

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21142

研究課題名(和文) 組織特異的プロモーターの選択的脱メチル化を誘導する因子の探索

研究課題名(英文) Deciphering the factors associated with selective demethylation of tissue-specific gene promoter

研究代表者

樋野 展正 (Hino, Nobumasa)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：90469916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織特異的遺伝子の発現は、そのプロモーター領域のメチル化状態により調節されている。本研究では、細胞分化に伴い組織特異的プロモーターが脱メチル化され活性化するメカニズムを明らかにすべく、DNA脱メチル化関連酵素であるTET1を特定の領域にリクルートする因子を、独自の相互作用解析法である細胞内光クロスリンク法を用いて探索した。その結果、TET1の触媒ドメインに結合する新規因子を同定することに成功し、この因子がTET1の酵素活性を直接促進することを明らかにした。この因子はいくつかの細胞の分化時に活性化することが知られており、今回の発見は細胞分化に伴う新規TET1活性調節機構である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression of tissue-specific gene is regulated by DNA methylation of its promoter region. The hypermethylated promoter is demethylated along with differentiation of the cells to induce the downstream gene expression. The demethylation is regulated by TET family enzymes (TET1-3), however, it is not well understood how these enzymes recognize promoters that should be demethylated at specific time point during cell differentiation. In this study, we attempted to identify TET1-interacting proteins that can recruit TET1 to specific promoter regions. We employed in vivo protein photo-cross-linking technique and identified a novel protein that binds to TET1 catalytic domain in living cells. Interestingly, the active form of this protein directly promoted the enzymatic activity of TET1 in vitro. Considered with the fact that this protein is activated during differentiation of several cell types, our findings suggest the existence of TET1-activity modulating mechanism at cell differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 組織特異的遺伝子 脱メチル化 タンパク質間相互作用 光クロスリンク 非天然型アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は、そのプロモーター領域の CpG 配列のメチル化状態によりエピジェネティックに制御されている。各組織で特異的に発現する遺伝子のプロモーターは未分化な細胞中では高度にメチル化されており、細胞が分化する過程で低メチル化状態へと移行して活性化することが知られている。すなわち、各組織で発現すべき遺伝子のプロモーターは、分化のある段階で何らかのメカニズムにより選択され、脱メチル化を受けるものと考えられる。

DNA の脱メチル化は TET1-3 から構成される TET ファミリータンパク質 (TETs) が 5-メチルシトシンを 5-ヒドロキシメチルシトシンへと変換する反応が起点となって起こる。しかしながら、TETs 自身は配列特異的な DNA 結合能を持たないため、特定のプロモーターが選択的に脱メチル化されるにはこれらの酵素をその領域へと呼び込む「リクルータータンパク質」が必要であると想定される。実際に、NANOG や PRDM14 といった転写因子が TETs を特定の領域にリクルートし、周辺配列の脱メチル化を促進することが報告されている。このような制御機構は TETs がゲノムの特定領域を選択的に脱メチル化する上でリーズナブルであり、幹細胞から成熟細胞への分化過程における TETs の相互作用因子の変化が活性化すべきプロモーターの決定要因であると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、ES 細胞から各胚葉系列への初期分化過程において特定の遺伝子プロモーターの脱メチル化が誘導されるメカニズムについて、ES・胚様体・中胚葉系の各細胞内での TET 相互作用因子の同定・比較を通じて明らかにする。解析対象としては未分化～分化初期の細胞に多く発現する TET1 を選択し、独自手法である細胞内光クロスリンク法を用いて各細胞系列での TET1 相互作用因子を探索する。この解析により TET1 の新規な相互作用因子が同定された場合には、その因子が実際に TET1 を特定のプロモーター領域にリクルートし、DNA 脱メチル化を誘導するのかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 非天然型アミノ酸導入用アデノウイルスベクターの開発

本研究に用いる細胞内光クロスリンク法は、研究対象とするタンパク質に対し、光クロスリンカーとして機能する非天然型アミノ酸を細胞内で部位特異的に導入することを基盤とする手法である。これにより光反応性を付与されたタンパク質は、細胞への光照射によって近傍に位置する相互作用因子との間に架橋を形成する。共有結合によ

って安定化された複合体は細胞から容易に単離できるうえ、質量分析やウエスタンブロット等の解析と組み合わせることにより相互作用因子を明確に同定することが可能である。また、クロスリンク反応を細胞内で行うことから、同定された相互作用は細胞内で実際に生じた相互作用を反映するという特長を持つ。

タンパク質への非天然型アミノ酸導入には、そのアミノ酸に特異的な tRNA およびアミノアシル tRNA 合成酵素をコードする遺伝子を細胞に導入する必要がある。しかしながら、プラスミドベクターを利用する従来法では、利用できる細胞種が限定的である。そこで、ES 細胞や初代培養細胞中に非天然型アミノ酸含有タンパク質を発現させるアデノウイルスベクターの開発を行う。

(2) TET1 に対するクロスリンカー導入箇所の最適化

細胞内光クロスリンク法により TET1 と相互作用する新規リクルータータンパク質を効率良く見出すためには、TET1 とリクルーターとの相互作用領域にクロスリンカーをうまく導入することが重要である。そこで、相互作用に関与すると考えられる TET1 の触媒ドメインにクロスリンカーを導入した変異体を 20 種類程度作製する。さらに、既知相互作用因子である NANOG とのクロスリンク形成を指標にして最適なクロスリンカー導入部位を決定する。

(3) 細胞内光クロスリンク法による TET1 相互作用因子の同定

項目(2)で最適化した位置に光クロスリンカーを有する TET1 を細胞に発現させる。その細胞に波長 365 nm の光を照射することで TET1 クロスリンク複合体を形成させる。この細胞の抽出液から TET1 複合体をアフィニティー精製法によって単離し、精製した複合体に含まれるタンパク質を質量分析法によって同定する。

4. 研究成果

(1) 非天然型アミノ酸導入用アデノウイルスベクターの開発

非天然型アミノ酸としてリジン誘導體である Z-Lysine を選択し、Z-lysine 導入用コンポーネントとしてピロリジル tRNA (tRNA-Pyl) およびピロリジル合成酵素変異体 (PyrRS) を選択した。この tRNA-酵素のペアは終止コドンのひとつである UAG コドンに対して非天然型アミノ酸を導入する。この活性は、遺伝子内部に TAG コドンを持つ GFP 遺伝子 (GFP-TAG) の発現をモニタリングすることで評価できる。アデノウイルスベクターに対し、EF1a プロモーター下流に PylRS を、H1 および U6 プロモーター下流にそれぞれ tRNA-Pyl を繋いだ各発現カセットを搭載した。同様に

EF1a プロモーター下流に GFP-TAG を、H1, U6 プロモーター下流に tRNA-Pyl 繫いだレポーターベクターを構築した。これらのベクターを HeLa 細胞に共導入したところ、Z-Lysine の添加に依存して GFP の蛍光が観察された。すなわち、非天然型アミノ酸導入用アデノウイルスベクターの構築に成功した。実際に、これらのウイルスベクターを用いれば、プラスミドによる遺伝子導入が困難な多種のがん細胞株および初代培養細胞中での非天然型アミノ酸含有タンパク質の発現が可能であることがわかった。さらに、同ベクターを用いて光クロスリンク能を持つ人工アミノ酸 mTmdZLys を導入することにより、初代培養細胞 HUVEC 中でのタンパク質間クロスリンクに成功した (発表論文 4)。

(2) TET1 に対するクロスリンカー導入箇所の最適化

TET 触媒ドメインの既知の立体構造情報および相互作用部位予測プログラムによる解析結果をもとに、クロスリンカー導入部位を計 20 箇所選択した。それぞれの部位にクロスリンカーを含有する TET1 変異体を NANOG とともに 293 細胞に共発現させ、光照射によるクロスリンクの成否をウエスタンブロット法により解析した。しかしながら、いずれの変異体においても NANOG とのクロスリンク形成は検出されなかった。このことから、TET1 と NANOG の相互作用部位は触媒ドメイン中には存在しない、もしくは、両者の相互作用は直接的なものではないことが示唆された。

(3) 細胞内光クロスリンク法による TET1 相互作用因子の同定

一方、項目(2)の解析を進める過程において、TET1 と何らかの内在性因子とのクロスリンク形成が観察された (図 1)。このク

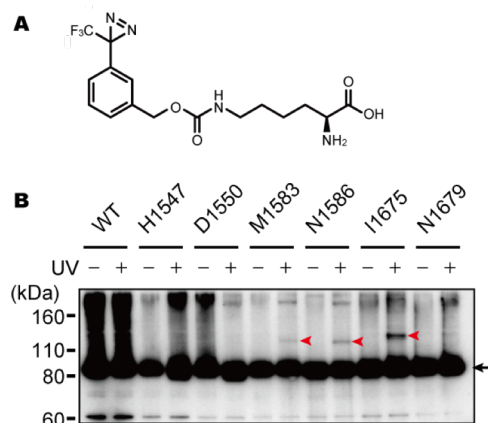


図 1 細胞内光クロスリンク法による TET1 相互作用因子の同定. (A) 光クロスリンク能を持つ人工アミノ酸 mTmdZLys の構造. (B) ウエスタンブロット法によるクロスリンク複合体の検出. TET1 触媒ドメインに対する mTmdZLys 導入部位を上部に示す. UV 照射依存的に検出されるシフトバンド (赤) は TET1 と何らかの内在性因子とのクロスリンク形成を示す。

ロスリンク複合体の構成タンパク質を質量分析法により解析したところ、多様な細胞の分化時に活性化される細胞内シグナルのメディエーターである因子 X が同定された。興味深いことに、両者の相互作用はこのシグナル経路を活性化すると増強し、阻害すると減弱した。また、この相互作用は TET1 の触媒ドメイン中に存在する特定のモチーフに依存することがわかった。さらに、*in vitro* 解析の結果、活性化した因子 X の存在下で TET1 の活性が亢進することが明らかとなった (図 2)。すなわち、因子 X は TET1 の新規活性モジュレーターであり、細胞に分化刺激が加わった際に TET1 の活性を亢進させる役割を持つものと推定される。

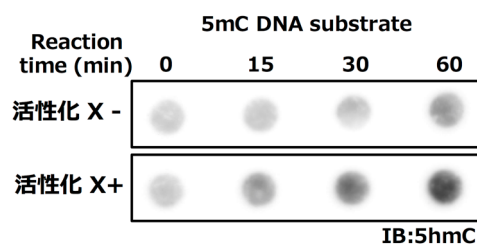


図 2 新規相互作用因子 X 存在下での TET1 酵素活性の亢進. 精製した TET1 触媒ドメインとメチル化 DNA 基質を反応させ、生成物であるヒドロキシメチル化 DNA をドットプロット法により検出した。反応液に活性化させた因子 X を加えるとヒドロキシメチル化 DNA の生成量が増加した。

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 6 件)

1. Tanaka T, Izawa K, Maniwa Y, Okamura M, Okada A, Yamaguchi T, Shirakura K, Maekawa N, Matsui H, Ishimoto K, Hino N, Nakagawa O, Aird WC, Mizuguchi H, Kawabata K, Doi T, Okada Y. "ETV2-TET1/TET2 Complexes Induce Endothelial Cell-Specific Robo4 Expression via Promoter Demethylation" *Sci. Rep.* 2018 8(1):5653. (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-018-23937-8
2. Shirakura K, Ishiba R, Kashio T, Sakai M, Fukushima Y, Yamamoto N, Manabe S, Shigesada N, Tanaka T, Hino N, Aird WC, Doi T, Okada Y. "Endothelial Robo4 regulates IL-6 production by endothelial cells and monocytes via a crosstalk mechanism in inflammation" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018 495:801-806. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.067
3. Ishimoto K, Hayase A, Kumagai F, Kawai M, Okuno H, Hino N, Okada Y, Kawamura T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama

- T, Tachibana K, Doi T. "Degradation of human Lipin-1 by BTRC E3 ubiquitin ligase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017 488: 159-164. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.159
4. Tanaka T, Maekawa N, Kashio T, Izawa K, Ishiba R, Shirakura K, Ishimoto K, Hino N, Aird WC, Doi T, Okada Y. "Tumor Necrosis Factor α Induces the Expression of the Endothelial Cell-Specific Receptor Roundabout4 through the Nuclear Factor- κ B Pathway" *Biol. Pharm. Bull.* 2017 40: 504-509. (査読有)
DOI: 10.1248/bpb.b16-00938
5. Kita A, Hino N, Higashi S, Hirota K, Narumi R, Adachi J, Takafuji K, Ishimoto K, Okada Y, Sakamoto K, Tomonaga T, Takashima S, Mizuguchi H, Doi T. "Adenovirus vector-based incorporation of a photo-cross-linkable amino acid into proteins in human primary cells and cancerous cell lines" *Sci. Rep.* 2016 6:36946. (査読有)
DOI: 10.1038/srep36946
6. Ishimoto 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* 2016 11(10):e0165766. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0165766

[学会発表] (計 5 件)

1. 樋野展正, 廣田康二, 鳴海良平, 堀越亮太, 向山樹, 足立淳, 朝長毅, 土井健史 「がん変異集積表面への光クロスリンカー導入による新規 KEAP1 結合因子の同定」日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会 2017 年
2. 廣田康二, 樋野展正, 鳴海良平, 堀越亮太, 向山樹, 足立淳, 朝長毅, 土井健史 「細胞内光クロスリンク法によるがん変異特異的タンパク質間相互作用解析」日本分子生物学会 第 40 回年会 2017 年
3. 喜多絢海, 東咲子, Jeremia Febrian, 高島成二, 樋野展正, 土井健史 「細胞内光クロスリンク法による TET1 相互作用因子の探索」日本薬学会 第 137 年会 2016 年

4. 喜多絢海, 樋野展正, 東咲子, 廣田康二, 高藤和輝, 高島成二, 水口裕之, 土井健史 「アデノウイルスベクターによる光架橋性アミノ酸のタンパク質への導入」第 15 回 次世代を担うファーマ・バイオフォーラム 2016 年

[図書] (計 1 件)

1. Hino N, Sakamoto K. *Springer* "Covalently Capturing Protein Interactions in Living Cells by Site-Specific Incorporation of Photo-Cross -Linkable Amino Acids. In: Hatanaka Y., Hashimoto M. (eds) Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein." Chapter 8, 159-181.

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋野 展正 (HINO, Nobumasa)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90469916

(2) 研究協力者

高島 成二 (TAKASHIMA, Seiji)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

岡田 欣晃 (OKADA, Yoshiaki)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

喜多 絢海 (KITA, Ayami)

大阪大学・大学院薬学研究科・大学院生