

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. 研究実施の概要

細胞系譜を決定づける階層的転写ネットワークの制御においてヒストン修飾を中心とする核ゲノムのエピジェネティクスが重要な役割を果たすことが明らかになり、細胞の初期化と分化のプロセスを制御するために時空間的にヒストン修飾を制御する技術が求められている。また、核ゲノムの 10 倍以上高頻度で変異が蓄積する体細胞ミトコンドリアゲノムをどう初期化するかも大きな課題である。成人の体細胞から iPS 細胞を誘導し、細胞治療に応用する際には、ミトコンドリア DNA の変異が問題になる可能性があるからである。本研究は、新しい技術・評価系を用いて核のエピゲノムの修飾変化とミトコンドリアゲノムのホモプラスミー化を誘導しうる活性化化合物を同定し、それらを組み合わせることによって核ゲノムとミトコンドリアゲノムの初期化の効率を上げるとともに、再分化に関して高いポテンシャルを持ち、疾患治療研究に理想的な iPS 細胞を作出する技術の確立を目指している。平成 22 年度は、エピジェネティクスを制御する酵素群、特にヒストンメチル化酵素に対する阻害活性を評価するための高速スクリーニングを法の開発と生細胞でリアルタイムにヒストンアセチル化修飾の動態をモニターできる系の構築と最適化を行った。また、ミトコンドリアのホモプラスミー形成とその維持機構を明らかにするため、ヒトミトコンドリア DNA の複製に働く DNA ヘリカーゼ Twinkle のオーソログである *PIF1* の機能解析を行った。その結果、*PIF1* 欠損変異株においては、mtDNA 複製開始点での二重鎖切断レベルが顕著に減少することを見出し、mtDNA 複製開始点での二重鎖切断形成に DNA ヘリカーゼが関与することを明らかにした。さらに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を行うため、正常ヒト線維芽細胞および数例のミトコンドリア病患者線維芽細胞に対し、レトロウィルスを介して山中 4 因子 (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) を導入し、それぞれ数クロンの正常/疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「吉田」グループ(理化学研究所)

- ① 研究分担グループ長: 吉田 稔 (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)
- 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(理化学研究所)

- ① 研究分担グループ長: 凌 楓 (理化学研究所 基幹研究所 吉田化学遺伝学研究室 専任 研究員)
- ② 研究項目
  - ・ 安定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(国立精神・神経医療研究センター)

- ① 研究分担グループ長: 後藤 雄一 ((独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部 部長)
- ② 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

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)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

エピゲノム制御の中心を担うヒストンメチル化酵素 (HMT) の阻害剤合成を行った<sup>1)</sup>。活性評価のため、従来法に比べ HMT 活性を簡便に評価する系の確立を試みた。新しい HMT の基質として、標的リジンの C 末端カルボキシル基にアミノメチルクマリン (AMC) をつけた蛍光ペプチド (ペプチジル-MCA) を用いた。このペプチジル-MCA のリシンとクマリン間のアミド結合はトリプシンにより切断され、AMC が遊離する。しかし、HMT が標的リジン残基の ε-アミノ基をメチル化すると、意外にもトリプシンによる切断は生じなかった。遊離した AMC はペプチジル-MCA と蛍光特性が異なることから、遊離した AMC、あるいはトリプシン添加後に残存するメチル化ペプチジル-MCA の蛍光強度を測定することで、HMT 活性の定量的な測定が可能となる。実際、ヒストン H3K4 の HMT である Set7/9 やヒストン H3K9 の HMT である G9a の酵素活性を本手法により測定することができ、また標的リジンの N 末端側のアミノ酸配列を変えることで HMT の基質特異性を評価することができた。

部位特異的なアセチル化が組織特異的な遺伝子発現において重要であることが示されているにも関わらず、そのダイナミクスの詳細は不明な点が多い。また、細胞内での阻害剤の効果をリアルタイムに評価する方法はなかった。われわれは FRET を利用して、生細胞におけるヒストン H4K5/K8 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブ Histac の開発に成功し、分裂期に H4K5 が脱アセチル化されることを報告した (Sasaki et al. 2009)。そこでさらに Histac の技術を応用し、ヒストン H4 の 12 番目のリジン (H4K12) のアセチル化を検出する蛍光プローブ、Histac-K12 を開発した。これを用いて H4K5 と異なり、H4K12 は分裂期に脱アセチル化されないことを見いだした。また、様々なヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の作用機序を検討したところ、阻害剤ごとにヒストンアセチル化の動態に差があることが分かった。特に 2009 年 11 月に米国で承認された FK228 (Istodax) は予想に反し、見かけ上不可逆的に阻害するものであることが判明した。さらに、アセチ

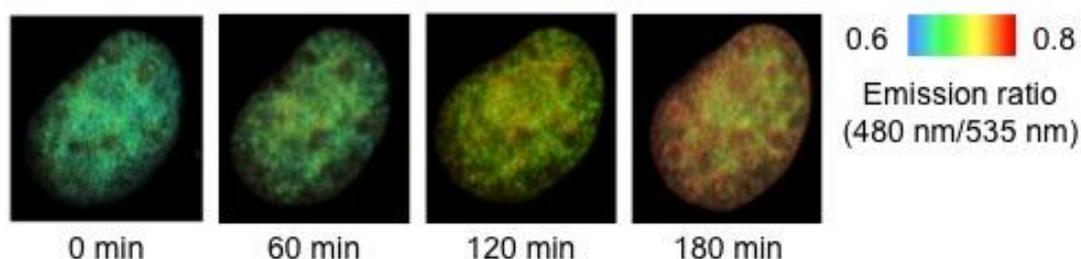


図 1. HDAC 存在下でのヒストン H4K12 アセチル化のリアルタイム変化

ル化ヒストンのエピジェネティック情報を認識する分子プロモドメインの阻害剤探索を行い、Histac-K12 の FRET シグナルを有意に低下させる新規プロモドメイン阻害剤 BIC1 の同定に成功した<sup>2)</sup>。

## 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

出芽酵母においては、活性酸素種の極めて限られた濃度範囲において、酸化損傷塩基除去酵素 Ntg1 が複製開始点で、濃度に応じた二重鎖切断を導入することで、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の相同対合を促進する酵素 Mhr1 の機能を介したローリングサークル型 DNA 複製を開始する。ローリングサークル型 mtDNA 複製とその産物であるコンカテマーとがホモプラスミー化を促進する。ヒトの mtDNA 複製に働く蛋白質群のオーソログの酵母におけるローリングサークル型 mtDNA 複製での機能を解明できれば、ヒト細胞でヘテロプラスミーになりがちな mtDNA のホモプラスミー化とその安定維持を図る重要な手がかりが得られる。現在、組換えを誘起する mtDNA 複製開始部位での二重鎖切断形成に Ntg1 とともに寄与する因子群は、ほとんど分っていない。我々は、ヒトミトコンドリア DNA の複製に働く DNA ヘリカーゼ Twinkle のオーソログである *PIF1* の欠損変異株においては、mtDNA 複製開始点での二重鎖切断レベルが顕著に減少することを見出し、mtDNA 複製開始点での二重鎖切断形成に DNA ヘリカーゼが関与することを明らかにした。さらに、Pif1 が mtDNA コピー数の維持、野生型 mtDNA より巨大欠失変異型 mtDNA が優位に複製する超抑制現象 (Hypersuppressiveness) の形成、及び Mhr1 に依存するローリングサークル型複製によるコンカテマーの合成に働くことを明らかにした。核では DNA の組換えを誘起する二重鎖切断部位から 3'-単鎖 DNA を露出させるというステップにおいて DNA ヘリカーゼが働くことが知られているが、DNA 二重鎖切断導入に DNA ヘリカーゼが働くことは知られていない。今回明らかにした Pif1 の働きは、DNA ヘリカーゼのこれまで知られていなかった機能であり、そのオーソログである Twinkle の新機能を揭示することにもつながる。さらに、これらの結果はヒトミトコンドリアにおいても Twinkle の機能に依存するローリングサークル型 mtDNA 複製が存在する可能性と、Twinkle の発現レベルを人為的に調節することでホモプラスミー化を促進することができる可能性を示唆した。

## 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

正常ヒト線維芽細胞および数例のミトコンドリア病患者線維芽細胞に対し、レトロウィルスを介して山中 4 因子 (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*) を導入し、それぞれ数クローンの正常/疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。樹立した正常/疾患特異的 iPS 細胞は、フィーダー細胞非存在下

(Matrigel-coated)でも未分化状態を維持しており(図 2)、胚様体形成を介して種々の細胞系譜へと分化することを確認した。現在、正常/疾患特異的 iPS 細胞の大量培養・詳細な特性解析と並行して mtDNA 挙動解析・ミトコンドリア機能解析を進めている。今後は、ミトコンドリア病の症状が顕著に現れやすい筋組織由来の筋芽細胞を用い、より病態を反映した疾患特異的 iPS 細胞の樹立を目指す。

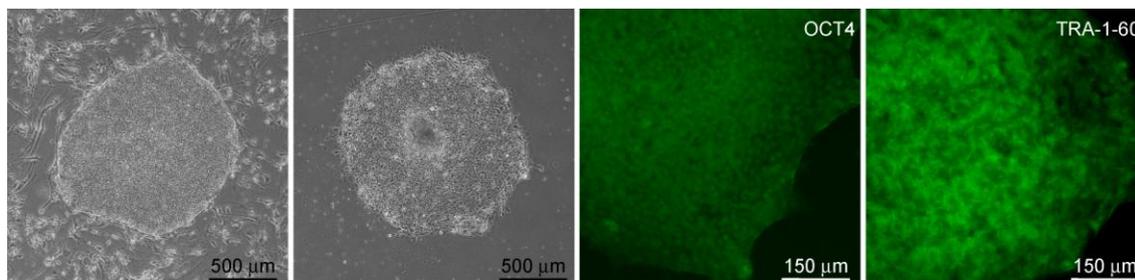


図 2 「ミトコンドリア病」患者線維芽細胞由来 iPS 細胞

#### (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ことで知られるバルプロ酸(ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤)を陽性対照として用い、化合物による細胞初期化効率の評価系を構築した。今後は、吉田グループより供与された種々の候補化合物に対し、「ES 様形態 + ALP 陽性 + OCT4 陽性」コロニー数を指標として細胞初期化におけるスクリーニングを開始する。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Eriko Iwasa, Yoshitaka Hamashima, Shinya Fujishiro, Eisuke Higuchi, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, and Mikiko Sodeoka, "Total synthesis of (+)-chaetocin and its analogs: Their histone methyltransferase G9a inhibitory activity", *Journal of American Chemical Society*, vol. 132, pp.4078-4079, 2010. (PMID: 20210309)
2. Tamaki Ito, Takashi Umehara, Kazuki Sasaki, Yoshihiro Nakamura, Norikazu Nishino, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Balasundaram Padmanabhan, Shigeyuki Yokoyama, Akihiro Ito, and Minoru Yoshida, "Real-time imaging of histone H4K12-specific acetylation determines the modes of action of histone deacetylase and bromodomain inhibitors", *Chemistry and Biology*, vol. 18, in press, 2011 (DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.02.009).

### (4-2) 知財出願

- ① 平成22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)