

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4月20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570173

研究課題名（和文） ヒストン修飾間相互作用による遺伝子転写開始制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of gene transcription start regulatory mechanism by crosstalk between histone modifications

研究代表者

中川 武弥（NAKAGAWA TAKEYA）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50363502

研究成果の概要（和文）：

本研究ではメチル化とユビキチン化という二つのヒストン修飾が共役し、遺伝子転写を制御する機構の解明を目的とした。ヒストン H2A の 119 番目アミノ酸であるリジンのユビキチン化と、ヒストン H3 の 4 番目のアミノ酸であるリジンのメチル化のクロストークは既に明らかにしていた。本研究ではこのクロストークによる遺伝子転写制御にはヒストン H4 のアセチル化が関与することを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, I investigated mechanism of transcriptional regulation by crosstalk between two histone modifications. We have already revealed the crosstalk between ubiquitylation of H2AK119 and methylation of H3K4. In this study, we obtained a result that indicate the involvement of histone H4 acetylation to this crosstalk.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：転写

1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造の構成単位はヌクレオソームと呼ばれ、ヌクレオソーム内のヒストンはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化等の翻訳後修飾を受ける。当時からこれらの修飾の生物学的な意義を明らかにする為の研究が、国内外で盛んに行われていた。特に異なるヒストン修飾間の相互作用(クロストーク)が多数発見されており、遺伝子発現制御の重要な役割を担っているとして世界的に注目されていた。ヒストンの修飾が遺伝子発現の制御に関わっている事は明らかにされていたが、その詳細な機構は明らかにされていなかった。我々は、いかにしてヒストンのユビキチン化とメチル化、或いはアセチル化が共役して遺伝子の転写開始を制御しているか、その詳細な機構を明らかにする為の研究を進めていた。

我々は肝臓の部分切除後の肝再生時に、ヒストンH2Aの119番目のリジン残基の脱ユビキチン化が起こること、その際遺伝子発現の劇的な変化が起こることから、H2Aのユビキチン化と遺伝子発現制御の関連性に注目した。まず遺伝子発現アレイのデータ解析及び組換えタンパク質の活性より、USP21がH2A119Kの脱ユビキチン化酵素である事を明らかにした (Genes Dev 22(1):37-49, 2008)。更にこのユビキチン化とヒストンH3K4のメチル化とのクロストークが遺伝子転写開始を制御していることを明らかにしたが、これらのヒストン修飾がいかにして遺伝子転写開始を制御しているのか、詳細な機構は解明されていなかった。

2. 研究の目的

ヒストンH2Aのユビキチン化とH3K4のメチル化のクロストークから遺伝子転写開始までの間で何が起きているのか、その詳細な機構を明らかにすることを目的とする。H3K4のメチル化により直接クロマチンの高次構造に変化が起こるのか、このメチル化を認識する転写調節やクロマチン高次構造に関与する因子が存在するのか、または更なるヒストン修飾のクロストークが起こるのか、これらの可能性について解析していく。

3. 研究の方法

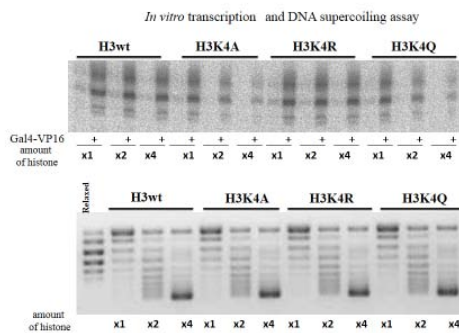
ヒストンH2Aの119番目のリジン残基のユビキチン化はヒストンH3K4のメチル化を阻害し、USP21による脱ユビキチン化を受けるとメチル化が促進され、遺伝子転写が活性化される。H3K4のメチル化による遺伝子転写活性化を、メチル化残基に変異を加えたヒストンを含むクロマチンを用いての試験管内遺伝子転写実験でより厳密に確認した。各ヒストン変異体で作ったクロマチンの間に構造的な違いが無いことをスーパーコイリングアッセイを行い確認した。

その他のヒストン修飾の状態を確認するため、試験管内遺伝子転写を行う際に放射性同位体ラベルをしたアセチル基供与体に加え、アセチル基のヒストンへの取り込み、つまりヒストンのアセチル化修飾を解析した。ヒストンH3K4変異体を用いてこの部位のメチル化との関連性を解析した。

クロマチンへの基本転写因子等の結合の違いが、ヒストン変異体の間に存在するのか確認を行った。ビオチン化ラベルした DNA を用いてクロマチンを作製し、試験管内遺伝子転写を行った後にアビジンビーズでクロマチンを精製し、結合している転写因子等をウエスタンブロッティングで検出した。

4. 研究成果

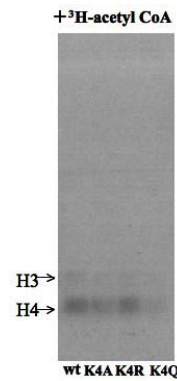
次の図は試験管内遺伝子転写実験の転写産物の検出と、スーパーコイルングアッセイで転写前クロマチンのスクレオソーム形成の状態を確認した。



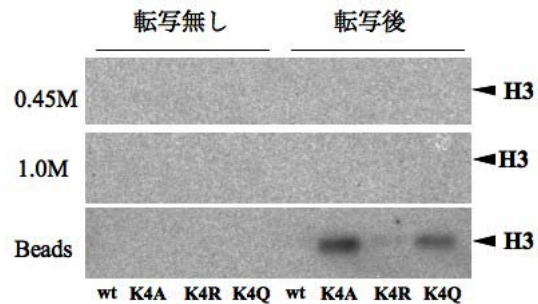
スーパーコイルングアッセイの結果は各ヒストン変異体間で変化は無く、クロマチン構造の違いは見られない。遺伝子転写はメチル化部位である 4 番目のリジンをアラニンやグルタミンへ変異させた場合転写が抑制され、メチル化リジンを電荷的に模倣したアルギニン変異体では野生型と同程度活性化された。この結果は H3 の 4 番目のリジンのメチル化が遺伝子転写を活性化させることを示している。

次の図は試験管内遺伝子転写の際の放射性同位体ラベルしたアセチル基の取り込みをオートラジオグラフィーで解析した結果である。メチル化を受ける野生型やメチル

化リジンを模倣したアルギニン変異体ではアセチルレベルが高いが、メチル化を受けないアラニンやグルタミン変異体ではメチル化レベルが減少している。この結果は H3K4 のメチル化がヒストン H4 のアセチル化を促進している可能性を示唆している。



次の図は試験管内遺伝子転写後にクロマチンに結合しているタンパク質を精製し、ウエスタンブロッティングで確認した物である。



ヒストン変異体での基本転写因子の結合に変化は見られなかったが、メチル化を受けず H4 のアセチル化レベルも低いアラニンやグルタミン変異体では 1M KCl で洗った後でもビーズ上のクロマチンへのヒストンの結合が見られた。これは何らかの理由でヒストンと DNA の結合が強まっている為だと考えられる。ヒストン H4 のアセチル化はヒストンと DNA の結合を弱めると考えられている。このことから、H3 のメチル化が H4 のアセチル化を促進し、その結果ヒストン-DNA 間の結合が緩み、クロマチンの構造変化が起こった結果遺伝子転写が活性化されるというモデルが

考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Richly H, Rocha-Viegas L, Ribeiro JD,
Demajo S, Gundem G, Lopez-Bigas N,
Nakagawa T, Rospert S, Ito T, Di Croce L.
Transcriptional activation of
polycomb-repressed genes by ZRF1. Nature.
468, 1124-8 (2010) 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 武弥 (NAKAGAWA TAKEYA)
長崎大学・医歯 (薬) 学総合研究科・助教
研究者番号 : 5036502

(2) 研究分担者

伊藤 敬 (ITO TAKASHI)
長崎大学・医歯 (薬) 学総合研究科・教授
研究者番号 : 90306275