

リプログラミングにおけるヒストン脱アセチル化酵素の 標的タンパク質に関する考察

松原圭吾¹、鎌田悠²、孫谷匡輝²、Lee Ah Reum³、矢持隆之¹、
佐伯和弘²、松本和也²、岸上哲士²、入谷明²、細井美彦²

はじめに

体細胞クローン動物の誕生により、分化した体細胞核が再び全能性を獲得しえることが示された。さらに Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの転写因子を導入することによりリプログラミングを引き起こす iPS 細胞作製技術が確立された。今後これらの技術の産業・医療分野への応用が期待されているが、現在まで両技術において作製効率の低さが共通した大きな問題の一つとして挙げられる。これまでの体細胞核移植技術に関する報告において、卵子内に移植された核の異常な DNA メチル化が、DNA メチル化阻害剤 (5-azacytidine) やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) の一つであるトリコスタチン A (TSA) 処理を行うことで大幅に抑制されることが示された⁽¹⁾。さらに TSA は抑制効果が大きく、クローン胚に対して TSA 処理を行うことでクローンマウスの作出効率を 5 倍以上に高めることに成功している。この結果から、卵細胞質中のリプログラミング因子が機能する際に、ヒストンのアセチル化レベルが移植された体細胞核のリプログラミング効率に大きく影響していると考えられている。また TSA 処理時間が 10 時間の時に最も発生効率が良く、処理時間がそれよりも長くても短くても発生率が低下する。このことから卵子活性化後から 10 時間がリプログラミングに重要で、以後の発生に影響していることが示唆される。一方、iPS 細胞技術においても HDACi の一つであるバルプロ酸 (VPA) 処理を行うことで Oct3/4, Sox2 の 2 因子のみで iPS 細胞が作出できることが報告されている⁽²⁾。これらの技術において HDACi がもたらす高アセチル化状態がリプログラミング効率に大きく関連していると示唆される。しかし、これらの分子メカニズムは明らかとなっていない。本項では、HDACi によるリプログラミングについて概説し、これらの標的タンパク質について考察を行った。

HDAC と HDACi

タンパク質のアセチル化は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) のバランスによって調節されており、HDACi 処理によって HDAC の活性を阻害することで HAT によるアセチル化が亢進し、高アセチル化状態となる (図 1)。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3

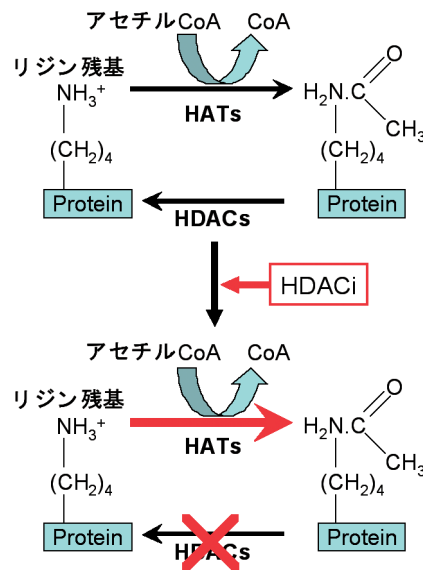


図1 HATs と HDACs によるアセチル化の制御

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) はこれまでに 18 種類が報告されており、酵母で保存されている遺伝子との相同性から 4 つのクラスに分けられている。これまでにリプログラミング効率を改善するとして報告されている TSA は Class I, II, IV のすべての HDAC に対して阻害作用を有している^(3, 4)。また VPA は Class I, II HDAC に対して阻害作用を示すことが報告されている⁽³⁾。いずれも Class を超えて広い範囲の HDAC に対して阻害作用を示し、HDAC の標的タンパク質全てが高アセチル化になると考えられる。しかし、リプログラミングにおいてそれらのうちのどのタンパク質が高アセチル化になることが重要であるか、その標的タンパク質は未だ明らかとなっていない。今後、クローン動物作出や iPS 細胞作製におけるリプログラミング効率を改善している標的タンパク質を明らかにすることはリプログラミングの分子メカニズムを理解する上で不可欠であると考えられる。

HDAC の標的タンパク質

HAT や HDAC はどのようなタンパク質を標的としているのだろうか。これらはその名前の通り、ヒストンのアセチル化や脱アセチル化を触媒している。ヒストンはヒストンテールとよばれる N 末端側のリジン残基が主にアセチル化を受ける。ヒストンがアセチル化を受けることによってクロマチン構造が弛緩し、これによって転写因子などがリクルートされることで、遺伝子発現の上昇に関与している。これまでヒストンがアセチル化を受けるアミノ酸残基が数多く報告されている (図 2)⁽⁵⁾。

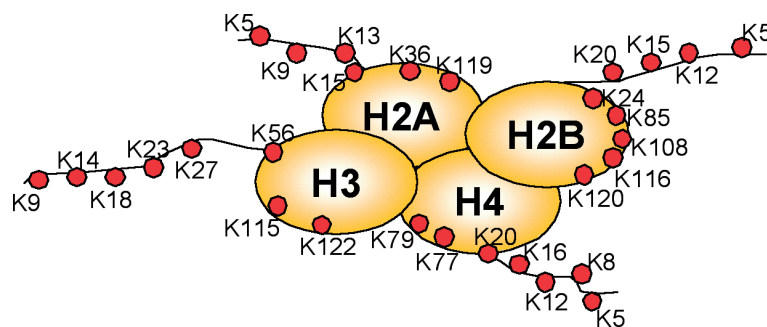


図2 アセチル化によって修飾を受けるリジン残基 (Minucci S et al., 2006)⁽⁵⁾ より改編

またヒストンに加えてヒストン以外のタンパク質（非ヒストンタンパク質）も HAT/HDAC によってアセチル化修飾を受け、生理活性が調節されることが報告されている（図3）^(6,7,8)。そのアセチル化の修飾の役割として、タンパク質の安定化が挙げられる。これまでに多くのタンパク質代謝の支配機構の一つとしてアセチル化が広く関与していることが報告されている。例えば、プロテアソーム系によるタンパク質の分解はリジン残基がユビキチン化を受けることに関連しており、同リジンがアセチル化を受けることによってユビキチン化を受けず、非ヒストンタンパク質は分解されなくなる（図3a）。このようなタンパク質として p53 が挙げられる。p53 はアセチル化を受けることで半減期が伸び、安定化するが、HDAC1 によって脱アセチル化を受けることでユビキチン化を受け、分解される⁽⁹⁾。他にも Runx3⁽¹⁰⁾ や c-Myc⁽¹¹⁾, Smad7⁽¹²⁾ など、数多くのタンパク質の安定化関わっていることが報告されている。一方、pRB⁽¹³⁾ や HIF-1 α ⁽¹⁴⁾ といったタンパク質はアセチル化を受けることによって逆に分解が促進されることも報告されている。

さらにもう一つのアセチル化の役割として、非ヒストンタンパク質がアセチル化によりタンパク質の相互作用が変化し、生理活性の変化を起こすことが知られている。例として HDAC6 による HSP90 の制御を挙げる。HSP90 はタンパク質の立体構造の形成に関与している分子シャペロンの一つとして知られており、通常アセチル化を受けた状態で存在する。この HSP90 が HDAC6 によって脱アセチル化を受けることによって他のシャペロンなどと共にグルココルチコイドレセプターと複合体を形成し、立体構造を変化させることでレセプターとリガンドの結合を可能とする。その結果、グルココルチコイドレセプターは活性化し、シャペロンを解離して二量体を形成することで核内に移行し、下流の遺伝子発現に関与することが報告されている⁽¹⁵⁾。

また α -Tubulin はアセチル化を受けることによって β -Tubulin とヘテロ二量体を形成し、この二量体が集合して微小管形成に関与する。逆に脱アセチル化を受けることによって微小管、ヘテロ二量体が解離し、可逆的に細胞遊走や細胞骨格形成に関与していることも知られている^(16,17)。このように HSP90 や α -Tubulin といった非ヒストンタンパク質はアセチル化や脱アセチル化を受けることによってタンパク質複合体形成や解離に関与し、様々な生命現象に関与している。

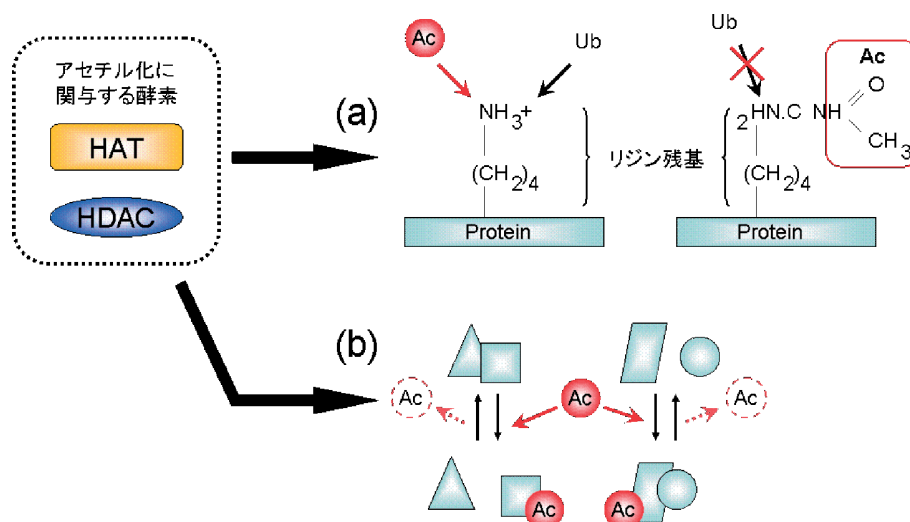


図3 非ヒストンタンパク質のアセチル化による制御
(Sadoul K et al., 2008)⁽⁷⁾ より改編

この他にもアセチル化によって様々な非ヒストンタンパク質がアセチル化を受けていることが報告されており（表1）^(6,7,8)、各タンパク質の生理活性が制御されていると考えられる。

表1 アセチル化によって調節される非ヒストンタンパク質

タンパク質の分類	アセチル化を受ける非ヒストンタンパク質
DNA 結合性転写因子	p53, c-Myc, E2F1, -2, -3, GATA1, -2, -3, -4 AML1, BCL-6, Ying Yang1, NF-x8, MEF2, CREB, HIF-1 α , BETA2, POP-1, IRF-2, -7, SRY, EKLF, USF1
ステロイドレセプター	Androgen receptor, estrogen receptor α , glucocorticoid receptor
シグナル仲介タンパク質	STAT3, Smad7, β -catenin, IRS-1
DNA 修復酵素	Ku70, WRN, TDG, NEIL2, FEN1
核内輸送タンパク質	Rch1, importin- α 7
シャペロンタンパク質	HSP90
構造タンパク質	α -Tubulin
炎症仲介タンパク質	HMGB1
ウイルス性タンパク質	E1A, L-HDAg, S-HDAg, T antigen, HIV Tat

(Xu WS et al., 2007)⁽¹⁸⁾より改編

リプログラミングに関連すると考えられる非ヒストンタンパク質

これまでの体細胞核移植技術において TSA、VPA、Scriptid⁽¹⁹⁾ といった HDACi 処理を行うことで産仔作出効率の改善が報告されている。これらの HDACi は上記の通り、HDAC の Class を超えて非特異的に HDAC 活性を阻害することから、これらの HDAC が基質とするすべてのタンパク質に生理活性の変化をもたらしていることが考えられる。また活性化開始後 10 時間 TSA 処理を行うことで最も発生率が高いことが示されていることから、卵子細胞質に存在する非ヒストンタンパク質のアセチル化が HDACi によるクローン胚発生の改善に寄与している可能性が考えられる。そこで公開されているトランスクリプトーム解析によるデータベースを用いて調べた。その中から MII 期卵子で発現しているアセチル化を受ける非ヒストンタンパク質を抽出し、関連している HDAC についてまとめ出した（表2）。

表 2 MII 期卵細胞質に含まれているタンパク質と関連 HDACs

遺伝子	脱アセチル化に関する HDACs
β -catenin	HDAC6, SIRT1
E2F1	HDAC1
HIF-1 α	HDAC1
HSP90	HDAC6
MEF2	HDAC3, -4, -5
pRB	HDAC1
STAT3	HDAC1, -2, -3
p53	HDAC1, SIRT1
α -Tubulin	HDAC6
Yy1	HDAC1, 2, 3

データベース GEO (GDS2300) より引用

おわりに

体細胞核移植技術や iPS 細胞技術を実用化に近づけるためには、効率の低さを改善し、リプログラミングのメカニズムを解明することが重要である。これまでにアセチル化による非ヒストンタンパク質の制御機構が少しずつ明らかとなってきた。今後、これらの観点からもリプログラミング効率改善のメカニズム解明に取り組むことは重要である。

参考文献

1. Kishigami S, Van Thuan N, Hikichi T, et al. Epigenetic abnormalities of the mouse paternal zygotic genome associated with microinsemination of round spermatids. *Developmental Biology* 2006;289 (1): 195-205.
2. Danwei H, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology* 2008;26 (11): 1269-1275.
3. Bolden JE, Peart MJ, and Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006;5 (9): 769-784.
4. Codd R, Braich N, Liu J, Soe CZ, and Pakchung AAH. Zn (II) -dependent histone deacetylase inhibitors: Suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41 (4): 736-739.
5. Minucci S and Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6 (1): 38-51.
6. Seto E, Yuan M, Zhang M, et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Faseb Journal* 2006;20 (5): A1473-A1473.
7. Sadoul K, Boyault C, Pabion M, and Khochbin S. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 2008;90 (2): 306-312.

- 8 . Spange S, Wagner T, Heinzl T, and Kramer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41 (1): 185-198.
- 9 . Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, et al. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo Journal* 2002;21 (22): 6236-6245.
10. Jin YH, Jeon EJ, Li QL, et al. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279 (28): 29409-29417.
11. Vervoorts J, Luscher-Firzlaff JM, Rottmann S, et al. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *Embo Reports* 2003;4 (5): 484-490.
12. Gronroos E, Hellman U, Heldin CH, and Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Molecular Cell* 2002;10 (3): 483-493.
13. Leduc C, Claverie P, Eymin B, et al. p14 (ARF) promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* 2006;25 (30): 4147-4154.
14. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002;111 (5): 709-720.
15. Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S, et al. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular Cell* 2005;18 (5): 601-607.
16. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 2002;417 (6887): 455-458.
17. Westermann S and Weber K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003;4 (12): 938-947.
18. Xu WS, Parmigiani RB, and Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26 (37): 5541-5552.
19. Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, et al. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction* 2009;138 (2): 309-317.

英文要旨

The discussion on the target protein of histone deacetylase for reprogramming.

Keigo Matsubara¹, Yu Kamata², Masateru Magotani², Lee Ah Reum³, Takayuki Yamoti¹, Kazuhiro Saeki², Kazuya Matsumoto², Satoshi Kishigami², Akira Iritani², Yoshihiko Hosoi²

Summary

Somatic cell nuclear transfer technology enables somatic cells to achieve totipotency. In addition, pluripotency is acquired by introduction of only four transcriptional factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) into somatic cells using iPS cell technology. However, one of the problems in these technologies is low efficiency of reprogramming. In previous studies, it was reported that the efficiency of reprogramming improved by histone deacetylase inhibitor (HDACi) treatment, but little is known of the molecular mechanism. The facilitation of histone acetylation by HDACi treatment relates to an increase in gene expression, and HDACi treatment also facilitates acetylation of non-histone proteins, and affects physiological activation. Thus, it is suggested that the acetylation of non-histone proteins relates to improvement of the reprogramming efficiency. In this review, we outline the mechanism of acetylation of non-histone proteins, and extract non-histone proteins possibly related to improving reprogramming from GEO database.

1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan.

3. RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan.