

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04644

研究課題名(和文) ヒストンメチル化酵素SETDB1の酵素機能を制御する分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism regulating enzyme function of histone methylation enzyme SETDB1

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンH3K9を特異的にメチル化するSETDB1について、その酵素機能を制御する分子機構を解析した。(1) SETDB1のモノユビキチン化修飾がH3K9me3活性を介して、遺伝子発現を制御していることを明らかにした。また、その制御機構に関わる因子として、クロマチン制御因子であるTRIM28を同定した。(2) 核内のSETDB1がプロテアソーム阻害剤と核外排出阻害剤によって増加し、それに関わる候補因子を見出した。(3) SETDB1-MCAF1のX線結晶構造解析を行うため、蛋白質の精製および結晶化を試みた。本研究で明らかとなった知見は、SETDB1を標的とした新たながんの治療薬の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms that control the enzymatic function of SETDB1, an enzyme that specifically methylates histone H3K9, were analyzed by a multiple approach. (1) We demonstrated that mono-ubiquitination modification of SETDB1 regulates gene expression via H3K9me3 activity. In addition, TRIM28, a chromatin regulator, was identified as a factor related to its regulatory mechanism. (2) SETDB1 in the nucleus showed stable expression by proteasome inhibitor and nuclear export inhibitor, and ligase X was found as a candidate factor related to it. (3) In order to conduct X-ray crystal structure analysis of SETDB1-MCAF1, we performed protein purification and its crystallization. The novel finding of SETDB1 clarified in this research leads to the development of new cancer therapeutic drug targeting SETDB1.

研究分野：生物系薬学、分子生物学

キーワード：ヒストンメチル化 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特異的に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 (図 1) (Mol. Cell, 12, 475 (2003))。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 occurs (J. Biol. Chem., 280, 13928 (2005))、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。

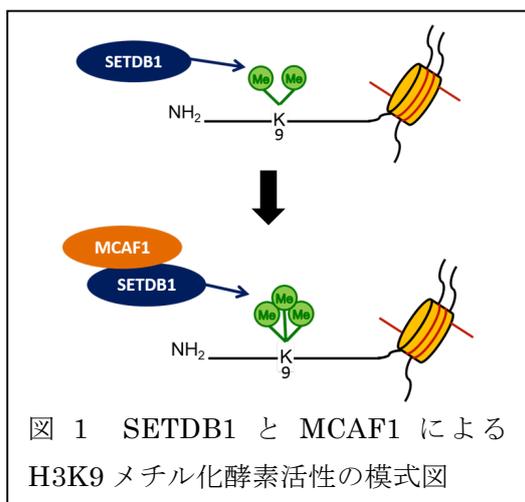


図 1 SETDB1 と MCAF1 による H3K9 メチル化酵素活性の模式図

このように、SETDB1 と MCAF1 は、がんの発症に関係しており、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。しかしながら、これらの解析を行うにあたり、SETDB1 の細胞内局在や翻訳後修飾などの基本的な分子情報が不足しており、そのため SETDB1、あるいは、SETDB1-MCAF1 複合体の立体構造が基盤となって影響を及ぼすヒストンメチル化酵素活性を完全に理解するのは困難である。従って、SETDB1 がもつ特性を十分に明らかにし、その上で SETDB1 と MCAF1 が形成する構造情報を得ることができれば、がんを標的とした新たな創薬を実施するアプローチが可能となる。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、(1) SETDB1 がモノユビキチン化修飾を受けることでヒストンメチル化酵素活性を発揮することや、(2) 核内で機能制御する因子 SETDB1 が通常細胞質に存在すること、(3) 昆虫細胞 Sf9 から酵素活性をもつ SETDB1 タンパク質の精製が可能だが、モノユビキチン化修飾と未修飾のものが混交し、X 線構造解析が難しい、といった知見を得ている。このような多方面からのアプローチにより、SETDB1 の基盤情報を得ることに成功し、分子レベルで SETDB1 を制御する方法を理解しつつある。

本研究では、これら研究課題の成果を基にして、展開、発展させ、SETDB1 のモノユビキチン化修飾や細胞内局在の制御など新たな知見を得るとともに、SETDB1 の立体構造、SETDB1 と MCAF1 の複合体構造を明らかにして、創薬開発情報の提供へと結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SETDB1 のモノユビキチン化修飾が細胞内で機能できるか否かを、モノユビキチン化修飾ができない SETDB1 変異体と野生型を比較することで評価する。具体的には、クロマチン免疫沈降やリアルタイム RT-PCR を使って、SETDB1 が標的とする遺伝子 SERPINE1 の変化量を調べる。また、モノユビキチン化修飾を制御する因子の探索を免疫沈降等で明らかにする。

(2) 細胞質の SETDB1 が本来酵素活性を発揮する核内で、どのような発現制御を受けているか調べる。具体的には、EGFP-SETDB1 安定発現細胞株を作製し、この細胞株の EGFP を指標として、SETDB1 を核内に局在させる低分子化合物をスクリーニングする。

また、核内 SETDB1 の発現を安定化させる因子を免疫沈降で探索する。

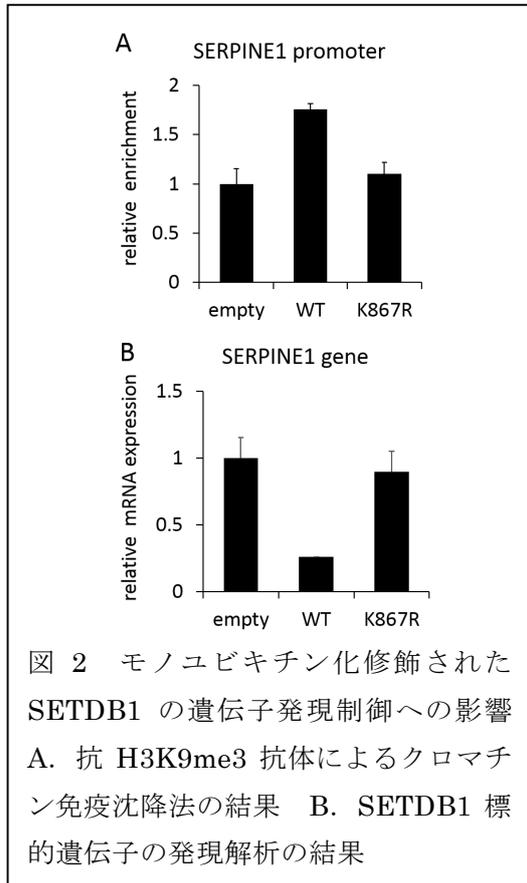
(3) SETDB1、および、SETDB1-MCAF1 複合体の X 線結晶解析を行う。SETDB1 (570-1291) を哺乳類細胞で発現・精製する系を確立する。また、大腸菌内で SETDB1 と MCAF1 を共発現する発現系の構築と精製系の確立を行う。更に、これら精製できたタンパク質について、結晶化を行う。

4. 研究成果

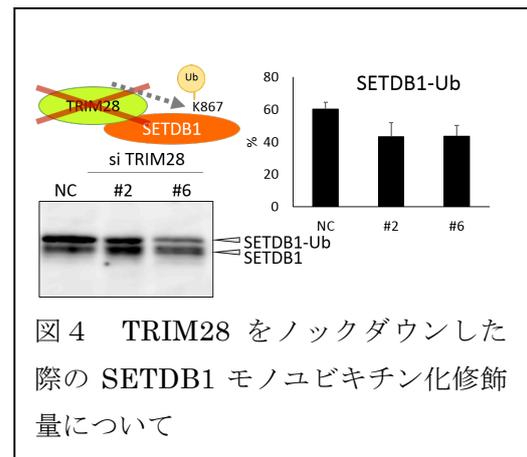
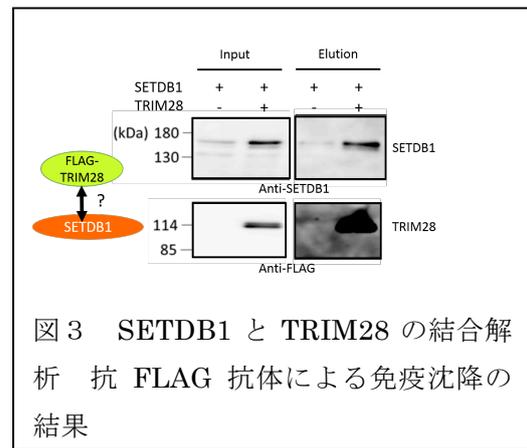
(1) モノユビキチン化修飾を受けた SETDB1 の機能評価とその制御因子の探索

SETDB1 は翻訳後修飾を受けることで、ヒストンメチル化酵素活性をもつことが知られている。この翻訳後修飾と酵素活性の詳細な分子メカニズムと、その制御方法を明らかにすることができれば、SETDB1 のもつ酵素活性を阻害することが可能となり、ひいてはがん抑制効果へとつながる。我々はこれまでに SETDB1 の修飾がモノユビキチン化修飾であること、K867 がその修飾部位であること、モノユビキチン化修飾ができない変異体 K867R では *in vitro* で酵素活性を発揮できないことを明らかにした。そこで、SETDB1 のモノユビキチン化修飾が、細胞内での機能に影響を及ぼすか調べた。細胞に野生型 SETDB1、K867R、コントロールベクターを過剰発現後、抗 H3K9 トリメチル化抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。その結果、コントロールと比較して、SETDB1 野生型では H3K9 トリメチル化活性が増加した (図 2 A)。一方、K867R を用いた場合はその増加が確認できなかった。

次に SETDB1 の標的遺伝子である SERPINE1 遺伝子の発現を調べた。その結果、野生型で SERPINE1 遺伝子の発現量は顕著に減少したが、K867R ではコントロールと変わらなかった (図 2 B)。これらのことから、SETDB1 のモノユビキチン化修飾は、細胞レベルでの SETDB1 の機能に必要なことがわかった (PLoS One., 11, e0165766 (2016))。



次に SETDB1 のモノユビキチン化修飾を制御する E3 リガーゼの探索を行った。我々はヒト SETDB1 (1291 アミノ酸) 中において、修飾に必要な約 100 アミノ酸の領域を見出し、この領域と文献情報を基にして、E3 リガーゼを探索したところ、TRIM28 が候補として挙げられた。TRIM28 は、クロマチン関連因子であり、E3 リガーゼとして AMPK をユビキチン化することが知られている。まず SETDB1 と TRIM28 の結合を免疫沈降で調べたところ、これらの因子が相互作用することがわかった (図 3)。そこで、TRIM28 を siRNA でノックダウンした際、SETDB1 のモノユビキチン化修飾がどのように変化するか調べた。その結果、2 種類の siRNA のどちらにおいても、SETDB1 のユビキチン化修飾が減少した (図 4)。これらのことから、TRIM28 が SETDB1 の E3 リガーゼであることが示唆された。



(2) 細胞質の SETDB1 を制御するメカニズムの解析

ヒストン H3 のリジン 9 をメチル化する酵素 SETDB1 は、ヒストンが存在する核内で機能するため、核内で主に局在すると予想される。一方で、細胞に一過的に発現させた SETDB1 の局在を解析すると、細胞質に局在することが分かった (図 5)。このことから SETDB1 は、酵素活性を発揮する場面において、はじめて核内に移行し、酵素活性を発揮することが予想される。即ち、核内へ SETDB1 を移行させないようなメカニズムを理解できれば、SETDB1 の酵素活性の阻害が可能となる。そこで、SETDB1 がどのような場面で、核内に局在できるかを明らかにするため、SETDB1 の細胞内局在に関与する低分子化合物を EGFP-SETDB1 安定発現細胞株を使ってスクリーニングすることにした。まず HeLa 細胞に EGFP-SETDB1 を発現するプラスミドをトランスフェクションし、G418 による薬剤選択で細胞株の樹立に成功した。この細胞株での EGFP-SETDB1 の発現を蛍光顕微鏡で観察したところ、一過的に解析した場合と同様に、細胞質で発現が確認できた。次にシグナル伝達や細胞内局在に関わる様々な低分子化合物を使って、EGFP-SETDB1 の細胞内局在を解析したところ、核排出阻害剤レプトマイシン B とプロテアソーム阻害剤 MG132 を組み合わせた場合、EGFP-SETDB1 の核内での蛍光を観察

できた (図 6)。これらのことから、核内 SETDB1 は、核内に移行してもすぐに核外に排出、あるいはタンパク質分解されることが予想された (Biochem Biophys Res Commun., 465, 725 (2015))。

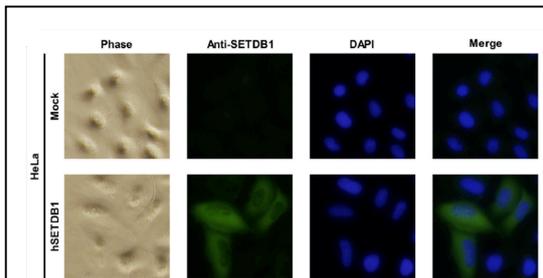


図 5 SETDB1 を一過的に発現した際の SETDB1 の細胞内局在の結果 抗 SETDB1 抗体で免疫蛍光染色を行った

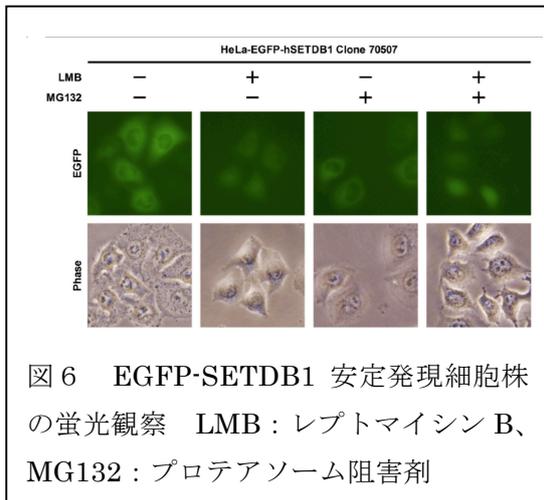


図 6 EGFP-SETDB1 安定発現細胞株の蛍光観察 LMB: レプトマイシン B、MG132: プロテアソーム阻害剤

次に核内の SETDB1 とプロテアソーム阻害剤との関連が示されたことから、この機構に着目し、これを制御する因子の探索を複数の E3 リガーゼを使って行った。その結果、SETDB1 と結合する新たなユビキチン E3 リガーゼ X を見出した。このリガーゼ X は核内で局在する報告があり、SETDB1 の核内でのタンパク質分解に関与している可能性が高い。SETDB1 とリガーゼ X の結合を調べたところ、リガーゼ X はモノユビキチン化を受けない SETDB1 とだけ結合することが明らかとなった (図 7)。これらのことから、SETDB1 がモノユビキチン化されるとインサーション領域が安定な構造をとり、リガーゼ X が結合できなくなることが予想された。今後はリガーゼ X が核内 SETDB1 に及ぼす影響を詳細に解明する。

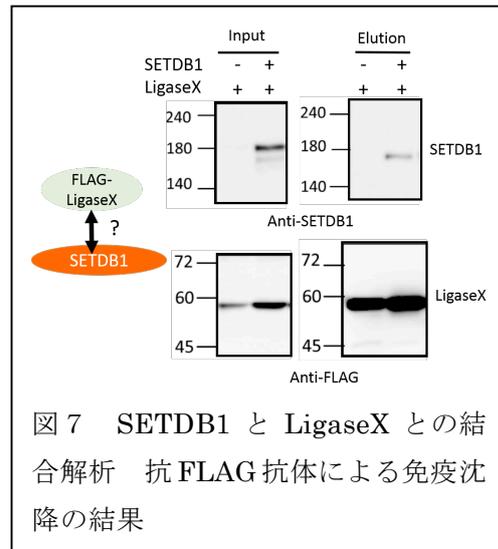


図 7 SETDB1 と LigaseX との結合解析 抗 FLAG 抗体による免疫沈降の結果

(3) 創薬に向けた SETDB1 と MCAF1 の X 線結晶構造解析

申請者らは SETDB1 の酵素活性領域を阻害する薬剤開発を目指し、その立体構造の解析を行ってきた。昆虫細胞 Sf9 において、酵素活性領域を含む SETDB1 (570-1291) の精製系の確立を行ったが、モノユビキチン化修飾と未修飾の 2 本のバンドが混交しているため、単一の生成物が必要となる X 線結晶解析には不向きであった。一方で、哺乳類細胞で発現させた SETDB1 は、モノユビキチン化修飾が大部分を占めていることから、哺乳類細胞での精製を試みた。タンパク質を過剰に発現できる EBAN1/OriP システムを用い、分泌型 GST-SETDB1 の発現を試みた。HEK293 c18 細胞にトランスフェクション後、細胞上清を回収し、その SETDB1 発現量を調べた。抗 SETDB1 抗体を用いた Western Blotting によるバンドが、CBB 染色では確認できなかった (図 8)。X 線構造解析に用いる

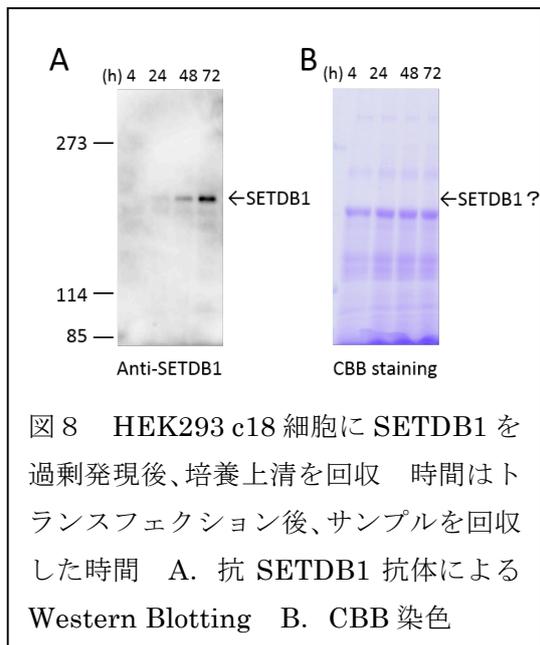
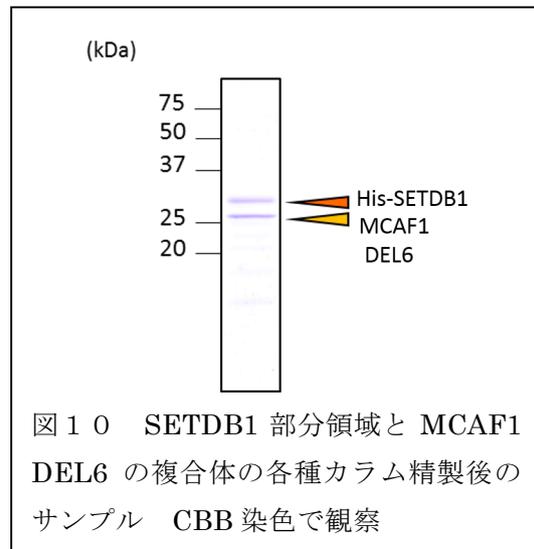
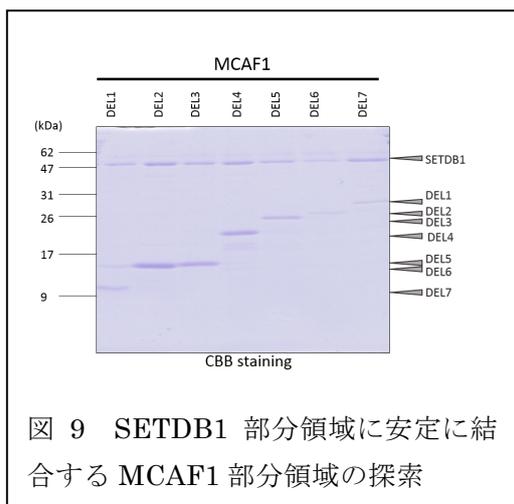


図 8 HEK293 c18 細胞に SETDB1 を過剰発現後、培養上清を回収 時間はトランスフェクション後、サンプルを回収した時間 A. 抗 SETDB1 抗体による Western Blotting B. CBB 染色

タンパク質の量として、ミリグラムレベルが必要なため、本システムでの精製は困難であることがわかった。

SETDB1 と MCAF1 の複合体解析について、GST と His タグを持つ SETDB1 部分領域(約 200 アミノ酸)と MCAF1 部分領域(約 200 アミノ酸)を大腸菌内で共に発現できるプラスミドを作製し大腸菌内での発現を行い、その後アフィニティー、イオン交換、ゲルろ過とそれぞれのカラムクロマトグラフィーを用いて大量精製を試みた。その結果、今回用いた MCAF1 部分領域では、一分子の SETDB1 に対して多量の MCAF1 が結合していることが分かり、それが原因で SETDB1 に付加したタグ切断が困難であることが分かった。そこで、MCAF1 の部分領域をより長くし SETDB1 と MCAF1 の相互作用を安定させる領域を決定するとともに、GST-His-SETDB1 から His-SETDB1 に変更することによって、タグ切断を必要としない新たな精製系の確立を試みた。具体的には MCAF1 の Domain1 領域について、7 種類の長さを有する欠失変異体を作製し、大腸菌内での相互作用を調べた。その結果、DEL6 において、1 対 1 で相互作用することが示唆された(図 9)そこで、このタンパク質複合体を大腸菌内で発現させた後、各種カラムを用いて精製を行い、ほぼ混在物を除去した複合体を得ることができた(図 10)。この精製できたタンパク質を使って、各種バッファー条件での結晶化を行ったが、現時点では結晶が得られていない。引き続き、他の結晶化条件を探索し結晶化を目指すと共に、不安定な SETDB1-MCAF1 複合体をより安定化させるため、抗体や他の結合因子などと複合体を形成させて結晶構造解析を進める必要があると考えられる。



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)

①Ishimoto K, Kawamata N, Uchihara Y, Okubo M, Fujimoto R, Gotoh E, Kakinouchi K, Mizohata E, Hino N, Okada Y, Mochizuki Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Inoue T, Tachibana K, Doi T Ubiquitination of Lysine 867 of the Human SETDB1 Protein Upregulates Its Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase Activity. *PLoS One*,11(10), e0165766,1-19 (2016),査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0165766.

②Tachibana K, Gotoh E, Kawamata N, Ishimoto K, Uchihara Y, Iwanari H, Sugiyama A, Kawamura T, Mochizuki Y, Tanaka T, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T. Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, **456**, 725-731(2015)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.065.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku/publication>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 健史（DOI, Takefumi）
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00211409

(2) 研究分担者

井上 豪（INOUE, Tsuyoshi）
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20263204

橘 敬祐（TACHIBANA, Keisuke）
大阪大学・大学院薬学研究科・特任講師（常勤）
研究者番号：30432446