

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31日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790364

研究課題名（和文）ヒストンメチル化酵素 SETDB1 を標的とした抗肥満薬開発のための基盤研究

研究課題名（英文）Functional analysis of the histone methyltransferase SETDB1

研究代表者

橋 敬祐 (TACHIBANA KEISUKE)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30432446

研究成果の概要（和文）：ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の構造と機能の関係を明らかにするため、SETDB1 の酵素活性を有する領域を解析した。その結果、SETDB1 の酵素活性には SET ドメインに加えさらに上流の領域が必要であることを明らかにした。次に、SETDB1 の翻訳後修飾を解析した結果、SET ドメインの複数のアミノ酸残基がリン酸化を受けることを明らかにした。最後に、SETDB1 の複合体を質量分析により解析した結果、SETDB1 と相互作用する因子として MCAF1 を同定した。

研究成果の概要（英文）：To analyze the function of SETDB1, we generated plasmids to express SETDB1 proteins of various sizes. The plasmids were expressed in Sf9 cells and purified. A histone methyltransferase assay using purified SETDB1 revealed that SETDB1 requires not only the SET domain, but also the N-terminal region of the SET domain for full enzymatic activity in vitro. We also identified that the SET domain of SETDB1 was phosphorylated. In addition, immunoprecipitation experiments revealed that SETDB1 was associated with MCAF1.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：代謝異常学、SETDB1、ヒストンメチル化酵素、相互作用解析、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化に伴い、肥満を基盤とする糖尿病、高脂血症などの発症率の増加が問題となっている。このことから、肥満発症の詳細なメカニズムを解明し、治療方法を確立することが急務である。近年、ヒストン3の9番目のリジン残基（H3K9）のメチル化状態を亢進させたマウスが肥満を呈することが報告され、エピゲノムの修飾状態の変化が肥満発症に深く関わっていることが示された。すなわち、H3K9 のメチル化を制御することで、肥満を抑制できる可能性が考えられた。しかし、ヒストンメチル化による肥満発症の分子メカニズムは明らかになっていない。

SETDB1 は、H3K9 のメチル化に関わるヒストンメチル化酵素の一種である。これまでに、SETDB1 は脂肪細胞の分化に関わることが報告されており、肥満発症に重要な役割を担っていることが示唆されている。しかしながら、その機能は完全には明らかにされていない。そこで本研究では、ヒストンメチル化によるエピゲノムの変化を介した肥満発症の分子メカニズムを解明するために、SETDB1 の機能を解析することにした。

2. 研究の目的

(1) SETDB1 の構造と活性の相関の解析

SETDB1 は 1291 アミノ酸残基からなるタ

ンパク質であるが、他のヒストンメチル化酵素と異なり、酵素活性に重要な SET ドメインに約 350 アミノ酸残基からなるインサージョン領域が挿入され二つに分断された、非常にユニークなタンパク質である (図 1)。しかしながら、その構造は明らかにされていない。そこで SETDB1 の構造を解析するために、タンパク質を発現・精製するための条件検討を行う。また、構造解析する領域を決定するため、酵素活性に必要な領域を同定する。

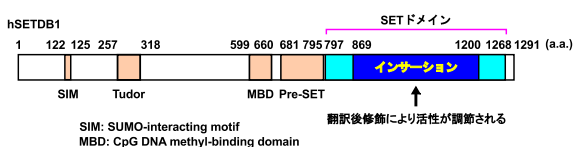


図 1 SETDB1 の二次構造

(2) SETDB1 の翻訳後修飾の解析

SETDB1 のインサージョン領域が翻訳後修飾を受けること、またその翻訳後修飾により活性が変化することが報告されている。このように、SETDB1 の機能を明らかにする上で、翻訳後修飾を解析することは非常に重要である。そこで、SETDB1 タンパク質を精製し、質量分析装置を用いて網羅的な翻訳後修飾の解析を行う。

(3) SETDB1 の複合体解析

SETDB1 は単独では DNA への結合能が無く、他の因子との相互作用を介してゲノム上にリクルートされ、ヒストンのメチル化を行い遺伝子の発現を制御している。従って、SETDB1 は複合体として機能を発揮すると考えられ、その複合体を明らかにすることは重要である。そこで、SETDB1 と相互作用する分子の同定を試み、SETDB1 の機能制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) SETDB1 タンパク質の精製とヒストンメチル化酵素活性の測定

N 末端側に GST タグを付加した全長、または、N 末端側を順次欠失させた SETDB1 タンパク質の発現ベクターを作製する。作製したベクターを用いて、各種 SETDB1 タンパク質を昆虫由来 Sf9 細胞に発現させる。細胞を溶解し、グルタチオンセファロースビーズを用いて SETDB1 タンパク質を精製する。得られる SETDB1 タンパク質とヒストン H3/H4 タンパク質、および、¹⁴C で標識したメチル基供与体を混合し、放射活性により ¹⁴C 標識メチル基がヒストンに転移されるか否かを測定することで、ヒストンメチル化酵素活性を解析する。

(2) SETDB1 タンパク質の翻訳後修飾の解析

精製した SETDB1 の SET ドメインのみの欠失変異体のタンパク質の翻訳後修飾の状態を、質量分析装置を用いて解析する。

(3) SETDB1 と相互作用する因子の解析

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞の抽出液と、申請者が作製した抗 SETDB1 抗体を用いて免疫沈降実験を行う。その際、コントロールとして normal mouse IgG を用いる。回収したサンプルを SDS-PAGE により分離し、銀染色を行う。コントロールを対照として、抗体を用いた時に認められるバンドを切り出し回収する。回収したバンドに含まれるタンパク質を質量分析により解析し、相互作用因子として同定する。

4. 研究成果

(1) SETDB1 の構造と機能の相関を明らかにするために、まず、今回用いる発現系により得られるタンパク質がヒストンメチル化酵素活性を有するか否かを検討した。N 末端側に GST タグを付加した全長の SETDB1 タンパク質を発現・精製し、ヒストンメチル化酵素活性を測定した。その結果、メチル化されたヒストンが検出された。すなわち、昆虫由来 Sf9 細胞を用いることで、ヒストンメチル化酵素活性を持つ SETDB1 タンパク質を得ることに成功した。

次に、SETDB1 のどの領域が酵素活性に必要であるかを明らかにするために、N 末端側を順次欠失させた様々な SETDB1 タンパク質を精製し、ヒストンメチル化酵素活性を測定した。その結果、SET ドメインのみの欠失変異体には活性が認められなかったが、SET ドメインに加えてさらに N 末端側の領域を含む欠失変異体は活性を有していた (図 2)。従って、この領域がヒストンメチル化酵素活性に重要であることが明らかになった。

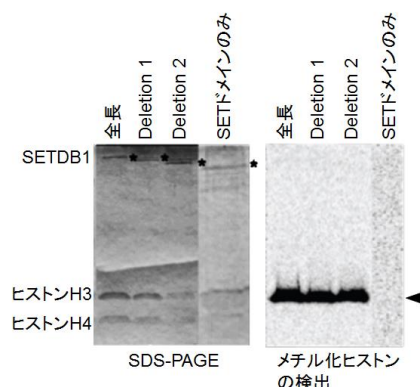


図 2 SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性

他のヒストンメチル化酵素 G9a は、SET ド

メインのみでも活性を持つことが報告されている。今回得られた結果は、SETDB1のSETドメインによる構造と活性の相関が、G9aとは異なっている可能性を示唆しており非常に興味深い結果である。現在、活性を持つ欠失変異体を用いてさらなる解析を進めている。

(2) SETDB1の翻訳後修飾による機能制御機構を明らかにするために、酵素活性に重要なSETドメインの翻訳後修飾を解析した。SETDB1のSETドメインのみのタンパク質を精製し、質量分析装置を用いて翻訳後修飾を解析した。その結果、少なくとも5つのセリン残基、および、1つのスレオニン残基がリン酸化修飾を受けることを明らかにした。

これまでに、大腸菌を用いて発現させたSETDB1タンパク質にはヒストンメチル化酵素活性が無いことが報告されている。大腸菌で発現させたタンパク質には翻訳後修飾が施されないことから、今回同定したアミノ酸残基のリン酸化が酵素活性に重要である可能性が考えられる。今後、リン酸化を受けるアミノ酸残基に変異を導入し、酵素活性を解析することで、翻訳後修飾によるSETDB1の機能制御メカニズムを明らかにできる可能性があり、本結果は非常に興味深いと考えられる。

(3) SETDB1の機能を制御する因子を明らかにするために、SETDB1の複合体解析を行った。まず、HEK293細胞の抽出液を作製し、申請者が作製したSETDB1に対するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降実験の条件検討を行った。次に、決定した条件に従いHEK293細胞を用いて免疫沈降実験を行い、SETDB1の複合体を回収した。得られたサンプルをSDS-PAGEを行い分離し、銀染色を行った。コントロール抗体を用いた時と比較して、抗SETDB1抗体を用いた時に認められるバンドを回収し、得られた分子を質量分析により同定した(図3)。その結果、SETDB1と特異的に結合する因子としてヘテロクロマチン形成に関わるMCAF1を同定した。

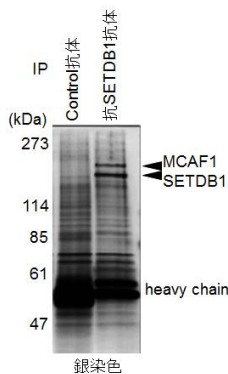


図3 SETDB1の複合体解析

MCAF1は、SETDB1のヒストンメチル化酵素活性をジメチル化からトリメチル化に変化させることが知られており、SETDB1の機能を明らかにする上で鍵となる相互作用因子である。今後、SETDB1とMCAF1の結合様式を詳細に解析することで、SETDB1の機能制御の分子機構を解明できると考えられる。

以上、本研究で得られた成果をもとに研究を進展させ、SETDB1の構造と機能の関連を明らかにすることで、SETDB1の酵素活性を制御するメカニズムの解明が期待できる。

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2件)

① K. Tachibana, K. Takeuchi, H. Inada, K. Sugimoto, K. Ishimoto, M. Yamashita, T. Maegawa, D. Yamasaki, S. Osada, T. Tanaka, H. Rakugi, T. Hamakubo, J. Sakai, T. Kodama, T. Doi, Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) via a peroxisome proliferator responsive element, *J Biochem*, (2013), doi: 10.1093/jb/mvt050, in press, 査読有

② D. Yamasaki, N. Kawabe, H. Nakamura, K. Tachibana, K. Ishimoto, T. Tanaka, H. Aburatani, J. Sakai, T. Hamakubo, T. Kodama, T. Doi, Fenofibrate suppresses growth of the human hepatocellular carcinoma cell via PPAR α -independent mechanisms, *Eur J Cell Biol*, 90, 657-664 (2011), 査読有

[学会発表] (計16件)

① 藤田泰聖, 樋野展正, 上原光太郎, 前川貴志, 熊谷文子, 石本憲司, 樋敬祐, 土井健史, 核内受容体PPAR δ の恒常的転写活性化領域への結合因子の解析, 日本薬学会 第133年会, 2013年3月28日, 横浜

② 熊谷文子, 石本憲司, 河井恵, 樋敬祐, 川村猛, 田中十志也, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史, 脂質代謝調節因子Lipin1タンパク質の分解制御機構の解析, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月12日, 福岡

③ 高野友希, 秋山恵麻, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 樋敬祐, 土井健史, 太田壮一, 臭素化ビスフェノールAのファミリー化合物が有する脂肪細胞分化作用, 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012年10月20日, 兵庫

- ④長和潤也, 秋山恵麻, 大西航平, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 橘敬祐, 土井健史, 太田壯一, 難燃剤テトラプロモビスフェノールA連続曝露による肝脂質代謝攪乱機構, 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012年10月20日, 兵庫
- ⑤橘敬祐, 竹内健太郎, 稲田大彦, 杉本研, 石本憲司, 田中十志也, 柴木宏実, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 沢村達也, 土井健史, ヒト核内受容体 PPAR α による生体防御レクチン MBL2 の発現制御機構の解析, 第121回日本薬理学会近畿部会, 2012年6月29日, 徳島
- ⑥橘敬祐, 上原光太郎, 前川貴志, 熊谷文子, 藤田泰聖, 樋野展正, 山下雅礼, 秋山恵麻, 谷本恵一, 石本憲司, 山崎大典, 川村猛, 田中十志也, 酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, 核内レセプターPPARdelta の翻訳後修飾と相互作用因子による転写制御機構の解明, 日光シンポジウム, 2011年12月17日, 栃木
- ⑦山下雅礼, 橘敬祐, 杉本研, 秋山恵麻, 石本憲司, 山崎大典, 岩成宏子, 田中十志也, 望月康弘, 柴木宏実, 酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, 転写制御因子を介したミトコンドリアの脂肪酸酸化制御の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜
- ⑧河井恵, 石本憲司, 橘敬祐, 山崎大典, 川村猛, 田中十志也, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史, 脂質代謝因子 Lipin1 の細胞内局在を制御する相互作用因子の探索, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14日, 横浜
- ⑨ E. Gotoh, K. Tachibana, Y. Uchihara, N. Kawamata, K. Ishimoto, D. Yamasaki, T. Doi, Protein purification and generation of antibody for structure analysis of SETDB1, The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011年11月23日, 大阪
- ⑩ K. Tachibana, K. Uehara, T. Maegawa, M. Yamashita, F. Kumagai, T. Fujita, K. Ishimoto, D. Yamasaki, T. Doi, Functional analysis of the roles of posttranslational modification of PPAR delta in regulating transcriptional activity, The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011年11月23日, 大阪
- ⑪ K. Ishimoto, M. Kawai, K. Tachibana, D. Yamasaki, T. Doi, Global proteomic analysis of lipin 1 involved in lipid metabolism, The 4th Global COE International Symposium on Physiome and Systems Biology for Integrated Life Sciences and Predictive Medicine, 2011年11月23日, 大阪
- ⑫ 石本憲司, 中村太樹, 河井恵, 橘敬祐, 土井健史, 肥満解消を目指した Lipin1 遺伝子の発現制御機構の解明, 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011年10月22日, 神戸
- ⑬ 元村友香, 秋山恵麻, 長和潤也, 平林祥匡, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 橘敬祐, 土井健史, 太田壯一, 臭素系難燃剤 TBBPA の糖・脂質代謝系への毒性影響, 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011年10月22日, 神戸
- ⑭ 櫻井浩壽, 秋山恵麻, 松本幸治, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 橘敬祐, 土井健史, 太田壯一, 置換臭素数の異なるビスフェノール系化合物が示す PPAR 活性, 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011年10月22日, 神戸
- ⑮ 後藤英子, 橘敬祐, 内原佳恵, 川又那津子, 石本憲司, 岩成宏子, 川村猛, 望月康弘, 酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の細胞内局在の解析, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日, 京都
- ⑯ 橘敬祐, 後藤英子, 内原佳恵, 川又那津子, 石本憲司, 山崎大典, 岩成宏子, 望月康弘, 酒井寿郎, 浜窪隆雄, 児玉龍彦, 土井健史, ヒストンメチル化酵素 SETDB1 はメチル基供与体 SAM の輸送体になり得るか?, 第6回 トランスポーター研究会, 2011年6月11日, 仙台

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘 敬祐 (TACHIBANA KEISUKE)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30432446