

平成21年 5 月20日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770142

研究課題名 (和文) ヒストンのメチル化と転写調節

研究課題名 (英文) Transcriptional regulation via histone methylation

研究代表者

福田 綾 (FUKUDA AYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50436276

研究成果の概要：クロマチンを構成するヒストンはメチル化やアセチル化などさまざまな翻訳後修飾を受け、それが遺伝子の発現調節に関与していることが明らかにされつつある。本研究では未同定のヒストン修飾酵素を探索するとともに、その転写調節における機能を解析するため、*in vitro* クロマチン再構成系およびそれを鋳型に用いた試験管内転写システムを構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝情報複製・転写装置・制御・ヒストン・メチル化・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

細胞内では DNA とヒストンがクロマチンを形成するが、その高次構造は遺伝子の発現調節に密接に関係している。クロマチンの高次構造形成にはヒストンの翻訳後修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など）が関わっていることが最近の研究で示されており、ヒストン修飾酵素が数多く同定されてきた。しかし、エピジェネティックな修飾（特にメチル化）が比較的不可逆なもの

と考えられていたこともあり、修飾を除去する酵素はあまり注目されていなかった。

しかし、最近では LSD1 や JHDM などヒストン脱メチル化酵素が発見され、安定で不可逆的な修飾と考えられてきたヒストンメチル化が可逆的に制御されることが示された。これは、エピジェネティックな制御が我々の想像以上にダイナミックに調節され、細胞分化が可塑性、可逆性を有することを示唆しており、このダイナミックな過程を理解するこ

とは ES 細胞を含む幹細胞の臨床応用という観点からも極めて重要である。

ヒストンのアミノ酸残基の中でメチル化されるのはアルギニンおよびリジン残基である。アルギニン残基のメチル化は核内レセプターをはじめ様々なアクチベーターによる転写活性化に関与し、ヒストン H3 の R2、R8、R17、R26 およびヒストン H4 の R3 が PRMT1、PRMT4、PRMT5 によってメチル化される。一方、リジン残基のメチル化は転写調節やヘテロクロマチン形成に関与し、ヒストン H3 の K4、K9、K27、K36、K79 およびヒストン H4 の K20 などが MLL や SUV39H、EZH2 などそれぞれ特異的なメチル化酵素によってメチル化される。

ショウジョウバエのトリソラックスグループやポリコームグループのタンパク質は、ホメオティック遺伝子の発現制御に関与し、胚発生期の形態形成に重要な役割を担っていることが以前より知られていたが、これらがヒストン H3K4 および H3K27 に対するメチル化酵素活性を持つことが近年報告された。トリソラックスおよびポリコームグループのタンパク質によるヒストンのメチル化とホメオティック遺伝子の発現制御は哺乳類でも保存されており、重要な制御機構であることがわかる。H3K4 はトリソラックスグループの MLL をはじめいくつかのメチル化酵素によってメチル化されるが、最近の研究で WDR5 や BPTF などメチル化された H3K4 に特異的に結合する因子や LSD1 などの脱メチル化酵素が同定され、分子レベルで H3K4 メチル化を介した転写活性化機構の解析が進みつつある。一方、H3K27 をメチル化するポリコームグループのタンパク質は PRC-1 および PRC-2 の2つの複合体として存在することが知られ、PRC-2 複合体の EZH2 サブユニットによって H3K27 がメチル化され、PRC-1 複合体のポリコーム Pc サブユニットがクロモドメインを介してメチ

ル化 K27 に結合し標的遺伝子の発現を抑制すると考えられている。ヒストン H3K27 のメチル化は、ホメオティック遺伝子のサイレンシングのほかX染色体の不活化やゲノムインプリンティング、B 細胞の分化などにも関与している重要なヒストン修飾で、H3K27 メチル化によるエピジェネティックな制御の分子機構の解明は様々な生物現象を理解するうえで非常に重要である。

2. 研究の目的

ヒストン H3K27 脱メチル化酵素をはじめ新規クロマチン修飾酵素の発見は、クロマチンおよび転写研究の分野に新しい知見をもたらすのみならず、再生医療などの分野で問題になっているゲノム再プログラミングの機構解明につながりうる。H3K27 脱メチル化酵素など未同定の新規クロマチン修飾因子の単離、同定および機能解析を行い、クロマチン修飾を介した転写調節の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) ヒストンメチル化酵素 PRC2 の作製
Native PRC2 はこれまでに複数の研究グループによって精製されており、それぞれ構成サブユニットに違いが見られる。当研究では報告された PRC2 に共通して見出されている4つのサブユニット (EZH2, SUZ12, EED, RbAp48) を用いて組換え体を再構成した。HeLa 細胞よりこれらの因子の cDNA を単離し、組換えバキュロウィルスを作製した。組み換えウィルスは、EZH2、SUZ12、His-EED を発現するウィルスと 3xFLAG-RbAp48 を発現するウィルスの2種類を作製し、共感染させた。昆虫細胞で発現させた組換え PRC2 は、陽イオン交換 (SP sepharose) および陰イオン交換 (Q sepharose) カラムを用いて精製した。

(2) クロマチン再構成系の構築

試験管内でのクロマチン再構成に必要な因子（ヒストン、NAP-1、ACF、TopoI）を大腸菌あるいは昆虫細胞を用いて発現させ、種々のカラムを用いて高度に精製した。ヒストンと NAP-1 を混合した後、ACF、TopoI、鋳型 DNA などに加えて 30°C で 2 時間インキュベートし、形成されたクロマチンを supercoiling assay や micrococcal nuclease assay で解析した。ヒストン変異体 H3K27R は、PCR で cDNA に変異を導入し、大腸菌で発現させた。

4. 研究成果

(1) 昆虫細胞に 2 種類のバキュロウイルスを共感染させ、PRC2 の 4 つのサブユニット（EZH2, SUZ12, EED, RbAp48）を再構成した。発現した PRC2 サブユニットの大部分は不溶性だったが、可溶性画分にも一部検出された。この画分を陽イオン交換（SP sepharose）カラムにかけたところ、PRC2 は陽イオン交換カラムに結合し、300mM KCl 付近で溶出された。この画分を集め、次に陰イオン交換（Q sepharose）カラムにかけたところ、PRC2 複合体は結合し、300-350mM KCl で溶出された。以上のカラムクロマトグラフィー精製の結果、大部分の細胞タンパク質を PRC2 複合体から除去することができた。

(2) 組換えヒストンは H2A と H2B、および H3 と H4 をそれぞれ大腸菌で同時発現させ、塩酸処理で大部分のタンパク質を除去した後、陽イオンカラムを用いて精製した。ヒストンシャペロン NAP-1 はバキュロウイルスを用いて発現させ、硫酸沈殿により大部分のタンパク質を沈殿除去した後、phenyl sepharose を用いて精製した。溶出された NAP-1 をさらに陰イオンカラム（Resource Q）にかけたところ、大部分の夾雑タンパク質を除去することができた。クロマチンリモデリ

ング因子 ACF はバキュロウイルスを用いて発現させ、昆虫細胞の核抽出液より SP sepharose および Mono Q を用いて精製した。MonoQ カラムにかけることにより、過剰な IswI サブユニットを除去することができた。トポイソメラーゼ I もバキュロウイルスを用いて発現させ、SP sepharose および hydroxyapatite を用いて精製した。これらの一連の精製により、非常に精製度の高いクロマチン再構成因子を得ることができた。クロマチンを再構成するため、組換えヒストンと NAP-1 を氷上で 15 分間インキュベートし、トポイソメラーゼ I、ACF、鋳型 DNA などに加えて 30°C、2 時間インキュベートした。各因子の量を注意深く検討し、非常に規則性の高いクロマチンを再構成することに成功した。クロマチンの形成およびその規則性は supercoiling assay および micrococcal nuclease assay によって解析した。再構成したクロマチンを鋳型に用いて試験管内転写反応を行ったところ、転写産物を検出することができた。

H3K27 脱メチル化酵素は UTX および JMJD3 というタンパク質であることが報告された。しかし、これらの脱メチル化酵素の機能およびヒストン修飾を介した転写調節機構を解明するためには今後さらなる解析が必要である。我々が構築したクロマチン再構成系およびそれを鋳型に用いた試験管内転写システムは、ヒストン修飾を介した転写調節機構を分子レベルで解明していくのに非常に有用である。今後はこの系を活用し、複雑な転写制御機構を解明していきたい。

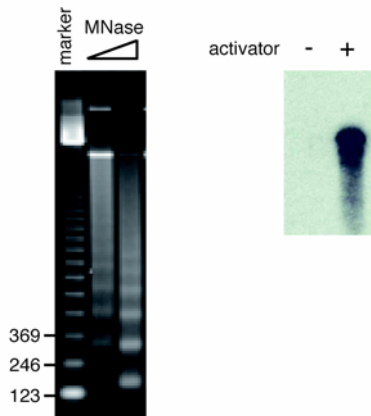


図 1 ヒストンの再構成 (Micrococcal nuclease assay) と試験管内転写

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 福田綾、久武幸司
「ヒストンのメチル化と転写調節」生化学、79、362-365、2007、査読無し
- ② 嶋田美穂、中太智義、福田綾、久武幸司
「c-fos 遺伝子の転写誘導時に起こるヒストン H3 リン酸化の誘導機構」実験医学、25、85-89、2007、査読無し

[学会発表] (計 5 件)

- ① 福田綾、中太智義、嶋田美穂、久武幸司
「c-fos 遺伝子の新規転写コアクチベーターの同定と機能解析」(ポスター発表) 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会、2008 年 12 月 10 日 (神戸)
- ② 久武幸司、嶋田美穂、中太智義、福田綾
「MSK1 によるヒストン H3 リン酸化の制御機構」(口頭発表)
神戸ポートアイランド (第 31 回日本分

子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会) 2008 年 12 月 10 日 (神戸)

- ③ 久武幸司、嶋田美穂、中太智義、福田綾
「MSK1 によるヒストン H3 リン酸化の制御機構」(ポスター発表) 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会、2008 年 12 月 10 日 (神戸)
- ④ Fukuda A., Nakadai T., Shimada M., Hisatake K., Identification of Novel Coactivator Activities for the c-fos Gene Transcription (ポスター発表)

Granlibakken, Lake Tahoe, USA (ASBMB Spetial Symposia "Transcription Regulation by Chromatin and RNA Polymerase II")

2008 年 10 月 18 日 (アメリカ合衆国)

- ⑤ 福田綾、中太智義、嶋田美穂、久武幸司
「c-fos 遺伝子の転写調節機構の解析」(ポスター発表) 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 12 日 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 綾 (FUKUDA AYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号 : 50436276