

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390077  
 研究課題名（和文）ヒストン H2A 脱ユビキチン化酵素による遺伝子転写制御機構の解明  
 研究課題名（英文）Mechanisms of transcriptional regulation by histone H2A specific deubiquitylase  
 研究代表者  
 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：

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。H2A の 118 番目のリジン残基はユビキチン化されることが 30 年前に明らかにされている。われわれは今回の研究により、この H2A118K のユビキチン化が H3K4 のメチル化とクロストークすることにより遺伝子転写開始を調節していることを明らかにした

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：クロマチン、遺伝子転写、ヒストン、翻訳後修飾、ユビキチン化

## 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。この研究の目的は、遺伝子転写や分化の調節機構におけるクロマチン構造の役割を解明することである。

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による遺伝子発現の調節に焦点をしばっている。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、他の修飾に関しては、いまだに未知の部分が多い。

我々は粗な核内抽出液の中に、新奇ヒストンのリン酸化酵素活性を発見し、同定、クローニングを行ない、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)と命名した ( Genes Dev 18: 877-888, 2004 )。ヒストンは非特異的なリン酸化の基質に用いられ、リン酸化されやすい蛋白であるが、申請者が発見したリン酸化酵素 NHK-1 は遊離のヒストンは全くリン酸化しないが、いったん組換え NAP-1 と 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 H 2 A 119 番目のトレオニンのみを特異的にリン酸化する。H 2 A の C 末端はドッキングドメインと呼ばれヌクレオソームがさらに高次の構造をとるときに重要な部位である。

ショウジョウバエNHK-1のヒトホモログはVRK-1と命名されていたが、H2Aキナーゼとしての機能は明らかにされていなかった。我々はヒトNHK-1ホモログをノックアウトした時にどのような表現形が出るか調べる予定である。ヒトH2Aの120番目のトレオニンのリン酸化フォームに対する抗体を作成し、癌細胞を染色してみると特に大腸癌で高率に染色されることを明らかにした。さらにショウジョウバエの体細胞分裂および減数分裂期においてもこのリン酸化部位が重要な働きをしていることを明らかにし

た ( Genes Dev 19: 2571-2582, 2005, J Cell Biol 171: 593-602, 2005 )。

## 2 . 研究の目的

H 2 A 119 番目のトレオニンのリン酸化と H2A の 118 番目のリジン残基はユビキチン化の翻訳後修飾の生物学的意義とその機構を明らかにすることが目的である。

H 2 A の C 末端はドッキングドメインと呼ばれヌクレオソームがさらに高次の構造をとるときに重要な部位である。一方、興味深いことに H2A の 118 番目のリジン残基はユビキチン化されることが30年前に明らかにされている。図 1 にヒストン H2A C 末端の配列と生物種間の比較を示す。しかしこのユビキチン化の意義は蛋白破壊の標的ではなく遺伝子転写に関連があると予想されているが、いまだに決め手となる証拠はない。われわれはこの H2A 118 番目と 119 番目のアミノ酸の翻訳後修飾に着目し、両者の生物学的意義を構造機能の面から明らかにすることを目的とする。

<i>D. melanogaster</i>	H2A	95	LLSGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTEKKA*
<i>H. sapiens</i>	H2A	96	LLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK*
<i>M. musculus</i>	H2A	96	LLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTESHHKAKGK*
<i>X. Laevis</i>	H2A	96	LLGRVTIAQGGVLPNIQSVLLPKKTESSKSAKSK*
<i>C. elegans</i>	H2A	97	LLAGVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKGGGKE*
<i>S. cerevisiae</i>	H2A.1	97	LLGNVTIAQGGVLPNIHQNLLPKKSAKATKASQEL*

図 1:ヒストン H 2 A の C 末端は 119 番目のトレオニンまで生物種間でよく保存され重要な働きをしていることが予想される。118 番目(ヒトでは 119)のリジンはユビキチン化される。

### 3. 研究の方法

我々が同定した肝臓切除後再生肝臓特異的な遺伝子発現を示す脱ユビキチン化酵素として同定した USP21 の脱ユビキチン化酵素活性がヌクレオソーム中のヒストンに特異的であるのか、また USP21 の活性の強さ、キネティクス、ヌクレオソームに対する親和性などを中心に生化学的手法により解析した。

ヌクレオソームに対する特異性の検索として、遊離のヒストンとヌクレオソームを基質にしたときの酵素活性を比較する。さらに疎抽出液を基質として USP21 と反応させ、反応産物を抗ユビキチン化抗体によるウエスタンブロッティングで解析し、変化するバンドがヒストン以外にも存在するか否かを検索した。これらの研究により特異性を解析できたと考える。

USP4 は USP21 と同様に再生肝臓特異的な遺伝子発現を示す脱ユビキチン化酵素として同定した。USP4 の基質は未知であり、疎抽出液を基質として USP4 と反応させ、反応産物を抗ユビキチン化抗体によるウエスタンブロッティングで解析し、変化するバンドを疎抽出液中より基質の候補として検出する。変化するバンドの検出が可能であれば、USP4 による脱ユビキチン化の基質をカラムクロマトグラフィーにより分画・同定を試みた。

ユビキチン化 H2A は蛋白質破壊の標的ではなく遺伝子転写との関連が示唆されているが明らかな証明は未だにない。近年、クロマチン中のヒストン蛋白の翻訳後修飾と、遺伝子転写を含む様々な生物学的現象との関連が明らかにされてきている。さらにヒストン中の種々の翻訳後修飾が相互に影響しあう現象、すなわちヒストンコードのクロストークが明らかにされてきた。これらの可能性を確認するため予備実験として H2A のユビキチン化と他の翻訳後修飾とのクロストークを検索した。

H2A ユビキチン化部位の C 末端に位置するトレオニンの NHK-1 によるリン酸化とクロストークすることを明らかにした。興味あることに H2A とは異なった別のヒストンである H3 の 4 番目のリジンのメチル化にも影響することも明らかにした。すなわち H2A ユビキチン化はヒストン H3 の 4 番目のリジンのメチル化酵素を抑制した。H3 の 4 番目のリジンのメチル化は活性化クロマチンと密接に関係していることが明らかになっている翻訳後修飾である。この申請の研究手法としてこれらのクロストークが実際どのようにして引き起こされているのかを生化学的手法により解析した。

### 4. 研究成果

ヒト NHK として試験管内で形成したヌクレオソームを基質として高次構造特異的に H2AC 末端の 119 番目トレオニンのみにリン酸化を導入する酵素 VRK-1 を見つけた。このキナーゼは生物種間でも保存され、重要な酵素とリン酸化部位であると考えられる (Genes Dev 18: 877-888, 2004; Genes Dev 19: 2571-2582, 2005; J Cell Biol 171: 593-602, 2005; 一部未発表)。

ヒストン H2A119 番目トレオニンのリン酸化は 118 番目のリジンのユビキチン化とクロストークし生物学的に興味深いことを示した (Nature 準備中)。

ヒストン H2A118 番目のリジンのユビキチン化はヒストン H3K4 のメチル化とクロストークし遺伝子転写開始を制御していることを明らかにした (Genes Dev 22: 37-49, 2008)。

ヒストン H3K4 メチル化は *in vitro* において遺伝子転写開始に必須であることを示した (図 2 参照)。

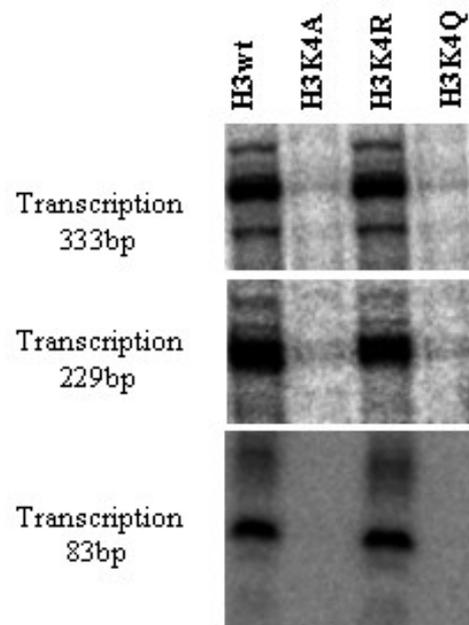


図 2 : ヒストン H3 の K4 (4 番目リジン) と転写活性化

H3wt では転写反応液中において K4 がメチル化され転写反応は進行する。アラニンやグルタミンに変換すると転写反応が抑制される。電荷的にメチル化リジンを模倣するアルギニンに変換すると転写反応は進行する。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1) 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. 2005JCR IF 15.610

[査読あり]

2) 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. 2006JCR IF 6.773[査読あり]

3) 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. 2006JCR IF 3.777 [査読あり]

4) Ito, T. 2007. Role of histone modification in chromatin dynamics. *J Biochem (Tokyo)* 141(5): 609-614. 2005JCR IF 1.827 [査読あり]

5) Oki, M., Aihara, H., and Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin

dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem* 41, 319-336.

〔学会発表〕(計4件)

1)細胞核ダイナミクスとRNA(1) 内藤カンファレンス2008年 6月24~27日

Session C: Chromatin structure and Histone Modifications during Transcription

Chair Takashi Ito & William Lee Kraus

Oral presentation

Histone modification and Transcriptional Regulation  
Takashi Ito

Poster Session

2)Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics

Hirofumi Mizusaki<sup>1</sup>, Hitoshi Aihara<sup>1</sup>, Haruhiko Koseki<sup>2</sup>, Masami Muramatsu<sup>3</sup>, Takashi Ito<sup>1</sup>

Department of Biochemistry, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Nagasaki, Japan<sup>1</sup>, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Suehiro, Yokohama, Japan<sup>2</sup>, Saitama Medical School Research Center for Genomic Medicine, Hidaka, Saitama, Japan<sup>3</sup>

3) ATP-Dependent Stimulator of Nucleosomal Histone Acetylation (ASNA) modifies H2A during Transcriptional Activation

Masamichi Doiguchi<sup>1</sup>, Takeya Nakagawa<sup>1</sup>, Hitoshi Ueda<sup>2</sup>, Masami Muramatsu<sup>3</sup>, and Takashi Ito<sup>1</sup>

Department of Biochemistry, Nagasaki University of Medicine, Nagasaki, Japan1. The Graduate School of Natural Science and Technology and Department of Biology, Faculty of Science, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama, Japan2. Saitama Medical School Research Center for Genomic Medicine, Hidaka, Saitama, Japan3.

4 ) Keystone Symposia 2008 Regulatory Mechanisms in Eukaryotic transcription (Kevin Struhl, and John T. Lis) Keystone Resort Keystone, Colorado

Poster Session 2

Takeya Nakagawa, Takuya Kajitani, Shinji Togo, Norio Masuko, Hideki, Ohdan, Yoshitaka Hishikawa, Koji Takehiko, Toshifumi Matsuyama, Tsuyoshi Ikura, Masami Muramatsu and Takashi Ito,

Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone crosstalk with H3K4 di- and tri-methylation.

〔図書〕（計0件）

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

該当なし

取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6 . 研究組織

研究代表者伊藤敬が研究総括し、研究分担者中川武弥と協力してUSP21のキネティックスおよび特異性を検索した。さらに研究代表者伊藤敬が研究分担者中川武弥、研究分担者難波泰明と協力してUSP21と遺伝子転写との関連を検索し、合わせてUSP21の基質の解析を行った。

### (1)研究代表者

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

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

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