

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21770181

研究課題名（和文） ヒストンアセチル化を介した転写調節の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of transcriptional regulation via histone acetylation

研究代表者

福田 綾 （ FUKUDA AYA ）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：50436276

研究成果の概要（和文）：当研究では、クロマチンを構成するヒストンの修飾と遺伝子の転写調節との関連を明らかにするため、クロマチン転写に必要な因子の特定を進めるとともに、ヒストンアセチル化を介した転写活性化メカニズムについて解析を行ってきた。その結果、ヒト培養細胞（HeLa）の核抽出液中にクロマチン転写に必要な活性を複数検出し、候補分子を同定した。また、アセチル化部位を欠失させたヒストン変異体を用いてクロマチンを再構成し、転写反応を行ったところ、複数の変異体で転写活性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To understand molecular mechanisms of transcriptional regulation via histone modifications, I have tried to identify the molecule(s) that is required for transcription from the chromatin template and have been focusing histone acetylation to analyze the relationship between histone modifications and transcriptional regulation. Using a purified in vitro transcription system, multiple chromatin transcription-enabling activities were identified in HeLa nuclear extract-derived fractions. Also, some of the acetylation-deficient mutants of histone H3 or H4 showed different transcription activity from the wild-type histone, suggesting that acetylation of the specific sites is important for transcriptional regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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、クロマチン、ヒストン、アセチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) クロマチン転写に必要な因子について

細胞内の遺伝子発現はおもに転写の段階で行われる。転写を行う RNA ポリメラーゼは、クロマチン構造に折たたまれた DNA 中の遺伝子を転写しなければならず、その過程には多くの因子を必要とする。これまでに、複数の研究グループによりクロマチンを鋳型とした *in vitro* 転写システムが構築され、クロマチン上での転写に必要な因子が単離、同定されてきた。しかし、これらの研究で用いているクロマチン再構成系や転写システムはさまざまで、クロマチン上での転写に本当に必要な因子を特定することが困難である。またクロマチン再構成や転写反応に細胞抽出液などを用いた系もあり、夾雑物の影響も否めない。これらの研究を踏まえ、近年、さらに精製されたクロマチン再構成系と転写系を用いた解析が行われ、転写伸長因子 TFIIS がクロマチン上での転写に必要な因子として報告された。当研究ではこれらの結果をもとに、精製した組換えタンパク質を用いて再構成したクロマチンを鋳型にし、精製度の高い再構成転写システムで転写反応を行ったが、我々の再構成転写システムに TFIIS を加えただけでは転写産物が検出されなかった。しかし、HeLa 細胞核抽出液由来の粗画面分を加えると転写産物が検出されたことから、この画分にクロマチン転写に必須の未知の因子が含まれることが示唆された。

(2) ヒストンアセチル化について

最近、ヒストンの修飾と転写制御との関係が盛んに研究され、遺伝子の転写活性とヒストン修飾の関連が明らかにされるとともに、ヒストン修飾酵素あるいは修飾残基を認識する因子などが数多く同定されている。なかでもヒストンのアセチル化は転写活性化に重要な修飾で、ヒストン H3 および H4 の N 末端リシン残基のアセチル化が GAL4-VP16 による転写活性化に必要であることが明らかにされているが、アセチル化残基の機能に

ついてはまだよく分かっていない。

2. 研究の目的

(1) 真核生物の RNA ポリメラーゼが、クロマチンという複雑な構造上でどのように転写調節を行っているのかを分子レベルで明らかにするため、クロマチン上での転写反応に必要な因子を同定する。

(2) アセチル化されることが知られているヒストン H3 および H4 の N 末端リシン残基のうち、転写活性化に重要な残基を決定する。次に、ヒストンのアセチル化を介した転写活性化の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) クロマチン転写に必須な因子の同定

精製度の高い *in vitro* クロマチン転写システムを用いて、クロマチン転写に必須な因子の精製と同定を行う。当研究では、*in vitro* で再構成したクロマチンを鋳型に用い、基本転写因子やこれまでに報告されたコアクチベーター等を用いて転写反応を行ったが、既知の因子のみでは転写産物が検出されず、HeLa 細胞核抽出液由来の粗画面分を加えることによりクロマチン上での転写産物が検出された。これは、この画分にクロマチン転写に必須な未知の因子が含まれていることを示唆する。この画分をさらに精製し、活性を担う因子をマスマスペクトロメトリーによって同定する。同定した因子は、昆虫細胞あるいは大腸菌を用いて組換えタンパク質を作製し、活性を確認する。

(2) 転写活性化におけるヒストンアセチル化の機能解析

転写活性化に必要なリシン残基を詳細に同定するため、ヒストン H3 の N 末端リシン残基 (K9, K14, K18, K23) およびヒストン H4 の N 末端リシン残基 (K5, K8, K12, K16) を変異させた組換えヒストンを作製し、それぞれの変異ヒストンを用いたクロマチ

ンを再構成して転写反応を行う。複数のリシン残基のアセチル化が転写活性化に必要な場合、一残基ずつの変異体では部分的な影響しか見えない可能性もある。この場合は、変異による影響が見られたリシン残基を同時に破壊し、転写活性への影響を調べる。また、マイクロコッカルスクレアーゼアッセイにより、リシン残基の変異がクロマチン構造に影響するかどうかを確認する。次に、アセチル化リシン残基を介した転写活性化メカニズムを明らかにするため、特異的に結合するタンパク質を探索する。これには、アセチル化ヒストンを用いて再構成したクロマチンあるいはアセチル化リシンを含む合成ペプチドをビーズに固定化し、HeLa 細胞核抽出液などと混合して特異的な結合タンパク質を検出する。また、そのタンパク質が物理的および機能的に相互作用する他の因子についても調べ、転写活性化メカニズムの解明につなげる。さらに、同定したアセチル化リシン結合タンパク質の細胞内での機能を調べるため、RNAi によるノックダウン実験を行い、マイクロアレイなどで遺伝子発現に与える影響について検討する。また、ChIP assay により、転写が活発な遺伝子上でのヒストンのアセチル化状態、およびアセチル化リシン結合タンパク質の結合の分布などについて解析する。

4. 研究成果

(1) 当研究では、アセチル化をはじめとするヒストン修飾を介した転写活性化機構を解析するため、再構成したクロマチンを鋳型に用いた *in vitro* 転写システムを構築した。クロマチン再構成には大腸菌で発現させたヒストンと鋳型 DNA、ヒストンシャペロン NAP-1、クロマチンリモデリング因子 ACF、Topo-I を用い、マイクロコッカルスクレアーゼアッセイにより規則正しいクロマチンができていることを確認した。次に、このクロマチンを鋳型に用い、基本転写因子 (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIF, TFIIF, TFIIF, TFIIF)、RNA ポリメラーゼ II、Mediator、TFIIS、ヒスト

ンアセチル化酵素 p300、アセチル CoA、アクチベーター GAL4-VP16 存在下で *in vitro* 転写反応を行ったところ、これらの因子のみでは転写が全く起こらなかった。しかし、ここに HeLa 細胞の核抽出液を陽イオン交換セルロース P11 で粗分画したフラクションを加えると、アクチベーターおよび p300 依存的な転写がみられ、クロマチン転写に必要な未知の因子が HeLa 細胞の核抽出液中に存在することが示唆された。クロマチン上での転写制御を分子レベルで解析するためには、この未知分子を同定することが必須であると考え、イオン交換カラムなどを用いて精製を進め、クロマチン転写に必要な複数の活性を検出した。これらのうち、いくつかの候補分子をマスマスペクトロメトリーにより同定した。同定した分子の cDNA を HeLa 細胞から調製し、組換えバキュロウイルスを作製して昆虫細胞で組換えタンパク質を発現させた。このタンパク質分子を精製し、転写活性を調べたが、鋳型クロマチンからの転写はほとんど検出されなかった。精製過程で活性に必要な他の分子が失われ、今回同定した分子のみでは活性が見られなかった可能性もあるので、さらに詳細に解析を進めている。

(2) 転写活性化に関わるヒストンアセチル化部位を調べるため、アセチル化されることが知られるヒストン H3 および H4 のリシン残基をアルギニン残基に変えた変異体を作製し、クロマチンを再構成した。ヒストン H3 の 9,14,18,23,27 番目のリシン残基を同時に変異させたものはほとんどアセチル化されず、この変異体を含む鋳型クロマチンからの転写活性化も見られなかった。一方、ヒストン H4 の 5,8,12,16 番目のリジン残基の変異は転写にほとんど影響しなかった。個々のリジン残基の変異による転写への影響について調べるため、各残基を一つずつ変異させた組換えヒストンを作製し、*in vitro* でクロマチンを再構成した。マイクロコッカルスクレアーゼアッセイの結果、一部の変異体にお

いてクロマチン構造の規則性が低下した。また、これらのヒストン変異体を含むクロマチンを用いて転写反応を行ったところ、転写活性に影響がみられるものがあった。このことから、既知のアセチル化部位のうち、一部のリシン残基の修飾が転写活性化に重要な役割を担っていることが示唆された。

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2件)

- ① Shimada M, Nakadai T, Fukuda A, Hisatake K.
“cAMP-response element-binding protein (CREB) controls MSK1-mediated phosphorylation of histone H3 at the c-fos promoter in vitro”
J. Biol. Chem. 285 (13), 9390-9401, 2010 (査読有)
- ② Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Hisatake K.
“Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R enhances transcription from the naturally configured c-fos promoter in vitro”
J. Biol. Chem. 284 (35), 23472-23480, 2009 (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① Fukuda A, Takeuchi M, Nakadai T, Shimada M, Hisatake K
“Mechanistic analysis of c-fos transcriptional regulation by a novel coactivator hnRNP R”
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月8日(神戸)
- ② Nakadai T, Fukuda A, Takeuchi M, Shimada M, Hisatake K
“Mechanistic analyses of

transcriptional regulation of the c-fos gene via the NF complexes”
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月7日(神戸)

- ③ Hisatake K, Takeuchi M, Nakadai T, Shimada M, Fukuda A
“Mechanism of c-fos transcriptional regulation by an RNA-binding protein, hnRNP R”
Leading Graduate Schools International Conference、2010年11月1日(つくば)
- ④ Hisatake K, Takeuchi M, Nakadai T, Shimada M, Fukuda A.
“Mechanism of c-fos transcriptional regulation by an RNA-binding protein hnRNP R”
ASBMB Special Symposia
“Transcriptional Regulation by Chromatin and RNA Polymerase II, Granlibakken Resort, Tahoe City, USA, 2010年9月30日～10月4日
- ⑤ Fukuda A, Takeuchi M, Nakadai T, Shimada M, Hisatake K.
“Mechanistic analysis of c-fos transcriptional regulation by a novel coactivator hnRNP R”
9th EMBL Conference Transcription and Chromatin, EMBL Heidelberg, Germany, 2010年8月28日～31日
- ⑥ Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Hisatake K.
“Transcriptional regulation of c-fos gene via RNA binding proteins”
第33回日本分子生物学会年会、2009年12月9日～12日(横浜)
- ⑦ Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Hisatake K.
“RNA binding proteins regulate the c-fos transcription”
Cold Spring Harbor Laboratory meeting on “Mechanisms of Eukaryotic

Transcription” , New York,

2009年8月25日～29日

- ⑧ Fukuda A, Nakadai T, Shimada M,
Hisatake K.

“Transcriptional Regulation by RNA
Binding Proteins”

日本生化学会関東支部例会, 2009年6
月20日(つくば)

[図書] (計1件)

- ① 福田 綾、久武幸司 「目的別で選べる
タンパク質発現プロトコール」(「昆虫細
胞」の項)
実験医学別冊 2010, 58-65, 120-144、
羊土社

[その他]

ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 綾 (FUKUDA AYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
助教

研究者番号 : 50436276