

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293166

研究課題名(和文) ヒストンアセチル化制御メカニズム解明による治療法開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy by regulating histone acetylation

研究代表者

猪阪 善隆 (ISAKA, Yoshitaka)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00379166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々な疾患の進展に遺伝子配列に加え、エピジェネティックな因子が深く関与することが知られるようになってきた。これまで動物細胞では間接的にしか存在が示されていなかったヒストン修飾H4K20acの存在を質量分析を用いて証明するとともに、H4K20acに対する抗体を作成し、クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサー、スーパーコンピューターを用いた解析で、今まで知られていたアセチル化は、発現頻度の高い遺伝子のプロモーター部位に集積するのに対して、H4K20acは発現頻度の低い遺伝子のプロモーター部位に集積することを見出し、H4K20acが、全く新しい種類のヒストン修飾であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Histone acetylation is generally associated with gene activation and chromatin decondensation. Recent mass spectrometry analysis has revealed that histone H4 lysine 20 (H4K20ac), a major methylation site, can also be acetylated. To understand the function of H4K20ac, we have developed a specific monoclonal antibody and performed ChIP-seq analysis using HeLa-S3 cells. H4K20ac was enriched around the transcription start sites (TSSs) of minimally expressed genes and in the gene body of expressed genes, in contrast to most histone acetylation being enriched around the TSSs of expressed genes. The distribution of H4K20ac showed little correlation with known histone modifications, including histone H3 methylations. A motif search in H4K20ac-enriched sequences, together with transcription factor binding profiles based on ENCODE ChIP-seq data, revealed that most transcription activators are excluded from H4K20ac-enriched genes and a transcription repressor NRSF/REST co-localized with H4K20ac.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腎障害 エピジェネティック ヒストン修飾 細胞肥大

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに、染色体における変化によって生じる、安定的に受け継がれうる表現型と定義されている。DNA の CpG 部位でのメチル化やヒストン修飾、さらには non-coding RNA やクロマチン立体構造変化が関わっている。本来、エピジェネティックな変化は環境に対応する仕組みであったが、何らかの要因で異常なエピジェネティクス修飾が誘発されると、その変化もまた維持されるため、がんや生活習慣病など疾患にも関与することが報告されている。

疾患におけるエピジェネティックな変化の関与については、UKPSD 研究において糖尿病強化療法が試験中止後の観察期間において長期予後を改善したことがよく知られており、Legacy effect あるいは Metabolic Memory と呼ばれている。実際、高血糖は血管平滑筋細胞のヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化を起すことにより Nk- κ B の発現を亢進させることにより炎症を惹起することが報告された。興味深いのは、いったん高血糖に暴露されると、その後血糖が改善してもエピジェネティックな変化は持続することである。慢性炎症は腎疾患の進展に関与することもよく知られている。炎症自体がエピジェネティックな変化を誘導すること、例えば DNA のメチル化と関連することが報告されている。また、miRNA (miR-155, miR-146, miR150, miR181, miR223) が炎症におけるエピジェネティックな制御に関わることも報告されている。

腎疾患の進展に関わる線維化においても、エピジェネティックな関与があることが報告されている。例えば Ras の阻害因子をコードする RASAL1 遺伝子のメチル化は線維芽細胞を活性化するとともに、腎の線維化を誘導する。また、強力な線維化因子である TGF- β は、H3K4 のメチル基転移酵素である SET7/9 の活性を亢進させることにより、H3K4 のメチル化を誘導し、線維化をきたすことが報告されている。また、miR-192 は一側尿管結紮モデルや 5/6 腎摘モデルにおいて、腎臓での発現が亢進し、TGF- β や Smad3 シグナル活性化に関わるとともに、miR-192 欠損により TGF- β によるコラーゲン産生が抑制されることも報告されている。

さらに、多発性嚢胞腎の原因遺伝子である PKD1 を生後 13 日目までにノックアウトすると嚢胞の形成が起こるが、14 日目以降にノックアウトした

場合には嚢胞腎には進展しない。マウスの腎臓では、生後 14 日目を境として、細胞増殖期から細胞肥大期に移行することが知られており、遺伝子発現が劇的に変化する。我々は、このような遺伝子発現の変化にはエピジェネティックな要因が関与している可能性が高いと考えた。このような生直後に生じる、エピジェネティックな変化が、腎障害時にも生じており、このようなエピジェネティックな変化が renal memory として腎障害進展に関与するとの仮説のもと、本研究を発案した。

2. 研究の目的

エピジェネティックから見た renal memory の可能性について検討することを目的としている。様々な疾患の発症進展において、環境や栄養状態が遺伝子、あるいはヒストンのアセチル化、メチル化をきたすことにより、遺伝子発現を変化させており、これをエピジェネティックと呼ぶが、このような環境因子もしくは栄養因子がエピジェネティックな変化をきたすことにより、腎障害の進展のみならず、合併症の発症にも関与するという仮説のもと、ヒストンのアセチル化、メチル化に対する抗体を用いて、腎臓の発生段階においてヒストン修飾に変化をきたす可能性を検討し、renal memory の可能性について検討を行うとともに、同じ変化が糖尿病性腎症や片腎摘モデルにおいても観察されるかなどを検討する。

3. 研究の方法

3-1) マウス出生後のヒストン修飾の変化の網羅的解析

マウス出生後のヒストン修飾の変化を網羅的に検討した。なお、検討したヒストン修飾は次の通りである。

H3K4 me0, H3K4 me1, H3K4 me2, H3K4 me3, H3K9 me2, H3K9 me3, H3K9/27 ac, H3S10 Ph, H3K27 me1, H3K27 me2, H3K27 me3, H3K27 ac, H3S28 Ph, H3K36 me1, H3K36 me2, H3K36 me3, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16 ac, H4K20 ac, H4K20 me1, H4K20 me2, H4K20 me3, H2B S14Ph, H2AX T139Ph, PolIII S5Ph, PolIII Pc26B5

3-2) 病態モデルならびに培養細胞を用いた H4K20 ac 変化の検討

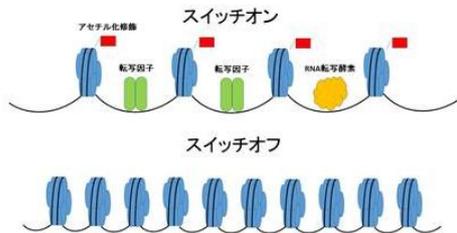
糖尿病モデルならびに片側腎臓摘出モデルをもちいて、H4K20 ac のヒストン修飾を検討した。

3-3) 哺乳類の細胞での H4K20 ac の発現の検討

これまで、H4K20 ac は植物由来細胞でしか報告がなかったことから、哺乳類由来の細胞を用いて、質量分析器を用いて、H4K20 ac が発現しているかを検討した。

3-4) H4K20 ac 修飾変化と遺伝子発現変化の検討

アセチル化ヒストン修飾は陰性に荷電していることから、同じく陰性に荷電した DNA とは互いに反発して、転写因子が入り込むスペースができて、遺伝子の発現をスイッチオンに関わることが知られている。



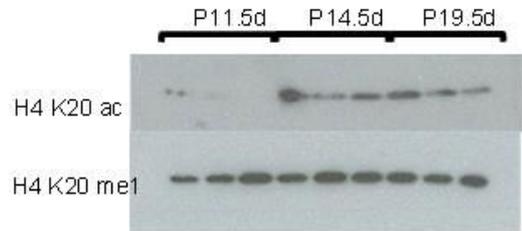
そこで、H4K20 ac 修飾変化と遺伝子発現変化を検討した。

さらに、次世代高速シーケンサーを用いて、motif 解析をおこなった。

4. 研究の成果

4-1) マウス出生後のヒストン修飾の変化の網羅的解析

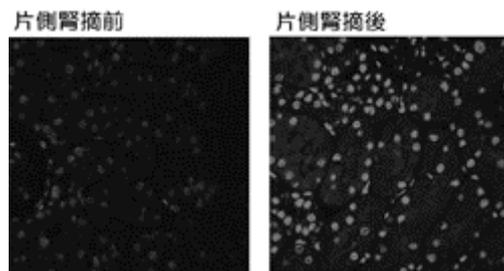
多くのヒストン修飾は生後に変化を認めなかったが、生後 14 日目を境に 3 種類のヒストン修飾が変化することを見出した。H4K5ac, H4K12ac の 2 種類は生直後は強いアセチル化を示したが、14 日目を境にアセチル化が低下した。一方、H4K20ac は生後はほとんどアセチル化が認められなかったが、



14 日目を境にアセチル化が亢進した。

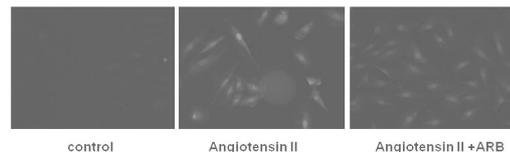
4-2) 病態モデルならびに培養細胞を用いた H4K20 ac 変化の検討

ヒストン修飾 H4K20 のアセチル化は、糖尿病性腎症や片腎摘出モデルにおいても尿細管細胞で亢



進することを見出した

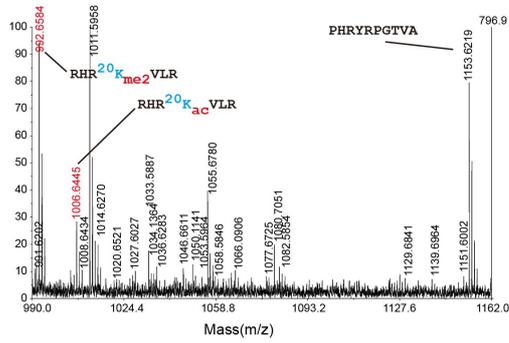
また、このヒストン修飾 H4K20 のアセチル化は、angiotensin II 添加により亢進し、ARB 同時添加により抑制されるなど、その制御機構も明らかにな



りつつある。

4-3) 哺乳類の細胞での H4K20 ac の発現の検討

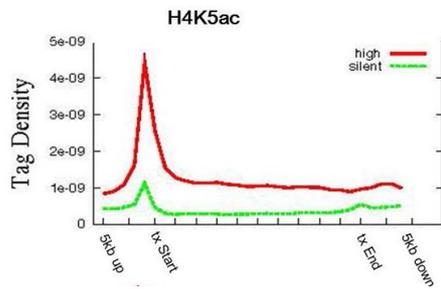
質量分析機を用いて、哺乳類細胞においても、H4K20ac が存在することを明らかとした。



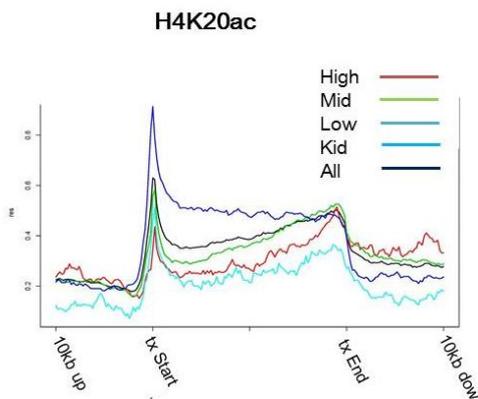
興味深いことに、通常ヒストンのアセチル化は発現が亢進している遺伝子の転写開始部位に多く存在する。

4-4) H4K20 ac 修飾変化と遺伝子発現変化の検討

H4K5ac は遺伝子発現が増強している遺伝子の転写開始部位でアセチル化が亢進しており、従来の報告と一致するものであった。



一方、H4K20ac は遺伝子発現が抑制されている遺伝子の転写開始部位と転写終始部位に多く分布していた。

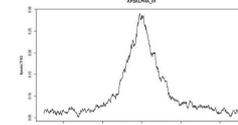


このように、H4K20Ac は、発現が抑制されている遺伝子の転写開始部位と終止部位に存在していることが確認できており、その制御機構は他のヒストン修飾と異なっていることが明らかとなった。

そこで、次世代高速シーケンサーを用いて、motif 解析をおこなった。

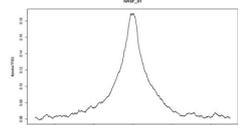
AP2- α 、C-Myc、STAT1、C-Jun、C-Fos 等ほとんどの transcription activator の転写因子結合領域において H4K20 のアセチル化が起こっているが、AP2- α 、C-Myc、STAT1、C-Jun、C-Fos の転写因子が結合している場合には、H4K20 のアセチル化が起こっていないことが確認できた。すなわち、これらの transcription activator の転写因子結合領域において H4K20 のアセチル化が起こると、転写因子が結合できなくなることが明らかとなった。しかし、転写因子の中で唯一 NRSF のみが、H4K20 のアセチル化が起こると、転写因子が結合できることが明らかとなり、H4K20 アセチル化による転写制御機構が明らかとなった。

AP-2 alpha binding motif 付近の H4K20ac の分布



H4K20ac

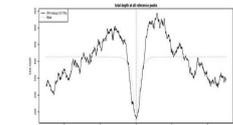
NRSF binding motif 付近の H4K20ac の分布



H4K20ac

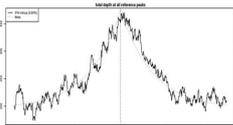
NRSF binding motif

AP-2 alpha がbindしている付近の H4K20ac の分布



H4K20ac

NRSF がbindしている付近の H4K20ac の分布

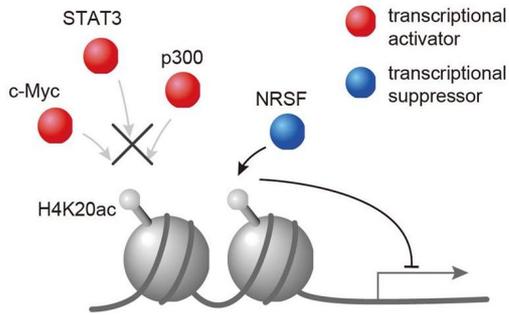


H4K20ac

NRSF binding motif

NRSF は心肥大に関与することも報告されており、H4K20Ac は遺伝子抑制的に作用し、何らかの細胞肥大とも関係があることが示唆された。

以上の検討から、遺伝子発現増強因子 (transcriptional activator) は、H4K20ac に近づくことが出来ないが、遺伝子発現抑制因子 (transcriptional suppressor) は近づくことが出来ることが明らかとなった。



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 1 件)

Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. Jun-Ya Kaimori, Kazumitsu Maehara, Yoko Hayashi-Takanaka, Akihito Harada, Masafumi Fukuda, Satoko Yamamoto, Naotsugu Ichimaru, Takashi Umehara, Shigeyuki Yokoyama, Ryo Matsuda, Tsuyoshi Ikura, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Naohito Nozaki, Shiro Takahara, Toshifumi Takao, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, and Yoshitaka Isaka. Sci Rep 6: 26137. 2016

[学会発表] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2016/20160411_1

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪阪善隆 (ISAKA, Yoshitaka)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00379166

(2)研究分担者

貝森淳哉 (KAIMORI, Jun-ya)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70527697

(3)連携研究者

木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院
・教授

研究者番号：30241392