



Title	ヒストンメチル化酵素SETDB1の酵素活性と細胞内局在に関する研究
Author(s)	後藤, 英子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59407
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	後 藤 英 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学 位 記 番 号	第 2 5 1 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学 位 論 文 名	ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の酵素活性と細胞内局在に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 土井 健史 (副査) 教 授 八木 清仁 教 授 辻川 和丈 教 授 大久保忠恭

論 文 内 容 の 要 旨

生命活動は、必要な組織で必要な時に必要な量の遺伝子発現が制御されることで持続されている。近年、塩基配列によらない、クロマチン構造の変化により遺伝子の発現が制御されるエピジェネティックな機構が明らかになってきた。クロマチン構造が弛緩したユークロマチンでは転写が活性化され、凝集したヘテロクロマチンでは転写が抑制される。このようなクロマチン構造の変化は、ヒストンの修飾によって制御されている。ヒストンの修飾のうち、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基 (H3K9) のメチル化は、転写抑制を引き起こす。近年、H3K9 特異的に脱メチル化する酵素 *Jhdm2a* の欠損マウスが肥満を呈することが明らかとなり、H3K9 のメチル化の変化が生活習慣病の発症に関与することが示唆されている。SETDB1 は、H3K9 に最大 3 つのメチル基を付加できるヒストンメチル化酵素である。SETDB1 はメラノーマで高発現しており、SETDB1 による H3K9 のメチル化が疾患の発症、および進展に関連していると考えられる。従って著者は、SETDB1 の機能を制御する機構を解明することが、癌や肥満の発症機構の解明に重要であると考えた。しかし、SETDB1 が機能するための詳細な機構は明らかになっていない。そこで著者は、ヒト SETDB1 の機能を制御する機構を解明することにした。

まず、SETDB1 の構造と機能の関係を明らかにするため、SETDB1 のヒストンメチル化酵素活性を有する領域を解析した。ヒト SETDB1 は 1291 アミノ酸残基からなり、MBD やヒストンメチル化酵素に共通する SET domain などを有する。そこで、酵素活性に必要な領域を同定するために、酵素活性に重要な SET ドメインを含む 4 種類の SETDB1 (1-1291 a.a., 417-1291 a.a., 570-1291 a.a., 681-1291 a.a.) タンパク質を調製した。その際、翻訳後修飾を受けた SETDB1 が酵素活性を有することから、翻訳後修飾可能な Sf-9 細胞を用いて SETDB1 タ

ンパク質を発現させ精製を行った。MS 解析などの手法を用いて、得られた SETDB1 タンパク質がリン酸化されていることを確認した。そこで、ヒストンメチル化酵素活性を測定した結果、SETDB1 (1-1291 a.a., 417-1291 a.a., 570-1291 a.a.) タンパク質は酵素活性を有したが、SET ドメインのみの SETDB1 (681-1291 a.a.) タンパク質は酵素活性を示さなかった。従って、SETDB1 がヒストンメチル化酵素活性を発揮するためには、SET ドメインだけでは不十分であり、MBD を含む 570 番目から 1291 番目までのアミノ酸領域が必要であることが明らかになった。今後、SETDB1 の酵素活性を持つ領域の構造を明らかにすることで、新規薬剤を開発するための知見を得られることが期待できる。

一方、タンパク質の細胞内局在の異常と疾患との関連が報告されているが、SETDB1 の細胞内局在を解析した報告はない。そこで、著者は SETDB1 の細胞内局在を解析することにした。まず、細胞内局在を解析するために、SETDB1 に対する抗体を作製した。作製した抗体を用いて SETDB1 の細胞内局在を解析した結果、核でヒストンをメチル化する SETDB1 は核には少ししか存在せず、細胞質に多く存在することが明らかになった。次に、SETDB1 に細胞内局在を制御する領域があるか否かを、種々の欠変異体を用いて探索した。その結果、いずれの領域を発現させても細胞質に多く存在した。従って、SETDB1 は何らかの機構により細胞質に多く存在すると考えられた。そこで、EGFP を融合した SETDB1 の安定発現細胞株を樹立し、様々な条件下での SETDB1 の細胞内局在を観察した。まず、SETDB1 が機能する条件下において核内の SETDB1 が増加するか否かを解析した。これまでに、SETDB1 は細胞周期依存的にヒストンのメチル化や染色体の凝縮に関与すること、また、BRAF シグナル経路と協同してメラノーマ発症の促進に関与することが知られている。そこで、細胞周期を停止する薬剤や MAPK シグナルの活性化剤を用いて局在を解析したが、SETDB1 の局在は変化しなかった。さらに、様々なシグナル阻害剤を用いて解析したが、いずれの条件下においても SETDB1 の細胞内局在は変化しなかった。従って、SETDB1 は核において少量で機能すると考えられた。SETDB1 が細胞質に多く存在する原因として、SETDB1 が核から細胞質へ排出されている、もしくは、細胞内で分解されている可能性を考えた。そこで、核外排出を阻害する Leptomycin B、および、プロテアソーム阻害剤 MG-132 で細胞を処理した。その結果、核に存在する SETDB1 の量が増加した。従って、SETDB1 は核から細胞質に排出されると共にプロテアソームで分解される結果、細胞質に多く存在すると考えられた。

最後に、SETDB1 の細胞内局在が相互作用因子によって影響を受ける可能性を考え、SETDB1 と相互作用する因子の同定を試みた。作製した抗体を用いて内在的に発現している SETDB1 の免疫沈降を行い、複合体を質量分析により解析した。その結果、SETDB1 と相互作用する因子として MCAF を同定できた。MCAF は核内で SETDB1 と相互作用し、ヘテロクロマチンの形成に寄与することが報告されている。これら免疫沈降したサンプルを網羅的に解析することで、SETDB1 の細胞内局在に必要な因子の同定、および、その局在を制御する機構を明らかにできる可能性がある。

今後、本研究を発展させヒストンメチル化酵素 SETDB1 の機能制御機構を解明することで、肥満や癌の発症機序を解明し、有効な薬剤を開発できることが期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

後藤さんは、ヒストンH3の9番目のリジン (H3K9) のメチル化を行う SETDB1タンパク質について、構造と機能の関係を明らかにするために以下の研究を行った。まず、SETDB1のヒストンメチル化酵素活性を有する領域を調べた。酵素活性に重要な SETドメインを含む4種類のSETDB1 (1-1291 a. a.、417-1291 a. a.、570-1291 a. a.、681-1291 a. a.) タンパク質を翻訳後修飾可能なSf-9細胞を用いて発現させ精製を行った。これらのヒストンメチル化酵素活性を測定した結果、SETDB1 (1-1291 a. a.、

417-1291 a. a.、 570-1291 a. a.) タンパク質は酵素活性を有したが、SETドメインのみのSETDB1 (681-1291 a. a.) タンパク質は酵素活性を示さなかった。

次に、SETDB1の細胞内局在を解析した。解析のための抗体を作製し、その抗体を用いて解析した結果、核には少ししか存在せず、細胞質に多く存在することが明らかになった。SETDB1は何らかの機構により細胞質に多く存在すると考えられた。そこで、EGFPを融合したSETDB1の安定発現細胞株を樹立し、様々な条件下でのSETDB1の細胞内局在を観察した。細胞周期を停止する薬剤やMAPKシグナルの活性化剤、さらに、様々なシグナル阻害剤を用いて解析したが、いずれの条件下においてもSETDB1の細胞内局在は変化しなかった。従って、SETDB1は核において少量で機能すると考えられた。次に、核外排出を阻害するLeptomycin B、および、プロテアソーム阻害剤MG-132で細胞を処理し観察した結果、核に存在するSETDB1の量が増加した。従って、SETDB1は核から細胞質に排出されると共にプロテアソームで分解される結果、細胞質に多く存在すると考えられた。

最後に、SETDB1の細胞内局在が相互作用因子によって影響を受ける可能性を考え、SETDB1と相互作用する因子の同定を試みた。作製した抗体を用いて内在的に発現しているSETDB1の免疫沈降を行い、複合体を質量分析により解析した結果、MCAFを同定した。MCAFは核内でSETDB1と相互作用し、ヘテロクロマチンの形成に寄与することが報告されている。

以上の結果は、今後、肥満や癌の発症機序を解明し、有効な薬剤の開発に寄与できることが期待され、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものと認められる。