

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860253

研究課題名(和文) 抗肥満薬開発を目指したヒストンメチル化酵素SETDB1の活性制御法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of the human histone methyltransferase SETDB1

研究代表者

橘 敬祐 (Tachibana, Keisuke)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：30432446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞の分化に関わるヒストンメチル化酵素SETDB1について、以下のことを明らかにした。SETDB1の酵素活性には、翻訳後修飾が重要な役割を担うことが示唆された。また、活性制御に重要な役割を担うMCAF1との相互作用に必要な領域を同定した。さらに、SETDB1が細胞質に多く存在する機構を解明した。以上、本研究で得られた成果はSETDB1を標的とした創薬を目指す上で重要な知見であり、非常に意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：SETDB1 is a histone methyltransferase that methylates lysine 9 on histone H3. We found that a post-translational modification of hSETDB1 is important to regulate its methyltransferase activity. Moreover, we identified the regions necessary for interaction between hSETDB1 and hMCAF1. Finally, we showed that nuclear hSETDB1 might be degraded by the proteasome and exported to the cytosol. These findings will be useful for regulating hSETDB1 function.

研究分野：病態医化学

キーワード：ヒストンメチル化酵素 SETDB1 細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

昨今増加している虚血性心疾患や脳血管疾患の発症の要因の一つとして肥満が挙げられており、肥満を予防・解消することが急務である。近年、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基(H3K9)のメチル化が亢進したマウスは、脂質代謝が低下し肥満を呈することが報告された。すなわち、生活習慣や遺伝的要因以外にエピジェネティックな変化も生活習慣病の発症に重要であり、H3K9のメチル化を抑制できる薬剤が新たな抗肥満として有望である。

H3K9 のメチル化酵素の一つである SETDB1 は未分化な脂肪細胞に多く発現しており、脂肪細胞の分化を抑制していると考えられている。このように、SETDB1 は脂肪細胞の分化を介して脂質蓄積に関わっており、肥満発症に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、SETDB1 が機能する詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、SETDB1 を標的とした抗肥満薬開発のための研究基盤を構築することを目指して、SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性の制御機構を解明することとした。

2. 研究の目的

本研究では、SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性の制御機構を解明することを目的として、酵素活性に重要な SET ドメイン、活性制御に関与している相互作用因子、及び SETDB1 の細胞内局在について検討を行った。

(1) SETDB1 の C 末端側には、ヒストンメチル化酵素活性に関わる SET ドメインがある。しかしながら、SETDB1 の SET ドメインは他のヒストンメチル化酵素と異なり、約 350 アミノ酸残基からなる長いインサクション領域によって分断されている。また SET ドメインだけでは活性を示さず、活性にはその上流の領域も必要であることを明らかにしてきた。しかし、それらによる活性の制御機構は、その立体構造を含め不明である。そこで本研究では、SET ドメインの構造と活性の相関について検討を行う。

(2) SETDB1 は単独では H3K9 をジメチル化までしか行えないが、ヘテロクロマチン形成に関与するタンパク質 MCAF1 と相互作用することでトリメチル化できることが報告されている。一方、同じ H3K9 のメチル化酵素である G9a は、単独でもトリメチル化酵素活性を有している。このように、SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性はタンパク質間相互作用によって制御されており、特に MCAF1 との複合体の形成が重要であると考えられる。そこで本研究では、SETDB1 と MCAF1 との相互作用様式について検討を行う。

(3) タンパク質が正常に機能するためにはしかるべき場所に存在する必要がある。タンパク質の細胞内局在の異常が疾病の発症に繋がるということが報告されている。このように、タンパク質の細胞内局在とその制御機構を明らかにすることは、疾患の予防法・治療法を開発する上においても重要である。しかしながら、SETDB1 の細胞内局在については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、SETDB1 の細胞内局在について検討する。

3. 研究の方法

(1) SETDB1 の酵素活性部位の構造と機能の相関について解析するために、ヒストンメチル化酵素活性に必要な C 末端側の領域を昆虫細胞 Sf9 細胞に発現させる。発現したタンパク質をアフィニティクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製する。精製したタンパク質は、SDS-PAGE により精製度を確認する。得られたタンパク質を用いて活性及び構造情報を取得する。

(2) MCAF1 による SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性の制御機構を解明するために、それらの相互作用様式を検討する。まず、SETDB1 と MCAF1 のそれぞれの欠失変異体を発現するプラスミドを種々作製する。作製した発現プラスミドを細胞にトランスフェクションし、免疫沈降法により相互作用に必要な領域を決定する。同定した領域のタンパク質を発現・精製し、相互作用様式を解析する。

(3) SETDB1 の細胞内局在を解析するために、抗 SETDB1 抗体を用いて免疫染色を行う。また、SETDB1 の各種欠失変異体に蛍光タンパク質 EGFP あるいは GST タグを付加した発現プラスミドを作製する。作製したプラスミドを細胞にトランスフェクションし、SETDB1 の領域と局在との関連を解析する。さらに、EGFP を付加した SETDB1 を発現する安定発現細胞株を樹立し、局在を制御するシグナルを同定する。

4. 研究成果

(1) これまでに申請者らは、SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性には SET ドメインに加えて、その上流の領域も必要であることを明らかにしてきた。そこで、酵素活性に必要な SET ドメインを含む領域に GST タグを付加したタンパク質を昆虫細胞に発現させ、アフィニティクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。得られたタンパク質の精製度を確認するために、SDS-PAGE 及び CBB 染色を行った。その結果、2 本のバンドが認められた (図 1)。SETDB1 に対する特異的抗体を用いた解析より、これらはいずれも SETDB1 由来のバンドであり、翻

訳後修飾の違いにより泳動度が異なることが分かった。精製したタンパク質を用いて結晶化実験を行ったが、現在のところ構造解析に用いることができる結晶は得られていない。一方で、これら翻訳後修飾が活性に及ぼす影響を調べた結果、翻訳後修飾が SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性に必要であるという予備的データが得られた。これらのことから、SETDB1 は翻訳後修飾の違いにより構造が変化し、それによりヒストンメチル化酵素活性が制御されると推察された。

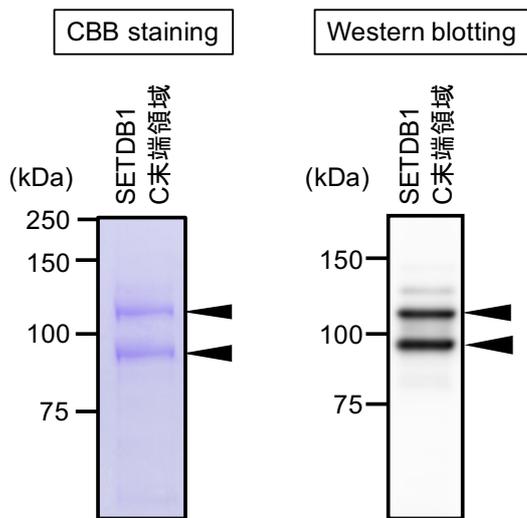


図 1 精製した SETDB1 タンパク質

(2) SETDB1 は、その活性制御に重要な役割を果たす MCAF1 の Domain 1 と相互作用することが報告されている。その情報を基にさらなる欠失変異体を作製し、SETDB1 との結合に必要な領域の絞り込みを行った。その結果、SETDB1 および MCAF1 のそれぞれの欠失変異体を用いて免疫沈降法により相互作用に必要な領域を解析した結果、SETDB1 の 195 アミノ酸残基からなる領域が、MCAF1 の 103 アミノ酸残基からなる領域と相互作用することが明らかになった。そこで、SETDB1 と MCAF1 の相互作用様式を明らかにするために、これらタンパク質を大腸菌に発現させ精製し、構造解析を試みた。しかしながら、103 アミノ酸残基からなる MCAF1 の最小領域は、タンパク質を精製する際に凝集することが分かり構造解析には不適切であると判断した。そのため、再度種々欠失変異体を作製し、発現・精製の条件検討を行った結果、227 アミノ酸残基からなる領域を用いた時に凝集傾向が少ないことが分かった。今後、これらの領域を用いて構造解析等を行い相互作用様式を明らかにすることで、SETDB1 と MCAF1 の相互作用による活性の制御機構の解明が可能になると考える。

(3) SETDB1 の局在を解析するために、申請者が作製したヒト SETDB1 に対するモノ

クローナル抗体を用いて肝ガン由来細胞株、肺ガン由来細胞株など様々な細胞株に対して免疫染色を行った。その結果興味深いことに、核内でヒストンをメチル化する酵素である SETDB1 は、いずれの細胞種においても細胞質に多く存在することが明らかになった。

次に、SETDB1 の局在制御機構を解明するために、SETDB1 の欠失変異体を作製して、細胞質の局在に必要な領域を同定することにした。EGFP あるいは GST タグを付加した SETDB1 の N 末端側、C 末端側を欠失させた変異体を細胞に発現させ、局在を観察した。その結果、全長の SETDB1 及びいずれの欠失変異体も細胞質に多く存在した。SETDB1 のアミノ酸配列を基にシグナル配列を検索した結果、N 末端側に核移行シグナル (NLS) と核外排出シグナル (NES) が検出された。このことから、C 末端側の欠失変異体は細胞質で翻訳されそのまま細胞質にとどまること、また、N 末端側は核内に移行しても細胞質に排出される可能性が考えられた。

そこで、SETDB1 が核外に排出されるか否かを調べるために、まず EGFP を付加した SETDB1 を発現する安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を、タンパク質核外輸送担体 CRM1 の阻害剤であるレプトマイシン B (LMB) 及びプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した時の局在の変化を観察した。その結果、LMB で処理することにより核に局在する SETDB1 の量の増加が観察された。一方、MG132 単独で処理した時には SETDB1 の局在にはほとんど変化は認められなかったものの、LMB と MG132 で同時に処理することにより核内に存在する SETDB1 の量が増加した (図 2)。したがって、SETDB1 は核から細胞質に排出されると

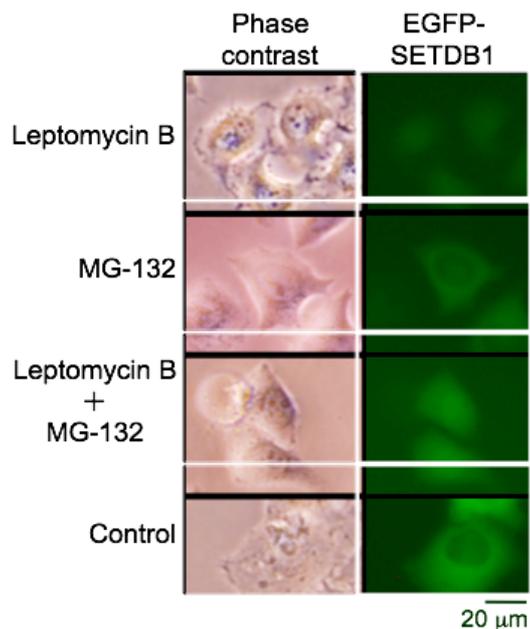


図 2 SETDB1 の細胞内局在の解析

共に、核のプロテアソームで分解される結果、細胞質に多く存在していると考えられた。すなわち、SETDB1によるヒストンのメチル化には、核内への局在の変化が重要であることが示唆された。

以上、本研究で得られた成果は、SETDB1を標的とした創薬を目指す上で重要な知見であり、非常に意義深いものとする。

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 1 件)

- ① Tachibana K, Gotoh E, Kawamata N, Ishimoto K, Uchihara Y, Iwanari H, Sugiyama A, Kawamura T, Mochizuki Y, Tanaka T, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T, Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochem Biophys Res Commun*, 465, 725-731 (2015), 査読有.
DOI:10.1016/j.bbrc.2015.08.065.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 早瀬絢香, 石本憲司, 熊谷文子, 橘敬祐, 川村猛, 田中十志也, 浜窪隆雄, 酒井寿郎, 児玉龍彦, 土井健史, ユビキチンリガーゼによる脂質代謝調節因子 Lipin1 の分解機構の解析, 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都.
- ② 秋山恵麻, 中西菜月, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 高野友希, 橘敬祐, 土井健史, 太田壮一, プラスチック工業製品に含まれる難燃剤によるマウス脂肪細胞分化への影響評価, 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都.
- ③ 秋山恵麻, 空久保良太, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 橘敬祐, 土井健史, 太田壮一, 母乳汚染物質テトラプロモビスフェノール A による脂肪細胞の分化攪乱作用, 第 64 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都.
- ④ 川又那津子, 石本憲司, 内原佳恵, 後藤英子, 垣之内啓介, 溝端栄一, 望月康弘, 酒井寿郎, 井上豪, 児玉龍彦, 橘敬祐, 土井健史, ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の酵素活性と翻訳後修飾の解析, 第 63 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2013 年 10 月 12 日, 京都.
- ⑤ 板倉奨, 秋山恵麻, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 橘敬祐, 土井健史, 太田壮一, テトラプロモビスフェノール A (TeBBPA) の脱臭素

化反応とその脱臭素化体の健康影響評価, 第 63 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2013 年 10 月 12 日, 京都.

- ⑥ 濱崎淳哉, 秋山恵麻, 角谷秀樹, 中尾晃幸, 橘敬祐, 土井健史, 太田壮一, 食品中に含まれる生体恒常性攪乱物質の糖・脂質代謝制御受容体活性の比較, 第 63 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2013 年 10 月 12 日, 京都.

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 敬祐 (TACHIBANA, Keisuke)

大阪大学大学院薬学研究科・招へい教員

研究者番号：30432446