

吉田 稔

(独)理化学研究所 基幹研究所 分子リガンド探索研究チーム・チームリーダー

核エピゲノムとミトコンドリアゲノムの化学的制御とその応用

## § 1. 研究実施体制

(1) 「吉田」グループ

① 研究代表者: 吉田 稔 ((独)理化学研究所 基幹研究所、チームリーダー)

② 研究項目

- ・エピゲノム・ミトコンドリアゲノム制御化合物探索

(2) 「凌」グループ

① 主たる共同研究者: 凌 楓 ((独)理化学研究所 基幹研究所、専任研究員)

② 研究項目

- ・安定ホモプラスミー化を促進する化合物の取得系の構築
- ・ホモプラスミー化法の確立と分子機構解析

(3) 「後藤」グループ

③ 主たる共同研究者: 後藤 雄一 ((独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所、部長)

④ 研究項目

- ・患者由来細胞の初期化／再分化における mtDNA とミトコンドリアの機能解析
- ・化合物による細胞初期化／再分化効率の評価

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### 吉田グループ

研究項目1 (化合物によるエピゲノム制御と初期化・再分化誘導)

(1) エピゲノム・ミトコンドリアゲノム制御化合物探索

新規の核エピゲノム調節化合物を取得するため、標的指向型と表現型スクリーニングのための

評価系を構築し、探索を実施した。

#### ①標的指向型スクリーニングと活性化化合物評価

平成 23 年度は核におけるエピゲノムを制御するヒストン修飾の中でも特に重要であると考えられているヒストンアセチル化およびメチル化に焦点を絞り、効率的なハイスループットスクリーニング (HTS) 系を構築することを目指した。G9a はエピゲノム制御の中心を担うヒストン H3K9 のメチル化酵素であり、iPS 細胞の誘導と密接に関わっていることが示唆されている。我々は以前に ELISA 法によるスクリーニングを実施したが、必ずしも効率は高くなかった。そこで前年度開発した蛍光ペプチド基質を用いた HTS 系を改めて構築した。これを用いて理化学研究所が所有する化合物ライブラリーの約 20,000 化合物および産総研の化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、数十の活性物質を同定した。さらに、活性の強い化合物を検討したところ、1-2  $\mu\text{M}$  の IC50 値を有する化合物を 3 種類同定した。サブタイプ選択性を検討したところ、H3K9 のメチル化酵素である Suv39h1 については阻害活性を示したが、H3K4 のメチル化酵素である Set7/9 の活性は全く阻害しなかったことから、選択的に H3K9 のメチル化を阻害すると結論した。次に、細胞レベルでの効果を検討したところ、H3K9 メチル化レベルを顕著に減少させたことから、細胞内の G9a の活性を阻害していることを確認した。また、産総研の化合物ライブラリーから見出されたヒット化合物についても同様な評価を行い、2  $\mu\text{M}$  の IC50 値を有する化合物を得た。選択性について検討した結果、本化合物は Suv39h1 を強く阻害したが、Set7/9 を阻害しなかった。細胞レベルについて検討したところ、H3K9 および H3K27 のメチル化レベルを減少させたが、H3K4, K36, K79, H4K20 のメチル化レベルには影響しなかったことから、細胞レベルで H3K9 選択性を有することが示唆された。また、以前の研究によって epipolythiodioxopiperazine (ETP) 化合物に属する gliotoxin が G9a 阻害活性を有することを見出していたが、今年度は類縁体の活性について検討し、他の ETP 化合物の中に gliotoxin と同様にヒストン G9a および Sun39h1 の酵素活性を阻害するものを見だし、その構造活性相関を明らかにした<sup>1,2)</sup>。また、H3K4 のメチル化酵素である Set7/9 の阻害剤として同定した cyproheptadin について IC50 値を算出したところ 0.4  $\mu\text{M}$  と良好な値であった。加えて G9a 及び Suv39h1 の活性は阻害しなかったことから、Set7/9 に選択性が高いと考えられる。iPS 細胞誘導効率を高めるバルプロ酸に代わるクラス I ヒストン脱アセチル化酵素に対する阻害剤候補として、独自のライブラリーから Ky-2 を選択した。本化合物は強い酵素阻害活性を有しているが、比較的毒性が低く、動物実験で強い炎症抑制効果を示したので<sup>3)</sup>、今後リプログラミングへの効果を検討する。クラス III ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 については蛍光基質を用いた HTS 系を確立し、スクリーニングを実施した。その結果、1-4  $\mu\text{M}$  の IC50 値を示す化合物を少なくとも 5 種同定した。そのうち 3 種については SIRT2、SIRT3 の活性には全く影響を与えなかったことから、選択的な SIRT1 阻害剤を得ることに成功したと考えられる。ヒストン脱メチル化酵素については、ヒストン H3K4 の脱メチル化酵素である LSD1 の阻害剤探索のための評価系構築を行い、探索研究を行う準備が整った。

#### ②表現型スクリーニング

前年度、細胞内での阻害剤の効果をリアルタイムに評価するために、ヒストン H4K12 のアセチル

化を特異的に検出する蛍光プローブ Histac-K12 の開発に成功した。今年度は、ヒストン H3K9/14 のアセチル化およびヒストン H3K9 のメチル化を検出する新規蛍光プローブの開発に着手し、ヒストン H3K9/14 のアセチル化あるいはヒストン H3K9 のメチル化依存的なシグナルの検出に成功した。現在感度上昇を目指し、プローブのチューニングを行っている。また、分化多能性に重要な Nanog 遺伝子の発現を指標として、マウス ES 細胞の自己複製を促進させる化合物を探索した。京都大学 iPS 細胞研究所から提供された ES 細胞 (RF8-NanogGIP) は LIF (leukemia inhibitory factor) 存在下で培養すると自己複製能を維持するため Nanog-GFP を発現しているが、LIF 非存在下では自己複製能を失うため Nanog-GFP の発現が低下する。この系を用いて LIF 除去による Nanog-GFP の発現低下を抑制する化合物を探索した。その結果、理化学研究所が所有する化合物ライブラリーの約 20,000 化合物をスクリーニングしたところ数種類の活性化化合物を得ることができた。

### 凌グループ

研究項目2(化合物によるミトコンドリアゲノムの初期化と疾患治療法の基盤技術開発)

#### (1) ホモプラスミー化と安定維持法の確立と分子機構解析

ミトコンドリアは常に融合と分裂を繰り返し、ダイナミックなネットワークを形成する。ミトコンドリアの形態形成に機能する因子の多くは酵母からヒトまでよく保存されている。我々は出芽酵母において、ローリングサークル型 DNA 複製が活性酸素種 (ROS) によって活性化され、その産物であるコンカテマーの生成がホモプラスミー化を促進することを見いだした。また、この反応は相同対合を促進する酵素 Mhr1 の機能に依存することを明らかにしている。平成 23 年度はさらに二分子蛍光補完 (BiFC) 由来の蛍光を指標に *in vitro* で単離ミトコンドリアの融合の進行を追跡するシステムを用いて、ミトコンドリア融合に伴い mtDNA コピー数が増加することを見出した。ミトコンドリア融合の初期段階において呼吸鎖複合体 IV の解離が起り、構成サブユニットの一部がミトコンドリア内膜に局在するタンパク質分解酵素によって消化されることで ROS が発生し、Mhr1 依存的に mtDNA 複製が亢進することがわかった。これらの結果から、ミトコンドリア融合は ROS を誘発することで組換え依存型複製を活性化することが示唆された<sup>4)</sup>。さらにミトコンドリアは常に分裂と融合を繰り返していることから、ミトコンドリアの分裂に必要なタンパク質の活性を阻害すると融合が促進され、その結果ホモプラスミーの形成が亢進すると考えた。そこで、ミトコンドリアの分裂に必要なタンパク質の欠失変異が mtDNA 対立遺伝子の分離に果たす役割を調べたところ、ヒトミトコンドリア融合に働くタンパク質のオーソログである酵母の Fis1 の欠失がホモプラスミーの形成を促進することを明らかにした<sup>5)</sup>。したがってヒト Fis1 ホモログの活性を阻害する化合物がヒト mtDNA ホモプラスミー化を促進する可能性があると考えている。

### 後藤グループ

研究項目3 (iPS 細胞によるミトコンドリア病発症機構の解明と新規治療法の開発)

#### (1) 患者由来細胞の初期化/再分化における mtDNA とミトコンドリアの機能解析

当センターでは 200 症例を超えるミトコンドリア病患者由来の筋芽細胞／線維芽細胞を保有しており、これらを用いた疾患特異的 iPS 細胞の効率的な樹立方法を検討した。とりわけ筋芽細胞は、ミトコンドリア病患者の骨格筋病理所見を直接反映した細胞種であると同時に、病理診断時に採取した組織から樹立されるために患者試料を最大限活用することにつながり、バイオリソースの観点からもその意義は大きい。様々な誘導法の検討結果から、正常ヒト筋芽細胞／ミトコンドリア病患者由来筋芽細胞からの iPS 細胞樹立に関しては、レトロウイルス法ではなく、より高効率かつ核 DNA への外来遺伝子非挿入法であるエピソーマルプラスミド法あるいはセンダイウイルス法を採用した。本研究期間で樹立した iPS 細胞は総計で 120 株を超えており、疾患特異的 iPS 細胞は 10 患者検体(9 種類の mtDNA 変異)60 株に達している。今後は、これらの iPS 細胞をミトコンドリア病で特に強く症状が現れやすい神経細胞・心筋細胞・骨格筋細胞などへと再分化させ、細胞レベルでのミトコンドリア病の発症機構の解明を目指す。

一方で、ES 細胞と分化細胞ではミトコンドリアの果たす役割(形態、機能、mtDNA 挙動など)が大きく異なっており、iPS 細胞のミトコンドリアは、様々な点で ES 細胞のミトコンドリアに酷似していることを本研究で明らかにした。今後は、ミトコンドリアおよび mtDNA の動態変化を経時的に追跡し、細胞初期化／分化におけるミトコンドリアの発生的役割の実態解明を目指す。

## (2) 化合物による細胞初期化／再分化効率の評価

iPS 細胞誘導効率を上昇させる核エピゲノム制御剤として知られているバルプロ酸(HDAC 阻害剤)、Parnate(LSD1 阻害剤)を陽性対照として用い、ヒト線維芽細胞株の種類、細胞播種数、リプログラミング因子導入法(レトロウイルス法／エピソーマルプラスミド法)、薬剤処理期間、培養環境(フィーダー細胞／マトリゲルコート)などを詳細に検証し、高信頼性、高再現性を有した化合物スクリーニングの実現に向けて実験評価系を改良した。今後は、吉田グループより供与された核エピゲノム制御に関与しうる一連の化合物群を用い、細胞初期化を高効率で誘導する候補化合物を探索する。リプログラミング因子を導入したヒト線維芽細胞に化合物を添加して培養を行い、「ES 様形態＋アルカリフォスファターゼ陽性」を指標に iPS 細胞コロニー数を計測し、化合物による iPS 細胞誘導効果を検証する。

## § 3. 成果発表等

### (3-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Takahashi M, Takemoto Y, Shimazu T, Kawasaki H, Tachibana M, Shinkai Y, Takagi M, Shin-Ya K, Igarashi Y, Ito A, Yoshida M, “Inhibition of histone H3K9 methyltransferases by gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines”, *Journal of Antibiotics* (Tokyo), in press, 2012 (DOI: 10.1038/ja.2012.6.)

2. Sun Y, Takada K, Takemoto Y, Yoshida M, Nogi Y, Okada S and Matsunaga S, “Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities“, *Journal of Natural Products*, vol. 75, No. 1, pp.111–114, 2012. (DOI: 10.1021/np200740e)
3. Furumai R, Ito A, Ogawa K, Maeda S, Saito A, Nishino N, Horinouchi S and Yoshida M, “Histone deacetylase inhibitors block NF- $\kappa$ B-dependent transcription by interfering with RNA polymerase II recruitment“, *Cancer Science*, vol. 102, No. 5, pp.1081-1087, 2011. (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01904.x)
4. Hori A, Yoshida M and Ling F, “Mitochondrial fusion increases the mitochondrial DNA copy number in budding yeast“, *Genes to Cells*, vol. 16, No. 5, pp.527-544, 2011 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01504.x.)
5. Bradshaw E, Yoshida M and Ling F, “Mitochondrial fission proteins Fis1 and Mdv1, but not Dnm1, play a role in maintenance of heteroplasmy in budding yeast ”, *FEBS Letters*, vol. 586, 1245-1251, 2012. (DOI:10.1016/j.febslet.2012.03.046)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)