

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25640098
 研究課題名(和文)新概念「ヒストンマルチ化学修飾酵素による転写制御」の提唱

研究課題名(英文)Multiple functions of histone demethylases

研究代表者

稲垣 毅 (Inagaki, Takeshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：10507825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：JmjCドメインを持つタンパク質はヒストン脱メチル化酵素として働き、遺伝子発現を制御することが知られている。本研究では、これらのタンパク質が単一のヒストン修飾にのみ関与するのではなく、複数の機構を介して働くという仮説のもとに研究を行った。その結果、ヒストン脱メチル化酵素が酵素活性とは独立して遺伝子発現を制御する新規の機構を解明した。ヒストン脱メチル化酵素は細胞内において種々のタンパク質群と結合する足場タンパクとして働き、ヒストンのアセチル化という異なるヒストンマークを変化させることや、クロマチン構造の変化をひきおこすことで遺伝子発現を変化させるという新たな転写制御機構の概念を提示した。

研究成果の概要(英文)：JmjC domain is a demethylase signature motif and most of JmjC-containing-proteins work as histone demethylase. However, in this study, we demonstrated that JmjC-containing proteins also play non-enzymatic roles. Shotgun proteomic analysis using HeLa cells showed that JMJD1A binds to SIN3A complex including ARID1A and histone deacetylase (HDAC) 1. HDAC activity was induced by repressing Jmjd1a expression in multiple cell lines. Based on these findings, we speculated that JmjC-containing-proteins play non-enzymatic roles by forming functional complex to regulate gene expression. This notion is supported by our two findings that JMJD1A regulates chromatin dynamics by forming complex with SWI/SNF and PPAR in brown adipocytes and that FBXL10 regulates white adipocyte differentiation by forming a novel polycomb repressive complex including RING1B, BCOR, and SKP1. In addition, our data suggested that JMJD1A regulates the expression of long non-coding RNA.

研究分野：生物学

キーワード：ヒストン修飾酵素 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A 複合体形成 HDAC 転写 FBXL10

1. 研究開始当初の背景

細胞核内にある標的遺伝子ゲノムはヒストンに巻き取られたのちにクロマチンを形成することでコンパクトに収納されているため、特異的なゲノム領域が転写を受けるためにはクロマチン構造の変化やエフェクター分子のリクルートメントなどのエピゲノム変化が必要である。エピゲノム制御機構にはDNAのメチル化やヒストン修飾、クロマチン構造制御因子やノンコーディングRNAを介した機構などが関与する。ヒストン修飾には種々の修飾が知られている(リン酸化やアセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO化、ADPリボシル化、N-アセチルグルコサミン化など)。そのなかでヒストンのメチル化修飾は細胞内で化学的に安定した状態であると考えられていたため、2004年にLysine-specific demethylase 1(Lsd1)が発見されるまでヒストンの脱メチル化酵素の存在自体が不明であった。その後、2006年にJmJcドメインを持つ一群が、ヒストン脱メチル化酵素であることが報告がされたことをきっかけとしてヒストン脱メチル化酵素の探索競争が起こり、その同定が進んだ。これらの同定されたヒストン脱メチル化酵素は、標的とするヒストン修飾を変化させるといふ単一の機能に注目して多くの研究がなされてきた。

2. 研究の目的

ヒストン修飾酵素は「ヒストンの化学修飾を制御することで転写を調節する」という単一の機能に注目して理解がなされてきたが、我々はヒストン脱メチル化酵素であるJMJD1A(KDM3A、JHDM2A)やFBXL10(KDM2B、JHDM1B)に注目して研究を進めるうちに、ヒストン脱メチル化を介した制御以外の転写制御機構があるのではないかとの仮説をもった。そこで、本研究課題では酵素活性を介さないヒストン脱メチル化酵素の作用機序について検討し、ヒストン化学修飾酵素のマルチファンクションという新規の概念を呈示することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 独自に作製した抗ヒトJMJD1A抗体を用いてJMJD1Aに結合するタンパク質のショットガンプロテオミクス解析を行った。JMJD1Aタンパク質は全長1321アミノ酸からなるが、本研究では全長ヒトJMJD1Aタンパク質を抗原として作製したN端600アミノ酸(a.a.)を認識する抗体(IgG-F0006, IgG-F0007, IgGF0026)もしくは、C端a.a.489からa.a.1321を抗原として作製した抗体(IgG-F1615, IgG-F1624, IgG-F1628)を用いた。抗体と磁性ビーズ(invitrogen 100.04D)を混じたのち、0.01% Tween20を含む洗浄バッファーで洗浄し、200mM トリエタノールアミン存在下で20mM DMPを用いて抗体と磁性ビーズの架橋を行った。10 cm プレ

ート10枚分のHeLa細胞を用意し、50 U/mlのベンゾネース(Novagen, 70644-3)で処理したのち、遠心して上清を回収し、細胞抽出液とした。この細胞抽出液と前述の磁性ビーズ架橋抗体を混じて4℃の条件で4時間転倒混和し、免疫沈降を行った。ビーズの洗浄後、0.1%ラビジエクトを用いて60℃、30分間処理することで目的のタンパク質を溶出した。その後、10%トリクロロ酢酸を用いてタンパク沈殿を行い、LC/MS質量分析器にかけることでショットガンプロテオミクス解析を行った。そのほかの手法として、SDS-PAGEゲルに展開したのちに切り出し法によるin-gel digestionを行い、LC/MS質量分析に供した。尚、FBXL10のプロテオミクス解析では、V5抗体をもちいてV5タグ結合強制発現FBXL10タンパク質を抗免疫沈降した(Inagaki T. et al JBC 2015)。

(2) 免疫沈降後のSDS-PAGEゲル泳動およびイムノブロット法は既報の通り行った(Inagaki T. et al JBC 2015)。抗体は以下のものを使用した。抗Sin3A(santa cruz, sc-994X)、抗Sin3A(Abcam, Ab3479)、抗ARID4A(Millipore, 05-563)。Sin3aおよびArid1aに対するsiRNAはinvitrogen社のものを使用した。

(3) ヒストン脱アセチル化活性は、Cayman社のCell based HDAC activityキット(600150)を用いて実施した。本キットでは、Boc-Lys(AC)-AMC(N- α -(t-Butoxycarbonyl)-N- ϵ -acetyl-L-lysine7-amido-4-methylcoumarin)を基質として用いている。Jmjd1aKOマウス及び野生型マウスの胎児(E13.5)からmouse embryonic fibroblast(MEF)を作製し、sv40発現レトロウィルスに感染させることで不死化した細胞を作製して使用した。そのほか、レトロウィルスを用いてmCAT HeLa細胞にshJMJD1Aを強制発現した細胞を準備して用いた。HDAC活性の検討は、培養プレート上で直接反応させる方法もしくは核抽出液を抽出したアッセイ方法を実施した。

(4) クロマチン免疫沈降法は、ホルムアルデヒドでDNAとヒストンタンパク質の架橋反応をおこなったのち、超音波破碎により断片化したものを使用した。最終濃度1%のホルムアルデヒドを添加し、室温で10分間振とうさせ、架橋反応を行った。SDS存在下で超音波細胞破碎機SONIFIER 250 Advance(BRANSON)をもちいて超音波破碎をおこない、得られた細胞破碎液を遠心して全画分を回収し免疫沈降に用いた。磁気ビーズに各抗体H3K9me1, me2, me3, H3K4me3抗体(大阪大学木村宏先生より分与)を加え、細胞抽出液と4℃で一晩転倒混和したのち洗浄し、脱架橋後にDNAの回収、定量を行った。精製したDNAは、アコースティックソルビライザー(コバリス社)を用いて約200bpのサイズに断片化する

ことでサイズを揃えたのち、バイオアナライザー電気泳動（アジレントテクノロジー社）を用いて断片化サイズの確認をおこなった。次世代シーケンサーに用いるサンプルを作製するために、断片化した DNA サンプルの末端にアダプターを付加した。得られた DNA サンプルは Solexa Genome Analyzer II (Illumina) を用いてシーケンシングを行ったのち、Pipeline software v1.4 (Illumina) を用いて 36bp のシングルエンドをマウスゲノム、NCBI Build 37 (UCSC mm9) でマッピングを行った。

(5) RNA シークエンスに用いるサンプルは以下のように調製した。Jmjd1a KO および WT MEF 細胞由来の total RNA 1 μg を TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina) を付属のプロトコルに基づいて抽出した。詳細には、total RNA から poly-T オリゴ結合磁気ビーズを用いて poly-A を含む mRNA を精製し、mRNA を小さく断片化したのち、逆転写酵素とランダムプライマーを用いて 1st strand cDNA を合成した。続いて DNA ポリメラーゼ I と RNaseH を用いて 2nd strand cDNA を合成した。この cDNA 断片に対して末端修復処理、アデニン塩基の付加、アダプターのライゲーションを行い、最後に PCR により増幅して cDNA ライブラリーを準備し、ゲノムシーケンサーを用いて RNA シークエンスをおこなった。ライブラリーの確認は、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) でサンプルのサイズと純度を確認することで行った。サンプルのゲノムシーケンシングは HiSeq (Illumina) を用いて行った。RT-qPCR 法は既報のとおり行った (Inagaki T. et al. JBC 2015)。

4. 研究成果

(1) JmJc ドメインを持つ JMJD1A がヒストン脱メチル化酵素としての働きを持つ可能性と機序について検討するために JMJD1A のプロテオミクス解析を行ったところ、JMJD1A が HeLa 細胞において SIN3A、ARID4A といった SIN3A 複合体を形成していた (図 1)。この結合は JMJD1A の C 端部分を抗原とする抗体でのみ認められた。その原因として、SIN3A 複合体が JMJD1A の C 端に結合するか、もしくは N 端認識抗体によって結合が阻害される可能性が考えられた。

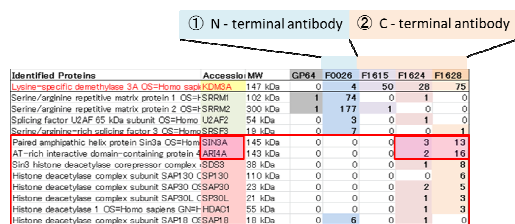
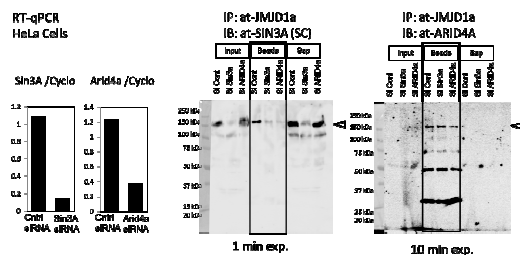


図1 JMJD1AはSIN3A複合体と結合する

(2) SIN3A、ARID4A と JMJD1A の直接的な結

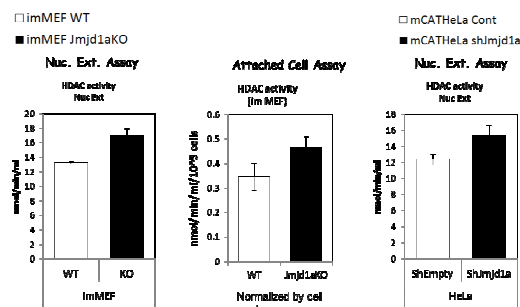
合関係性を検討するために siRNA を用いて Sin3a もしくは Arid1a をノックダウンした細胞を用いて免疫沈降後のイムプロット法を行った。その結果、Sin3a をノックダウンした細胞では JMJD1A と ARID1A の結合が認められたのに対し、Arid1a をノックダウンした細胞では JMJD1A と SIN3A との結合は認められなかった (図 2)。このことから、JMJD1A と SIN3A の結合には ARID1A が必要であることが明らかになった。

図2 ARID4AはJMJD1AとSIN3Aの結合に必要である



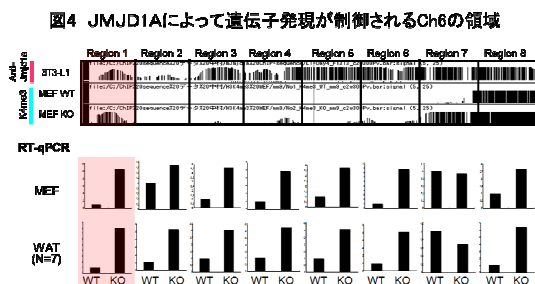
(3) 今回、JMJD1A が結合するタンパク質として SIN3A および ARID1A をはじめとする SIN3A 複合体タンパク質群が同定され、HDAC1 との結合を認めた。そこで、JMJD1A がヒストン脱メチル化能に与える影響を検討した。JMJD1A ノックアウトマウスから作製した不死化マウス胎児繊維芽細胞をもちいてヒストン脱アセチル化活性を測定した結果、JMJD1A ノックアウトマウス由来のマウス胎児繊維芽細胞からの核抽出液を用いた検討および接着細胞を用いた検討の両方において、ヒストン脱アセチル化活性が 20-30% 増強していた (図 3)。同様の結果は、shRNA をもちいて Jmjd1a 発現をノックダウンした mCAT HeLa 細胞においても認められた。このことから、内因性の JMJD1A がヒストン脱アセチル化活性を抑制することが明らかになった。

図3 JMJD1a発現はHDAC活性に影響する



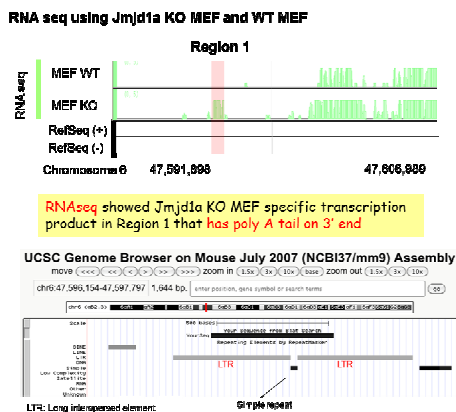
(4) JMJD1A の標的遺伝子を解析する目的で ChIP シークエンス解析と遺伝子発現解析を行った。ChIP シークエンスの結果、Jmjd1a KO MEF 特異的に H3K9me1, me2, me3, H3K4me3 抗体全てで濃縮が認められ、さらに 3T3-L1 細胞における検討で mJmjd1a の濃縮が一致して得られた領域 (Ch6 47596720-47601590) を発見した。同領域における RNA の発現量を検討するため、この 4800bp の領域を約 600bp ずつ

の8領域 (Region 1- Region 8) に分け、それぞれの領域に一箇所ずつ約 150 bp を増幅する RT-qPCR 法用のプライマーを設計し、Jmjd1a KO および WT マウスの MEF、白色脂肪組織 (WAT)、褐色脂肪組織 (BAT)、肝臓、大腿四頭筋 (quadriceps femoris) について定量的 RT-PCR を行った。その結果、Region 1 における転写産物の発現は、Jmjd1a KO マウスから得られる MEF において、WT の 10 倍、WAT において WT の 8 倍、肝臓において WT の 7 倍であった (図 4)。



(5) RNA シークエンスの結果、前述の Region 1 において、Jmjd1a KO MEF 特異的にみられるシングルピークを認めた。Region 2 から Region 8 の領域においても、Region 7 を除いて Jmjd1a KO MEF と WT MEF のピークの差が認められたが、2 群間の差は Region 1 において最も顕著であった。RefSeq 上ではこの領域に既知の遺伝子を認めない事から、Region 1 の転写産物は non-coding RNA (nc RNA) である可能性が考えられた。5' RACE 法で得られたこの遺伝子領域の転写産物は 550bp であり、long-non coding RNA のクライテリア (200bp 以上) に当てはまるものであった。今回、Region 1 遺伝子領域における特徴を検討するために、UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>) をもちいて解析を行った結果、Lnc-R Region 1 の領域が RMER12B という LTR 型のレトロトランスポゾンと重なることを見出された。

図5 Region 1にコードされるLong noncoding RNA



(6) 褐色脂肪細胞系においては、JMJD1A がイソプロテレノール刺激によってリン酸化を受けることでクロマチン再構成複合体と結合していることを見出した。また、この複合

体形成により ChIP シークエンスと 3C アッセイの結果、エンハンサーとプロモーターの近接関係を制御することで転写を制御する機構が示された。これらの結果から、JMJD1A がヒストン脱メチル化を介さない遺伝子発現制御機構を担うことが示された (Abe et al. Nature Commun. 2015)。また、白色脂肪細胞系 3T3-L1 細胞では、JmJc ドメイン含有タンパク質である Fblx10 が SKP1、BCOR、PCGF1、RING1B といったタンパクとともに Polycomb repressive complex 1 (PRC1) 複合体を構成して遺伝子発現を抑制することが明らかになった (Inagaki T. et al. JBC 2015)。

(7) 以上のように、ヒストン脱メチル化酵素が、酵素活性とは独立して遺伝子発現を制御する複数の機構を提示した。ヒストン脱メチル化酵素は細胞内において種々のタンパク質群と結合する足場タンパクとして働き、ヒストンアセチル化という異なるヒストンマークを変化させることや、クロマチン構造の再構成をひき起こすことで遺伝子発現を変化させるという新たな転写制御機構の概念を提示した。

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 7 件)

- 1) Inagaki T., Sakai J, Kajimura S.* (2016) Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipocyte cell fate and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* In press 査読有
- 2) Matsumura Y., Nakaki R., Inagaki T., Yoshida A., Kano Y., Kimura H., Tanaka T., Tsutsumi S., Nakao M., Doi T., Fukami K., Osborne T.F., Kodama T., Aburatani H., Sakai J. (2015) H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific DNA methylation pauses adipocyte differentiation. *Molecular Cell* 60, 584-596. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.025 査読有
- 3) Inagaki T.* (2015) Research perspectives on the regulation and physiological functions of FGF21 and its association with NAFLD. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6: 147 (*Corresponding author) doi: 10.3389/fendo.2015.00147 査読有

- 4) Abe Y., Rozqie R., Matsumura Y., Kawamura T., Nakaki R., Tsurutani Y., Tanimura-Inagaki K., Shiono A., Magoori K., Nakamura K., Ogi S., Kajimura S., Kimura H., Tanaka T., Fukami K., Osborne T.F., Kodama T., Aburatani H., Inagaki T.*, Sakai J.* (2015) JMJD1A is a signal-sensing scaffold that regulates acute chromatin dynamics via SWI/SNF association for thermogenesis. *Nature Communications* 7:6:7052 (*Corresponding author) doi:10.1038/ncomms8052
査読有
- 5) Inagaki T.*, Iwasaki S., Matsumura Y., Kawamura T., Tanaka T., Abe Y., Yamasaki A., Tsurutani Y., Yoshida A., Chikaoka Y., Nakamura K., Magoori K., Nakaki R., Osborne T.F., Fukami K., Aburatani H., Kodama T., Sakai J.* (2015). The FBXL10/KDM2B scaffolding protein associates with novel polycomb repressive complex-1 to regulate adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 290(7):4163-77 (*Corresponding author) doi: 10.1074/jbc.M114.626929
査読有
- 6) Raza-Iqbal S., Tanaka T., Anai M., Inagaki T., Matsumura Y., Ikeda K., Taguchi A., Gonzalez F. J., Sakai J., Kodama T. (2015) Transcriptome Analysis of K-877 (a Novel Selective PPAR α Modulator (SPPARM α))-Regulated Genes in Primary Human Hepatocytes and the Mouse Liver. *J Atheroscler Thromb.* 22(8):754-72 doi.org/10.5551/jat.28720
査読有
- 7) Tanaka T., Tahara-Hanaoka S., Nabekura T., Ikeda K., Jiang S., Tsutsumi S., Inagaki T., Magoori K., Higurashi T., Takahashi H., Tachibana K., Tsurutani Y., Raza S., Anai M., Minami T., Wada Y., Yokote K., Doi T., Hamakubo T., Auwerx J., Gonzalez F. J., Nakajima A., Aburatani H., Naito M., Shibuya A., Kodama T., Sakai J. (2014). PPAR beta/delta activation of CD300a controls intestinal immunity. *Scientific Reports* 24:4:5412 doi:10.1038/srep05412
査読有
- 1) 稲垣 毅、阿部陽平、Rozqie Royhan、松村欣宏、岩崎聡、梶村真吾、田中十志也、児玉龍彦、油谷浩幸、酒井寿郎 ヒストン修飾酵素による脂肪細胞制御 第59回日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演、シンポジウム)、2016年5月20日、国際会館(京都府京都市)
- 2) 稲垣 毅 転写調節因子とクロマチン構造変化を介した糖脂質代謝制御機構の解明 第89回日本内分泌学会学術総会(招待講演)、2016年4月23日、国際会館(京都府京都市)
- 3) Inagaki T., Abe Y., Rozqie R., Matsumura Y., Kawamura T., Kodama T., Aburatani H., Sakai J., JMJD1A is a Mediator of Long-Range Genomic Interactions to Regulate Metabolic Gene Expression, Keystone Symposia Conference; Diabetes, 2015年10月26日、Westin Miyako Kyoto (京都府京都市)
- 4) Inagaki T., Abe Y, Rozqie R, Matsumura Y, Kajimura S, Sakai J. Regulation of Higher-order Chromatin Structure during Thermogenesis in Brown Adipocytes, The 46th NIPS International Symposium (招待講演、シンポジウム)、2015年10月3日、Nagoya Congress Center (愛知県名古屋)
- 5) 稲垣 毅 エピゲノム研究から見た一卵性双生児 第16回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会(招待講演)、2015年9月26日、幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)
- 6) Inagaki T., Abe Y, Rozqie R, Matsumura Y, Kawamura T, Nakaki R, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. "JMJD1A Regulates Metabolic Gene Expression by Mediating Long-Range Genomic Interactions in Response to β -Adrenergic Stimulation under Cold Environment" The 40th Naito Conference on Epigenetics—from histone code to therapeutic strategy, 2015年9月17日、CHÂTERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO (北海道札幌市)
- 7) 稲垣 毅、阿部 陽平、Royhan Rozqie、松村 欣宏、梶村 真吾、児玉 龍彦、油谷 浩幸、酒井 寿郎 アディポバイオロジーを制御する ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の修飾シグナル 第58回日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演、シンポジウム)、2015年5月22日、下関市市民会館(山口県下関市)

- 8) 稲垣 毅、阿部陽平、Rozqie Royhan、松村欣宏、川村猛、仲木竜、鶴谷悠也、谷村恭子、田中十志也、児玉龍彦、油谷浩幸、酒井寿郎 脂肪細胞における新規エピゲノム制御機構 第52回日本臨床分子医学会学術集会(招待講演、シンポジウム)、2015年4月11日、京都みやこめっせ(京都府京都市)
- 9) 稲垣 毅、岩崎 聡、松村欣宏、川村 猛、阿部陽平、吉田文乃、中村加奈子、馬郡健太、仲木 竜、田中十志也、児玉龍彦、油谷浩幸、酒井寿郎 FBXL10によるエピゲノム複合体を介した脂肪細胞分化調節機構 第37回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 10) 稲垣 毅 JMJDIA Regulates Metabolic Gene Expression by Mediating Long-Range Genomic Interactions in Response to β -Adrenergic Stimulation 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会(English Session、招待講演、2014年7月11日、京王プラザホテル(東京都新宿区))
- 11) Inagaki T, Iwasaki S, Kawamura T, Abe Y, Yoshida A, Nakamura K, Magoori K, Tanaka T, Matsumura Y, Sakai J., Fbxl10 Controls Adipogenesis through Inhibiting Clonal Expansion by Forming an Epigenetic Regulator Complex, 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)

[その他]

ホームページ等

1. <http://www.mm.rcast.u-tokyo.ac.jp/member/inagaki.html>
2. http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/people/staff-inagaki_takeshi.html
3. <http://www.lsbm.org/staff/inagaki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 毅 (INAGAKI, TAKESHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：10507825