

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：37303
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K08239
 研究課題名(和文) クロマチン修飾酵素群の新規活性測定法の開発とエピジェネティクス解析への応用

研究課題名(英文) Development of the novel assay method for chromatin modified enzymes and application to epigenetics analysis

研究代表者
 椋島 力 (Kabashima, Tsutomu)
 長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20274673
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クロマチン修飾に重要なヒストンおよびDNAの修飾酵素について、簡便で安価かつ特異性が高い新規測定方法を開発し、これら測定法のエピジェネティクス解析への応用を目的としている。

ヒストン脱アセチル化酵素に関しては、修飾アミノ酸と非修飾アミノ酸を識別できる発色反応を開発した。また、DNAメチル化酵素については、制限酵素とFRETを組み合わせた新規活性測定法が開発できた。本法は、これまでの測定法と比べてバックグラウンドを1/10-1/50に低下させることによって、DNAメチル化酵素の高感度測定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティクスは、DNAの塩基配列の変化(変異)なしにゲノム構造を変化させ、遺伝子発現を調節する制御機構を指す。エピジェネティクスは、胚発生や細胞の分化、老化、X染色体の不活性化など様々な生命現象と関連しており、細菌から動物に至るまで広く存在し、生物にとって重要な制御機構である。さらに、エピジェネティクスは、がんなどの疾患との関連も指摘されており、実際に、関連酵素の阻害剤が臨床適応されている。本研究で開発する酵素活性の測定法をエピジェネティクス解析に応用できれば、エピジェネティクスに関連した新たな医薬品の開発や、生命現象の解明に繋がる。

研究成果の概要(英文)：This research purpose is the development of novel assay methods for enzymes related to chromatin modification. Histone deacetylase and DNA methyltransferase are important enzymes in chromatin modification. And these assay methods will be useful for epigenetics analysis. In terms of histone deacetylase, novel color reaction to discriminate modified amino acid and non-modified amino acid could be developed. Regarding DNA methyltransferase, novel assay method could be developed using restriction enzyme and FRET. This method could decrease the background by 1/10-1/50. Therefore, the high sensitivity measurement of the DNA methyltransferase activity was succeeded.

研究分野：生物物理化学

キーワード：エピジェネティクス クロマチン ヒストン DNA 修飾酵素 メチル化 アセチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、DNA の塩基配列の変化 (変異) なしにゲノム構造を変化させ、遺伝子発現を調節する制御機構を指す。エピジェネティクスは、胚発生や細胞の分化、老化、X 染色体の不活性化など様々な生命現象と関連しており、細菌から動物に至るまで広く存在し、生物にとって重要な制御機構である。

エピジェネティクスの分子レベルでの主なメカニズムとして、クロマチンを構成する DNA のメチル化とヒストン修飾 (メチル化・アセチル化・リン酸化など) が知られている。真核生物での DNA メチル化は、シトシンとグアニンが隣接する CpG 部位のシトシンがメチル化され、哺乳類においては、全 CpG 部位の 60-90% のメチル化が報告されている。通常、プロモーター領域の CpG がメチル化されると、遺伝子発現は抑制される。一方、ヒストンの修飾としては、リジン残基のアセチル化がよく研究されている。ヒストンのリジン残基の側鎖は、正に荷電しており、DNA 中の負に荷電したリン酸基と結合する。しかし、リジン残基の側鎖がアセチル化されると、正荷電が中和され、ヒストンと DNA 間の結合が弱まり、転写因子が DNA に結合できるようになる。その結果、ヒストンのアセチル化によって、転写が促進される。これとは逆に、ヒストンの脱アセチル化は、転写を抑制する。これら DNA やヒストンの修飾は、それぞれ対応する酵素が触媒している。

現在のエピジェネティクス解析は、主に、次世代シーケンサーによる DNA メチル化領域の解析やヒストンの構造解析などを中心に行われている。一方、DNA やヒストンの修飾に関連した酵素群の解析は、主に RT-PCR や抗体による発現解析であり、この場合、他のタンパク質との複合体形成や翻訳後修飾による酵素活性の変動を知ることができない。そのため、これら酵素群の生体内での詳細な機能解析には、簡便で安価、特異的、高感度な活性測定法が必要であるが、要求を満たすような測定法は開発されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、クロマチン修飾に重要な酵素群 (ヒストンおよび DNA 修飾酵素) の簡便で安価かつ特異性が高い新規測定方法を開発し、本測定法をエピジェネティクス解析へ応用することを目的とした。エピジェネティクスは、胚発生や老化などの生命現象に加えて、がんなどの疾患との関連も指摘されており、実際に、関連酵素の阻害剤が臨床適応されている。

現在のクロマチン修飾酵素の測定法は、煩雑、特異性が低い、特殊な試薬や特別な機器が必要などの欠点を有している。そのため、本研究の目的とする測定法が開発できれば、生命科学やエピジェネティクスに関連する酵素を標的とした新規医薬品の開発にも有用なツールとなると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、クロマチン修飾酵素の中でも、特に重要だと考えられるヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase: HDAC) および DNA メチルトランスフェラーゼ (DNA methyltransferase: DNMT) について、新規活性測定法の開発を試みた。

(1) HDAC 新規活性測定法の開発

トリプシンは基質となるペプチド中のリジン残基の C 末側を切断する酵素であるが、リジン残基の側鎖が、アセチル化などの修飾を受けると切断することが出来ない。この性質を利用して、HDAC 新規活性測定法の開発を行った。原理としては、まず、N 末端を Boc やアセチル基などで保護したアセチル化リジンを含むペプチドを基質として、HDAC により脱アセチル化を行う。その後、トリプシンで分解を行い、新たに生じた N 末端にアミノ基を持つペプチドを発色または蛍光検出することで、HDAC の活性を測定するという方法である。

(2) DNMT 新規活性測定法の開発

制限酵素の中には、メチル化 DNA を分解できないものが存在する。この性質を利用して、制限酵素と蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を組み合わせた DNMT の測定法の開発を試みた。本測定法の原理は、DNMT によるメチル化部位 (CpG) と制限酵素 (Sma I) 切断部位が重なるように基質 DNA の塩基配列を設計した。また、基質の末端は蛍光基と 2 つの消光基を結合させている。この 2 つの消光基による FRET 効果のため、基質の蛍光は消光されている。この基質を Sma I で切断すると、蛍光基と消光基が離れ、蛍光を発する。一方、基質が DNMT によってメチル化されると、Sma I では切断できない (無蛍光)。つまり、DNMT の活性に比例して、Sma I 切断後の蛍光強度は減少するというものである。

4. 研究成果

(1) HDAC 新規活性測定法の開発

まず、リジン残基の側鎖が修飾されたペプチドと未修飾のペプチドが、トリプシン消化後に識別できるか調べた。この際、切断後のペプチドの検出には、我々が開発した蛍光反応を用いた。その結果、図 1 に示すように、リジン残基の側鎖が未修飾の場合のみ、蛍光検出することができた。この結果は、今回の原理によって、HDAC の活性が測定出来ることを示している。

また、操作の更なる簡便性を期待して、修飾アミノ酸 (アセチル化リジン) と未修飾のアミノ酸が識別できる反応試薬をスクリーニングした。その結果、図 2 に示すように、アセチル化リジンと未修飾のリジンを目視で識別できる呈色試薬を見出した。現在、これらの試薬や反応

を利用した HDAC 新規活性測定法の開発を継続している。

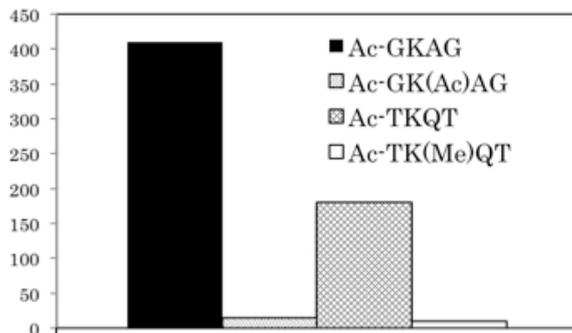


図1 リジン修飾/未修飾ペプチドの蛍光検出

各種ペプチドをトリプシン分解後、蛍光反応を行った。リジンがアセチル化 (Ac-GK(Ac)AG) またはメチル化 (Ac-TK(Me)QT) されたペプチドは、蛍光を発しないが、未修飾リジンのペプチド (Ac-GKAG および Ac-TKQT) は、蛍光検出できた。

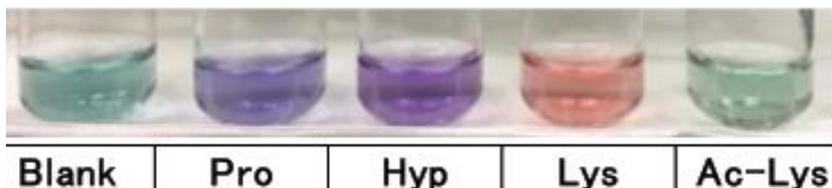


図2 修飾/未修飾アミノ酸の新規呈色反応

リジン (Lys)、アセチルリジン (Ac-Lys)、プロリン (Pro)、ヒドロキシプロリン (Hyp) を呈色試薬と室温で 10 分間反応させた。ヒストン修飾に重要なリジンの修飾について、修飾の有無が目視で確認できた。

(2) DNMT 新規活性測定法の開発

【3. 研究の方法】で述べた方法で DNMT の活性が測定できるか調べた。まず、微生物由来の DNA メチル化酵素 (M.Hpa II) を使用して活性を測定したところ、既存の方法と比較して、2 つの消光基を導入することで、バックグラウンドを 1/10~1/50 に低下させることに成功した (図3)。

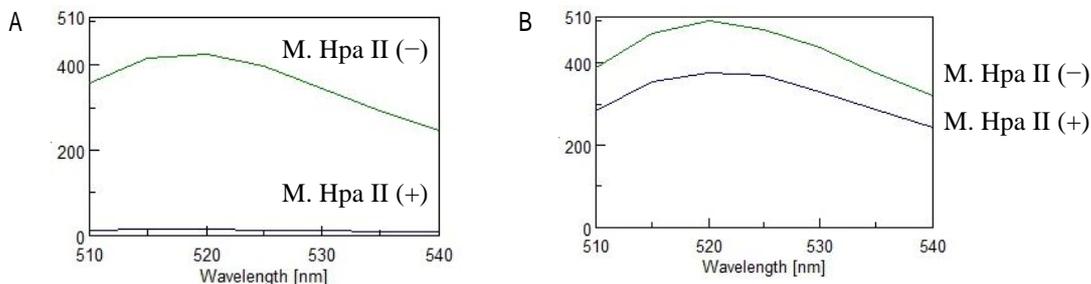


図3 FRET と制限酵素を利用した微生物由来 DNA メチル化酵素 (M.Hpa II) の活性測定

今回開発した方法 (A) は、既存の方法 (B) と比較して、酵素の有無による蛍光強度の差が大きい、つまり、高感度化が期待できる。

次に、反応時間を変化させて、本測定法で M.Hpa II の活性測定を行った。その結果、図 4 に示すように、反応時間の延長とともに、蛍光強度が減少していることから、本測定法によって、DNA メチル化酵素の活性が測定できることがわかった。現在、培養細胞を用いて、核抽出物内の DNMT の活性が測定できるか調査中である。

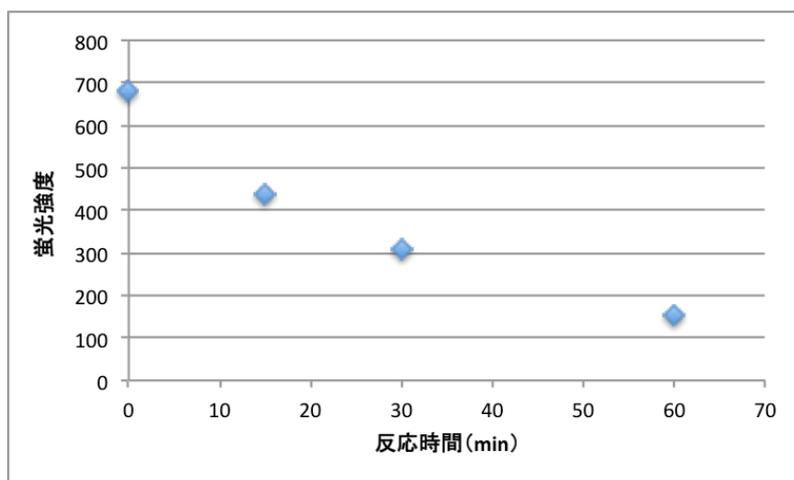


図 4 本測定法による DNA メチル化酵素の活性測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takada Makoto, Ohba Yoshihito, Kamiya Seitaro, Kabashima Tsutomu, Nakashima Kenichiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Simple and rapid analysis of tocilizumab using HPLC fluorescence detection method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Luminescence	6. 最初と最後の頁 347 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bio.3615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kabashima Tsutomu, Tonooka Keiko, Takada Makoto, Kai Masaaki, Shibata Takayuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Simultaneous assay for protease activities of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus based on fluorescence detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45711-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 TAKADA Makoto, OHBA Yoshihito, KABASHIMA Tsutomu, NAKASHIMA Kenichiro, WADA Mitsuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Simple Simultaneous Assay of Methotrexate and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs by HPLC	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2020.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 椛島 力
2. 発表標題 蛍光及び化学発光を応用した生体分子測定法の開発
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志久 優里香、高田 誠、神谷 誠太郎、大庭 義史、椛島 力、中島 憲一郎
2. 発表標題 迅速かつ簡便な生体試料中トシリズマブHPLC蛍光検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中元 瑞綺、高田 誠、神谷 誠太郎、大庭 義史、椛島 力、中島 憲一郎
2. 発表標題 迅速かつ簡便なメトトレキサートとNSAIDsの同時定量法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 友田 沙、神谷 誠太郎、椛島 力
2. 発表標題 ニフェジピンの新規ナノ粒子製剤の調製
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椛島力、安達杏奈、甲斐雅亮、柴田孝之
2. 発表標題 FRETを用いた新規DNA methyltransferase活性測定法の開発
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片山晶誠、甲斐雅亮、椛島力、柴田孝之
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素の新規活性測定法の開発
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島村亮祐、根本俊光、櫻井宏樹、甲斐雅亮、椛島力、柴田孝之
2. 発表標題 ウラシル特異的蛍光反応のDPD欠損症診断法としての展開
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椛島力、安達杏奈、甲斐雅亮、柴田孝之
2. 発表標題 DNA methyltransferase活性測定法用の新規FRETの開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田誠、深堀寛太、神谷誠太郎、大庭義史、椛島力、中島憲一郎
2. 発表標題 生体試料中トリシズマブのHPLC蛍光法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 申田竜誠、高田誠、和田光弘、小平美紗、山本真里奈、神谷誠太郎、桜島力、中島憲一郎
2. 発表標題 ヒト血清中トシリズマブの迅速かつ簡便なHPLC蛍光検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考