

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19687007
 研究課題名 (和文) 新規ヒストン脱メチル化酵素の同定及び機能解析による
 ヒストンメチル化修飾の機能解析
 研究課題名 (英文) Identification and functional analysis of histone demethylases

研究代表者
 東田 裕一 (TSUKADA YUICHI)
 九州大学・生体防御医学研究所・助教
 研究者番号：90444801

研究成果の概要：

遺伝情報の発現は、“エピジェネティクス”と呼ばれる DNA とヒストンなどのタンパク質から構成されるクロマチンの化学的、構造的な修飾による制御を受けており、これは発生の過程で確立され、その後細胞の記憶として働く。本研究では、このエピジェネティクスの主要な制御因子であるクロマチンの化学修飾を制御する新規のヒストン脱メチル化酵素の同定に成功した。そして、この酵素の機能解析により、遺伝子のサイレンシングに関与する複数のメチル基からの脱メチル化を触媒するという基質特異性を持つこと及び脊椎動物において発生過程における脳形成に関与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：エピジェネティクス・クロマチン・ゲノム・発現制御・酵素

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の個体は様々な種類の細胞から形成されているが、同一個体の細胞は免疫系などの一部の例外を除き、全ての細胞が全く同一の遺伝情報を持つ。つまり、同一の遺伝情報から異なる種類の細胞が作り出されているのである。近年、この同一の遺伝情報から異なる種類の細胞ごとにその細胞の種

類を決定付ける特異的な遺伝情報を取り出し、維持するメカニズムとしてエピジェネティクスが注目され、且つその研究は急速な発展を遂げている。「エピジェネティクス」とは、分子生物学においては、細胞分裂を経ても継承される塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の活性化・不活性化を意味する。発生・分化過程における細胞運命の決定がこのエピジェネティクスによって制御されてい

ると考えられることから、このエピジェネティクスを理解し、人工的に制御することが出来るようになれば、より完全な再生医療への応用が可能であると考えられる。

エピジェネティクスを制御する主要なメカニズムとしてクロマチンの構造変換がある。これまでこのクロマチン構造変換の制御機構には、クロマチンの化学修飾(ヒストンの翻訳後修飾・DNAのメチル化)・ATP依存的なクロマチン構造変換・ヒストンバリエーションによるものが考えられている。この中でヒストンの翻訳後修飾についてはアセチル化・メチル化・リン酸化・ユビキチン化がこれまでによく研究されており、これらの修飾の組み合わせが最終的な遺伝子発現のアウトプットを決めるというヒストンコード仮説が提唱されている。

エピジェネティクスの制御因子であるヒストンの翻訳後修飾の機能を理解する上で、その可逆性を知ることは大変重要である。ヒストンの翻訳後修飾においては、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化が可逆的な修飾であるのに対し、メチル化はその可逆性が大きな議論的であり、最近まで不可逆的で永続的な修飾であると考えられてきた。そこで研究者らはこの議論に結論を出すべく、新規のヒストン脱メチル化酵素の同定を試み、進化的に保存された新規のヒストン脱メチル化酵素ファミリーとして **JmjC** ドメイン含有タンパク質ファミリーを同定し、ヒストンの脱メチル化は真核生物に共通したメチル化の制御機構であることを証明した [Tsukada et al. *Nature* (Article) (2006)]。

2. 研究の目的

ヒストン脱メチル化酵素の同定により、メチル化修飾の可逆性には答えが出された。しかしながら、メチル化に関しては一部のメチル化部位の可逆性が証明されたことが、全てのメチル化部位の可逆性の証明にはならず、ヒストンのメチル化の可逆性に対する議論に完全な答えが出された訳ではない。メチル化は、同一の修飾でありながらその修飾部位及びメチル化状態(モノ・ジ・トリメチル化)の違いによって機能が異なるのである。つまり部位特異的メチル化の果す役割の違いにより可逆性も異なる可能性がある。そこで本研究課題では、可逆性の不明であるメチル化部位に対するヒストン脱メチル化酵素の同定及びその細胞レベル・個体レベルでの機能解析により、メチル化の機能及び制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 可逆性の不明であるヒストンのメチル化部位に対する脱メチル化酵素の同定

① ヒストン脱メチル化酵素候補タンパク質の脱メチル化活性の解析

研究代表者らがヒストン脱メチル化酵素の特徴的モチーフとして同定した **JmjC** ドメインを有するタンパク質ファミリーのリコンビナントタンパク質を作製し、これらが可逆性が不明のメチル化部位に対し脱メチル化活性を有するかを、研究代表者らが既に構築した活性検出系を用いて解析する。

② ヒストン脱メチル化酵素の生化学的アプローチによる同定

ヒストンのメチル化のダイナミックな変化が観察される発生過程に未同定の脱メチル化酵素が高発現している可能性が考えられるため、胚性癌細胞由来の細胞株 **P19** 及び **F9** から脱メチル化酵素の精製を、研究代表者らが構築した活性検出系とクロマトグラフィを組み合わせる方法で試みる。

③ 酵素特性の解析

①②から同定又は精製したヒストン脱メチル化酵素の基質特異性などの酵素特性を *in vitro* 及び *in vivo*(細胞内)において検討する。

(2) 同定したヒストン脱メチル化酵素の細胞レベル及び個体レベルでの機能解析

④ 同定したヒストン脱メチル化酵素の解析に適した細胞株又は初代培養細胞において、ヒストン脱メチル化酵素のノックダウン及び過剰発現によりヒストンの脱メチル化異常の表現系を解析し、ヒストン脱メチル化酵素によるヒストン脱メチル化が含まれる細胞レベルでの生物学的プロセスを見つける。そしてその生物学的プロセスにおけるヒストンメチル化の機能及び制御機構の解析を行う。

⑤ 同定したヒストン脱メチル化酵素のノックアウト又はコンディショナルノックアウトマウスを作製し、④と同様の解析を個体レベルで行う。

4. 研究成果

本研究課題では、新規ヒストン脱メチル化酵素 **HDMX** (Histone Demethylase X) の同定に成功した。そして、酵素の分子レベル・細胞レベル・個体レベルでの機能解析により、酵素の基質特異性、細胞内での遺伝子発現調節機能、個体の発生制御機能を明らかにした。

① 酵素特性の解明

研究代表者ら構築したヒストン脱メチル化酵素活性検出系を用いて **HDMX** の基質特異

性を解析した。その結果、遺伝子発現の抑制に関与する複数のヒストンのメチル化部位を基質とすることが明らかになった。

② 個体発生における役割の解明

HDMX の個体レベルでの機能解析をモデル生物としてゼブラフィッシュを用いて行った。その結果、脳・神経系特異的な遺伝子発現パターンを示した (図1: HDMX のゼブラフィッシュの発生過程での発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。紺色で染まっているのが HDMX の発現部位)。また、HDMX を欠損させると脳の一部が形成異常を起こすことが分かった。

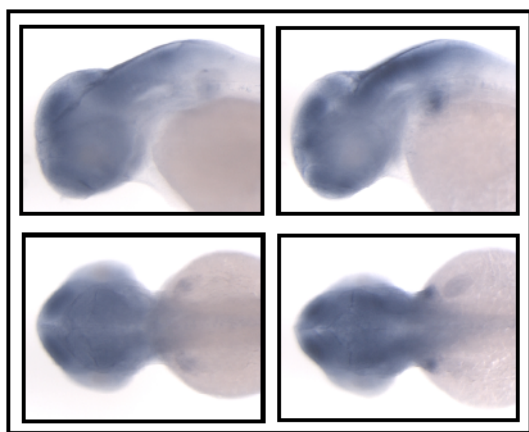


図1 HDMX の発現部位

③ 遺伝子発現制御における役割の解明

ゼブラフィッシュでは、HDMX が神経細胞に高発現していることから、HDMX の細胞レベルでの解析を、哺乳類神経癌細胞を用いて行った。哺乳類の各組織由来の培養細胞における HDMX の発現量を比較した結果、神経癌細胞は他の組織由来の培養細胞に比べて HDMX の発現量が高いことが明らかになった。そして、神経癌細胞において HDMX を欠損させると、複数の遺伝子とその発現に影響を受けることを明らかにした。影響を受けた遺伝子は、神経細胞に特異的に発現している遺伝子が多かった。

④ 哺乳類 HDMX の機能解析

哺乳類における HDMX の機能を解明するために、哺乳類の各組織における HDMX の発現を比較した。その結果、HDMX は卵母細胞に高発現していることが明らかになった。

「エピジェネティクス」は、急速に発展してきた注目を集めている研究分野である。その中でも本研究課題の対象であるヒストン脱メチル化酵素の研究は、近年激しい競争が行われ、最も注目されている研究である。このような状況において、本研究課題では新規のヒストン脱メチル化酵素を同定し、その分

子レベル・細胞レベル・個体レベルでの機能の一部を解明した。これは、エピジェネティクス及びヒストン脱メチル化酵素の研究において非常に重要な研究成果であり、新たな知見を提供するものである。

今後は、哺乳類での HDMX の機能解析を行う予定であるが、HDMX は哺乳類では卵母細胞に高発現していることから、卵母細胞の成長・成熟過程や受精といった生理過程に関与していることが予想される。よって、HDMX の機能解析により、卵母細胞の成長・成熟過程や受精といった生理過程におけるエピジェネティックな制御の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 3 件)

「全て査読有り」

- ① He, J., Kallin, E. M., Tsukada, Y., and Zhang, Y.: The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15Ink4b. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15: 1169-75 (2008).
- ② Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, I. A., and Nakayama, K. I.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.*, 11: 172-82 (2008).
- ③ Shirako, E., Hirayama, N., Tsukada, Y., *Tanaka, T., Kitamura, N.: Up-regulation of p21CIP1 expression mediated by ERK-dependent and -independent pathways contributes to hepatocyte growth factor-induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. *J. Cell. Biochem.*, 104, 176-88 (2008).

[学会発表] (計 1 件)

東田 裕一、JHDM1 によるヒストンの脱メチル化とユビキチン化の制御、日本分子生物学会、2007 年 12 月、横浜

[図書] (計 2 件)

- ① 東田裕一: ヒストンのメチル化と脱メチル化 -脱メチル化を中心に-. 生化学 (日本生化学会), 79: 691-697, (2007).

- ② 東田裕一：クロマチン免疫沈降法 (ChIP). 分子間相互作用解析ハンドブック (羊土社, 東京), 183-188, (2007).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東田 裕一 (TSUKADA YUICHI)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：90444801

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：