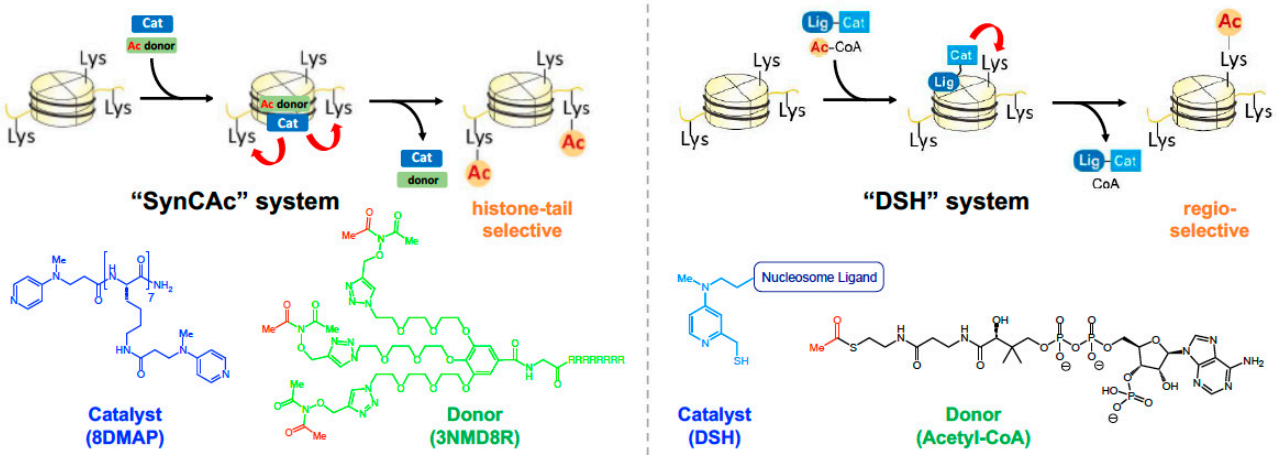
110　人工触媒を用いたヒストンアシル化修飾制御機構の研究	川島　茂裕

【目的】クロマチンを構成する主要なタンパク質であるヒストンは、様々な翻訳後修飾を受けることにより多彩な遺伝子発現パターンを生み出す。特に、約 50 年前にヒストン翻訳後修飾としてメチル化とともに発見されたアセチル化は、最もよく研究されてきた修飾の一つであり、ヒストンアセチル化酵素（HAT）がアセチル CoA からヒストンのリジン残基へとアセチル基を転移させることにより進行する。細胞内でのヒストンアセチル化プロファイルは、HAT とヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）のバランスで規定されている。HAT の不活性化によるヒストンアセチル化の減少はがんをはじめとした様々な疾患との関与が示唆されていることから、創薬の標的としても注目されている。近年の質量分析技術の発展により、ヒストンのリジン残基は、アセチル化だけではなくブチリル化、クロトニル化、マロニル化等の様々な種類のアシル化修飾を受けていることが明らかになっている。これら新しいヒストンアシル化の機能や酵素による制御機構はほとんど不明であり、現在のエピジェネティクス研究分野における中心的な問題の一つである。最近、精子の形成過程や、ダイエットや糖尿病に起因する代謝異常時の遺伝子発現制御にヒストンのブチリル化やクロトニル化、または 3–ヒドロキシブチリル化が関与することが示され、個体は発生・分化時やストレス応答時に様々なヒストンアシル化修飾を使い分けることで精密なクロマチン制御を行っていることが示唆されている。著者らは、ヒストンを選択的にアセチル化する二種類の人工触媒系（触媒＋アセチルドナー）の開発に世界で初めて成功している。一つは、ヌクレオソームの DNA に結合し、ヒストンテール領域の複数のリジン残基を広範囲にアセチル化する人工触媒であり（“SynCAc” system）、もう一つは、ヌクレオソームの中の特定の領域に結合し、リジン残基を位置選択的にアセチル化する人工触媒である（“DSH” system）。これらの人工触媒系はドナーを変えることにより、アセチル化だけではなく他の様々なアシル化をヒストンのリジン残基に導入できるという特徴をもつ。本研究計画では、これらの独自の人工触媒系を用いたケミカルバイオロジー的手法を主軸とし、ヒストンアシル化修飾の機能や酵素による制御機構の理解を深めることを目的とした。

【方法】著者らは、人工触媒系を用いて調製しアシル化ヌクレオソームをヒトのサーチュインと反応させた後、LC−MS/MS 解析により各残基の脱アシル化率を定量化する系を立ち上げた。この系を用いてヒトサーチュインの残基およびアシル基選択性の網羅的解析を行った。

【結果】ヒト Sirt1〜7 のリジン残基およびアシル基選択性についての網羅的知見を得ることに成功した。特にがん化との関連がよく知られている Sirt7 は、自身のカルボキシ末端に存在する塩基性アミノ酸に富んだ領域を介してヌクレオソームに直接結合し、これまで主な標的と考えられていたヒストン H3 の 18 番目のリジン残基よりも、36 番目のリジン残基を効率的に脱アセチル化及び脱ブチリル化することを見出した。

ヒストンを選択的にアセチル化する人工触媒系



110. 人工触媒を用いたヒストンアシル化修飾制御機構の研究

川島　茂裕

東京大学 大学院薬学系研究科 有機合成化学教室

Key words：触媒，エピジェネティクス，ヒストン，クロマチン，アシル化

緒　言

1つの受精卵からヒトの身体を構成する機能の異なる多種多様な細胞が作り出されるためには、精巧かつ多彩な遺伝子発現の制御メカニズムが必要となる。染色体を構成する主なタンパク質であるヒストンは、さまざまな化学修飾を受けることにより、クロマチン構造の変化などを経て、多彩な遺伝子発現パターンを生み出す。中でもアセチル化は最も古くから知られているヒストン修飾の1つで、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）と呼ばれる2つの拮抗した酵素により精密に制御されている。サーチュインはヒストン脱アセチル化酵素ファミリーの一つであり、その異常は老化やがん化などの疾患と密接に関連している。ヒトでは Sirt1～7 の七種類のサブタイプが見つかっており、細胞内局在、基質、および機能はそれぞれのサーチュインで異なる。しかし、各サーチュインがヒストンのどのリジン残基のどのアシル基をどれくらいの効率で脱アシル化するのかは不明であった。著者らは、人工触媒系を用いて調製しアシル化ヌクレオソームをヒトのサーチュインと反応させた後、LC－MS／MS 解析により各残基の脱アシル化率を定量化する系を立ち上げた。この系を用いてヒトサーチュインの残基およびアシル基選択性の網羅的解析を行い、その結果、ヒト Sirt1～7 のリジン残基およびアシル基選択性についての網羅的知見を得ることに成功した。特にがん化との関連がよく知られている Sirt7 は、自身のカルボキシ末端に存在する塩基性アミノ酸に富んだ領域を介してヌクレオソームに直接結合し、これまで主な標的と考えられていたヒストン H3 の 18 番目のリジン残基よりも、36 番目のリジン残基を効率的に脱アセチル化及び脱ブチリル化することを見出した。

方法および結果・考察

1.　LC－MS/MS を用いたヒトサーチュインの残基選択性およびアシル基選択性に関する定量解析

我々は以前に、ヌクレオソーム結合触媒（8DMAP）とアセチルドナー（3NMD8R、**1**）およびマロニルドナー（3Mal8R、3）を含むアシルドナーからなる人工触媒システムを開発した［1］（図 1A）。これらは、組換えヌクレオソーム中のヒストンテールのリジン残基を容易にアセチル化またはマロニル化できる。それ故、我々はアセチル化またはマロニル化ヌクレオソームが HDAC アイソフォームの残基選択性およびアシル基選択性を比較するための基質として使用できると考えた。さらに、人工アシル化触媒系のレパートリーをブチリル化へと拡大するために、マロニルドナー（**3**）と同じ骨格構造を有するブチリルドナー（3Bu8R、**2**）を合成した。これらの化合物を用いて、それぞれアセチル化、ブチリル化、またはマロニル化ヌクレオソームを調製した（図 1B）。限外濾過によって化合物を除去した後、アシル化ヌクレオソームをその後の脱アシル化アッセイのための基質として使用した（図 1C）。アセチル化、ブチリル化、およびマロニル化ヌクレオソームに対して、ヒトサーチュイン Sirt1～7 の組換えタンパク質を用いて HDAC アッセイを行った。 HDAC アッセイを行った後、未修飾リジンのプロピオニル化、トリプシン消化、および定量的液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC－MS／MS）分析を行った（図 1C）。脱アシル化効率の計算方法は図 1D、E に示す。著者らの実験において検出可能な脱アシル化活性を全く示さなかった Sirt4 を除いて、各サーチュインによる得られた脱アシル化効率を図 2 に示す。

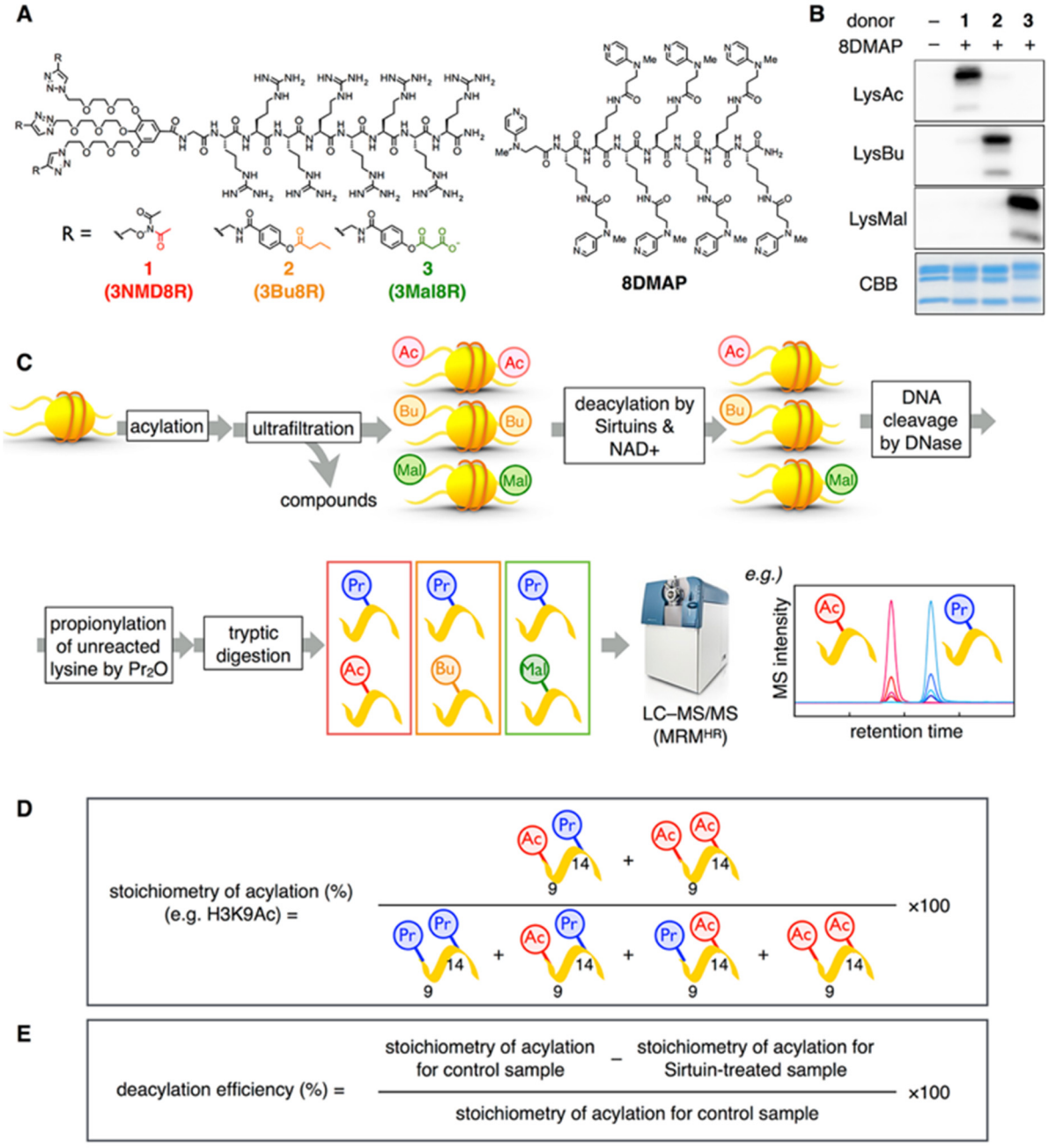


図 1. サーチュインの残基選択性およびアシル基選択性の定量的な解析方法

(A) 本研究で用いた触媒およびアシルドナー。

(B) アシル化ヌクレオソームのウエスタンブロッティング解析。

(C) 本研究の方法。

(D) (E) 脱アシル化の効率の計算方法。

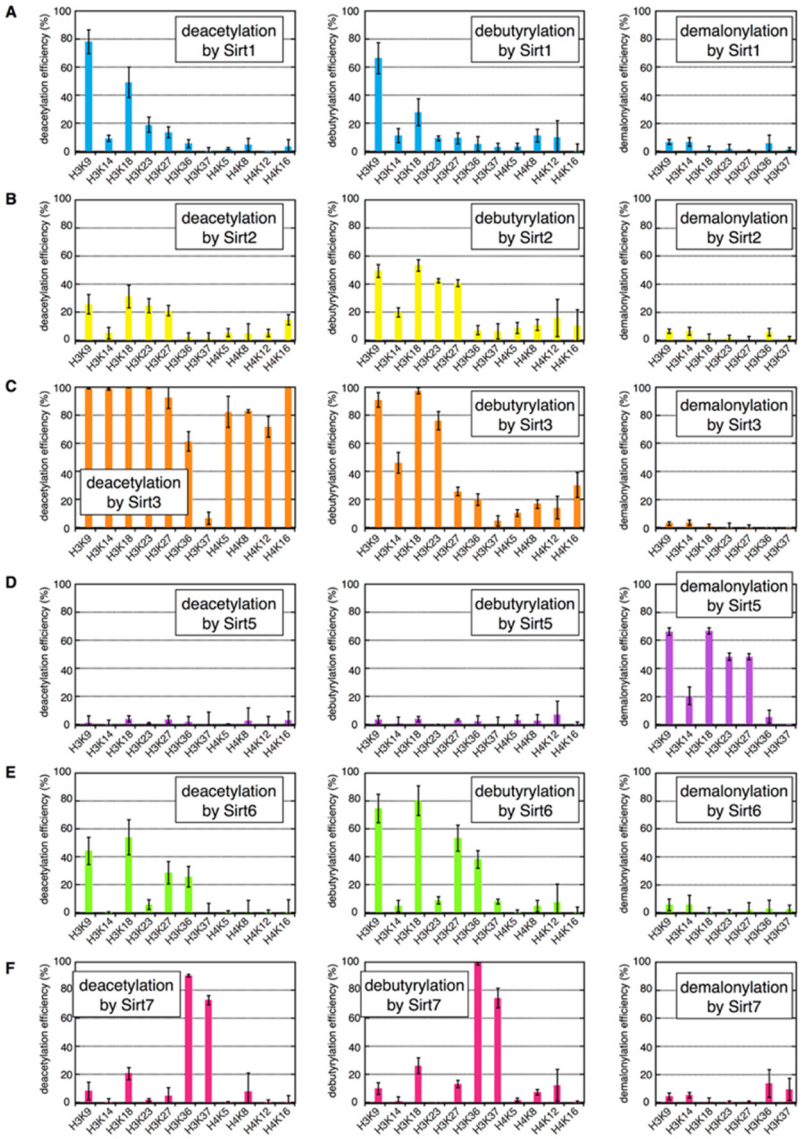


図 2. 脱アシル化アッセイの結果

(A) Sirt1、(B) Sirt2、(C) Sirt3、(D) Sirt5、(E) Sirt6、(F) Sirt7 の脱アシル化アッセイの結果。

2. サーチュインのアシル基選択性

以前に報告されたように [2]、Sirt5 のみが顕著な脱マロニル化活性を有していた (図 2D)。一方、他のサーチュインは脱アセチル化と脱ブチリル化の両方の活性を示した (図 2)。著者らは、検出可能な脱アセチル化／脱ブチリル化活性を示さなかった Sirt5 を除いて、脱アセチル化と脱ブチリル化のどちらが効率的に起きているかについて「acetyl preference index (API)」を定義した (図 3)。H3K18 での Sirt1 の API は、3 回の独立した実験で 1.58、1.69、および 2.32 でした。つまり、Sirt1 はこのサイトでは脱ブチリル化より脱アセチル化を好むことを意味する。Sirt1 は他のリジン残基においても同様の傾向を示し、Sirt1 は高いアセチル基選択性を持つと結論づけた。同様に、Sirt3 は高いアセチル基選択性を有することが明らかとなった。一方、Sirt2 と Sirt6 はブチリル基への優先度を示し、API は H3 テール全体で 0.41 から 0.72 の範囲であった。さらに、Sirt7 の API は 0.63～0.94 であり、Sirt7 のわずかな脱ブチリル化の優先度を示唆した。以上から、Sirt1 と Sirt3 は脱ブチリル化よりも脱アセチル化を好むのに対し、Sirt2、Sirt6 および Sirt7 は逆の選択性を持つと結論付けた。

	Sirt1			Sirt2			Sirt3			Sirt6			Sirt7		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
H3K9	1.09	1.18	1.29	0.65	0.41	0.49	1.07	1.18	1.03	0.64	0.60	0.52	0.85	NE	NE
H3K14	0.66	NE	NE	0.44	NE	NE	2.02	2.74	1.86	NE	NE	NE	NE	NE	NE
H3K18	1.58	1.69	2.32	0.70	0.59	0.44	1.02	1.06	1.00	0.72	0.72	0.55	0.90	0.63	0.90
H3K23	1.97	2.32	NE	0.70	0.56	0.47	1.30	1.46	1.19	NE	NE	NE	NE	NE	NE
H3K27	1.44	1.26	NE	0.60	0.51	0.43	3.63	3.79	3.46	0.54	0.65	0.41	NE	0.73	NE
H3K36	NE	NE	NE	NE	NE	NE	3.71	2.93	2.82	0.61	0.85	0.53	0.90	0.89	0.94

deaceylation efficiency / debutyrylation efficiency:
: –0.6
: 0.6–0.8
: 0.8–1.0
: 1.0–1.2
: 1.2–1.4
: 1.4–
debutyrylation preference
deacetylation preference

図 3. サーチュインのアシル基選択性

各値は acetyl preference index（API：脱アセチル化効率を脱ブチル化効率で割った値）を示す。

NE：Not Estimated。＃1～3 は 3 回の独立した HDAC アッセイの結果を示す。

3. サーチュインの残基選択性

サーチュインの脱アシル化活性は、リジン残基の位置によって異なっていた（図 2）。興味深いことに、H3 テールに存在するいくつかのリジン残基は、H4 テールに存在するものよりもすべてのサーチュインにより効率的に脱アシル化されることがわかった（図 2）。H3 テール内のサーチュインの残基選択性を調べるために、各脱アシル化効率を H3K18 での対応する脱アシル化によって標準化した（図 4A）。その結果、例えば、Sirt1 は H3K9 のブチリル基を H3K18 のブチリル基よりも効率的に除き、逆に Sirt7 は H3K18 よりも H3K9 を脱ブチリル化しないことが示唆された。興味深いことに、Sirt7 は H3K36 と K37 のブチリル基を非常に選択性高く除去することが示唆された（図 4B）。この脱アシル化活性は NAD^+依存的であり（図 4C）、脱アセチル化の残基選択性は脱ブチリル化と同様であった（図 2F）。以上の結果から、Sirt7 は H3K18 より H3K36／K37 を効率的に脱アセチル化および脱ブチリル化すると結論付けた。

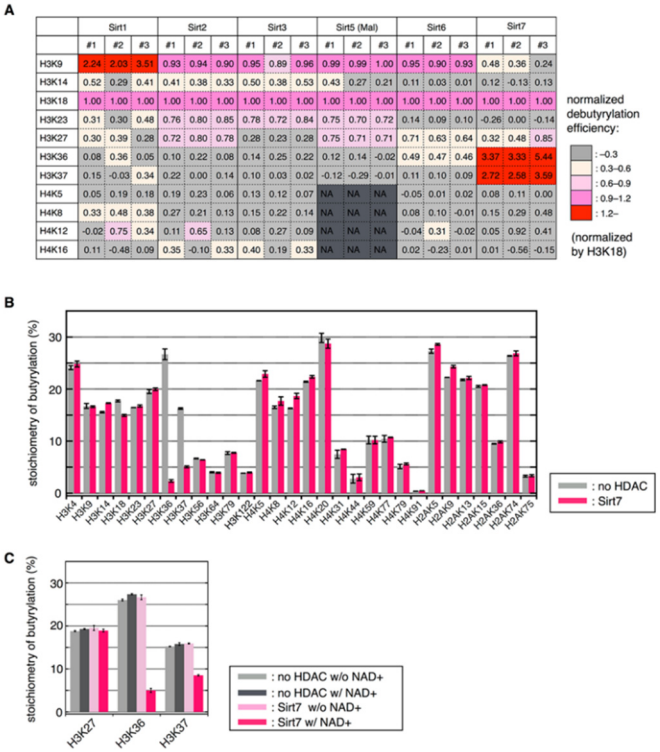


図 4. サーチュインの残基選択性

(A) 各値は acetyl preference index（API：脱アセチル化効率を脱ブチル化効率で割った値）を示す。

NE：Not Estimated。＃1～3 は 3 回の独立した HDAC アッセイの結果を示す。

(B) Sirt7 の残基選択性。

(C) NAD^+存在下での脱ブチリル化実験。

4. Sirt7 の H3K36/37 に対する選択性の解析

先行研究において、Sirt7 は H3K18 アセチル化ペプチドに対して特異的な脱アセチル化活性を示すことが報告されている［3］。また最近、二本鎖 DNA と RNA が Sirt7 を活性化することも報告された［4，5］。Sirt7 の RNA 結合モチーフはそのカルボキシ末端の塩基性領域に存在し、カルボキシ末端の塩基性アミノ酸が 7 つのアラニン残基に変異した Sirt7 変異体（CA：図 5A）は、RNA 結合能が低下し、それゆえ RNA の添加によって活性化することはできないことが示されている［5］。著者らの結果は、Sirt7 がアセチル化またはブチリル化ヌクレオソームに対して、主に H3K36 および K37 に対して、RNA を添加することなく、強力な脱アセチル化または脱ブチリル化活性を有することを示した（図 4）。したがって、Sirt7 はカルボキシ末端の塩基性領域を介してヌクレオソーム上の DNA と結合し、そのヌクレオソーム結合は Sirt7 の脱アシル化活性を増強しているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、著者らは、HeLa 細胞から FLAG-Sirt7（CA）変異体タンパク質、ならびに野生型 FLAG-Sirt7（WT）および触媒活性のない FLAG-Sirt7（DM）変異体タンパク質を精製した（図 5A、B）。精製 FLAG-Sirt7（WT）タンパク質は、H3K36／K37 に対して強い脱アセチル化および脱ブチリル化活性を示し、また H3K18/23/27 に対しては弱い活性を示した（図 5C、D）。さらに、FLAG-Sirt7（WT）は、脱アセチル化や脱ブチリル化よりも弱いものの、特に H3K36／K37 のマロニル基を除去した（図 5E）。観察されたすべての脱アシル化活性は NAD^+に依存し、ニコチンアミド（NAM）の添加によって阻害された（図 5C、D、E）。さらに、FLAG-Sirt7（DM）変異体タンパク質はその脱アシル化活性を完全に失った（図 5F）。プルダウンアッセイにより、Sirt7（WT）および Sirt7（DM）は組換えヌクレオソームと結合し、Sirt7（CA）は結合しないことが示された（図 5G）。Sirt7（CA）変異体は Sirt7（WT）と比較して低い脱アシル化活性を示した（図 5F）。以上の結果から、Sirt7 はカルボキシ末端塩基性領域を介してヌクレオソーム上の DNA と結合し、そのヌクレオソーム結合が H3K36／37 に対する Sirt7 の脱アシル化活性を増強すると結論づけた。

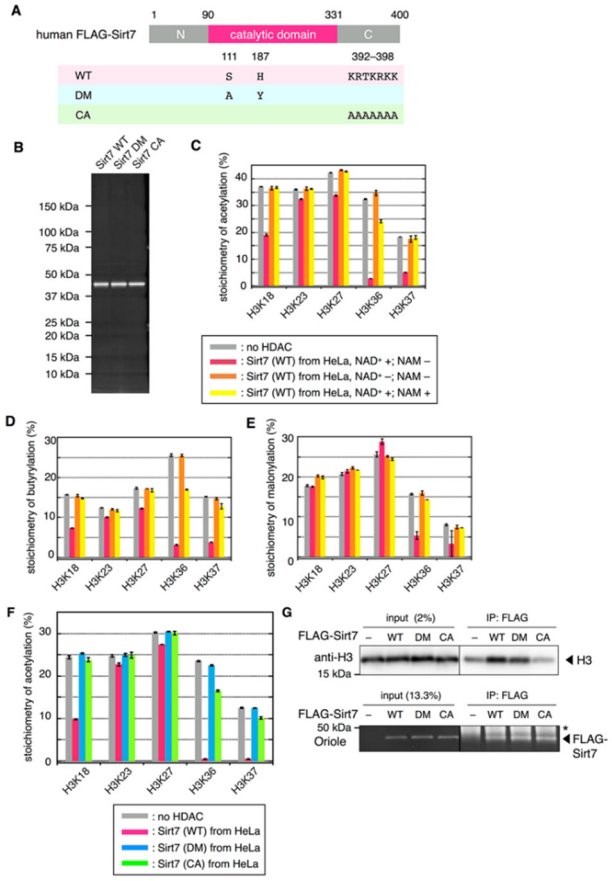


図 5. Sirt7 の H3K36／37 に対する選択性の解析

(A) (B) 本研究で用いたFLAG-Sirt7変異体。

(C) (D) (E) NAD^+、NAM存在下または非存在下における脱アシル化実験。

(F) FLAG-Sirt7変異体を用いた脱アシル化実験。 (G) Sirt7とヌクレオソームの結合実験。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科有機合成科学教室の金井求教授、山次健三助教、田辺佳奈博士、Jiaan Liu 博士、東京大学定量生物学研究所胡桃坂研究室の胡桃坂仁志教授、加藤大貴博士である。

文　献

1） Ishiguro, T. et al. Synthetic Chromatin Acylation by an Artificial Catalyst System. Chem 2, 840-859, doi:10.1016/j.chempr.2017.04.002 (2017).

2） Du, J. et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. Science 334, 806-809, doi:10.1126/science.1207861 (2011).

3） Barber, M. F. et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. Nature 487, 114-118, doi:10.1038/nature11043 (2012).

4） Tong, Z. et al. SIRT7 Is Activated by DNA and Deacetylates Histone H3 in the Chromatin Context. ACS Chem Biol 11, 742-747, doi:10.1021/acschembio.5b01084 (2016).

5） Tong, Z. et al. SIRT7 Is an RNA-Activated Protein Lysine Deacylase. ACS Chem Biol 12, 300-310, doi:10.1021/acschembio.6b00954 (2017).