

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07836

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御に関わるセレノプロテイン含有タンパク質複合体の同定

研究課題名(英文) Identification of the selenoprotein complex functioning epigenetic regulation

研究代表者

廣澤 瑞子 (Hirosawa, Mitsuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60533982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：必須微量元素であるセレンは、エピジェネティック制御に影響を及ぼすとの発見を契機に、我々は、核内に局在する唯一のセレン含有プロテインSelHに注目した。SelHノックダウンマウスES細胞(SelH-KDES細胞)の解析により、SelHはES細胞の多分化能に関わるエピジェネティック因子として、DNAのメチル化とヒストン修飾に関与することが分かった。現在進行中のSelH含有タンパク質複合体の同定は、今後、SelHのエピジェネティクス制御機構解明に大きく貢献すると期待する。

研究成果の概要(英文)：Based on our finding that the selenium which is the essential trace element influences epigenetic regulations, we focused on selenoprotein H (SelH), which is known as the only nuclear protein among selenoproteins. By the analysis of SelH knock down ES cells, we found out that SelH is effect on the DNA methylation status and histone modifications at several pluripotent marker genes, indicating that SelH functions as one of epigenetic factors. We expected that the identification of SelH containing protein complex, which is in progress, might contribute to understanding how SelH participates in epigenetic regulation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：セレノプロテイン ヒストン修飾 DNAメチル化 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

必須微量元素であるセレン (Se) は、生体内においては主に、セレノシステイン (SeCys) として存在しており、SeCys は「21 番目のアミノ酸」として、大腸菌からヒトに至るまで保存されたタンパク質構成必須アミノ酸である。SeCys を含むタンパク質、セレノプロテインは、現在までにマウスにおいて 24 種類の存在が推定されている。申請者らは、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた先の研究で、Se 暴露がヘテロクロマチン構造に影響を与えることを発見した。それを機に、セレノプロテインの中で唯一、核内移行シグナルを持つ SelH に着目し、SelH の有するエピジェネティック因子としての機能解明を試みた。

2. 研究の目的

ES 細胞における SelH のエピジェネティック作用を解析し、SelH 標的ゲノム領域における集積タンパク質の解析を通して、SelH のエピジェネティクス制御機構解明を目指す。

3. 研究の方法

独自に作製した SelH 特異抗体を駆使し、樹立に成功した SelH ノックダウン ES 細胞株の解析によって、SelH を介したエピジェネティック制御が存在するか否かを明らかにすることを試みた。

ES 細胞におけるセレン暴露によって観察されたヘテロクロマチンシグナルの減少という現象を念頭に、SelH ノックダウン ES 細胞株において DAPI 染色による核内ヘテロクロマチン構造の観察を行ったところ、コントロール ES 細胞に比べて、ヘテロクロ

マチンシグナルが減少することがわかった。

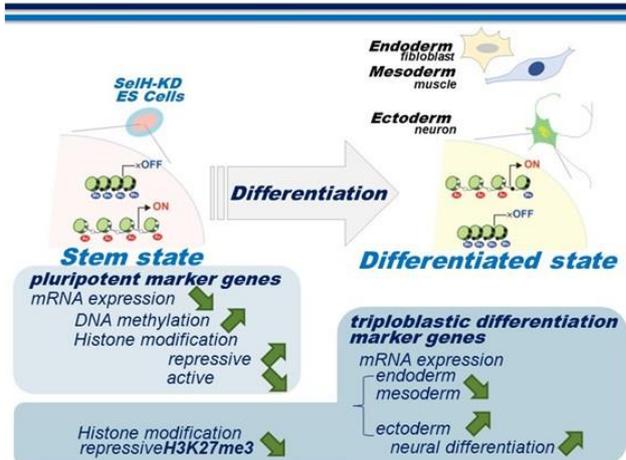
SelH ノックダウン ES 細胞株において、多分化能関連遺伝子である Nanog, Dppa3, Nodal に着目したところ、定量的 PCR 法により、それら遺伝子発現の低下が認められ、さらに、COBRA 法およびバイサルファイトシークエンス法による、それら遺伝子の転写開始点近傍の DNA メチル化状態を解析では、DNA メチル化の亢進が認められた。同時に ChIP 法の結果より、相当する領域では活性型ヒストン修飾である H3K4me3 修飾の低下と抑制型ヒストン修飾である H3K9me3 および H3K27me3 修飾の増加が見られた。

胚葉体形成による分化能評価では、SelH ノックダウンにより内胚葉、中胚葉マーカー遺伝子発現の低下および外胚葉マーカー遺伝子の増加が確認された。さらに SelH-KDES 神経分化誘導実験の結果、神経分化促進が見られたことから、SelH が胚葉分化の方向性決定に関与することが示された。

神経分化過程におけるヒストン修飾状態の解析を行ったところ、神経分化に関与するバイバレント遺伝子領域では、抑制型のヒストン修飾である H3K27me3 修飾が選択的に低下していることが観察され、SelH ノックダウン ES 細胞株における神経分化への促進傾向を説明できる。

以上より、SelH は ES 細胞の多分化能性に関わるエピジェネティック因子であることが明らかになった。

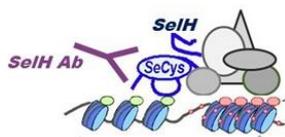
**Sel H functions as epimutagen**



野生型 ES 細胞と申請者によって樹立された SelH ノックダウン ES 細胞を用いて、申請者が作出した抗 SelH 特異抗体を用いた免疫沈降 (IP) により、SelH 標的ゲノム領域における集積タンパク質を調整し、MALDI-TOF/MS を用いてタンパク質の同定は未だ進行中である。野生型とノックダウン間で、SelH 抗体によって沈降できるタンパク質群に差があることは確認できている。今後、タンパク質複合体の全容解明を急ぎたい。

## **How does Sel H function as epimutagen?**

### **Identification of SelH protein complex**



#### 4. 研究成果

本研究によって、SelH は、ヘテロクロマチン構造変化に関与する機能を有し、ES 細胞の多分化能関連遺伝子のエピジェネティック状態を、DNA メチル化およびヒストン修飾の両方向から制御する因子であることが示された。

セレノプロテイン分野においては、グルタチオンペルオキシダーゼの研究が先行してきたことを背景に、これまで、セレノプロテインといえば、SeCys を酵素の活性中心とする抗酸化酵素であると一元化する偏った見解が支配的であった。セレノプロテインの有する機能として、新たにエピジェネティック制御を挙げたという本研究の成果は、セレノプロテイン分野に一石を投じるものである。

#### 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 5 件)

- ① Tabei Y, Hayakawa K, Nara D, Shiota K, Tanaka S and Hirosawa M, Epigenetic effect of selenoprotein H in mES cells, in preparation, 2018
- ② Hayakawa K\*, Hirosawa M\*, Tani R, Yoneda C, Tanaka S, Shiota K. \*equal contribution, H2A O-GlcNAcylation at serine 40 functions genomic protection in association with acetylated H2AZ or  $\gamma$ H2AX. Epigenetics Chromatin. (査読有) 2017, Vol.13. 10(1)51. doi: 10.1186/s13072-017-0157-x.
- ③ Hirosawa M\*, Hayakawa K\*, Yoneda C, Arai D, Shiota H, Suzuki T, Tanaka S, Dohmae N and Shiota K \*equal contribution, Novel O-GlcNAcylation on Ser(40) of canonical H2A isoforms specific to viviparity. Sci Rep. (査読有) 2016, Vol.12(6), p31785 doi: 10.1038/srep31785
- ④ Arai Y, Hirosawa M and Ohgane J et al. Putative epimutagens in maternal peripheral and cord bloods samples identified using human induced pluripotent cells. Biomed Res Int. (査読有) 2015, Vol.2015 (2015), p876047 doi: 10.1155/2015/876047
- ⑤ Arai D, Hayakawa K, Ohgane J, Hirosawa M, Nakao Y, Tanaka S and Shiota K. An epigenetic regulatory element of the Nodal gene in the mouse and human genomes. Mech Dev. (査読有) 2015, Vol.136, p.143-154 doi: 10.1016/j.mod.2014.12.003

[学会発表] (計7件)

- ① 廣澤瑞子、田部井靖亨、早川晃司、奈良大輔、塩田邦郎、田中智、マウス ES 細胞におけるセレノプロテイン H のエピジェネティック作用、2017 年度生命科学会合同年次大会、2017、神戸
- ② 廣澤瑞子、田部井靖亨、早川晃司、奈良大輔、塩田邦郎、田中智、マウス ES 細胞におけるセレノプロテイン H のエピジェネティック作用、第 11 回エピジェネティック研究会、2017、東京
- ③ 早川晃司、廣澤瑞子、谷瑠依子、米田智佳子、田中智、塩田邦郎、ヒストン H2A O-GlcNAc 修飾による哺乳類特有 DNA 修復機構、第 11 回エピジェネティック研究会、2017、東京
- ④ Hirosawa M, Hayakawa K, Yoneda C, Arai D, Shiota H, Suzuki T, Tanaka S, Dohmae N and Shiota K, Novel O-GlcNAcylation on L1 region of canonical H2A specific to isoforms、第 17 回 東京大学生命科学シンポジウム、2017、東京
- ⑤ 廣澤瑞子、早川晃司、米田智佳子、新井大祐、塩田仁志、鈴木健裕、田中智、堂前直、塩田邦郎、ヒストン H2A の L1 領域における胎生動物特異的な新規 O-GlcNAc 修飾、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016、横浜
- ⑥ 早川晃司、廣澤瑞子、谷瑠依子、米田智佳子、田中智、塩田邦郎、ヒストン H2A O-GlcNAc 修飾による哺乳類特有 DNA 修復機構、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016、横浜

- ⑦ 廣澤瑞子、糖による新たなヒストン修飾を発見～胎生動物出現の鍵～、東京大学農学系研究科研究交流会 2016、東京

[図書] (計3件)

- ① 廣澤瑞子監修、日本文芸社、図解 眠れなくなるほど面白い生物の話、2017、全128頁
- ② 廣澤瑞子共著、自由国民社、現代用語の基礎知識 2018、2017、p669-674 セクション化学担当
- ③ 廣澤瑞子共著、自由国民社、現代用語の基礎知識 2017、p687-692 セクション化学担当

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：糖感知エピゲノムバイオマーカー

発明者：塩田邦郎・廣澤瑞子・早川晃司

権利者：国立大学法人 東京大学

種類：特許出願

番号：2015-177176

出願年月日：2015年9月9日

国内外の別：国際

名称：グルコース感受性細胞の保護剤

発明者：塩田邦郎・廣澤瑞子・早川晃司・藤井遼介

権利者：国立大学法人 東京大学

種類：特許出願

番号：2015-077228

出願年月日：2015年4月3日

国内外の別：国際

[その他]

招待講演 (計 2 件)

① 廣澤瑞子、マウス ES 細胞におけるセレノプロテイン H のエピジェネティック作用、日本薬学会第 138 回シンポジウム、2018、金沢

② Mitsuko HIROSAWA, Novel O-GlcNAcylation on Ser40 of canonical H2A isoforms specific to viviparity. Invited by Dr. Yanagimachi R. University of Hawaii, Institute for Biogenesis Research, 2017, Hawaii, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣澤 瑞子 (HIROSAWA, Mitsuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 : 60533982