

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22870007

研究課題名（和文） ヒストン化学修飾ネットワークの構築及び作動の仕組みの解明

研究課題名（英文） Elucidation of constructing and working mechanisms of histone modification network

研究代表者

林 陽平 (HAYASHI YOHEI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・博士研究員

研究者番号：00588056

研究成果の概要（和文）：多種多様なヒストン化学修飾の相互制御が、複雑なヒストン化学修飾ネットワークを形成するという我々の理論に基づき、このネットワークが生体内でどのように構築され、作動しているのかを解明することを目的とした。全439種から成る出芽酵母ヒストン点変異株ライブラリーを用いて、化学修飾残基の変異により生じるヒストン化学修飾ネットワークの異常を、表現型の変化として観察した。その結果、ヒストンH3のLys4、Lys36やヒストンH4のLys12、Lys16といった化学修飾残基が、生体機能の維持に重要な役割を果たす「機能的ハブ化学修飾」であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our previous theory on histone modifications suggested that mutual controls among a wide variety of histone modifications form complex histone modification network. In this study, to elucidate how the network is built and working in living cells, the aberrances of the network caused by the point mutation of histone modifiable residues were comprehensively examined as phenotypic changes using the histone point-mutant library of the budding yeast. As a result, histone H3-Lys4, -Lys36 and histone H4-Lys12, -Lys16 were identified as modifiable residues working as “functional hubs”, which play an important role in the maintenance of biological functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,260,000	378,000	1,638,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学・タンパク質修飾

キーワード：エピジェネティクス、複雑ネットワーク、蛋白質、化学修飾、頑強性

1. 研究開始当初の背景

クロマチンを構成するヒストンの化学修飾やDNAのメチル化といったエピジェネティック情報による遺伝子制御をエピジェネティック制御という。エピジェネティック制御は生命の維持・変換において重要な役割を

担っており、その破綻は癌を始めとする様々な疾患の原因となる。エピジェネティック情報がいかんして生体反応の制御を行うか、という仕組みに関しては、「特定の化学修飾パターンに応じて下流反応制御の方向性が決定される」という「ヒストンコード仮説」が2000年に提唱された（Strahl & Allis, Nature,

403, 41-45 (2000))。その仮説に基づき、多種多様なヒストン化学修飾の各々について、機能的役割を解明する研究が遺伝子制御分野を席卷し、様々な化学修飾と、下流反応との関係の大筋が明らかになったかに見えた。

しかし、個々のヒストン化学修飾の研究が進むにつれ、ヒストン化学修飾と下流反応の関係は、1対1対応のコードのように単純ではないことが分かってきた。まず、ヒストン化学修飾同士の制御関係が非常に密であり、ある化学修飾の増減が直接・間接的に様々なヒストン化学修飾に影響を及ぼす「複雑性」を有することが明らかになりつつある。更に応募者の所属研究室では、ヒストン蛋白質中のアミノ酸一つ一つをアラニンに置換した出芽酵母ヒストン点変異体ライブラリー約440種を構築し、化学修飾残基の変異株を用いて種々の表現型解析を行った (Matsubara et al., *Genes Cells*, 12, 13-33 (2007); Sakamoto et al., *Genes Cells*, 14, 1271-1330 (2009))。その結果、驚くべきことに、ヒストンテイル領域の化学修飾残基の点変異株は一例を除き全く表現型が変化しない、即ち化学修飾の欠損に対して生体が極めて「頑強」であるという結果を得た。これら「複雑性」及び「頑強性」の基となっているのは複雑システムであるヒストン化学修飾システムであることから、個々の化学修飾に焦点を当てた「ヒストンコード仮説」ではこれらの性質を説明できず、ヒストン化学修飾システムの全体像を捉える、システム生物学的視点が必要と考えた。そこで応募者は、このシステムを複雑ネットワークとして捉え直しヒストン“modification web”理論を構築し、その特徴的なネットワーク構造により生体の「頑強性」が獲得されることを見出した (Hayashi et al., *Genes Cells*, 14, 789-806 (2009); 図1)。

2. 研究の目的

ヒストン“modification web”の理論的枠組みの提出は完了したものの、生命の維持・変換におけるエピジェネティック制御の本質的な仕組みを理解するには、どのような化学修飾の変動がweb中のどの経路を制御し、結果的にどのような化学修飾状態を導くか、即ちヒストン“modification web”の作動の仕組みに関して未知の部分の解明しなければならない。本研究では、ヒストン点変異体ライブラリーを用いて、あるヒストン化学修飾の変化が他のヒストン化学修飾の状態にどの程度影響を与えるか、を包括的に解析した。この解析を通して、ある化学修飾が変化した時にどの化学修飾がその働きを補うのかという、「頑強性」獲得の仕組みの理解を目指した。

3. 研究の方法

ヒストン“modification web”が生体内でどのように作動しているか、を知るためには、まずネットワーク中で「核」として働いているヒストン化学修飾(機能的ハブ)を特定する必要があると考えた。その上で、ヒストンの化学修飾が互いに互いを制御し合い、全体としてどのようなネットワーク構造を形成しているのか、またそのネットワーク構造はある化学修飾の欠損に対してどのように作動して、その欠損を補填しているのか、を明らかにしたい。応募者の所属研究室では、化学修飾残基の点変異体を含む、ヒストン点変異体ライブラリー全439種を構築しており、それを利用して以下の研究を進めた。

- (1) 機能的ハブとなるヒストン化学修飾の特定: ヒストン化学修飾残基の点変異出芽酵母株を、ヒストン“modification web”の働きを制限した状況下で生育し、各ヒストン化学修飾の欠損が、出芽酵母の生育に与える影響を検証した。そして、特に強く出芽酵母の生育に影響を及ぼしたヒストン化学修飾を機能的ハブとして特定した。
- (2) (1)で特定した機能的ハブを中心として、様々なヒストン化学修飾残基の点変異株において、他のヒストン化学修飾量がどのように変動するかを検証し、化学修飾の制御関係を包括的に明らかにすることを試みた。

これらの研究を通して、ヒストン“modification web”中で各々の化学修飾の欠損が機能的に補填され、「頑強性」が獲得される仕組みを考察した。

4. 研究成果

本研究の目的は、多種多様なヒストン化学修飾が相互に制御し合うことで生じた複雑システムであるヒストン“modification web”(図1)が、どのような原理に基づいて構築され作動しているのか、を明らかにすることであった。研究材料として、申請者の所属研究室が独自に保有する、出芽酵母のヒストンのアミノ酸一つ一つに点変異を導入した全439種から成るヒストン点変異株ライブラリーを用いて、以下の研究を進めた。

- (1) 機能的ハブとなるヒストン化学修飾の特定: 化学修飾残基に変異が導入された場合に生じるヒストン化学修飾ネットワークの異常を、表現型の変化として観察し

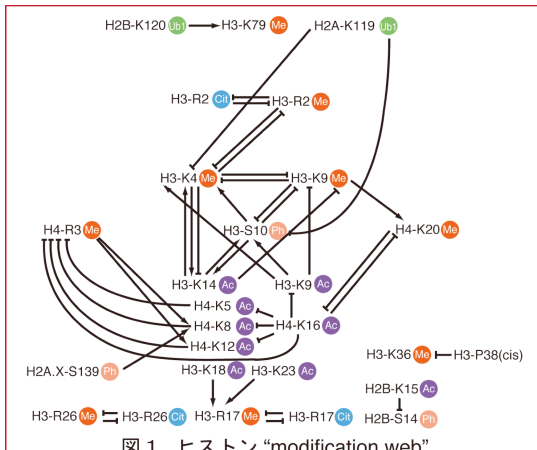


図 1. ヒストン “modification web”

た。その結果、ヒストン H3 の Lys4, Lys36 といったメチル化残基やヒストン H4 の Lys12, Lys16 といったアセチル化残基が、ヒストン化学修飾ネットワーク及び生体機能の維持に重要な役割を果たす「機能的ハブ化学修飾」であることを明らかにし、論文発表した (Sato et al., *Genes Cells*, 15, 553-594 (2010); 図 2)。これらの機能的ハブの内、ヒストン H3-Lys4, H4-Lys16 は、ヒストン “modification web” 構造中でもネットワーク構造の維持に重要な役割を果たす化学修飾残基であることが示唆された一方、ヒストン H3-Lys36 及び H4-Lys12 は現時点でのヒストン “modification web” 中では構造的重要性を見いだせなかった。現時点で発見されていない化学修飾や化学修飾間の制御関係が多数あると予想されるため、更なるヒストン “modification web” の精緻化が必要と考えられた。

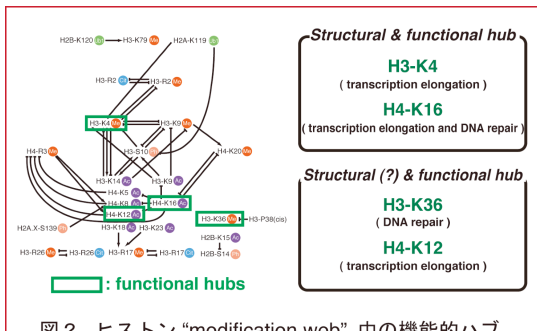


図 2. ヒストン “modification web” 中の機能的ハブ

- (2) (1)で同定した、機能的に重要な役割を担う化学修飾（機能的ハブ化学修飾）が、ヒストン化学修飾ネットワーク上の他のヒストン化学修飾に対してどのような影響を及ぼすか、を検証した。実験方法としては、機能的ハブ化学修飾残基の点変異出芽酵母株において、他のヒストン化学修飾量の増減をウェスタンブロットにより解析する手法を採用した。

国内外における位置づけとインパクト：ヒス

トンの化学修飾が相互制御を基盤とした複雑ネットワークを形成することを初めて提唱したヒストン “modification web” 理論は、我々の提唱した独自性の高い理論である (Hayashi et al., *Genes Cells*, 14, 789-806 (2009))。この理論を更に発展させるため、ネットワーク中で機能的に核となる化学修飾の特定に成功した。これにより、従来の研究では説明できなかったヒストン化学修飾システムの環境変化に対する抵抗性の高さ（頑強性）を支える仕組みの解析が可能となった。今後の、ヒストン化学修飾ネットワークの精緻化及び全容解明の端緒となる研究であり、ヒストン化学修飾研究分野にシステム論的解析を導入し、新たな方向性を示した点で意義深い。

今後の展望：本研究の今後の展開によって、ヒストン化学修飾同士の制御関係が包括的に明らかにされ、ヒストン化学修飾制御ネットワークの全容が明らかになるため、今後のヒストン化学修飾を基にした遺伝子制御研究の概念的基盤を提示できると考えられる。また、ヒストンにおいて提示した概念は、p53 など他の蛋白質の “modification web” へも適用可能であると考えられ、理論の一般化に繋がられる。

エピジェネティック制御は、疾患との関連が深く、特に癌ではヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が抗癌剤として利用されるなど、薬剤開発が進んでいる。しかし、その複雑さ故、標的とする化学修飾を特定できないまま薬剤開発が進んでいる。本研究によるヒストン “modification web” の全容及び作動の仕組みの解明は、ネットワーク構造を基にした標的的化学修飾の特定や薬剤の副作用予測を可能とするため、新たな薬剤開発戦略法の提案に繋がる。

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 2 件)

- ① Kawano A, Hayashi Y, Noguchi S, Handa H, Horikoshi M, Yamaguchi Y, Global analysis for functional residues of histone variant Htz1 using the comprehensive point mutant library., *Genes Cells*, 16, 590-607 (2011) 査読有
- ② Sato L, Noguchi S, Hayashi Y, Sakamoto M, Horikoshi M, Global analysis for functional residues of histone variant Htz1 using the comprehensive point mutant library., *Genes Cells*, 15, 553-594 (2010) 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Hayashi Y, Horikoshi M, Network-based histone “modification web” theory and “DESS” strategy for elucidating the physiological significance of histone modifications., *Keystone symposia Histone code: Fact or Fiction ?*, 146, Utah (January 12th, 2011)
- ② Hayashi Y, Sato L, Kawashima S, Akai Y, Adachi N, Natsume R, Senda T, Seki M, Horikoshi M, Mechanistic models on eukaryotic gene regulation., *BMB2010*, 3T2-12, Kobe (December 9th, 2010)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 陽平 (HAYASHI YOHEI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・博士研究員
研究者番号：00588056

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：