

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460351

研究課題名(和文) SAM合成酵素を標的とするエピゲノム書き換え法

研究課題名(英文) Methods rewriting epigenome as the target of methionine adenosyltransferase II

研究代表者

加藤 恭丈 (KATO, Yasutake)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：40397914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：メチオニン・アデノシル転移酵素II (MATII) は、S-アデノシルメチオニン (SAM) の生合成を触媒する。合成されたSAMはメチル基転移酵素 (MT) の基質として利用され、そのメチル基はDNA中のシトシンやヒストンのリジン残基などへ転移され、クロマチンレベルでのエピジェネティクスを支配する。本研究では、ヒストンやDNAのメチル化を包括的に低下させる方法を開拓し、細胞記憶を消去することである。しかし、当初予定していた細胞記憶の書き換え法にまでは、至っていない。一方、核移行に必要な因子群の同定や、MATII が核移行するために必要と示唆される翻訳後修飾の動態から、理解可能となった。

研究成果の概要(英文)：Methionine adenosyltransferase (MAT) catalyzes S-adenosylmethionine (SAM) synthesis, which is utilized as a methyl donor in transmethylation reactions. MATII, a MAT isozyme, is composed of the catalytic and regulatory subunits. Both of the subunits are recruited to a subset of target genes of Bach1 and MafK to facilitate their repression. However, it has been unclear how the nuclear accumulation of MATII subunits is regulated. Using overexpression and bimolecular fluorescence complementation, we found that MATII promoted the nuclear localization of the subunit and that resulting heterooligomer was present predominantly in nuclear compartment. A single serine residue of subunit was required for its interaction with subunit and efficient nuclear accumulation. These results suggest that subunit defines nuclear-specific MAT isozyme by facilitating nuclear import of its catalytic subunit.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：エピジェネティクス SAM合成酵素 ヒストンメチル化 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞記憶とメチル化反応 細胞分化システムの基盤となる幹細胞は、多分化能を維持しつつ増殖しながら(自己複製)、ある頻度で分化を開始し、様々な細胞を作り出す。幹細胞でも分化細胞でも、ある一定の遺伝子発現パターンが安定に維持されており、この現象を「細胞記憶」と呼ぶ。このような細胞記憶は、細胞核内のクロマチン構造のレベルで保持されていると考えられている。クロマチン構造は、ヘテロクロマチンとユークロマチンに大別される(図1)。ヘテロクロマチンは細胞学的な観察により高密度なDNA領域として識別され、転写活性の低いクロマチン構造である。一方、ユークロマチンは低密度なDNA領域として識別され、転写活性の高いクロマチン構造である。このクロマチン構造の制御に関して、「ヒストンコード仮説」が提唱され、個々の修飾やその組み合わせの“意味”が解明されつつある。現在、ヒストンのメチル化・脱メチル化において、ヒストンH3の4番目と9番目のリジン残基が極めて重要であることがわかっている(図1)。そして、

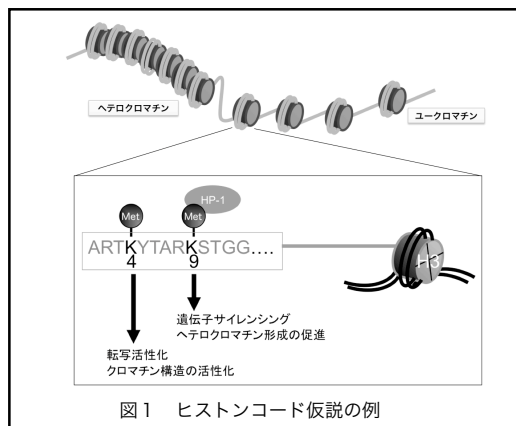


図1 ヒストンコード仮説の例

これらのリジンのメチル化や脱メチル化が、ヒストンのアセチル化や脱アセチル化、DNAメチル化を誘導し、クロマチン構造を変化させ、その結果、遺伝子の発現制御に寄与するといった「エピゲノム」のパラダイムを確立させつつある。したがって、DNAやヒストンのメチル化修飾によるエピゲノム制御を標的とすることにより、細胞記憶の状態を変えることも可能かもしれない。メチル化修飾をクロマチンに施すメチル化酵素は、全てS-アデノシルメチオニン(SAM)を基質とするが、核内におけるSAM量の増減やSAM合成酵素の局在化が、ヒストンのメチル化レベルなどのエピゲノム動態を左右する可能性は、これまでほとんど想定されていない。

(2)MATIIとエピゲノム制御 研究代表者はこれまでに、がん関連転写因子MafKがパートナー分子とヘテロ二量体を形成して、Maf認識配列(MARE)に結合し、その標的遺伝子の転写制御を明らかにしてきた。例えば、Bリンパ球分化の過程では、MafKは主に転写抑制因子として機能し、Blimp-1遺伝子などの発現を抑制することにより液性免疫の量と質を制御する。具体的には、成熟Bリン

パ球株からMafKの複合体精製と質量分析をおこない、MafKがBach2とヘテロ二量体を形成しBlimp-1遺伝子の転写を抑制していることを明らかにした。さらに、本提案の根幹を成す発見として、MafK複合体からSAM合成酵素(methionine S-adenosyltransferase II, MATII)を同定した。MATIIは、触媒サブユニットαと機能未知のサブユニットβから構成される。研究代表者は、MATIIαの複合体精製および質量分析もおこない、MATIIがMafKやBach2以外の転写因子や、Swi/SnfやNuRD、ポリコム複合体などのクロマチン制御因子、G9aやEhmt1、ALL1などのメチル化酵素と複合体を形成することを示し、SAMIT複合体(SAM-integrating transcription regulation module)と名付けた(図2)。そして

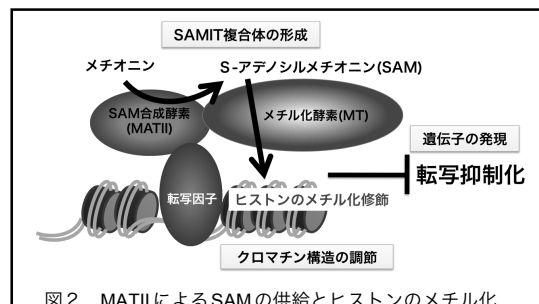


図2 MATIIによるSAMの供給とヒストンのメチル化

て、MATIIおよびSAMITがMafKのコリプレッサーとしてHO-1遺伝子など標的遺伝子の転写を抑制すること、この抑制にはMATIIαのSAM合成活性が必要であることも明らかにした。さらに、SAMIT複合体がSAM合成とヒストンH1およびH3のメチル化修飾という二段階反応を効率良く触媒することを見いだした。これらのことから、研究代表者は、転写因子がMATIIをクロマチンへ局所的に動員し、標的遺伝子周辺のヒストンのメチル化を促進して転写を調節すること、すなわち、局所的なMATIIの動員がエピゲノム制御の基本原則であることを提唱した。MATIIが動員されない場合には、クロマチン周辺でのSAMの供給が途絶えるために、ヒストン等のメチル化が低下し、細胞記憶が維持されなくなる可能性がある。このような背景と独自の知見に基づいて、研究代表者は、RNA干渉(RNA interference, RNAi)法によるMATIIのノックダウンにより、DNAやヒストンのメチル化修飾を包括的に低下させる技術(memory canceling法)を開発し、分化細胞の細胞記憶を人為的に改変する(memory rewriting法)、というアイデアを考えた。

2. 研究の目的

全ての細胞は、ある一定の遺伝子発現パターンが安定に維持され、クロマチンレベルで制御されていると考えられている。このような細胞記憶は、DNAやヒストンテイルのメチル化修飾により、クロマチン構造が変化し、その状態が安定に維持されると考えられている。これら核内のメチル化反応は、全てS-アデノシルメチオニン(SAM)をメチル基供

与体とする。SAMは、メチオニンとATPを基質としてSAM合成酵素(MAT)により生成される。本研究の主題は、ヒストンやDNAのメチル化を包括的に低下させる方法を開拓し、細胞記憶を消去し、クロマチンと細胞の可塑性を高める技術を開発することである。そのために、核内のMATの機能を解明し、さらにその機能改変による、幹細胞の誘導や細胞分化の人為的制御を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞記憶キャンセル法 (Memory Canceling 法) の開発

MATII がゲノムワイドに包括的な制御にも関わることを証明するために、MATII $\alpha$  のノックダウン ES 細胞を用いて、ヒストン H3 だけでなく、ヒストン H4 や H1 のリジン、DNA のシトシンにおけるメチル化の挙動をコントロールと詳細に比較した。また、詳細な遺伝子発現プロファイリングを行い、細胞記憶状態をゲノムワイドに検討した。

#### (2) MATII $\alpha$ および $\beta$ の細胞内局在

細胞内の蛋白質間相互作用検出システム (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) を行うために、既に YFP 蛋白質の改変型である Venus 蛋白質を、蛍光に必要な二つの機能ドメインに分離 (Split Venus タグ) し、そのタグと MATII サブユニットとの融合蛋白質の発現系を構築した。独立したタグが互いに近接した場合のみ蛍光を発するので、このタグに融合した MATII $\alpha$  と  $\beta$  の局在の場を検出することができる。研究代表者は、MATII $\alpha$  または  $\beta$  の過剰発現や、両サブユニットの共発現における、細胞内局在の可視化を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) ES 細胞を用いた MATII $\alpha$ のノックダウン

研究代表者らは、細胞記憶キャンセル法を開発するために、ES 細胞を用いて一過的に MATII $\alpha$  の転写量を減弱 (ノックダウン) することを試みた (図 3)。MATII $\alpha$  遺伝子のアミノ酸翻訳領域を標的とする、2 種類の

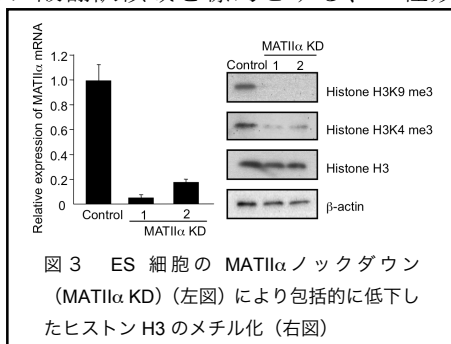


図 3 ES 細胞の MATII $\alpha$  ノックダウン (MATII $\alpha$  KD) (左図) により包括的に低下したヒストン H3 のメチル化 (右図)

siRNA を調製し、ES 細胞へそれらを遺伝子導入 (エレクトロポレーション法) した。これらの ES 細胞から、全 RNA を抽出し、逆転写酵素によって鋳型 DNA を調製、それを用いて、定量 PCR 法による転写量の測定を行った。その結果、図 3 の左図にあるように、2 種類の MATII $\alpha$  の siRNA により、MATII $\alpha$  の転写量が 80~90% ほど減弱させることができた。そこで、この細胞から引き続き、全ヒストンを抽出した。これらの抽出物を、15% SDS-PAGE にて展開し、イムノブロット解析のために、PVDF 膜に転写して、抗ヒストン H3 ならびに、H3 K4 や K9 といったリジンのメチル化、 $\beta$  アクチン抗体によって、サンプル中のメチル化や、総タンパク質量の程度を検出した。その結果、MATII $\alpha$  のノックダウンによって、ヒストン H3 K4 ならびに K9 のメチル化が明らかに減少していた (図 3、右図)。このことは、MATII $\alpha$  がメチル化の供与体である SAM の産生に寄与することで、その MATII $\alpha$  の発現低下が、SAM の産生低下だけでなく、主要なエピゲノムマーカーである、ヒストン H3 K4 や K9 のメチル化に包括的に影響を与えていることが示唆される。さらに、研究代表者らが目的とする、細胞記憶の消去に、MATII $\alpha$  が重要な役割を担っている可能性も示唆された。

#### (2) 未分化維持に関与する遺伝子群の発現プロファイル

前述の ES 細胞を用いた MATII $\alpha$  のノックダウンが成功したことで、MATII $\alpha$  の転写量の定量測定実験と同様に、細胞の未分化能やその維持に関与する遺伝子群の発現量も定量することを試みた。その結果、図 4 に示す

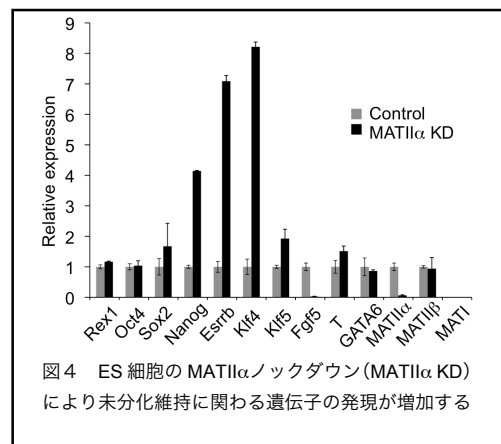


図 4 ES 細胞の MATII $\alpha$  ノックダウン (MATII $\alpha$  KD) により未分化維持に関わる遺伝子の発現が増加する

とおり、山中因子に相当する Sox2 や Klf4、これらの上流に相当する Nanog、ES 細胞の未分化維持に重要とされる Esrrb の発現量が、MATII $\alpha$  のノックダウンによって増加していた。このことから、研究代表者らが目的とする、細胞記憶の消去の過程に、未分化能や多能性の遺伝子群が影響を受け、その制御には、エピゲノムだけでなく、MATII $\alpha$  が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

#### (3) MATII $\alpha$ の細胞内局在

MATII $\alpha$ によるエピゲノムや遺伝子発現制御が、細胞記憶の分子機構に大いに関与すること、もともと転写因子 Bach1/MafK 複合体の構成因子として、細胞核内の MATII $\alpha$  が同定されたこと、さらに、MATII には MATII $\alpha$  のだけでなく、調節サブユニット  $\beta$  による酵素活性の制御を受けることが、これまでの研究代表者らの解析から明らかにされてきた。そこで、私たちは MATII $\alpha$  と MATII $\beta$  の局在を、モニターする観察実験系を構築することを試みた。そのために、蛍光タンパク質 YFP の改変型 Venus を用いて、このタンパク質の構造ドメインを2分したそれぞれのペプチド (Venus (N) および Venus (C)) をタグにして、MATII $\alpha$  や  $\beta$  との融合タンパク質の細胞内発現プラスミドを構築した。もし、互いの分子の相互作用が成立すると、2分した Venus の構造ドメインの空間距離が近くなり、そのことで蛍光可能になる。この現象を利用して、MATII サブユニット間の細胞内局在を生細胞下にて、観察した。その結果、

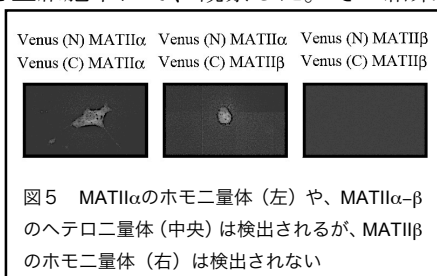


図5に示すとおり、MATII $\alpha$ を2分したそれぞれのタグとの融合タンパク質として、発現させると、MATII $\alpha$ の二量体が形成されることにより、細胞全体の蛍光が観察された(左図)。一方で、同様に MATII $\beta$ を2分したそれぞれのタグとの融合タンパク質として、発現させた場合には、MATII $\beta$ の二量体が形成されることはなく、蛍光は観察されなかった(右図)。2分したそれぞれのタグに、MATII $\alpha$ と $\beta$ との融合タンパク質として発現させると、今度は、MATII $\alpha$ と $\beta$ との二量体が形成され、その蛍光は細胞核に局限した。以上のことから、先に述べた、MATII $\alpha$ によるエピゲノムや転写調節制御には、MATII $\beta$ によるMATII $\alpha$ の核内への移行が必要であることが示唆された。

今後、MATII $\alpha$ と $\beta$ の局在から、細胞記憶の消去ならびに書き込み法に向けて、その分子機構を解き明かす必要がある。しかし、今回の研究では、一過性のノックダウンしか構築できず、安定したノックダウン発現系を完成させる必要があると考えている。

## 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4件)

- ① Sekine H, Okazaki K, Ota N, Shima H, Katoh Y, Suzuki N, Igarashi K, Ito M, Motohashi H,

Yamamoto M. (査読有り)

The mediator subunit MED16 transduces NRF2-activating signals into antioxidant gene expression. **Mol Cell Biol.** 2016; 36 (3) 407-420. doi: 10.1128/MCB.00785-15.

- ② Dendo M, Maeda H, Yamagata Y, Murayama K, Watanabe K, Imura T, Inagaki A, Igarashi Y, Katoh Y, Ebina M, Fujimori K, Igarashi K, Ohuchi N, Satomi S, Goto M. (査読有り)  
Synergistic Effect of Neutral Protease and Clostripain on Rat Pancreatic Islet Isolation. **Transplantation** 2015; 99: 1349-1355. doi: 10.1097/TP.0000000000000662.
- ③ Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K. (査読有り)  
Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. **J Biol Chem.** 2013; 288: 13592-13601. doi: 10.1074/jbc.M112.429738.
- ④ Ohbayashi N, Matsumoto T, Shima H, Goto M, Watanabe K, Yamano A, Katoh Y, Igarashi K, Yamagata Y, Murayama K. (査読有り)  
Solution structure of clostridial collagenase h and its calcium-dependent global conformation change. **Biophys J.** 2013; 104: 1538-1545. doi: 10.1016/j.bpj.2013.02.022.

[学会発表] (計12件)

- ① 小柴 生造、加藤 恭丈、三枝 大輔、元池 育子、城田 松之、斎藤 智、田邊 修、安田 純、木下 賢吾、山本 雅之、  
「日本人多層オミックス参照パネル公開」  
第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) 2015年12月1~4日
- ② 五十嵐 和彦、蝦名 真行、加藤 恭丈  
「S-アデノシルメチオニン (SAM) の核内産生機構とそのエピゲノム制御における役割」第26回同人化学フォーラム、熊本ホテルキャッスル(熊本県・熊本市) 2015年11月13日(シンポジウム講演)
- ③ 加藤 恭丈、蝦名 真行、城田 松之、元池 育子、木下 賢吾、工藤 久智、信國 宇洋、峯岸 直子、三枝 大輔、小柴 生造、五十嵐 和彦、山本 雅之、田邊 修「血漿プロテオームによる大規模住民コホート研究」  
第13回日本ヒトプロテオーム学会 (JHUPO) くまもと森都心プラザ(熊本県・熊本市) 2015年7月23日(招待講演)
- ④ 高橋 裕一朗、村上 寛和、加藤 恭丈、Andrey Brydum、Davide Bertold、Raphael Gubeli、西嶋 仁、柴原 慶一、五十嵐 和彦、Christian Heinis、原田 昌彦  
「アクチンファミリータンパク質 Arp5 および Arp8 によるヒト INO80 クロマチンリモデリング複合体の機能制御: 遺伝子破壊細胞と bicyclic peptides を用いた解析」第37回日本分子生物学会年会、みなとみらい国際会議場(神奈川県・横浜市) 2014年11月25~27日

- ⑤ 加藤 恭丈, 蝦名 真行, 城田 松之, 木下 賢吾, 五十嵐 和彦, 田邊 修, 山本 雅之  
「大規模住民コホート研究のための LC-MS/MS による血漿プロテオーム解析の標準化」第 87 回日本生化学会年会、京都国際会議場、京都（京都府・京都市）2014 年 10 月 15～18 日
- ⑥ 古山 和道, 山下 莉奈, 野村 和美, 加藤 恭丈, 久保田 美子  
「非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の新たなヘム依存的分解機構」第 87 回日本生化学会年会、京都国際会議場（京都府・京都市）2014 年 10 月 15～18 日
- ⑦ 蝦名 真行, 加藤 恭丈, 五十嵐 和彦, 田邊 修  
「大規模解析にむけた血漿プロテオーム」第 12 回日本ヒトプロテオーム学会 (JHUP0)、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）2014 年 7 月 17～18 日
- ⑧ 加藤 恭丈, 蝦名 真行, 城田 松之, 木下 賢吾, 五十嵐 和彦, 山本 雅之, 田邊 修  
「大規模コホートにおける血漿プロテオーム解析サンプルの標準化」第 12 回日本ヒトプロテオーム学会 (JHUP0)、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）2014 年 7 月 17～18 日
- ⑨ Katoh Y, Igarashi K.  
Nuclear localization of the catalytic subunit of methionine adenosyltransferase II is promoted by its regulatory subunit. IAS Research Conference 2014 Chromatin Decoding, May 12-15th 2014, IAS（京都府・京都市）, JAPAN（シンポジウム講演）
- ⑩ 石山 駿, 加藤 恭丈, 森野 杏子, 榎野 絵里子, 五十嵐 和彦「メチオニンアデノシル転移酵素 (MATII) の細胞内局在」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）2013 年 12 月 3～6 日
- ⑪ 加藤 恭丈, 森野 杏子, 石山 駿, 齊藤 維友, 榎野 絵里子, 島 弘季, 五十嵐 和彦  
「メチオニンアデノシル転移酵素の細胞内局在と制御機構」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 30～31 日
- ⑫ 解良 洋平, 加藤 恭丈, 太田 嶺人, 松本 光代, 山本-高野 照子, 五十嵐 和彦  
「メチオニンアデノシル転移酵素 (MATII) によるエピジェネティックな COX-2 遺伝子発現制御機構」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 30～31 日

〔図書〕（計 1 件）

- ① 加藤 恭丈, 解良 洋平  
エピゲノムと転写の共役制御を担う S-アデノシルメチオニン合成酵素 MATII 生化学 2014; 86: 683-686.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 恭丈 (KATOH, Yasutake)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師  
研究者番号：40397914

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

守田 匡伸 (MORITA, Masanobu)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10519094

長嶋 剛史 (NAGASHIMA, Takeshi)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80443000

三枝 大輔 (SAIGUSA, Daisuke)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師  
研究者番号：90545237

松本 光代 (MATSUMOTO, Mitsuyo)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80400448

五十嵐 和彦 (IGARASHI, Kazuhiko)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：00250738