

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570172

研究課題名（和文） メチル化 PCAF の機能に関する研究

研究課題名（英文） The function of lysine-methylated PCAF molecule

研究代表者

山本 健（YAMAMOTO KEN）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60274528

研究成果の概要（和文）：

ヒストンメチル化酵素（HMTase）がこれまでに多数同定されている。我々は、Set9 分子が p300/CBP-associated factor（PCAF）の複数のリジン残基をメチル化することを同定し報告した。本研究ではこれをさらに発展させ、リジンメチル化による PCAF の機能変化を解析した。その結果、PCAF の安定性は変化しないこと、自己アセチル化には影響しないこと、そして、P53 や H3 を基質としたアセチル化活性を低下させること、を見出し、メチル化を介した Set9-PCAF 系による新たな転写制御系の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

There exist several methyltransferases targeting histone molecules (HMTase). We previously reported that one of HMTase, Set9, methylates multiple lysine residues of p300/CBP-associated factor (PCAF). To elucidate biological relevance of this PCAF methylation, we examined functional change of PCAF caused by methylation. We found that lysine methylation did not alter stability and self-acetylation of PCAF; however, its acetylation activity to P53 and histone H3 molecules was impaired by this modification. Our results implicate a novel transcription pathway including Set9 and PCAF via multiple lysine methylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝子転写、PCAF、リジンメチル化

1. 研究開始当初の背景

リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などのヒストンのさまざまな共有結

合修飾は、高度に組織化されたクロマチンの機能変化に関与し、多くの基本的な生命現象に影響を与える。ヒストン H3-K4、-K9、-K27、

-K36、-K79、H4-K20 に特異的なヒストンメチル化酵素 (HMTase) がこれまでに多数同定され、その機能の観点から転写活性あるいは転写抑制に区別されている。近年、複数のグループにより Set9、Smyd2、G9a などの HMTase が非ヒストンタンパクをターゲットとし、リジンメチル化を介して機能制御を行うことを報告した。このように、リジンメチル化に対する関心はもはやヒストンにとどまっ

てはいない。SET ドメインを持つ HMTase の中でも、Set9 はその基質認識において特徴的な性質を有している。Set9 は元来、H3-K4 特異的な HMTase として同定されたが、この Set9 は遊離ヒストン H3-K4 に対しては強い活性を持つにもかかわらず、ヌクレオソームヒストン H3-K4 に対しては活性を有していなかった。その一方で Set9 は活性化因子による転写を促進することが示されたが、これは Set9 が非ヒストンタンパクの機能を制御し、転写を活性化する役割を持つことを示唆している。その後の研究により Set9 は p53、TAF10、エストロゲンレセプター α (ER) のリジンメチル化を介して転写制御因子として機能することが明らかとなった。p53 と ER のメチル化は、これらのタンパクを安定化させるとともにこれらによる転写を活性化させる。また、TAF10 メチル化は、RNA ポリメラーゼ II に対する親和性を高め、これにより転写開始時における開始前複合体 (Pre-initiation complex) の形成に直接かかわることが示唆されている。これらの結果は、Set9 が非ヒストン転写制御因子をメチル化することにより転写を制御するという考えを支持するものである。

申請者はこれまでに、クロマチンリモデリング因子の解析 (Dilworth et al. Mol. Cell 2000)、プロモドメインとヌクレオソームとの相互作用の解析 (Remboutsika et al. J. Biol. Chem. 2002)、ヒストンメチル化酵素 SUV39H1 とヘテロクロマチン分子 HP1 との結合様式の解析 (Yamamoto and Sonoda BBRC 2003)、ポリコームグループタンパク SUZ12 の機能解析 (Yamamoto et al. J. Biol. Chem. 2004, Furuno et al. BBRC 2006) などにより、クロマチン構成分子と転写制御に関する研究を進めてきた。近年、これらの研究の過程で、Set9 が p300/CBP-associated factor (PCAF) の複数のリジン残基を In vitro および In vivo でメチル化することを同定し報告した (Masatsugu and Yamamoto, "Multiple lysine methylation of PCAF by Set9 methyltransferase." BBRC 2009)。この報告では、詳細なメチル化部位のマッピングを行い、新たに見出されたメチル化部位周囲のアミノ酸配列が既知の Set9 認識配列とは異なることを示した。すなわち、Set9 がリジンメチル化を介して PCAF の機能を制御している

可能性、ならびに更なる Set9 ターゲットが存在する可能性を示唆した。本申請課題ではこの成果を基盤として、メチル化 PCAF の分子機能変化を同定し、Set9 による PCAF メチル化の機能的意義について解明する。

2. 研究の目的

これまでの研究成果によって、PCAF の 6 リジン残基が Set9 によってメチル化されることを明らかにした。これらのリジン残基は、E3 ドメイン、アセチル化活性ドメイン、プロモドメインなどの機能ドメインには位置していないが、それぞれの機能に影響する可能性は否定できない。したがって、本申請課題では、メチル化による PCAF の機能変化を以下の観点から明らかにする。

- ・3 箇所の機能ドメインの機能変化
- ・PCAF の安定性変化
- ・PCAF の局在変化
- ・総和としての PCAF による転写活性の変化
- ・PCAF のメチル化がどのような細胞刺激で誘導されるか、を明らかにする。

これらの研究を通して、PCAF メチル化の生理的意義の解明を目指したい。

先に述べたように、ヒストンリジンメチル化酵素のヒストン以外の基質として、p53 や基礎転写因子の一部が同定され、そのリジンメチル化が分子機能を制御することが報告されつつある。これはヒストンメチル化酵素の異なる機能的側面を示すものであり、これまで同定された以上の転写因子がリジンメチル化を受けている可能性がある。申請者はその一つとして PCAF を同定したが、この成果を土台として PCAF メチル化の意義を明らかにすることにより、転写制御の新しいカスケードが明らかになる可能性がある。また、PCAF では少なくとも 6 箇所のリジン残基がメチル化を受けること、そしてその配列が既知のものとは異なることから、今後、新しいメチル化標的分子を同定する上で、有用な配列情報を提供することとなる。

3. 研究の方法

研究計画は、主として次の 3 つに区分される。

- ・PCAF 機能ドメインに着目した分子機能変化の解析：ユビキチンリガーゼ活性、アセチル化活性、プロモドメインによるヌクレオソーム結合能の解析
- ・メチル化 PCAF における転写機能の変化の解析：PCAF 標的遺伝子を解析対象としたメチル化 PCAF 転写活性の解析、メチル化 PCAF の安定性の解析
- ・メチル化 PCAF 誘導機序解明に関する研究：細胞増殖やアポトーシス刺激時における

PCAF メチル化の半定量解析

(1) PCAF 機能ドメインに着目した分子機能変化の解析

PCAF の6つのメチル化標的リジン残基は E3 リガーゼドメイン、アセチル化ドメイン、プロモドメインの周囲に存在する。したがって、これらのドメインの機能変化について、In vitro 解析を主体にして研究を進める。

① E3 リガーゼドメイン: メチル化 PCAF は培養細胞内で Set9 と共に強制発現させることにより、免疫沈降法を用いて精製が可能である (検証済み)。このようにして精製したメチル化 PCAF ならびに非メチル化 PCAF を用いて、定法により E3 リガーゼ活性の差異を検討する。

② アセチル化ドメイン: p53, ヒストン H3 は PCAF によるアセチル化標的分子である。これらを対象として、精製メチル化 PCAF を用いた In vitro アセチル化の検討を行う。また、PCAF は自己アセチル化活性を有することが知られている。したがって、自己アセチル化活性の変化も解析に加える。

③ プロモドメイン: 申請者はこれまでの研究により、効率的にヌクレオゾームを精製する手法を確立している。プロモドメインを介したヌクレオゾーム結合能について、メチル化 PCAF と非メチル化 PCAF の差異を解析する。この研究は、ヌクレオゾーム DNA をビオチンラベルした後に、Band Shift Assay を実施することによって実現可能である (Remboutsika, Yamamoto, JBC 2002)。

(2) メチル化 PCAF の転写機能の変化の解析
二つのアプローチによって、メチル化 PCAF の転写活性の変化を解析する。

① レポーターアッセイ: p21 などの PCAF によって転写が制御される遺伝子のプロモーターを用い、レポーターアッセイを実施する。Set9 とメチル化活性を喪失した変異 Set9、ならびに、標的リジン残基をアルギニン残基に置換した変異 PCAF などを駆使し、メチル化 PCAF の転写機能変化について検討する。

② ノックダウンによる解析: 培養細胞において Set9 をノックダウンすることにより、メチル化 PCAF 量の推移をモニターし、その安定性を解析する。さらに、メチル化 PCAF 量の変化による PCAF 標的遺伝子の発現変化を定量 PCR によって解析しその相関を検討する。一方、これらの実験については、標的遺伝子発現量の変化が微細な時には検出感度を下回る可能性があるため、強制発現系を用いた実験を考慮する。

(3) メチル化 PCAF 誘導機序解明に関する研究

PCAF のメチル化がどのような細胞刺激によって誘導されるかを明らかにすることは、PCAF メチル化の生理的意義を理解する上で極めて重要である。Set9 が PCAF をメチル化

することから、Set9 の発現誘導刺激に伴う PCAF メチル化の誘導を解析する方法が端緒となるが、現時点で、Set9 に対する有効な誘導刺激は明らかではない。しかしながら、これまでの申請者の予備実験では、メチル化 PCAF 特異的な抗体を用いた顕微鏡下の観察とウエスタンブロットによる半定量的解析によって、アドリアマイシン添加がメチル化 PCAF を誘導することが確認されている。これらの実験結果に基づき、細胞の増殖刺激あるいはアポトーシス刺激が、PCAF メチル化誘導機構解明の切り口となることが予想される。したがって、培養細胞を用い、細胞周期、血清刺激、種々のアポトーシス誘導刺激 (アルキル化剤、UV、デスレセプター刺激、小胞体ストレスなど) を順次試し、メチル化 PCAF を半定量する。この時、全 PCAF との比率を取ることによって、絶対量と相対量を解析する。

4. 研究成果

(1) リジンメチル化 PCAF のアセチル化活性変化の検討

① in vivo 解析

PCAF が P53 分子をアセチル化することから、PCAF のメチル化がそのアセチル化活性にどう影響するかを検討した。U2OS 細胞を SET9 に対する siRNA でノックダウンするとメチル化 PCAF が減少する。この時、P53 分子 K320 およびヒストン H3K9 のアセチル化を解析したところ、ともにアセチル化の程度が減少していた。さらに、PCAF のメチル化部位を変異 (K を R に置換) させた変異 PCAF を強制発現し、アドリアマイシンにて P53 分子を誘導した際のアセチル化 P53 (K320) をウエスタンブロットにより解析したところ、変異 PCAF を強制発現した細胞においては P53 (K320) のアセチル化が低下していた。以上の結果は、メチル化 PCAF が P53 (K320) のアセチル化を正に制御している可能性を示唆している。一方、PCAF の細胞内安定性やユビキチン活性はリジンメチル化によって左右されなかった。

② in vitro 解析

さらに in vitro 解析を進めた。メチル化 PCAF を細胞より精製し、in vitro でのメチル化 PCAF 分子の機能を検討した。HEK293 細胞に、Myc タグを付加した PCAF を導入し、それに加えて、メチル化を促進する目的で野生型 SET9 を導入した。メチル化 PCAF を抗 PCAF メチル化抗体および抗 Myc 抗体の2段階で精製した。コントロールとして、MycPCAF とメチル化活性部位に変異を有する変異 SET9 を導入した細胞より、抗 Myc 抗体によって精製した PCAF 分子を準備した。それぞれにおいて精製された PCAF を抗 PCAF 抗体および抗メチル化 PCAF 抗体を用いて確認した。大腸菌

にて作成した GST 融合 P53 分子とメチル化 PCAF あるいはコントロール PCAF を反応させ P53 分子のアセチル化を検討したところ、メチル化 PCAF においてはアセチル化活性が減少していた。さらに GST 融合ヒストン H3 を基質として検討したところ同様の結果が得られた。以上の結果は、メチル化によって PCAF のアセチル化活性が、in vitro では少なくとも P53 や H3 に対して低下することを示したものである。

上記①と②の結果は相反するものであり、予期せぬ結果であった。P53 分子のアセチル化には、PCAF のみならず複数の分子が関与していることから、直接的な影響を観察することが可能な in vitro 解析の結果が、メチル化 PCAF の機能を反映していると考えているが、さらなる追加実験が必要である。

(2) MIBP1 の機能解析

PCAF と同様な転写制御分子である MIBP1 の機能解析を並行して行った。MIBP1 (別名 HIVEP2, Schnurri2) の発現調節機能をマイクロアレイで解析した結果 NF- κ B パスウェイ遺伝子の抑制が最も顕著であり、また、発現抑制される遺伝子の転写開始点上流には NF- κ B 認識配列が有意に多く含まれていることを明らかにした。MIBP1 が NF- κ B サイトに結合することをゲルシフト実験によって確認し、さらに、内在性 MIBP1 発現を RNAi で抑制することにより、NF- κ B 認識配列を持つ遺伝子群の発現上昇が起こることを見出した。これらの結果より、MIBP1 が NF- κ B パスウェイの抑制因子であると結論し、さらに糖転移酵素 OGT による本因子の修飾の影響も検討し論文発表した。

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) Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Uchiumi T, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Yamamoto K, Seki N, Naito S. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci.* 2010; 101: 1797-1806. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01598.x. 査読あり
- (2) Iwashita Y, Fukuchi N, Waki M, Hayashi K, Tahira T. Genome-wide repression of NF- κ B target genes by transcription factor MIBP1 and its modulation by O-linked β -N-acetylglucosamine

(O-GlcNAc) transferase. *J Biol Chem.* 2012; 287: 9887-9900.

doi:10.1074/jbc.M111.298521. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 山本 健 (2011, 10/7)、DNA チップの可能性 — 相関, 連鎖, エピジェネティクス —, 第 65 回日本臨床眼科学会、東京
- (2) 岩下雄二、福地成彦、脇万里子、林健志、田平知子 (2011, 12/15)、Genome-wide Repression of NF- κ B Target Genes by the Transcription Factor MIBP1 and its Modulation by O-GlcNAc Transferase. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.gen.kyushu-u.ac.jp/~genome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO KEN)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：60274528

(2) 研究分担者

田平 知子 (TAHIRA TOMOKO)

九州大学・生体防御医学研究所・講師
研究者番号：50155230