

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650037

研究課題名(和文)新規クロマチン修飾の制御因子同定と機能解析

研究課題名(英文)Identification and functional analysis of novel chromatin modifiers

研究代表者

東田 裕一(TSUKADA, YUICHI)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・教授

研究者番号：90444801

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)：遺伝情報の発現は、エピジェネティクスと呼ばれるDNAとヒストンなどのタンパク質から構成されるクロマチンの化学的、構造的な修飾による制御を受けており、これは発生の過程で確立され、その後細胞の記憶として働く。本研究では、このエピジェネティクスの主要な制御因子であるクロマチンの化学修飾を制御する新規のヒストンクロトニル基転移酵素の部分的な精製に成功した。そして、ヒストンのクロトニル化修飾は哺乳類の雌性生殖細胞に豊富に存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms underlying epigenetic phenomena involve a range of chromatin modifications including covalent modification of chromatin and higher order chromatin reorganization. The covalent modifications of chromatin include DNA methylation and post-translational modifications of histones (acetylation, phosphorylation, ubiquitination, small ubiquitin-like modifier (SUMO)-ylation and methylation); all of these can influence overall chromatin structure. Among these covalent modifications of histones, crotonylation has been discovered recently. However, a responsible enzyme for this modification remains unknown. In this study, we partially purified histone crotonyltransferase activity and revealed that female germ cells are abundant in crotonylation of histones.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：遺伝子の情報発現と複製

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の個体は様々な種類の細胞から形成されているが、同一個体の細胞は免疫系などの一部の例外を除き、全ての細胞が全く同一の遺伝情報を持つ。つまり、同一の遺伝情報から異なる種類の細胞が作り出されているのである。近年、この同一の遺伝情報から異なる種類の細胞ごとにその細胞の種類を決定付ける特異的な遺伝情報を取り出し、維持するメカニズムとしてエピジェネティクスが注目され、且つその研究は急速な発展を遂げている。「エピジェネティクス」とは、分子生物学においては、細胞分裂を経ても継承される塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の活性化・不活性化を意味する。発生・分化過程における細胞運命の決定がこのエピジェネティクスによって制御されていると考えられることから、このエピジェネティクスを理解し、人工的に制御することが出来るようになれば、その応用によってより優れた再生医療の実現が可能になると考えられる。

エピジェネティクスを制御する主要なメカニズムとしてクロマチンの構造変換がある。これまでこのクロマチン構造変換の制御機構には、クロマチンの化学修飾(ヒストンの翻訳後修飾・DNAのメチル化)・ATP依存的なクロマチン構造変換・ヒストンバリエーションによるものが考えられている。この中でヒストンの翻訳後修飾についてはアセチル化・メチル化・リン酸化・ユビキチン化がこれまでによく研究されており、これらの修飾の組み合わせが最終的な遺伝子発現のアウトプットを決めるというヒストンコード仮説が提唱されている。研究代表者はエピジェネティクスを理解するために、クロマチン化学修飾の機能解析をその制御因子の同定と機能解析により行ってきた。最近、新規のヒストン翻訳後修飾としてクロトニル化修飾が発見され、その機能解析が求められているが、修飾を触媒する酵素は未だ同定されていない。

## 2. 研究の目的

ゲノムの持つ遺伝情報の発現は、“エピジェネティクス”と呼ばれるクロマチンの化学的・構造的な修飾による制御を受ける。これまで生命現象の未知のメカニズムは、その制御因子の同定・機能解析により解明されてきたと言っても過言ではない。事実、ヒストンの翻訳後修飾の機能解析はその修飾制御因子の同定・機能解析により飛躍的に進んだ。研究代表者はエピジェネティクスを理解するために、クロマチン化学修飾の機能解析をその制御因子の同定と機能解析により行ってきた。これまでに新規のヒストン脱メチル化酵素ファミリーとして JmjC ドメイン含有タンパク質ファミリーを世界で初めて同定

したことをはじめ[引用文献]、クロマチン化学修飾の制御因子について、分子・細胞・個体レベルでの機能解析を行ってきた[引用文献]。最近、新規のヒストン翻訳後修飾としてクロトニル化修飾が発見されたが、他のヒストン修飾と異なり、修飾を触媒する酵素は同定されていない。そこで本研究では、クロトニル化修飾の触媒酵素を同定し、その機能解析により修飾の機能および生物学的意義の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒストンクロトニル基転移酵素活性検出系の確立

クロトニル化は、アセチル基より炭素鎖が二つ多いクロトニル基がヒストンのリジン残基に付加する(図1)。この反応によりクロトニル基のドナーであるクロトニル CoA から CoA が生成することが推測される。そこで、CoA を NADH に変換し、NADH を検出することでクロトニル基転移酵素活性を検出する系を確立した。

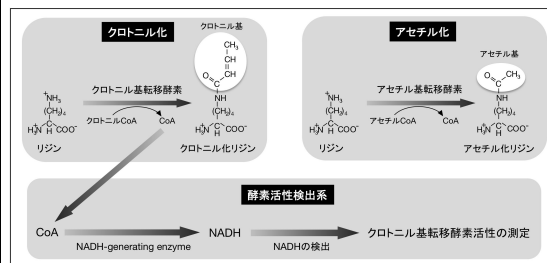


図1: クロトニル化反応とクロトニル基転移酵素活性検出系の確立

### (2) タンパク質クロマトグラフィーによるヒストンクロトニル基転移酵素の精製

まず、細胞のタンパク質画分を小規模で調製し、画分のクロトニル化活性を(1)の検出系を用いて調べた。活性が検出されたため、タンパク質画分を大規模で調製し、それを原材料として酵素活性を指標にクロトニル基転移酵素をクロマトグラフィーにより精製した。精製の原材料にはアフリカツメガエル卵のタンパク質画分を用いた。これは受精卵でクロトニル化修飾が豊富に検出されること、およびタンパク質画分調製にかかる時間とコストの削減を図るためである。

### (3) クロトニル化修飾の細胞レベルの機能解析

マウス受精卵におけるヒストンのクロトニル化修飾状態をクロトニル化されたヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫染色により解析した。

## 4. 研究成果

本研究課題では、新規ヒストンクロトニル化酵素の部分的な精製に成功した。そして、

クロトニル化修飾の細胞レベルでの機能解析により、ヒストンのクロトニル化修飾が雌性生殖細胞に豊富に存在していることを明らかにした。

### (1) ヒストンクロトニル化酵素活性検出系の確立

クロトニル化は、アセチル基より炭素鎖が二つ多いクロトニル基がヒストンのリジン残基に付加する。この反応では、クロトニル基のドナーであるクロトニル CoA から CoA が生成することが推測される。そこで、CoA を NADH に変換し、NADH を検出することでクロトニル基転移酵素活性を検出する系を確立し、アフリカツメガエル卵のタンパク質抽出液の画分からクロトニル基転移酵素活性を検出した(図2)。

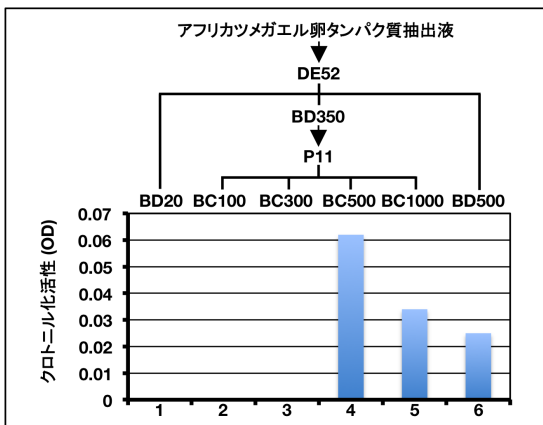


図2: クロトニル基転移酵素活性の検出

### (2) 新規ヒストンクロトニル基転移酵素の部分的な精製

まず、細胞のタンパク質画分を小規模で調製し、画分のクロトニル基転移活性を(1)の検出系を用いて調べたところ、活性が検出された。そこで、アフリカツメガエル卵のタンパク質抽出液の画分を大規模で調製し、それを原材料として酵素活性を指標にタンパク質クロマトグラフィーによるクロトニル基転移酵素の精製を試みた。数種類のカラムによるタンパク質の分画まで完了し、ヒストンクロトニル基転移酵素の部分的な精製に成功した。

### (3) ヒストンクロトニル化修飾の細胞レベルの機能解析

ヒストンのクロトニル化修飾は最近発見された修飾であることから、その機能は未解明であり、雄性生殖細胞における遺伝子発現制御への関与が報告されているのみである[引用文献]。そこで、雌性生殖細胞である卵母細胞および受精卵のクロトニル化修飾状態を解析した。哺乳類受精卵では、細胞核は精子由来のDNAが存在する雄性前核と卵子由来のDNAが存在する雌性前核に分かれている。クロトニル化されたヒストンに対する特異的抗体を用いたマウス受精卵の免疫染色

の結果、コアヒストンを形成するヒストン H2A、H2B、H3 および H4 のさまざまなリジン残基でクロトニル化修飾が起こっていることを明らかにした(図3)。本研究により、マウス卵母細胞にヒストンのクロトニル化修飾が豊富に存在することが明らかとなり、ヒストンのクロトニル化修飾は雄性生殖細胞だけでなく雌性生殖細胞でも機能していることが示唆された。

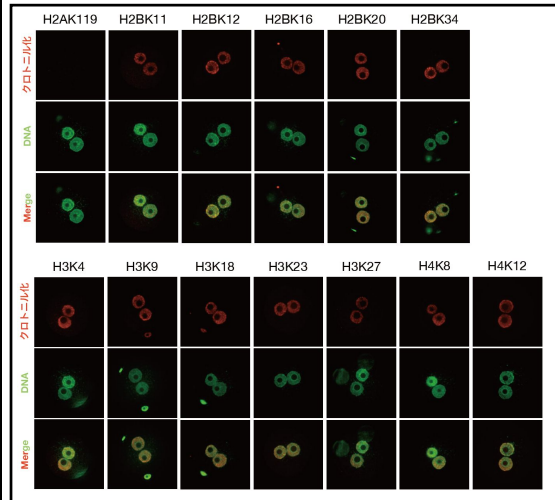


図3: マウス受精卵前核におけるヒストンのクロトニル化修飾状態

「エピジェネティクス」は、急速に発展してきた注目を集めている研究分野である。その中でも本研究課題の対象であるヒストンクロトニル基転移酵素の研究は、新規のヒストン修飾であるクロトニル化修飾の機能解明に必要な研究である。このような状況において、本研究課題では新規ヒストンクロトニル基転移酵素を部分的に精製し、ヒストンのクロトニル化修飾が哺乳類雌性生殖細胞および受精卵に豊富に存在することを明らかにした。これは、エピジェネティクス及びヒストンクロトニル化修飾の研究において非常に重要な研究成果であり、新たな知見を提供するものである。

今後は、ヒストンクロトニル基転移酵素の精製を継続する予定であるが、ヒストンクロトニル化修飾が哺乳類卵母細胞および受精卵に豊富に存在していることから、卵母細胞の成長・成熟過程や受精といった生理過程に関与していることが予想される。よって、ヒストンクロトニル基転移酵素の同定により、卵母細胞の成長・成熟過程や受精をはじめとする生理過程におけるヒストンクロトニル化修飾の機能解明が期待できる。

### <引用文献>

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., Zhang, Y.: Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins.

Nature, 439 (2006) 811-816.  
Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, I. A., and Nakayama, K. I.: CDH8 suppresses p53-mediated apoptosis during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.*, 11 (2009) 172-82.  
Tsukada, Y., Ishitani, T., and Nakayama, K. I.: KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev.*, 24 (2010) 432-7.  
Minjia TAN, Hao LUO, Sangkyu LEE, Fulai JIN, Jeong Soo YANG, Emilie MONTELLIER, Thierry BUCHOU, Zhongyi CHENG, Sophie ROUSSEAUX, Nisha RAJAGOPAL, Zhike LU, Zhen YE, Qin ZHU, Joanna WYSOCKA, Yang YE, Saadi KHOCHBIN, Bing REN, and Yingming ZHAO.: Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell*, 146 (2011) 1016-1028.

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)

〔学会発表〕(計1件)

Y. Tsukada, Chemical modifications of chromatin, 9<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine, 2015.12.10-12, Mie.

〔図書〕(計2件)

束田裕一, ナノ学会、ゲノム情報を管理するクロマチンの化学修飾とその制御機構、ナノ学会会報、2014、13 (2): 85-92.

束田裕一, 医学書院、代謝とエピジェネティクス、生体の科学、2014、65: 349-356.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tsukada-lab.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

束田 裕一 (TSUKADA, Yuichi)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・教授

研究者番号：90444801

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：