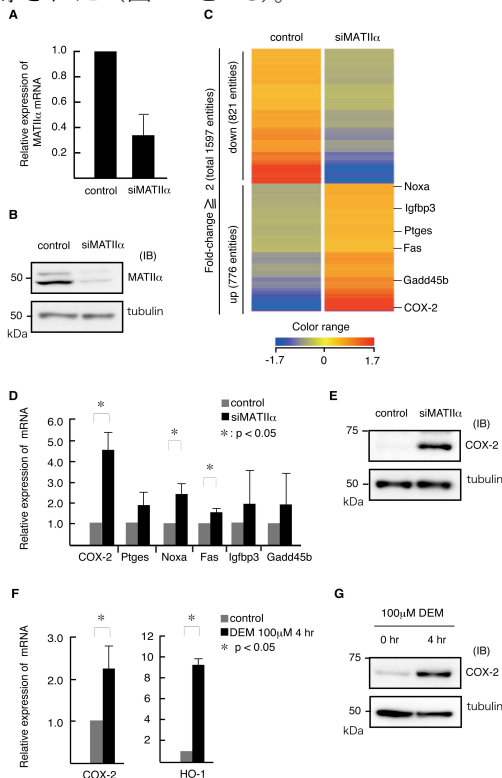


図 1. MATII 標的遺伝子としての COX-2

(2) MATII による COX-2 遺伝子の転写抑

制化: 先の DNA マイクロアレイ実験により同定された MATII の標的遺伝子が、iMEF 細胞だけでなく、普遍的な細胞株によっても同様な結果を導くことを証明するために、ヒト単球性白血球細胞株 (THP-1) や、マウス肝癌細胞株 (Hepal) を用いて、MATII $\alpha$  ノックダウンを作成した (図 2A <THP-1 細胞> と 2C <Hepal 細胞> )。THP-1 細胞において、コントロールと MATII $\alpha$  ノックダウンによる COX-2 ならびに HO-1 遺伝子の発現量は増加し (図 2B)、この結果は、Hepal 細胞においても同様であった (図 2D)。

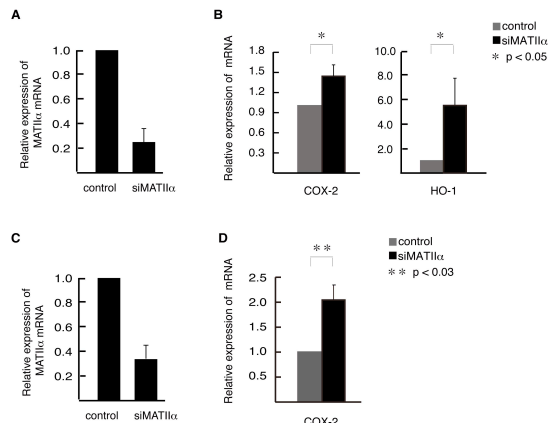


図 2. MATII $\alpha$  ノックダウンによる COX-2 遺伝子の脱抑制化

(3) COX-2 遺伝子制御領域への MATII の動員: COX-2 遺伝子の転写が、MATII によって抑制されていることを、これまでの結果から、iMEF 細胞などで証明した。そこで、COX-2 遺伝子の転写抑制化には、その遺伝子転写制御領域に、MATII が動員されるのか、また、転写因子 MafK とともに動員されるのかを調べることにした。まず、COX-2 遺伝子の転写制御領域を概観してみると、5' DNA 領域で、プロモーターから 1.6 kb 上流に、Maf 結合認識配列 (MARE) が存在することがわかった (図 3A)。次に、COX-2 遺伝子の転写制御領域のうち、この MARE とプロモーター、全く関係のないプロモーターから 3kb 上流の配列に注目して、クロマチン免疫沈降実験 (ChIP) をおこなった。その結果、抗 MATII $\alpha$  抗体による ChIP から、MATII $\alpha$  が MARE とプロモーターに動員された (図 3B)。MATII $\alpha$  と二量体を形成し、機能がわかっていない MATII のサブユニット MATII $\beta$  も、抗 MATII $\beta$  抗体による ChIP から MATII $\alpha$  と同様の結果を示した (図 3C)。さらに、抗 MafK 抗体による ChIP では、MafK は COX-2 遺伝子の MARE へのみ有意に動員されることが明らかになった (図 3D)。これらの結果から、MATII や MafK は、COX-2 遺伝子の MARE に動員され、MATII に限ってはさらに、両サブユニットともにプロモーターにも動員されることが明らかになった。

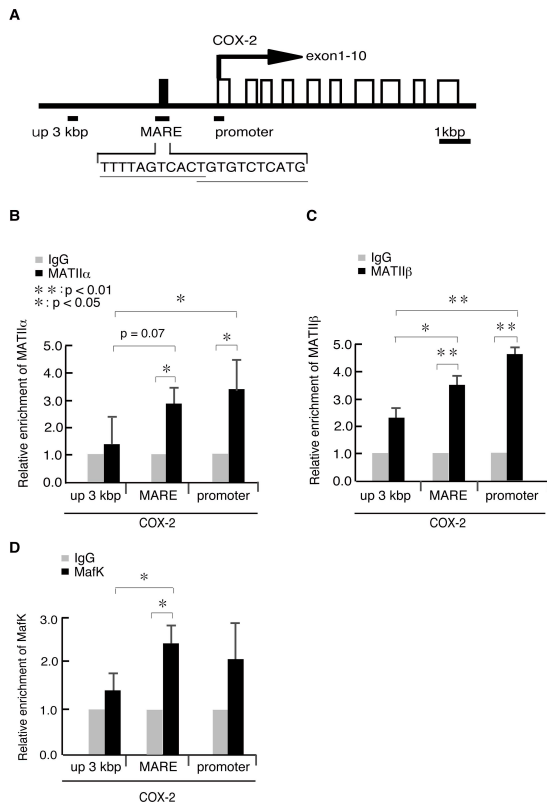


図 3. COX-2 遺伝子領域に動員される MATI1 と MafK

(4) COX-2 遺伝子制御領域のエピゲノム制御: MATI1 が COX-2 遺伝子の転写制御領域に動員されることを明らかにしたことから、MATI1 が COX-2 遺伝子のヒストンのメチル化に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、この可能性を検証するために、コントロールと MATI1α ノックダウン iMEF 細胞における、COX-2 遺伝子制御領域のヒストン H3K9 および K4 のトリメチル化を、抗ヒストン H3K9 または K4 抗体による ChIP 実験から調べた。その結果、ヒストン H3K9 のトリメチル化が、COX-2 遺伝子のプロモーターや、MARE、上流 3 kb 領域の全てにおいて検出され、MATI1α ノックダウンによって低下することが明らかになった (図 4A から 4C)。このことから、MATI1 が MARE だけでなく、遺伝子制御領域全体のヒストン H3K9 のトリメチル化を制御していることを示唆された。一方で、ヒストン H3K4 のトリメチル化は、MATI1α ノックダウンに関わらず有意な変動はなかった (図 4D から 4F)。ヒストン H3K9 のトリメチル化は、一般的に遺伝子の転写を抑制する指標となることから、MATI1α ノックダウンによってヒストン H3K9 のトリメチル化が低下すること、先の結果で示した COX-2 の発現と相関する。そこで、転写活性化の指標となるヒストン H3K9 および K27 のアセチル化についても、それぞれの抗体による ChIP 実験をおこなった。その結果、COX-2

遺伝子のプロモーター領域において、MATI1α ノックダウンによって、ヒストン H3K9 のアセチル化が有意に増加した (図 4G)。ヒストン H3K27 のアセチル化についても増加の傾向がみられ、これらのことから、MATI1 はヒストン H3K9 の脱アセチル化にともなって、メチル化を制御していることが示唆された。

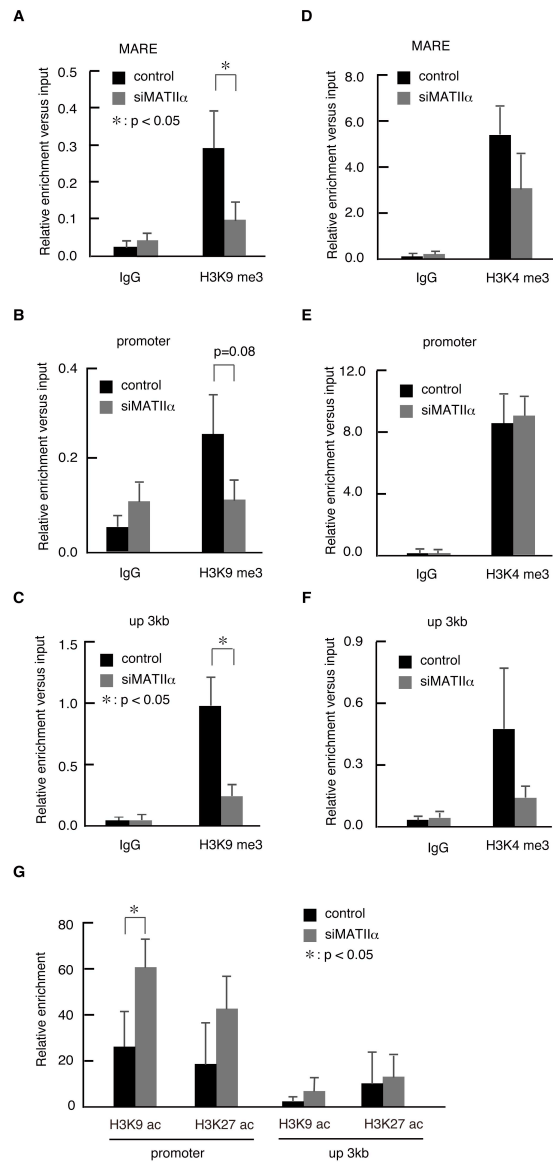


図 4. COX-2 遺伝子領域のヒストン修飾

(5) MATI1 と共役するヒストン H3K9 トリメチル化酵素の同定: MATI1 による COX-2 遺伝子の転写抑制化には、その転写制御領域のヒストン H3K9 トリメチル化が影響をうけることを明らかにしたことから、MATI1 と共役するヒストン H3K9 トリメチル化酵素を同定することを試みた。iMEF 細胞に FLAG とビオチン化配列を融合した MATI1α (FLBio-MATI1α) を安定に発現させ

た(図 5A)。そして、その細胞の核抽出物を用いて、ピオチン-アビジンのプルダウン実験をおこない、MATII と相互作用する可能性のあるヒストン H3K9 トリメチル化酵素のウエスタン解析をおこなった(図 5B)。その結果、MATII  $\alpha$  と相互作用する SETDB1 と Suv39h を同定した。このうち、SETDB1 ノックダウン iMEF 細胞では、コントロールと比較して、MATII 同様に COX-2 遺伝子の発現が増加した(図 6A と 6B)。さらに、SETDB1 の COX-2 遺伝子制御領域への動員も、MARE において有意に検出され、Suv39h の動員ではないことまで明らかになった(図 6C と 6D)。

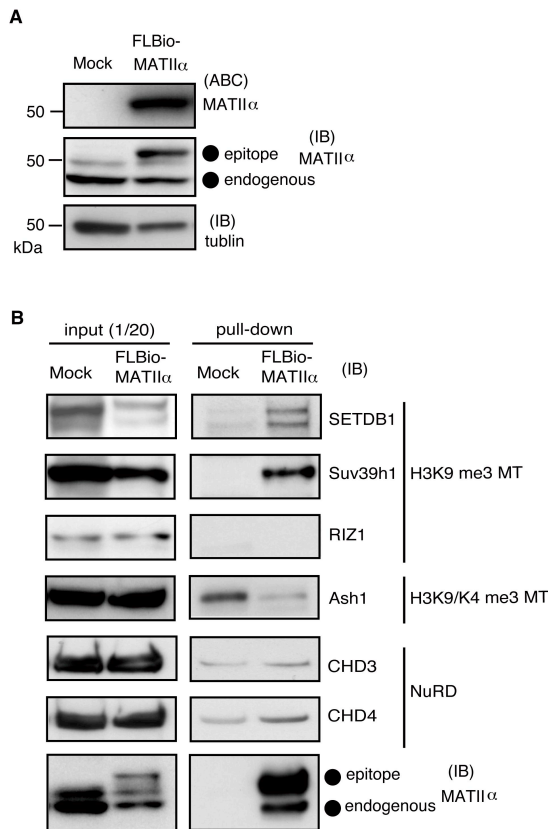


図 5. MATII  $\alpha$  は SETDB1 と相互作用する

(6) 考察と展望: 細胞核内の MATII  $\alpha$  と  $\beta$  から構成される SAMIT (SAM-integrating transcription) 調節モジュールが、転写因子 Bach1-MafK やヒストンメチル基転移酵素と複合体を形成し、ヒストンのメチル化と転写制御を共役させることが提唱されてきた (*Mol. Cell* 41: 554-566, 2011)。しかし、HO-1 遺伝子以外に、このシステムを利用している標的遺伝子はわかっていなかった。また、このシステム寄与し、MATII と特異的に相互作用する、ヒストンメチル基転移酵素も発見されていなかった。そこで、本申請課題では、これらの問題を解明することを試み、その結果、新規の MATII 標的遺伝子として COX-2 遺伝子を同定し、この遺伝子の制御メカニ

ムとして、SAMIT モジュールを介して複合体形成にも寄与する、特異的なヒストンメチル基転移酵素 SETDB1 も同定した。これらの分子メカニズムを図 6E に提唱する。

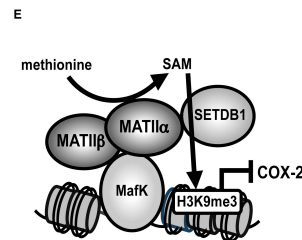
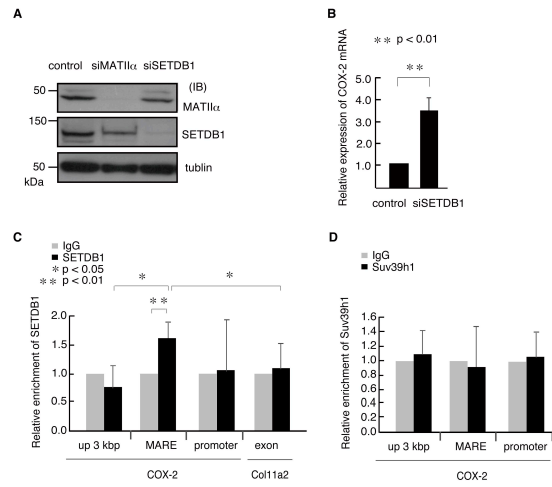


図 6. SETDB1 も COX-2 の転写抑制とエピゲノム制御に関与する

ところが、このモデル図から、まだ今後さらなる解析を必要とする課題がみえてきた。第一に、このモデル図は細胞核内かつ、特異的な標的遺伝子領域に MATII が動員され、ヒストン H3K4 や K9 のトリメチル化が制御され、COX-2 遺伝子の転写が抑制されることを示している。このような制御は、効率的な SAM の供給を可能にし、クロマチン構造やヒストンメチル基転移酵素との相互作用を考慮することになる。一方で、ゲノム全体におけるエピゲノム制御への MATII の関与も示されつつある。この場合、MATII はクロマチン構造やヒストンメチル基転移酵素との相互作用を考慮することなく、SAM を供給していると考えられる。このことは、SETDB1 が、細胞分裂 S 期において、クロマチンに取り込まれていないヒストン H3K9 をトリメチル化できることとも関連する。これらのことから、MATII による、ゲノム全体、または局所的なエピゲノム制御に、分子機構の違いがあるのかどうかを見出す必要がある。第二に、転写因子やヒストンメチル基転移酵素と MATII との物理的な相互作用が、必ずしも標的遺伝子の転写抑制化だけとは限らない点である。コントロールと MATII  $\alpha$  ノックダウン iMEF 細胞の間の DNA マイクロアレイ解析から、MATII  $\alpha$  ノックダウンによって、発現の低下

した遺伝子が見出されている。この点は、これまでに MATII が転写活性化因子とも相互作用することと一致する。また、最近ではクロマチンを制御する6つのモジュールが存在し、その一つに SETDB1 が含まれ、それらのモジュールが一体となって、転写を活性化したり抑制化したりすることが報告されている。もしかすると、MATII もこれらのモジュールのひとつとして構成されるかもしれない。

#### 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3件)

(1) Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K.

Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J Biol Chem.* 2013; 288: 13592-13601. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M112.429738

(2) Igarashi K., and Katoh Y.

Metabolic Aspects of Epigenome: Coupling of S-Adenosylmethionine Synthesis and Gene Regulation on Chromatin by SAMIT Module. *Subcell. Biochem.* 2012; 61: 105-118.

査読有

DOI: 10.1007/978-94-007-4525-4\_5.

(3) 加藤 恭丈, 五十嵐 和彦

エピゲノム系の代謝的側面をS-アデノシルメチオニンから考える, 実験医学, 2011; 29(14): 2241-2245. 査読無

<http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku>

[学会発表] (計9件)

① 加藤 恭丈、石山 駿、森野 杏子、楨野 絵里子、五十嵐 和彦「メチオニンアデノシル転移酵素 (MATII) の細胞内局在とその制御機構」第35回 日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012年12月11~14日

② 解良 洋平、加藤 恭丈、太田 嶺人、松本 光代、山本-高野 照子、五十嵐 和彦「メチオニン・アデノシル転移酵素 (MATII) によるエピジェネティックなCOX-2遺伝子発現制御機構」第35回 日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012年12月11~14日

③ 加藤 恭丈、石山 駿、森野 杏子、楨野 絵里子、五十嵐 和彦「メチオニンアデノシル転移酵素 (MATII) の細胞内局在とその制御機構」「転写代謝システム」平成24年度班会議、つくばグランドホテル 2012年7月2~4日

④ Igarashi K, Kera Y, Katoh Y. MafK-dependent and independent nuclear functions of methionine adenosyltransferase II and SAMIT module in gene expression. MBSJ2011, December 16th 2011, pacifico Yokohama, Yokohama, JAPAN

⑤ Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Yamamoto-Takano T, Igarashi K. Methionine adenosyltransferase (MATII) -dependent writing of histone H3K9 methylation and expression of Cox2 gene. MBSJ2011, December 16th 2011, pacifico Yokohama, Yokohama, JAPAN

⑥ Katoh Y, Morino K, Kera Y, Ohta M, Igarashi K. SAMIT module for coupling of S-adenosyl-L-methionine synthesis and chromatin regulation. MBSJ2011, December 14th 2011, pacifico Yokohama, Yokohama, JAPAN

⑦ 五十嵐 和彦、解良 洋平、森野 杏子、加藤 恭丈 SAMIT 核内モジュールによる SAM 合成とヒストンメチル化の共役 第84回日本生化学会大会 (シンポジウム発表), 京都, 2011年9月22日

⑧ Katoh Y, Kera Y, Ohta M, Morino K, Igarashi K. Epigenetic regulation by SAMIT module containing methionine adenosyltransferase II. CSHL meeting of mechanisms of eukaryotic transcription. August 30<sup>th</sup> -September 3<sup>rd</sup>, 2011 Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

⑨ 加藤 恭丈 転写因子による転写調節とエピゲノム制御の共役機構 日本生化学会東北支部 第77回例会・シンポジウム(生化学東北支部奨励賞受賞講演), 仙台, 2011年7月23日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他] 研究室ホームページ

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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 恭丈 (KATOH YASUTAKE)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号: 40397914