

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17054032

研究課題名（和文） ヒストン蛋白質修飾によるクロマチン構造変換機構

研究課題名（英文） Post-translational histone modification and chromatin structure

研究代表者

氏名 伊藤 敬 (ITO TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90306275

研究成果の概要（和文）：

真核細胞の核内ではゲノム DNA は様々な蛋白と相互作用しクロマチンを形成する。クロマチンテンプレートは遺伝子転写開始、伸長を抑制する。アセチル化、メチル化、ユビキチン化など様々なヒストン翻訳後修飾は遺伝子転写、修復、複製と関連している。このプロジェクトでは新奇のヒストン脱ユビキチン化酵素 USP21 を同定した。さらに USP21 は脱ユビキチン化、ヒストンのメチル化、転写活性化と進むカスケードによって遺伝子転写を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In the eukaryotic nucleus, genomic DNA interacts with numerous proteins to form chromatin. Packaging of the template into chromatin appears to affect all stages of transcription, including initiation and elongation. Diverse histone modifications, such as acetylation, methylation and ubiquitylation have been linked to the regulation of cellular activities such as transcription, repair and replication. In this project we clarified unique histone deubiquitylase USP21. USP21 hydrolyzes isopeptide bond between histone H2A and ubiquitin. We identified that USP21 activate transcription through histone modification cascade that connects deubiquitylation of ubiquitylated histone H2A, histone H3 K4 methylation and subsequent transcriptional activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	20,300,000	0	20,300,000
2006年度	22,300,000	0	22,300,000
2007年度	22,100,000	0	22,100,000
2008年度	21,900,000	0	21,900,000
2009年度	21,600,000	0	21,600,000
総計	108,200,000	0	108,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：DNA 高次構造、アセチル化、エピジェネティクス、クロマチン、ヌクレオソーム、ヒストン、ユビキチン化、リン酸化、遺伝子転写

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の核内では遺伝子転写、複製など様々な生物学的現象がおきている。細胞は遺伝情報を、安定に保ち、正確に発現すなわち細胞分化を維持するために、多様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とよばれる構造で、この構造は遺伝子上での様々の生物学的現象とともに、ダイナミックに変化している。この研究の目的は、遺伝子転写や分化の調節機構を解明することである。最近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で流動化することを明らかにしてきた (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、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。ヒストンのメチル化は細胞情報の長期記憶と関連し、最近脚光をあびて来ている。我々はこれらヒストンのメチル化酵素活性を増強させる活性ヒストンメチル化増強因子 Enhancer of core histone methylation (EHM) を見出し部分的に精製した。この活性はクロマチンの存在下でヒストン H3 のメチル化を増強する。ヒストンのメチル化が細胞の分化と密接に関連している事よりこのヒストンのメチル化を増強させる因子は細胞の分化を調節する可能性がある。

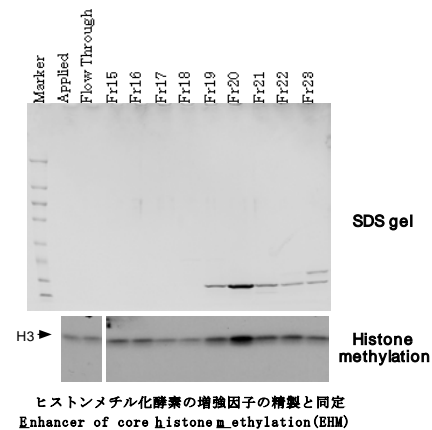
2. 研究の目的

- (1) ヒストンのメチル化による遺伝子発現の調節などの生物学的現象を解析する。
- (2) リン酸化、ユビキチン化、メチル化などの翻訳後修飾間のクロストークと生物学

的な意義を明らかにする

3. 研究の方法

ヒストンメチル化増強因子の同定方法ヒストンメチル化増強因子 Enhancer of core histone methylation (EHM) の部分精製と活性を図に示す。この活性はクロマチンの存在下でヒストン H3 のメチル化を増強する。ヒストンのメチル化はクロマチンを鋳型としてトリチウムラベルの S-adenosyl-methionine を基質として反応させ検出する。反応後 SDS gel 電気泳動を行いフルオログラフィーにより検出する。ヒストンのメチル化が細胞の分化と密接に関連している事よりこのヒストンのメチル化を増強させる因子は細胞の分化を調節する可能性がある。このような活性は未だ報告されておらず、機能ドメイン検索などではゲノム情報から見つける事は不可能でアッセイを指標とした精製によってのみ同定する事ができると考える。



図ヒストンメチル化増強因子 Enhancer of core histone methylation (EHM) はクロマチンとヒストンメチル化酵素の存在下でヒストン H3 のメチル化を増強する新規の活性を持っている。現在精製をさらに進め蛋白を同定中である。性的のある分画を同定する。活性のある分画をさらにカラムクロマトグラフィーにより分画を続けていく。

たんぱく質の同定

活性のあるたんぱく質の同定はSDS電気泳動の後、エドマン分解法や質量分析法で同定する。

活性の解析

精製したたんぱく質が長期記憶などに関与していないかまたは肝臓再生などの現象と関連していないか調べる。肝臓再生においてはマウス70%肝切除モデルを用いて解析する。肝切除前後でヒストンのユビキチン化リン酸化メチル化を免疫染色、Westernブロット、Chip assay などにより調べる。

肝臓再生とクロマチン翻訳後修飾

肝臓再生は劇的な遺伝子転写の変化を引き起こす。肝切除後の遺伝子発現を発現マイクロアレイにて調べる。肝切除前と切除後3, 6, 12, 18時間の肝臓を回収し遺伝子変化とクロマチン中のヒストンの翻訳後修飾を調べる。さらにChip assayにより遺伝子転写と局所の変なkを明らかにする。

4. 研究成果

2005年;核細胞の核内では遺伝子転写、複製など様々な生物学的現象がおきている。細胞は遺伝情報を、安定に保ち、正確に発現すなわち細胞分化を維持するために、多様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。平成17年度は細胞核の遺伝情報の収納と発現のメカニズムに焦点をあて、クロマチン中のコアヒストン蛋白質修飾と遺伝子発現制御との関連、および機構の一端を明らかにした。すなわち試験管内で構築したクロマチンを用いてクロマチン中のヒストンのみをリン酸化する酵素NHK-1を発見した。この酵素はH2A

のC末端の119番目トレオニンのみをリン酸化を導入する(Genes Dev 18:877-888, 2004)。このキナーゼは生物種間でも保存されており重要な酵素とリン酸化部位であると考えられる。さらにこのリン酸化酵素が減数分裂において重要な働きをしていることを見出した(Genes Dev 19:2571-82, 2005)またH2A118番目、119番目のアミノ酸の翻訳後修飾に着目し、ヒストンH3のメチル化と両者がクロストークしている事を明らかにした。またリン酸化酵素NHK-1はヒトがん細胞においても増殖に重要な役割をしており、H2AのC末端リン酸化部位の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。今後も引き続きクロマチン構造変換の生物学的意義を構造機能の面から明らかにしていく。

2006年;遺伝子転写の制御機構にクロマチン中ヒストンの翻訳後修飾が重要であることが明らかにされてきた。翻訳後修飾によるDNA高次構造変換の観点から遺伝子転写や分化の調節機構の一端を解明した。我々の見つけたリン酸化酵素NHK-1はヒストン単独では活性を全く示さないが、クロマチン中のヒストンは強くリン酸化する。さらにこのリン酸化酵素はヒストンH2AのC末端119番目のトレオニンを選択的、特異的にリン酸化する。ヒストンH2Aユビキチン化とヌクレオソーム特異的ヒストンリン酸化酵素Nucleosome Specific Histone Kinase-1(NHK-1)のクロストークを中心に解析した。ヒストンは非特異的なリン酸化の基質にも使われ程リン酸化されやすい蛋白であるが、申請者が同定したリン酸化酵素NHK-1は遊離のヒストンは全くリン酸化しないが、リコンビナントNAP-1とリコンビナントACFでクロマチンを形成するとヌクレオソーム中のヒストンをリン酸化する。さらに基質特異性が強くH2A119番目

のトレオニンのみをリン酸化する。しかし H2A118 番目リジンのユビキチン化を伴うとこのリン酸化は完全に抑制された。H2A118 番目リジンのユビキチン化に対する抗体を作成し、免疫沈降するとこのユビキチン化は遺伝子転写抑制と密接に関係していることが明らかとなった。さらに試験管内遺伝子転写実験によりユビキチン化が遺伝子転写を抑制することを明らかにした。

2007 年 ; 細胞核の遺伝情報の取納と発現のメカニズムに焦点をあて、クロマチン中のコアヒストン蛋白質修飾と遺伝子発現制御との関連、および機構の一端を明らかにした。我々が発見したクロマチン中のヒストンのみをリン酸化する酵素 NHK-1 は H2A の C 末端の 119 番目トレオニンのみをリン酸化を導入する (Genes Dev 18:877-888, 2004)。2007 年度はリン酸化酵素 NHK-1 による遺伝子発現の調節などの生物学的現象を解析し他のヒストン修飾である H2A の C 末端の 118 番目リジンのユビキチン化とのクロストークを明らかにした。またこれらの修飾はヒストン H3 のメチル化に影響することにより遺伝子転写開始を調節することを明らかにした (Genes Dev 22:37-49, 2008)。

2008 年 ; 肝臓再生のモデルを用いてヒストンの翻訳後修飾と生物学的な現象の関連を明らかにした。肝臓は再生を始めると、肝細胞クロマチン中のヒストンのユビキチン化は減少する。遺伝子発現マイクロアレイを用いてこの脱ユビキチン化と関連した脱ユビキチン化酵素 USP21 を同定した。この脱ユビキチン化酵素 USP21 は肝切除後遺伝子転写の上昇する遺伝子プロモーター領域の脱ユビキチン化を促進することにより遺伝子転写を調整していることを明らかにした。肝臓再生

は劇的な遺伝子変化を伴いこれらの遺伝子変化は肝臓の再生に重要であることが推察される。この酵素 USP21 による遺伝子転写機構の解明は USP21 を標的とした創薬にも応用できると考える。

2009 年 ; 2008 年の研究をさらに発展させ、肝臓再生のモデルを用いてヒストンの翻訳後修飾と遺伝子転写、生物学的な現象の関連を明らかにした。肝臓再生後転写が上昇する遺伝子プロモーター領域においては、USP21 によるプロモーター領域の脱ユビキチン化が引き起こされる。引き続き脱ユビキチン化はヒストン H3 メチル化酵素 MLL3 によるヒストン H3K4 のメチル化を許容する。ユビキチン化ヒストンは MLL3 の基質にならないが脱ユビキチン化ヒストンは MLL3 の基質になることを試験管内の実験により明らかにした。これらのクロストークによりカスケードが形成され、肝再生に必要な遺伝子転写がプロモーター領域の脱ユビキチン化により開始される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

Sawatsubashi, S., Murata, T., Lim, J., Fujiki, R., Ito, S., Suzuki, E., Tanabe, M., Zhao, Y., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., Umetsu, D., Ito, T., Takeyama, K., Kato, S., 2010. A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev* 24: 159-170.

Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M., and Ito, T. 2008. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev* 22(1): 37-49.

Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K., and Kamiya, K. 2007. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* 27(20): 7028-7040.

Brittle, A.L., Nanba, Y., Ito, T., and Ohkura, H. 2007. Concerted action of Aurora B, Polo and NHK-1 kinases in centromere-specific histone 2A phosphorylation. *Exp Cell Res* 313(13): 2780-2785.

Ito, T. 2007. Role of histone modification in chromatin dynamics. *J Biochem (Tokyo)* 141(5): 609-614.

Okii, M., Aihara, H., and Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem* 41, 319-336.

Ito, K., Nakajima, Y., Onohara, Y., Takeo, M., Nakashima, K., Matsubara, F., Ito, T., and Yoshimoto, T. 2006. Aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from *Escherichia coli*: Crystal structure and conformational change of the methionine 260 residue involved in substrate recognition. *J Biol Chem* 281(44): 33664-33676.

Jin, C., Kato, K., Chimura, T., Yamasaki, T., Nakade, K., Murata, T., Li, H., Pan,

J., Zhao, M., Sun, K., Chiu, R., Ito, T., Nagata, K., Horikoshi, M., and Yokoyama, K.K. 2006. Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nature Structural & Molecular Biology* 13(4): 331-338.

Ito, K., Nakajima, Y., Xu, Y., Yamada, N., Onohara, Y., Ito, T., Matsubara, F., Kabashima, T., Nakayama, K., and Yoshimoto, T. 2006. Crystal structure and mechanism of tripeptidyl activity of prolyl tripeptidyl aminopeptidase from *Porphyromonas gingivalis*. *J Mol Biol* 362(2): 228-240.

Cullen, C.F., A.L. Brittle, T. Ito, and H. Ohkura. 2005. The conserved kinase NHK-1 is essential for mitotic progression and unifying acentrosomal meiotic spindles in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 171: 593-602. 2006JCR IF 10.152

Furumatsu, T., M. Tsuda, K. Yoshida, N. Taniguchi, T. Ito, M. Hashimoto, and H. Asahara. 2005. Sox9 and p300 Cooperatively Regulate Chromatin-mediated Transcription. *J Biol Chem* 280: 35203-8.

Ivanovska, I., T. Khandan, T. Ito, and T.L. Orr-Weaver. 2005. A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila oocytes*. *Genes Dev* 19: 2571-82.

Saeki, H., K. Ohsumi, H. Aihara, T. Ito, S. Hirose, K. Ura, and Y. Kaneda. (2005) Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5697-702.

Nakajima, Y., Ito, K., Xu, Y., Yamada, N., Onohara, Y., Ito, T., and Yoshimoto, T. 2005. Crystallization and preliminary X-ray characterization of prolyl tripeptidyl aminopeptidase from *Porphyromonas gingivalis*. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61(Pt 12): 1046-1048.

〔学会発表〕 (計 4 件)

第 82 回日本生化学会大会

1S11p-1 ヒストン翻訳後修飾と遺伝子転写
伊藤敬 2009年10月21日 神戸

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生
化学会大会 合同大会

1S4-4 Histone modification and Transcriptional
Regulation Takashi Ito, 2008年12月9日 神戸

第30回 日本分子生物学会年会

第80回 日本生化学会大会 合同大会

2W8-1 ヒストン蛋白修飾と遺伝子転写 伊
藤 敬 (長崎大学医学部)

2007年12月11日-15日 横浜

第48回 日本組織細胞化学会総会、第39回日
本臨床分子形態学会総会

S1-0 2 ヒストン蛋白修飾によるクロマチ
ン構造変換機構 伊藤 敬

2007年9月28日 山梨

[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

氏名 伊藤 敬 (ITO TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90306275

(2) 研究分担者

氏名 中川 武 弥 (NAKAGAWA TAKEYA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：50363502

(3) 研究分担者

氏名 難波 泰明 (NANBA YASUAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90444869

(4) 研究分担者

氏名 水崎博文 (MIZUSAKI HIROFUMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40467957