

氏 名	伊藤 環
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 号 番 号	博理工甲第 822 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	タンパク質のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発および動態解析に関する研究
論 文 審 査 委 員	委員長 連携教授 吉田 稔 委 員 教 授 松本 幸次 委 員 連携教授 今本 尚子 委 員 准 教 授 田中 秀逸

論文の内容の要旨

序論

アセチル化は代表的なヒストン翻訳後修飾の 1 つであり、細胞内においてヒストンアセチル化酵素（HAT）とヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）によって可逆的かつダイナミックに制御されている。しかしヒストンアセチル化の検出方法はウエスタンブロッティング法などの生化学的手法が主に用いられており、生細胞内においてヒストンアセチル化がいつ、どこで、どのように起きているかといった時間・空間分解能を持った解析法が存在しなかった。このような問題を克服するため、最近当研究室では蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を利用したヒストン H4 の 5 番目および 8 番目のリシン残基（H4K5/K8）のアセチル化を検出する新規蛍光プローブ「Histac」の開発に成功した。近年、様々なヒストンの翻訳後修飾が個々、あるいは複数組み合わせることによって遺伝子発現を制御しているというヒストンコード仮説の提唱により、個々の部位特異的なアセチル化を解析する重要性が示されている。よって本研究では部位特異的なヒストンのアセチル化の動態を生細胞で解析することを目的として、Histac の手法を応用したヒストンの部位特異的なアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発を行った。

結果

1. ヒストン H4K12 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発

FRET を用いたヒストンの部位特異的なアセチル化の検出を可能にするため、ヒストン H4 の 12 番目のリシン残基（H4K12）のアセチル化を特異的に認識する BRD2 のプロモドメインを利用してヒストン H4K12 のアセチル化を認識するプローブ、「Histac-K12」を作製した。

Histac-K12 はクロマチンに取り込まれ、内在性ヒストン H4K12 と同様の挙動を示すことがわかった。さらに Histac-K12 発現細胞に TSA を処理してアセチル化を誘導し、FRET 応答の指標として蛍光強度比（CFP/Venus）を用いて調べたところ、Histac-K12 は蛍光強度比の増加を伴ってアセチル化に応答することがわかった。一方、ヒストン H4K12 をアルギニンに置換した Histac-K12R では TSA 処理によって誘導されたアセチル化に対してほとんど応答しなかった。さらに、ヒストン H4K12 以外のアセ

チル化部位である K5、K8、K16 をアルギニンに置換した Histac-K5+8+16R では、TSA 処理に対して Histac-K12 WT とほぼ同様の応答を示した。以上のことから、ヒストン H4K12 のアセチル化を特異的に検出する新規蛍光プローブ、Histac-K12 の開発に成功した。

2. Histac および Histac-K12 を用いたヒストンアセチル化の動態解析

生細胞内における分裂時のヒストン H4K12 のアセチル化レベルについて調べた結果、ヒストン H4K12 のアセチル化レベルは分裂期を通してほとんど変化しないことがわかった。また、各 HDAC 阻害剤に応じて、H4K5/K8 および H4K12 のアセチル化レベルは異なる動態変化を示すことがわかった。特に、FK228 および MS-275 については過去の報告から可逆的な HDAC 阻害活性を有すると思われていたにもかかわらず、見かけ上不可逆的な阻害活性を示すことがわかった。また、BRD2 プロモドメインと結合する化合物として同定された BIC1 の生細胞内における評価を Histac-K12 を用いて行ったところ、BIC1 はヒストン H4K12 のアセチル化レベルに影響を与えることなく、アセチル化ヒストン H4K12 と BRD2 プロモドメインとの結合を阻害することがわかった。

3. ヒストン H3K9/K14 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発

FRET を用いたヒストンの部位特異的なアセチル化の検出を可能にするため、ヒストン H3 の 9 番目および 14 番目のリシン残基 (H3K9/K14) のアセチル化を特異的に認識する BRD4 のプロモドメインを利用してヒストン H3K9/K14 のアセチル化を認識するプローブ、「Histac-H3K9/K14」を作製した。

Histac-H3K9/K14 は染色体 DNA と共局在し、内在性ヒストン H3K9/K14 と同様の挙動を示していることがわかった。さらに Histac-H3K9/K14 発現細胞に TSA を処理してアセチル化を誘導し、FRET 応答の指標として蛍光強度比 (CFP/Venus) を用いて調べたところ、Histac-H3K9/K14 は蛍光強度比の減少を伴ってアセチル化に応答することがわかった。さらに、ヒストン H3K9/K14 をアルギニンに置換した Histac-H3K9+14R では TSA 処理によって誘導されたアセチル化に対してほとんど応答しなかった。以上のことから、ヒストン H3K9/K14 のアセチル化を特異的に検出する新規蛍光プローブ、Histac-H3K9/K14 の開発に成功した。

まとめと考察

本研究において、ヒストン H4K12、H3K9/K14 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発に成功した。本研究で開発されたプローブは、分裂期における動態をはじめとして、分化誘導時や胚発生時におけるダイナミックなアセチル化の動態変化等を解析するツールとしても有用であると期待される。また近年、がんなどの様々な疾患治療薬として、あるいは iPS 細胞誘導剤として、ヒストン翻訳後修飾因子を標的とした化合物の探索が世界的に実施されている。本プローブは、このようなエピジェネティクス調節化合物の in vivo 評価系としても有用な解析手法となると期待される。

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 23 年 2 月 14 日（月）16：10～17：10 に埼玉大学理学部 3 号館 2 階第 3 会議室で論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

ヒストンのアセチル化は様々な遺伝子の発現をクロマチンレベルで制御していることが知られている。しかし近年では、部位特異的なヒストンのアセチル化が DNA 損傷応答やエピジェネティックメモリーとして機能するなど、様々な生命現象に関与することが示唆されているがその詳細はまだほとんど明らかになっていない。その原因の 1 つとして、従来のヒストンアセチル化検出法がいずれも生化学的手法のみであり、生細胞内においてヒストンアセチル化がいつ、どこで起きているかという時間・空間分解能を持った解析法がなかったことが挙げられる。本研究では近年、生細胞内におけるタンパク質翻訳後修飾の検出に用いられている蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を用いたヒストンのアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発に世界に先駆けて成功し、そのプローブを用いてヒストンアセチル化の動態解析を行ったものである。学位論文は以下の項目からなっている。

1. ヒストンの部位特異的なアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発

本研究ではまず、アセチル化リシン残基とタンパク質プロモドメインとの相互作用に着目した部位特異的なヒストンアセチル化検出蛍光プローブの開発について述べている。本プローブを考案した佐々木和樹博士とともに、ヒストン H4 と、高アセチル化ヒストンのマーカーである 5 番目と 8 番目のリシン残基（K5/K8）のアセチル化を特異的に認識する BRDT のプロモドメインを用いることで、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 を作製した。Histac 発現細胞に TSA を処理してアセチル化を誘導し、FRET 応答の指標として蛍光強度比（CFP/Venus）を用いて調べたところ、Histac は蛍光強度比の増加を伴ってアセチル化に応答することがわかった。以上の結果から Histac は高度にアセチル化されたヒストン H4 の動態を生細胞内で検出できる初めての FRET プローブであることがわかった。そこで次に、Histac の手法を応用し、BRD2 のプロモドメインを用いたヒストン H412 番目のリシン残基（H4K12）のアセチル化を認識するプローブ、「Histac-K12」の開発を試みた。Histac-K12 はクロマチンに取り込まれ、内在性ヒストン H4K12 と同様の挙動を示し、Histac と同様、TSA 処理によって蛍光強度比が増加することを確認した。一方、ヒストン H4K12 をアルギニンに置換した Histac-K12R では TSA 処理によって誘導されたアセチル化に対してほとんど応答しなかった。さらに、ヒストン H4K12 以外のアセチル化部位である K5、K8、K16 をアルギニンに置換した変異体では、TSA 処理に対して野生型 Histac-K12 とほぼ同様の応答を示した。以上のことから、Histac-K12 はヒストン H4K12 のアセチル化を特異的に検出する新規蛍光プローブであると結論した。

2. Histac および Histac-K12 を用いたヒストンアセチル化の動態解析

生細胞内における分裂時のヒストン H4 のアセチル化レベルについて調べた結果、ヒストン H4K5/K8 のアセチル化は分裂中期から後期にかけて劇的に減少するのに対し、ヒストン H4K12 のアセチル化レベルは分裂期を通してほとんど変化しないことがわかった。また、各ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤に応じて、ヒストン H4 のアセチル化レベルは異なる動態変化を示すことがわかった。特に、FK228 および MS-275 については過去の報告から可逆的な HDAC 阻害活性を有すると思われていたにもかかわらず、見かけ上不可逆的な阻害活性を示すことがわかった。MS-275 は基質である HDAC に結合しながらその構造

を変化させることで、HDAC へより強固に結合することが近年報告されており、これが MS-275 の示す不可逆性の理由と考えられる。FK228 についても同様の理由が考えられるほか、細胞内への取り込みに対して細胞外への流出が比較的緩やかであるために、細胞内への蓄積性が高くなったことが原因として考えられる。また、BRD2 プロモドメインと結合する化合物として同定された BIC1 の生細胞内における評価を Histac-K12 を用いて行ったところ、BIC1 はヒストン H4K12 のアセチル化レベルに影響を与えることなく、アセチル化ヒストン H4K12 と BRD2 プロモドメインとの結合を阻害することがわかった。

3. ヒストン H3K9/K14 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発

さらに他の部位特異的なアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発をめざして、BRD4 プロモドメインを用いたヒストン H3K9/K14 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブ、「Histac-H3K9/K14」の開発を試みた。Histac-H3K9/K14 は染色体 DNA と共局在し、内在性ヒストン H3K9/K14 と同様の挙動を示すことを確認した。Histac-H3K9/K14 発現細胞に TSA を処理してアセチル化を誘導し、FRET 応答の指標として蛍光強度比 (CFP/Venus) を用いて調べたところ、Histac-H3K9/K14 は蛍光強度比の減少を伴ってアセチル化に応答することがわかった。一方、ヒストン H3K9/K14 をアルギニンに置換した変異体では TSA 処理によって誘導されたアセチル化に対してほとんど応答しなかった。以上のことから、アセチル化に伴って FRET シグナルが増加する新しいタイプの蛍光プローブ、Histac-H3K9/K14 の開発にも成功したと考えられる。ヒストン H3K9 はアセチル化されると同時にメチル化による転写抑制にもかかわるきわめて重要な部位であり、この部位のアセチル化を検出できる特異的生細胞プローブが得られたことは、今後のクロマチン研究に極めて有用であると考えられる。

以上、本論文はヒストン H4K5/K8、H4K12、H3K9/K14 のアセチル化を検出する新規蛍光プローブの開発に世界に先駆けて成功したものである。本研究で見出された分裂期における動態をはじめとして、今後は分化誘導時や胚発生時にはダイナミックなアセチル化の動態変化等を解析するツールとして有用であると期待される。また近年、がんなどの様々な疾患治療薬として、あるいは iPS 細胞誘導剤として、ヒストン翻訳後修飾因子を標的とした化合物の探索が世界的に実施されている。本プローブは、それらエピジェネティクス調節化合物の *in vivo* 評価系としても有用な解析手法となると期待される。

本研究の結果は査読制のある国際誌に 2 編の論文 (筆頭著者および共著者) として掲載 (および掲載決定) となった。よって本審査委員一同は、本論文が博士 (理学) の学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と認めた。