

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 5 日現在

機関番号：47407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430170

研究課題名(和文) 遺伝子ノックアウト法によるヒストン修飾酵素群固有生理機能の総括的解析

研究課題名(英文) Investigation of the physiological functions of histone modifying enzymes by gene targeting techniques

研究代表者

菊池 秀彦(Kikuchi, Hidehiko)

尚絅大学短期大学部・その他部局等・教授

研究者番号：10301384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なエピジェネティック制御因子であるヒストン修飾酵素群による細胞機能制御メカニズムの解明を目指し、以下に示す成果を挙げることができた。

(1) ヒストンアセチル化酵素GCN5およびPCAFがB細胞分化制御において、正反対(GCN5：促進、PCAF：抑制)の機能を有することが明らかとなった。(2) GCN5が抗アポトーシス因子Bcl-2の発現抑制を介して小胞体ストレス誘発型アポトーシスを促進的に制御していることが明らかとなった。(3) GCN5およびPCAFが免疫グロブリン重鎖の遺伝子発現において、正反対(GCN5：促進、PCAF：抑制)の機能を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the physiological roles of histone modifying enzymes, in this study, I examined the effects of deficiency of their genes on various cellular functions using gene targeting techniques in the chicken immature B cell line DT40.

(1) Histone acetyltransferases GCN5 and PCAF participate in B cell differentiation through controlling gene expression of some B cell-specific transactors in an opposite manner (GCN5: promoting effect, PCAF: inhibitory effect). (2) GCN5 is involved in regulation of prolonged ER stress-induced apoptosis through controlling Bcl-2 gene expression. (3) GCN5 and PCAF take part in transcriptional regulation of the IgM H-chain gene and play key roles in epigenetic regulation of B cell functions.

研究分野：生化学

キーワード：エピジェネティクス B細胞分化 遺伝子ノックアウト ヒストンアセチル化 DT40

### 1. 研究開始当初の背景

高等真核細胞のクロマチン構造変化は遺伝子発現制御などに大きな影響を与えることが知られている。細胞が外界から受けた刺激は核へと伝達され、クロマチン構造に多様な動態変化をもたらす。この結果、複製、転写、修復や組換えといったDNAが関わる生命現象の動的変化が引き起される。この際、生じる塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現（活性化もしくは不活性化）を制御する後成的な修飾をエピジェネティクスと呼び、この分野の研究の重要性は急速に高まっている。ヒストンアセチル化は最も重要なエピジェネティック制御機構の一つであり、ヒストンアセチル化関連酵素群（アセチルトランスフェラーゼ（HAT）やヒストンデアセチラーゼ（HDAC））という2種類の酵素群によって制御されている。しかしながら、個々のHATもしくはHDACの有する固有の生理機能に関して、その詳細には不明の点が多く残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、エピジェネティック制御機構の最重要因子の一つであるヒストンアセチル化関連酵素、すなわち、HATおよびHDACの固有の生理機能を、遺伝子ノックアウト法を用いて解明することを主たる目的とした。研究開始当初までに、ヒトにおいて同定されているHATおよびHDACはそれぞれ20種類足らずであり、数万を越える遺伝子の発現制御に関しては各ヒストンアセチル化関連酵素が固有の機能とオーバーラップした機能とを併せ持っていることが推測された。この複雑きわまりないヒストンアセチル化関連酵素群の生理機能（特に固有の生理機能）を明らかにすることは、生物学・医学的に極めて有意義であると考えられた。

### 3. 研究の方法

種々のHATおよびHDACについて、それらの遺伝子を欠損させたニワトリB細胞系株細胞DT40変異株を作成した。次に、作成した変異株のphenotype（増殖、分化や刺激応答など）を詳細に解析した。今回、phenotype解析で変化が確認できた事例については、その原因となりうる遺伝子の発現状況をRT-PCR法により解析し、候補遺伝子をpick upした。さらに、phenotype解析ではpick upし難い（例：主としてB細胞以外で機能している）が医学的見地からは重要度の高い遺伝子の発現変化を網羅的に調べて野生株と比較した。そして、これまでの過程でpick upした遺伝子の発現制御機構について、クロマチン免疫沈降法（ChIPアッセイ）等の手法を用いてその解明を試みた。以上を総合して、個々のHATおよびHDACが特定の遺伝子発現制御を介して固有の生理機能を発揮するメカ

ニズムの解明を目指した。

### 4. 研究成果

代表的なエピジェネティック制御機構であるヒストンアセチル化による細胞機能制御メカニズムの一端の解明を目指し、個々のHATおよびHDAC、特に本研究課題では代表的なHATであるGCN5およびPCAFの固有の生理機能に着目し、以下に示す成果を挙げることができた。

（1）GCN5およびPCAFがB細胞分化制御において、正反対（GCN5：促進、PCAF：抑制）の機能を有することが明らかとなった。GCN5はB細胞特異的転写因子IRF-4の発現活性化を通してB細胞分化のmaster geneであるblimp-1の遺伝子発現を促進していることが明らかとなった。一方、PCAFはB細胞特異的転写因子であるbcl-6およびpax5の遺伝子発現制御を介してblimp-1の遺伝子発現を抑制していることも明らかとなった。すなわち、blimp-1遺伝子の発現制御はGCN5とPCAFという2種類のHATにより為されていることが世界で初めて示された。B細胞分化には多くの因子が関与しているが、ヒストンアセチル化制御の観点からの知見は乏しかった。本研究結果によって、B細胞分化のエピジェネティック制御機構の一端を明らかにすることができた。今後は、他のHATやHDACの役割についても解析を進めていきたいと考えている。

（2）GCN5が抗アポトーシス因子Bcl-2の発現抑制を介して小胞体ストレス誘発型アポトーシスを促進的に制御していることが明らかとなった。小胞体ストレス応答は現在最も注目を集めている生体反応の一つである。小胞体ストレス応答におけるエピジェネティック制御機構は殆ど解明されていなかったが、本研究成果によって小胞体ストレス応答の制御機構の新しい一面を明らかにすることに成功した。今後は、他のHATやHDACの小胞体ストレス応答に関する機能についても解析を進めていきたいと考えている。

（3）GCN5およびPCAFが免疫グロブリン重鎖の遺伝子発現において、正反対（GCN5：促進、PCAF：抑制）の機能を有することが明らかとなった。B細胞の最も重要な生理機能である抗体産生についてはこれまで膨大な量の研究が為されてきたが、エピジェネティクスという観点からの研究データは依然として不足した状態である。本研究成果は、免疫グロブリン（抗体）の発現調節機構の新たな側面を明らかにし、抗体産生に係る諸疾患（自己免疫疾患等）の原因解明や治療法開発の一助となることが充分期待できる。今後は、他のHATやHDACの抗体産生制御における役割についても解析を進めていきたいと考えている。

## 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 8 件)

<sup>1</sup> Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. (2014) GCN5 is essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. *J. Leukoc. Biol.*, **95**: 399-404.

DOI: 10.1189/jlb.0413232

<sup>2</sup> Kikuchi H, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S. (2014) Down-regulation of Fas-mediated apoptosis by plasma transglutaminase factor XIII that catalyzes fetal-specific cross-link of the Fas molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **443**: 13-17.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.163

<sup>3</sup> Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. (2014) Protein kinase C $\theta$  gene expression is oppositely regulated by GCN5 and EBF1 in immature B cells. *FEBS Lett.*, **588**: 1739-1742.

DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.025

<sup>4</sup> Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. (2014) GCN5 is involved in regulation of immunoglobulin heavy chain gene expression in immature B cells. *Gene*, **544**: 19-24.

DOI: 10.1016/j.gene.2014.04.030

<sup>5</sup> Kikuchi H, Nakayama M, Kawai C, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. (2015) Histone acetyltransferase p300/CBP-associated factor is an effective suppressor of secretory immunoglobulin synthesis in immature B cells. *Microbiol. Immunol.*, **59**: 243-247.

DOI: 10.1111/1348-0421.12237

<sup>6</sup> Kikuchi H, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nakayama M, Takami Y, Nishitoh H, Nakayama T. (2015) Lack of GCN5 remarkably enhances the resistance against prolonged endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through up-regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**: 870-875.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.027

<sup>7</sup> Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. (2015) Paired box gene 5 isoforms A and B have different functions in transcriptional

regulation of B cell development-related genes in immature B cells. *Microbiol. Immunol.*, **59**: 426-431.

DOI: 10.1111/1348-0421.12272

<sup>8</sup> Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Nakayama T. (2015) Histone acetyltransferase PCAF is involved in transactivation of Bcl-6 and Pax5 genes in immature B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**: 509-513.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.011

〔学会発表〕(計 5 件)

<sup>1</sup> 菊池秀彦、栗林太、大海忍、西頭英起、高見恭成、中山建男、GCN5 は DNA ポリメラーゼ  $\eta$  の発現制御を介して細胞を紫外線から保護する。日本エピジェネティクス研究会第 7 回大会、平成 25 年 5 月 30 日～31 日(奈良県新公会堂、奈良市)

<sup>2</sup> 菊池秀彦、中山雅美、栗林太、大海忍、西頭英起、高見恭成、中山建男、GCN5 は未熟 B 細胞で免疫グロブリン重鎖遺伝子発現制御に関与する。日本生化学会第 86 回大会、平成 25 年 9 月 11 日～13 日(パシフィコ横浜、横浜市)

<sup>3</sup> 菊池秀彦、中山雅美、栗林太、大海忍、西頭英起、高見恭成、中山建男、ヒストンアセチル化酵素 GCN5 は未熟 B 細胞に於いて IRF-4 の転写を促進し、それに続く Blimp-1 の転写活性化をもたらす。日本エピジェネティクス研究会第 8 回年会、平成 26 年 5 月 25 日～27 日(伊藤国際学術研究センター、東京)

<sup>4</sup> 菊池秀彦、栗林太、三室仁美、西頭英起、大海忍、Down-regulation of Fas-mediated apoptosis by plasma transglutaminase factor XIII that catalyzes fetal-specific cross-link of the Fas molecule. 第 37 回日本分子生物学会年会、平成 26 年 11 月 25 日～27 日(パシフィコ横浜、横浜市)

<sup>5</sup> 菊池秀彦、中山雅美、栗林太、三室仁美、大海忍、西頭英起、高見恭成、中山建男、プロテインキナーゼ C $\theta$  の遺伝子発現は GCN5 と EBF1 によって正負に制御されている。日本エピジェネティクス研究会第 9 回年会、平成 27 年 5 月 25 日～26 日(東京一ツ橋学術センター、東京)

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kikuchi-biolchem.jimdo.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊池 秀彦 (KIKUCHI, Hidehiko)

尚絅大学短期大学部食物栄養学科・教授

研究者番号： 10301384

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

西頭 英起 (NISHITOH, Hideki)

宮崎大学医学部・教授

研究者番号： 00332627