

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32525  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K16357  
研究課題名（和文）ヒストン修飾異常解明に向けたヒストンアセチル化酵素翻訳制御因子の同定と機能解明  
  
研究課題名（英文）Identification of translational regulators of histone acetyltransferases  
  
研究代表者  
坂本 明彦（Sakamoto, Akihiko）  
  
千葉科学大学・薬学部・助教  
  
研究者番号：10737290  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌においてポリアミンは、いくつかの転写因子の翻訳を制御することで、遺伝子発現を調節する。本研究では、ヒストンアセチル化に焦点を当て、真核細胞におけるポリアミンの遺伝子発現制御機構を解析した。ポリアミンは、ヒストンアセチル化酵素であるGcn5及びHat1を翻訳レベルで発現促進し、ヒストンアセチル化を促進することで、細胞増殖関連遺伝子の遺伝子発現を制御することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
エピジェネティックな遺伝子発現制御の一つであるヒストン修飾は、異常が起ると、がんなどの疾患の発症に寄与することが知られている。しかし、ヒストン修飾を担う修飾酵素の明確な制御因子は同定されていない。本研究では、細胞増殖因子ポリアミンがヒストンアセチル化酵素の翻訳制御因子であることを明らかにした。したがって、ヒストン修飾異常解明や新薬開発（創薬ターゲット）の基盤となる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Polyamines regulate gene expression in Escherichia coli by stimulating translation of mRNAs encoding global transcription factors. In this study, we focused on histone acetylation, one of the mechanisms of epigenetic regulation of gene expression, to attempt to clarify the role of polyamines in the regulation of gene expression in eukaryotic cells. Polyamines stimulate the translation of histone acetyltransferases Gcn5 and Hat1 at the level of translation, and regulate transcription of genes required for cell proliferation by enhancing histone acetylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストン修飾 遺伝子発現 ヒストンアセチル化酵素 ポリアミン 翻訳

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒストンアセチル化

ヒストンアセチル化酵素によるヒストンのアセチル化を介したクロマチンの構造変化は、遺伝子発現、DNA複製・修復、細胞周期進行などの生命活動に重要な役割を果たしている。ヒストンアセチル化酵素発現の誤制御は、ヒストンアセチル化修飾異常を引き起こし、がんの発生に寄与することが知られている (Shanmugam, MK. *et al. Oncotarget*. 2017, 9(13), 11414-11426)。このことから、ヒストンアセチル化酵素の異常を利用したがんの診断や抗がん標的として阻害剤の開発が行われている (Kaypee, S. *et al. Pharmacol Ther*. 2016, 162, 98-119)。しかし、ヒストンアセチル化酵素の発現制御因子や制御機構は明らかとなっておらず、疾病の根本的な発症原因解明には至っていない。

### (2) 細胞増殖因子ポリアミン

ポリアミンは生物に普遍的に分布し、全身の細胞内に比較的高濃度 (mM オーダー) で存在する生理活性アミンである。細胞内で種々の酸性物質、主として RNA と相互作用し、蛋白質合成を促進する。特に翻訳効率の悪い mRNA の蛋白質合成を円滑にし、細胞増殖・分化・生存率を促進する。このようにポリアミンにより翻訳促進をうける蛋白質をコードする遺伝子群を“ポリアミンモジュロン”と命名されている (Igarashi, K. and Kashiwagi, K. *IUBMB Life*. 2015, 67(3), 160-169)。研究代表者らは大腸菌において、ポリアミンモジュロンを 20 種同定し、そのうち 15 種が転写因子であることから下流の遺伝子群の発現を制御することで、細胞増殖・生存率維持・バイオフィーム形成及び酸化ストレス抵抗性を上昇させることを明らかにした (Sakamoto, A. *et al. PLoS One*. 2015, 10(4), e0124883)。一方、真核生物の遺伝子発現に果たすポリアミンの役割は明らかとなっておらず、ポリアミンの生理機能は未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、真核生物における特徴的な遺伝子発現制御の一つであるエピジェネティクスに着目した。その中でもヒストンアセチル化におけるポリアミンの効果を調べたところ、ポリアミンがヒストンアセチル化レベル、ヒストンアセチル化酵素 Gcn5 及び Hat1 の発現を翻訳レベルで上昇させることを見出した (図 1)。本研究では、ポリアミンによるヒストンアセチル化酵素 Gcn5 及び Hat1 合成促進機構を解析し、ヒストン修飾や遺伝子発現に果たすポリアミンの役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ポリアミンによるヒストンアセチル化酵素翻訳制御機構の解析

Gcn5 及び Hat1 mRNA におけるポリアミン作用部位を同定するため、5'-非翻訳領域 (5'-UTR) とコード領域の N 末端の一部を EGFP レポーター遺伝子に繋げ、部位特異的変異導入法により変異させたプラスミドを数種類作製した。これらのプラスミドを NIH3T3 細胞に形質導入し、ポリアミンの有無による EGFP の発現量の変化を蛍光顕微鏡と Western blotting により比較することで、ポリアミン結合部位を決定した。尚、ポリアミンを減少させる際は、ポリアミン生合成酵素阻害剤である  $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO) を使用した。

(2) ヒストン修飾動態に対するポリアミンの効果と細胞増殖関連遺伝子プロモーター解析

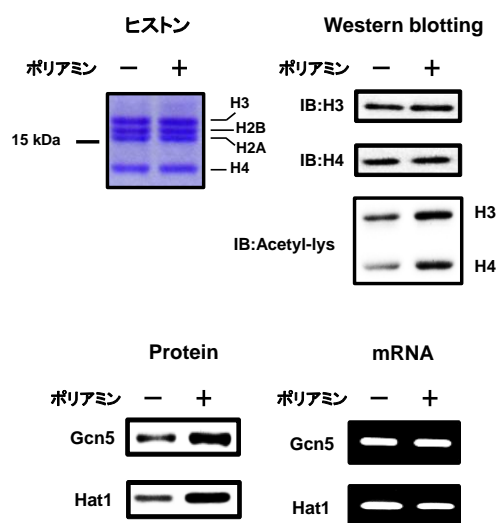


図 1 ポリアミン減少によるヒストンアセチル化及び Gcn5, Hat1 の発現低下

Gcn5 及び Hat1 が修飾するヒストンのリジン残基がポリアミンにより変動しているか各種修飾ヒストン抗体を用いて Western blotting により確認した。細胞増殖関連遺伝子である Ki-67、Pcna 等の発現がポリアミンにより変化するか RT-PCR により解析した。また、これらのプロモーター領域をクロマチン免疫沈降 (ChIP) により定量解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ポリアミンによるヒストンアセチル化酵素翻訳制御機構

ポリアミンは、mRNA の 5'-UTR に作用し、翻訳効率を上昇させることが明らかとなっている (Igarashi, K., Kashiwagi, K. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019, 107, 104-115.)。Gcn5 及び Hat1 mRNA の一部を EGFP に繋げたプラスミド (wild type) と 5'-UTR の構造を欠損させた複数の変異体を作製し、ポリアミンの作用部位を探索した (図 2A, C)。Hat1 においては、wild type も変異体もポリアミンの蛋白質合成促進効果が認められた (図 2B)。Hat1 mRNA は、5'-UTR が 38 ヌクレオチドと非常に短く、ポリアミン作用部位が 5'-UTR に認められなかったことから、以前に報告されたポリアミンの翻訳開始複合体形成促進によることが考えられた (Shimogori, T. *et al. Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 223(3), 544-548.)。一方、ポリアミンによる Gcn5 合成促進機構を解析した結果、wild type でポリアミンの促進効果が見られ、Gcn5 mRNA の 5'-UTR を一部欠損させたことにより、ポリアミンによる蛋白質合成促進効果が消失した。このことから、ポリアミンは Gcn5 mRNA 5'-UTR の開始コドンより上流 21~54 塩基に作用することが明らかとなった (図 2D)。さらに Gcn5 の合成促進に関して詳細に解析したところ、開始コドンより上流 21~54 塩基付近に、micro RNA : miR-7648-5p が結合する部位が認められた (図 3A)。そこで、miR-7648-5p と相補性をなくした変異体と相補性を強めた変異体を作製したところ、両変異体ともにポリアミンの促進効果が消失したが、相補性をなくした変異体では蛋白質合成が著しく低下し、相補性を強めた変異体においては蛋白質合成が増加した (図 3C)。さらに、miR-7648-5p 過剰発現細胞の実験結果より、miR-7648-5p は Gcn5 mRNA 5'-UTR と相互作用し、翻訳を促進するというユニークな機能を有していること、ポリアミンが Gcn5 mRNA と miR-7648-5p との相互作用を強めることで、Gcn5 を翻訳レベルで合成促進することが明らかとなった (図 3D)。

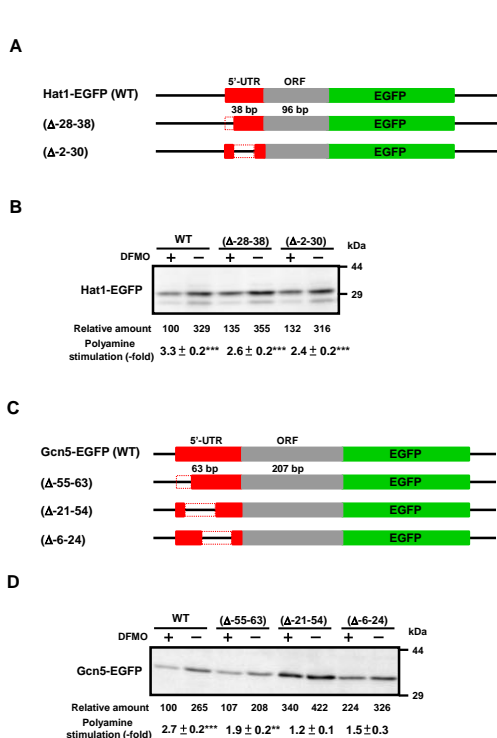


図 2 ヒストンアセチル化酵素 mRNA におけるポリアミン作用部位の探索

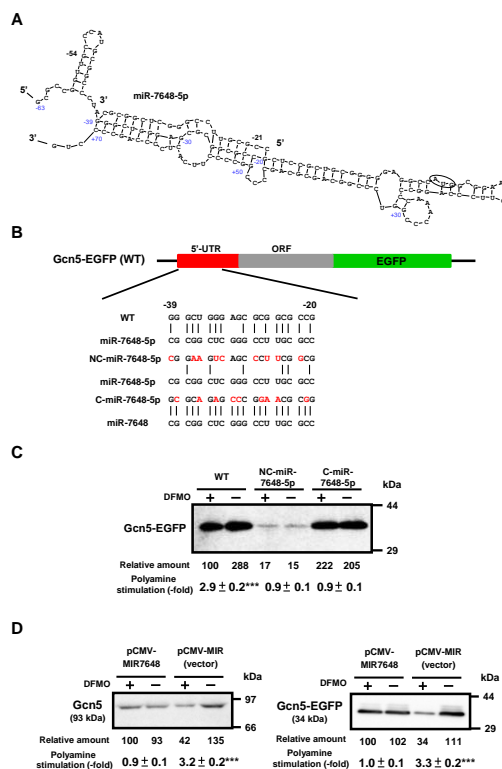


図 3 Gcn5 の蛋白質合成におけるポリアミンと miR-7648-5p の効果

(2) ポリアミンによるヒストンアセチル化を介した遺伝子発現制御

Gcn5 及び Hat1 特異的にアセチル化されるヒストン H3 及び H4 のリジン残基のアセチル化レベルは、ポリアミンにより有意な増加が認められた(図 4)。そこで、細胞増殖関連遺伝子 (Ki-67, PcnA など) の mRNA 量を RT-PCR により測定した結果、ポリアミンにより有意に増加した(図 5A)。また、クロマチン免疫沈降により、細胞増殖関連遺伝子のプロモーター領域をポリアミンの有無で調べた結果、ポリアミンにより活性化されることが明らかとなった(図 5B)。

以上の結果より、ポリアミンはヒストンアセチル化酵素である Gcn5 及び Hat1 を翻訳レベルで合成促進することで、ヒストンアセチル化を促進し遺伝子発現を制御することが明らかとなった。

(3) 今後の展望

本研究により、真核細胞において、細胞増殖因子ポリアミンがヒストンアセチル化酵素の翻訳促進を介して遺伝子発現制御することが明らかとなった。また、ポリアミンの RNA との相互作用に基づいた新たな蛋白質合成促進機構を分子レベルで解析した。したがって、これまでの大腸菌を用いた研究と本研究により、遺伝子発現制御というポリアミンの生理機能の一つを提唱することができた。

今後は、ヒストンメチル化など他のヒストン修飾におけるポリアミンの影響を調べ、ポリアミンの分子基盤及びエピジェネティックの新たな制御因子として確立すべく研究を進めていく。

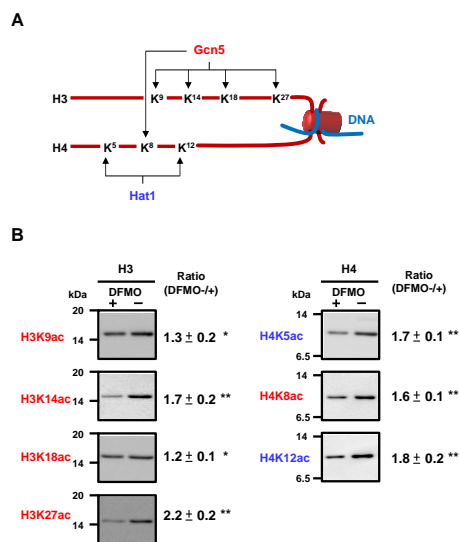


図 4 ポリアミンによるヒストンアセチル化の増加

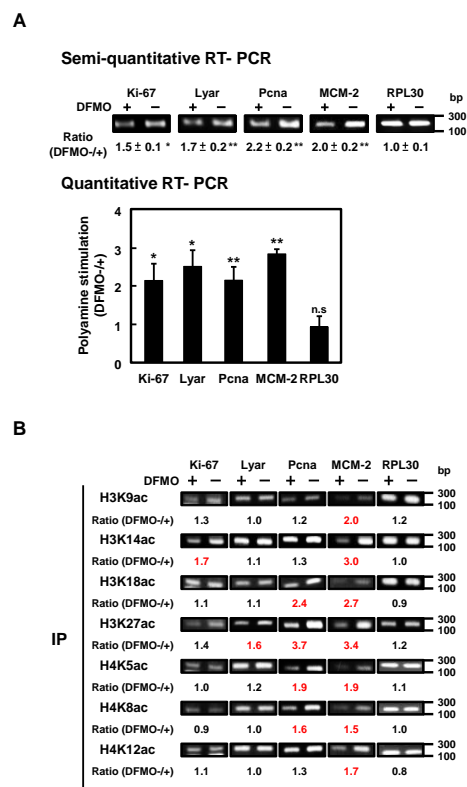


図 5 ポリアミンのヒストンアセチル化を介した遺伝子発現制御

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakamoto A, Terui Y, Uemura T, Igarashi K, Kashiwagi K.	4. 巻 295(26)
2. 論文標題 Polyamines regulate gene expression by stimulating translation of histone acetyltransferase mRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 8736-8745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013833.	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 Sakamoto A, Terui Y, Uemura T, Igarashi K, Kashiwagi K.	4. 巻 22(3)
2. 論文標題 Translational Regulation of Clock Genes BMAL1 and REV-ERB by Polyamines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031307.	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 Uemura T, Suzuki T, Ko K, Nakamura M, Dohmae N, Sakamoto A, Terui Y, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K.	4. 巻 77(10)
2. 論文標題 Structural change and degradation of cytoskeleton due to the acrolein conjugation with vimentin and actin during brain infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytoskeleton (Hoboken)	6. 最初と最後の頁 414-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cm.21638.	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 Sakamoto A, Uemura T, Terui Y, Yoshida M, Fukuda K, Nakamura T, Kashiwagi K, Igarashi K.	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 Development of an ELISA for Measurement of Urinary 3-Hydroxypropyl Mercapturic Acid (3-HPMA), the Marker of Stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Med Sci (Basel).	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medsci8030033.	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 坂本明彦	4. 巻 52(9)
2. 論文標題 細胞増殖因子ポリアミンによるヒストンアセチル化酵素の翻訳促進	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 24-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sakamoto A, Sahara J, Kawai G, Yamamoto K, Ishihama A, Uemura T, Igarashi K, Kashiwagi K, Terui Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Cytotoxic Mechanism of Excess Polyamines Functions through Translational Repression of Specific Proteins Encoded by Polyamine Modulon.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072406.	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 Uemura T, Suzuki T, Ko K, Watanabe K, Dohmae N, Sakamoto A, Terui Y, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of dendritic spine extension through acrolein conjugation with -, -tubulin proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Biochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 58-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocel.2019.05.016	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 -

〔学会発表〕 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 坂本明彦, 照井祐介, 植村武史, 五十嵐一衛, 柏木敬子
2. 発表標題 ポリアミンはヒストンアセチル化を促進して遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本明彦, 照井祐介, 植村武史, 五十嵐一衛, 柏木 敬子
2. 発表標題 ポリアミンは時計遺伝子を翻訳レベルで発現制御する
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村武史, 中村瑞穂, 坂本明彦, 照井祐介, 柏木敬子, 五十嵐一衛
2. 発表標題 アクロレイン毒性を指標とした脳梗塞予防効果を持つ食品成分の同定
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiko Sakamoto, Sachi Iwasaki, Yusuke Terui, Takeshi Uemura, Kazuei Igarashi, Keiko Kashiwagi
2. 発表標題 Polyamines enhance synthesis of the circadian regulator Bmal1 at translational level
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Terui, Akihiko Sakamoto, Junpei Sahara, Gota Kawai, Takeshi Uemura, Kazuei Igarashi, Keiko Kashiwagi
2. 発表標題 Inhibition of cell growth and viability by excess polyamines through translational repression of specific proteins encoded by members of polyamine modulon in Escherichia coli
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎倅千、坂本明彦、佐原潤平、河合剛太、山本兼由、石浜明、植村武史、五十嵐一衛、柏木敬子、照井祐介
2. 発表標題 細胞増殖因子スベルミジンの過剰蓄積が起こす細胞毒性の機序解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎倅千、坂本明彦、照井祐介、五十嵐一衛、柏木敬子
2. 発表標題 ポリアミンによる時計遺伝子Bmal1の合成促進機構解明
3. 学会等名 日本ポリアミン学会 第11回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本明彦、植村武史、照井祐介、柏木敬子、五十嵐一衛
2. 発表標題 尿中アクロレイン代謝物3-HPMA測定法の開発
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〕

千葉科学大学 薬学部 病態生化学研究室 <a href="http://www.cis.ac.jp/~kkashiwagi/">http://www.cis.ac.jp/~kkashiwagi/</a> 千葉科学大学ホーム_教員検索_坂本 明彦 <a href="https://www.cis.ac.jp/teacher/detail/49">https://www.cis.ac.jp/teacher/detail/49</a>
---



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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------