

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24118003

研究課題名(和文) 遺伝子転写再構築系による転写サイクル制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of transcriptional cycle regulation via in vitro reconstitution

研究代表者

伊藤 敬 (ITO, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：90306275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 152,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンH2AのC末端リン酸化が癌細胞において亢進していることを明らかにした。このリン酸化はVRK1により触媒されることを証明した。VRK1をノックダウンするとCyclinD1の発現が低下し、癌細胞増殖は低下する。CyclinD1のプロモーター領域ではVRK1の局在とヒストンH2AのC末端リン酸化を認めた。これらの所見はヒストン修飾酵素の異常が癌化を引き起こすエピジェネティックなメカニズムを証明したものである。

大熊らは、自然免疫に関わるTLR9活性化にメディエーターが重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、基本転写因子TFIIEの結晶構造を決定した。

研究成果の概要(英文)： We found that histone H2A Thr 120 is phosphorylated in human cancer cell lines and proved that H2A Thr 120 phosphorylation is catalyzed by hVRK1. By knocking down VRK1, cyclin D1 was found to be down-regulated by loss of H2A Thr120 phosphorylation and increased H2A Lys119 ubiquitylation of its promoter region resulted in impaired cell growth. In vivo, we identified that histone H2A is hyper-phosphorylated with up-regulated cyclin D1 in human gastrointestinal tract cancer tissues. In vitro, mutated H2A Thr 120 Asp that mimics phosphorylation transformed NIH3T3 cells. This suggested that histone H2A Thr 120 hyper-phosphorylation by hVRK1 causes inappropriate gene expression including up-regulated cyclin D1, resulting in carcinogenesis.

Ohkuma et al determined TFIIE structure using X-ray crystallography. They demonstrated that Mediator is functioning by activating essential genes using kinase module.

研究分野：生化学

キーワード：クロマチン ヒストン 癌化 メディエーター TFIIE

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞は遺伝情報を安定に保ち、正確に発現し、細胞分化を維持するため、多彩な機構を働かせている。その中の1つがクロマチンと呼ばれる DNA 高次構造である。クロマチン構造の最小単位はヌクレオソーム構造で、ヌクレオソームはゲノムにおける様々な生物学的現象に伴い、ダイナミックに変化する。

我々は遺伝子転写の際に、ヌクレオソームが、その構成成分であるコアヒストンのアセチル化により流動化することを明らかにした (Genes Dev 14: 1899-1907, 2000)。コアヒストンの修飾にはアセチル化に加え、ユビキチン化、リン酸化やメチル化等が知られ、その実体と生物学的な意義が国内外でしのぎを削り研究されている。我々は特にヒストンのリン酸化とユビキチン化、メチル化による遺伝子発現の調節に焦点を絞っている。ヒストンのアセチル化及びメチル化は遺伝子発現の共役因子として働くことが示されたが、詳細な調節の機構はいまだに未知の部分が多い。この研究の目的は、転写サイクルでの機能制御機構におけるヒストンの翻訳後修飾とクロマチン構造の役割を解明し、それらが引き起こす生命現象を明らかにすることである。

一方ヒトなどの高等真核生物では、細胞の分化・脱分化は少数の転写因子により決定される。その際には、これら転写因子と転写を行う RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の間を仲介し、遺伝子発現シグナルを Pol II に伝えるメディエーター複合体と、Pol II を遺伝子プロモーター上で補助し、正確で効率的な転写を開始させ、伸長段階へと誘導する基本転写因子が重要な役割を果たしている。研究分担者、大熊らは Pol II による転写サイクル前半のこれらの過程に関わるメディエーターと基本転写因子の中で Pol II の転写開始の引き金を引き、伸長への移行のスイッチを入れる役割を果たしている TFIIIE について解析していく。

## 2. 研究の目的

遺伝子転写再構築系により転写サイクルによる遺伝子転写開始機構を明らかにする。特にヒストンの翻訳後修飾とクロマチン構造と転写の間のクロストークを解明することによって、生体内での転写サイクルと生命現象との接点を探る。

(1) 転写サイクルにおいてダイナミックに変化するヒストン翻訳後修飾がクロマチン構造変換と遺伝子転写開始のネットワーク制御機構に与える影響を *in vitro* 再構築系にて明らかにする。

(2) RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が構成する転写開始複合体と転写制御因子を橋渡しするメディエーター複合体、これと相互作用するタンパク因子及びその標的遺

伝子を同定、解析することにより、転写サイクル内でのメディエーター複合体が引き起こす転写活性化と抑制のスイッチ機構を解明する。

(3) 領域全体での共同研究により、試験管内で明らかにした機構をゲノムワイドの機構に対比させ、生理現象との関連を解析する。

## 3. 研究の方法

本研究は転写サイクルとしてのヒストン翻訳後修飾の相互クロストーク、転写調節因子および共役因子による遺伝子転写開始機構の解明、ネットワーク制御により引き起こされる生命現象の解明を目的として以下の研究を計画している。

(1) ヒストン H2A 脱ユビキチン化とヒストン H3K4 メチル化のクロストークの機構を明らかにする。(2) ヒストン H3K4 メチルによる遺伝子転写開始制御機構を明らかにする。(3) 転写活性化クロマチンリモデリング SWI/SNF 型複合体を形成する Brg1 と転写活性化の際のメディエーター複合体の協調機構を解明する。(4) 培養細胞にヒストン翻訳後修飾を模倣した変異ヒストンを導入し表現型を調べる。

(5) NHK-1, USP21 のノックアウトマウスを作成する。(6) ヒストン翻訳後修飾を模倣した変異ヒストンを導入した遺伝子改変マウスを作製しその影響を調べる。(7) ヒトメディエーターに関しては、キナーゼモジュールの CDK8 と CDK19 という2つのキナーゼの活性を調べるため、キナーゼモジュールを生化学的に再構成し、それらの制御標的と機能を解析する。また、細胞の分化の際に、これら CDK や他のサブユニットがどのような機能をしているか、これらのメディエーターサブユニットを siRNA によりノックダウンして解析した。(8) 基本転写因子 TFIIIE については、ヒト TFIIIE を大腸菌で発現し、精製後、結晶構造を X 線で決定した。また、 $\alpha$  と  $\beta$  の各サブユニットの欠失および点変異体を用いて、その転写機能と Pol II や他の基本転写因子との相互作用の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝子転写再構築系及びがん細胞を用いてヒストンのリン酸化が癌化を引き起こすことを明らかにした。我々はヒストン蛋白の翻訳後化学修飾の中でも特にリン酸化に注目しヒストン H2A の C 末端リン酸化が種々の癌細胞において亢進していることを明らかにした。これらのリン酸化は我々が同定したショウジョウバエ NHK-1 のヒトホモログ VRK1 により触媒されることを証明した。培養細胞を用いてヒストンリン酸化酵素である

VRK1 をノックダウンすると種々の遺伝子発現が低下し癌細胞増殖も低下する。複数の細胞で共通して発現が低下し、癌細胞増殖と関連し癌遺伝子と考えられているものとして CyclinD1 を見いだした。CyclinD1 の遺伝子発現を調節するプロモーター領域では VRK1 の局在とヒストン H2A の C 末端リン酸化を認めた。ヒストン H2A の C 末端リン酸化の癌化への役割を明らかにするため、ヒストン H2A Thr120 をリン酸化トレオニンの模倣であるアスパラギン酸で置換し NIH3T3 に導入し高発現とした。変異ヒストンの発現は NIH3T3 を悪性転化トランスフォームすることを明らかにした。これらの所見はヒストン修飾酵素の異常が癌化を引き起こすエピジェネティックなメカニズムを証明したものである(Aihara et al, Mol Cell, 2017)。

(2)TLR9 刺激による炎症遺伝子転写活性化へのメディエーターCDK サブユニットの関与

自然免疫機能は、多細胞真核生物に備わっている生体防御機構において重要な役割を果たしている。我々は以前、免疫応答遺伝子の転写の際、メディエーターキナーゼの CDK8 と CDK19 がヒストンアルギニンメチルトランスフェラーゼ PRMT5 をリクルートすることで転写を抑制していることを示した(Tsutsui et al., *J. Biol. Chem.* 288, 20955-20965,2013)。そこで、バクテリアやウイルスの感染の際に、その防御に関わる Toll 様受容体 9(TLR9)の CpG オリゴによる活性化に伴う炎症遺伝子活性化の際に、転写活性化に関わることが知られている NFκB と C/EBPβと共にメディエーターの CDK8/19 がいかに挙動するか調べた。

まず、細胞としては、ミエローマ由来の RPMI8226 細胞が最もよく自然免疫に反応すること、特に TLR9 に対する反応性が高いことがわかった。そして炎症性遺伝子としては *IL8*, *IL10*, *PTX3* の 3 遺伝子が特に CpG に対する反応性が良いため、これらを用いて解析を進めた。まず siRNA を用いて CDK8 と CDK19 がこれらの遺伝子の発現に及ぼす影響を調べたところ、*IL10* と *PTX3* は CDK8 の関与が強かったが、*IL8* は両方の CDK が、同程度に反応した。次に、これらの遺伝子上でのこれらタンパク因子の挙動を ChIP アッセイにより調べたところ、いずれの遺伝子でも転写因子はプロモーター近傍に CpG オリゴ特異的に誘導されたが、CDK8 の関与の強い *IL8* では CDK8 がより強くプロモーターに結合しており、一方 *IL10*, *PTX3* では CDK8 と CDK19 は同程度に CpG によりプロモーターに誘導された。以上からこの反応における CDK8/19 の関与が示された(Yamamoto et al., *Genes Cells*, 22, 265-276, 2017)。

(3)基本転写因子 TFIIE 構造と機能の解明  
基本転写因子 TFIIE は、Pol II の転写開始と開始から伸長への移行段階で機能する。今回、この TFIIE の両サブユニットの結晶構造が決定できた。TFIIE は 2 つのサブユニットが直線状につながり、Pol II の上顎とクランプと呼ばれる口の形を形成する領域を跨ぐように結合し、Pol II が転写を開始する際の構造変化を誘導する。今回の我々の構造決定により、この構造が原子レベルで決定され、その機能メカニズムが詳細に理解できるようになった(Miwa, et al., *J. Mol. Biol.* 428, 4258-4266, 2016)。

## 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 11 件 )

(1) Yamamoto, S., Hagihara, T., Horiuchi, Y., Okui, A., Wani, S., Yoshida, T., Inoue, T., Tanaka, A., Ito, T., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF-κB and C/EBPβ on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes Cells*, 22, 265-276, 2017. ( 査読有 ) DOI:10.1111/gtc.12475

(2) Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Abratani H, Takayama K, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T. 2016. Histone H2A T120 phosphorylation promotes oncogenic transformation via upregulation of cyclin D1. *Mol Cell* 63:176-188. ( 査読有 ) DOI:10.1016/j.molcel.2016.09.012

(3) Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus W. L., Ueda H, Ito T. 2016. SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. *Scientific reports* 6: 20179. ( 査読有 ) DOI:10.1038/srep20179

(4) Miwa, K., Kojima, R., Obita, T., Ohkuma, Y., Tamura, Y., and Mizuguchi, M. Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIE at Atomic Resolution. *J. Mol. Biol.* 428, 4258-4266, 2016. ( 査読有 ) DOI:10.1016/j.jmb.2016.09.008

(5) Wani, S., Sugita, A., Ohkuma, Y., and Hirose, Y. Human SCP4 is a chromatin-associated CTD phosphatase and exhibits the dynamic translocation during erythroid

differentiation. *J. Biochem.* 160, 111-120, 2016. (査読有) DOI:10.1093/jb/mvw018

(6) Inoue D, Aihara H, Sato T, Mizusaki H, Doiguchi M, Higashi M, Imamura Y, Yoneda M, Miyanishi T, Fujii S, Okuda A, Nakagawa T, Ito T. 2015. Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. *Scientific reports* 5: 16567. (査読有) DOI:10.1038/srep16567

(7) Nakagawa T, Ikehara T, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Yoneda M, Ito T. 2015. Enhancer of Acetyltransferase Chameau (EACHm) Is a Novel Transcriptional Co-Activator. *PLoS One* 10: e0142305. (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0142305

(8) Samson M, Jow MM, Wong CC, Fitzpatrick C, Aslanian A, Saucedo I, Estrada R, Ito T, Park SK, Yates JR, 3rd et al. 2014. The Specification and Global Reprogramming of Histone Epigenetic Marks during Gamete Formation and Early Embryo Development in *C. elegans*. *PLoS Genet* 10: e1004588. (査読有) DOI:10.1371/journal.pgen.1004588

(9) Okuda H, Ohdan H, Nakayama M, Koseki H, Nakagawa T, Ito T. 2013. The USP21 Short Variant (USP21SV) Lacking NES, Located Mostly in the Nucleus In Vivo, Activates Transcription by Deubiquitylating ubH2A In Vitro. *PLoS One* 8: e79813. *PLoS One*. 2013 Nov 22;8(11):e79813. (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0079813

(10) Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., Vidal, M., Bernstein, B.E., and Koseki, H. (2012). Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. *PLoS Genet* 8, e1002774. (査読有) DOI:10.1371/journal.pgen.1002774

(11) Whitcomb, S.J., Fierz, B., McGinty, R.K., Holt, M., Ito, T., Muir, T.W., and Allis, C.D. (2012). Histone Monoubiquitylation Position Determines Specificity and Direction of Enzymatic Cross-talk with Histone Methyltransferases Dot1L and PRC2. *J Biol Chem* 287, 23718-23725. (査読有) DOI:10.1074/jbc.M112.361824

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 伊藤 敬、ヒストン H2A T120 のリン酸化はサイクリン D1 発現促進により癌化を引き起こす。第39回日本分子生物学

学会年會；2016年11月30日～12月2日、パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

(2) Yoshiaki Ohkuma, Takahide Nakamura, Yusuke Akimoto, Mizuki Fukuoka, Kumiko Sogawa, Yutaka Hirose, Aki Tanaka. Dynamic Switch Mechanism of RNA Polymerase II by General Transcription Factor TFIIE from Transcription Initiation to the Transition Step from Initiation to Elongation. 第39回日本分子生物学会(シンポジウム3AS10 Approaches for Dynamic Regulations of Eukaryotic Gene Expression) 2016年11月30日～12月2日、パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

(3) 中村考秀、田中亜紀、福岡瑞希、廣瀬豊、大熊芳明。基本転写因子TFIIEによる転写開始から伸長への移行の制御機構解析。第39回日本分子生物学会、2016年11月30日～12月2日、パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

(4) 杉田愛、柳澤奈月、石黒尋保、田淵圭章、大熊芳明、廣瀬豊。リン酸化CTD結合因子PCIF1による遺伝子発現調節機構。第39回日本分子生物学会、2016年11月30日～12月2日、パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

(5) 藤田智陽、安倍光姫、山崎愛実、深澤力也、廣瀬豊、大熊芳明。ヒトメディエーター複合体Kinaseモジュール構成サブユニットCDK8/19の新規結合因子の同定。第39回日本分子生物学会、2016年11月30日～12月2日、パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

(6) 林裕人、深澤力也、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明。メディエーター複合体と神経細胞分化の関係。第89回日本生化学会大会 2016年9月25日～9月27日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

(7) 土井口 真康、中川 武弥、伊藤 敬、SMARCD1はATP依存的なクロマチンリモデリング因子でCBPによるヒストンアセチル化を刺激し転写を亢進する、BMB2015 (第38回日本分子生物学会年會、第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015年12月1日～4日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(8) Hirofumi Mizusaki, Hitoshi Aihara, Takashi Ito, Histone H2A Thr 120 phosphorylation results in cancer via up regulation of Cyclin D1, 第37回日本分子生物学会年會The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan日程; 2014年11月25日～27日、パシフィック横浜(神奈川県横浜市)

(9) Hirofumi Mizusaki, Hitoshi Aihara, Takashi Ito, Histone H2A Thr 120 phosphorylation results in cancer via up regulation of Cyclin D1, Cold Spring Harbor

Laboratory Meeting & Courses Epigenetics & Chromatin September 9 – September 13, 2014, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

(10) Hitoshi Aihara, Hirofumi Mizusaki, Takeya Nakagawa, Takashi Ito, Histone H2A Mutation Might Play Roles in Carcinogenesis, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting & Courses Epigenetics & Chromatin September 9 – September 13, 2014, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

(11) Takashi Ito, ATP-Dependent Stimulator of Nucleosomal Histone Acetylation (ASNA) plays a role in transcriptional regulation together with CBP/p300. 第36回日本分子生物学会年会、The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan日程; 2013年12月3日～6日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計3件)

(1) 相原仁、伊藤敬、(分担執筆) 4章ヒストンアセチル化・ユビキチン化「遺伝子発現制御機構」田村隆明・浦聖恵編著、東京化学同人、35-45、2017年

(2) 大熊芳明、エネルギー代謝とメディエーター複合体、実験医学別冊「遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル」編集：矢作直也、110-118、2016年

(3) Mizusaki H, Aihara H, Ito T. 2014. Histone Phosphorylation and Chromatin Dynamics. Fundamentals of Chromatin: 341-354. DOI:10.1007/978-1-4614-8624-4\_8

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 敬(ITO, Takashi) 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  
研究者番号：90306275

(2) 研究分担者

大熊 芳明(OHKUMA, Yoshiaki)長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員  
研究者番号：70192515

広瀬 豊(HIROSE, Yutaka)富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授  
研究者番号：00218851