

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840003

研究課題名(和文) ヒストンH1ユビキチン化によるゲノム安定性制御機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of genome maintenance by histone H1 ubiquitination

## 研究代表者

加藤 広介 (Kato, Kohsuke)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90466673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、VprBP複合体によるヒストンH1ユビキチン化の核内反応における機能の解析を通して、ヒストンH1ユビキチン化によるゲノム安定性制御機構を解明することを目的とした。VprBPの発現抑制により、細胞にDNA損傷の集積とS期後期からG2期での細胞周期停止が誘導された。またVprBPは、ヒストンH1依存的に活性化型E2F遺伝子、および相同組換え修復関連遺伝子群の転写伸長の促進に関与することが明らかとなった。以上の結果より、VprBPによるヒストンH1ユビキチンは、G1-S遺伝子群の転写制御を介してゲノム安定性維持に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aim of this research is to reveal the molecular mechanism of genome maintenance through the VprBP-mediated histone H1 ubiquitination. Depletion of VprBP caused the accumulation of DNA damage and cell cycle arrest at late S-G2 phase in cells. We found that VprBP is involved in transcription elongation of activating E2F and homologous recombination-repair genes in histone H1-dependent manner. These results raise a possibility that VprBP-mediated histone H1 ubiquitination is involved in genome maintenance through the transcriptional regulation of genes activated in cell cycle G1-S phases.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム安定性 ヒストンH1 ユビキチン クロマチン G1-S遺伝子群 転写

## 1. 研究開始当初の背景

(1)DNA複製やDNA修復におけるクロマチン構造制御機構の破綻は、染色体異数化や染色体転座などのゲノム不安定化を引き起こし、細胞のがん化などの原因となる。クロマチン構成タンパク質の1つであるリンカーヒストン H1 は、高次クロマチン構造の形成に関わると考えられており、DNA修復や組換えなどの核内反応を介してゲノム安定性制御に関わると考えられているが、その制御因子とメカニズムの実体は明らかでない。

(2)質量分析法によるヒストン H1 結合因子の網羅的解析を行ったところ、Cullin4 E3 ユビキチンリガーゼ複合体中で基質認識サブユニットとして機能することが知られている VprBP を新規のヒストン H1 結合因子として同定した。ヒストン H2A をはじめとするコアヒストン種のユビキチン化は、DNA修復をはじめとする多くの核内反応において重要ことが知られている。しかしヒストン H1 のユビキチン化は、質量分析により存在が確認されているにも関わらず、その生理機能はほとんど明らかでない。

## 2. 研究の目的

VprBP 複合体によるヒストン H1 ユビキチン化の核内反応における機能の解析を通して、ヒストン H1 ユビキチン化によるゲノム安定性制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1)VprBP によるヒストン H1 ユビキチン化のメカニズムを、哺乳類細胞での発現系ならびに siRNA を用いた遺伝子発現抑制法を用いて解析する。また、ヒストン H1 の変異体を用

いて、VprBP によりユビキチン化されるアミノ酸を同定する。

(2)哺乳類細胞において VprBP とヒストン H1 の発現抑制を行い、VprBP によるヒストン H1 ユビキチン化に関わる DNA 修復や転写などの核内反応を明らかにする。また、それに伴う細胞内表現型について、細胞増殖やゲノム安定性への影響などを中心に解析する。

## 4. 研究成果

(1)VprBP によるヒストン H1 ユビキチン化機構の解析

細胞内において実際に VprBP がヒストン H1 のユビキチン化に関与するかを検証した。ヒト腎臓由来 HEK293T 細胞にヒストン H1.2、ユビキチンおよび VprBP を遺伝子導入により過剰発現させ、ヒストン H1 を免疫沈降により調製し解析したところ、VprBP の共発現により、ヒストン H1.2 のモノあるいはヘテロユビキチン化が促進された(図1)。また逆に siRNA を用いて VprBP の発現を抑制したところ、ヒストン H1.2 のユビキチン化がほとんど見られなくなった。さらにヒストン H1.2 のユビキチン化がプロテアソーム系によるタンパク質分解に関与するかについて、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて解析したところ、MG132 によって細胞内にポリユビキチン化されたタンパク質が集積するにも関わらず、ヒストン H1.2 タンパク質量に変化は見られなかった。以上の結果より、VprBP は細胞内でヒストン H1 のユビキチン化に関与し、またそれはプロテアソームによる分解とは異なる機能を担うことが明らかとなった。

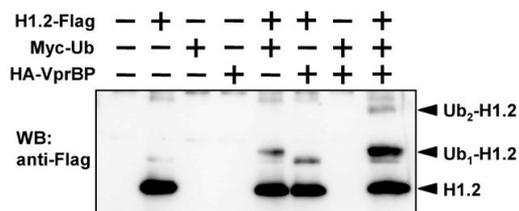


図1: VprBPによるヒストンH1ユビキチン化の促進  
293T細胞に各発現ベクターをパネル上の組み合わせでトランスフェクションした。抗Flag抗体で免疫沈降後、抗Flag抗体でウェスタンブロットを行なった。ユビキチン化ヒストンH1がSDS-PAGE上でシフトしたバンドとして検出された。

VprBP 依存的にユビキチン化されるヒストン H1 のアミノ酸部位を、ヒストン H1 のリシン残基をアルギニン残基に置換した点変異体を用いて解析した。その結果、ヒストン H1 の N 末端側テイル領域内にある 17 番目のリシン残基が VprBP による主なユビキチン化部位であることが明らかとなった。また同じく N 末端テイル領域にある 34 番目のリシンも、マイナーなユビキチン化サイトである可能性が示唆された。ヒストン H1 の N 末端テイル領域は、ユビキチン化に限らずアセチル化やメチル化など多くのエピジェネティックな転写制御に関わる修飾が起こることが知られており、VprBP によるユビキチン化もまたエピジェネティックマークの 1 つとして機能しうる可能性が考えられる。

#### (2)siRNA を用いた VprBP およびヒストン H1 による核内反応制御機構の解析

ヒト骨肉種由来 U2OS 細胞において siRNA による VprBP の発現抑制を行い、表現型解析を行った。その結果、DNA 複製の異常と S 期後期から G2 期における細胞周期の停止が観察された。これは、すでに報告されている知見とも合致する。さらに  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いた免疫染色および FACS 解析により、VprBP の発現を抑制した細胞では、S 期後期から G2 期

にかけて DNA 損傷が蓄積することが明らかとなった。以上の結果より、VprBP は DNA 複製ならびに DNA 複製後の DNA 修復に関わる可能性が示唆された。これまでに DNA 損傷部位において、E3 ユビキチン化酵素である RNF8 および RNF168 により、ヒストン H2A および H2AX が高度にユビキチン化され、これが相同組換え関連因子など DNA 修復に関わる因子のリクルートに重要な事が明らかとされている。また、本研究課題の進行中に、DNA 損傷部位において RNF8 によるヒストン H1 ユビキチン化が促進され、これが RNF168 のリクルートに関与することが報告された。VprBP によるヒストン H1 のユビキチン化も RNF8 と同様の機能を示すかを検証するため、トポソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシンなどで細胞に DNA 損傷を誘導し、DNA 損傷部位へ VprBP が集積するかを免疫染色により検証した。その結果、RNF8 および RNF168 は高度に DNA 損傷部位に集積するのに対し、VprBP ではそのような様子は観察されなかった。また VprBP の発現抑制は、RNF8 および RNF168 の DNA 損傷部位への集積に影響を与えなかった。以上の結果より、VprBP は DNA 損傷部位で促進されるヒストン H1 のユビキチン化には積極的に関与せず、異なるメカニズムで DNA 損傷修復に関与する可能性が示唆された。

細胞周期の S 期後期から G2 期においては、複製後の DNA 修復に相同組換え修復系が重要な役割を果たしている。そこで、VprBP の発現抑制が相同組換え修復関連因子に与える影響について、免疫染色法およびウェスタンブロットングにより検証した。その結果、VprBP の発現抑制により、Rad51 のタンパク

質発現量が高度に減少した。さらに、VprBPの発現抑制により Rad51 のみならず BRCA1 などの相同組換え修復に関連する遺伝子群の転写量が軒並み低下している様子が観察された。これらの結果より、VprBP は相同組換え修復に関連する遺伝子群の転写促進を介して、DNA 損傷の抑制または修復に関わる可能性が示唆された。またこれら相同組換え修復に関連する遺伝子群の転写は、ヒストン H1.2 の発現抑制によっても低下した。この結果より、ヒストン H1.2 はこれら遺伝子群の転写活性化に関わる可能性が示唆された。

Rad51 や BRCA1 などの相同組換え修復に関連する遺伝子は、細胞周期の G1 期から S 期にかけて転写される G1-S 遺伝子群に含まれる。活性化型 E2F と呼ばれる E2F1、E2F2 および E2F3 は、G1-S 期遺伝子群の転写活性化に関わる主要な転写因子である。そこで、VprBP およびヒストン H1 がこれら活性化型 E2F 遺伝子の転写制御に関わるか検証した。その結果、VprBP およびヒストン H1.2 の発現抑制により、E2F1 と E2F2 の転写量の減少が観察された(図2)。また VprBP の発現抑制による E2F 転写量の減少は、ヒストン H1.2 の発現抑制によって減弱化された。これらの結果より、VprBP はヒストン H1.2 依存的に活性化型 E2F の転写活性化に関わることが明らかとなった。さらにクロマチン免疫沈降法により、E2F1 遺伝子領域での RNA ポリメラーゼ II の結合量を検証した。その結果 VprBP の発現抑制により、RNA ポリメラーゼ II の結合量は転写開始点付近で増加し、反対に遺伝子コーディング領域で減少した。これらの結果より、VprBP はヒストン H1 依存的に E2F1 遺伝子の転写伸長制御に関わる可能性が示唆さ

れた。

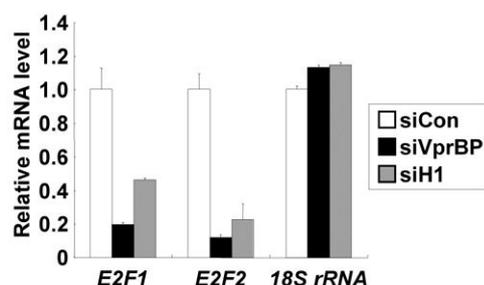


図2: VprBPおよびヒストンH1の発現抑制による活性化型E2F転写量の減少。各siRNAをトランスフェクションしたU2OS細胞よりtotal RNAを調製、Q-RT-PCRを行なった。siConはコントロールのsiRNAを示す。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

加藤広介、永田恭介、ヒストン H1 ユビキチン化による G1-S 遺伝子群の転写制御、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1、神戸国際会議場(神戸)

Kohsuke Kato、Kyosuke Nagata、Involvement of histone H1 ubiquitination in post-replicative chromatin maintenance、Asian Conference of Transcription、2014.2.21、Melbourne, Australia

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 広介 (KATO, Kohsuke)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：90466673