

## 論文内容の要旨

論文題目 生体内におけるヒストンバリエント H2Av の機能解析

指導教員 東京大学 消化管・代謝栄養内分泌外科 瀬戸泰之 教授

東京大学 分子細胞生物学研究所 核内情報研究分野 加藤茂明 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

博士課程

外科学専攻

田辺真彦

### 第 1 章 序論

真核生物の染色体構造は、DNA およびヒストン八量体からなるヌクレオソームを基本単位としたクロマチン高次構造を形成している。クロマチン高次構造は、ヌクレオソームが凝縮した「ヘテロクロマチン状態」と、弛緩した「ユークロマチン状態」に大別される。このようなクロマチン構造は、「転写」、「DNA 複製」、「DNA 修復」、それぞれの過程において、クロマチン構造調節因子により、「可逆的に変換」あるいは「不可逆的に維持」されている。

ヌクレオソーム基本単位の中心となるヒストン八量体は、各 2 分子の H2A, H2B, H3, H4 により形成される。これらヒストンは、カノニカル・ヒストンまたはコア・ヒストンと呼ばれ、細胞分裂 S 期に合成され、主に DNA 複製時に染色体に取り込まれる。ヌクレオソームから外側に露出している各ヒストンの N 末テイル、C 末テイルはアセチル化、メチル化などの化学修飾を受け、クロマチン構造や遺伝子発現を制御する。ヒストン化学修飾は、遺伝子配列の変化を伴わない遺伝情報の記憶と発現の暗号となることが明らかとなり、総じて「エピジェネティクス」という概念で理解されている(Jenuwein and Allis, 2001)。

転写をはじめとするクロマチンリモデリングの過程で、H2A-H2B ヘテロダイマー、さ

らには、H3-H4 テトラマーがヌクレオソームから外れることが知られている。これらカノニカル・ヒストンと置き換わり、複製非依存的にヌクレオソームに取り込まれるヒストン H2A、H3 バリエントがそれぞれ存在する(Wu and Bonner, 1981)。これらヒストンバリエントは、カノニカル・ヒストンと置き換わることで、クロマチン構造や遺伝子発現を制御することが報告され、ヒストン化学修飾とは別のエピジェネティクス機構であることが明らかとなりつつある(Kamakaka and Biggins, 2005)。しかしながら、カノニカル・ヒストンの化学修飾に比べ、ヒストンバリエントへの置換の意義は明らかではない。

ヒストン H2A のバリエントの一つ H2Av のアミノ酸配列は、酵母 Htz1 やショウジョウバエ H2AvD から哺乳動物 H2A.Z まで、種を超えて保存されており、いずれも生存に必要な不可欠であることが知られている(Redon et al., 2002)。H2Av の分子機能解析は主に酵母 Htz1 で進んでおり、転写の活性化、ヘテロクロマチン形成、クロマチン境界の維持などに関わることや、SWR1、NuA4 が Htz1 置換を担うことが報告されてきた(Guillemette and Gaudreau, 2006; Kamakaka and Biggins, 2005)。哺乳動物 H2A.Z は発生・分化や癌と関連があることが報告されているが、H2A.Z 置換がどのような生体内高次機能に反映されているかについては未だ明らかではない(Zlatanova and Thakar, 2008)。

そこで、本研究では、モデル生物であるショウジョウバエに着目した。ショウジョウバエと哺乳動物では、ヒストン/ヒストンバリエントのみならず、転写制御因子にも相同性があることが知られており、基本的な転写制御機構は同様であると考えられている。また、ショウジョウバエの各種遺伝子変異系統、三齢幼虫の唾液線多糸染色体、複眼赤白斑模様の程度を指標とする position effect variegation(PEV)などが、転写制御機構やクロマチン構造変換機構の解析に有用であることが多数報告されている(Ito et al., 2004; Kimura et al., 2008; Murata et al., 2008; Sawatsubashi et al., 2004; Takeyama et al., 2002; Zhao et al., 2009)。

本研究では、ショウジョウバエ個体内における H2AvD の転写制御機構の一端の解明、および、H2AvD 新規相互作用因子の探索を試みた。

## 第2章 *Hsp70* 遺伝子発現におけるヒストンバリエント H2AvD のアセチル化

H2AvD の N 末テイル/C 末テイルに蛍光タンパク質 Green Fluorescent Protein(GFP) を融合させた GFP-H2AvD/H2AvD-GFP 発現トランスジェニックショウジョウバエを作出し、免疫染色法により唾液腺多糸染色体上で各 H2AvD 変異体の局在を観察した。その結果、H2AvD-GFP は染色体に広く濃く観察されたのに対し、GFP-H2AvD では、局在域も局在量も著しく減少していた。また、*hsp70* 遺伝子発現を検討すると、GFP-H2AvD では、heat shock puff がコントロールに比べて小さく、*hsp70* mRNA の発現量も低下していた。この原因を探索したところ、GFP-H2AvD では、H2AvD の N 末テイルがアセチル化されていない可能性が考えられた。

酵母 Htz1 置換に N 末テイルのアセチル化が必要であるという報告(Keogh et al., 2006) を参照し、アセチル化されうる 5 つのリジン K をすべてアルギニン R に置換した KR-H2AvD-GFP ラインを作出した。KR-H2AvD-GFP は、GFP-H2AvD と同様に、クロマチンに取り込まれにくく、転写活性化能も低いことが示された。

以上より、H2AvD の N 末テイルには、H2AvD の局在を規定する要素が存在する可能性が示唆され、アセチル化がその一つであると考えられた。また、通常抑制化状態にある *hsp70* 遺伝子が、熱刺激に応じて転写活性化状態に移行する際に、N 末テイルがアセチル化された H2AvD が促進的に作用する可能性が示唆された。

## 第3章 ヒストンバリエント H2AvD 新規相互作用因子の探索

H2Av の機能解析の足掛かりとして、新規相互作用因子の同定を試みた。これまでに H2Av の相互作用因子 SWR1、NuA4 およびそのホモログは、生化学的手法により同定されてきた。しかしながら、上述した背景から、さらに重要な役割を担う未知相互作用因子の存在が推測された。そこで、新たなアプローチ方法として、「split GFP system を応用した新規スクリーニング方法の構築」を試みた。そして、N 末 GFP-H2AvD と、C 末 GFP 融合未知タンパク質との相互作用による GFP 蛍光の発現が embryo sorter により検出され、

スクリーニングが有用である可能性が示された。本スクリーニング方法により、H2AvDと相互作用する可能性のある因子として、*Aac11*(apoptosis inhibitor 5)、CG6195(developmentally regulated GTP binding protein)、*pecanex*(spermatogenesisと関連する可能性あり)などが同定された。

また、この過程で、腹部背側の体節が不整になる表現型を示すショウジョウバエが認められた。これは、遺伝子変異体同士の交配で表現型が変化する遺伝学的相互作用である可能性が高いことが明らかとなり、「表現型を指標にしたスクリーニング」の可能性について検討した。本スクリーニング方法により、H2AvDと相互作用する可能性のある因子として、*nuf*(*nuclear fallout*; microtubule binding)、*Itd*(*lightoid*; GTP binding protein)、*Mnf*(*myocyte nuclear factor*; winged helix/ forkhead transcriptional factor)などが同定された。

このように、それぞれのスクリーニング方法により、H2AvD新規相互作用因子の候補が複数取得されつつあり、有用な手法である可能性が高いと考えられる。

#### 第4章 総合討論

本研究では、N末テイルがアセチル化されないH2AvD (KR-H2AvD-GFP)は、クロマチンに挿入されにくく、*hsp70* 遺伝子の熱刺激依存的な転写活性化能が低下していることを示した。最新の報告では、H2Avは、プロモーター、特に転写開始点近傍に局在し、ヒストンバリエントH3.3とともに弛緩したヌクレオソームを形成すること(Henikoff et al., 2008)や、DNAのメチル化に拮抗する作用があること(Zilberman et al., 2008)が示された。これらの報告と本研究の結果とを考え合わせると、転写開始点のH2Avは、転写開始に有利なクロマチン環境を整えていることが推測される。今後、DNAのメチル化とH2Av置換の関係を結びつける分子機構の解明が重要であると考えられる。

現在、転写の活性化に先立ち、ヒストンアセチルトランスフェラーゼHATが、クロマチン内のヒストンをアセチル化することが知られている(Rice and Allis, 2001)。本研究に

においても、転写活性化時にアセチル化 H2AvD がクロマチン内に存在することが示された。一方、N 末がアセチル化されない H2AvD (KR-H2AvD-GFP) は、クロマチンに挿入されにくいことが示された。この結果から、既にクロマチン内に存在する H2Av がアセチル化されるという従来の概念とは異なり、アセチル化された状態の H2Av が挿入されるというモデルが想定される。このように、従来の概念とは異なる分子機構を担う相互作用因子の探索も課題の一つである。

本研究では、ショウジョウバエ個体を用いて、H2AvD の N 末テイルのアセチル化の意義の一端を解明し、新たな二つのスクリーニング方法を構築した。今後は、酵母 Htz1 置換の分子機構と哺乳動物 H2A.Z の高次機能を結びつけるような鍵因子の同定を目指し、H2Av 生体内高次機能の解析に発展させたい。本研究で構築した新規スクリーニング方法を実践、継続することで、H2Av 新規相互作用因子の取得が実現できる可能性があると考えている。

Guillemette, B., and Gaudreau, L. (2006). Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem Cell Biol* *84*, 528-535.

Henikoff, S., Henikoff, J.G., Sakai, A., Loeb, G.B., and Ahmad, K. (2008). Genome-wide profiling of salt fractions maps physical properties of chromatin. *Genome Res.*

Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., and Kato, S. (2004). In vivo potentiation of human oestrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes Cells* *9*, 983-992.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.

Kamakaka, R.T., and Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* *19*, 295-310.

Keogh, M.C., Mennella, T.A., Sawa, C., Berthelet, S., Krogan, N.J., Wolek, A., Podolny, V., Carpenter, L.R., Greenblatt, J.F., Baetz, K., *et al.* (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev* *20*, 660-665.

Kimura, S., Sawatsubashi, S., Ito, S., Kouzmenko, A., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Ueda, T., Fujiyama, S., *et al.* (2008). *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. *Biochem Biophys Res Commun* *371*, 889-893.

Murata, T., Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Zhao, Y., Yamagata, K., Tanabe, M., Fujiyama, S., Kimura, S., Ueda, T., *et al.* (2008). RNA-binding protein hoip accelerates polyQ-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Biosci Biotechnol Biochem* *72*, 2255-2261.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* *12*, 162-169.

Rice, J.C., and Allis, C.D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 263-273.

Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., and Kato, S. (2004). Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly(ADP-ribosyl)ation. *Biochem Biophys Res Commun* *320*, 268-272.

Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., and Kato, S. (2002). Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*. *Neuron* *35*, 855-864.

Wu, R.S., and Bonner, W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* *27*, 321-330.

Zhao, Y., Takeyama, K., Sawatsubashi, S., Ito, S., Suzuki, E., Yamagata, K., Tanabe, M., Kimura, S., Fujiyama, S., Ueda, T., *et al.* (2009). Corepressive action of CBP on androgen receptor transactivation in pericentric heterochromatin in a *Drosophila* experimental model system. *Mol Cell Biol* *29*, 1017-1034.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*.

Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* *16*, 166-179.