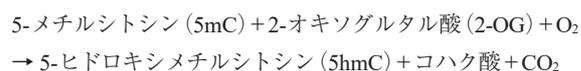

トピックス

緑藻クラミドモナスの TET1 ホモログ CMD1 は 新規アスコルビン酸依存型ジオキシゲナーゼである

CMD1, a mammal TET1 homologue, is a novel ascorbate-dependent dioxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*

アスコルビン酸 (AsA: ビタミン C) は、平面な γ ラクトン環の安定化した炭素 2 位および 3 位に水酸基が付加したエンジオールと呼ばれる特徴的な化学構造を有しており、非常に強い還元力を持っている。AsA の生理作用は、その還元力に依存しており、主に活性酸素種の除去に関わる抗酸化作用および酵素の補因子としての作用の二つに大別される。後者では、特に 2-オキソグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ (2OGD) の補因子としての役割が重要である。2OGD は二価鉄を補欠分子族として含む水溶性タンパク質であり、水酸化、不飽和化、脱メチル化、エポキシ化、酸化的 C-C カップリング、ハロゲン化など多彩な酸化反応を触媒することができる酵素群である。これらいくつかの酵素反応時において、AsA は還元型二価鉄を維持するために不可欠である。近年、AsA は 2OGD ファミリーのひとつで DNA 脱メチル化酵素の ten eleven translocation 1 (TET1) を介して、哺乳動物のエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが明らかにされ¹⁾⁻³⁾、AsA の新規機能として本誌においてもトピックスとして紹介されている⁴⁾⁵⁾。次式に示すように TET1 は、シトシン残基の炭素 5 位がメチル化した 5-メチルシトシン (5mC) を、酸化的脱メチル化反応により 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に変換することで、環境変化など外的要因の影響に応じた遺伝子発現を調節している。



さまざまな生物のゲノムデータベースより、TET1 相同遺伝子は哺乳動物以外にも存在するが、これらが哺乳動物 TET1 同様に AsA 要求性のエピジェネティック制御に関与するかは不明であった。最近 Xue らは、緑藻類のクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)

に存在する TET1 相同遺伝子の機能解析を行い、新規 AsA 依存型ジオキシゲナーゼとして既知の TET1 とは異なる機構によりエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することを明らかにしている⁶⁾。本稿ではその概要について紹介する。

Xue らは、クラミドモナスに存在する 8 つの TET 相同遺伝子 (CrTET1-8) に注目した⁶⁾。CrTET1-8 の一次構造には、TET1 を含む哺乳動物のジオキシゲナーゼに共通する鉄結合部位 (His-X-Asp モチーフ) が保存されているが、興味深いことに、補基質として必須の 2-OG 結合部位が存在しない。CrTET1-8 の組換え体タンパク質について、5mC を含む DNA (5mC-DNA) を基質として AsA および 2-OG を加えた条件で反応させ、ジオキシゲナーゼ活性を評価したところ、CrTET1 のみ活性が認められた。CrTET1 の反応液を HPLC で分離すると、基質の 5mC-DNA ピークの減少とともに、未知の生成物由来の二つのピーク (P1 および P2) が検出された。一方、既知の TET1 反応産物である 5hmC-DNA はトレースレベルでしか検出されなかった。P1 および P2 の生成には、His-X-Asp モチーフが必須であり、CrTET1 の一次構造を反映して 2-OG は影響しなかった。CrTET1 の反応は AsA 特異的であり、AsA 異性体の D-イソアスコルビン酸やリン酸基やエチル基など付加した AsA 誘導体では活性を示さなかった。これらの結果から、CrTET1 は、哺乳動物 TET1 とは異なる新規 5mC 修飾酵素であることが示され、新たに CMD1 (5mC-modifying enzyme) と命名された。

質量分析の結果、CMD1 の反応生成物 P1 と P2 の質量 (m/z) はどちらも同じ $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_7^+$ に由来する 332.1448 および 332.1449 であり、基質の 5mC-DNA よりも 90 Da 質量が増加していた。さらに核磁気共鳴装置と密度汎関数理論による詳細な構造解析を実施し、P1 はシトシン、トリヒドロキシブチル、デオキシリボー

スを有し、シトシンとトリヒドロキシブチルが CH_2 を介して結合した 5-(1-[2,3,4-トリヒドロキシブチル])-2-デオキシシチジン (5-グリセリル-メチルシトシン; 5gmC) であると決定された。また P2 はキラル炭素 C8 の構成が異なるシストランス異性体であった。そこで次に 5mC 修飾に関わるグリセリル基の起源について、 ^{13}C 標識した AsA 安定同位体を用いて詳細に解析を進めた。その結果、グリセリル基は AsA の炭素骨格 C4 から C6 に由来することが明らかになり、図 1 に示す CMD1 の反応機構を提唱した。CMD1 は 2-OG の代わりに AsA を利用して、AsA の酸化的脱炭酸反応を介して二価鉄イオンから反応性の高い Fe(IV)=O 反応中間体を生成する (図 1 g,h)。その後、5mC から水素原子を引抜くことでラジカル化させ (図 1 i)、脱炭酸の結果として残った C5 の L-キシロン酸の C-C 結合を切

断する。これにより、5mC にグリセリル基として転移することで 5gmC が生じるとともに (図 1 j)、副産物として C2 のグリオキシル酸が生成する反応機構である。実際に、CMD1 反応時に炭素 1 位を選択的に標識した $[1-^{13}\text{C}]\text{AsA}$ を用いると $^{13}\text{CO}_2$ の発生が確認されること、また LC-MS によりグリオキシル酸の生成も確認されており、提唱した機構により反応が進行していることが強く支持される。以上の結果より、クラミドモナスの CMD1 は、哺乳動物 TET1 のように AsA を補因子とする 2-OG 依存型ではなく、初めて同定された AsA 依存型ジオキシゲナーゼであることが明らかとなった (図 2)。AsA が酵素反応への電子供与体ではなく、官能基のドナーとして機能している初めての発見である。

さらに、Xue らは、クラミドモナスにおける CMD1 の

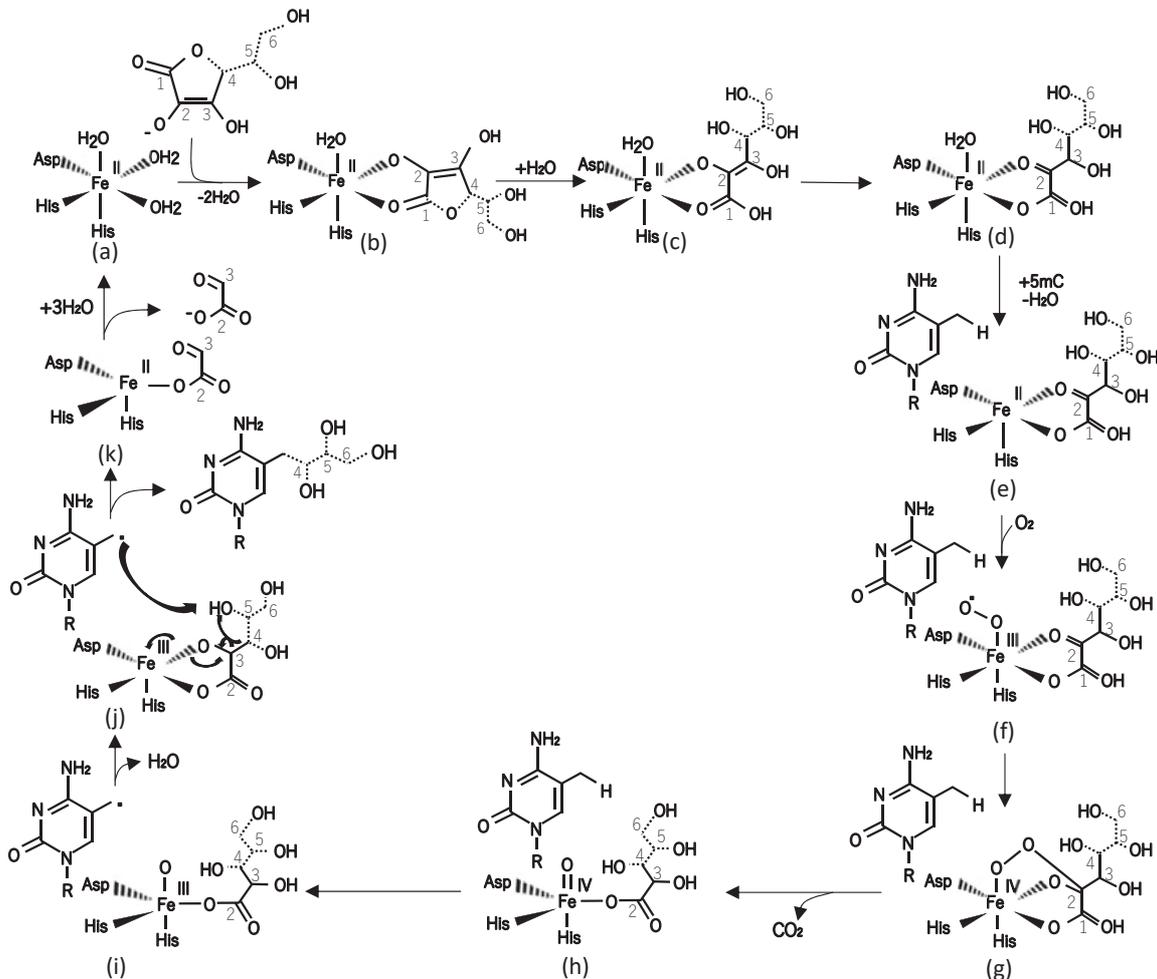


図 1 提唱された CMD1 の反応機構

CMD1 は酸化的脱炭酸反応によりビタミン C の炭素 4 位-6 位をグリセリル基の供給源とし、5mC を 5gmC に変換するとともに副産物としてグリオキシル酸を生成する。

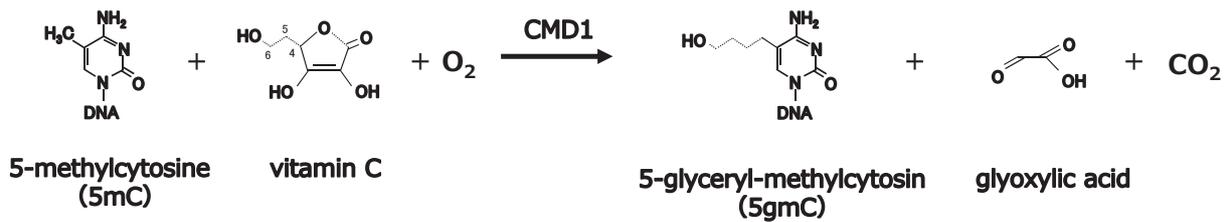


図2 CMD1の反応式

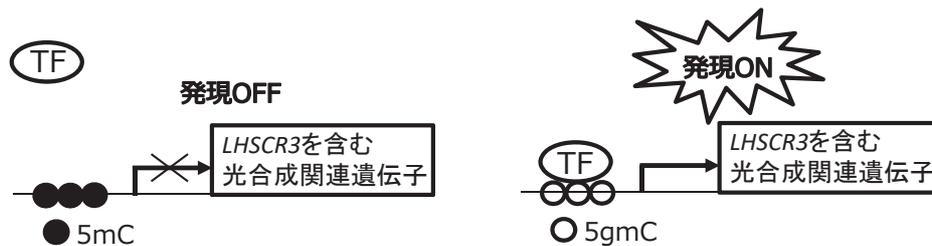


図3 CMD1を介した光合成関連遺伝子発現のエピジェネティック制御

シトシンがメチル化された状態(5mC)では転写調節因子(TF)はプロモーター領域に結合することができず、遺伝子発現はOFFの状態となる。CMD1により5mCが脱メチル化され5gmCに変換されると、転写調節因子がプロモーター領域に結合可能となり、光合成関連遺伝子が発現する。

生理機能についても検証した⁶⁾。クラミドモナス野生株のゲノムDNA上には、シトシン100万個当たり約10個の割合で5gmCが検出された(全5mCの0.25%に相当)。そこで、CRISPR-Cas9を使ったゲノム編集によりクラミドモナスCMD1変異細胞(*cmd1*)を作出し、ゲノムDNA中に含まれる5gmCおよび5mCを測定したところ、野生株と比較して5gmC量は約60%に低下したのに対して、5mCは約2倍に増加し、CMD1は*in vivo*で5gmCの生成に機能していることが確認された。AsAの5gmC生成の影響について調べるために、野生株の約10%程度までAsA量が減少したAsA欠乏変異細胞(*vtc2*)を作出して同様に調べた結果、野生株に比べ約80%の5gmC量の低下と約2倍の5mC増加が確認され、AsAがCMD1反応に不可欠であることも示された。通常の生育光条件下(180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)において、*cmd1*の形態や生育には野生株との違いは認められなかったが、600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光条件下ではブリーチングなどの光障害の表現型を示した。強光下の*cmd1*では、光防御機構である非光化学消光(non-photochemical quenching; NPQ)の誘導抑制と、光合成電子伝達活性の低下が観察されたことから、光合成能力の全体的な低下が強光感受性の要因であると考えられた。RNA-Seqによる遺伝子発現解析を行なったとこ

ろ、*cmd1*では予想通り20以上の光合成関連遺伝子の発現レベルが変動しており、特にNPQ誘導に必要な*LHCSR3* (light-harvesting complex stress-related protein 3) 遺伝子の発現レベルが強光条件下で抑制されていた。そこで、バイサルファイト法による全ゲノムシーケンスを行い、野生株と*cmd1*のDNAメチル化部位を比較した。その結果、*cmd1*の*LHCSR3*遺伝子の5'領域は強光下でも高度にメチル化状態が維持されており、*LHCSR3*発現レベルの抑制と一致していた。他の光合成関連遺伝子の解析からも同様の結果が得られた。以上より、CMD1は光合成関連遺伝子発現のエピジェネティック制御を介して、クラミドモナスの光環境応答に重要な役割を果たしていることが示された(図3)。クラミドモナスなどの光合成生物では光強度に応じて細胞内AsA濃度が変動する⁷⁾⁸⁾。したがって、強光時に増加したAsAによりCMD1が応答して光合成関連遺伝子発現を促進している事実は、非常に理に適ったメカニズムと言える。

今回、緑藻クラミドモナスのCMD1の機能解析により、哺乳動物以外でもAsAがエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが初めて示され、クラミドモナス以外の他の藻類や植物でも共通の機構が存在しているかどうか興味を持たれる。しかし、現在公開されている植物ゲノムデータベースを調べる限り、

CMD1 相同遺伝子はボルボックスとミズゴケなど一部の光合成生物にしか確認できず、高等植物のエピジェネティックな遺伝子発現制御に TET1 相同遺伝子や AsA が関与しているのかどうか今後の大きな検討課題である。一方で、発達した多様な二次代謝経路を反映して、植物には動物よりも多くの 2OGD 遺伝子が存在している。一例として、シロイヌナズナの 2OGD は遺伝子全体の約 0.5% (129 遺伝子) を占め、P450 に匹敵する大きな酵素ファミリーを構成している⁹⁾。これらの中には AsA を必須の補因子とする未解析酵素あるいは CMD1 のような新規 AsA 依存型ジオキシゲナーゼが存在する可能性も期待され、今後の進展が楽しみである。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2020.10.7 受付)

Key words :vitamin C, epigenetics, 5-glyceryl-methylcytosine, TET, CMD1

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Shimane University

²Institute of Agricultural and Life Sciences, Academic Assembly, Shimane University

¹ 島根大学大学院自然科学研究科農生命科学専攻

² 島根大学学術研究院農生命科学系

田中 泰裕¹, 丸田 隆典^{1,2}, 石川 孝博^{1,2}

文 献

- 1) Minor EA, Court BL, Young JI, Wang G (2013) Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem* **288**, 13669-13674
- 2) Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird DJ, Hirst M, Rao A, Lorincz MC, Rammalho-Santos M (2013) Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* **500**, 222-226
- 3) Young JI, Züchner S, Wang G (2015) Regulation of the epigenome by vitamin C. *Annu Rev Nutr* **35**, 545-564
- 4) 岸本祐樹, 石神昭人 (2014) ビタミン C によるエピジェネティクスの制御. *ビタミン* **88**, 40-43
- 5) 佐藤安訓, 石神昭人 (2018) ビタミン C はエピジェネティクスによる制御を介して白血病の発症を防ぐ. *ビタミン* **92**, 389-393
- 6) Xue JH, Chen GD, Hao F, Chen H, Fang Z, Chen FF, Pang B, Yang QL, Wei X, Fan QQ, Xin C, Zhao J, Deng X, Wang BA, Zhang XJ, Chu Y, Tang H, Yin H, Ma W, Chen L, Ding J, Weinholt E, Kohli RM, Liu W, Zhu ZJ, Huang K, Tang H, Xu GL (2019) A vitamin-C-derived DNA modification catalysed by an algal TET homologue. *Nature* **569**, 581-585
- 7) Vidal-Meireles A, Neupert J, Zsigmond L, Rosado-Souza L, Kovács L, Nagy V, Galambos A, Fernie AR, Bock R, Tóth SZ (2017) Regulation of ascorbate biosynthesis in green algae has evolved to enable rapid stress-induced response via the VTC2 gene encoding GDP-L-galactose phosphorylase. *New Phytol* **214**, 668-681
- 8) Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff N (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* **52**, 673-89
- 9) Kawai Y, Ono E, Mizutani M (2014) Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J* **78**, 328-343