

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670026

研究課題名(和文) ヒストンメチル化酵素を標的とした創薬への挑戦

研究課題名(英文) Innovative Drug Development for Histone Methylase

研究代表者

土井 健史 (DOI, Takefumi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00211409

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)：ヒストンH3の9番目のリジンのメチル化に関与するSETDB1と、この酵素によるトリメチル化に必要なMCAF1との相互作用について調べ、1から195番目のSETDB1分子と、562～817番目のMCAF1分子とが複合体を形成している事を確認した。また、この複合体の構造を明らかにするために両タンパク質を大腸菌で発現させ、精製を行い、結晶化に用いる試料を調製した。

次にSETDB1の欠失変異体について、これらの翻訳後修飾と酵素活性を調べた。そして、酵素活性にユビキチン化修飾が必要である事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：SETDB1 is one of the H3K9 methylation enzymes and requires MCAF1 for H3K9's tri-methylation. In this study, we have investigated the interaction between SETDB1 and MCAF1 to elucidate the tri-methylation mechanism by SETDB1.

We first confirmed that SETDB1(1-195) and MCAF1(562-817) formed a complex by immune-precipitation experiment. Then, in order to reveal the complex structure, we expressed these proteins in E.coli and purified them for further X-ray analysis.

Next, we searched the relationship between the post-translational modification and methylation activity of SETDB1. Analyses of several deletion mutants checking their methylation activities and modification revealed that the ubiquitination of SETDB1 is needed for its methylation activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストンH3 ヒストンメチル化 SETDB1 MCAF1 翻訳後修飾 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

SETDB1 はヒストン H3 の 9 番目のリジン残基をメチル化する酵素で、エピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。そのメチル化において、モノメチル化、ジメチル化は単独で行えるが、トリメチル化には MCAF1 の存在が必要とされている¹⁾。ここで H3K9 のトリメチル化は、HP 1 によるヘテロクロマチン化を誘導し、遺伝子発現の抑制がおこることが知られており²⁾、このトリメチル化がきっかけとなる遺伝子発現抑制とがんの発症との関係が注目されている³⁾。

2. 研究の目的

このように、がんの発症に関係している SETDB1 と MCAF1 について、これら因子の構造、相互作用を明らかにする事は、学術的に意味がある事に加え、がんに対する新たな創薬ターゲットを開発する上で重要である。しかし現在、これらの構造についてはほとんど明らかにされていない（他の一連のメチル化酵素と異なり、メチル化に関与する SET ドメインが約 350 アミノ酸からなる配列で分断化されており、特殊な立体構造をとっていると推測されている）。そこで、SETDB1 単独あるいは SETDB1-MCAF1 複合体の立体構造を明らかにし、これらによるエピジェネティックな遺伝子発現制御機能を分子レベルで明らかにすることは重要であると考え、これを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化に関与する SETDB1 と、この酵素によるトリメチル化に必要な MCAF1 との相互作用を調べた。SETDB1 および MCAF1 について、どの領域が相互作用に関与するかをみるために、それぞれの欠失変異体を発現するプラスミドを作製し、大腸菌でタンパク質を発現させ、これらの相互作用を調べた。また相互作用するタンパク質の立体構造を明らかにするために、これらの因子、及び複合体の精製を行い

結晶化を試みた。方法としては、それぞれのタンパク質を別々に発現させ、精製後に混合して複合体を組ませて構造解析サンプルに用いる方法と、2つのタンパク質を同じ細胞で同時に発現させ、複合体を精製して解析サンプルに用いる方法があるが、複合体を形成する事でより構造が安定する事も考えられたため、後者の方法を用いて発現、精製を試みる事にした。

次に、SRTDB1 分子の翻訳後修飾について調べた。以前から、SETDB1 は SDS-PAGE において 2 本のバンドを示す事が知られていたため、それぞれのバンドについて質量分析装置を用いて解析を行い、どのような修飾のために分子量の大きなバンドが出現するかについて調べた。さらに、その修飾を確認するために、修飾を認識する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、修飾の同定を行った。

4. 研究成果

まず、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化に関与する SETDB1 と、この酵素によるトリメチル化に必要な MCAF1 との相互作用について調べた。はじめに 1 から 195 番目の SETDB1 分子と、567~669 番目の MCAF1 分子との複合体の精製を試みた。しかし、567~669 番目の MCAF1 分子が不安定な構造を取っているためか、タグを除去すると分解が促進され、これら複合体を得る事ができなかった。そこで次に少し大きい 562~817 番目の MCAF1 を用いて発現、精製を試みた。SETDB1 (1-195) には GST タグおよび His タグを導入しているため、大腸菌での両タンパク質の共発現後、GST アフィニティークロマトによる精製を行ったところ、MCAF1 も画分に含まれていた。これにより複合体として存在している事がわかったため、タグによるアフィニティー精製後にタグを切断し、再度アフィニティー精製、ゲル濾過クロマトグラフィーを行い、複合体を単離する事ができた。現在結晶化のスクリーニングを行っている (図 1)。

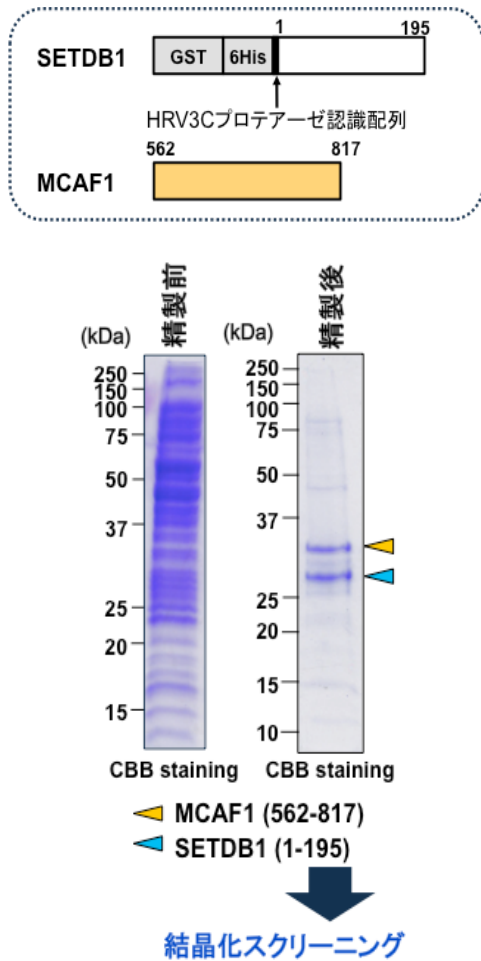


図1 SETDB1 (1-195)-MCAF1 (562-817) 複合体の精製

次に、SETDB1 分子の翻訳後修飾について調べた。動物細胞において SETDB1 分子の発現を行った場合には、SDS-PAGE で2本のバンドが検出されるが、大腸菌での発現では1本しか見られない事から、翻訳後修飾が動物細胞内で行われている事が予想された。また大腸菌で発現された分子は酵素活性がみられない事から、この修飾が酵素活性に重要である事が示唆された。そこで、種々N末端側を欠失させた SETDB1 変異体を HeLa 細胞で発現させ、翻訳後修飾と酵素活性を調べたところ、N末端から 570 アミノ酸を欠如した場合、修飾がおこっており酵素活性も存在しているが、681 アミノ酸を欠如すると、修飾も酵素活性も無くなる事がわかった (図2)。そこで、修飾がみられる変異体における SDS-PAGE 上の2本のバンドについて、これらにどのような違いがあるかを SETDB1 (570-1291) 変異

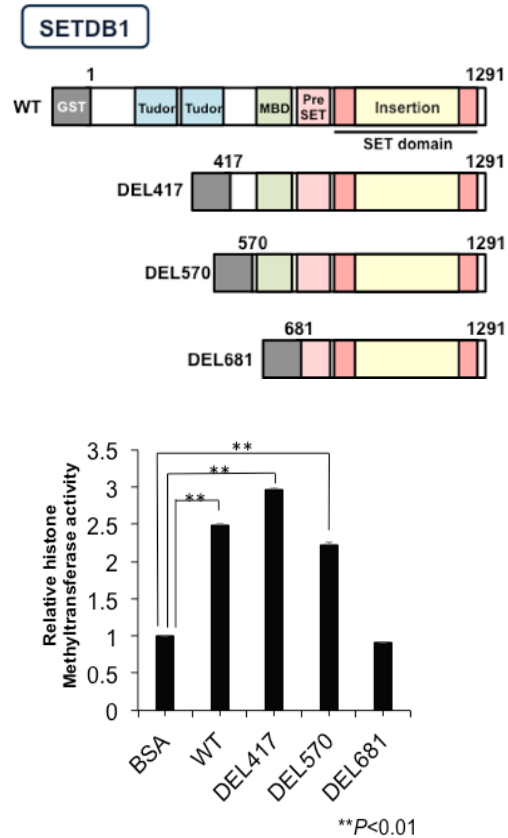


図2 SETDB1 の酵素活性には、570-1291 番目のアミノ酸領域が必要

体を用いて質量分析装置で調べたところ、分子量の大きいバンドの方が小さいバンドに比べ、有意に多くのユビキチン化修飾が検出された (図3)。そこで抗ユビキチン化抗体によるウエスタンブロット解析を行ったところ、分子量の大きいバンドのみユビキチン化抗体に反応し、上のバンドがユビキチン化されている事が判明した (図4)。また、他の変異体分子および全長の分子についてもユビキチン化修飾を調べたところ、酵素活性のある変異体 (全長分子を含む) は全てユビキチン化されていた。

以上、これまで SETDB1 の酵素活性について、構造と機能の関係ではドメイン構造が議論されているだけであったが、本研究において初めて翻訳後修飾が酵素活性に影響を与える事、すなわち SETDB1 のユビキチン化が酵素活性発現に必要である事を明らかにすることができた。

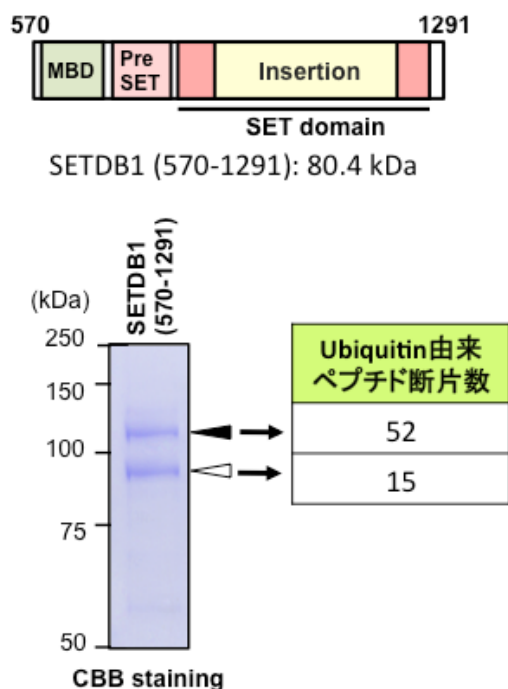


図3 質量分析装置によるユビキチン化の検出

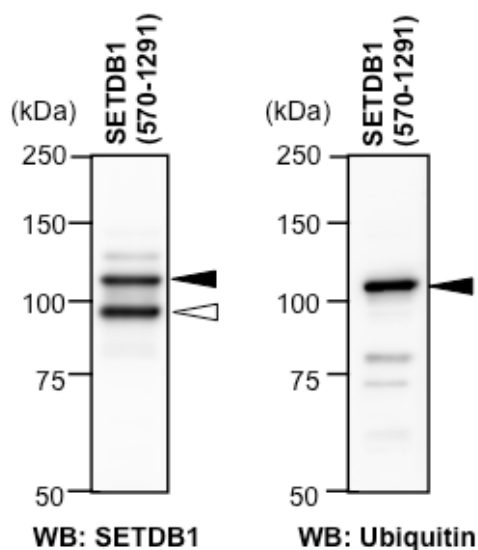


図4 ウェスタンブロット解析によるユビキチン化の検出
 左：抗 SETDB1 抗体による SETDB1 の検出
 右：抗ユビキチン抗体によるユビキチン化タンパク質の検出

<引用文献>

1) mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression.
 Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, Tempst P, Roeder RG, Zhang Y.
Mol. Cell., 12, 475 (2003)

2) Transcriptional Repression and Heterochromatin Formation by MBD1 and MCAF/AM Family Proteins.
 Ichimura T, Watanabe S, Sakamoto Y, Aoto T, Fujita N, Nakao M,
J. Biol. Chem., 280, 13928 (2005)

3) The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset.
 Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, Bilodeau S, Orlando DA, Battisti V, Fritsch L, Lin WM, Hollmann TJ, Ferré F, Bourque C, Burke CJ, Turner L, Uong A, Johnson LA, Beroukhi R, Mermel CH, Loda M, Ait-Si-Ali S, Garraway LA, Young RA, Zon LI.
Nature, 471, 513 (2011)

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①川又那津子、石本憲司、内原佳恵、後藤英子、垣之内啓介、溝端栄一、望月康弘、酒井寿郎、井上豪、児玉龍彦、橘敬祐、土井健史、ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の酵素活性と翻訳後修飾の解析、第63回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013年10月12日、同志社女子大学京田辺キャンパス(京都府)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 健史 (DOI TAKEFUMI)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00211409