

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710216

研究課題名(和文) ヒストンリン酸化とユビキチン化による転写制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the transcriptional mechanism regulated by H2A phosphorylation and ubiquitylation

研究代表者

相原 仁 (AIBARA, HITOSHI)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80587717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、VRK1がヒストンH2A 120番目スレオニンをリン酸化すること、転写制御においてこのリン酸化が119番目リジンのユビキチン化と相互に拮抗して機能することをin vitroで証明してきた。しかし、この拮抗作用の実在や分子メカニズムは不明である。本研究で我々は、VRK1によるH2Aリン酸化で転写が活性化され、H2Aユビキチン化で抑制される標的遺伝子を同定した。標的遺伝子の一つであるサイクリンD1の過剰発現が、VRK1ノックダウンによる細胞増殖低下を部分回復できることから、VRK1のH2Aリン酸化によるサイクリンD1転写制御が細胞増殖・癌化の引き金となることが推測される。

研究成果の概要(英文)：We have found that 120th threonine of histone H2A (H2A-T120) is phosphorylated by VRK1 in human cancer cell lines. We have also demonstrated that H2A-T120 phosphorylation and mono-ubiquitylation of 119th lysine (H2A-K119) are mutually inhibitory and this mutual inhibition functions at transcriptional regulation in vitro. However, the existence of this mutual inhibition in vivo and the molecular mechanism are still unknown. In this study, we identified direct target genes that are activated by VRK1-mediated H2A-T120 phosphorylation, and are conversely repressed by H2A-K119 ubiquitylation. Overexpression of CyclinD1, one of these direct target genes, can rescue a growth defect caused by VRK1 knockdown. Our results suggest that transcriptional regulation of CyclinD1 gene by VRK1-mediated H2A-T120 phosphorylation is a key regulator to control cell growth and trigger tumorigenesis.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学 ゲノム生物学

キーワード：エピゲノム ヒストン修飾 転写制御

1. 研究開始当初の背景

(1) NHK-1 キナーゼの発見と NHK-1 ファミリーの機能的役割

我々は、ヌクレオソーム特異的にクロマチンに結合してショウジョウバエヒストン H2A の 119 番目スレオニン(dH2A-T119)をリン酸化するキナーゼ Nucleosomal Histone Kinase-1 (NHK-1) をショウジョウバエ胚を用いて生化学的に精製・同定した(Aihara et al., 2004)。dH2A-T119 のリン酸化が分裂期を通じて顕著に観察されるのに一致して、NHK-1 は、細胞分裂の初期に核内に集積し、(Aihara et al., 2004) 分裂期の進行・促進に必須であると考えられる(Cullen et al., 2005)。また NHK1 は、核内クロマチン DNA と核膜の相互作用を仲介する Barrier to autointegration factor (BAF)をリン酸化し、このリン酸化によって BAF とクロマチン DNA の相互作用が弱まり、核膜崩壊が促進される事が、ショウジョウバエ、線虫、哺乳類培養細胞で証明されている(Nichols et al., 2006, Gorjanacz et al., 2007, Molitor and Traktman 2014)。他方、NHK-1 による H2A リン酸化は、糖新生などの遺伝子発現に関与する(我々のグループによる出芽酵母のリン酸化部位変異体を用いた発現マイクロアレイ解析、未発表データ)。また NHK-1 キナーゼファミリーおよび H2A リン酸化部位は、進化上高度に保存されており、ヒストンコード仮説に基づく普遍的なエピジェネティック制御因子であると考えられる。

(2) 生殖細胞分化や減数分裂過程における NHK-1 および H2A リン酸化の役割

ショウジョウバエ NHK-1 変異体では、卵細胞減数分裂過程において、H2A リン酸化の消失にともない、シナプトネマ構造の異常や染色体凝縮・分配に必須なコンデンシン複合体の染色体への集積が損なわれることから(Ivanovska et al., 2005)、NHK-1 による H2A リン酸化が減数分裂における染色体の安定維持へ関与することが推察される。もう一方で、NHK-1 哺乳類オースログである VRK1 の遺伝子破壊マウスは不妊であり、精原細胞数の著しい減少が観察されている(Wiebe et al., 2010)。精原細胞、減数分裂、精子形成過程で働く複数の遺伝子の発現異常が観察されているが(Choi et al., 2010) これらの遺伝子発現制御の分子メカニズムは不明であり、VRK1 機能の解明に至っていない。我々のグループは独自に、野生型マウスの精巣では、他の組織と比較して、H2A の 120 番目スレオニン(H2A-T120; dH2A-T119 と同部位)のリン酸化が高レベルであるという興味深い結果を得ており、VRK1 による H2A-T120 リン酸化が転写をコントロールする、その制

御機構が、生殖系列細胞の増殖・分化に必須であると推測される(図4)。

2. 研究の目的

(1) 本研究開始以前に我々のグループは、VRK1 が H2A-T120 をリン酸化することを、*in vitro* リン酸化アッセイ(塩透析法によりプラスミド DNA と精製ヒストンから作製したヌクレオソームを基質とし、VRK1 は HeLa 細胞から精製したものをを用いる)や siRNA による VRK1 のノックダウンにより証明し、H2A のリン酸化模倣変異体が、NIH3T3 細胞のトランスフォーム活性を持ち、ヌードマウスを用いて腫瘍形成能を有することを発見している。また、H2A-T120 のリン酸化が、隣 119 番目リジン残基(H2A-K119)のユビキチン化を抑制することも *in vitro* の生化学的アッセイにより証明している。以前我々は、このユビキチン化が、転写活性化のマークであるヒストン H3 の 4 番目リジン(H3-K4)のメチル化を抑制し、USP21 酵素によって、H2A-K119 が脱ユビキチン化されると H3-K4 がメチル化されて転写活性を促進することを証明している(Nakagawa et al., 2008)。

(2) 上記の研究結果から、私は、**VRK1 による H2A-T120 のリン酸化が転写を活性化する、一方 H2A-K119 のユビキチン化が不活性化に働き、両者の相互拮抗作用によって転写状態が調節・維持され生殖細胞の増殖・分化が調節され、これらの調節破綻が、癌化や不妊の原因である**という仮説(図4)をたて、実証することを最終目標とした。本研究では、まず H2A-T120 リン酸化および H2A-K119 ユビキチン化の転写制御メカニズムを培養細胞で明らかにすること、さらに vrk1 ノックアウトマウスを用いて精子形成異常の原因を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) siRNAによりVRK1をノックダウンし、遺伝子発現マイクロアレイ解析により、VRK1 の標的遺伝子の候補をリストアップする(データは研究開始前に得られていた)。クロマチン免疫沈降および次世代シーケンサーを用いた解析(ChIP-seq)により、VRK1 のクロマチン結合領域、H2A リン酸化およびユビキチン化領域をゲノムワイドスケールで同定する。の統合解析により、VRK1によって直接転写制御される標的遺伝子を同定し、転写が制御される領域、段階を予測し、転写の分子メカニズムを解析する。

(2)(1)のマイクロアレイ解析から、染色体分配に必要な構成因子や細胞周期の進行に関与する遺伝子群がVRK1標的候補である

と考えられたため、これら遺伝子の転写が、VRK1 によるH2A-T120 リン酸化によって細胞周期でどのように正確に制御されているか、また細胞分裂後にこれらヒストン修飾が親細胞から娘細胞へどのように伝播・維持されるかを調べるため、細胞周期の各時期に同調させた細胞を用いてChIP解析を行う。

(3) VRK1 によるH2A-T120 リン酸化がどのように転写活性化へ導くかを説明するため、仲介因子(図4)を想定し、タグをつけたVRK1 融合タンパク質を培養細胞で発現させ、アフィニティー精製により、VRK1 結合因子の精製同定と機能解析を行う。

(4) 仮説に基づき、VRK1 によるH2A-T120 リン酸化に対して拮抗的に働くH2A-K119 コピキチン化酵素(H2A-HUB)や、逆に協調的に働く脱コピキチン化酵素(H2A-DUB)を同定するため、siRNAによるH2A-HUBやH2A-DUBのノックダウンおよびRT-qPCRを用いて、VRK1標的遺伝子への影響を調べる。

(5) vrk1ノックアウトマウスにおいて、生殖細胞形成過程のどの段階で異常が観察されるか、各分化マーカーを指標に特定し、クロマチン形態レベルの異常も検討する。またこのマウスを用いたゲノムワイドスケールのCistrome解析(RNA-seqおよびChIP-seq)により、生殖系列細胞におけるVRK1 が転写をコントロールする標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) Cistrome 解析を用いた VRK1 標的遺伝子の同定

HeLa 細胞などに比べて H2A-T120 リン酸化状態が高い HT1080(ヒト繊維腫由来)および MDA-MB-231(ヒト乳がん由来)細胞を用いて遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。その結果、siRNA による VRK1 の発現抑制によって、発現が低下した 40 以上の遺伝子を同定した。次に HT1080 細胞を材料に、H2A-T120 リン酸化、H2A-K119 コピキチン化、および VRK1 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った結果、VRK1 標的候補遺伝子領域における VRK1 の結合が確認でき、かつ siVRK1 処理によって H2A-T120 リン酸化レベルが低下する遺伝子を同定した。このリン酸化レベルの低下は遺伝子領域の広範にわたって見られるものもあるが、転写開始点に限って低下して見られる遺伝子もあった。VRK1 標的遺伝子の代表的な例として、細胞増殖・細胞周期制御のキーレギュレーターであるサイクリン D1 遺伝子の ChIP-seq 解析結果を図 1 に示す。VRK1 のクロマチン結合領域と H2A-T120 のリン酸化領域のオーバーラップを確認した(図 1 上 2 段および中段)。また siVRK1 処理サンプルでは、オ

ーバーラップする領域の H2A-T120 リン酸化のシグナルが低下することから、VRK1 が直接 H2A をリン酸化することを強く示唆される(これと同じ傾向が認められる遺伝子を 15 以上同定している)。さらに、それら遺伝子のうち、リン酸化 H2A-T120 のシグナルが強い領域ではコピキチン化 H2A-K119 のシグナルが弱く、また siVRK1 処理によってそのパターンが逆転する遺伝子を 5 つ同定した(図 1 下 2 段)。

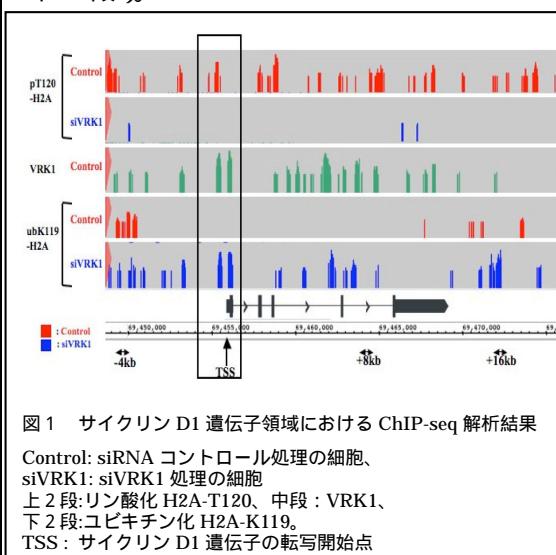


図 1 サイクリン D1 遺伝子領域における ChIP-seq 解析結果

Control: siRNA コントロール処理の細胞、
siVRK1: siVRK1 処理の細胞
上 2 段:リン酸化 H2A-T120、中段: VRK1、
下 2 段:コピキチン化 H2A-K119。
TSS: サイクリン D1 遺伝子の転写開始点

以上の結果は、研究目的の項目 2 - (2) に記した仮説: H2A-T120 リン酸化と H2A-K119 コピキチン化の相互拮抗作用による転写制御を支持する。

VRK1 および H2A-T120 リン酸化の標的遺伝子として同定したサイクリン D1 遺伝子は、多くの癌細胞において発現の異常亢進が観察されており、癌治療標的として注目されている (Musgrove et al., 2011)。一方で我々は、VRK1 を過剰発現させると細胞増殖率は上昇し、siVRK1 処理すると低下するという結果を得ている。そこで以下の発展的実験を行った。サイクリン

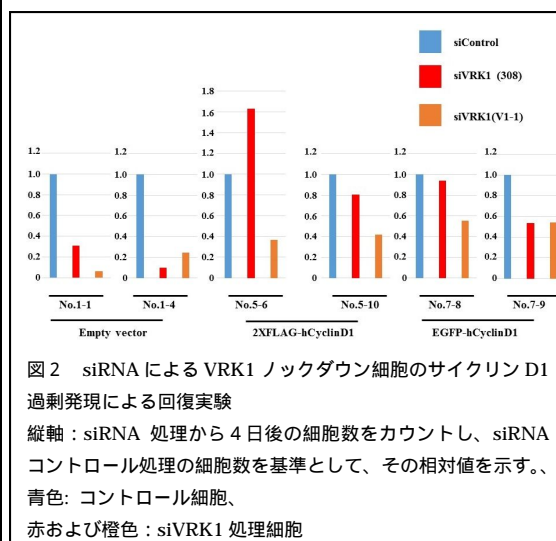


図 2 siRNA による VRK1 ノックダウン細胞のサイクリン D1 過剰発現による回復実験

縦軸: siRNA 処理から 4 日後の細胞数をカウントし、siRNA コントロール処理の細胞数を基準として、その相対値を示す、
青色: コントロール細胞、
赤および橙色: siVRK1 処理細胞

D1 を安定的に発現する細胞株を作製し、これに siVRK1 処理を行うと、コントロールの細胞に比べて、siVRK1 処理により低下する細胞増殖率が、サイクリン D1 の発現によって、完全ではないが部分的に回復した (図 2)。この結果から、VRK1 の H2A-T120 リン酸化によるサイクリン D1 遺伝子の転写活性化が細胞増殖コントロールのメインストリームであると推測される

(2) VRK1 標的遺伝子領域における H2A-T120 リン酸化動態および遺伝子発現の細胞周期的制御の解析

HT1080 細胞をダブルチミジンブロック法を用いて G1/S 境界に同調し、リリース後のタイムコース実験を行った。まずイムノプロット解析によって、VRK1 の発現レベルは細胞周期を通じて一定であり、H2A-T120 リン酸化は G1 では低レベルであり、S 期に中程度レベルになり、G2 初期でもう一度低レベルになり、M 期に高レベルになることが判明した。次に、ChIP 解析により、個々の VRK1 標的遺伝子領域における H2A-T120 リン酸化レベルを各周期時期で比較した結果、おおむねイムノプロットと同様の結果 (つまり調べたどの遺伝子でも M 期に H2A-T120 リン酸化レベルが高い) を得た。当初、サイクリン D1 などの M 期で発現レベルが低い遺伝子においては、その遺伝子の発現レベルがピークの G1/S 期に H2A-T120 リン酸化レベルも高いことを予想していた。これは、M 期特異的な Bub1 キナーゼによって H2A-T120 がリン酸化されていると推測され、このリン酸化が VRK1 によるものか、Bub1 によるものか見分けをつけることができないため、これ以上の解析は困難であると結論づけた。しかしながら、G1 および S 期における H2A-T120 リン酸化レベルは、siVRK1 処理によって低下するため、このリン酸化は VRK1 によるものであると考えている。

(3) VRK1 結合因子の精製・同定

VRK1 タンパク質の N 末端に Flag やヒスチジンタグを付加した融合タンパクを HeLa 細胞や HT1080 細胞で発現させ、VRK1 複合体をアフィニティー精製し、候補となるペプチドの同定を進めていたが、精製した VRK1 の H2A-T120 リン酸化活性が著しく低い、さらにこれらのタグをつけた VRK1 を HT1080 細胞に過剰発現させても siVRK1 による細胞増殖低下を回復できないなどの問題から、以下のように原因究明を行った。まず内在性の VRK1 を精製するため、N 末端のペプチドを認識する抗体を用いて免疫沈降し、VRK1 を N 末端ペプチドで溶出し、この各分を用いてキナーゼアッセイを行った結果、十分な H2A-T120 リン酸化活性を検出することができた。このことから、N 末端にタグを付加すると VRK1 の構造が変化し、H2A-T120 をリン酸化できないこ

とが推測される。そこで解決策として、VRK1 抗体を用いて複合体精製を行っており、また C 末端側にタグを付加した VRK1 を作製し、この H2A-T120 リン酸化活性を確認している。

(4) VRK1 標的遺伝子における H2A-HUB および DUB の同定

H2A-HUB 3 種 (DZIP3, RING1B, RNF8)、H2A-DUB 5 種 (USP3, USP16, USP21, USP22, MYSM1) の siRNA 処理を行い (1 酵素につき 3 種類の siRNA オリゴをテスト)、RT-qPCR を行った結果、DZIP3 や RING1B によって発現が抑制される VRK1 標的遺伝子を 2 つ同定した。また Ring1B については ChIP 解析も行い、VRK1 標的遺伝子への結合も確認している。この結果は、VRK1 と Ring1B を含むポリコム複合体 (Polycomb repressive complex 1: PRC1) が拮抗的に働いていることを示唆する。

(5) vrk1 ノックアウトマウスにおける生殖細胞形成異常の解析

研究開始段階では、vrk1 ノックアウトマウスは作製できていたが、他の研究グループの vrk1 ノックアウトマウスをみの解析結果が発表されており、我々は方針を変更し、H2A-T120 リン酸化と H2A-K119 ユビキチン化の拮抗メカニズムというオリジナルの観点から有益な知見を得るため、*vrk1*^{-/-}、*usp21*^{-/-} ダブルノックアウトマウスを作製しており、マウス掛け合わせの最終段階である F3 世代の解析を行っている (図 3)。*vrk1*^{-/-}、*usp21*^{-/-} マウスは低リン酸化かつ高ユビキチン化であると推測されるため、*vrk1*^{-/-} マウスの

精巢での表現型 (精原細胞数の著しい減少 Wiebe et al., 2010) をさらに増強することを予想している。

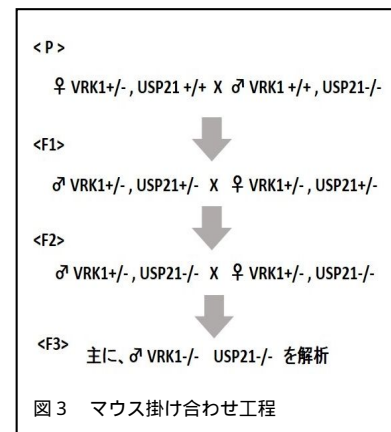
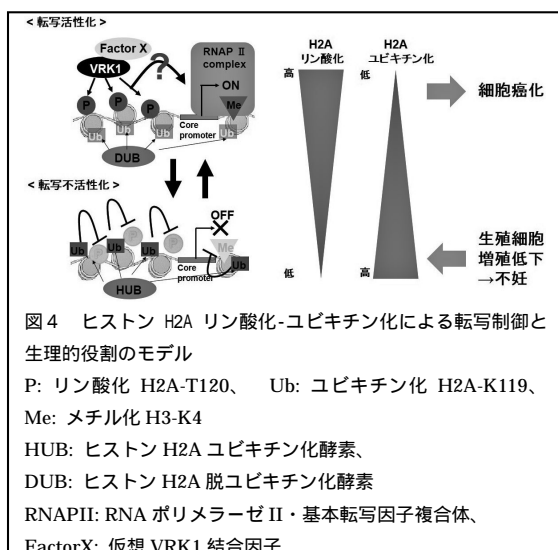


図 3 マウス掛け合わせ工程

まとめ

図 4 に示すように、本研究結果は、H2A-T120 リン酸化および H2A-K119 ユビキチン化の拮抗作用によって転写制御が行われていることを培養細胞で証明している。研究結果 (1) と H2A リン酸化模倣変異体の腫瘍形成能の結果を取りまとめ、論文投稿中である。この拮抗作用の詳細な分子メカニズムは、VRK1 複合体を解明し、ポリコム複合体との

分子的なやりとりを調べていくことによって明らかにされていくことが期待される。また、この分子メカニズムの生理機能の解明には、細胞癌化のモデル系や生殖細胞の形成過程において、VRK1 や HUB・DUB の変異体の作製が必要である。さらに、H2A リン酸化模倣変異体のみならずユビキチン化変異体の解析によって、新たな知見が得られることを期待している。例えば、研究目的の項目 2 - (1) に記した H2A リン酸化模倣変異体が腫瘍形成能をもつことから、H2A-T120 リン酸化が異常亢進によって CyclinD1 の恒常的発現の獲得が細胞癌化のキーステップである可能性を想起させる。これに腫瘍形成能を持つ H2A ユビキチン化変異体では H2A のリン酸化レベルが上昇するかなど調べることによって、分子メカニズムのさらなる補強にもつながる。何よりも H2A の変異が癌患者の検体でも起きているかを調べるのが今後の急務となる。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

相原 仁 (AIBARA HITOSHI)

長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：80587717