

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06279

研究課題名（和文）ヒストンH3-H4の解離制御と生理機能

研究課題名（英文）Molecular mechanism of histone H3-H4 separation

研究代表者

田上 英明（Tagami, Hideaki）

名古屋市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：70273216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分裂酵母Mlo2のC末端領域（CTD）が二量体を形成し、ヒストンH4と同様にヒストンH3と相互作用することで、安定なH3-H4を解離させる分子機構を明らかにした。構造生物学および生化学的解析により二量体形成およびH3相互作用に寄与するアミノ残基を特定した。さらに、遺伝学的解析によりこれらの部位が細胞内におけるMlo2機能に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なヒストン化学修飾は機能的なエピゲノム情報基盤として重要であり、動的なクロマチン制御の破綻と多くの疾患との関連性も示唆されている。ヒストンH3結合因子として見いだしたMlo2の分子機能解析より、これまで安定と考えられてきたヒストンH3-H4が、Mlo2によって解離される分子機構を明らかにした。今後、ヒストンバランス制御の理解に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the molecular mechanism underlying the separation of histone H3-H4 facilitated by Mlo2. We revealed that the C-terminal domain (CTD) of Mlo2 forms a dimer, and interacts with histone H3 through a mechanism resembling its interaction with histone H4. Through structural biology and biochemical analysis, we identified amino acid residues crucial for dimer formation and H3 interaction. Furthermore, genetic analysis suggested the involvement of these sites in the cellular function of Mlo2.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストンH3-H4 Mlo2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームの形成において、安定なヒストン H3-H4 四量体に DNA が巻き付き、さらに H2A-H2B 二量体 2 つが取り込まれる。様々なヒストン化学修飾を介したクロマチン構造制御は、機能的なエピゲノム情報基盤として重要である。クロマチン構造は、細胞周期を通して非常にダイナミックに構造変換し、ヒストン修飾だけでなくヒストン分子自体の交換反応も起こることが明らかとなってきている。出芽酵母における転写伸長と共役したヒストン交換反応 (Nature (2012) 489, 452) や、ES 細胞の分化においてヒストンバリエーション H3.3 の交換反応が重要であること (Cell (2013) 155, 107) も報告されており、ヒストン交換を介したダイナミックなクロマチン構造変化が細胞機能や分化に重要であることが示されていた。

細胞内のヒストン量は厳密に制御される必要があり、クロマチンに挿入されていない可溶性ヒストン量は非常に少なく保たれている。DNA 複製と共役したヒストン遺伝子の発現調節機構 (Nature Rev. Genet. (2008) 9, 843) や過剰ヒストンの分解 (Curr. Opin. Genet. Dev. (2006) 16, 112, Nature Cell Biol. (2009) 11, 925) の例が報告されているが、その分子機構は不明点が多く残されている。酵母において DNA/ヒストン量比の破綻が DNA 損傷感受性や染色体欠落などを誘引することや、多くのがんなどでヒストン遺伝子の増幅が報告されており、ヒストンレベル制御はゲノム不安定化とも密接に関わることが明らかとなってきた。また、細胞外における過剰のヒストンが炎症シグナルになることも報告されていた (Cell Death Disease (2014) 5, e1370)。

本研究代表者の田上は、ヒトや酵母から様々な可溶性ヒストン複合体を精製する実験系を確立し (Methods in Molecular Biology (2018) 1832, 51.)、ヒストンシャペロンおよびクロマチン動的制御に関わりうる候補因子群を多数同定してきた。その中で、分裂酵母からヒトまで高度に保存されるユビキチンリガーゼ様配列 (UBR, PHD) をもつ Mlo2 がヒストン H3 と結合し、その C 末端領域が安定な H3-H4 を解離させることを見いだした。研究開始当時、Mlo2 のヒトホモログ hUBR7 がその PHD を介してヒストン H2B の 120 番目のリジンをモノユビキチン化すること、および乳がん抑制因子として作用することが報告された (Nature Commu. (2019) 10:1398) が、ヒストン H3 との相互作用の分子機構やその役割は不明であった。

### 2. 研究の目的

これまで安定で常にヘテロ二量体もしくは四量体として存在するとされてきたヒストン H3-H4 が、Mlo2 によってどのように解離されるのか、その分子機構と生理機能を明らかにすることが目的である。さらに、Mlo2 および可溶性ヒストン複合体がもつユビキチン化活性と H3-H4 解離制御との関連を解析することにより、ヒストン量の調節などクロマチン動的制御と細胞機能との連携システムを解明することを目指した。また、ヒストン過剰発現時の危機管理因子群の役割について、機能的複合体解析から核-細胞質-オルガネラ間におけるヒストン品質管理ネットワークの全体像の理解にまで繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Mlo2 C 末端領域の二量体形成と H3-H4 解離の分子機構

分裂酵母 Mlo2 の C 末端領域 (CTD) を共同研究により NMR 構造解析した結果、二量体を形成しうる証拠が得られた。Mlo2 CTD の二量体形成と H3 結合に関与する可能性のあるアミノ酸残基をアラニン置換した。それらの点変異体のリコンビナントタンパク質を精製し、生化学的解析を行った。

Mlo2 CTD 二量体形成については、ゲル濾過カラム分画法およびグリセロール密度勾配遠心法を用い、H3 との相互作用については、GST プルダウン法を用いた。

#### (2) Mlo2 C 末端領域の生理的機能解析

Mlo2 は、分裂酵母で過剰発現させると染色体分配異常により増殖阻害を引き起こす事が知られている。Mlo2 CTD において、二量体形成と H3 結合に関与するアミノ酸のアラニン置換変異を導入した Mlo2 を過剰発現させた際の表現型を解析することで、細胞内における機能を調べた。

#### (3) Mlo2 複合体の精製

全長および CTD 欠損変異をもつ内在性 mlo2 遺伝子にエピトープタグを付加し、分裂酵母から複合体を精製した。

#### (4)ヒストン量的制御の分子機構解析

ヒストンバランス破綻時の危機管理システムの理解のために、分裂酵母ヒストンを過剰発現する系を構築した。ヒストン H3 および H3-H4 同時過剰発現系をもちいて、ヒストン量的制御の分子機構解析を進めた。

### 4 . 研究成果

#### (1)Mlo2 C 末端領域の二量体形成と H3-H4 解離の分子機構

Mlo2 CTD 点変異体の生化学解析から、二量体形成に寄与するアミノ酸残基を複数特定することができた。そのうちのいくつかの残基は H3 結合にも重要であることを明らかにし、Mlo2 CTD の構造機能が理解できるようになった。また、ヒストン H3 において、H4 と相互作用する部位が Mlo2 結合にも重要であることを明らかにし、Mlo2 が H4 と同様に H3 と相互作用することで、安定な H3-H4 を解離させることが示唆された。

#### (2)Mlo2 C 末端領域の生理的機能解析

Mlo2 CTD 点変異体を分裂酵母内で過剰発現させた場合、増殖阻害が抑圧された。このことにより、Mlo2 の細胞内機能に CTD が重要であることが示唆された。

#### (3)Mlo2 複合体の精製

mlo2 遺伝子の C 末端に FLAG/HA エピトープタグを付加した分裂酵母株を作成したが、発現量が低下した。Mlo2 CTD がタンパク質安定性にも関与することが示唆されるが、現在 N 末端にエピトープタグを付加した株も作成することで Mlo2 相互作用因子の探索を進めている。

#### (4)ヒストン量的制御の分子機構解析

分裂酵母でヒストン H3 の過剰発現は増殖阻害を起こし、H3-H4 同時過剰発現は非常に強い増殖阻害を起こした。H3 N 末端テイルや H4 結合部位の変異体の過剰発現では、増殖阻害を抑圧することを明らかにした。また、mlo2 欠損変異株では、ヒストン H3 過剰発現に対してより感受性となることも明らかとなった。今後、Mlo2 結合との関連性からヒストンバランス破綻時の危機管理システムについて明らかしたいと考えている。

これらの研究結果から、これまで細胞内で安定と考えられてきたヒストン H3-H4 が Mlo2 によって解離されるという新しい分子機構が明らかとなった。

この間、ヒト Mlo2 ホモログ hUBR7 がポストヌクレオソーム H3 のヒストンシャペロンとしてはたらくこと(EMBO J(2021)40, e108307)や、イネ Mlo2 ホモログ osUBR7 も PHD が H2B モノユビキチン化活性をもち、植物生長に関わること(Plant Commu. (2022)3, 100412)などが海外の複数グループより報告され、国際的に注目されつつある。

Mlo2 がもつ H2B モノユビキチン化活性や細胞増殖との関連性も含め、Mlo2 による H3-H4 解離活性がどのように制御され、細胞機能と連携するかを明らかにすることが、今後の課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦翔太郎, 栗田順一, 西村善文, 中山潤一, 田上英明
2. 発表標題 分裂酵母 Mlo2 C末端領域における二量体形成およびヒストン H3 結合を介したクロマチン制御
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野海斗, 田上英明
2. 発表標題 分裂酵母Mlo2の生化学的構造解析: Mlo2は二量体、多量体?
3. 学会等名 第11回高次クロマチン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本実佳, 田上英明
2. 発表標題 ヒストン過剰発現時が与える影響
3. 学会等名 第11回高次クロマチン研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本遺伝学会 編	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典 10章2「ヒストン修飾」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------