

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670410

研究課題名(和文)新規臓器肥大epigenetic marker H4K20ac基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research of new epigenetic marker, H4K20ac

研究代表者

貝森 淳哉(Kaimori, Jun-Ya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：70527697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類細胞から大量のヒストン蛋白を抽出し、質量分析機を用いて、精密に分子量を測定することによりH4K20acが、哺乳類細胞に存在することを証明した。また、このヒストン修飾に対する抗体を作成し、クロマチン免疫沈降したサンプルを次世代シーケンサーを用いて解析し、このデータをスーパーコンピューターを用いて解析し、世界中のデータベースに存在する既知のヒストン修飾のデータと網羅的に比較して、H4K20acが発現量の低い遺伝子のプロモーターに集積していること、H4K20acの集積しているプロモーター部位には、遺伝子発現増強因子は近づけないが、遺伝子発現抑制因子が近づくことができることを発見した。

研究成果の概要(英文)：By using mass spectrometry analyses, we identified H4K20ac, which was discovered only in plant cells. To understand the function of H4 lysine 20 acetylation (H4K20ac), we have developed a specific monoclonal antibody and performed ChIP-seq analysis using HeLa-S3 cells. H4K20ac was enriched around the transcription start sites (TSSs) of minimally expressed genes and in the gene body of expressed genes, in contrast to most histone acetylation being enriched around the TSSs of expressed genes. The distribution of H4K20ac showed little correlation with known histone modifications, including histone H3 methylations.

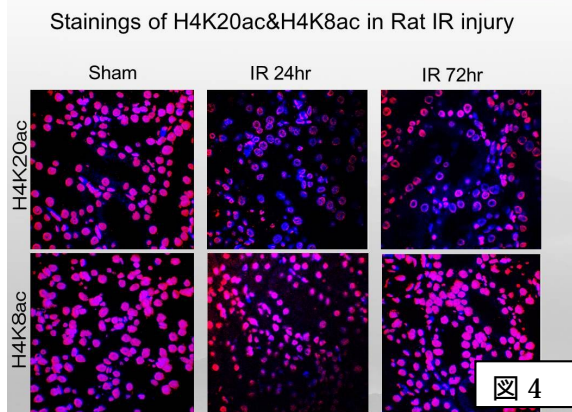
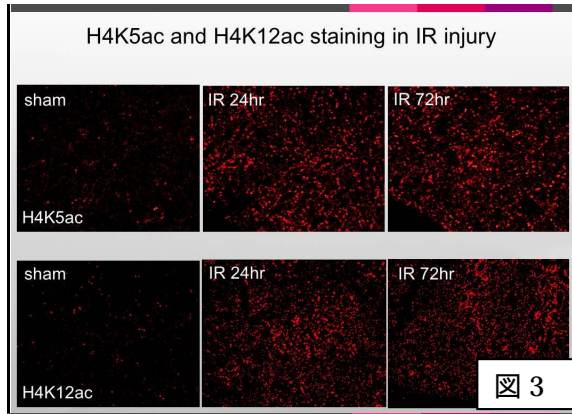
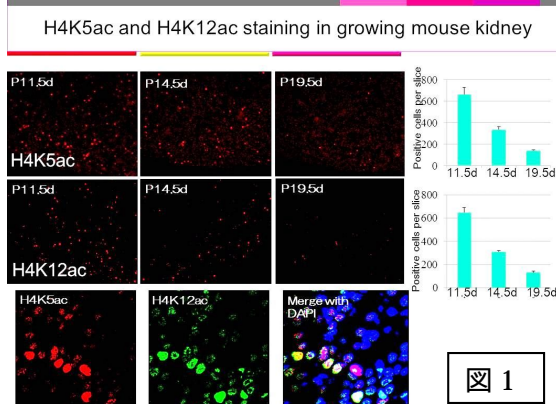
研究分野：腎臓内科

キーワード：epigenetics epigenome histone modification gene expression

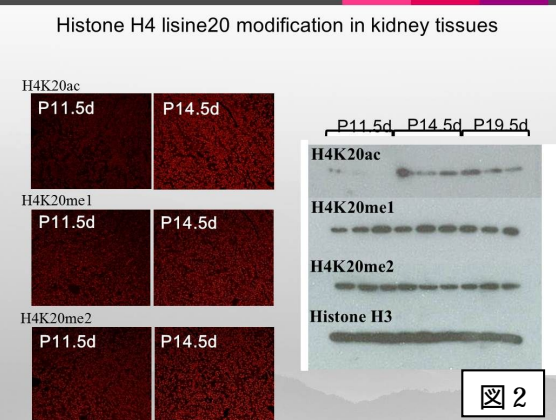
様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

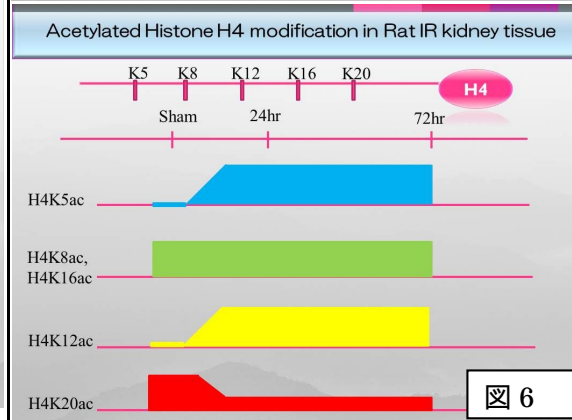
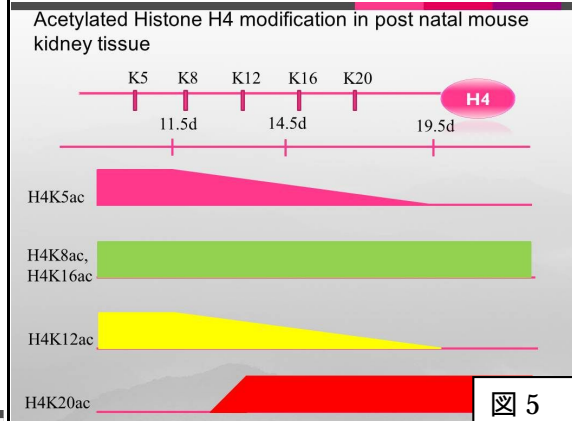
常染色体優性遺伝多発嚢胞腎 (ADPKD) は、末期腎不全に至る腎疾患としては4番目に多く、全世界で1250万人もの患者が存在すると言われている重要な遺伝性疾患である。また、多発嚢胞腎は現在明確な治療法のない難病である。2007年米国 Johns Hopkins の Piontek らは tamoxifen-Cre による gene knock out system を用いてマウスの出生後14日を境に Pkd1 knock out 後の腎臓嚢胞形成が顕著に変化することを見出した (Piontek K et.al., Nat Med 2007)。我々は、この ADPKD 発症感受性が epigenetics と関係があると考え、大阪大学大学院生命機能研究科木村宏准教授 (現在東京工業大学声明理工学部教授) と共同して、マウス生後11.5日目と14.5日目の腎臓組織を28種類にのぼる histone modification を識別する抗体で染色した。そこで組織染色上変化のあった histone modification として H4K5ac、H4K12ac、H4K20ac の3種類の epigenetic marker を見出した。すなわち、H4K5ac、H4K12ac について、生後11.5日目と比べて14.5日目では染色陽性細胞の数が減少していた。(図1)



また、H4K20ac については、反対に生後11.5日目と比べて14.5日目では全体の染色が著明に増強していた。この H4K20ac の変化は核抽出蛋白を用いた western blotting によっても確かめられた (図2)。



以上の結果をまとめると図4,5のようになる。研究を始めた当時、H4K20ac のヒストン修飾は、植物細胞や酵母にのみ存在すると考えられていた。



また、ともに細胞増殖のモデルである虚血再還流後の腎臓組織、及び常染色体劣性遺伝多発嚢胞腎モデルマウス肝臓の嚢胞において、上記と反対の変化を認めた。(図3,4)

2. 研究の目的

植物細胞や酵母にのみ存在すると考えられていたヒストン修飾 H4K20ac の動物細胞での

生物学的意義を検討する。

3. 研究の方法

1. 哺乳類細胞 HeLa-S3 細胞に H4K20ac が存在することを、質量分析を用いて照明する。
2. 哺乳類細胞におけるヒストン修飾 H4K20ac の動物細胞での生物学的意義を、抗体染色を用いた解析及び、ChIP-seq を行う事によって明らかにする。

4. 研究成果

1. 哺乳類細胞 HeLa-S3 細胞から大量のヒストン蛋白を抽出し、ペプチド切断酵素 (lysyl endopeptidase 及び endoproteinase Asp-N) を用いて蛋白を解析可能なペプチドまで消化した。そのペプチド溶液を液体クロマトグラフィーによって、合成したアセチル化ペプチド (RHR²⁰KacVLR) を指標に分離した。質量分析機を用いて、精密に分子量を測定することにより RHR²⁰KacVLR を RHR²⁰Kme²VLR や RHR²⁰Kme³VLR と区別することが可能となった。このことから、哺乳類細胞に存在することを証明した (図 6)。

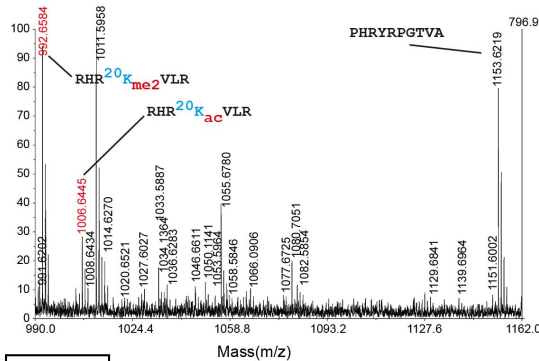


図 7

2. 抗体染色を用いた解析及び、ChIP-seq を行ったところ、以下 (図 7) のような結果となり、H4K20ac が、今まで報告されているいかなるヒストン修飾とも似ていないことが判明した。

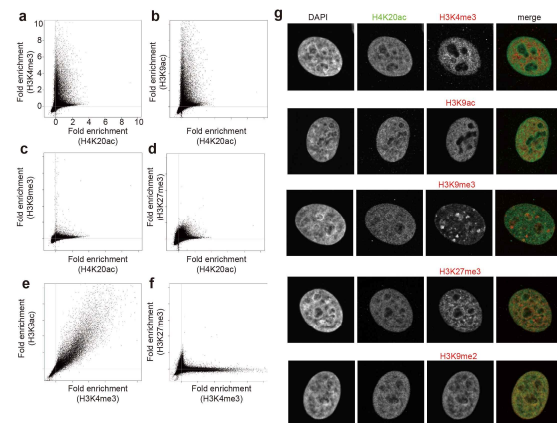


図 8

- 次に、ChIP-seq の結果をゲノムワイドに解析したところ、HeLa-S3 細胞において、H4K20ac は、発現の低い遺伝子のプロモーター領域に特に高い分布を示した。この分布形式は、以前に報告されているアセチル化ヒストン修飾とは逆の分布形式であった (図 9)。

また、我々は、この H4K20ac が、血管平滑筋細胞に強く発現している事を見出した。ひと血管平滑筋細胞を用いて、ChIP-seq を行ったところ、同じように、発現の低い遺伝子のプロモーター領域に特に高い分布を示した (図 10)。HeLa-S3 細胞とヒト血管平滑筋細胞という 2 つの細胞の結果から、H4K20ac は、発現の低い遺伝子のプロモ-

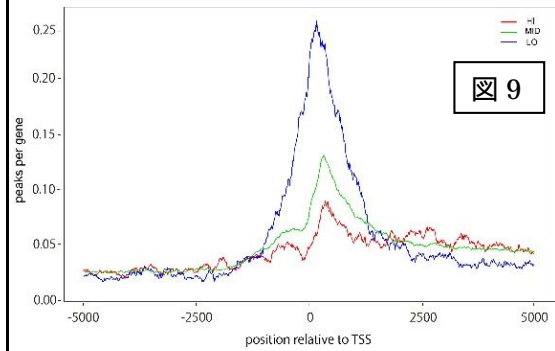


図 9

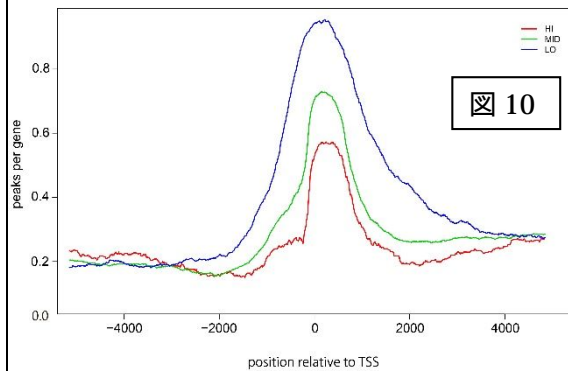


図 10

ーター領域に特に高い分布を示す事が明らかとなった。

次に、H4K20ac が集積しているプロモーター領域について、転写因子結合のモチーフサーチを行った。結果は、transcriptional activator の結合部位に、H4K20ac が集積している事が判明した。そこで、ENCODE の HeLa-S3 細胞における転写因子の ChIP-seq のデータと H4K20ac の ChIP-seq データを照らし合わせたところ、実際に transcriptional activator が結合している場所には H4K20ac は結合していない事が判明した。この結果は、他の多くの transcriptional activator について同じことが確認された。また、NRSF は transcriptional suppressor として知られているが、この因子に関しては、H4K20ac が集積している部分に、結合していることが判明した (図 11)。これらの事から、H4K20ac が発現の低い遺伝子のプロモーター領域に分布しているメカニズムの一端が判明した。

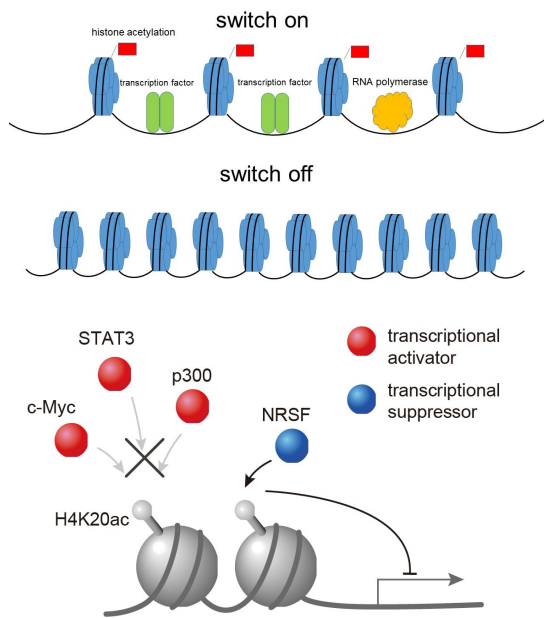


図 11

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 2 件)

Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells.

Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y.
Sci Rep. 2016 Apr 11;6:24318.

腎臓細管細胞 epigenetics に対する免疫抑制剤影響の解析

貝森淳哉

今日の移植、2015

[学会発表](計 3 件)

New Epigenetic Marker, H4K20ac Related to Transcriptional Suppression Is Induced in Postneonatal Kidney Maturation and Organ Hypertrophy

Jun-Ya Kaimori, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, Yoshitsugu Obi, Masaki Hatanaka, Hidetoshi Tsuda, Shiro Takahara, Hiromi Rakugi, Yoshitaka Isaka.ASN 2014

新規抑制性アセチル化ヒストン修飾 H4K20ac は、臓器肥大により誘導される

貝森 淳哉、前原 一満、林 陽子、畑中 雅喜、山本 聡子、小尾 佳嗣、高原 史郎、高尾 敏文、大川 恭行、木村 宏、猪阪 善隆、楽木 宏実

日本高血圧学会学術総会 2014

腎臓尿細管細胞 epigenetics に対する免疫抑制剤の影響の解析

貝森 淳哉

CPCF 2014

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学 HP

<http://www.att.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

貝森 淳哉 (KAIMORI, Jun-Ya)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70527697

(2)研究分担者

猪阪 善隆 (ISAKA, Yoshitaka)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00379166

(3)連携研究者

高原 史郎 (TAKAHARA, Shiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：70179547