

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スクリーニング系の構築

・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

① 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)

#### 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

## § 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

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 24 年度は、前年度にハイスループットスクリーニング (HTS) 系の構築に成功したヒストンアセチル化、メチルおよびタンパク質 SUMO 化修飾酵素に対するスクリーニングを実施した。ヒストンメチル化修飾酵素については、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 G9a の阻害剤探索を主に実施した。前年度に実施した HTS により複数の G9a 阻害剤の同定に成功しているが、新規構造を有するリード化合物を取得するため、東京大学の化合物ライブラリーの約 140,000 化合物から HTS を行い、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、IC50 値が 15  $\mu\text{M}$  以下の化合物を少なくとも 5 種類同定した。細胞内の G9a 阻害剤活性をヒストン H3K9 のメチル化を指標に検討し、前年度に同定した阻害剤を含めて最終的に細胞でも効く G9a 阻害剤を 6 個得ることが出来た。次に Alpha テクノロジーを利用してヒストン H3K27 メチル化酵素 EZH2、ヒストン H3K79 メチル化酵素 Dot1L、ヒストン H4K20 メチル化酵素 Set8/PR-Set7 の活性測定系を構築し、*in vitro* 選択性を検討したところ、少なくとも一つの阻害剤については G9a のみを選択的に *in vitro* で阻害した。その他のヒストンメチル化修飾酵素としては、前年度 HTS 系を構築したヒストン H3K4 メチル化酵素 Set7/9 に対して、理研 NPDepo 化合物ライブラリーおよび東京大学の化合物ライブラリーからスクリーニングを実施し、複数のヒット化合物を得た。加えて、H3K4 脱メチル化酵 JARID1A、H3K27 脱メチル化酵素 UTX 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。

ヒストンアセチル化修飾酵素について今年度は、NAD 依存性脱アセチル化酵素である SIRT2、SIRT3、SIRT5 に対してスクリーニングを実施し、複数のヒット化合物を得た。そのうち、SIRT2 については IC50 値が 5  $\mu\text{M}$  以下の化合物 19 個について、細胞レベルでの評価を行った。SIRT2 の生理的基質として  $\alpha$  チューブリンが知られているが、SIRT2 ノックダウン、あるいは pan-Sirtuin 阻害剤であるニコチンアミドを添加しても、顕著な  $\alpha$  チューブリンのアセチル化の亢進が見られなかったことから、新たな SIRT2 の生理的基質を同定する必要性が生じた。そこで、アセチル化タンパク質として同定した翻訳後開始因子 eIF5A およびアクチン結合タンパク質コータクチンのアセチル化を特異的に認識する抗体をそれぞれ作製し、SIRT2 ノックダウン細胞を用いて検討したところ、両タンパク質は SIRT2 の生理的基質であることを見出した<sup>(3,4)</sup>。この両タンパク質のアセチル化を指標にして、細胞内の SIRT2 阻害活性を検討し、細胞で効く複数の化合物の同定に成功した。

脱 SUMO 化酵素 SENP1 については、*in situ* SUMO 化アッセイ系を応用した *in situ* 脱 SUMO 化アッセイを用いた HTS 系を確立し、スクリーニングを実施した。その結果、IC50 値が 10  $\mu\text{M}$  以下の化合物を 6 個得た。そのうち 4 種類はトリプシンおよびパパイン等の他のシステインプロテアーゼには影響を与えず且つ、細胞内の SUMO 化タンパク質を増加させたことから、細胞で効く選択的な SENP1 阻害剤を得ることが出来たと考える。

さらにエピジェネティクスとミトコンドリアを結ぶ可能性のある因子として脱アセチル化酵素

HDAC6 に着目し、HDAC6 の活性とミトコンドリア機能の関連を調べたところ、HDAC6 の活性低下はミトコンドリアの呼吸活性を減少させることを見出した<sup>(4)</sup>。

## ②プローブ開発と表現型スクリーニング

前年度から引き続き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の蛍光プローブの開発を行った。ケトシン、グリオトキシンなどの既存の G9a/Suv39H1 阻害剤は細胞毒性が強く、昨年度開発した H3K9 のメチル化を特異的に検出する蛍光プローブの評価に用いることが難しかった。そこで、既存の G9a/Suv39H1 阻害剤をもとに毒性の減弱した誘導体を合成した<sup>(5)</sup>。本化合物および HTS により得られた新規 G9a/Suv39H1 阻害剤を用いて H3K9 のメチル化を特異的に検出する蛍光プローブを評価したところ、細胞のヒストン H3K9 メチル化レベルの低下に伴って蛍光プローブの応答が観察され、本蛍光プローブはヒストン H3K9 メチル化酵素阻害剤の細胞レベルでの評価に使用できることを示した。前年度作製した H3K9/14 のアセチル化を検出する蛍光プローブについては、感度上昇および安定的に細胞内に導入できるようにチューニングを行った。また、前年度より行っていた Nanog-GFP を指標とした胚性幹細胞のセルフリニューアル促進物質の探索を引き続き行い、2つの活性物質を得た。一方、リプログラミングマーカーを導入したマウス繊維芽細胞でのリプログラミングマーカーの発現を促進する化合物を探索したが、ヒット化合物は得られなかった。

今後、①および②で得られた化合物に対して活性強度、細胞膜透過性、構造活性相関などの基本的特徴付けを行い、有望な化合物候補群について、単独あるいは複数の化合物を組み合わせヒト iPS 細胞誘導効率への影響を評価していく。また同時に、ヒストンのメチル化、アセチル化、SUMO 化を読み取るリーダー分子を標的とした化合物を拡充していく。

## 凌グループ

### 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) 安定ホモプラスミー化を促進する化合物のスクリーニング系の構築

ホモプラスミー状態へ誘導する化合物のスクリーニング系の構築に資する知見を得るため、DNA 損傷によってヘテロプラスミーとなったヒト細胞を正常 mtDNA からなるホモプラスミー状態へ戻す機構の存在の有無を検証した。通常、DNA 損傷を受けると、細胞核においてチェックポイント経路が活性化される。出芽酵母においては、この際、ミトコンドリアゲノムの量が増加することが知られている。そこで、我々は HeLa 細胞を用いてヒト RRM3 遺伝子をノックダウンすることで DNA 損傷に応答するチェックポイント経路を活性化させた結果、細胞内の ROS のレベルが高くなり、ミトコンドリアゲノムの量も増加することを見出した。しかし、ROS スカベンジャーが存在すると、mtDNA コピー数の増加が見られなくなった。従って、DNA 損傷チェックポイント活性化によるヒト mtDNA のコピー数増加に ROS が必要であることがわかった。DNA 損傷チェックポイント経路は酵母からヒトまでよく保存されており、これらの結果は、ヒトミトコンドリアにおいても ROS によって活性化される mtDNA 複製機構が存在することを示唆している。また、DNA 損傷によ

ってヘテロプラスミー化が進行する細胞をホモプラスミーの状態に再び戻す治療法の開発に役立つ可能性も考えられる<sup>(2)</sup>。

## (2) ホモプラスミー化法の確立と分子機構解析

出芽酵母ミトコンドリアにおいては、ROS が相同組換えの最重要ステップである相同 DNA 対合を促進する組換え酵素 Mhr1 を介したローリングサークル型 DNA 複製を活性化し、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。相同組換えの主な機能は DNA 二重鎖切断修復である。しかし、その修復の過程で、相同 DNA 対合の後、DNA 二重鎖切断修復と mtDNA 複製のどちらに進むかについての決定機構は不明である。我々は、DNA 損傷によって誘導される Din7 タンパク質が 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、Mhr1 による相同対合に必要な 3'-単鎖 DNA を提供することを明らかにした。そして Din7 と Mhr1 タンパク質活性の相対レベルが、Mhr1 による相同 DNA 対合の後に、DNA 二重鎖切断修復とホモプラスミー化を促進するローリングサークル型 DNA 複製のどちらに進むかを定めることを明らかにした<sup>(6)</sup>。よって、ヒト mtDNA ホモプラスミー化を促進するためには、Din7 と Mhr1 ホモログの活性を調節する化合物をスクリーニングする系の構築を行う必要があると考えられる。

これらの結果は、ヒト細胞での mtDNA のホモプラスミー化機構の解明とヒト mtDNA ホモプラスミー化を促進するための薬剤開発につながる成果であると考えている。

## 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

我々は、主にエピソーマルプラスミドベクター法を用いて健常者由来/ミトコンドリア病患者由来の筋芽細胞(または線維芽細胞)から iPS 細胞を樹立した。本研究期間で樹立した iPS 細胞株は、現在までに総計 200 株程度(正常 mtDNA および 10 種類の代表的な mtDNA 病原性変異)に達している。これらの iPS 細胞株を用いてミトコンドリア病で症状が強く現れやすい神経細胞・心筋細胞への分化誘導に成功し、現在は、骨格筋細胞系譜への分化誘導法を検討している。今後は、疾患 iPS 細胞由来の神経細胞・心筋細胞・骨格筋細胞に対するミトコンドリア機能・形態解析、mtDNA 動態解析を通じてミトコンドリア病の病態発症機構の解明を目指す。

また我々は、iPS 細胞と線維芽細胞におけるミトコンドリア機能・形態、mtDNA 動態を比較した結果、①ミトコンドリア形態の変化、②解糖系優位なエネルギー代謝機構、③酸化ストレスの低下、④一細胞あたりの mtDNA コピー数の顕著な減少など、iPS 細胞は ES 細胞と同様のミトコンドリアの活動状態を示し、線維芽細胞とは大きく異なることを明らかにした。本成果は、ミトコンドリア病の病態解明研究に向けた重要な知見に繋がると同時に、「ミトコンドリアは細胞内の環境変化(発生・分化段階)に応じて能動的に機能・形態調節を行う」ことを強く示唆している。今後は、細胞初期化過程に着目し、分化細胞が多能性を獲得する段階でのミトコンドリア機能・形態、mtDNA 動態を経時的に追跡し、これらの状態変化を制御する候補因子の同定を目指す。

## (2) 化合物による細胞初期化／再分化効率の評価

我々は、これまでの研究を通じて、ヒト iPS 細胞の誘導に関する化合物スクリーニングの評価系を構築した。本評価系を用いて吉田グループより供与された数十種類の候補化合物に対する解析を実施した結果、ヒト iPS 細胞の誘導効率を高める数種類のヒット化合物を得ることに成功した。また吉田グループへの技術移転(ヒト線維芽細胞株および細胞播種数、リプログラミング因子導入法、培養環境、薬剤処理期間など)を完了し、化合物探索における HTS 化の後方支援を行う体制を構築した。

## §3. 成果発表等

### (3-1) 原著論文発表

1. Kamemura K, Ogawa M, Ohkubo S, Ohtsuka Y, Shitara Y, Komiya T, Maeda S, Ito A, Yoshida M., Depression of mitochondrial metabolism by downregulation of cytoplasmic deacetylase, HDAC6, *FEBS Lett.*, **586**, 1379-1383, 2012  
(DOI:10.1016/j.febslet.2012.03.060.)
2. Niu R, Yoshida M., and Ling F., Increases in Mitochondrial DNA Content and 4977-bp Deletion Upon ATM/Chk2 Checkpoint Activation in HeLa Cells, *PLoS ONE*, **7**, e40572, 2012. (DOI:10.1371/journal.pone.0040572)
3. Ishfaq M, Maeta K, Maeda S, Natsume T, Ito A, Yoshida M., Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), *FEBS Lett.*, **586**, 3236-3241, 2012 (DOI:10.1016/j.febslet.2012.06.042.)
4. Ishfaq M, Maeta K, Maeda S, Natsume T, Ito A, Yoshida M., The Role of Acetylation in the Subcellular Localization of an Oncogenic Isoform of Translation Factor eIF5A, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 2165-2167, 2012. (DOI:10.1271/bbb.120620)
5. Fujishiro S, Dodo K, Iwasa E, Teng Y, Sohtome Y, Hamashima Y, Ito A, Yoshida M., Sodeoka M., Epidithiodiketopiperazine as a pharmacophore for protein lysine methyltransferase G9a inhibitors: Reducing cytotoxicity by structural simplification, *Bioorg Med Chem Lett.*, **23**, 733-736, 2013. (DOI:10.1016/j.bmcl.2012.11.087)
6. Ling F., Hori A, Yoshitani A, Niu R, Yoshida M., and Shibata T, Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strandbreak-induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast, *Nucleic Acids Res.*, in press, 2012.