

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651070

研究課題名（和文）セレノプロテインによるエピジェネティック制御

研究課題名（英文）Epigenetic regulation by selenoproteins

研究代表者

廣澤 瑞子 (MITSUKO HIROSAWA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：60533982

研究成果の概要（和文）：

セレン含有タンパク質の中で、唯一の核内タンパク質である SelH が、ゲノム上の特異的な遺伝子領域に結合し、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制御することを示した。これまで、抗酸化作用にのみ注目されてきたセレノプロテインの機能として、エピジェネティック制御という新しい側面があることが明らかになり、環境あるいは栄養因子としてのみならず、エピジェネティックという視点からも、セレンの重要性を提唱する。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that SelH, the only nuclear protein in the selenoprotein family, can bind to specific gene regions on the genome in ES cells to control the epigenetic state of some pluripotency-related genes. Until today, it has been only focused in the antioxidant activity as a function of the selenoprotein. However, there is a new aspect that selenoprotein has the function involved in epigenetic regulation. Since selenoproteins contain selenium as selenocysteine, we proposed the importance of the selenium from the epigenetic prospective, as well as nutritional and environmental point of view.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：エピゲノム・セレノプロテイン

1. 研究開始当初の背景

セレン Se は、必須微量元素であり、日本では厚生労働省により、その所用必要量が定められ、欧米では、サプリメントとして Se が広く摂取されている。一方で、Se は必要レベルの倍程度の摂取量で生体に毒性を示すことが知られており、過剰摂取を防止する配慮から Se は環境基準指定項目に挙げられている。このように、Se は必要量と中毒量の間の適正量の範囲が非常に狭いという特徴を有しており、「生体内における Se」についての理解は、人類の健康維持のために重要である。

Se は、生体内においては主に、システイン(Cys)の硫黄が Se に置き換わったアミノ酸、セレノシステイン (SeCys) の形で存在している。大変興味深いことに、SeCys は、通常「終止コドン」として機能している UGA によってコードされている。このことから、SeCys はタンパク質構成必須アミノ酸であり、「21 番目のアミノ酸」として注目された (Boeck A. et al., *Mol Microbiol.*, 1991)。

これまでの研究では、SeCys が終止コドンによって読み込まれる機構の解明に力が注がれた。申請者らは、GAPsec (Hirosawa-Takamori M. et al., *FASEB J.*, 2008) を含めた SeCys 取り込み必須因子の同定を世界に先駆けて行い、複雑な分子機構の全容解明に挑戦してきた。SeCys 取り込み機構は、大腸菌からヒトに至るまで進化の課程で保存されており、(Hirosawa-Takamori M. et al., *EMBO Rep.*, 2000 & 2004)、生命の根源に関わる機構であることは間違いない。ヒトゲノム計画完了後、バイオインフォマティクスの発展により、現在までに 25 種

類の SeCys 含有タンパク質 (セレノプロテイン) の存在が推定されているものの (Kryukov G. et al., *Science*, 2003)、セレノプロテイン H (SeIH) を含め、機能が明らかになっていないものが未だに多く存在する。

エピジェネティクスは、ポストゲノム研究の新たなパラダイムで、癌、発生異常、生活習慣病等の診断、創薬標的探索、再生医療など、21 世紀の生命科学領域の新たな分子基盤である。環境汚染物質や食品安全性の評価という観点からも、エピジェネティック系に変化を起こすエピ変異原の探索に関心が集まっている。

研究代表者らは、エピ変異原の探索の一環として、マウス ES 細胞に重金属であるセレン (Se) を暴露することにより、細胞核内のヘテロクロマチン構造に変化を来すことを発見した。よって、核内移行シグナルを持つ唯一のセレノプロテイン、SeIH に着目し、Se 暴露からヘテロクロマチン構造形成に至る過程で、SeIH を介したエピジェネティクス制御が存在する可能性を見出すに至った。

2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティック制御因子としてのセレノプロテインの役割を解明することを目的としている。

ヘテロクロマチン構造変化に、どのようにセレノプロテインが関与するかが解明できれば、新規のエピジェネティック制御因子として Se の重要性を提唱することになる。このことは、Se の栄養因子として、または、環境毒性に対して、エピジェネティクスを指標にした新たな評価系の提供につながるばかりでなく、進化上保存されたセレノプロテイン生物学の進展を加速させることが期待

できる。

3. 研究の方法

本研究では、セレノプロテイン H (Se1H) に焦点をあて、Se1H 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ために、まずは、Se1H の分子動態の解析に役立つツールとして、抗 Se1H 特異抗体の作製を試みた。抗原として供する Se1H 組換えタンパク質の発現とその精製に成功し、ウサギ抗血清の作製の委託を行い、得られた抗血清のアフィニティー精製を行った。

さらに、Se1H の発現変化が、セレン暴露によって観察されたのと同様なヘテロクロマチン構造変化を引き起こすか否かを検証するために、Se1H 強制発現/ノックダウン ES 細胞株の確立を試みた。定量的 PCR 法により mRNA レベル、あるいは、得られた抗体を用いたウエスタンブロッティングによりタンパク質レベルでの、Se1H の発現変化が認められる細胞株の樹立に成功した。

Se1H 強制発現 ES 細胞株を用いて、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結果、Se 暴露によって観察されたのと同様に、ヘテロクロマチンシグナルが増加し、一方、Se1H ノックダウン ES 細胞株では、ヘテロクロマチンシグナルは減少した。このように、Se1H はヘテロクロマチン構造変化に関与する機能を有することが示唆された。

Se1H 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ケンス法による、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、同時に ChIP 法の結果より、相当する領域のヒストンの脱アセチル化が認められた。

EGFP 融合 Se1H 強制発現 ES 細胞を用いて、EGFP 抗体で ChIP を行った結果、EGFP 融合 Se1H は Nanog 領域を含む、特異的遺伝子領域に結合していることも明らかになった。

4. 研究成果

本研究によって、Se1H は、ヘテロクロマチン構造変化に関与する機能を有し、また、ゲノム上の特異的な遺伝子領域に結合し、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。

4. 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)

①□Yagi S, Hirosawa M and Shiota K. DNA methylation profile: a composer-, conductor-, and player-orchestrated mammalian genome consisting of genes and transposable genetic elements.

J. Reprod. Dev. 査読有, *in press*, 2012.
② Shchedrina VA, Kabil H, Vorbruggen G, Lee BC, Turanov AA, Hirosawa-Takamori M, Kim HY, Harshman LG, Hatfield DL and Gladyshev VN.
Analyses of fruit flies that do not express selenoproteins or express the mouse selenoprotein, methionine sulfoxide reductase B1, reveal a role of selenoproteins in stress resistance.
J Biol Chem. 査読有,
26;286(34):29449-29461. 2011.
doi: 10.1074/jbc.M111.257600

[学会発表] (計2件)

① 田部井靖享、廣澤瑞子、田中智、八木慎太郎、塩田邦郎
エピジェネティック因子としての Selenoprotein H の機能
第6回エピジェネティクス研究会年会
2012年5月14日、学術総合センター (東京)

② Tabei Y, Hirosawa M, Tanaka S, Yagi S and Kunio Shiota.
Selenoprotein H contributes to epigenetic status in ES cells.
2012 Keystone Symposia "The Life of a Stem Cell: From Birth to Death"
2012年3月15日 Olympic Valley, CA. U.S.A

[図書] (計1件)

廣澤瑞子、八木慎太郎、塩田邦郎、健昂社、
栄養とエピジェネティクス、2012年、p37-62

[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
http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/seika/lab_index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣澤 瑞子 (MITSUKO HIROSAWA)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任准教授
研究者番号 : 60533982

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし