

## 184. エピジェネティクスを制御するヒストン修飾の共役機構

中山 潤一

\*名古屋市立大学 大学院システム自然科学研究科

Key words : エピジェネティクス, 分裂酵母, ヒストン, メチル化, ユビキチン化

### 緒言

エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能の変化であり、個体の発生や細胞の分化、がんを含む様々な疾患にも深く関与することが示唆されており、その分子メカニズムの解明は世界でもっとも注目されている研究分野のひとつになっている。このエピジェネティクスの制御に重要な役割を果たしているのが DNA を取り巻くクロマチンと呼ばれる環境であり、その構成要素であるヒストンの翻訳後修飾がクロマチンの構造変化を引き起こすことで、エピジェネティックな遺伝子発現を制御している。私たちはこれまでに、クロマチン研究の優れたモデル生物である分裂酵母を用いて、エピジェネティックな遺伝子発現制御に、ヒストンの特徴的なメチル化修飾と、そのメチル化を認識して結合する HP1 タンパク質が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた [1]。一方、分裂酵母のヒストンメチル化酵素である Clr4 は、生化学的な解析からユビキチン化との関与が示唆されている因子と共に CLRC と呼ばれる複合体を形成していることが報告されていたが、メチル化とユビキチン化修飾がどのように関わるのかについては明らかにされていなかった。本研究では、分裂酵母の CLRC の生化学的な解析を進めることで、ヒストンのメチル化酵素の活性にユビキチン化が密接に関わることを明らかにしたので報告する。

### 方法、結果および考察

#### 1. CLRC 複合体の生化学的解析

これまでに私たちは、分裂酵母からアフィニティー精製した CLRC 複合体を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行うことで、CLRC がヒストン H3 をユビキチン化する活性を有することを見出していた (図 1)。そこで H3 のどの残基が CLRC によるユビキチン化の標的になっているのか検討を行った。まずヒストンの N 末端のテイル領域 (H3N) を GST 融合タンパク質 (H3N-GST) として発現させ、H3N-GST が CLRC の基質になることを確認した。次に候補となるリジン残基に変異を導入した H3N-GST を調製し、CLRC のユビキチン化活性への影響を検討した。その結果、H3 の K14 に変異を導入した場合に CLRC のユビキチン化活性が顕著に阻害されることを見出した。実際にユビキチン化された H3N-GST を抽出し質量分析計によって解析することで、ユビキチン化されたリジン残基の同定を試みた。その結果、H3K14 のユビキチン化が優先的に検出されることが分かった。以上の結果は、CLRC がヒストン H3 の特に 14 番目のリジンを標的としていることを示唆する結果である。

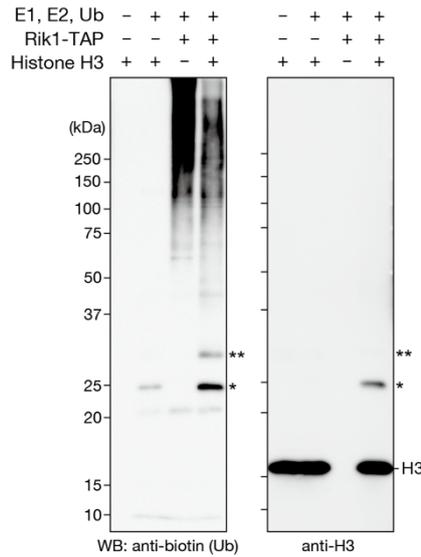


図 1. CLRC はヒストン H3 をユビキチン化する

ヒストン H3 を基質とした、CLRC による *in vitro* ユビキチン化アッセイ。精製した CLRC (Rik1-TAP) とヒストン H3 を反応させた。反応産物を抗ビオチン抗体 (左)、抗 H3 抗体 (右) を用いたウェスタンブロットによって検出した。\*ユビキチン化された H3。

分裂酵母を用いた解析から、ヒストンメチル化酵素である Clr4 や CLRC の構成因子は、ヘテロクロマチンと呼ばれる高次クロマチンの形成に重要なことが示唆されている。そこで分裂酵母のヘテロクロマチン領域に H3 のユビキチンが存在しているかどうかを検討した。まずヘテロクロマチン領域に特徴的なメチル化修飾 (H3K9me) に対する抗体でクロマチンを免疫沈降させ、沈降されたクロマチンに含まれる H3 の修飾状態を質量分析計で解析した。その結果、H3K9me を持つクロマチン領域に優先的に H3K14 のユビキチン化修飾が存在していることが明らかになった。また、ヒストン H3 の特定のリジンアラニンに置換した変異 H3 を異所的に発現させ、ヘテロクロマチンによる遺伝子発現抑制の状態への影響を検討した。その結果、H3K14A の変異によって高次クロマチン構造による遺伝子発現抑制が解除されることが分かった (図 2)。以上の結果より、分裂酵母の細胞内に実際に H3K14 のユビキチン化修飾が存在すること、またこの修飾が高次クロマチン構造によるエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わるということが強く示唆された。

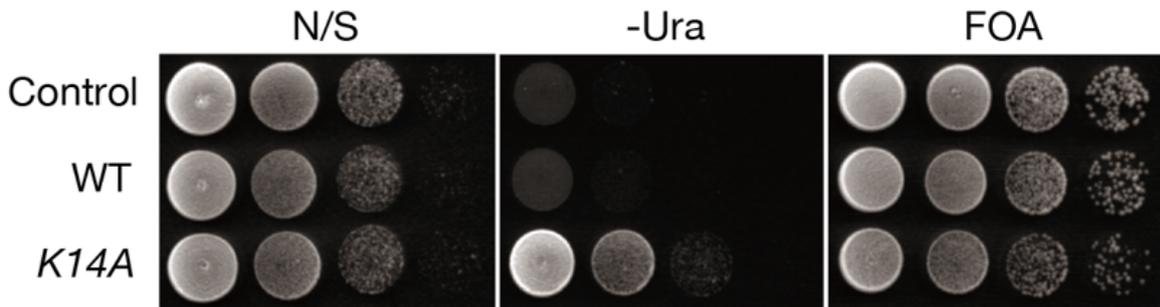


図 2. H3K14 はヘテロクロマチンのサイレンシングに重要である

分裂酵母内で変異 H3 を発現させ、ヘテロクロマチン領域に挿入したマーカー遺伝子 (*Kint2::ura4<sup>+</sup>*) の発現抑制状態をスポットアッセイ法によって評価した。H3K9me マークを持つヘテロクロマチン領域に挿入されたマーカー遺伝子は通常抑制されており、ウラシル欠乏培地 (-Ura) ではほとんど増殖できず、逆に 5-フルオロオロチン酸 (FOA) を含む培地では効率良く増殖できる。一方ヘテロクロマチン構造に異常が起きると、マーカー遺伝子のサイレンシングは解除されて、-Ura 培地で増殖できるようになり、逆に FOA 培地では増殖が阻害される。N/S: 非選択培地。

## 2. ヒストンメチル化とユビキチン化のクロストーク

上述した生化学的な解析から、分裂酵母の CLRC がヒストン H3 をユビキチン化する活性を有すること、またこのユビキチン化が高次クロマチンを介したエピジェネティックな遺伝子発現抑制に関与することが明らかになったが、ユビキチン化がどのようにメチル化を制御しているのか、その分子機構は不明である。そこで、ユビキチン化の有無がヒストンメチル化酵素の活性にどのような影響を与えるか検討した。まず CLRC を作用させてユビキチン化修飾を導入した H3N-GST、あるいは化学的にユビキチン化を導入した H3 を基質として、精製したメチル化酵素 (Clr4) を用いて *in vitro* でメチル化アッセイを行い、ユビキチン化修飾の影響を検討した。その結果、Clr4 は未修飾の H3 と比較してユビキチン化された H3 を優先的にメチル化することが明らかになった。一方、H3 のメチル化は CLRC のユビキチン化活性を促進することはなかった。この結果はヒストン H3K14 のユビキチン化が先に起こり、その後で H3K9 がメチル化されるという、段階的な H3 の修飾経路の存在を示唆している (図 3)。

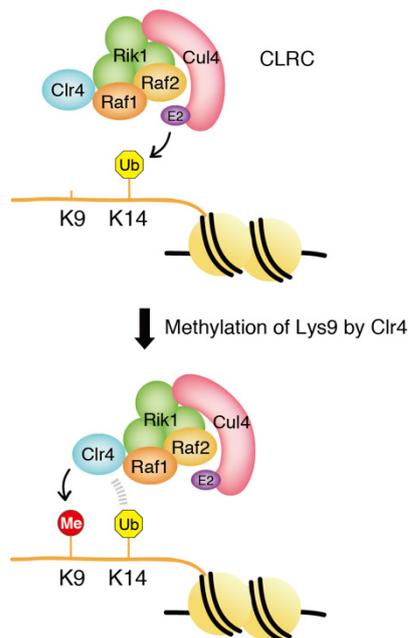


図 3. ヒストンのユビキチン化とメチル化のクロストークを示した模式図

分裂酵母の CLRC 複合体はヒストン H3K14 を優先的にユビキチン化する (上図)。K3K14 のユビキチン化修飾は Clr4 の酵素活性を制御し、H3K9 へのメチル化が促進される (下図)。

実際に Clr4 のどの領域がユビキチン化の認識に関与しているか、Clr4 の一部を欠損させた様々な変異 Clr4 を調製し、同様に *in vitro* でメチル化アッセイを行った。その結果、N 末端を欠損した Clr4 では未修飾の H3 を効率良くメチル化できることが明らかになった。興味深いことに、N 末端を欠いた変異 Clr4 は、全長の Clr4 よりも高い活性を示しており、N 末端が C 末端側の酵素活性を負に制御している可能性が考えられた。この結果は、Clr4 の N 末端がユビキチン化の認識に重要な役割を果たしているだけでなく、酵素全体の活性制御に関わることを支持する結果である。分裂酵母の高次クロマチン構造の形成には、CLRC と RNA サイレncing 機構の関連が示唆されており [2]、今後 Clr4 の RNA 結合能とユビキチン化修飾の認識がどのように関連しているか検討することが重要だと考えられる。

## 謝 辞

最後に、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Shimojo H, Kawaguchi A, Oda T, Hashiguchi N, Omori S, Moritsugu K, Kidera A, Hiragami-Hamada K, Nakayama J, Sato M, Nishimura Y. Extended string-like binding of the phosphorylated HP1 alpha N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Sci Rep.* 2016; 6:22527. doi: 10.1038/srep22527. PMID: 26934956
- 2) Mutazono M, Morita M, Tsukahara C, Chinen M, Nishioka S, Yumikake T, Dohke K, Sakamoto M, Ideue T, Nakayama J, Ishii K, Tani T. The intron in centromeric noncoding RNA facilitates RNAi-mediated formation of heterochromatin. *PLoS Genet.* 2017;13(2):e1006606. doi: 10.1371/journal.pgen.1006606. PMID: 2