

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510082

研究課題名(和文)ヒ素化合物によるヒストン修飾の多様性とその意義の解明

研究課題名(英文)Variety of histone modifications by arsenic compounds, and the meanings of these modifications.

研究代表者

鈴木 俊英 (Suzuki, Toshihide)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：60256055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ヒ素化合物によるヒストン修飾の多様性を明らかにするとともに、その意義の解明を試みたものである。

三価無機ヒ素 [iAs(III)] は、ヒストンH3をリン酸化およびメチル化修飾する事を明らかにするとともに、細胞内での局在を調べたところリン酸化修飾はある限られたDNAが巻き付いているヒストンでのみ観察された。さらに検討を進め、iAs(III)によって誘導されるFOS、EGR1などの遺伝子が巻き付いているヒストンが修飾を受けている事が明らかとなり、iAs(III)によるこれらの遺伝子の誘導は、ヒストンが修飾されクロマチン構造が緩んだ部位に転写因子が結合して引き起こされる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this work was to evaluate the modification of histone by arsenic compounds, and to elucidate the meanings of these modifications.

Inorganic arsenite [iAs(III)] induced phosphorylation and methylation of histone H3, and phospho-histone H3 was observed as a punctual signals in specific region. Furthermore, we found phospho-histone H3 was localized in the promoter region of FOS and EGR1, which were induced by iAs(III). These results suggested that the modification of histone changes chromatin structure and then induces gene expression.

研究分野：毒性学

キーワード：ヒ素化合物 エピジェネティクス ヒストン修飾 遺伝子誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、ヒストンタンパク質のリン酸化、メチル化、アセチル化などの修飾を介した遺伝子の転写制御 (= エピジェネティックな発現制御) が、組織の形成、生理機能の獲得、細胞分裂制御、毒性発現などとの関連から非常に注目されている。一般にヒ素化合物は変異原性を有さないが、発がん性があり、その発がんメカニズムとして、染色体異常誘発作用、細胞分裂制御異常誘発作用、フリーラジカル産生、がん抑制遺伝子の発現低下およびがん遺伝子の発現増強、DNA のメチル化修飾、ヒストンの異常修飾などが考えられている。しかし、ヒ素化合物によるヒストンの異常修飾については十分解明されていないのが現状である。

(2) 申請者らは、これまで多種のヒ素化合物 (無機ヒ素化合物、メチル化ヒ素化合物、有機ヒ素化合物) による細胞分裂異常および染色体異常の誘発について明らかにしてきた。ヒ素化合物による染色体異常誘発メカニズムについての研究を進めてきた過程で、ある種のヒ素化合物が染色体のヒストン H3 を高度にリン酸化修飾することを見出したが、その意義についてはこれまで十分解明されていない。

(3) 毒性学の分野では、毒性発現へのエピジェネティックな制御についての検討はあまり進んでおらず、本申請課題で行われるヒ素化合物によるエピジェネティックな毒性発現制御の研究は、将来的に他の化学物質、薬物などの毒性発現機構の解明への応用も期待できる。

2. 研究の目的

(1) ヒ素化合物による、ヒストン修飾の多様性を明らかにする

これまでの研究過程で、ヒ素化合物の種類によってヒストンの修飾には多様性があることを示唆する結果を得ており、ヒ素化合物によりヒストンのどのアミノ酸残基がどのような修飾 (メチル化、アセチル化、リン酸化など) を受けるかを明らかにする。また、ヒ素化合物により修飾されるヒストンの細胞内での局在性についても明らかにする。

(2) ヒ素化合物により誘発されるヒストン修飾機構を明らかにする

ヒストン H3 のリン酸化について予備的な検討を行い、ヒ素化合物の種類によってヒストンリン酸化に参与するリン酸化酵素が異なる可能性があることが予想された。そこで、ヒ素化合物によるヒストンのリン酸化修飾を含めメチル化、アセチル化などに関与するシグナル伝達系を明らかにする事により、ヒ素化合物によるヒストン修飾メカニズムの全体像を把握する。

(3) ヒ素化合物によるヒストン修飾が、遺伝子の転写制御に及ぼす影響を明らかにする

種々の遺伝子は、ヒストンのアセチル化、リン酸化などの修飾により転写制御されていることが知られている。ヒ素化合物により多種の遺伝子が誘導されるが、これらの遺伝子の中には、ヒストンの修飾により発現制御されているものもある可能性が十分考えられ、これらの遺伝子を特定する。

本研究の最終目的は、ヒ素化合物により誘発されるヒストン修飾の多様性とその意義を明確にすることにより、これまでに知られていないヒ素化合物の毒性発現メカニズムを見出そうとするものである。毒性発現に参与する未知のターゲットが明らかとなれば、世界的に見られるヒ素化合物による慢性毒性の予防や治療への応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒ素化合物によるヒストン修飾の多様性について

ヒ素化合物によりヒストンがどのような修飾を受けるかをヒストン H3 に焦点を絞り、修飾ヒストン H3 特異抗体を用いイムノプロットングにより検討した。

《使用した修飾ヒストン特異抗体》

・メチル化

リジン 4 (モノ、ジ、トリメチル化)

-H3K4me, -H3K4me2, -H3K4me3,

リジン 9 (モノ、ジ、トリメチル化)

-H3K9me, -H3K9me2, -H3K9me3,

リジン 27 (モノ、ジ、トリメチル化)

-H3K27me, -H3K27me2, -H3K27me3,

リジン 36 (モノ、ジ、トリメチル化)

-H3K36me, -H3K36me2, -H3K36me3,

・アセチル化

リジン 9: -H3K9ac,

リジン 14: -H3K14ac

リジン 18: -H3K18ac

リジン 27: -H3K27ac

・リン酸化

セリン 10: -H3S10p,

スレオニン 11: -H3T11p,

セリン 28: -H3S28p,

・メチル化+リン酸化

リジン 9, セリン 10: -H3K9me3S10p,

また、イムノプロットングによりヒ素化合物により修飾が促進する事が確認された、H3K9me2, H3S10p, H3T11p, H3K9me3S10p の細胞内局在について、細胞周期のどのステージで、核内のどの部分に修飾されたヒストンが局在しているかを免疫蛍光染色法で検討した。

(2) ヒ素化合物により誘発されるヒストン修飾機構

ヒストンのリン酸化には、MAP kinase (Erks、p38)、Aurora-B kinase、

MSK1(mitogen- and stress-activated kinase 1)、Ribosomal Protein S6 Kinase (RSK)などが関与することが知られている。これらのどのキナーゼがヒ素化合物により活性化されるかを確認するとともに、阻害剤を用いヒストン修飾に関与している経路を明らかにする。また、ヒストンのアセチル化、メチル化に関しても、これらに關与する酵素の阻害剤を用い、ヒ素化合物によるヒストン修飾メカニズムを明らかにする。

(3) ヒ素化合物によるヒストン修飾が、遺伝子の転写制御に及ぼす影響

まず、ヒストンの修飾部位のアミノ酸を修飾されない他のアミノ酸に変異させたミュータント細胞を確立する。そして、これらの細胞を用いヒ素化合物による遺伝子誘導への影響を検討し、ヒストン修飾と転写制御の関連を明確にする。次いで、変異を入れたミュータント細胞で誘導が抑えられた *FOS*、*EGR1*、*IL8* についてクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を用い、ヒ素化合物により修飾が促進された H3K9me2、H3S10p、H3T11p、H3K9me3S10p が、*FOS*、*EGR1*、*IL8* プロモーター領域が巻き付いているヒストンで観察されるかを検討した。また、*FOS*、*EGR1*、*IL8* プロモーター領域をルシフェラーゼベクターに導入しプロモーターアッセイを行い、*FOS*、*EGR1*、*IL8* の誘導に關与する転写因子結合配列を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒ素化合物によるヒストン修飾の多様性について

20種類のヒストンH3の修飾について特異抗体を用いて検討したところ、3価無機ヒ素 [iAs(III)] により H3K9me2、H3K9me3、H3S10p、H3T11p、H3K9me3S10p 修飾は亢進し、H3K14ac 修飾は抑えられた (表1)。また、免疫蛍光染

表1 3価無機ヒ素[iAs(III)]によるヒストンH3の修飾

	3hr	0 μM	5 μM	25 μM	50 μM
H3K4me		1.00	1.06	1.10	0.92
H3K4me2		1.00	0.91	0.70	0.61
H3K4me3		1.00	0.90	1.31	0.84
H3K9me		1.00	0.73	0.84	0.90
H3K9me2		1.00	1.19	2.91	4.94
H3K9me3		1.00	1.06	2.88	2.41
H3K27me		1.00	1.06	1.76	1.80
H3K27me2		1.00	0.57	1.32	1.15
H3K27me3		1.00	0.59	0.66	0.68
H3K36me		1.00	0.99	1.21	1.20
H3K36me2		1.00	0.97	1.04	1.06
H3K36me3		1.00	1.24	0.91	1.18
H3K9ac		1.00	0.95	1.00	1.13
H3K14ac		1.00	0.50	0.53	0.32
H3K18ac		1.00	0.72	1.03	0.90
H3K27ac		1.00	0.91	0.95	1.00
H3S10p		1.00	9.13	17.53	12.72
H3T11p		1.00	1.45	7.83	4.02
H3S28p		1.00	1.06	1.10	1.07
H3K9me3S10p		1.00	8.03	14.93	11.05

色法でこれらの修飾の細胞内局在を検討したところ、H3S10p、H3T11p、H3K9me3S10p はドット状のシグナルが観察され、クロマチン

の特定の部位限定的に修飾を受けている事が明らかとなった。一方、H3K9me2 はクロマチン全体が修飾されていた。また、H3S10p と H3K9me3S10p は一部局在が一致していた (図1) が、H3T11p は局在が異なっていた。

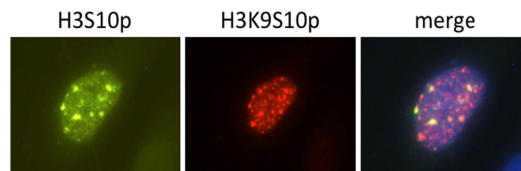


図1 3価無機ヒ素[iAs(III)]により修飾されるヒストンH3の細胞内局在

(2) ヒ素化合物により誘発されるヒストン修飾機構

細胞を Erks カスケードの阻害剤 (U0126) で前処理すると、iAs(III) によるヒストンH3のリン酸化が抑制される (図2) とともに *FOS*、*EGR1*、*IL8* の誘導が抑えられた (図3)。

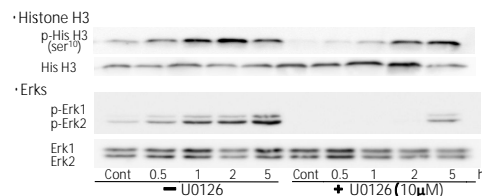


図2 iAs(III) (50 μM) によるHistone H3リン酸化におよぼすErks阻害剤の作用 (HepG2細胞)

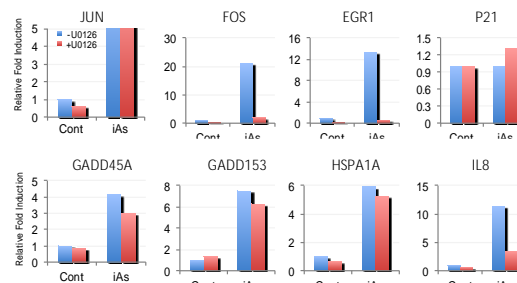


図3 iAs(III) (50 μM) によるmRNA発現におよぼすErks阻害剤の作用 (HepG2細胞)

一方、Aurora B キナーゼの阻害剤 (ZM447439)、p38の阻害剤 (SB239063)、MSK1の阻害剤 (H89) および RSKの阻害剤 (BI-D1870) で細胞を処理しても顕著な違いは認められなかった。

また、ヒストンメチル化酵素の阻害剤 (BIX01294、BIX01338、UNC0646) の作用は顕著ではなく、さらなる検討が必要と思われる。ヒストンアセチル化は iAs(III) により増強されなかったため、検討しなかった。

(3) ヒ素化合物によるヒストン修飾が、遺伝子の転写制御に及ぼす影響

ヒストンH3のセリン10をアラニンに変異させた遺伝子を高発現させた細胞では、iAs(III)による *FOS*、*EGR1*、*IL8* の誘導が抑えられたことより、これらの遺伝子の誘導にはヒストン修飾が関与している事が示唆された (図4)。次いで、ヒ素化合物により修飾が亢進された、H3K9me2、H3S10p、H3T11p、H3K9me3S10p 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行い、*FOS*、*EGR1*、*IL8* のプロモーター領域が巻き付いているヒストンが修飾

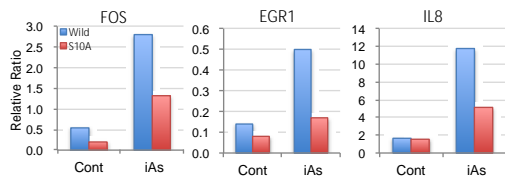


図4 ヒストンH3Ser10をAlaに置換した遺伝子を導入した細胞(S10A細胞)でのiAs(III)により誘導される遺伝子の発現変化(HeLa細胞)

されているかを検討した。その結果、*FOS* 遺伝子は転写開始点付近および、転写開始点上流-200~-300bp 付近のDNAが巻き付いているヒストン H3 が iAs(III) 処理により H3S10p、H3K9me3S10p へと修飾されていることが明らかとなった。一方、*EGR1* 遺伝子は転写開始点上流-100bp 付近のDNAが巻き付いているヒストン H3 が、iAs(III) 処理により H3S10p、H3K9me3S10p へと修飾されていることが明らかとなった。

さらに、*FOS* および *EGR1* 遺伝子についてプロモーターアッセイを行ったところ、iAs(III)による *FOS* の誘導には転写開始点上流-200~-800bp 間に存在する HSE、SIE、ELK1、SRE が、一方 *EGR1* の誘導には転写開始点上流-50~-300bp 間に存在する SRE、CRE 配列に結合する転写因子が関与する事が明らかとなった。

これらの結果を考え併せると、iAs(III)による *FOS* および *EGR1* の誘導は、Erks の系を介して *FOS* および *EGR1* のプロモーター領域が巻き付いているヒストン H3 がリン酸化修飾を受け、クロマチン構造が緩んだ所に転写因子が結合して誘導される可能性が示唆された。

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 1 件)

Toshihide Suzuki, Kayoko Kita, Takafumi Ochi, Phosphorylation of histone H3 at serine 10 has an essential role in arsenite-induced expression of FOS, EGR1 and IL8 mRNA in cultured human cell lines, J. Appl. Toxicol., 査読有、33(8)、2013、pp.46-755 (2013)

[学会発表](計 4 件)

渡邊裕史、鈴木俊英、北加代子、越智崇文：3 価無機ヒ素 [iAs(III)] による遺伝子発現に関与する転写因子とヒストン H3 修飾の関連性：日本薬学会第 135 年会 (2015、3；神戸)

鈴木俊英、保坂早紀、北加代子、越智崇文：3 価無機ヒ素 [iAs(III)] による *FOS* および *EGR1* 遺伝子プロモーター近傍のヒストン H3 修飾について：日本薬学会第 134 年

会 (2014、3；熊本)

鈴木俊英、北加代子、越智崇文：3 価無機ヒ素 [iAs(III)] によるヒストン H3 の修飾：日本薬学会第 133 年会 (2013、3；横浜)

鈴木俊英、北加代子、越智崇文：3 価無機ヒ素 [iAs(III)] によるヒストン H3 の修飾：日本薬学会第 132 年会 (2012、3；札幌)

[図書](計 0 件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 俊英 (SUZUKI, Toshihide)
帝京大学・薬学部・准教授
研究者番号：60256055

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：