

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19780253
研究課題名(和文) リバースアレイを用いたヒストン修飾シグナルのプロテオミクス解析
研究課題名(英文) Reverse array analysis for post-translational modification of histones

研究代表者
前田 和宏 (MAETA KAZUHIRO)
独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・基礎科学特別研究員
研究者番号：60443024

研究成果の概要：本研究では分裂酵母の全 ORF の過剰発現株とリバースアレイの手法を利用し、ヒストンの翻訳後修飾に及ぼす遺伝子過剰発現の影響を調べた。結果、ヒストンのアセチル化をグローバルレベルで変動させる因子として、アセチル化酵素、脱アセチル化酵素に加えてヒストンシャペロンやクロマチン構造に影響を及ぼす因子、さらには rRNA の転写活性化因子やアミノ酸、グルコース代謝に関与する因子を明らかにすることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	0	2,500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：タンパク質翻訳後修飾、リバースプロテオミクス、リバースアレイ、分裂酵母、ヒストン、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞は環境変化を細胞外からのストレスとして認識し、シグナル伝達経路を活性化させることで適応に必要な遺伝子の発現を惹起することが知られている。ストレスにตอบสนองして起こる遺伝子発現の開始には、MAP キナーゼカスケードなどのシグナル伝達経路による転写アクティベーターの活性化が必要であるが、それに加え、ヒストンの修飾が重要な働きをしている。真核生物の DNA はヒス

トンタンパク質と結合してクロマチンを形成しているため、遺伝子情報のタンパク質への変換において、クロマチン構造の変化が重要なファクターの一つとなると考えられてきた。近年、ヒストンの修飾に伴うクロマチン構造の変化が次々と明らかにされており、ヒストンの修飾による遺伝子発現の制御は、エピジェネティックな制御として認識されている。実際、転写が活性化されている染色体領域ではコアヒストンはアセチル化され、クロマチン構造が緩んでいることが多い。ま

た、転写不活性化状態の維持にはヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化が重要であることが示されている。ヒストンの修飾にはアセチル化、メチル化のみならず、リン酸化、ユビキチン化などがあり、さらにビオチン化が起こりうるということが最近報告された。これらヒストンの修飾間には相互作用があり、例えば、細胞増殖因子による初期応答において、ヒストン H3 の 10 番目のセリン残基のリン酸化は 14 番目のリジン残基のアセチル化を亢進し、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化を阻害する。また、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化とアセチル化はお互いに阻害しあうことが知られている。このようにヒストンの修飾はダイナミックなネットワークを形成しており、個々の修飾だけでなく、包括的な研究が期待されている。

これまでのヒストンの修飾に関する研究では、ヒストンの修飾を認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、それぞれの修飾を持つヒストンが遺伝子のどの領域に多く存在するかを明らかにしてきた。この方法によりヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化やヒストン H3 の 9 番目、14 番目のリジン残基のアセチル化が転写開始点に多くみられ、タンパク質コード領域ではヒストン H4 の脱アセチル化がみられることが観察されている。また、それぞれの修飾を引き起こす酵素も同定されつつあり、例えば出芽酵母においては Gen5 がヒストン H3 の 9、14、18、23、27 番目のリジン残基、ヒストン H2B の 11、16 番目のリジン残基のアセチル化を引き起こし、こられのアセチル化は Hda1 によって脱アセチル化される。一方、特定の残基のアセチル化が特別な役割を果たしていると考えられているが、そのアセチル化を決定し、実行するための上流因子は明らかにされていない。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた検討や、有糸分裂時の観察から染色体全体のアセチル化レベルがグローバルに変化することが知られている。このことから細胞内環境の変化がグローバルなヒストン修飾を引き起こすと考えられ、修飾を実行する際のシグナル伝達経路が存在することが示唆される

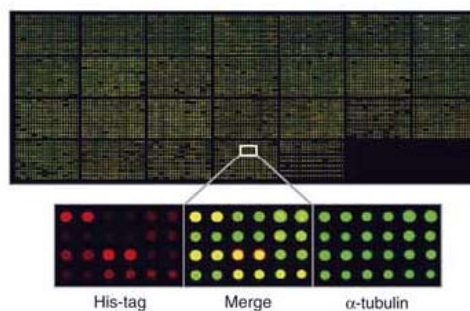
2. 研究の目的

ヒストンの特定サイトの修飾（特に生物種を超えて保存性の高いヒストン H4 K5, K8, K12, K16 のアセチル化、ヒストン H3 K9 のメチル化、アセチル化、ヒストン H3 K4 のメチル化、ヒストン H3 K18, K23, K27 のアセチル化）に対して過剰発現させることにより影

響を及ぼす因子を同定し、得られた結果からヒストンの翻訳後修飾に影響を及ぼす上流因子を同定する。

3. 研究の方法

上流因子を同定するためには特定の修飾を変化させる遺伝子を網羅的に取得する必要がある。そこで、細胞内の全タンパク質を検討する方法として、独立行政法人理化学研究所吉田化学遺伝学研究室で作製された分裂酵母の全遺伝子（約 5,000 個の open reading frame）の一つ一つの過剰発現が可能でコレクションで作成したリバーサレイ（図 1）を検討に持ちいた。リバーサレイは抗体や精製したタンパク質をスポットしたアレイとは異なり、細胞の抽出液をそのままメンブレンなどにスポットして作製されるアレイである。一見非常に単純なアレイであるが、例えば特定のタンパク質に対する抗体を用いることによりそのタンパク質の発現量の変化を非常に迅速に調べることができる。吉田化学遺伝学研究室において松山らは分裂酵母のリバーサレイを各タンパク質の発現量の解析に用いたが、本申請者はそれをさらに発展させてヒストン抗体を用いることで全遺伝子の過剰発現の影響で起こるヒストンの修飾の変動を検出する。

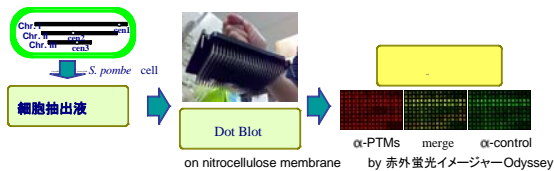


（図 1）分裂酵母リバーサレイ
約 5,000 株から調製したサンプルをスポットして作製。コントロールと翻訳後修飾特異的抗体を用いて検出を行い、定量することで翻訳後修飾レベルの変化を検討できる。図ではチューブリンと His-Tag 抗体を用いて His-Tag 融合タンパク質の発現量を検討した。

4. 研究成果

本研究では、あらかじめゲノム遺伝子や cDNA を取得した上でタンパク質の網羅的解析を行うリバースプロテオミクスの手法を用いて、分裂酵母におけるヒストンの翻訳後修飾に関わる因子の同定を試みた。

リバースアレイの作製においては、サンプル調製用のバッファーを検討したところ、グアニジンを含むバッファーが、従来の SDS-PAGE サンプルバッファーよりもタンパク質の回収量が優れていた。このことから、グアニジンバッファーを用いて約 5,000 のサンプルの調製を行った。リバースアレイは、ニトロセルロースメンブレンに 384pin レプリケーターを利用してサンプルをドットプロットすることで作製した。検出には赤外蛍光イメージャーOdyssey を使うことによってコントロールと翻訳後修飾を二重染色により検出し、定量を行った。(図 2)



(図 2) リバースアレイの作製
分裂酵母から全細胞抽出液を調製し、384 pin によりメンブレンにドットプロットを行った。検出は蛍光イメージャーOdyssey を用いて二重染色を行う。

本研究では、メンブレンにスポットしたマイクロアレイの他にも、ニトロセルロース膜をコートしたスライドガラス上にサンプルをスポットしてマイクロアレイを作製することを試みた。しかしながら、パーキンエルマー社 (PerkinElmer, Inc.) のタンパク質スポットター “ピエゾレイ” を用いて作製を試みたところ、約 200 スポットしか連続スポットできないという機械の潜在的な欠陥が明らかになり、マイクロアレイの作製は断念した。

本研究においてドットプロットによってスポットされるタンパク質は細胞の全タンパク質であることから、本研究のためには特異性の高い抗体が必要であった。そこで抗体の特異性を検討するため、ヒストン H3 ならびに H4 の翻訳後修飾を受けるアミノ酸残基を他の残基に置換したヒストンを発現させて抗体の特異性を検討した。その結果、ヒストン H3 K4 ジメチル化、トリメチル化、K9 アセチル化、K14 アセチル化、K18 アセチル化、K23 アセチル化、

K56 アセチル化、H4K5 アセチル化、K8 アセチル化、K12 アセチル化に対する特異性の高い抗体を得ることができた。

リバースアレイを利用して検討したところ、既にヒストンの翻訳後修飾に影響を及ぼすことが知られている因子が同定された (図 3) ことから、本実験系は有用であることが示された。

QuickTimey C²
TIFF (LZW) @LREVEVEEOEáEá
C™ÇçÆEsEVE EEE%æçEQçç%ç...çÖKóvÇ-çIAB

by 赤外蛍光イメージャーOdyssey

(図 3) H3K9 アセチル化の検討
リバースアレイの結果と Western blotting による確認

リバースアレイにおいて、ヒストンシャペロン Cia1 やヒストンアセチル化酵素 Gcn5 の過剰発現では H3K9 のアセチル化レベルの上昇がみられ、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 の過剰発現ではアセチル化レベルの低下がみられた。Cia1 と Sir2 の過剰発現の影響は Western blotting でもみることができる。また、gcn5 の欠損株を用いた検討から、分裂酵母においても出芽酵母の報告と同様に Gcn5 がアセチル化に必要 (ヒストン H3K9 アセチル化酵素) であることが示された。

リバースアレイを用いた本研究により、幾つかの候補因子を同定し、さらに Western blotting で確認を行った。その結果、H3K9 のアセチル化に影響を及ぼす因子としてリボソームタンパク質、ヒストンシャペロン、システイン合成酵素、Sir ファミリーヒストン脱アセチル化酵素を、H3K14 アセチル化レベルを変動させる因子として CENP-A シャペロン、MBF 転写因子複合体サブユニット、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ、RNA 結

合タンパク質、H3K18Ac に対して、減数分裂に関与する RNA 結合タンパク質、RNA 結合タンパク質、セリン/スレオニンプロテインキナーゼ、ユビキチンリガーゼを、H3K56 のアセチル化に影響を及ぼす因子として RNAi 関連因子、ヒストンシャペロン、RNA ポリメラーゼ I, II, III サブユニット、タンパク質輸送因子、RNA ポリメラーゼの活性化因子のサブユニット、リボソーム生合成因子、トランスロコン α サブユニットを同定した。

また、リバースアレイの結果を統計学的に解析した後、Gene ontology ならびに KEGG のパスウェイに照らし合わせたところ、およそ 1,500 の遺伝子過剰発現と 100 のパスウェイがヒストンの翻訳後修飾に影響を及ぼすと示唆された。

今後これらの経路の詳細な検討により、ヒストンの翻訳後修飾をグローバルレベルで変動させることのできるシグナル伝達経路を明らかにすることができると考えている。

今回行われた分裂酵母の遺伝子過剰発現システムを用いた網羅的な解析はこれまでに類がなく、今後、ヒストン以外のタンパク質の翻訳後修飾を検討する上で強力なツールとなりうる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

前田和宏、Reverse array analysis for understanding signaling pathways、Fourth International Fission Yeast Meeting、2007 年 6 月、Copenhagen, Denmark

前田和宏、分裂酵母遺伝子過剰発現コレクションを用いたヒストン翻訳後修飾を引き起す上流因子のリバースアレイ解析、日本農芸化学会 2009 年度大会、平成 21 年 3 月 28 日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 和宏 (MAETA KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：60443024