

## ヒストンのメチル化と脱メチル化 —脱メチル化を中心に—

### 1. はじめに

真核生物において、ヒストンは非ヒストンタンパク質と共にクロマチン構造を形成し、DNAをコンパクトに核内に収納している。このヒストンには、アセチル化・メチル化・リン酸化・ユビキチン化といった翻訳後共有結合修飾が起こる。そしてこれらの修飾は、エピジェネティクスを制御する主要なメカニズムであるクロマチン構造変換制御において重要な役割を果たし、様々な生物学的プロセスにおいて機能している。この翻訳後修飾の機能を解明する上で、修飾の可逆性、及びその制御メカニズムを知ることは必要不可欠である。それ故、これらの翻訳後修飾の中で可逆性が不明であったメチル化は、その可逆性が大きな議論的であり、最近まで不可逆的な修飾であると考えられていた。そこで筆者らは、この議論に結論を出すべくヒストン脱メチル化酵素の同定を試み、新規ヒストン脱メチル化酵素ファミリーとしてJHDM (JmJC (Jumonji C terminal) domain-containing histone demethylase) ファミリーを同定した。本稿では、ヒストンのメチル化修飾の制御機構について、脱メチル化に焦点を当てて述べてみたい。

### 2. ヒストンのメチル化機構とその機能

メチル化修飾はヒストンのリジンとアルギニンの両アミノ酸残基において起こる。リジンにおいては、モノ・ジ・トリメチル化が起こるが、アルギニンにおいては、モノ・ジ (シンメトリックまたはアシンメトリックタイプ) メチル化のみが起こる (図 1A)。ヒストンのメチル化を触媒する酵素は、PRMT (protein arginine methyltransferase) ファミリー・SET (SU(VAR)3-9, enhancer of zeste, trithorax) ドメイン含有タンパク質ファミリー・Dot1 (disruptor of telomeric silencing 1) タンパク質ファミリーの三つの異なるタンパク質ファミリーに属する。PRMT ファミリーはアルギニンのメチル化を触媒するが、タイプ I 及び II が共にモノメチル化を触媒することが可能であるのに対し、タイプ I はアシンメトリックタイプのジメチル化、タイプ II はシンメトリックタイプのジメチル化をそれぞれ触媒する (図 1A)。SET ドメイン含有タンパク質ファミリー、及び非 SET ドメインタンパク質である Dot1 タンパク質ファミ

リーはリジンのメチル化を触媒するが、メチル化部位及びモノ・ジ・トリメチル化のどの状態からどの状態までを触媒するかには特異性がそれぞれある (図 3B)。

ヒストンのメチル化は、ヘテロクロマチン形成・X染色体不活性化・転写制御といった様々な生物学的プロセスに関与していることが過去数年の間に示されてきた。特にリジンのメチル化は、一般的に転写の活性化に関与するアセチル化とアルギニンのメチル化とは異なり、メチル化部位の違いによって転写の活性化と不活性化の両方にシグナルを送ることが可能である。更には同一部位であってもメチル化状態の違いにより、生物学的プロセスにおける機能が異なりうる。ヒストンの翻訳後修飾は、クロマチン構造変換に重要な役割を果たすことが示唆されているが、メチル化がどのようなメカニズムにより構造変換に機能するのかについては、十分な解明には至っていない。メカニズムの一つとして、アセチル化がリジンの正電荷を中和することで構造変換を引き起こすような直接的作用が考えられるが、メチル化では現在までそのような直接的作用は報告されていない。もう一つのメカニズムとして、クロマチン構造変換を担う分子をリクルートする足場の提供が考えられる。メチル化部位、及び状態特異的に結合する分子群が同定されており、これらを特異的にリクルートすることが、部位及び状態特異的なメチル化の機能として重要であると考えられている (図 1B)。

### 3. メチル化ヒストンの効力消去機構

ヒストンの翻訳後修飾の中で、メチル化についてはその可逆性が、最近の脱メチル化酵素の同定まで不明であり、大きな議論的であった。不可逆性を支持する証拠としてヒストンとそのメチル化リジン残基の半減期がほぼ同じであるという報告がある一方、可逆性を支持する証拠としてメチル基のターンオーバーはわずかではあるが検出されるという報告があったが、不可逆的なものであるとの考えが支配的であった<sup>1)</sup>。それ故、脱メチル化酵素の同定前には、これから述べるようなメチル化の効力を打ち消すメカニズムが考えられ、証明されている。

#### ① バイナリースイッチ

隣接する異なる修飾が、他方の修飾部位とその結合タンパク質とのアフィニティーを減少させ、結合を阻害することにより、修飾の効力を打ち消すというメカニズムである。メチル化では、ヒストン H3K9 (9番目のリジン) のメチル化が持つ HP1 (heterochromatin protein 1) タンパク質をリクルートする機能が、隣接する S10 のリン酸化に

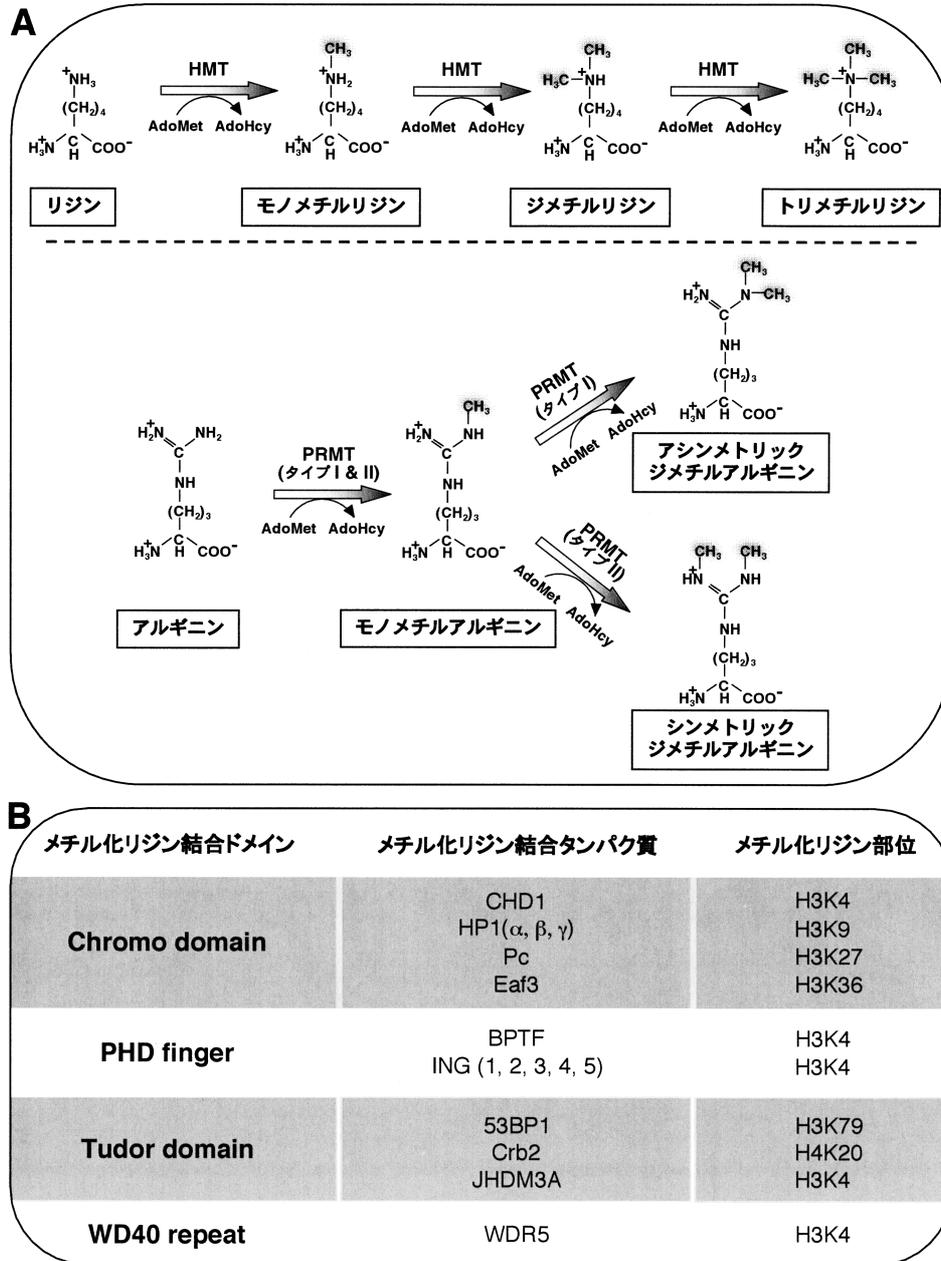


図1 メチル化機構と結合タンパク質

(A)メチル化の反応機構. 上段にリジン, 下段にアルギニンのメチル化の反応機構を示した. HMT (histone methyltransferase), AdoMet (*S*-adenosyl-L-methionine), AdoHcy (*S*-adenosyl-L-homocysteine)

(B)メチル化リジン結合タンパク質. メチル化リジン結合タンパク質とその結合ドメイン, 及びメチル化部位を示した. PHD (plant homeodomain), CHD1 (chromodomain helicase DNA binding protein 1), Pc (polycomb), Eaf3 (Esa1 associated factor 3), BPTF (bromodomain and PHD finger transcription factor), ING (inhibitor of growth), 53BP1 (p53 binding protein 1), WDR5 (WD repeat-containing protein 5)

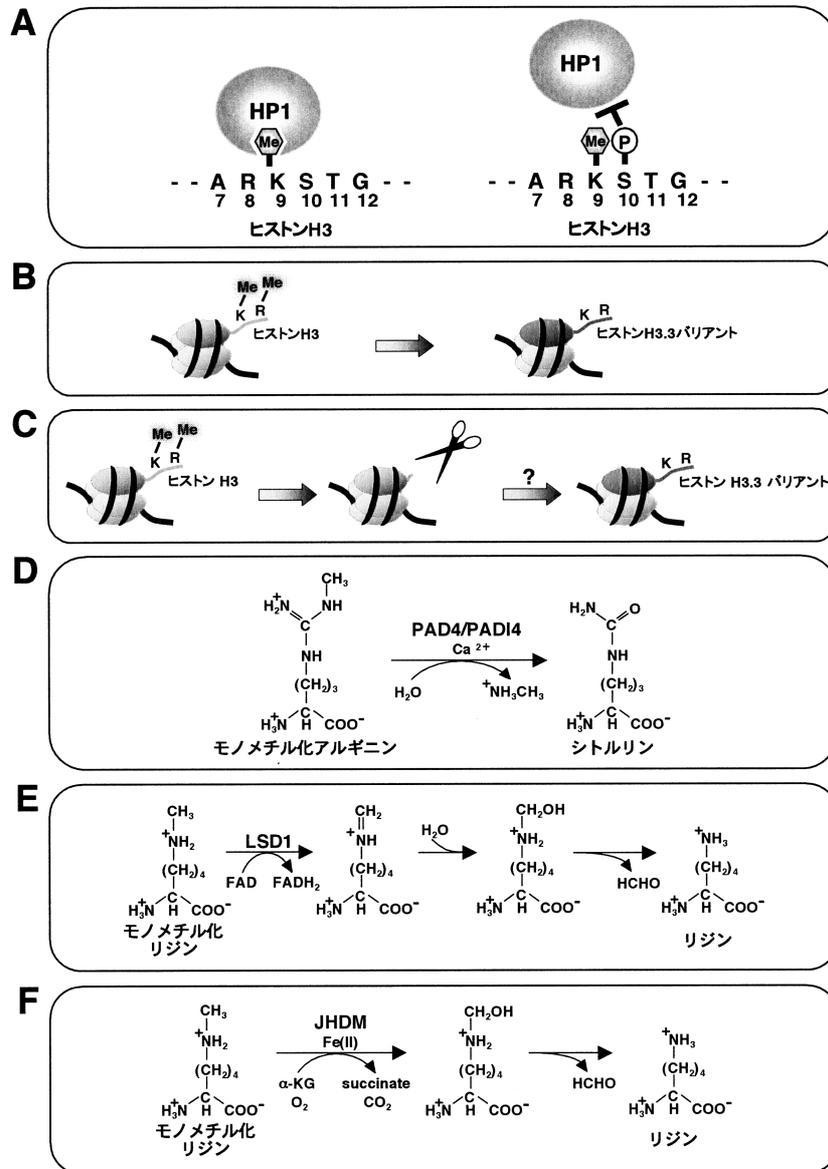


図2 メチル化ヒストンの効力消去機構

(A) バイナリースイッチ

(B) ヒストンバリエントによる置換

(C) N末端テール部のクリッピング

(D) PAD4/PADI4によるモノメチル化アルギニンの脱イミノ化. この反応はジメチル化アルギニンにおいては起こらず, 未・モノメチル化アルギニンの部位による基質特異性は低い.

(E) LSD1ファミリーが触媒する酸化によるモノメチル化リジンの脱メチル化. 同様の反応がジメチル化リジンにおいても起こるが, トリメチル化リジンでは起こらない.

(F) JHDMファミリーが触媒する酸素添加・水酸化反応によるモノメチル化リジンの脱メチル化. 同様の反応がジ・トリメチル化リジンにおいても可能である.

$\alpha$ -KG ( $\alpha$ -ketoglutarate)

より失われることが証明されている<sup>2,3)</sup> (図2A)。

#### ② ヒストンバリエーションによる置換

メチル化ヒストンを未メチル化ヒストンと置換することにより、メチル化ヒストンの効力を消去するメカニズムである。これは、ショウジョウバエやほ乳類細胞の転写の活性化領域において観察されるDNA複製非依存的なヒストンH3バリエーションH3.3の置換が、サイレンシング状態の遺伝子からそれを担うヒストン修飾を迅速に取り去るためのものであると考えられることから提案されている<sup>4-6)</sup> (図2B)。

#### ③ N末端テール部のクリッピング

メチル化修飾を受けているヒストンのN末端テールを切断することで、その効力を消去するメカニズムである。これは、テトラヒメナにおいてN末端6アミノ酸残基が切断されたヒストンH3が、転写の起こっていない小核に特異的に存在し、欠損部位には転写活性化に関与するメチル化部位であるR2とK4を含むことから提案されている<sup>7)</sup> (図2C)。切断後、正常なヒストンとの置換が起こるかは不明である。

#### ④ 脱イミノ化

PAD4/PADI4 (peptidyl arginine deiminase 4) が脱イミノ化を触媒し、メチル化アルギニンをも別のアミノ酸であるシトルリンに変換することでメチル化の効力を消去するメカニズムである<sup>8,9)</sup> (図2D)。しかし、シトルリンがアルギニンに戻るのか、その場合はどのようにして戻るのかは不明である。

#### ⑤ 脱メチル化

酵素による触媒により、メチル基のみを除去することでメチル基の効力を消去する最も直接的なメカニズムである。しかしながら、最近まで脱メチル化酵素の存在は不明であった。

### 4. ヒストン脱メチル化酵素

ヒストン脱メチル化酵素の研究の歴史を遡ると、1964年にメチル化した遊離リジンの脱メチル化酵素が同定されたことに始まったと言える<sup>10)</sup>。その約10年後、同じグループによりヒストン脱メチル化酵素活性の部分的な精製が行われたが、酵素分子本体の同定には至らなかった<sup>11)</sup>。これらの研究はヒストン脱メチル化酵素の存在を示唆したが、*in vitro*での脱メチル化活性の検出が技術的に困難であったことから、その後約30年間、ヒストン脱メチル化酵素の研究に進展は無かった。この長い沈黙の期間を経て、最近異なるメカニズムにより脱メチル化を触媒する二

つのヒストン脱メチル化酵素ファミリーの同定が行われたのである。

#### ① LSD1 ファミリー

2004年、Dr. Shiらのグループは、いくつかのヒストン脱アセチル化酵素複合体の共通の構成因子であるKIAA0601というFAD (flavin adenine dinucleotide) 依存のアミノキシダーゼの複合体における役割に疑問を持ち、この酸化酵素の酵素反応機構からヒストン脱メチル化酵素としての可能性を調べた結果、この分子がモノ・ジメチル化ヒストンH3K4からの脱メチル化反応を触媒するヒストン脱メチル化酵素であることを証明した<sup>12)</sup>。彼らがLSD1 (lysine specific demethylase 1) と名付けたこの酵素は酸化反応により脱メチル化を触媒する酸化酵素である。この反応はメチル化リジンから水素原子をFADに転移させることでイミン中間体を生成する (図2E)。このイミン中間体は自然に起こる加水分解により非常に不安定なカルビノールアミン中間体を生成し、この不安定な中間体からホルムアルデヒドが放出され脱メチル化反応が完了する (図2E)。この反応は、リジンのε-アミノ基の窒素がプロトン化されていることが必要なため、トリメチル化リジンでは起こらない。メチル化部位の基質特異性はH3K4だが、LSD1のアンドロゲン受容体との相互作用によりH3K9に変わることが報告されている。また、LSD1にはほ乳類において非常に類似したタンパク質であるAOF1 (amine oxidase, flavin containing 1) が存在するが、この分子の脱メチル化酵素活性についてはまだ報告はされていない。

#### ② JHDM ファミリー

Dr. Shiらのグループが脱メチル化酵素候補分子からのアプローチを行ったのに対し、筆者らは生化学的酵素活性解析とクロマトグラフィーを組み合わせたアプローチにより酵素の同定を試みた<sup>1)</sup>。筆者らは、まずA1KBというDNA脱メチル化酵素が触媒する反応が、その類似性からヒストンの脱メチル化にも用いられている可能性があるかと推測した。そして、この反応産物であるホルムアルデヒドの検出により脱メチル化活性を検出すべく、ホルムアルデヒドの高感度検出系を構築した。そして2005年、筆者らが、この検出系を用いて検出した脱メチル化酵素活性を指標にし、クロマトグラフィーによりHeLa細胞の核タンパク質画分から精製したのがモノ・ジメチル化ヒストンH3K36の脱メチル化酵素JHDM1Aである<sup>13)</sup>。JHDM1Aは、酸素添加/水酸化反応により脱メチル化を触媒する酸素添加/水酸化酵素である。JHDM1Aは、補酵素としてFe(II)とアルファケトグルタル酸を用いて、水酸基をメチ

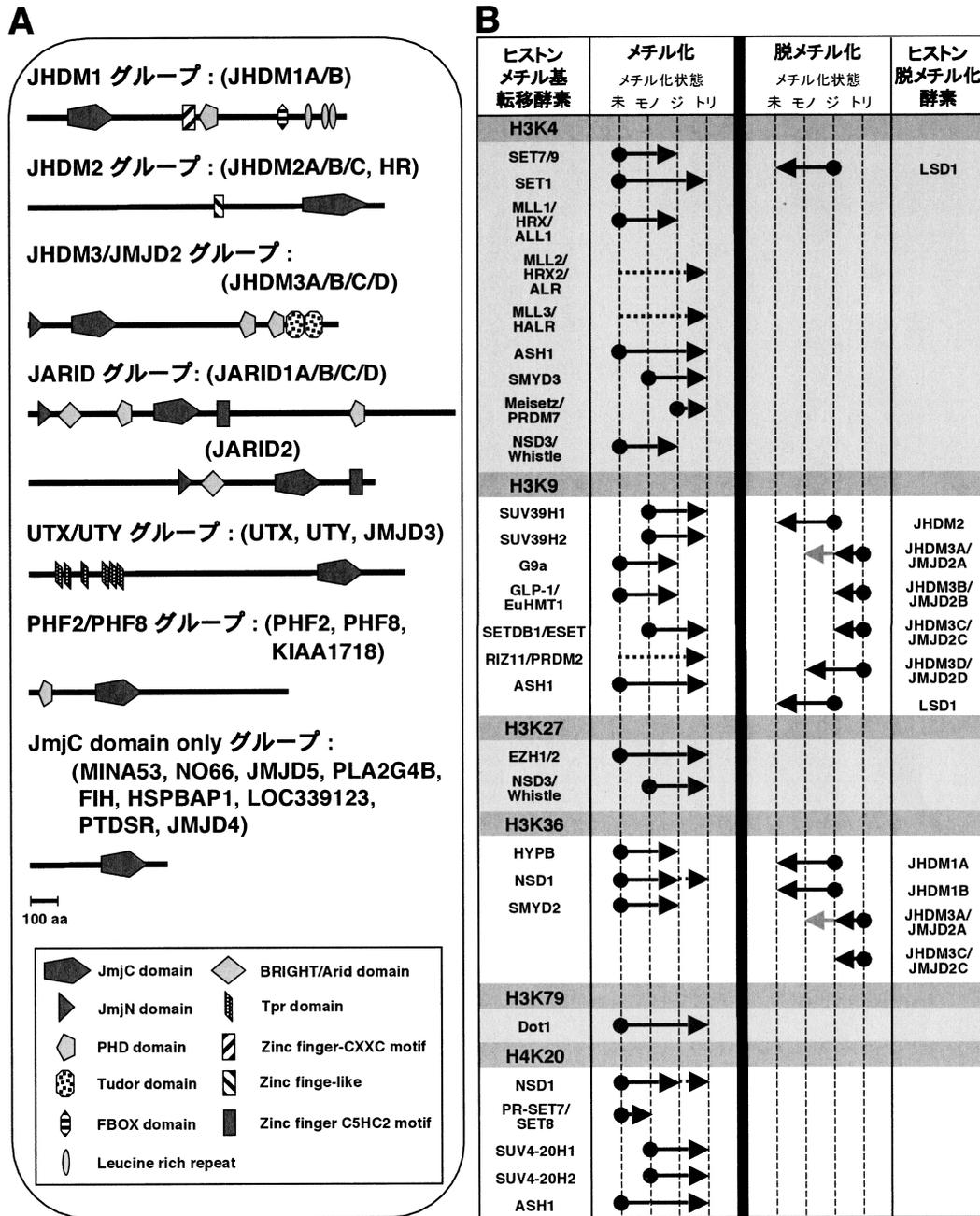


図3 (A) JmjC ドメイン含有タンパク質ファミリー。ほ乳類における JmjC ドメイン含有タンパク質ファミリーを構成するタンパク質を七つのグループに分類し、それぞれの特徴的ドメイン構成を示した。HR (hairless), PHF (PHD finger protein), JARID (Jumonji, AT-rich interactive domain), UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X chromosome), UTY (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on Y chromosome), MINA53 (Myc-induced nuclear antigen with a molecular mass of 53kDa), PLA2G4B (phospholipase A2, group 4B), FIH (factor inhibiting HIF1), HSPBAP1 (heat-shock 27kDa protein-associated protein 1), PTDSR (phosphatidylserine receptor), JmjN (Jumonji N-terminal), BRIGHT (B-cell regulator of IgH transcription), Arid (AT-rich interaction domain), Tpr (tetratricopeptide repeat) (B) ヒストンメチル基転移酵素及び脱メチル化酵素の基質特異性。これまでに報告されているヒストンメチル基転移酵素及び脱メチル化酵素の基質特異性を示した。矢印はどの状態からどの状態までのメチル化または脱メチル化を触媒するかを示す。破線の矢印は、メチル化状態が不明のものを示す。灰色の矢印は弱い活性を示す。(文献19より改変) MLL (mixed lineage leukemia), HRX (homolog of trithorax), ALL (acute lymphocytic leukemia 1), ALR (ALL1-related gene), HALR (homologous to ALR), ASH (absent, small, or homeotic), SMYD (SET and MYND domain-containing protein) PRDM (PR domain-containing protein), NSD (nuclear receptor-binding SET domain-containing protein), GLP-1 (G9a-like protein 1), EHMT1 (euchromatin histone methyltransferase 1), SETDB1 (SET domain, bifurcated 1), ESET (ERG-associated protein with SET domain), RIZ1 (retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene 1), EZH (enhancer of zeste homolog), HYPB (huntingtin interacting protein B),

ル基に導入する (図 2F). この結果生成された不安定なカルピノールアミン中間体はホルムアルデヒドを放出し脱メチル化が完了する (図 2F). この反応は LSD1 のように, トリメチル化リジンからは脱メチル化できないという制限は無い. また, 筆者らは JHDM1A の持つ JmjC ドメインが触媒ドメインであることを証明し, このドメインを持つタンパク質が形成する酵母からヒトまで進化的に保存されたファミリーが, 脱メチル化酵素候補分子群であることを示唆した. この JmjC ドメイン含有タンパク質ファミリーは, 系統樹及びそのドメイン構成から七つのグループに分けられる (図 3A). このうち, 現在までに三つのグループがヒストン脱メチル化酵素であることが筆者らを含めた四つの研究グループから報告されている\*. JHDM2 はモノ・ジメチル化ヒストン H3K9 を基質とし, JHDM3/JMJD2 (Jumonji domain containing 2) /GASC1 (gene amplified in squamous cell carcinoma 1) は主にトリメチル化ヒストン H3K9・K36 を基質としている<sup>14-18)</sup>. これまでに見つかった脱メチル化酵素の基質特異性がメチル基転移酵素と同様に, メチル化部位のみでなくメチル化状態にもあること, 及びどのメチル化状態からどの状態まで脱メチル化を行うかに特異性があることは, メチル化部位及び状態により機能が異なり, その厳密な制御が必要であることを示唆するものであると考えられる (図 3B).

近い将来, 残りの四つのグループの中から更にヒストン脱メチル化酵素が同定されることは疑いないだろう\*. また, これまでヒストン H3K4・K9・K36 の脱メチル化酵素が同定されたが, 機能解析の進んでいる他のメチル化部位 H3K27・K79・H4K20, そしてアルギニンの脱メチル化酵素が存在するのか, その場合, JmjC ドメイン含有タンパク質ファミリーから見つかるのか, または別の新しい脱メチル化酵素ファミリーが存在するのか, と疑問は尽きず, 研究の進展が期待される.

## 5. おわりに

これまで生命現象の未知のメカニズムは, その制御因子の同定・機能解析により解明されてきたと言っても過言ではない. ヒストン脱メチル化酵素の同定は, ヒストンのメ

チル化が可逆的な修飾であることを明らかにし, これまでに形成されたメチル化ヒストンの効力消去機構及びメチル化の生理機能に関する概念の見直しを余儀無くした. 今回, メチル化制御機構について脱メチル化に焦点を絞って述べたが, メチル化はヒストンの翻訳後修飾の中の一つであり, その翻訳後修飾はクロマチン構造変換制御因子の一つである. エピジェネティクスを制御する主要なメカニズムであるクロマチン構造変換制御の研究はまだまだ発展途上の研究分野であり, 多くの未発見の制御因子の存在は疑いなく, 現状では研究の進展にはそれら制御因子の同定及び機能解析が有効であると筆者は考える. エピジェネティクスの研究は, その再生医療への応用などから非常に関心が高い. 実際に再生医療への応用が迅速に進むよう, 研究の進展が望まれる. 本稿が読者の研究に何らかの形で貢献できれば幸いである.

- 1) Tsukada, Y. & Zhang, Y. (2006) *Methods*, 40, 318-326.
- 2) Fischle, W., Wang, Y., & Allis, C.D. (2003) *Nature*, 425, 475-479.
- 3) Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., & Allis, C.D. (2005) *Nature*, 438, 1116-1122.
- 4) Ahmad, K. & Henikoff, S. (2002) *Mol. Cell*, 9, 1191-1200.
- 5) Janicki, S.M., Tsukamoto, T., Salghetti, S.E., Tansey, W.P., Sachidanandam, R., Prasanth, K.V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R.H., & Spector, D.L. (2004) *Cell*, 116, 683-698.
- 6) Johnson, K., Pflugh, D.L., Yu, D., Hesslein, D.G., Lin, K.I., Bothwell, A.L., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D.G., & Calame, K. (2004) *Nat. Immunol.*, 5, 853-861.
- 7) Allis, C.D., Bowen, J.K., Abraham, G.N., Glover, C.V., & Gorovsky, M.A. (1980) *Cell*, 20, 55-64.
- 8) Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., & Kouzarides, T. (2004) *Cell*, 118, 545-553.
- 9) Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., Roeder, R.G., Clarke, S., Stallcup, M.R., Allis, C.D., & Coonrod, S.A. (2004) *Science*, 306, 279-283.
- 10) Kim, S., Benoiton, L., & Paik, W.K. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 3790-3796.
- 11) Paik, W.K. & Kim, S. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, 165, 369-378.
- 12) Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., & Shi, Y. (2004) *Cell*, 119, 941-953.
- 13) Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006) *Nature*, 439, 811-816.
- 14) Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage,

\*この原稿の出稿から掲載までの間に, JHDM ファミリーの中の JARID グループが H3K4 の脱メチル化酵素であることが, 複数の研究グループから種々のモデル生物を用いて約 10 報ほどの論文によってほぼ同時に報告された.

- H., Tempst, P., Wong, J., & Zhang, Y. (2006) *Cell*, 125, 483–495.
- 15) Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., & Zhang, Y. (2006) *Nature*, 442, 312–316.
- 16) Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolnikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M., & Shi, Y. (2006) *Cell*, 125, 467–481.
- 17) Cloos, P.A.C., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., & Helin, K. (2006) *Nature*, 442, 307–311.
- 18) Fodor, B.D., Kubicek, S., Yonezawa, M., O'Sullivan, R.J., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G., & Jenuwein, T. (2006) *Genes Dev.*, 20, 1557–1562.
- 19) Shi, Y. & Whetstine, J.R. (2007) *Mol. Cell*, 25, 1–14.

東田 裕一

(国立大学法人九州大学生体防御医学研究所  
細胞機能制御学部門分子発現制御学分野)

Histone methylation and demethylation—Focusing on demethylation—

Yuichi Tsukada (Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Cell Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan)

## ホタル発光のなぞ

### はじめに

ホタルのルシフェラーゼの発光反応は、分子生物学や細胞生物学研究は無論のこと、*in vivo* の分子イメージングなどの基礎医学研究でも広く用いられている。この発光反応の最大のなぞの一つは、発光色制御のメカニズムである。長らく謎だったこの仕組みが、発光色の異なるルシフェラーゼの反応過程の各段階の結晶構造を精密に解析することによりようやく明らかになった<sup>1)</sup>。本稿では、ホタルの発光反応色の制御メカニズムの研究動向について紹介する。

#### 1. ホタル・ルシフェラーゼの発光反応と発光色の制御メカニズム

ホタルの発光反応は、発光酵素ルシフェラーゼ (EC 1.13.12.7) によって発光基質の化学エネルギーが光へと変換されるものである<sup>2,3)</sup>。発光反応は図 1a に示すように

2段階で進行する。まず発光基質ルシフェリンのカルボキシ基が ATP の  $\alpha$  位のリン酸基を攻撃し、ルシフェリル AMP 中間体を酵素中で一旦生成し、ピロリン酸 (PPi) が放出される。次いで、酸素がこの中間体と反応して、AMP, CO<sub>2</sub> とともに、励起状態のオキシルシフェリンが生成し、これが基底状態へと移動する際、エネルギーを可視光として放出する。このエネルギー変換の量子収率は極めて高く、ほぼ 90% に達する<sup>4)</sup>。

この発光反応の最大のなぞの一つは、発光色制御のメカニズムである。ホタルの発光はふつう黄緑色を示す。しかし、酸性 pH 条件下でルシフェラーゼ反応を行うと発光色が赤色に変化する。また、ルシフェリン誘導体を酵素非存在下で反応させた場合も発光は赤色になってしまう。この発光色の変化は、発光するときのオキシルシフェリンがケト-エノール互変異性により変化し、エノール型が黄緑色に発光し、ケト型が赤色に発光するという説が唱えられてきた<sup>5)</sup> (図 1a ではケト型のみ記載)。ところが、ジャマイカ産のヒカリコメツキ (*Pyrophorus plagiophalamus*) というホタルの仲間では、多種類のルシフェラーゼ遺伝子を体内に持っており、例えば、背は緑色に腹が黄色に発光する<sup>6)</sup>。さらに、梶山らは、ゲンジボタルのルシフェラーゼ遺伝子にランダム変異を導入することにより赤色に発光するルシフェラーゼを作り出した<sup>7)</sup>。配列解析の結果、Ser 286 が Asn に変換されている (S286N) ことが判明した (図 1c)。ヒカリコメツキや S286N の場合、基質や反応条件はまったく同じであるわけであるから、発色の違いをケト-エノールの違いで説明するには無理がある。これらアミノ酸配列の違いと発光色の関わりが報告されると、McCapra は、オキシルシフェリン分子の簡単な量子化学計算などを基に、オキシルシフェリンの構造はケト型であり、発光色の違いは、励起状態におけるオキシルシフェリンの二つの環構造の相対角度 (C2-C2' 結合の回転角度) の違いに由来するという説を提出した<sup>8)</sup>。この角度の制御にルシフェラーゼの立体構造の違いが関与していると考えれば矛盾しないだろう。

#### 2. 北アメリカホタル・ルシフェラーゼの結晶構造決定と変異体解析

北アメリカホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼの結晶構造が 1996 年に Conti らによって決定された (図 2 a)<sup>9)</sup>。ルシフェラーゼは、N 末端側の大ドメインと C 末端側の小ドメインの二つから構成されていることが判明した。ただし、基質や生成物など ATP やルシフェリン関連