

論文内容の要旨

論文題名

核内蛋白質のリジン残基特異的アセチル化と
染色体領域特異的な遺伝子発現制御機構の解析

氏名

木村 暁

(きむら あかつき)

真核生物のゲノム DNA は、「長く」、「多種類の遺伝子」を含む。この特徴が多細胞生物の発生分化をはじめとする真核生物の洗練された生物機能を担っている。一方で構造面に着目すると、真核生物のゲノム DNA はヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソーム構造を基本骨格とするクロマチン構造を形成している。このことが、長い DNA をコンパクトに核内に収容すると同時に、ゲノム中の発現してはいけない遺伝子を発現させないために働いていると考えられている。すなわち、真核生物のゲノム DNA の転写、複製、組み換え、修復、再編成等の「機能制御」にはクロマチンの「構造制御」が重要である。

ヒストン蛋白質のアセチル化修飾は「基質が(染色体の主要構成成分である)ヒストンであること」「修飾が時間的・空間的に制御されていること」からクロマチンの「構造制御」に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、「1. アセチル化されるリジン残基はどのように選ばれているのか?」「2. 生体内ではどのようにして特定の残基だけがアセチル化されるのか?」「3. 特定の残基がアセチル化されることはどのような効果をもたらすのか?」といった重要な問題については不明のままであった。本研究では、これら3点について以下のように研究を進め、更にその研究成果に基づいて、新しい研究展開の方向性を示せた。

(1) ヒストンアセチル化酵素の特異性とヒストンの被修飾残基の対応の法則化

コアヒストン(ヒト)において N 末領域に存在する 28 個のリジン残基のうち、生体内でアセチル化されるのは 15 個である。申請者らはこの 15 のリジン残基が、その周辺配列の一次構造に

着目すると、3つのクラス・6つのサブクラス（グループ）に分類できることを発見した。さらに、in vivo ではアセチル化されないリジン残基はこの分類には属さないこと、および既知の in vitro の酵素活性とこの分類が対応していることから、ヒストンアセチル化酵素はこの分類に基づいてリジン残基を見分けているとする仮説を提唱した（表1）。特定のリジン残基のみがアセチル化される理論を提唱したのは本研究が初めてである。

そこで、この仮説の妥当性を検証するために当研究室において HAT 活性を持つことが見出された Tip60 がアセチル化するリジン残基を解析したところ、Tip60 がこの仮説を支持し、かつ新しいタイプのリジン残基特異性を有することを示す実験結果を得た（表1）。この研究は、ヒストンの特定のリジン残基がアセチル化される機構に関する考察を加えるものであるばかりでなく、アセチル化により制御されるクロマチン関連反応の調節機構を議論するにあたり新たな視点を提示するものとする。

表1. 申請者らが提唱したリジン残基の分類とヒストンアセチル化酵素活性との相関

class	group	position	sequence	site specificity of HATs					
				hTip60	yHat1p	yGcn5p	dTAF230	hSRC-1	hp300
I (G/A)	A	H2A- 5	SGRGKQGGK	+	?	-	-	-	?
		H4 - 5	SGRGKGGKG	+	+	-	?	?	+
		H4 -12	KLGLKGGAK	+	+	-	?	?	+
	B	H3 -14	STGGKAPRK	+	-	+	+	+	?
		H4 - 8	GKGGKGLGK	+	-	+	?	?	+
		H4 -16	KGGAKRHRK	+	-	+	?	?	+
II (S/T)	C	H2B- 5	PEPSKSAPA	-	-	-	-	-	?
		H2B-15	KKGSKKAIT	-	-	-	-	-	?
	D	H2B-20	KAITKAQKK	-	-	-	-	-	?
		H3 - 4	ARTKQTAR	-	-	-	-	-	?
		H3 -23	QLATKAARK	-	-	-	?	?	?
	III (K/R)	E	H2B-12	PAPKQGSKK	-	-	-	-	-
H3 -18			KAPRQLAT	-	-	-	-	-	?
F		H3 - 9	QTARKSTGG	-	-	-	?	?	?
		H3 -27	KAARKSAPA	-	-	-	?	?	?

(2) 生体内でのアセチル化酵素の標的の細分化

上記(1)での解析から HAT 酵素活性ドメインの in vitro におけるリジン残基の特異性の種類は限られていることが分かった。一方で、in vivo では多くのリジン残基が同時にアセチル化されることは修飾による多様性を生みにくい。また、同じファミリーに属する HAT は in vitro で同様の特異性を有するが、生体内での機能は多様性に富んでいる。このことから、酵素活性が生体内では多様な制御を受け、同じ分類に属するリジン残基を区別して修飾ことにより、特定の機能発揮を担っていると仮定した。そこで我々の研究室で HAT 活性を有することを明らかにした MYST ファミリーに属する出芽酵母3因子(SAS2, SAS3, ESA1)が、同じファミリーに属するものの in vivo で標的となりうるリジン残基が異なるのではないかと考え検討を加えた。

その結果、3 因子の機能の違いと呼応して in vivo で標的となるリジン残基も異なることがわかった。この特異性の多様化は酵素と他の蛋白質が会合した複合体形成によって制御されていることが示唆された。すなわち、in vivo では HAT の特異性が複合体形成などにより制御され、特異性が細分化されることによって多様な機能を果たしうることが明らかとなった（表 2）。

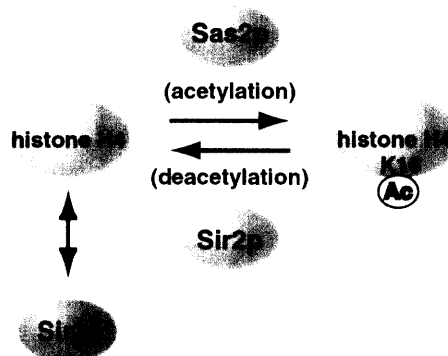
表 2. 出芽酵母 MYST ファミリーに属するヒストンアセチル化酵素の in vivo での標的

group	site	sequence	localization	MYST-HAT in charge
group A	H4-5	SGRGKGGK	euchromatin	Esa1
	H2A-5	SGRGQGGK	?	(Esa1)
	H4-12	KGLGKGGAK	heterochromatin X-chromosome inactivation	Esa1
group B	H3-14	STGGKAPRK	?	Sas3
	H4-8	GKGGKGLGK	euchromatin	Esa1
	H4-16	KGGAKRHRK	anti-silencing X-chromosome activation	Sas2

(3) 生体内でのアセチル化制御とテロメア蛋白の局在・機能の制御

特定のリジン残基のアセチル化修飾とその機能の関係を探るためには、(i) 特定のリジン残基をアセチル化修飾する酵素、(ii) このリジン残基の脱アセチル化を担う酵素、(iii) このリジン残基のアセチル化状態に依存してヒストンとの結合が制御される因子、の 3 者の関係を in vivo で探る必要がある。しかしながらそのような研究はこれまでになかった。我々は上記 (2) の研究で SAS2 が in vivo においてヒストン H4-K16 のアセチル化を特異的に担う因子であることを見出したので、in vivo におけるこのサイトの脱アセチル化酵素と考えられていた SIR2、およびこのサイトのアセチル化によってヒストンとの結合が制御されると考えられているテロメア局在蛋白 SIR3 との関連づけを行った (図 1)。

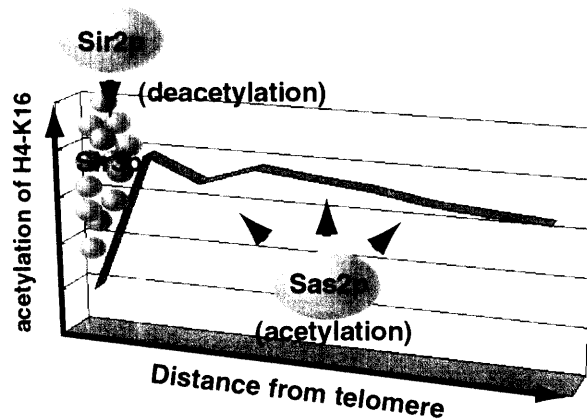
図 1. 出芽酵母遺伝子サイレンシングにおけるヒストンのアセチル化と相互作用の制御モデル



第一に、野生株においてはテロメア周辺で特異的にヒストン H4-K16 のアセチル化が低下していることがわかった。このことから、ヒストン H4-K16 の脱アセチル化はテロメアを初めとした遺伝子サイレンシングを受ける染色体上の領域に特徴的であることが示唆された。次に、このテロメアでの脱アセチル化、および非テロメア領域でのアセチル化が、それぞれ SIR2 と SAS2 によって担われていることを変異体解析から明らかにした。すなわち染色体においてはテロメア末端から中央領域に向かってヒストンアセチル化の勾配が SIR2 と SAS2 の働きにより形成されていることがわかった。このように染色体上でヒストンの化学修飾の勾配を形成する修飾酵素の組み合わせを明らかにしたのは本研究が初めてである。

さらに、この化学修飾勾配形成の生理的意義を探るために SIR3 の染色体上の局在、および全染色体の遺伝子発現状態を検討した。SIR2 破壊株では SIR3 が普段局在しているテロメア領域への局在が見られなかった一方で、SAS2 破壊株では普段局在していないテロメア周辺領域への局在が見られた。さらに、SAS2 破壊株ではテロメア周辺領域を中心に遺伝子発現の抑制が見られた。これらの結果から、*in vivo* での特定のリジン残基のアセチル化が染色体上の蛋白の局在と機能発揮に重要であるという一連の流れがありうることが示された (図 2)。

図 2. テロメア末端におけるヒストンのアセチル化修飾勾配の形成とその意義に関するモデル



ヒストンをはじめとする蛋白質の化学修飾による制御は、ゲノム配列にその様式が直接コードされていないため、謎に包まれている部分が多く残されている。また、修飾の組み合わせを考えるとその制御する事象は膨大である。本研究のように、化学修飾を担う酵素に着目するアプローチ、事象を抽象化・単純化するアプローチはこのような問題に取り組む上で有効と考える。

(筆頭著者としての発表論文)

Kimura, A. & Horikoshi, M. How do histone acetyltransferases select lysine residues in core histones? *FEBS Lett.* 431, 131-133. (1998)

Kimura, A. & Horikoshi, M. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones *in vitro*. *Genes Cells* 3, 789-800. (1998)