

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成15年度博士課程入学

氏名 西野 智則

指導教員 堀之内 末治

## 論文題目

### ヒストン脱アセチル化酵素による遺伝子発現制御に関する研究

クロマチンの最小単位はヌクレオソームと呼ばれる8分子のコアヒストンにDNAが巻き付いた構造体であり、転写不活性な領域ではこのヌクレオソームが密にパッキングし、高密度な構造をとることで転写因子等のリクルートを防ぎ、一方で転写活性な領域ではヌクレオソームは数珠状に伸びた低密度な構造を取り、転写因子等のリクルートに有利な環境を与えていると考えられている。個体の発生や分化では、ゲノム上のDNAの遺伝子を選択的に活性化あるいは不活性化することによって特異的な遺伝子発現パターンを決定づける。このような遺伝子発現の制御には転写因子の活性化だけでなく、クロマチン高次構造の変化も重要であるとされている。DNAやヒストンの翻訳後修飾はこのようなクロマチン構造の構築に関与すると考えられており、特にヒストンのアセチル化は転写活性な領域に多く見られる。ヒストンのアセチル化レベルはアセチル化酵素(HAT)と脱アセチル化酵素(HDAC)によって制御され、HATはコアアクチベーター複合体に、HDACはコリプレッサー複合体に含まれることからそれぞれ転写の活性化と不活性化に関与していることが知られている。本研究ではHDACによる選択的遺伝子発現の制御機構の解明を目的とし、1) HDAC4による転写抑制因子Bach2の核内フォーカス形成メカニズム、2) HDAC4の細胞内局在制御機構、3) ヒストンアセチル化による遺伝子発現変化の継承機構についての解析を行った。

## 1、HDAC4による転写抑制因子 Bach2 の核内フォーカス形成メカニズム

Bach2 は、B リンパ球細胞において特異的な大量発現が見られる DNA 結合タンパク質であり、B リンパ球細胞の活性化応答や酸化ストレス環境下でのアポトーシス誘導に転写抑制因子として関わっている。Bach2 による転写抑制活性は細胞内局在並びに核内局在によりされており、通常の培養条件下では細胞質に局在するが、酸化ストレス環境下で核へと移行する。当研究室では、Bach2 が共役抑制因子である SMRT と核内で斑点状の構造体 (Bach2 フォーカス) を形成し、この Bach2 フォーカスの形成が HDAC アイソザイムの一つである HDAC4 によって促進されることが見いだされていた。本研究ではまず HDAC4 による Bach2 フォーカス形成の促進機構について解析を行った。



図1 SMRT存在下で形成されるBach2 focus

Bach2 と HDAC4 はともに核-細胞質間を行き来するシャトルタンパク質であり、核外輸送タンパク質 CRM1 の阻害剤である leptomycin B (LMB) によって核外輸送が阻害される。そこで LMB によって起こる Bach2 の核蓄積を継続的に観察することによって HDAC4 や SMRT 存在化での Bach2 の核移行速度の評価を行った。その結果、Bach2 の核移行速度は HDAC4 あるいは SMRT の存在下においても変化しないことが分かった。しかし、Bach2 フォーカス形成については SMRT 存在下でのみ観察され、HDAC4 の共発現によりさらにフォーカス形成が促進された。また、HDAC4 非存在下でも、LMB によって Bach2 フォーカスの形成が促進された。

以上の結果より、Bach2 フォーカスの形成には SMRT の存在と Bach2 の核局在化が重要であることが示された。また、HDAC4 は SMRT を介して Bach2 と結合し、Bach2 フォーカス周辺の転写抑制に関与することも示唆された。HDAC4 もまた Bach2 非依存的に SMRT と安定なフォーカスを形成することから、HDAC4 は SMRT と結合することで Bach2 フォーカスの安定性を高め、Bach2 の核局在化およびフォーカス形成を促進していると考えられる。

## 2、HDAC4 の細胞内局在制御機構の解明

共同研究者である宮崎らは、Bach2 フォーカスの機能解析を目的として、Bach2 フォーカスの形成を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、phorbol-12 myristate-13 acetate (PMA) が HDAC4 の細胞質局在化を引き起こすことを見いだした。HDAC4 を含む class IIa HDAC はアミノ末端に核移行シグナル (NLS)、カルボキシ末端には核外輸送シグナル (NES) を持ち、核-細胞質間をシャトルしている。HDAC4 は筋芽細胞において核内に局在し、転写因子 MEF2 による筋分化の開始を抑制しているが、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルによる HDAC4 のリン酸化によってシャペロンタンパク質 14-3-3 と結合し、それによって積極的に核外へ輸送されると考えられてきた。ところが、本スクリーニング系では核内における Bach2 フォーカスの形成を観察するために HDAC4 の NES 欠損体を用いていたため、PMA による細胞質局在化

は従来の NES 活性化モデルでは説明困難な現象であった。そこで、本研究ではスクリーニングによって発見された PMA による HDAC4 の細胞質局在化の詳細を明らかにすることにより、HDAC4 の細胞内局在に関する新しい分子機構の解明を試みた。

核移行の阻害が予想されたため、PMA 存在化での LMB を用いた核移行速度の評価を行った。その結果 PMA 存在下での著しい核移行速度の低下が観察され、HDAC4 の細胞内局在が核移行時に制御されていることを初めて実験的に証明した。また、その分子機構には PMA によって活性化される protein kinase C (PKC) のうち、カルシウム非依存的なアイソザイムである nPKC の活性化が関ること、PMA により 14-3-3 との結合が増加することなどを明らかにした。しかし、nPKC である PKC $\delta$  や PKC $\epsilon$  の活性化型変異体の過剰発現は細胞内において HDAC4 の細胞質局在化を引き起こすにもかかわらず、*in vitro* リン酸化試験においては HDAC4 をほとんどリン酸化しなかったことから、HDAC4 のリン酸化酵素については nPKC シグナルの下流で活性化されるリン酸化酵素によって行われるものと考えられる。さらに 14-3-3 結合部位の変異体を用いた実験では、変異体は LMB 依存的な核局在化を引き起こしたが、PMA による核移行速度の低下は起こらなくなった。これらの結果は、細胞内において HDAC4 は 14-3-3 非依存的に核-細胞質間シャトルしており、14-3-3 の結合が核外輸送に必須でないこと、14-3-3 の結合が PMA による HDAC4 の核移行阻害に必須であることを示している。核移行阻害の作用機序については、14-3-3 結合部位と NLS が近接していることから核輸送タンパク質の NLS 結合に対する立体障害が生じているものと考えられる。また、PMA による核移行阻害は、HDAC4 と同じ class IIa に分類される HDAC5 と HDAC7 においても観察され、ともに 14-3-3 の結合が PMA 依存的に増大していた。これらの結果は 14-3-3 による核移行阻害が class IIa HDAC 間で起こる共通の分子機構であることを示している。

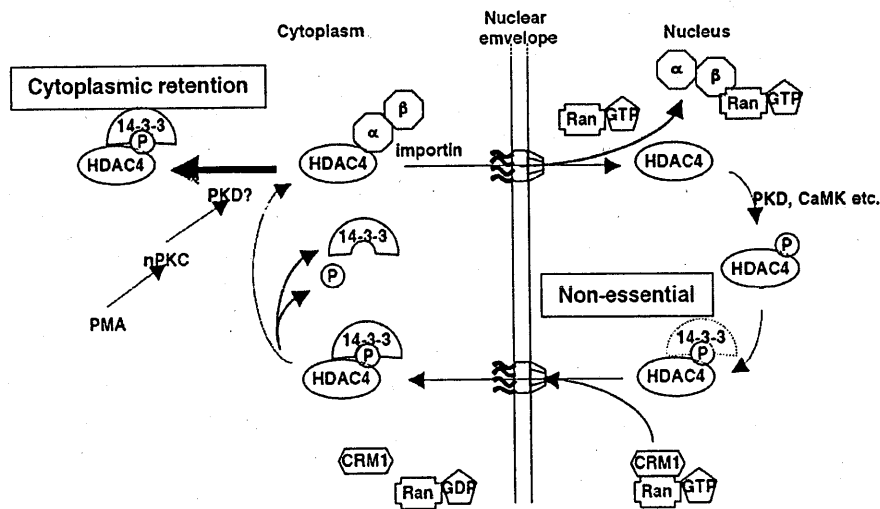


図2 HDAC4核-細胞質間シャトルの制御機構のモデル図

### 3、ヒストンアセチル化による遺伝子発現変化の継承機構の解析

遺伝子発現の調節に関するクロマチンの修飾は DNA のメチル化とヒストンの翻訳後修飾に大別されるが、

ともに正常な遺伝子発現パターンを次世代に伝えるために DNA 複製により新しく形成されたクロマチンに継承される必要がある。可逆的な HDAC 阻害剤である trichostatin A (TSA) は全ヒストンのアセチル化レベルを上昇させ、一部の遺伝子について転写の活性化を誘導する。TSA を除去すると速やかにアセチル化レベルは減衰し、基底状態へと戻る。このことは TSA による全体的なアセチル化レベルが維持されないことを示すが、変化を受けた一部の遺伝子座においてアセチル化が維持され、遺伝子発現が「記憶」される可能性を検討するために DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。

HeLa 細胞に対して 24 時間 TSA 処理を行った後、TSA を除いて培養を続け、48 時間後と 96 時間後における遺伝子の発現量を DNA マイクロアレイ (54,675 プローブ) により調べた。その結果、14.2% (7,762 プローブ) で 2 倍以上の遺伝子発現が見られたが、48 時間後に 2.5% (1,440 プローブ)、96 時間後には 0.70% (382 プローブ) のみが 2 倍以上の発現レベルを維持していた。48 時間にわたって発現上昇の見られた遺伝子の中で発現レベルの高いものの中には細胞周期の進行や細胞死に関わるもの複数含まれており、その中には TSA の抗腫瘍活性の要因の一つである cyclin-dependent kinase inhibitor である CDKN1A (p21) も含まれていた。そこで CDKN1A の mRNA レベルをノーザン解析および RT-PCR により調べた結果、TSA 除去後も 72~96 時間まで持続的な mRNA の発現上昇が観察された。また、転写阻害剤である actinomycin D を用いた実験で CDKN1A の mRNA の半減期は 4~6 時間程度であり、文献値とも一致して短いことから、TSA 除去後 24 時間以降の転写産物は新規合成されたものであることが示唆された。このことは、ヒストンアセチル化によって変化した遺伝子発現の一部は、細胞分裂を経て娘細胞に継承されることを示しており、ユークロマチン領域の遺伝子発現における「細胞記憶」の存在を示唆するものである。

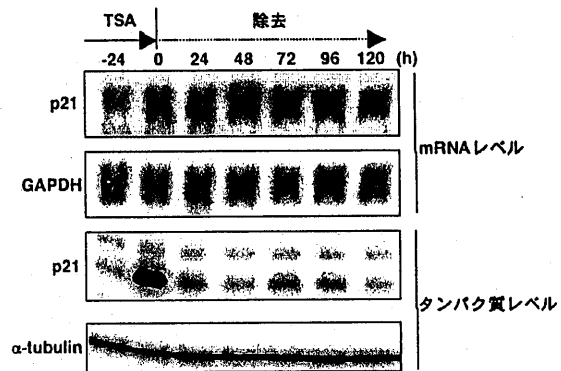


図3 TSA除去後も持続するp21の転写活性化

まとめ

### 1. HDAC4 による転写抑制因子 Bach2 の核内フォーカス形成メカニズム

HDAC4 が Bach2 フォーカスの安定性を高めることで Bach2 の核内繫留およびフォーカス形成を促進している可能性を示した。

### 2. HDAC4 の細胞内局在制御機構の解明

14-3-3 による HDAC4 の細胞内局在制御が核移行の阻害であることを証明した。

### 3. ヒストンアセチル化による遺伝子発現変化の継承機構の解析

TSA によって発現誘導された一部の遺伝子発現の変化が細胞に「記憶」され、その「記憶」が数世代に渡って娘細胞に継承されることを示した。