

特集：タンパク質修飾がもたらす遺伝子発現調節

ヒストン H2A のユビキチン化と遺伝子転写抑制

伊 藤 敬

真核生物のゲノムはクロマチンと呼ばれる DNA 高次構造により細胞核内に収納され、その構造は正確に遺伝子を発現させるために、重要な働きをしている。クロマチンを構成するヒストンはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などにより翻訳後修飾を受け、その翻訳後修飾は遺伝子転写や遺伝子修復などの様々な現象に関与していることが明らかにされてきた。これらの翻訳後修飾はヒストンコードのクロストークによるネットワークを形成しクロマチンタンパク質と相互作用することにより機能する¹⁻³⁾。ヒストン H2A は 1975 年に最初のユビキチン化タンパク質として同定され、その後の研究により遺伝子転写制御に関わることが明らかにされてきた。遺伝子転写開始点におけるヒストン H2A のユビキチン化脱ユビキチン化とヒストンコードネットワークとの協調による遺伝子転写制御の機構を概説する。

はじめに

ヒトゲノムは約 2 m の DNA からなり細胞核内では高次構造をとり数マイクロメートルの細胞核内に収納され、その情報制御は種々の機構で調節されている。遺伝子発現の調節には転写調節因子の DNA 結合に加え、その高次構造、すなわちクロマチン構造の変化が重要な役割を果たしているということが明らかにされている。クロマチン構造の最小単位はヌクレオソームで、二つのヒストン H2A-H2B 二量体と一つの H3-H4 四量体で構成されるコアヒストン八量体の周りを 146 bp の DNA が 1.75 回転左巻きに巻いている (図 1)⁴⁾。

ヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質のアミノ末端は図 1 のようにヌクレオソームから外側に向けて突出しているため、ヒストン H3, H4 のアミノ末端及びヒストン H2A, H2B アミノ末端及びカルボキシ末端はヒストン

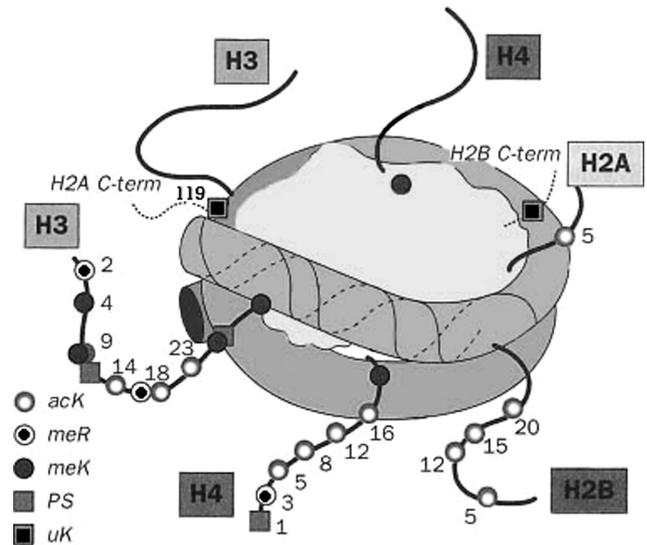


図1 ヌクレオソーム構造
クロマチン構造の最小単位はヌクレオソームコアとよばれ、二つのヒストン H2A-H2B 二量体と一つのヒストン H3-H4 の四量体で構成されるコアヒストン八量体から成り、そのまわりを DNA が 1.75 回転、左巻きに巻いた構造をとる。ヌクレオソームから突出したヒストンテールは種々の翻訳後修飾を受け生物学的な機能を調節している。(文献 4 を参考) (acK; アセチル化リシン, meR; メチル化アルギニン, meK メチル化リシン, PS; リン酸化セリン, uK ユビキチン化リシン)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命医科学講座生化学 (〒852-8523 長崎市坂本 1 丁目 12 番 4 号)
Ubiquitylation of core histone H2A repress transcriptional initiation by transhistone crosstalk
Takashi Ito (Department of Biochemistry, Nagasaki University School of Medicine, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki, Nagasaki 852-8523, Japan)

テールと呼ばれ、リン酸化、アセチル化、メチル化などさまざまな修飾を受け遺伝子転写などを調節している。ヒストンの修飾として、ヒストン H3 アミノ末端から4番目のリシン (K) のジメチル化トリメチル化は転写活性化と関連し、9番目のリシン (K) のメチル化は遺伝子転写抑制と関連している⁵⁾。ヒストン H2A も図に示したようにリン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を受けヌクレオソームコアを構成している³⁾。ヒストンのリン酸化はヒストン H3 についてよく解析されている。G₀期の休止細胞を増殖因子で刺激することによりヒストン H3 の10番目のセリンが RSK-2 (Ser/Thr kinase ribosomal S6 kinase 2) などによりリン酸化される。H3 の10番目のセリンのリン酸化は H3 の14番目のリシンのアセチル化を促進することが知られており、この現象を通じて転写を活性化しているものと考えられる。また M 期に染色体が凝集する際にも H3 の10番目のセリンがリン酸化されるがこれは aurora キナーゼによる。ヒストン H2A のリン酸化も同様に重要であり、我々は NHK-1 (nucleosomal histone kinase-1) がヒストン H2A の C 末端 120 番目のセリンをリン酸化することを明らかにした。ヒストン H2A の C 末端のリン酸化部位であるセリンの近傍は、ヒストン H2A のユビキチン化部位としてよく知られている⁶⁻⁸⁾。ヒストン H2A は 1975 年最初のユビキチン化タンパク質として同定され、ユビキチン化の部位がヒストン H2A の C 末端 119 番目のリシンであることが明らかにされた^{9,10)}。

ゲノムはクロマチン構造をとることにより遺伝子転写が種々のレベルで抑制され、ヒストンの翻訳後修飾は他のクロマチン因子とともに転写レベルを調節する。ヒストン H2A のユビキチン化は転写レベルの抑制に重要な働きをしておりその調節機構について概説する。

1. ヒストンのユビキチン化

タンパク質のユビキチン化は 76 アミノ酸残基からなるユビキチンのカルボキシ末端のグリシンと、目的タンパク質のリシンの ε アミノ基がイソペプチド結合により共有結合する反応よりなる。このユビキチン化は三つの段階より構成され、最初の反応により ATP は AMP と P_{Pi} に、ついで 2P_i へ加水分解され、このエネルギーにより駆動されてユビキチン末端グリシンのカルボキシル基が E1 酵素のシュルフィドリル基とチオエステル結合を作る。引き続きチオエステル交換反応により活性化されたユビキチンが E2 に転移する。最後の反応ではユビキチンリガーゼである E3 が標的タンパク質のリシンの ε-アミノ基へのユビキチンの転移を触媒する。一般に E1 酵素は共通で、E2 酵素は反応により使用が制限され、E3 酵素は反応特異的となっている。

1975 年 Goldknopf らにより肝切除後の再生肝臓を用い

てユビキチン化ヒストン H2A が発見されて 30 年以上経過した。タンパク質分解の標的としてのユビキチン化に加えて、シグナル伝達としてのユビキチン化、脱ユビキチン化が知られ、ヒストンのユビキチン化もその一つであることが明らかにされている⁹⁻¹¹⁾。ヒストン H2A のユビキチン化と遺伝子転写の活性化に関する報告もあるが¹²⁾、最近ではヒストン H2A のユビキチン化と遺伝子転写抑制に関する報告が多い¹³⁻¹⁵⁾。高等真核生物においては約 10% の H2A がユビキチン化されているが酵母ではヒストン H2A はユビキチン化されていない¹⁶⁾ことは、ユビキチン化の役割を考える上でも有用である。H2B ユビキチン化については高等真核生物と酵母で 1980 年に発見され、哺乳類の H2B 120 番目のリシン残基または酵母 H2B 123 番目のリシン残基がユビキチン化されていることが明らかにされている^{17,18,16)}。ヒストン H2A と同様 H2B のユビキチン化はモノユビキチン化でヒストン H2A は約 10% がユビキチン化されているのと比較して、ヒストン H2B は約 1~2% がユビキチン化されている¹⁷⁾。H2B のユビキチン化は遺伝子発現に関与し、遺伝子転写開始と伸長において重要であると理解されている¹⁹⁾。

ヒストン H2A のユビキチン化部位はヌクレオソーム構造において DNA の進入部近傍にあり、そのユビキチン化はヌクレオソーム構造に与える影響が大きいことが予想される。さらに立体構造のなかではヒストン H3 のアミノ末端の近傍にヒストン H2A のユビキチン化部位は位置している⁴⁾。これらの予想に反してクロマチンアレイ中のヌクレオソームの間隔やクロマチン形成の効率などに対するヒストン H2A のユビキチン化による影響は認められなかった¹⁵⁾。ヒストン H2A のユビキチン化は高等真核生物のみに認められ、酵母に認められないという事実は、高等真核生物に特異的な機能、すなわち組織の発生分化や臓器の機能など高次の機能と関連していることを予想させる。

2. ヒストン H2A のユビキチン化および脱ユビキチン化酵素

ヒストン H2A のユビキチン化を触媒する特異的 E3 酵素がアッセイを評価に用いたクロマトグラフィーによる精製によって明らかにされた¹³⁾。活性と一致して Ring1, Ring2, Bmi1 (マウスにおいてはそれぞれ Ring1A, Ring1B, Bmi1) を含むヒト polycomb repressive complex 1-like (hPRC1L) が同定された。hPRC1L は試験管内においてヒストン H2A のユビキチン化酵素活性を有していることが確認され、Ring2 のノックダウンにより細胞内のユビキチン化 H2A が減少することが確認されている¹³⁾。ショウジョウバエホモログである dRing がポリコム応答配列においてユビキチン化 H2A と共局在し、dRing をノックダウンすることにより同様にユビキチン化 H2A が減少す

ることを確認し、hRing2やdRingがヒストンH2Aのユビキチン化を触媒する特異的E3酵素で、ポリコームによる遺伝子転写抑制に関与することが示された。さらにN-CoR/HDAC1/3複合体と会合する因子として2A-HUBが同定されヒストンH2Aのユビキチン化酵素であることが明らかにされた。2A-HUBはhRing2やdRingと同様にヒストンH2Aの119番目リシンのユビキチン化を触媒する。2A-HUBはTLR (toll-like receptor 4)の活性化と関連したケモカインの転写抑制に働くことが明らかにされた。複数のヒストンH2Aユビキチン化酵素と作用する異なった遺伝子や共役因子の存在は、ヒストンH2Aのユビキチン化酵素2A-HUB、hRing2/dRingが遺伝子特異的、共役因子特異的に機能していることを示唆する。

2A-HUB、hRing2/mRING1B/dRingなどの遺伝子転写と関連したヒストンH2Aのユビキチン化酵素に加えてRNF8 (ring finger protein 8)はゲノムの安定性と関連したヒストンH2Aのユビキチン化酵素として同定されており、DNA二重鎖切断があるとリン酸化に引き続いて速やかに損傷部位に集積する。引き続いてH2AXをユビキチン化するがヒストンH2Aも同様にユビキチン化する^{20~22}。このRNF8がDNA二重鎖損傷のみに関与するのか、遺伝子転写などの現象にも関与するのかは今後の検討が必要である。

ヒストンH2Aの脱ユビキチン化酵素も数種類が同定されている。肝臓は最初にユビキチン化ヒストンが発見された臓器であり、さらに脱ユビキチン化現象も最初に見つかった臓器である。我々のグループはこの肝臓で機能していると予想される脱ユビキチン化酵素を明らかにした。USP21 (ubiquitin specific protease 21)とUSP4は肝臓切除後の肝臓再生において遺伝子発現が増加している脱ユビキチン化酵素であることを、遺伝子発現マイクロアレイにより明らかにした。さらに試験管内でのアッセイを用いてUSP21にヒストンH2Aの脱ユビキチン化酵素活性が存在することを見いだした¹⁵。USP21は遊離のユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化は触媒しないが、ヌクレオソーム構造をとらせるとユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化を触媒することを明らかにした。さらに脱ユビキチン化は肝臓においても試験管内においても遺伝子転写を活性化することを明らかにしている。

2A-DUB (histone H2A deubiquitylase)はアンドロゲン受容体の共役因子として同定されユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化を触媒することにより遺伝子転写を活性化することが報告されている²³。Ubp-M (a mutant deubiquitinating enzyme)/USP16 (ubiquitin specific protease 16)も同様にユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化を触媒することが示され、Hox遺伝子群を調節することが示された。さらにUbp-M/USP16を抑制することにより

アフリカツメガエルにおいて発生異常を引き起こすことが示された¹⁴。

一方、USP22は酵母Ubp8のホモログとして同定された。酵母にはユビキチン化ヒストンH2Aが存在しないため、ユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化酵素活性に関する検索はされていないが、USP22にはユビキチン化ヒストンH2Bに加えて、ユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化酵素活性があることが試験管内で示された。TFTC (TATA-binding protein-free TAF-containing)/STAGA (SPT3-TAF9-GCN5-acetyltransferase)複合体はUSP22とGCN5 HATを含み、ヒストンの脱ユビキチン化と、アセチル化による遺伝子転写活性化の共役が示唆される^{24,25}。

USP21、USP22、Ubp-M/USP16、2A-DUBなどの遺伝子転写活性化と関連した脱ユビキチン化酵素に加え、USP3はゲノムの安定性と関連したユビキチン化ヒストンH2Aの脱ユビキチン化酵素として同定されている²⁶。

これら複数のヒストンH2Aのユビキチン化および脱ユビキチン化酵素の存在はヒストンH2Aのユビキチン化が高等真核生物の複数の高度な生命機能と関連していることを示唆する。しかし一方ですべての酵素が生体内で機能しているかどうかを慎重に検索することも重要となる。

3. ヒストンH2Aのユビキチン化および脱ユビキチン化と遺伝子転写制御

分裂している筋芽細胞などではゲノムの5~10%のヒストンH2Aがユビキチン化され、分化に伴ってユビキチン化は減少する²⁷。一方で最初にユビキチン化H2Aが発見された肝臓では、分裂していない肝切除前の肝臓でユビキチン化H2Aが多く存在し分裂を開始するとユビキチン化H2Aは減少する。これらの相反する現象はH2Aのユビキチン化が多様な生物学的な現象に関与していることを支持するものである^{9,15}。

また細胞周期と関連してユビキチン化H2Aとユビキチン化H2BはG₂期からM期にかけて脱ユビキチン化され、M期からG₁期にかけて再ユビキチン化される²⁸。抗ユビキチン化H2A抗体を用いて調べると増殖していない細胞ではユビキチン化のレベルが低く、さらに増殖細胞核抗原とヒストンH2Aのユビキチン化が共局在することも報告されている²⁹。しかし培養細胞の種類によっては抗ユビキチン化H2A抗体を用いて調べるとG₂期からM期にかけてユビキチン化は亢進する(未発表)。これらの報告には一貫性がなく、これらヒストンH2Aのユビキチン化と細胞周期など生物学的現象との関連における相違には、実験に用いた臓器、組織、細胞の種類のみでなく、アイソトープラベルによる検出や抗体による検出など実験方法も関与していると考えられる。

遺伝子転写に関してはユビキチン化が遺伝子転写を抑制することが多くの報告によって示され、一致した意見となっている。我々も静止期と再生肝臓を用いて免疫沈降を行った後、遺伝子転写抑制とヒストン H2A のユビキチン化との関連を確認した。すなわち抗 H3K4 メチル化抗体、抗 H3K9 メチル化抗体を用いて免疫沈降を行い、抗ユビキチン化ヒストン H2A 抗体でウエスタンブロットを行い、ヒストン H2A ユビキチン化が転写活性化されているクロマチンと転写抑制されているクロマチンのどちらの分画に存在しているかを調べた。ユビキチン化ヒストン H2A は抗 H3K9 メチル化抗体により免疫沈降されたクロマチンで濃縮しており、ユビキチン化が遺伝子転写を抑制することを示すデータとなった。我々はさらに試験管内のクロマチンの再構築と遺伝子転写の系により、ヒストン H2A のユビキチン化が遺伝子転写に与えるメカニズムを詳細に検討

した¹⁵⁾。ユビキチン化ヒストン H2A と H2B, H3-H4 又は H2A-H2B, H3-H4 を用いて NAP-1 (nucleosome assembly protein 1) と ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) によりクロマチンを形成した^{30,31)}。ヒストン H2A のユビキチン化によりクロマチン中のヌクレオソームの間隔などに違いは認めなかったが、ユビキチン化ヒストン H2A は試験管内遺伝子転写を抑制することを明らかにした。さらにユビキチン化ヒストン H2A は MLL3 による H3K4 のメチル化を抑制することにより遺伝子転写開始を抑制することを明らかにした。ヌクレオソーム構造のなかでヒストン H3K4 とヒストン H2AK119 は近傍に位置している (図 1)。また、試験管内でクロマチン形成と遺伝子転写開始複合体の順序を変えることにより、ユビキチン化ヒストン H2A は遺伝子転写開始複合体形成を抑制することを明らかにした。興味深いことに H3K4 をメチル

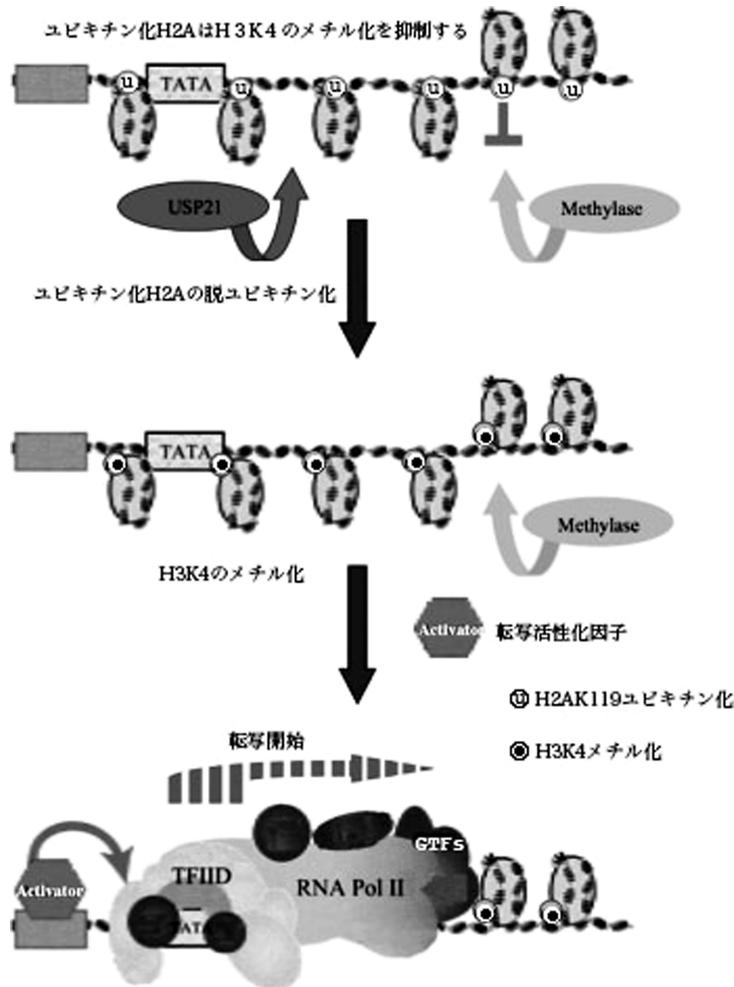


図2 ヒストン H2A の翻訳後修飾と遺伝子転写開始の調節
ユビキチン化ヒストン H2A は H3K4 のメチル化を抑制することにより、間接的に遺伝子転写開始を抑制する。USP21 によりヒストン H2A が脱ユビキチン化されるとメチル化が引き起こされ転写活性化因子により遺伝子転写が開始する。(文献 15 より改変・引用)

化模倣のアルギニンに置換するとユビキチン化ヒストン H2A は遺伝子転写開始複合体形成も遺伝子転写伸長も抑制しないことが明らかとなった。すなわち試験管内の詳細な解析により、ユビキチン化ヒストン H2A は H3K4 のメチル化を抑制することにより、間接的に遺伝子転写開始を抑制し、一旦遺伝子転写複合体ができると遺伝子転写開始も遺伝子転写伸長も抑制しないことを明らかにした¹⁵⁾ (図 2 で概略を示した)。

おわりに

ヒストン H2A のユビキチン化は高等真核生物にのみ見られる翻訳後修飾であり細胞の分化やがん化などと密接に関連していることが予想される。様々な生物学的な現象がヒストン H2A のユビキチン化および脱ユビキチン化と関連したヒストンコードのネットワークにより調節されている。これらのネットワークを理解するためには遺伝子配列とそこに作用するタンパク質、それらの翻訳後修飾などによる相互作用の総合的な理解が必要となる。

文 献

- Berger, S.L. (2002) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 142-148.
- Mellor, J. (2005) *Mol. Cell*, **19**, 147-157.
- Kouzarides, T. (2007) *Cell*, **128**, 693-705.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., & Richmond, T.J. (1997) *Nature*, **389**, 251-260.
- Rando, O.J. (2007) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **17**, 94-99.
- Aihara, H., Nakagawa, T., Yasui, K., Ohta, T., Hirose, S., Dhomae, N., Takio, K., Kaneko, M., Takeshima, Y., Muramatsu, M., & Ito, T. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 877-888.
- Ito, T. (2007) *J. Biochem.*, **141**, 609-614.
- Oki, M., Aihara, H., & Ito, T. (2007) *Subcell. Biochem.*, **41**, 319-336.
- Goldknopf, I.L., Taylor, C.W., Baum, R.M., Yeoman, L.C., Olson, M.O., Prestayko, A.W., & Busch, H. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7182-7187.
- Goldknopf, I.L. & Busch, H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 864-868.
- Goldknopf, I.L., French, M.F., Musso, R., & Busch, H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5492-5495.
- Jason, L.J., Finn, R.M., Lindsey, G., & Ausio, J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 4975-4982.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., & Zhang, Y. (2004) *Nature*, **431**, 873-878.
- Joo, H., Zhai, L., Yang, C., Nie, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chang, C., & Wang, H. (2007) *Nature*, **449**, 1068-1072.
- Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M., & Ito, T. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 37-49.
- Robzyk, K., Recht, J., & Osley, M.A. (2000) *Science*, **287**, 501-504.
- West, M.H. & Bonner, W.M. (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4671-4680.
- Thorne, A.W., Sautiere, P., Briand, G., & Crane-Robinson, C. (1987) *EMBO J.*, **6**, 1005-1010.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., & Berger, S. L. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 2648-2663.
- Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., & Chen, J. (2007) *Cell*, **131**, 901-914.
- Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., Pelletier, L., Jackson, S.P., & Durocher, D. (2007) *Science*, **318**, 1637-1640.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007) *Cell*, **131**, 887-900.
- Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, J., Ohgi, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Glass, C., & Rosenfeld, M. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 609-621.
- Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H.G., Krasnov, A., Georgieva, S.G., Schüle, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L., & Devys, D. (2008) *Mol. Cell*, **29**, 92-101.
- Zhang, X.Y., Varthi, M., Sykes, S.M., Phillips, C., Warzecha, C., Zhu, W., Wyce, A., Thorne, A.W., Berger, S.L., & McMahon, S.B. (2008) *Mol. Cell.*, **29**, 102-111.
- Nicassio, F., Corrado, N., Vissers, J.H., Areces, L.B., Bergink, S., Marteijn, J.A., Geverts, B., Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W., Di Fiore, P.P., & Citterio, E. (2007) *Curr. Biol.*, **17**, 1972-1977.
- Wunsch, A., Haas, A., & Lough, J. (1987) *Dev. Biol.*, **119**, 85-93.
- Wu, R.S., Kohn, K.W., & Bonner, W.M. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 5916-5920.
- Vassilev, A., Rasmussen, H., Christensen, E., Nielsen, S., & Celis, J. (1995) *J. Cell Sci.*, **108**, 1205-1215.
- Ito, T., Bulger, M., Pazin, M.J., Kobayashi, R., & Kadonaga, J. T. (1997) *Cell*, **90**, 145-155.
- Ito, T., Levenstein, M.E., Fyodorov, D.V., Kutach, A.K., Kobayashi, R., & Kadonaga, J.T. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1529-1539.