

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23616009

研究課題名(和文) ヒストンH4リジン20のメチル化を介した染色体機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of chromatin function mediated by histone H4 lysine 20 methylation

研究代表者

小田 尚伸(Oda, Hisanobu)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：30295133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン蛋白質は種々の翻訳後修飾を受け、クロマチンや核の機能に影響を与える。ヒストンH4のリジン20番のメチル化はDNA修復応答、染色体凝縮、DNA複製や遺伝子発現といった様々な機能を制御している。PR-Set7はH4リジン20の唯一のモノメチル化酵素であり、すべてのレベルのメチル化に不可欠である。PR-Set7の欠失はマウス初期発生ならびに皮膚分化に影響を与えた。今回H4K20メチル化がDNA複製開始に重要な役割を果たしていること、皮膚の構造と機能に重要であることを明らかにし、Genes and Development、EMBO Journalの二つの欧米誌に論文として公表した。

研究成果の概要(英文)：Histone post-translational modifications impact many aspects of chromatin and nuclear function. Histone H4 Lysine 20 methylation (H4K20me) has been implicated in regulating diverse processes ranging from the DNA damage response, chromatin condensation, and DNA replication to gene regulation. PR-Set7 is the sole enzyme that catalyzes monomethylation of H4K20. It is required for maintenance of all levels of H4K20me, and, importantly, loss of PR-Set7 is catastrophic for the various stages of development such as embryonic development and skin differentiation. These findings have placed PR-Set7, H4K20me, and proteins that recognize this modification as central nodes of many important pathways. The results were published in two journals, Genes & Development and EMBO Journal.

研究分野：医学、生物学

科研費の分科・細目：時限付分科細目、エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 染色体 ヒストン修飾 ヒストンメチル化酵素 H4リジン20 細胞周期 DNA複製
クロマチン

1. 研究開始当初の背景

染色体を構成するヒストンは種々のメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化といった翻訳後修飾により、その細胞内機能が制御されている。これらの修飾はヌクレオソームの可動性や相互作用に影響を与え、あるいはその修飾を特異的に認識する蛋白質の動員によって、クロマチンの構造変換を惹起して DNA の複製、転写、修復といった種々の細胞機能の調節に関わっている。

近年ヒストンのメチル化酵素が数多く報告され、その部位特異的な修飾と細胞機能との関連が注目を集めている。ヒストンのメチル化される部位の違いだけでなく、同一部位でも異なるレベルのメチル化が別の細胞内機能に関わることが知られている。なかでもヒストン H4K20 のメチル化は個々のメチル化の状態が細胞周期の中で非常に動的に制御されていることが特徴で、哺乳類の生体内では PR-Set7/setd8, Suv4-20h1, Suv4-20h2 の三つの酵素が関与しているが、これらの酵素がどのように役割分担し、またどのように協調して動的な H4K20 のメチル化を制御しているのかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

H4K20 のメチル化が生体内でどのような生理機能を担っているかを明らかにする目的で、まずは生体内における PR-Set7 の機能解析を行うこととし、その遺伝子破壊マウスを作成し解析を行った (Oda *et al*, Mol. Cell Biol. 29, 2278-2295, 2009)。PR-Set7 欠損マウスは胎生致死であり、8 細胞期にて発生が停止した。またそれは PR-Set7 の持つメルトランスフェラーゼ活性の欠損に依存していることを 2 細胞期胚への PR-Set7 をコードする mRNA の注入によるレスキュー実験により明らかにした。さらに PR-Set7 の条件特異的遺伝子破壊 ES 細胞を用いた解析を行うことにより PR-Set7 非存在下では細胞周期の停止と自発的な DNA 損傷が細胞内で誘発され、その結果として細胞死が誘導されることを

示した。PR-Set7 が欠損するとモノメチル化のみならずジメチル化、トリメチル化のレベルも減少することから、機能的に異なると考えられるこれらのメチル化が細胞内では協調的に制御されていること、また間期の細胞においても染色体の凝縮度が低下しており、これらのメチル化が多彩な生理機能を担うことが明らかになった。

本研究では H4K20 メチル化の生体での機能を解析する目的で DNA 複製における役割、皮膚の発生および分化における PR-Set7 および H4K20 メチル化の機能に焦点をあてて解析をすることとした。

3. 研究の方法

(1) DNA 複製における H4K20 メチル化の役割の解析

PR-Set7 の細胞内の動態を制御する因子として PCNA ならびに CRL4(Cdt2) が関わることをすでに明らかにしていた。PCNA 結合を介した分解制御に抵抗性の変異型 PR-Set7^{PIP2} 蛋白質を培養細胞内で発現することにより、細胞周期への影響を解析した。

次に Suv4-20h1 および Suv4-20h2 を欠損する繊維芽細胞あるいは野生型の繊維芽細胞を用いて PR-Set7^{PIP2} を誘導的に発現する細胞株を作成し、H4K20me2/me3 の有無による表現型への影響を調べた。

さらに PR-Set7 野生型および変異型マウス胚を用いて分解抵抗性の変異型 PR-Set7 および Suv4-20h1 を発現させることによりこれら二つの酵素の初期胚における役割を明らかにする実験を行った。

以前の解析から翻訳開始点の結合蛋白質 (ORC) がメチル化 H4K20 に結合することを見出している (Oda *et al*, Mol. Cell 40, 364-376, 2010)。PR-Set7 をクロマチン上に動員することにより ORC が細胞内で動員されるかどうかをクロマチン免疫沈降法で調べた。さらに構造からクロマチン結合ドメインを有すると推測される ORC1 および

ORCA を用いてメチル化 H4K20 に対する結合能の解析を行った。

(2) 皮膚における PR-Set7 の機能解析

皮膚において組織特異的に PR-Set7/setd8 を欠失するマウスを作成するために、ケラチン 14 プロモーターの制御下に Cre 酵素あるいは CreER を発現するトランスジェニックマウスを入手し、PR-Set7/setd8 の flox マウスと交配した。CreER マウスにおいては 4-ヒドロキシタモキシフェンを投与することにより PR-Set7 遺伝子を皮膚特異的にかつ誘導的に欠失させた。

これらのマウスから皮膚細胞を分離採取し培養細胞として遺伝子導入実験に用いた。またマウスの皮膚を採取固定して主に免疫組織染色の方法により種々の蛋白質の発現を特異的に検出する抗体を用いて解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) PR-Set7 変異蛋白質(PR-Set7^{PIPM2})を発現することにより、G2/M 期の細胞が増加あるいは DNA 量が倍加した細胞が出現した。

Cdt2 欠損細胞においても細胞周期の障害が認められたが、PR-set7 あるいは Cdt1 を同時に欠失させることにより細胞周期の障害はレスキューされた。この結果から PR-Set7 は CRL 4 (Cdt2) による DNA 再複製の制御に、その下流で働く可能性が示唆された。

Suv4-20h1 および Suv4-20h2 を欠損する繊維芽細胞では PR-Set7^{PIPM2} を誘導的に発現しても、細胞周期の障害が認められず H4K20me2/me3 の増加が原因となっている可能性が示唆された。

初期胚においては PR-Set7^{PIPM2} を発現させても細胞周期の障害は認められず、また野生型 PR-Set7 と同様に PR-Set7 ノックアウト胚の細胞周期停止をレスキューできることが示された。これより初期胚では分化した細胞とは異なる細胞周期進行制御およびチェックポイント制御が存在していることが

示唆された。初期胚ではヘテロクロマチンおよびそれに付随するヒストンの修飾が存在しないことが両者の表現型の違いを決定していると考えられた。

以前の解析にて *in vitro* で ORC 蛋白質を H4K20me2/3 結合蛋白質として同定した。今回 GAL4-PR-Set7 を UAS 部位に動員することにより、ORCA および ORC1 も同様に動員されることがクロマチン免疫沈降により示された。ORC 蛋白質のうち H4K20me2/me3 に結合する可能性を有する蛋白質を検討したところ、WD40 ドメインを有する ORCA 蛋白質、BAH ドメインを有する ORC1 蛋白質が候補として見いだされたためメチル化ペプチドを用いてこれらの結合能を解析した。ORCA 蛋白質は H4K20me3 に対して、ORC1 蛋白質は H4K20me2 に対して結合能を有することが確認された。

以上の解析結果から DNA 複製の開始機構において PR-Set7, Suv4-20 といった H4K20 メチル化酵素が関与し、ORC 複製開始部位結合蛋白質がメチル化 H4K20 へ結合により動員される機構が明らかになった。

(2) PR-SET7 の発現を LacZ のレポーターマウスを作成することにより解析した結果、皮脂腺(SG)、毛嚢間表皮 (IFE)、毛嚢(HF)に発現が認められた。ケラチン 14 のプロモーターにより胎生 14.5 日より PR-Set7 を欠失させたマウスにおいては表皮が完全に消失し、胎児は出生後すぐに死亡した。これより PR-Set7 の機能は胎児期の皮膚発生に不可欠であることが示された。

次にケラチン 14 プロモーターに加えて 4-ヒドロキシタモキシフェンを用いて誘導条件下で PR-Set7 を欠失するマウスを作成し解析を行った。PR-Set7 欠失を誘導すると IFE の細胞数が減少するとともに、SG の消失が認められ、これらの領域の前駆細胞の生存に PR-Set7 が不可欠であることが示された。皮膚の分化においては幹細胞から前駆細胞が生じる過程で c-Myc が重要な役割を果たす転

写因子であることが知られているが、PR-Set7 が c-Myc の標的のひとつであり、また Myc によって誘導される細胞の増殖および分化において PR-Set7 が不可欠であることを示した。

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 3 件)

1. Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg DF, PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genomic integrity, cell cycle, chromosome condensation and transcription, *Genes Dev.* 26(5), 325-337, 2012

2. Driskell I, Oda H, Blanco S, Nascimento E, Humphreys P, Frye M, The histone methyltransferase Setd8 acts in concert with c-Myc and is required to maintain skin, *EMBO J.* 31(3), 616-29, 2012

3. Beck DB, Burton A, Oda H, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME, Reinberg D, The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h, *Genes Dev.* 26(23), 2580-9, 2012

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小田 尚伸 (HISANOBU ODA)

九州がんセンター・臨床研究センター

研究者番号：30295133

(2)研究分担者

中別府 雄作 (YUSAKU NAKABEPPU)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350