

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24613007

研究課題名(和文)クロマチン脱修飾酵素によるヌクレオソームの制御研究

研究課題名(英文)Study on nucleosomes and chromatin-demodifying enzymes

## 研究代表者

梅原 崇史 (Umehara, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：20415095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性がんや生活習慣病の発症との関連が示唆されているヒストン脱メチル化酵素LSD1/LSD2ファミリーによるリジンメチル化ヌクレオソームの制御機構解析系の樹立を目指した。LSD1/LSD2がクロマチンを認識して脱メチル化を行う際に基質とする残基特異的monoメチル化ヒストンH3タンパク質について、大腸菌無細胞合成系でのBoc保護monoメチルリジンの遺伝的導入法と化学的な脱保護反応を組み合わせることにより、任意残基にmonoメチル化修飾を導入したヒストンH3の調製法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is to establish biochemical assay systems for understanding of regulatory mechanisms of lysine-methylated nucleosome core particles through the histone demethylase family of LSD1/LSD2 (Lysine-specific demethylase-1/2) which is assumed in the onsets of intractable cancers and/or lifestyle-related diseases. We achieved cell-free protein production methodology to synthesize full-length histone H3 protein containing a site-specific mono-methyl-lysine, which is the demethylation substrates for LSD1/LSD2 in the context of chromatin, through the combination of site-specific incorporation of Boc-protected mono-methyl-lysine into a protein during translation and chemical removal of the Boc group.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：遺伝子発現 構造解析 エビジェネティクス エピゲノム クロマチン 染色体 ヒストン ヌクレオソーム

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする真核生物の遺伝子発現は、ゲノム DNA の配列情報だけでなく、ヒストンの翻訳後修飾と DNA の修飾を主体とするエピジェネティック (後成的) な情報によって制御される。ヒストンに対するエピジェネティック情報の制御因子は、ヒストンアセチル化酵素やヒストン脱アセチル化酵素の同定以降、メチル化・リン酸化・ユビキチン化等の修飾・脱修飾・認識に関わる因子群が数多く同定されている。このうち、ヒストンの脱メチル化反応は最初の脱メチル化酵素 LSD1 が 2004 年に同定された比較的新規のエピジェネティクス制御カテゴリーであり、その制御機構には不明な点が多い。LSD1 はヒストン H3 (Lys4 を主に脱メチル化する) だけでなく、がん抑制因子 p53 や DNA メチル化酵素 Dnmt1 を脱メチル化することも示唆されており (Nature 449, 105, 2007; Nature Genetics 41, 125, 2009)、クロマチン転写を複数の経路で制御していると考えられる。また、ヒストンの脱メチル化は十文字ドメインを含むファミリーと FAD を補酵素とする LSD ファミリーによって担われているが、十文字ファミリーはヒトで 28 種類存在することが示唆される一方、LSD ファミリーはヒトで LSD1 と LSD2 の 2 種類のみから構成され、酵素活性中心を形成する補酵素の FAD を介して mono-または di-メチルリジンのみを脱メチル化する特徴がある。また、LSD2 も LSD1 と同様にヒストン H3 の Lys4 を主要な脱メチル化標的とすることが示唆されているが、研究開始時点においてその立体構造は解明されておらず、LSD2 の構造や LSD2 がクロマチン制御に果たす役割は不明であった。また、LSD1/2 が基質とするメチル化ヒストン等を精密に合成する手法も限定的であった。

2. 研究の目的

以上の背景に基づいて、本研究ではヒト脱メチル化酵素 LSD ファミリーがメチル化修飾ヌクレオソームを脱メチル化して転写抑制に働く分子機構の解明に資するため、生化学的なヌクレオソーム脱修飾解析系の構築と LSD1/LSD2 ファミリーによる機能解析を行うことを目的とした。そのため、LSD1/LSD2 によるクロマチン脱修飾の基質となる真正な翻訳後修飾を含むヌクレオソーム複合体「エピヌクレオソーム」の調製技術開発について、特に mono メチル化リジンの残基特異的な導入技術の開発を目指した。あわせて、真核細胞におけるエピジェネティクス制御タンパク質やその複合体について結晶化純度での調製技術開発を目指した。

3. 研究の方法

LSD1/LSD2 が脱修飾標的とするメチル化リジンを導入したヒストン・ヌクレオソームを

調製・再構成するために、大腸菌内発現ベクターに該当ヒストン遺伝子および amber suppression による非天然アミノ酸の導入のために残基特異的なコドン位置を TAG に置換した cDNA を準備し、大腸菌無細胞抽出液を用いたタンパク質の合成・精製を行った。大腸菌無細胞合成では、PCR 増幅した直鎖 cDNA またはその環状化プラスミドを転写反応の鋳型として、培養大腸菌の抽出液を用いた無細胞転写・翻訳連結反応系でのタンパク質合成反応を行った。調製したタンパク質のうち、ヒストン H3 については、沈殿画分の変成・可溶化・塩透析とカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。Boc 保護した全長ヒストンタンパク質については、トリフルオロ酢酸溶液による脱 Boc 反応の条件検討を行い、最終産物について質量分析および残基特異的な mono メチル化認識抗体によるウェスタンブロッティングにより、選択的な修飾導入の有無を検討した。LSD1/LSD2 タンパク質はそれぞれ大腸菌および昆虫細胞ウイルス発現系による発現を行い、カラムクロマトグラフィーと濃縮等により結晶化純度の試料を調製し、機能・構造解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 残基特異的な Boc-mono メチルリジンを含むヒストンタンパク質の合成

3.の方法により、ヒト全長ヒストンへの Boc 保護 mono メチルリジンの翻訳段階での導入検討を行った (図 1)。mono メチル化の導入残基は LSD1, LSD2 が脱メチル化反応の基質とするヒストン H3 の Lys4 と、LSD1 については複合体形成により脱メチル化すると報告されている Lys9 を選択した。また、比較対照実験用として、遺伝子転写抑制に関わる Lys27、および遺伝子転写伸長制御に関わる Lys36 への mono メチルリジンの導入も検討に含めた。

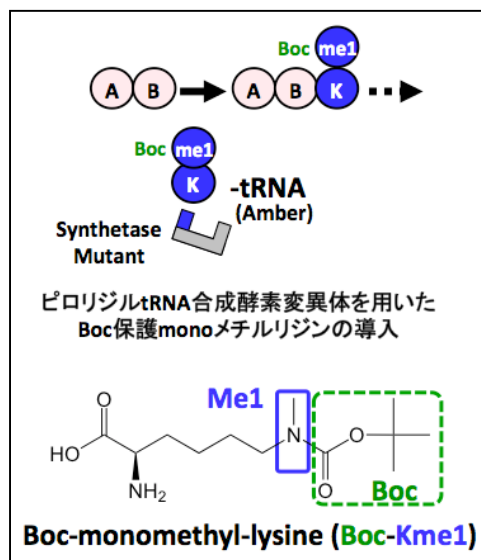


図 1 Boc-mono メチルリジンのタンパク質への遺伝的導入法の検討

ピロリジルtRNA合成酵素の変異体とピロリジルtRNA等を用いたタンパク質合成反応を検討した結果、これらの因子と Boc-mono リジンを添加した際に TAG コドンの amber suppression が起こり、Boc-mono メチルリジンを導入した全長ヒストン H3 が合成可能な反応条件を取得した (図 2 上)。

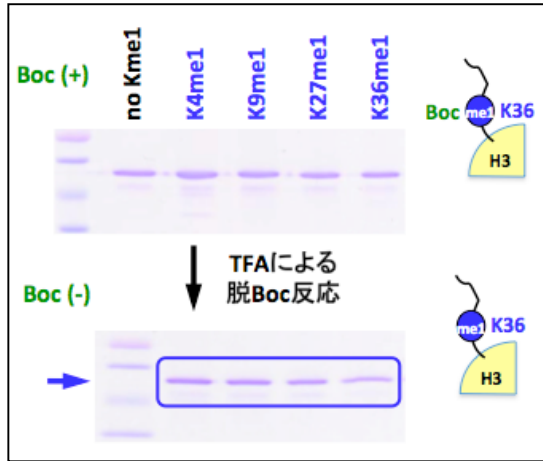


図 2 ヒストン H3 への Boc-mono メチルリジンの導入と脱 Boc 反応

## (2) 脱 Boc 反応による残基特異的な mono メチル化ヒストンの調製

上記により調製した大腸菌無細胞合成ヒストン H3 について、化学反応による脱 Boc 反応を検討した。トリフルオロ酢酸溶液を用いて 4°C で反応させることにより、タンパク質の分解等を起こさずに脱 Boc 反応が進行する条件を見出した (図 2 下)。これらの脱 Boc 反応が完全に進行したことを質量分析によって確認した。また、各位置の mono メチル化リジン修飾を特異的に認識する抗体を用いて残基特異的な mono メチル化と脱保護の確認を行い、検討した全ての全長ヒストン H3 タンパク質について、設計した位置に残基特異的な mono メチルリジンを導入できたことを検証した (図 3) (文献⑤)。

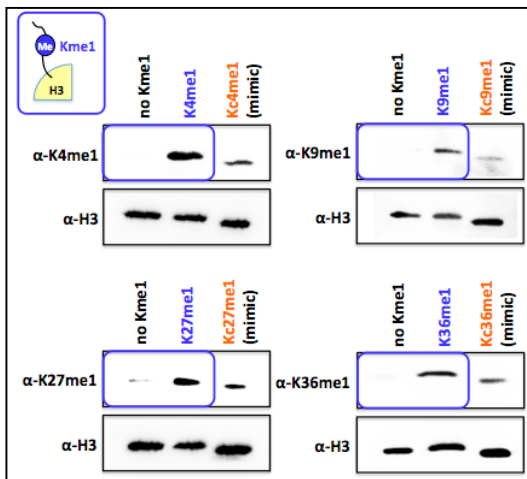


図 3 全長ヒストン H3 に導入した残基特異的な mono メチル化修飾の確認

## (3) ヒストン脱メチル化酵素 LSD2 の機能・構造解析

ヒストン脱メチル化酵素 LSD2 について昆虫細胞ウイルスを用いた発現系により、LSD2 のほぼ全長領域に相当するタンパク質のミリグラム規模での発現を行った。このタンパク質のアフィニティー精製により、X 線構造解析グレードの LSD2 タンパク質の単結晶を取得した。本研究では、LSD2 の基質ペプチドや LSD2 の脱メチル化阻害が予想される候補化合物との複合体の結晶化について条件検討した。この結晶化純度の LSD2 タンパク質については熊本大学発生医学研究所・日野信次朗助教および中尾光善教授らのグループとの共同研究により LSD2 を特異的に認識する抗体を取得した。この抗体を利用した免疫沈降実験等により、LSD2 が脂質代謝関連遺伝子群の発現制御に関与することが明らかとなった (文献②)。

## (4) 真核タンパク質複合体の調製技術開発

上記の成果に加え、本研究では真核細胞タンパク質複合体の調製技術開発にも貢献した。ピキア酵母を用いた複合体サブユニット遺伝子へのゲノムタグ法による複合体の調製法を明星大学・須賀則之准教授らとの共同研究により開発した (文献③)。この手法により、真核転写酵素複合体を 10L 規模の培養によりミリグラム規模で調製しうることを検証した。さらに、調製した複合体は結晶構造解析が可能な高純度であることを理化学研究所・関根俊一チームリーダーらとの共同研究により見出した (文献③)。これらの真核タンパク質複合体の調製技術は、ヒストンのメチル化等を制御するエピジェネティクス修飾・脱修飾酵素複合体の簡便な調製とその機能・構造解析に資する。

## 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 7 件)

- ① \*Tochio, N., \*Umehara, T., Nakabayashi, K., Yoneyama, M., Tsuda, K., Shirouzu, M., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Yokoyama, S. "Solution structures of the DNA-binding domains of immune-related zinc-finger protein ZFAT" *J. Struct. Funct. Genomics* 16 (2): 55-65 (2015). 査読有  
DOI: 10.1007/s10969-015-9196-3.
- ② Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., Yokoyama, S., Sasaki, Y., Nakao, M. "Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells" *Mol. Cell. Biol.* 35 (7): 1068-1080 (2015). 査読有

- DOI: 10.1128/MCB.01404-14.
- ③ Higo, T., Suka, N., Ehara, H., Wakamori, M., Sato, S., Maeda, H., Sekine, S. I., Umehara, T., Yokoyama, S. "Development of a hexahistidine-3× FLAG-tandem affinity purification method for endogenous protein complexes in *Pichia pastoris*" J. Struct. Funct. Genomics 15 (4): 191-199 (2014). 査読有  
DOI: 10.1007/s10969-014-9190-1.
- ④ Yanagisawa, T., Umehara, T., Sakamoto, K., Yokoyama, S. "Expanded genetic code technologies for incorporating modified lysine at multiple sites" ChemBiochem 15 (15): 2181-2187 (2014). 査読有  
DOI: 10.1002/cbic.201402266.
- ⑤ \*Yanagisawa, T., \*Takahashi, M., Mukai, T., Sato, S., Wakamori, M., Shirouzu, M., Sakamoto, K., #Umehara, T., #Yokoyama, S. "Multiple site-specific installations of N<sup>ε</sup>-monomethyl-L-lysine into histone proteins by cell-based and cell-free protein synthesis" ChemBiochem 15 (12): 1830-1838 (2014). 査読有  
DOI: 10.1002/cbic.201402291.
- ⑥ \*Niwa, H., \*Handa, N., Tomabechi, Y., Honda, K., Toyama, M., Ohsawa, N., Shirouzu, M., Kagechika, H., Hirano, T., Umehara, T., Yokoyama, S. "Crystal structures of histone methyltransferase SET7/9 in complexes with adenosylmethionine derivatives" Acta Cryst. D69 (4): 595-602 (2013). 査読有  
DOI: 10.1107/S0907444912052092.
- ⑦ #Umehara, T., Shirouzu, M., #Yokoyama, S. "Structural biology toward rational drug development in collaboration with molecular imaging" Curr. Med. Imaging Rev. 8 (4): 308-313 (2012). 査読無  
DOI: 10.2174/157340512803759794
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 梅原崇史 『エピヌクレオソーム』の再構成に基づいた創薬技術開発. 第 135 回日本薬学会年会 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市) 2015 年 3 月 26 日
- ② Umehara, T., Yokoyama, S. Structure-based development of inhibitors targeting histone demethylase LSD1/KDM1. 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2014 年 11 月 26 日
- ③ Umehara, T., Wakamori, M., Fujii, Y., Suka, N., Shirouzu, M., Sakamoto, K., Yokoyama, S. "Functional and structural analyses of H4-acetylated nucleosome core particles" 11th EMBL Conference of Transcription and Chromatin (Heidelberg, Germany) (24-Aug-2014).
- ④ Umehara, T., Yanagisawa, T., Takahashi, M., Mukai, T., Sato, S., Wakamori, M., Shirouzu, M., Sakamoto, K., Yokoyama, S. "Synthesis of histone proteins containing multiple and site-specific monomethyl-lysines" FASEB Science Research Conference on Biological Methylation: Regulation of Chromatin, Epigenetics, and Disease (Nassau, Bahamas) (07-Jul-2014).
- ⑤ Umehara, T., Yokoyama, S. Reconstitution of 'epi-nucleosomes' with pinpoint epigenetic information. 広島大学 クロマチン動態数理研究拠点セミナー 広島大学 (広島県・東広島市) 2014 年 6 月 13 日
- ⑥ Umehara, T., Wakamori, M., Takahashi, M., Mukai, T., Shirouzu, M., Sakamoto, K., Yokoyama, S. "Reconstitution of epigenetic nucleosomes through genetic code expansion" The 65th Fujihara Seminar, International Symposium on Synthetic Biology of Unnatural Base Pairs and Amino Acids (Tomakomai, Japan) (04-Oct-2013).
- ⑦ 梅原崇史, 堀 雄一郎 薬学が拓くエピジェネティクス研究の最前線. 第 134 回日本薬学会年会 熊本大学黒髪キャンパス (熊本県・熊本市) 2014 年 3 月 30 日
- ⑧ 梅原崇史, 横山茂之 BET ファミリーのヒストン認識ポケットに対する構造基盤阻害剤開発. 第 86 回日本生化学会大会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2013 年 9 月 13 日
- ⑨ Umehara, T., Sato, S., Niwa, H., Wakamori, M., Sakamoto, K., Shirouzu, M., Yokoyama, S. "Structure-based development of epigenetics-regulating inhibitors and 'Epi-nucleosomes'" 7th International Conference on Structural Genomics (Sapporo, Japan) (31-Jul-2013).
- ⑩ 梅原崇史, 日野信次朗, 佐藤 心, 丹羽英明, 白水美香子, 中尾光善, 横山茂之 合理的創薬を指向したヒストン脱メチル化酵素 LSD1/KDM1 の構造基盤阻害剤開発. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 8 回年会 東京医科歯科大学 (東京都・文京区) 2013 年 6 月 21 日
- ⑪ 梅原崇史, 若森昌聡, 須賀則之, 高橋美穂子, 佐藤 心, 柳沢達男, 向井崇人, 白水美香子, 坂本健作, 横山茂之 残基特異的な修飾を導入した「エピヌクレオソーム」の調製技術開発と機能解析. 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 奈良県新公会堂 (奈良県・奈良市) 2013 年 5 月 30 日

- ⑫ 平野智也, 梅原崇史 創薬を指向したエピジェネティクス研究の最前線. 第 133 回日本薬学会年会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2013 年 3 月 29 日
- ⑬ 梅原崇史, 丹羽英明, 半田徳子, 影近弘之, 平野智也, 白水美香子, 横山茂之 創薬を指向した疾患関連タンパク質とその阻害剤複合体の X 線結晶構造解析. 第 30 回 Photon Factory シンポジウム つくば国際会議場 (茨城県・つくば市) 2013 年 3 月 14 日
- ⑭ Umehara, T., Yokoyama, S. "Structure analysis and drug development of transcription factor complexes" International Symposium on Development of Medical Technologies for Treating Intractable Cancers and Cardiovascular Diseases (Tokyo, Japan) (01-Mar-2013).
- ⑮ 梅原崇史, 若森昌聡, 須賀則之, 向井崇人, 寺田貴帆, 白水美香子, 坂本健作, 横山茂之 クロマチンを創る: エピジェネティック情報を持つヌクレオソームの試験管内再構成. 細胞を創る研究会 5.0 東京工業大学すずかけ台キャンパス (神奈川県・横浜市) 2012 年 11 月 21 日
- ⑯ 梅原崇史 エピジェネティックなヌクレオソームの調製技術. 大阪大学蛋白質研究所セミナー 大阪大学吹田キャンパス (大阪府・吹田市) 2012 年 9 月 28 日
- ⑰ Umehara, T. "Structural study and drug development of a histone demethylase involved in repressive KLF pathway" FASEB Summer Research Conference on Biology and Pathobiology of Krüppel-like Factors (Snowmass Village, CO, USA) (06-Aug-2012).
- ⑱ 梅原崇史, 三榎信哉, 佐藤 心, 須賀則之, 丹羽英明, 半田徳子, 横山茂之 ヒストン脱メチル化酵素 LSD1/KDM1 の結晶構造解析と阻害剤開発. 第 12 回日本蛋白質科学会年会 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) 2012 年 6 月 22 日
- ⑲ 梅原崇史, 若森昌聡, 須賀則之, 向井崇人, 寺田貴帆, 白水美香子, 坂本健作, 横山茂之 複数の残基特異的アセチル化を含む「エピヌクレオソーム」の再構成と機能解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 学術総合センター (東京都・千代田区) 2012 年 5 月 14 日

[図書] (計 3 件)

- ① 梅原崇史, 堀 雄一郎 「薬学が拓くエピジェネティクス研究の最前線」薬学雑誌 135 (1) 1-2 (2015). DOI: 10.1248/yakushi.14-00202-F.
- ② 梅原崇史 「エピヌクレオソームの再構成による遺伝子発現制御解析」生体の科学「生命動態システム科学」(医学書院) 65 (5) 462-463 (2014).

- ③ 梅原崇史 「エピジェネティクスを標的とした医薬品開発」日本薬学会 構造活性関連部会ニューズレター No. 25, pp. 9-16 (2013).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

[http://www.riken.jp/research/labs/clst/struct\\_synth\\_biol/bio\\_funct\\_mol\\_dev/epigen\\_drug\\_discov/](http://www.riken.jp/research/labs/clst/struct_synth_biol/bio_funct_mol_dev/epigen_drug_discov/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅原 崇史 (UMEHARA TAKASHI)  
独立行政法人理化学研究所・  
ライフサイエンス技術基盤研究センター・  
ユニットリーダー  
研究者番号: 20415095

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし