



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（生体情報）
報告番号	甲第 1500 号
学位記番号	第 13 号
氏名	西淵 剛平
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	HP1 のリン酸化修飾制御とその機能の解明
論文審査担当者	主査： 中山 潤一 副査： 湯川 泰，田上 英明，大隅 圭太

名古屋市立大学 博士学位論文

HP1 のリン酸化修飾制御とその機能の解明

2015 年

西淵 剛平

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

目次

要旨	1
第一章 序論 —研究背景—	3
1-1 緒言	4
1-2 ヘテロクロマチン	6
1-3 ヒストンのメチル化修飾とクロマチン構造	8
1-4 Heterochromatin Protein 1	11
1-4-1 クロモドメイン	12
1-4-2 クロモシャドウドメイン	13
1-4-3 N 末端領域とヒンジ領域	14
1-4-4 HP1 の翻訳後修飾	14
1-4-5 HP1 とヌクレオソームの相互作用	16
1-5 本研究の目的と意義	17
第二章 ヒト HP1 α の恒常的なリン酸化修飾とその機能	18
2-1 緒言	19
2-2 実験材料及び実験方法	20
2-2-1 使用した発現プラスミドの構築	20
2-2-2 使用した細胞の培養条件とプラスミドの導入	20
2-2-3 ウェスタンブロット解析	20
2-2-4 組換えタンパク質の調製	21
2-2-5 細胞抽出液の調製と分画	22
2-2-6 <i>in vitro</i> リン酸化アッセイ	23
2-2-7 FLAG タグを利用した免疫沈降	23
2-2-8 ヌクレオソームプルダウンアッセイ	24
2-2-9 ゲルシフトアッセイ	25
2-3 実験結果	26
2-3-1 細胞内における HP1 α のリン酸化状態の確認	26
2-3-2 HP1 α の恒常的なリン酸化を担う酵素の同定	27
2-3-3 大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製	29
2-3-4 HP1 α N 末端領域のリン酸化修飾によるヌクレオソーム結合特異性の獲得機構	31
2-4 考察	37

第三章	HP1 α の分裂期特異的リン酸化修飾制御とその機能	39
3.1	緒言	40
3.2	実験材料及び実験方法	41
3-2-1	使用した発現プラスミド	41
3-2-2	使用した細胞の培養条件とプラスミドの導入	41
3-2-3	ウェスタンブロット解析	41
3-2-4	組換えタンパク質の調製	42
3-2-5	FLAG タグを利用した免疫沈降	42
3-2-6	<i>in vitro</i> リン酸化及び脱リン酸化アッセイ	42
3-2-7	ヌクレオソームプルダウンアッセイ	42
3-2-8	ゲルシフトアッセイ	43
3-2-9	クロマチン分画アッセイ	43
3.3	実験結果	44
3-3-1	ヒト HP1 の分裂期特異的リン酸化修飾の検出	44
3-3-2	HP1 α の分裂期特異的リン酸化部位の同定	45
3-3-3	HP1 α の分裂期特異的リン酸化状態を制御する酵素の同定	46
3-3-4	大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製	51
3-3-5	HP1 α の分裂期特異的リン酸化修飾の機能	52
3.4	考察	54
第四章	結論	56
	参考文献	59
	学会発表一覧	64
	謝辞	

要旨

真核生物は非常に長大なゲノム DNA を核という小さな領域に収納する必要がある。そのためにゲノム DNA は、ヒストンという進化的に高度に保存された塩基性タンパク質に巻き付いたヌクレオソーム構造として存在し、さらにこの構造が高度に折りたたまれコンパクトにまとめられている。一方で細胞は発生や分化、細胞周期、外部環境に応じて遺伝子の発現を適切なレベルに調節する必要があり、その際このクロマチン構造を部分的に緩めたり、きつくしたりするメカニズムが重要となってくる。このようなクロマチンの構造変換は、DNA の一次配列の変化を伴わない遺伝現象として知られる「エピジェネティクス」を制御する重要な分子機構の一つとして注目されている。特に、クロマチンの主要構成因子であるヒストンの翻訳後修飾は、このエピジェネティックなクロマチンの構造変換において重要な役割を果たしている。

ヒストンにはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な修飾が付加される。その中でもヒストンのメチル化は、付加される残基によってその役割が大きく異なることが知られている。ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化修飾 (H3K9me) は、ヘテロクロマチンと呼ばれる凝縮したクロマチン構造の構築に必要である。反対に、ユークロマチンと呼ばれる緩んだ状態の活性化型クロマチン領域では、転写が活発な遺伝子のヒストン H3 の 4 番目のリジン残基にメチル化修飾 (H3K4me) が付与される。ヒストンのメチル化修飾はメチル化酵素、脱メチル化酵素によって可逆的に制御される反応であり、メチル化ヒストンを認識するリーダータンパク質によってその情報が読み取られる。

これまでさまざまなモデル生物の解析から、ヘテロクロマチンに特徴的な H3K9me を認識して結合する Heterochromatin Protein 1 (HP1) が、抑制的なクロマチン構造の形成に重要な役割を果たしている事が明らかにされている。HP1 には α 、 β 、 γ の 3 種類のファミリータンパク質が存在するが、どの HP1 も自身のクロモドメインを介して H3K9me に結合し、クロマチン構造変換を促進すると考えられている。一方で、HP1 自身が様々な翻訳後修飾を受けることが知られている。これまでに、哺乳類の HP1 α の N 末端側のセリンクラスターが恒常的にリン酸化されていること、そしてこの HP1 α

のリン酸化が H3K9me への結合を促進していることが明らかにされている。また、HP1 α が分裂期特異的にリン酸化されていることも示されている。しかしながら、依然として HP1 のリン酸化修飾がどのようにクロマチン結合に寄与しているのか、その詳細には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、まず HP1 α のリン酸化を制御する酵素を探索し、そこで同定したリン酸化酵素を大腸菌内で共発現させる方法によってリン酸化 HP1 α を大量調製した。次に、DNA や H3K9me ヌクレオソームに対するリン酸化 HP1 α の生化学的な性質を検証した。その結果、興味深いことに、HP1 α の N 末端側で起こる恒常的なリン酸化は、HP1 α と DNA との相互作用を変化させ、その結果として H3K9 未修飾のヌクレオソームに対する親和性を大きく減少させることで、H3K9me ヌクレオソームに対する特異性を高めていることが明らかになった。また、HP1 α の分裂期特異的に起こる付加的なリン酸化は、さらなる核酸結合能の低下を示すことが分かった。さらに、細胞を用いた解析ではこのリン酸化が分裂期クロマチンからの解離に寄与していることが明らかになった。一方で、分裂期の染色体において HP1 はその大部分がクロマチンから解離することが報告されている。一般的に、HP1 のクロマチンからの解離は、H3K9 の隣の 10 番目のセリン残基がリン酸化されることによって起きると考えられている。しかし、本研究によって分裂期における HP1 α 自身のリン酸化が、この解離の過程に関与していることが示唆された。以上の結果より、HP1 のリン酸化修飾は、HP1 のクロマチン結合をダイナミックに制御することで、ヘテロクロマチン動態制御に寄与していると考えられる。

今回、HP1 α のリン酸化修飾とヒストンのメチル化修飾の認識機構に着目したが、その他にもこれまでに数多くのヒストン修飾が発見され、その情報を認識する因子が同定されている。しかしながらそのほとんどは、認識を担うタンパク質の部分ドメインのみで議論され、翻訳後修飾を考慮しているものも少ない。より生体内に近い条件で行われた本研究の成果が、今後のクロマチン情報の認識機構の解明を目指す研究に役立つことが期待される。

第一章

序論 —研究背景—

1-1 緒言

真核生物のゲノム DNA は、ヒストンという進化的に高度に保存された塩基性タンパク質に巻き付いたヌクレオソーム構造として存在し、さらにこの構造が高度に折りたたまれコンパクトにまとめられたクロマチン構造を構築している。一方で細胞は発生や分化、細胞周期、外部環境に応じて遺伝子の発現を適切なレベルに調節する必要があり、その際このクロマチン構造を部分的に緩めたり、きつくしたりするメカニズムが重要となってくる。緩んだ状態のクロマチン構造はユークロマチンと呼ばれ、その対となる凝縮したクロマチン構造はヘテロクロマチンと呼ばれている。このようなクロマチンの構造変換は、DNA の一次配列の変化を伴わない遺伝現象として知られる「エピジェネティクス」を制御する重要な分子機構の一つとして注目されている。特に、クロマチンの主要構成因子であるヒストンの翻訳後修飾は、このエピジェネティックなクロマチンの構造変換において重要な役割を果たしている。

ヌクレオソームは、コアヒストンである H2A、H2B、H3、H4 それぞれの二分子ずつで構成される八量体に、約 146 bp の DNA が巻き付いて形成される (図 1-1)。真核生物の長大なゲノム DNA は、ヌクレオソームの集合からなるクロマチン構造によって細胞核への収納を可能にしている反面、転写や複製、DNA 損傷の修復などの場面ではこのクロマチン構造を部分的に緩める必要がある。各々のヒストンは、安定な八量体を形成するために必要な C 末端側のヒストンフォールドと、ヌクレオソームから突出し、特定の二次構造を持たない N 末端側のヒストンテイルという 2 つのドメインを有している。現在明らかになっている主要なヒストンへの翻訳後修飾は、このテイル領域に付加される (図 1-2)。ヒストンにはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な修飾が付加されるが、ここ十数年の短い間に次々と主要なヒストン修飾酵素が明らかにされていき、実際にゲノムの構造や機能と相関していることから爆発的に研究が進展した。ヒストンのメチル化修飾はアセチル化修飾と異なり、付加される部位によって機能が異なる。ヘテロクロマチンを制御する代表的なヒストンメチル化修飾として、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化修飾 (H3K9me) が知られている。この修飾は、Heterochromatin Protein 1 (HP1) と呼ばれるタンパク質によって認識され凝縮したクロマチン構造の足場となっていることがわかっている。

本研究では HP1 の翻訳後修飾とクロマチン結合について議論していくにあたり、この序論では、まず 2 節でヘテロクロマチンについて、3 節でヒストンのメチル化修飾制御クロマチン構造についての研究背景を記述する。続く 4 節ではヘテロクロマチンの形成に重要な HP1 についてそのドメイン構造を軸に概説する。最後に 5 節において本研究の目的と意義を明らかにする。

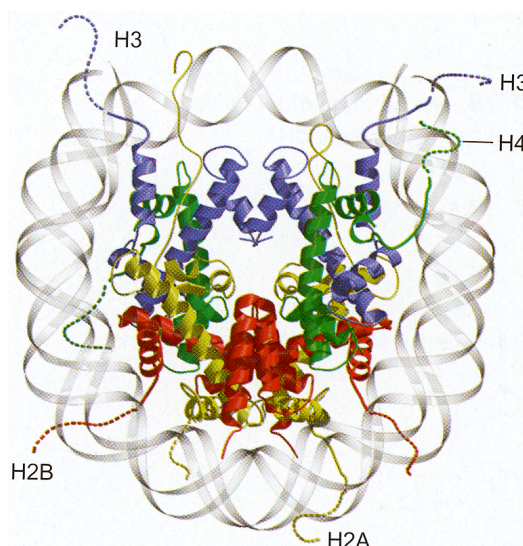


図 1-1 ヌクレオソームの結晶構造

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームはコアヒストンである H2A、H2B、H3、H4 それぞれの 2 分子ずつからなる 8 量体に DNA が 146bp 巻き付いた構造を取っている。(図は参考文献 1 より引用)



図 1-2 代表的なヒストン修飾

ヒストンにはリン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化など様々な化学修飾が付加される。そのほとんどはヒストンタンパク質の N 末端領域のヒストンテイル領域に付加される。(図は参考文献 2 を一部改変した)

1-2 ヘテロクロマチン

1879年に W. Flemming が、核内の構造体を顕微鏡で観察する際に使用した染色液(アニリン色素)でよく染まる構造体をクロマチンと名付けた (3)。その後顕微鏡による観察技術が発展し、1928年に E. Heitz は、よく染色される密度の濃いクロマチンをヘテロクロマチン、逆に染色が薄いクロマチンをユークロマチンと名付けた (3,4) (参考に DAPI 色素で DNA を蛍光染色したマウス細胞の染色図を図 1-3 に示す)。ヘテロクロマチンの中でも染色体の末端であるテロメアと、中心部のセントロメア近傍のペリセントリック領域に形成されるヘテロクロマチンを構成的ヘテロクロマチン(constitutive heterochromatin)、不活性化 X 染色体や発生関連の遺伝子など、発生段階や組織によって抑制される領域のヘテロクロマチンを条件的ヘテロクロマチン(facultative heterochromatin)と呼ぶ。顕微鏡下による形態的な特徴だけでなく、DNA 切断酵素の感受性の低さなどから、ヘテロクロマチンが非常にコンパクトに凝縮されていることが生化学的にも証明されている (4)。

基本的にヘテロクロマチン領域は遺伝子が少なく、繰り返し配列から構成されるが、ヘテロクロマチン領域に存在する数少ない遺伝子は転写抑制状態にある。1930 年代に H.J. Muller 等はショウジョウバエに X 線処理をすることによって、通常赤色の目が白色の混ざった斑な表現系を示す変異個体を得た (3,4)。この個体を解析したところ、目の色素を決める *White* 遺伝子座周辺が染色体の逆位によって、ヘテロクロマチン近傍に転位しているため抑制されていることを明らかとし、この現象を PEV (position effect variegation) と名付けた (3,4)。同様なヘテロクロマチン領域への遺伝子挿入による発現抑制は、酵母から哺乳類に至るまで観察されている。また、PEV の表現型を抑制するサプレッサーのスクリーニングによって、50 個にも及ぶヘテロクロマチン制御因子が同定されたことも重要な点である。

しかしながら、ヘテロクロマチンは単に転写を抑制するためだけに存在する領域ではない。哺乳類のような高等生物では、遺伝子とその転写に必要な領域はわずか数%程度であり、その残りはジャンク (がらくた) DNA などと言われているが、実際にはその非コード DNA の多くが様々な役割を担っている。哺乳類のペリセントリック領域はサテライト DNA と呼ばれる数百 bp 単位のリピート配列が、数 M bp~数十 M bp

の間繰り返されゲノム全体の数%にも及ぶ (6)。そこに形成されるヘテロクロマチン構造は染色体の正常な分配や、染色体の核内配置に重要であり、ゲノムの安定性に寄与していることが分かっている。

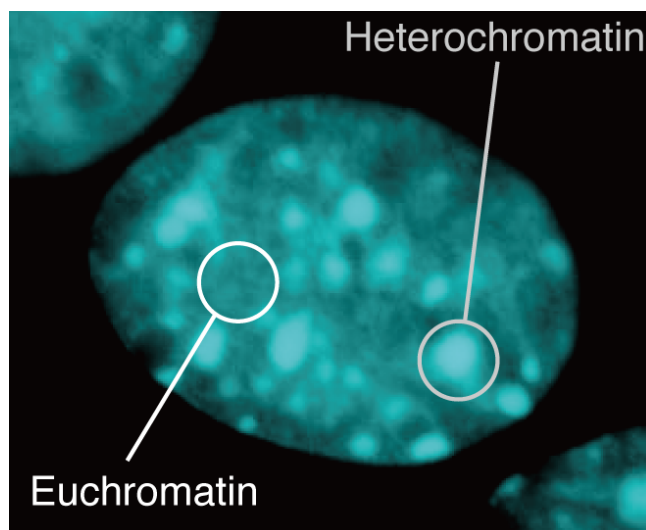


図 1-3 マウス細胞におけるクロマチン構造

マウス線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞を DAPI 染色し蛍光顕微鏡で観察した図。濃く染まっている部分が凝縮したヘテロクロマチンであり、淡く染色されている部分はユークロマチンと呼ばれる。(図は参考文献 5 を一部改変した)

1-3 ヒストンのメチル化修飾とクロマチン構造

現在では多くのタンパク質がアセチル化やメチル化などの翻訳後修飾を受けることが知られているが、ヒストンは古くからアセチル化やメチル化の修飾を受ける代表的なタンパク質として知られていた。ヒストンタンパク質自体は 1884 年の A. Kossel によって発見されていたが、DNA の二重らせん構造が明らかにされた約 10 年後の 1964 年に、V. Allfrey 等はヒストンにアセチル基、メチル基の付加が起こっていることを発見した (7)。この当時はまだ、ヌクレオソームがクロマチンの基本単位であることは明らかになっていなかった。その後アセチル化ヒストンの抗体を用いた解析などによって、ヒストンのアセチル化が転写の活性化領域と相関し、転写活性化のマークであることが示唆された (8)。しかし、実際にその直接的な証拠としてヒストンアセチル化酵素 (histone acetyl transferase: HAT) が同定されたのは、ようやく 1990 年代になってからである。1996 年に、D. Allis 等はテトラヒメナの大核の抽出液を用い、生化学的な手法により HAT 活性のあるタンパク質の単離、同定に成功した (9)。興味深いことに、単離された HAT は、ホモロジー解析によってすでに酵母で遺伝学的に単離されていた転写のコアクチベーターである Gcn5 と高い相同性を示すこと、さらに Gcn5 にも同様な HAT 活性があることが証明された。当時、エピジェネティクスと呼ばれる DNA の塩基配列の変化を伴わない遺伝現象について、DNA のメチル化を中心に議論が行われていたが、この発見によってヒストンの翻訳後修飾と遺伝子制御の関係が組み込まれ、急速に研究が進展するようになった。

ヒストンのアセチル化の解析が進む一方で、1994 年に G. Reuter 等は、変異により PEV を強力に抑圧するサプレッサーの 1 つとして *Su(var)3-9* を単離した。またその機能に重要な C 末端側に、酵母からヒトに至るまで保存されたドメインがあることを示した (10)。興味深いことにそのドメインはショウジョウバエで HOX 遺伝子群の抑制遺伝子として単離されたポリコムグループの Enhancer of zeste: E(z) と、逆に活性化に働く Trithorax タンパク質の中に共通して含まれるドメインであることがわかった。全く正反対の機能を持つタンパク質に含まれるそのドメインは、それぞれのタンパク質の頭文字を取って、SET ドメインと名付けられた。そして 2000 年になってようやく、T. Jenuwein 等によって SUV39H1 (ヒトの *Su(var)3-9* 相同因子) が H3K9 の

メチル化酵素であることが示され、SET ドメインがメチル化酵素ドメインであることが明らかとなった (11)。酵母からヒトに至るまでこの酵素活性は保存されていたが、他の SET ドメインタンパク質には H3K9 のメチル化活性が無かったため、これらのドメインは他のリジン残基をメチル化する酵素である可能性が示唆された。実際、E(z) は H3K27 を、Trithorax は H3K4 のメチル化を行うタンパク質であることが証明されている (12)。現在では多くの SET ドメインタンパク質が同定され、ほとんどのリジン残基のメチル化は SET ドメインを持つタンパク質が担っている。ヒストンのアセチル化やリン酸化は、ヒストンの電荷を変化させ構造変換を促すと考えられているが、メチル化はヒストンタンパク質自体に大きな構造変化を及ぼさない。また同じアミノ酸残基に複数のメチル化が付加され、アルギニン残基ではモノメチルと対称、非対称のジメチルが存在し、リジン残基ではモノー (me)、ジー (me2)、トリメチル化 (me3) の三段階が確認されている (図 1-4)。メチル化修飾の個数によっても異なる機能を持つことが示唆されている (13)。

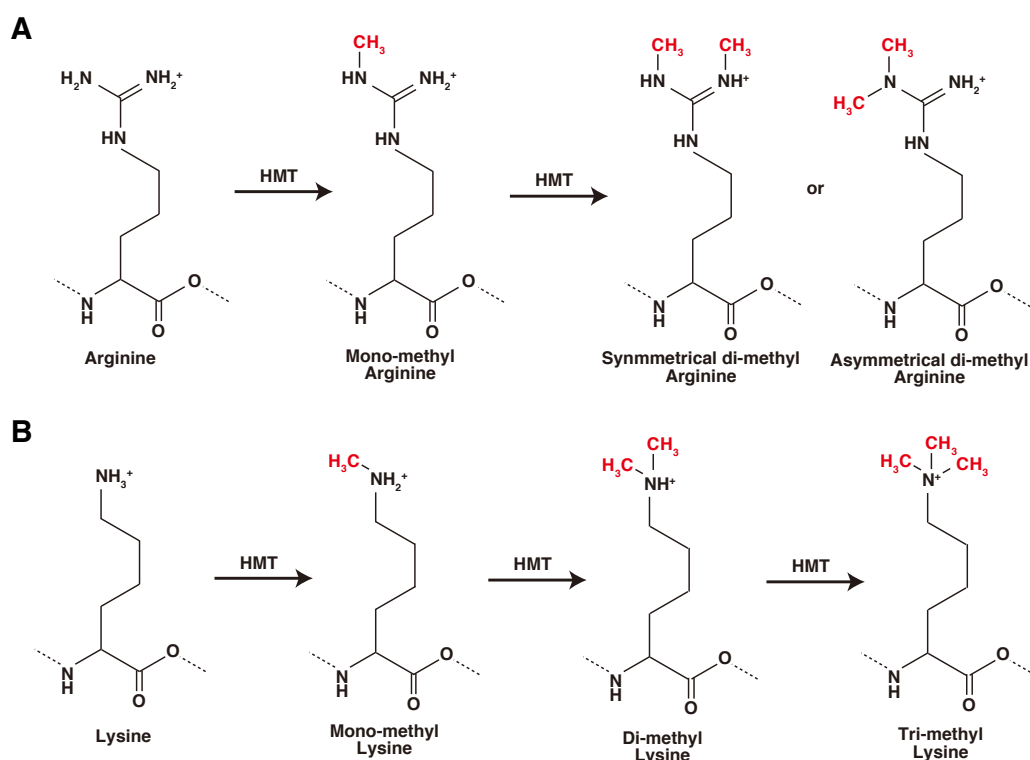


図 1-4 ヒストンにおけるアルギニン残基とリジン残基のメチル化状態

(A) アルギニンにはモノメチル、対称、非対称のジメチルが存在する。(B) リジンではモノー (me)、ジー (me2)、トリメチル化 (me3) の三段階のメチル化が確認されている。(参考文献 13 より引用)

アセチル化修飾とは異なり、メチル化修飾は入るアミノ酸残基によって機能が異なることが知られている。H3K9 や H4K20 のメチル化は構成的ヘテロクロマチンを形成するための足場の構築に特に重要であり、H3K9 のメチル化修飾 (H3K9me)によるヘテロクロマチン形成機構は、分裂酵母から哺乳類に至るまで保存されている。一方で、*HOX* 遺伝子群の抑制など条件的ヘテロクロマチンの形成には、H3K27 のメチル化が重要である。分裂酵母では H3K27 はメチル化されないが、テトラヒメナや植物でも H3K27 のメチル化は保存されており、発生や生殖段階での遺伝子制御に重要である。一方で遺伝子の活性化と相関するヒストンメチル化修飾として、ヒストン H3K4、H3K36 のメチル化が良く解析されている。H3K4 メチル化修飾は転写が活発な遺伝子の転写開始点付近に多く存在し、転写の活性化に必要である。また H3K36 のメチル化は転写が活発な遺伝子のコーディング領域に多く見られる (14)。

これらメチル化修飾は、クロモドメインタンパク質などリーダー (読み取り)タンパク質によって認識され、下流の反応を制御している。その中でも H3K9me を認識する HP1 (Heterochromatin protein 1)は、ヒストンのメチル化と特定のクロマチン構造をつなぐタンパク質の中でも最も良く解析されているタンパク質である。

1-4 Heterochromatin protein 1 (HP1)

HP1 は、モノクローナル抗体を用いたスクリーニングでペリセントリックヘテロクロマチンに局在する因子として同定された (15)。興味深いことに、HP1 は PEV のサプレッサーとして単離された *Su(ver)2-5* と同一の遺伝子であることが後の解析で明らかとなった (16)。HP1 は進化的に高度に保存されており、分裂酵母からヒトに至るまで相同因子が確認されている。哺乳類では、HP1 α 、 β 、 γ (それぞれ CBX5、-1、-3 と呼ばれる) の 3 種類の HP1 タンパク質が存在し (図 1-5)、それぞれ進化的に良く保存されたクロモドメイン (CD)、クロモシャドウドメイン (CSD) を有している。また、CD の N 末端側領域と、CD と CSD をつなぐヒンジ領域は、配列保存性は低いものの HP1 の働きに重要であり、またそれぞれの HP1 特異的な機能にも寄与している。この節の前半では、それぞれの領域について説明することで HP1 の機能を概説したい。また後半では HP1 に関する最近の知見について紹介する。

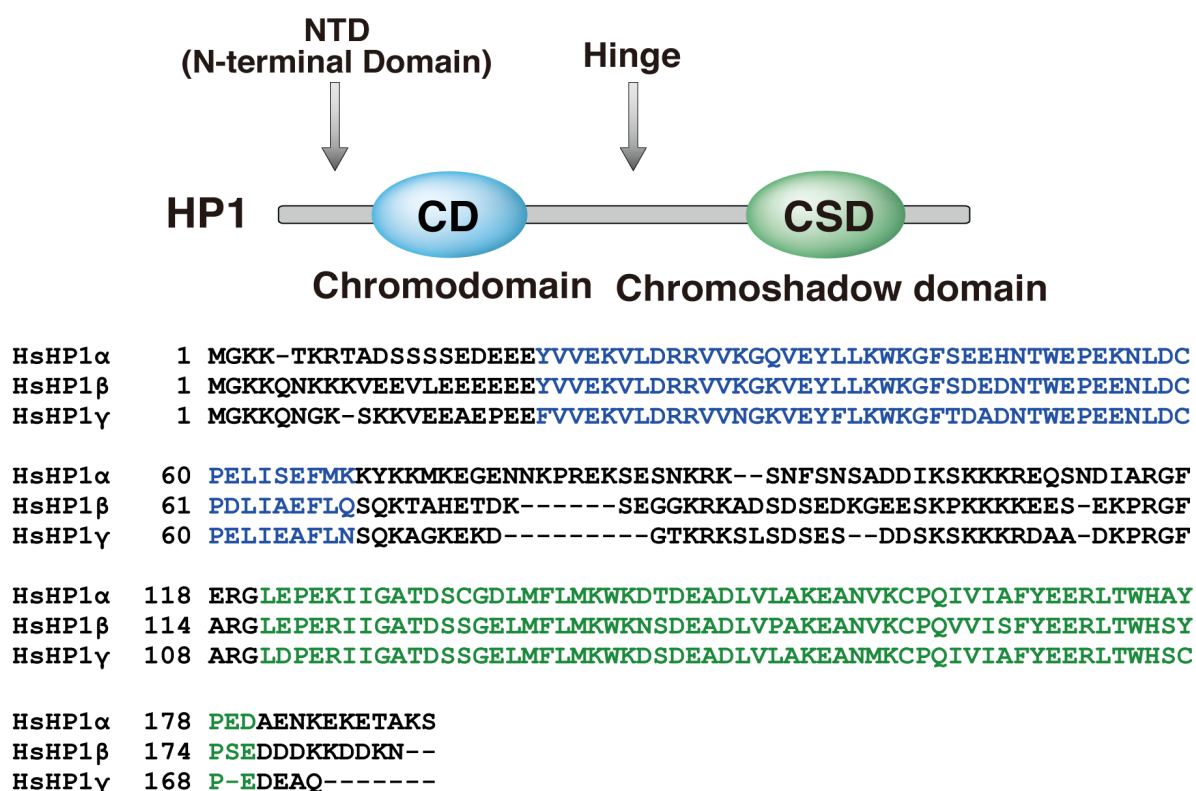


図 1-5 ヒト HP1 の構造とアライメント

(上) HP1 タンパク質の模式図。(下) 3 種類のヒト HP1 タンパク質のアミノ酸配列。図中青はクロモドメイン、緑はクロモシャドウドメインを示している

1-4-1 クロモドメイン (CD)

クロモドメイン (Chromodomain)は、Chromatin organization modifier domain の略で *HOX* 遺伝子群の抑制に働くショウジョウバエの Pc (Polycomb)タンパク質と、HP1 に共通して存在する領域として名付けられた (17)。その後、CD は HP1 のクロマチン結合に必須であることが証明された。同じく PEV のサプレッサーである Su(var)3-9 の相同因子が H3K9 のメチル化酵素であることが確認された後、複数のグループによって HP1 の CD がヒストン H3K9 にメチル化依存的に結合することが示され、その機能がヘテロクロマチン形成に必須であることが明らかとなった (18-20)。構造解析の結果から、CD の中の保存された 3 つの芳香族アミノ酸が作るアロマティック・ケージ (aromatic cage)でメチル化リジン残基を認識していることが示された (図 1-6A) (21)。また、HP1 ファミリーのタンパク質はどれも H3K9me と結合するが、HP1 の CD と約 60%相同性のある Pc の CD は H3K27me をより良く認識することが分かっている (22)。

HP1 は凝縮したヘテロクロマチンに局在しているが、HP1 の CD と H3K9me ペプチドの親和性の指標となる解離定数の値 (Kd 値)は、数 μM 程度であり非常に弱い (23)。実際に GFP タグを融合した HP1 を用いた FRAP (光褪色後蛍光回復法)において、HP1 の局在は褪色数秒後から蛍光シグナルが回復し、数分後には元に戻ることが示され、その動きが非常にダイナミックであることが示唆されている (24)。間期のクロマチンでは、HP1 はダイナミックな入れ替えがありつつも比較的安定にヘテロクロマチンへ局在しているが、分裂期ではその大部分がクロマチンから解離することが分かっている (25)。分裂期には H3K9me の隣のセリン残基 H3S10 にリン酸基が付加されることが知られている。CD とリン酸化ヒストンペプチドを用いた実験から、このリン酸化 (H3S10phos)によって HP1 は H3K9me に結合できなくなることが証明された (23, 26)。しかしながら、全長の HP1 α を用いた実験では、HP1 α が H3K9me, S10phos が両方入ったヒストンペプチドに結合できることが示され (27,28)、さらに HP1 α は分裂期においても弱いセントロメア局在を示すこと (25)から、分裂期の HP1 の解離には、他の分子機構が関与していると考えられる。

1-4-2 クロモシャドウドメイン (CSD)

HP1 の CSD は CD に良く似た配列として同定された (29)。しかしながらその分子的な機能は大きく異なる。構造解析の結果、CSD は二量体を形成することが分かり、その二量体を作る疎水性ポケットに様々なタンパク質が結合する (図 1-6B) (30)。配列に多少揺らぎはあるが、CSD を介して結合するタンパク質の多くには PXVXL (X は任意のアミノ酸)モチーフが存在する。また、哺乳類 HP1 はファミリー同士でヘテロダイマーを形成することが分かっている (31)

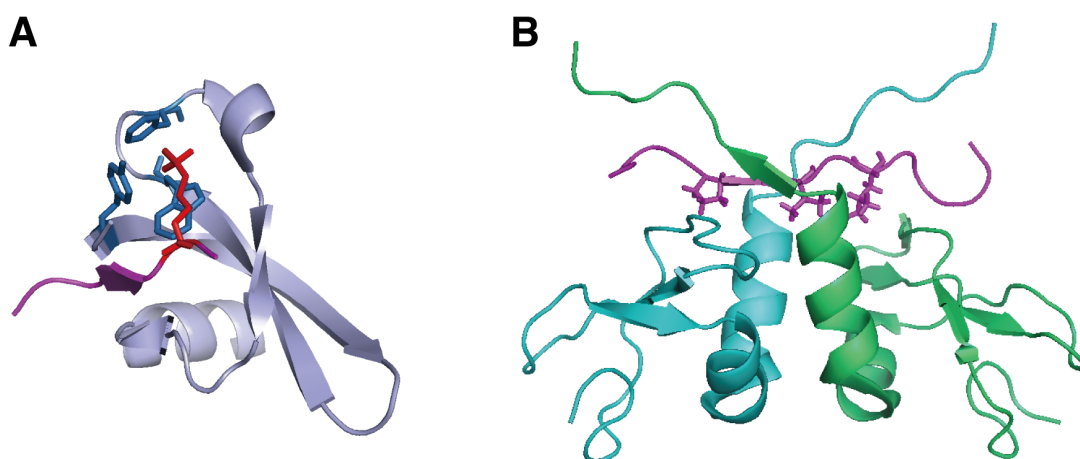


図 1-6 ヒト HP1 の CD と CSD の構造

(A) ヒト HP1α と H3K9me3 ペプチドの共結晶構造 (PDB:3FDT)。灰色の部分 が CD であり、アロマティック・ケージを形成するアミノ酸の側鎖を青色で示した。また K9me3 を赤色で示している。(B) マウス HP1β の CSD と CAF1 ペプチドの共結晶構造 (PDB:1S4Z)。二量体を形成しているそれぞれの CSD を青色と緑色で、PXVXL モチーフを介して結合している CAF1 ペプチドを紫色で示している。図は 32 より引用した。

1-4-3 N 末端領域とヒンジ領域

CDのN末端側領域とCDとCSDをつなぐヒンジ領域は、種間での保存性は低い、いくつかの共通点を有している。長さは異なるが、N末端領域では塩基性アミノ酸残基と酸性アミノ酸残基がそれぞれクラスターを形成している(図1-5)。そして、CD直前の酸性アミノ酸残基は、ヒストンテイルとの相互作用を強める働きがあり、CDのメチル化リジン残基の認識に重要である(35)。また、ショウジョウバエ HP1a、分裂酵母 Swi6、マウス HP1α タンパク質はいずれもN末端領域にリン酸化修飾が付加される(33-35)。興味深いことに、これらのHP1はヒンジ領域を介して核酸と結合することが報告されている(36-40)。核酸結合能を持つHP1は、RNAとDNAのどちらにも、顕著な配列特異性なく結合することが分かっている。また、サブタイプによってヒンジ領域の核酸結合能の有無、強さは異なることから、各HP1の機能の違いに寄与していると考えられている(38)。

1-4-4 HP1 の翻訳後修飾

3節ではヒストンの翻訳後修飾とクロマチン構造について紹介したが、HP1自身も様々な化学修飾を受けていることが報告されている。前述のN末端領域のリン酸化修飾以外にもアセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO化が確認されており、その中でもリン酸化とSUMO化についてはその機能が調べられている(表1)(41,43)。当研究室の先行研究より(35)、マウス HP1α の11~14番目のセリンクラスター領域が細胞内で常時リン酸化されていること、このリン酸化によってH3K9meの結合親和性が上昇し、安定なヘテロクロマチン結合に寄与していることが報告されている。また、哺乳類 HP1α は分裂期特異的にリン酸化されることが報告されているが、その詳細は未だ不明である。

生物種	Isoform	アミノ酸残基	PTMs	酵素	機能	変異体の影響	参考文献
Human	β	T51	Phos	CK2	損傷クロマチンからの解離	T51A,E > 局在の消失	42
	γ	S83	Phos	PKA	Ku70との相互作用 ユークロマチン局在	S83D > サイレンシング異常	43
Mouse	γ	S83	Phos	Aurora A	紡錘体局在	S83D,A > 細胞増殖の停止	44
	α	S11-14	Phos	CK2	H3K9me3の結合促進	S11-14A > H3K9meへの結合の低下	35
	α	S93	Phos	—	—	S11-14A > 染色体不安定化	35
	α	S95	Phos	NDR1	キネトコア局在	—	35
	α	Ks in the hinge region	SUMO	UBC9	ノンコードイングRNAとの相互作用	分裂期の進行異常	45
<i>Drosophila</i>	β	N/D	SUMO	N/D	ノンコードイングRNAとの相互作用	—	46
	γ	N/D	SUMO	N/D	ノンコードイングRNAとの相互作用	—	46
	a	S15,S202	Phos	CK2	ヘテロクロマチン局在	S15A,E, S202A,E > サイレンシング異常	33
	Swi6	Ss in the N-terminus	Phos	CK2	HDAC複合体のリクルート	multiple S→A > サイレンシング異常	34
	Chp2	K103	SUMO	Hus5/Ubc9	ヘテロクロマチン構造の構築	K103R > サイレンシング異常	47
<i>S. pombe</i>		K198	SUMO	Hus5/Ubc9	ヘテロクロマチン構造の構築	K198R > サイレンシング異常	47

表 1 HP1 の翻訳後修飾とその機能

文献 (32)を元に一部改変した。アミノ酸残基の特定など詳細な解析が行われていない修飾は省略した。

1-4-5 HP1 とヌクレオソームの相互作用

ここ数年、リコンビナントヒストンと DNA を利用し、試験管内で再構成したヌクレオソームと、HP1 との相互作用を検証した実験が複数のグループから報告されている (40,48-50)。H3K9 のメチル化修飾の導入の仕方は複数存在するが、D. Canzio 等が最初に分裂酵母 Swi6 を用いて行った実験では (48)、システイン残基のアルキル化反応によってメチル化リジンアナログを導入する方法を使っている。メチル化ヒストンテイルのペプチドを用いた場合、従来の報告通り Swi6 は H3K9me に対して特異的に結合する。しかしながらモノヌクレオソームを用いた実験では、Swi6 は未修飾のヌクレオソームにも結合してしまい、メチル化ヒストンに特異性がほとんど見られなかった。一方、オリゴヌクレオソームを用いた解析では、Swi6 は H3K9me ヌクレオソームに対して特異性を示すことが明らかとなった。また、オリゴヌクレオソームを用いた場合に特異性が上昇することは、ヒト HP1 α を用いて他のグループからも報告されている (49)。その一方で、ヒト HP1 β を用いた解析では、モノヌクレオソームであっても H3K9me ヌクレオソームに対して特異性があることが証明された (50)。それぞれのグループで実験手法や使用している HP1 が異なることもあり、HP1 のヘテロクロマチン結合のメカニズムに関しては今も議論が続いている。

1-5 本研究の目的と意義

近年、*in vitro* の生化学的実験は、より生体内に近い実験手法にシフトしている。前述したように、従来の実験で用いられていたヒストンペプチドの代わりに再構成ヌクレオソームを用いること、またクロモドメインなどの個々のドメインの代わりに全長を用いることで、従来の結果とは異なる側面が露見してきた。基本的に、大腸菌を用いて作製した組換えタンパク質は翻訳後修飾を受けない。当研究室での先行研究などから、哺乳類 HP1 α は恒常的にリン酸化されていること、また分裂期特異的に付加的にリン酸化されることが分かっている (35)。そこで、生体内のリン酸化状態を反映した状態で生化学的実験を行い、HP1 のリン酸化とクロマチン結合の関係を明らかにすることを本研究の目的とする。二章で恒常的リン酸化について、三章で分裂期特異的なリン酸化について解析する。

第二章

ヒト HP1 α の恒常的なリン酸化修飾とその機能

2-1 緒言

マウス HP1 α を用いた先行研究によって、CD の N 末端側 S11-14 が恒常的にリン酸化されていること、リン酸化によってメチル化ヒストンペプチドへの結合親和性が上昇すること、リン酸化が HP1 α のヘテロクロマチン局在に重要であることが明らかとなっている (35)。しかし、生体内でこのリン酸基を導入する酵素が同定されておらず、リン酸化がどのようにヌクレオソーム結合に寄与するかという課題が残されている。すでにショウジョウバエ HP1 α と分裂酵母 Swi6 は、いずれもカゼインキナーゼ 2 (Casein Kinase 2: CK2)によってリン酸化されること、またマウス HP1 α は *in vitro* において CK2 によってリン酸化されることが報告されている (33-35)。この章では、まずヒトでも同様のリン酸化が起こっているかの確認をするために、さまざまな培養細胞の内在性 HP1 α のリン酸化状態を検出した。次に生体内でのリン酸化酵素を細胞抽出液から段階的に精製する手法を用いて同定することを試みた。次に、同定したリン酸化酵素と HP1 を大腸菌内で共発現する系によってリン酸化 HP1 α を大量調製し、このリン酸化 HP1 α を用いてヌクレオソームとの結合試験など生化学的解析を行った結果について記述する。

2-2 実験材料及び実験方法

2-2-1 使用した発現プラスミド

HeLa 細胞から RNA を抽出し SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。ヒト HP1 α (NM_012117)、HP1 β (NM_006807)、HP1 γ (BAA_83340) の cDNA を PfuTurbo (Agilent) を用いて増幅し、TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) を用いて pCRII ベクターにクローニングした。大腸菌内で His タグ融合タンパク質として発現させるために、各 HP1 の cDNA を pCold I ベクター (TaKaRa) にそれぞれ組込んだ。FLAG タグ融合タンパク質として HEK293T 細胞で発現させるために、HP1 α の cDNA を pFLAG-C1 ベクター (35) に組込んだ。大腸菌内で CK2 を発現させるために pRSFDuet ベクター (Novagen) にマウス Ck2a、Ck2b が組込まれているプラスミドを利用した (35)。アミノ酸置換変異体の作製は、変異を入れたプライマーを用いて PCR を行う site-directed mutagenesis 法を用いた。

2-2-2 使用した細胞の培養条件とプラスミドの導入

HeLa、HEK293T、U2OS、IMR90 細胞は 10% FBS (GIBCO)、ペニシリン-ストレプトマイシン (ナカライ) を DMEM (ナカライ) に添加した培地で培養した。培養細胞で発現するためのプラスミドは QIAGEN midiprep kit を用いて調製し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション開始から 24~48 時間後、総タンパク質の回収もしくは免疫沈降を行った。

2-2-3 ウェスタンブロット解析

細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, Protease inhibitor cocktail [Complete EDTA-free; Roche], 10 mM NaF) で溶解し、4°C、12,000 rpm で 10 分遠心した後、上清を細胞抽出液として分取した。脱リン酸化処理のために、50 μ l の細胞抽出液 (0.6 mg/ml) に等量の 2x alkaline-phosphatase reaction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 9.0], 10 mM MgCl₂, and 60 units/ml shrimp alkaline phosphatase [SAP; TaKaRa]) を加え 3 時間 37°C でインキュベーションした。Phos-tag (Wako) を用いてウェスタンブロットをする

場合は、SDS-PAGE 後ゲルを 5 mM EDTA 入りの Transfer buffer (25 mM Tris, 190 mM Glycine, 20% Methanol) で 20 分間浸透後、EDTA が入っていない Transfer buffer で 15 分洗浄する前処理を行った。PVDF 膜 (Immobilon-P ; Millipore) への転写は、タンク式のブロット装置 (BIO-RAD) を用いた。転写後のメンブレンを 5% スキムミルク/TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 1 時間ブロッキングした後、それぞれの抗体で 1 時間反応させた。各抗体反応後、TBS-T で 3 回メンブレンを洗浄し、ECL システム (GE Healthcare) と LAS300mini を使用して検出した。

以下に使用した一次抗体及び二次抗体を示す。

- anti-HP1 α (BMP001 ; MBL)
- anti-HP1 β (1MOD-1A9; Millipore)
- anti-HP1 γ (2MOD-1G6; Millipore)
- anti-CK2 α (1AD9; Calbiochem)
- anti- α -tubulin (T5168; Sigma)
- peroxidase-conjugated anti-histone H3 (ab21054; Abcam)
- peroxidase-conjugated anti-FLAG M2 (A8592; Sigma)
- peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (A6667; Sigma)
- peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (112-035-072; Jackson ImmunoResearch)

2-2-4 組換えタンパク質の調製

実験手順の概略を図 2-3A に示している。以下その詳細について示す。

2-2-4a 大腸菌の大量培養

大腸菌内で大量発現させるために、前日に発現プラスミドを BL21(DE3) 株に形質転換し、100 μ g/ml アンピシリンを含む 2xYT プレート上に播種した。翌朝シングルコロニーを 5 ml の 2xYT 培地に移し、37°C で 3 時間前培養した後、1 L の培地に全量加えた。37°C で培養し OD₅₉₅ が 0.5~0.6 に到達したら 30 分間氷冷し、終濃度 200 μ M になるように IPTG を添加し、15°C で 24 時間培養後、菌体を回収した。

2-2-4b His タグ精製

回収した大腸菌を Extraction buffer (50 mM Sodium phosphate [pH7.0], 300 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF])に懸濁し、ソニケーターで破碎した。破碎上清を TALON ビーズ (Clontech)と混ぜ 1 時間 4℃で反応させ、Wash buffer (50 mM Sodium phosphate [pH7.0], 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole)を用いてビーズを洗浄してから、Elution buffer (50 mM Sodium phosphate [pH7.0], 300 mM NaCl, 150 mM Imidazole)で溶出した。溶出したタンパク質は SOURCE 15Q カラム (GE Healthcare)を用いてさらに精製した。

リン酸化酵素と共発現し大腸菌内でリン酸化させる場合は、二つのプラスミドを同時に形質転換し 50 µg/ml アンピシリン、25 µg/ml カナマイシンを含む培地で培養し、同様の方法で精製した。

2-2-5 細胞抽出液の調整と分画

2-2-5a 細胞質抽出液 (S100)と核抽出液 (NE)の調製

細胞抽出液の調製方法は、Dignam 法をもとに一部改変した (51)。必要量の細胞を細胞量の 5 倍量の Buffer A (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM Dithiothreitol [DTT])で細胞を再懸濁し、4℃、2,000 rpm で 10 分遠心し、上清を除いた。2 倍量の低張液で細胞を再懸濁し、氷上にてホモジェナイザーで 10~20 回ストロークし、細胞を破碎した。新しい 15 ml チューブに移し、2,000 rpm で 10 分間遠心し、上清は細胞質抽出液として取り分けた。ペレットを新しいバッファーで再懸濁した後、超遠心チューブに移し、MLS50 ローター (Beckman)を用い 4℃、14,000 rpm で 20 分間遠心し、上清と沈降画分 (核画分)に分けた。上清は先ほどの上清と一緒にし、総量に対し 0.11 倍量の Buffer B (0.3M HEPES [pH 7.9], 1.4 M KCl, 30 mM MgCl₂)を添加し、4℃、36,000 rpm で 1 時間遠心した。その上清を細胞質抽出液として-80℃で保存した。上記遠心で得られたペレットの核画分に 3 倍量の Buffer C (20 mM HEPES [pH 7.9], 0.42 M NaCl, 25% Glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT)を加え、再び氷上にてホモジェナイザーで 10 回ストロークし、核画分を破碎した。新しい 15 ml チューブに移し、30 分間、4℃でローター

ションした。インキュベーション後、超遠心チューブに移し、16,000 rpm で 30 分間遠心した。遠心後の上清を透析膜 (SPECTRUMLABS, MWCO: 6-8,000) に移し、その上清の 50 倍以上の Buffer D (20 mM HEPES [pH 7.9], 0.15 M KCl, 10% Glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT) で 1 時間透析した。バッファーを途中で新しいものに変え 2 回透析した。透析後のサンプルを 1.5 ml チューブに移し、15,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を新しいチューブに移し、核抽出液として -80°C で保存した。

2-2-5b 細胞抽出液の分画

HeLa 細胞から調製した S100 もしくは NE は、Buffer Q (20 mM HEPES [pH 7.9], 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT) で平衡化した HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare) に通し、結合したタンパク質を 0~1 M (KCl) の勾配で段階的に溶出した。活性のあったフラクションはさらに Superose 6 Column (GE Healthcare) を用いて分画した。

2-2-6 *in vitro* リン酸化アッセイ

in vitro でのリン酸化は、1 μ g の HP1 α (N 末端から CD 領域まで [1-80aa]) と調製したカラムの精製産物 5 μ l を総量 25 μ l の Kinase reaction buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 200 μ M ATP) で 3 時間、30°C で反応させた。ポジティブコントロールとして、精製産物の代わりに 50 units の CK2 (NEB) を使用した。CK2 の活性阻害には 50 μ M の 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB; Chemicon) を反応液中に添加した。

2-2-7 FLAG タグを利用した免疫沈降

2-2-7a 細胞抽出液の調製

FLAG タグを付加した HP1 α を HEK293T 細胞 (10 cm² ディッシュ 1 枚) で強制発現し、24 時間後回収し、PBS で洗浄した。細胞ペレットを 1 ml の氷冷した IP buffer (50 mM HEPES [pH 7.9], 0.3 M NaCl, 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, and 0.1% TritonX-100, 1mM PMSF, Protease inhibitor cocktail [Complete; Roche]) で再懸濁し、freeze-thaw を 3 回繰り返した。以下操作はすべて氷上もしくは 4°C にて行った。12,000

rpm で 10 分間遠心し、上清を IP buffer で平衡化した 200 μ l の Sepharose 4B (GE Healthcare)に加え、ローテーションしながら 30 分間インキュベーションした。遠心し、上清を IP バッファーで平衡化した 50 μ l (50%スラリー)の ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA)に加え、3 時間ローテーションしながらインキュベーションした。インキュベーション後のレジンを IP buffer で三回洗浄し、洗浄後のレジンを新しいチューブに移した。FLAG elution buffer (250 μ g/ml 3xFLAG peptide / IP buffer)200 μ l を加え、1 時間ローテーションし、遠心後上清を精製産物として回収し、以降の反応に使用した。

2-2-8 ヌクレオソームプルダウンアッセイ

ビオチン化した再構成ヌクレオソームは早稲田大学胡桃坂研究室より提供されたものを使用した。以下その手法について簡潔に記す。組換えタンパク質としてヒトの H2A, H2B, H4 をそれぞれ精製した (52)。ヒストン H3 は 9 番目のリジンをシステイン (K9C)に、110 番目のシステインをアラニン (C110A)に置換したものを同様の方法で精製し、システインのアルキル化反応により、K9C にリジントリメチルアナログを導入した (H3K9me3) (53)。非メチル化ヌクレオソームは C110A 変異体を用いた (H3K9me0)。ビオチン化した 193 bp-601 配列 DNA と精製した各ヒストンを混ぜ、塩透析法によってヌクレオソームを再構成した (52)。

ビオチン化したヌクレオソーム 1 μ g と streptavidin T1 Dynabeads 80 μ g (Invitrogen)を Binding buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol, 0.05 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mM DTT)内でローテーションしながら 4°Cで 4 時間インキュベートした。ビーズを Binding buffer で洗浄したのち、100 pmol の リコンビナント HP1 タンパク質、もしくは細胞から精製した FLAG-HP1 α を加え、ローテーションしながら 4°Cで 1 時間インキュベートした。3 回 Wash buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 300 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 5% glycerol, and 0.05 mM EDTA)で洗浄し、SDS サンプルバッファーを加えてボイルすることで溶出した。

2-2-9 ゲルシフトアッセイ

10 μ l の Gelshift buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA)中に段階的な濃度で調製した HP1 タンパク質と 0.2 pmol の 193 bp-601 配列 DNA を混ぜ 37°Cで 15 分間インキュベーションした。反応後 1 μ l の 30%スクロースを加え、0.5 x Tris-borate-EDTA (TBE)で作製した 5% native polyacrylamide gels にて 100 V で 1.5 時間展開し、SYBR Gold (Invitrogen)で染色した。LAS3000 mini (GE Healthcare)を使用して検出し、ImageQuant software を使用して定量した。結合曲線には $\text{fraction bound} = 1 - \text{fraction unbound}$ の値を用い、Igor Pro software を用いて Curve-fitting を行った。

2-3 実験結果

2-3-1 細胞内における HP1 α のリン酸化状態確認

マウス細胞において、HP1 α は恒常的なリン酸化が付加されていることがすでに明らかとなっている (35)。リン酸化 HP1 α の役割を明らかにするためにまず、恒常的なリン酸化がヒト細胞でも同様に起こっているかどうか確認した。異なる組織のがん細胞である HeLa、HEK293T、U2OS 細胞株と正常線維芽細胞株の IMR90 細胞株からそれぞれタンパク質抽出液を調製し、標準的な SDS-PAGE 及びリン酸基を含むタンパク質の泳動が遅くなる Phos-tag 溶液を加えた SDS-PAGE を行い、HP1 α の抗体を用いたウェスタンブロットを行った (図 2-1A)。その結果、脱リン酸化処理によって、より早くバンドが移動した。さらにその差が Phos-tag ゲルでより顕著であることからヒト HP1 α はマウス細胞同様に恒常的にリン酸化されていることが分かった。次にこのリン酸化を受ける部位を確認するため、マウス HP1 α でリン酸化部位であることが確認された 11~14 番目のセリン残基をすべてアラニン置換した HP1 α (S11-14A) を作製し、細胞内でのリン酸化の挙動を確認した (図 2-1B)。その結果、野生型 (WT) で見られるバンドシフトが S11-14A 変異体では見られないことから、ヒトでもこの部位がリン酸化されることが確認できた (図 2-1C)。

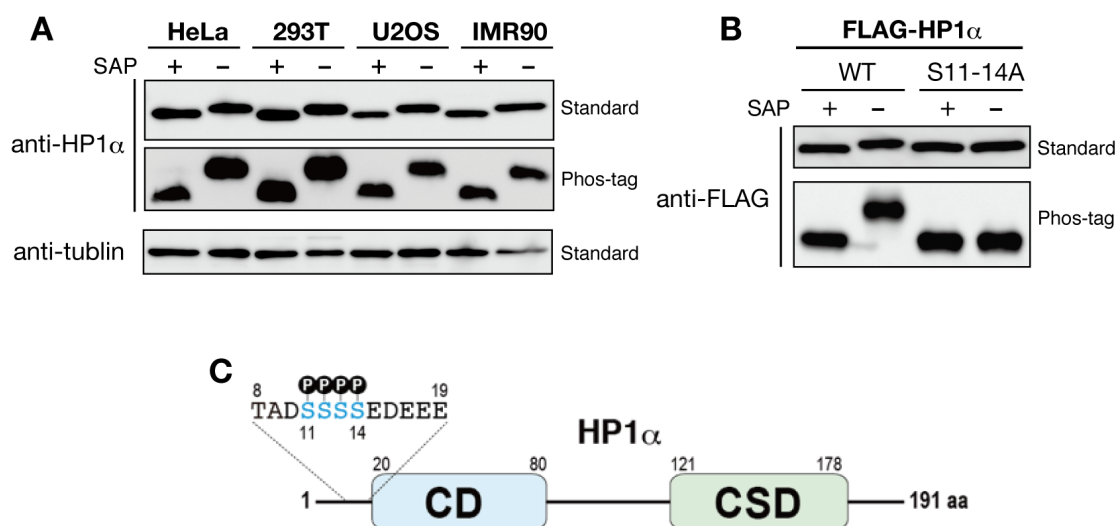


図 2-1 ヒト HP1 α の恒常的リン酸化部位の同定

(A) 様々なヒト培養細胞内での HP1 α のリン酸化状態の確認結果。SAP 処理したサンプルは非リン酸化 HP1 α を表している。(B) 恒常的なリン酸化部位の同定結果。FLAG タグを付加した HP1 α の N 末端セリンクラスター領域をアラニン置換した変異体を用いた。(C) リン酸化部位周辺のアミノ酸残基と HP1 α の構造。

2-3-2 HP1 α の恒常的にリン酸化を担う酵素の同定

ショウジョウバエ HP1 α や分裂酵母 Swi6 は、ヒトやマウスの HP1 α と同様に細胞内でリン酸化されており、その酵素はカゼインキナーゼ 2 (Casein Kinase 2: CK2) であることが明らかとなっている (33,34)。また、マウス HP1 α も *in vitro* において CK2 によってリン酸化されることが分かっている (35)。CK2 は α , β サブユニットそれぞれの二量体からなるヘテロテトラマーを形成している。生体内での CK2 の基質は 100 種類以上存在し、多くの組織で働くリン酸化酵素であり、CK2 は細胞の生育に必須で活性阻害剤の添加は急速なアポトーシスを誘導する (54)。また、HP1 は細胞内で非常に量が多く、短期間の CK2 の阻害では脱リン酸化された状態の HP1 α は今のところ確認できていない。そのため、その他のリン酸化酵素の関与も否定できない。そこで、HP1 α の N 末端から CD まで (1-80aa) のリコンビナントタンパク質に対してリン酸化活性のあるタンパク質を段階的に精製する手法を用いて、内在性 HP1 α のリン酸化酵素を同定することにした。その結果、HeLa 細胞から調製した細胞抽出液 (S100)、核抽出液 (NE) どちらにおいても、陰イオンカラムに通した際にほぼ同じ溶出ピークに活性が見られた (図 2-2A,B)。S100 に関してさらにゲルろ過カラムによってサイズによる分離を行うと 200~500 kDa の領域に活性が見られることが分かった (図 2-2C)。この活性が CK2 かどうか確認するために、CK2 α の抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ活性のピークに重なるように CK2 が検出された (図 2-A,B,C)。また CK2 の阻害剤である TBB を反応液中に添加したところ、活性が消失した (図 2-2D)。以上の結果から生体内での恒常的な HP1 α のリン酸化は基本的に、CK2 によって行われていることが明らかとなった。

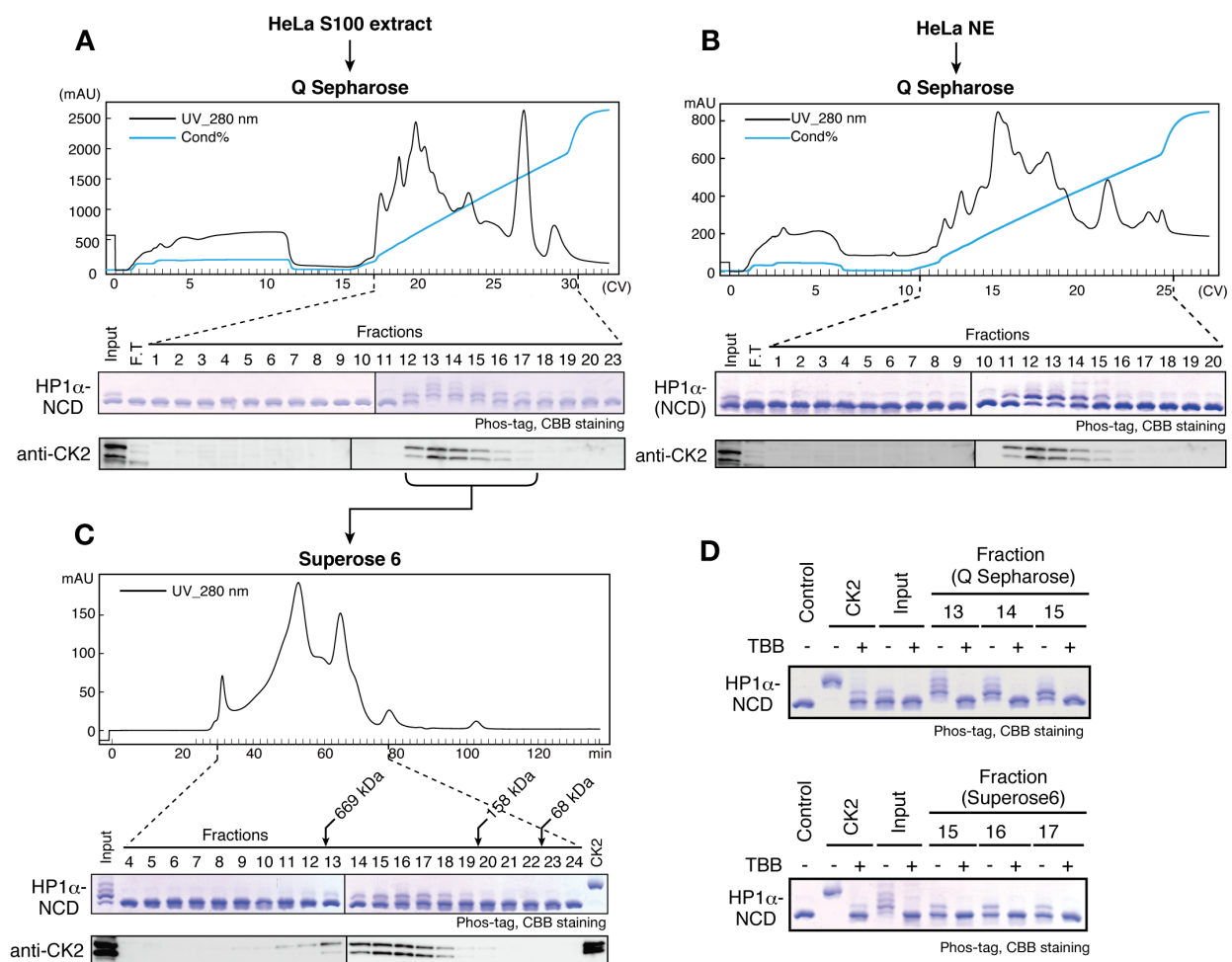


図 2-2 HP1α の N 末端領域のリン酸化酵素の単離

(A,B) HeLa 細胞から調製した細胞質抽出液 (A)及び、核抽出液 (B)を陰イオンカラムに通した分離プロファイルと各フラクションの *in vitro* リン酸化アッセイ、CK2 抗体を用いた WB の結果の結果。(C) A のフラクション 12-17 をゲルろ過カラムでさらに分離し、同様のアッセイを行った結果。(D) 活性フラクションに CK2 阻害剤を加えアッセイを行った結果。

2-3-3 大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製

次に、リン酸化 HP1 α の生化学的性質を検討するにあたり、リン酸化された全長の HP1 α の調製を行った。2-3-2 で同定した CK2 と HP1 α を大腸菌内で共発現することで、HP1 α をリン酸化した。His タグによる精製後、精製分画をさらに陰イオンカラムで分画し、精製度を高めた (図 2-3A)。精製後のサンプルは SDS-PAGE 後のゲルを CBB 染色することによって確認した。また WB 最終精製産物に CK2 が存在するかどうかの確認も行った (図 2-3B)。その結果、非常に純度の高いリン酸化 HP1 α を作製できていることが分かった。

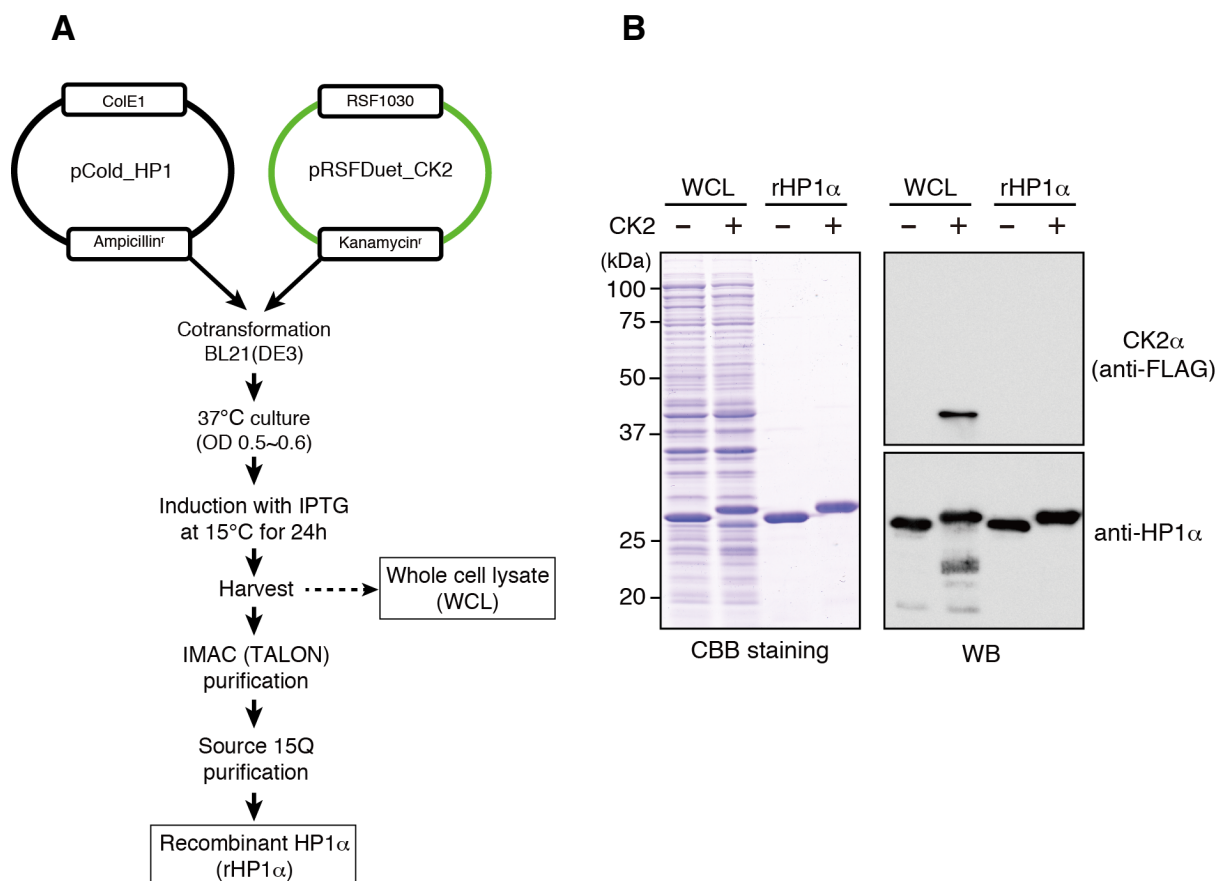


図 2-3 大腸菌内共発現によるリン酸化タンパク質の調製

(A) 大量培養と組換えタンパク質の精製過程。詳細は実験方法を参照。(B) 精製前と最終精製産物の確認。大腸菌内で CK2 を発現し、調製したサンプルの最終精製産物に CK2 は検出されない。また CK2 の有無で精製度に差は見られない。

次に Phos-tag SDS-PAGE で精製産物を確認したところ、内在性の HP1 α では確認できなかったリン酸化のバンドが存在することが分かった (図 2-4A)。マウスの HP1 α を用いて *in vitro* でリン酸化した以前の報告から、このバンドがヒンジ領域にある 97 番目のセリン残基に付加されたリン酸化であることが示唆されている (35)。S11-14 領域のリン酸化の機能と区別するため、S97A 変異体についても調製し、同様の精製を行った (図 2-4A)。非リン酸化 HP1 α 、 β 、 γ (図 2-4B) 及びヒンジ領域の核酸結合領域をアラニンに置換した変異体 HP1 α -HM (KRK89-91AAA, KKK104-106AAA) のリン酸化あり、なしのリコンビナントタンパク質 (図 2-4C,D) も同様に調製した。

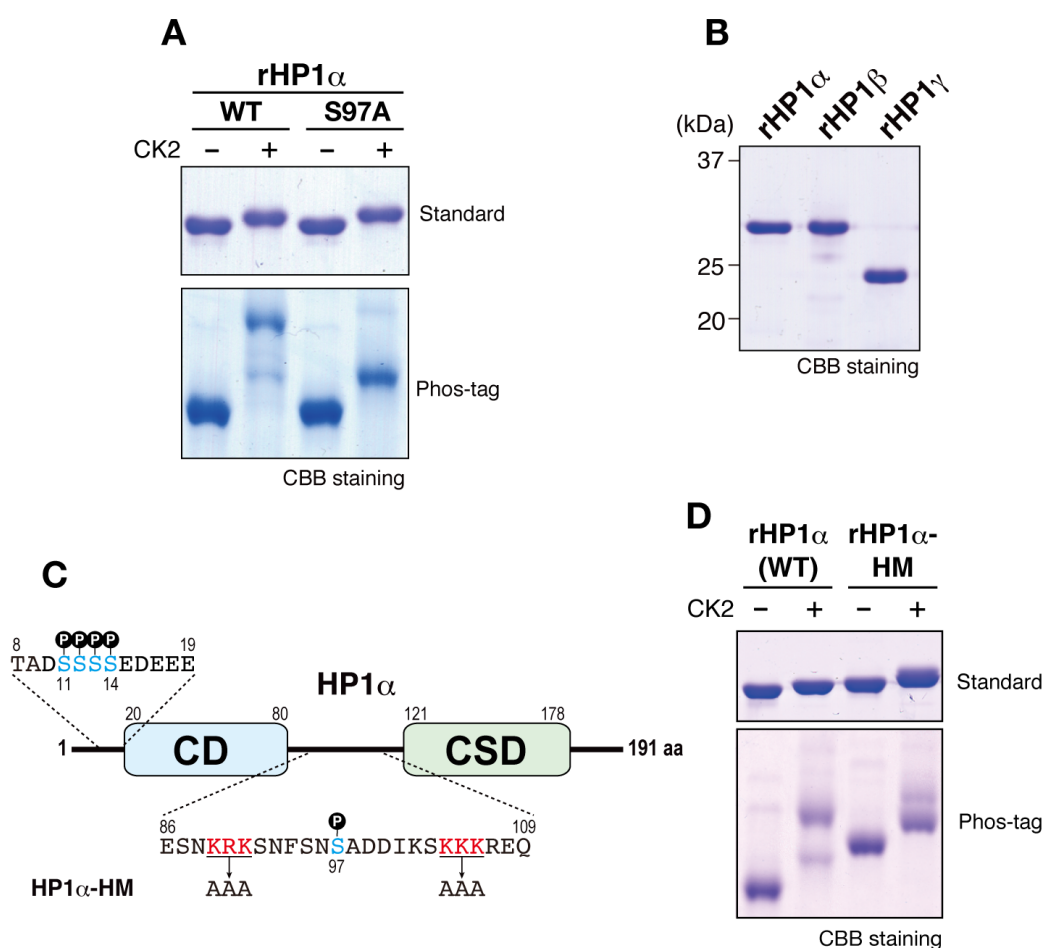


図 2-4 各種 HP1 タンパク質の最終精製産物の確認

(A) 図 2-5,6 で使用した WT と S97A 変異体の確認。(B) 図 2-5,6 で使用した非リン酸化 HP1 α 、 β 、 γ の確認。(C) HP1 α の全体構造。Hinge mutant ; HM の変異部位を赤字で示した。(D) 図 2-7 で使用した HP1 α -HM の確認。

2-3-4 HP1 α N 末端領域のリン酸化修飾によるヌクレオソーム結合特異性の獲得機構

HP1 の CD 部分を用いた実験では、ヒストンテイル領域の前半部分を含む H3K9me ペプチドに対して選択的に結合することが明らかにされている、一方、分裂酵母の全長 Swi6 と再構成したモノヌクレオソームを用いた実験では、H3K9me に対する結合特異性は大きく減少することが報告されている (48)。そこで、HP1 α の N 末端領域のリン酸化が、ヌクレオソーム結合に対してどのように影響するか検討することにした。DNA にビオチン標識した再構成ヌクレオソームを用いてプルダウンすることによって H3K9me₃ への結合特異性を検証した。まず、リン酸化されていない HP1 α 、 β 、 γ を用いてプルダウンアッセイを行った (図 2-5A,B)。その結果、HP1 α は未修飾のヌクレオソームにも非常に良く結合し、H3K9me₃ ヌクレオソームは、それよりも若干強く結合する程度であることが分かった。これは Swi6 の報告とも合致する (48)。一方、HP1 β は未修飾のモノヌクレオソームに対する結合は弱く、H3K9me₃ ヌクレオソームに対して優先的に結合することが分かった。これは同じ HP1 β で同様のプルダウン実験を行った報告と同一の結果であった (50)。次にリン酸化 HP1 α を用いて同様の実験を行ったところ、リン酸化 HP1 α は未修飾ヌクレオソームにはほとんど結合せず、H3K9me₃ ヌクレオソームに特異的に結合することが分かった (図 2-5C,F)。またヒンジ領域に入るリン酸化の影響を排除するために S97A 変異体を用いて同様の実験を行ったが、H3K9me₃ ヌクレオソームに対する特異性は変わらなかった (図 2-5C)。さらに、リン酸化がすでに入っていると考えられるヒト培養細胞から精製した HP1 α も、同様に H3K9me₃ ヌクレオソームに対して高い特異性を持つことが分かった (図 2-5E-G)。以上の結果より、CK2 による HP1 α の N 末端領域のリン酸化が、優先的な H3K9me₃ ヌクレオソーム結合に必須であることが示唆された (図 2-5E,F,G)。

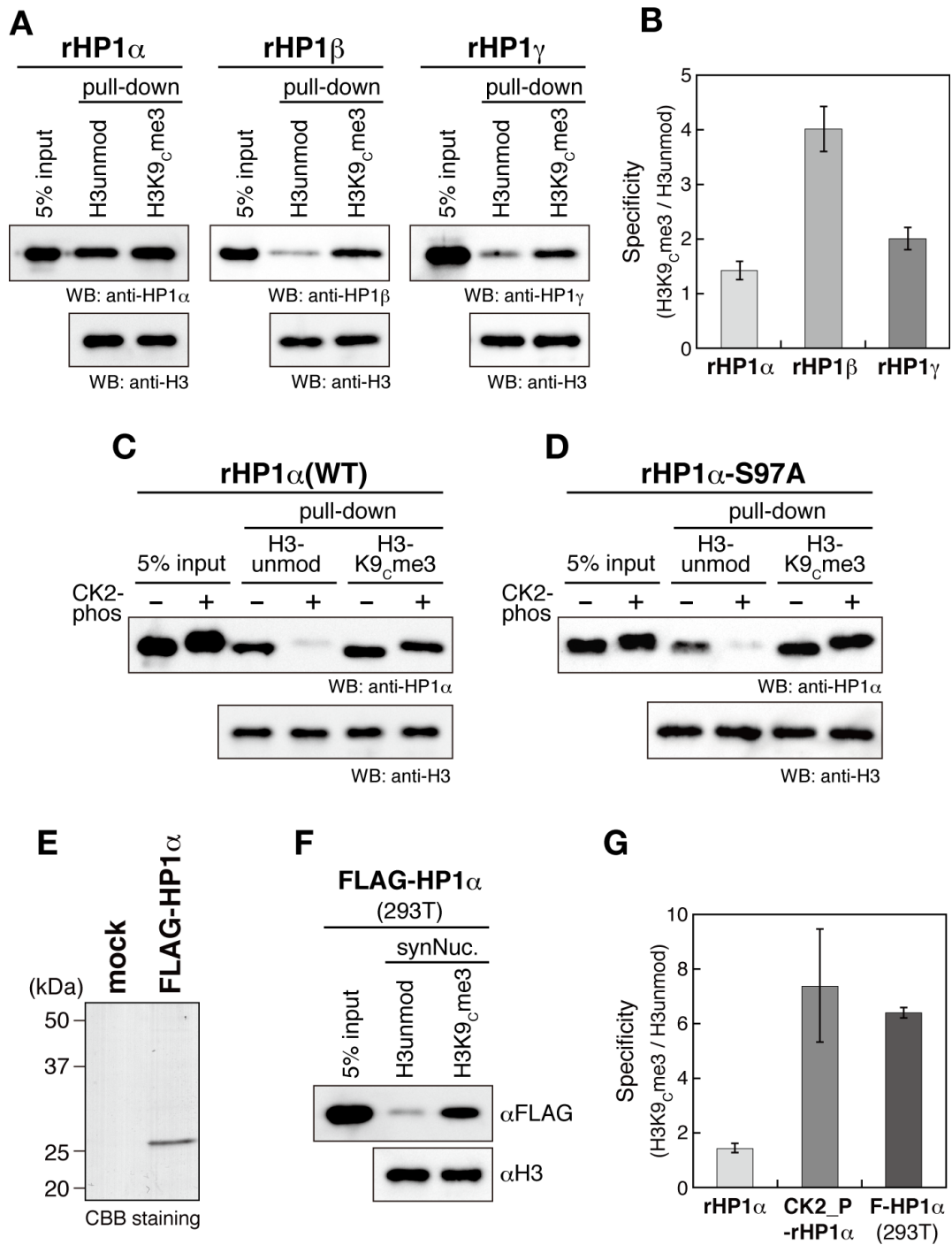


図 2-5 ビオチン化した再構成ヌクレオソームと HP1 を利用したプルダウンアッセイ
H3K9 未修飾、及び K9me3 アナログを導入したヌクレオソーム (それぞれ H3unmod、H3K9_cme3) を用いて、リコンビナント HP1 をプルダウンした結果。(A) HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ のプルダウンアッセイの結果。アッセイに使った HP1 (input) と各ヌクレオソームでプルダウンした産物について、各 HP1 タンパク質の抗体を用いた WB によって検出した。(B) A の結果を定量したグラフ。(C,D) リン酸化した HP1 α (C; WT, D; S97A) を用いて行ったプルダウンアッセイの結果。(E,F) 精製した FLAG-HP1 α とそのプルダウンアッセイの結果。(G) C,F の結果を定量したグラフ。

当研究室の以前の報告では、HP1 α の N 末端領域のリン酸化が H3K9me3 ペプチドに対してより強く結合することを明らかにしていた (35)。しかしながら、今回の再構成ヌクレオソームを用いて行った実験では、H3K9me3 ヌクレオソームに対しての結合が強くなっているというよりも、未修飾のヌクレオソームに対して結合が減少しているように見えた (図 2-5C)。ヌクレオソームとヒストンペプチドを比べた時に、異なる箇所は DNA であること、HP1 α はその他の HP1 と異なり核酸結合能があることが知られていることから、ゲルシフトアッセイによって核酸への結合親和性を評価し、その相互作用がリン酸化の影響を受けるかどうか検討することにした。

ヌクレオソームを再構成する際に利用した DNA を用いて、HP1 の量を段階的に増やすことで、HP1 の結合定数を算出した。その結果、従来の報告通り、非リン酸化タイプの HP1 α はゲルシフトアッセイによって他の HP1 タンパク質よりも DNA と強く相互作用することが確認できた。(図 2-6A 左,C-F)。興味深いことに、HP1 α と DNA の相互作用はリン酸化の付加によって大きく減少することが分かった (図 2-6A 右)。また、S97A 変異体においても DNA 結合が減少していることから (図 2-6B)、この核酸結合能の低下は N 末端領域のリン酸化によってもたらされていることが明らかとなった。また、リン酸化された HP1 α は、他の HP1 と同じ程度、もしくはそれ以下の結合親和性 (解離定数)を示している (図 2-6F)。ちなみに、HP1 α の CD が H3K9me3 ペプチドを認識する結合親和性は数 μ M であるが (23,35)、非リン酸化状態の HP1 α の核酸結合親和性は、それよりも一桁高い。以上の結果より、HP1 α がリン酸化されると、核酸に対する親和性が減少し、その結果として H3K9me ヌクレオソームへの結合特異性が高くなったのだと考えられる。

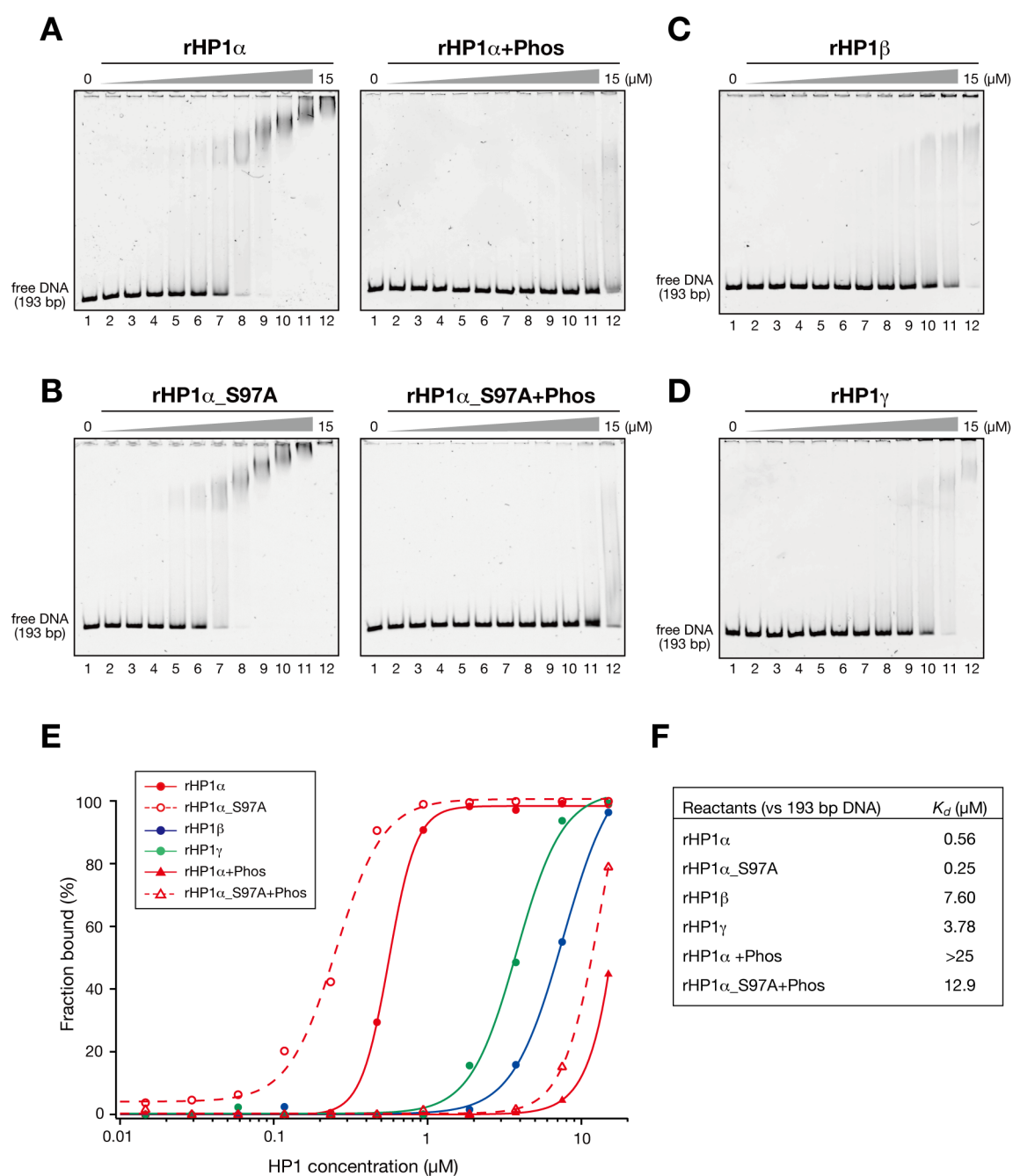


図 2-6 HP 1 と DNA のゲルシフトアッセイ

(A-D) ヌクレオソームの再構成に使用した DNA と HP1 のゲルシフトアッセイ。それぞれ、非リン酸化、及びリン酸化 HP1 α -WT (A)、-S97A (B)、リコンビナント HP1 β (C)、リコンビナント HP1 γ (D)の HP1 を使用した。(E) 結合した DNA の量を、結合しなかった DNA 量から定量し算出したグラフ。(F) グラフより算出した K_d 値

HP1 α がヌクレオソームに結合する際、ヒンジ領域の核酸結合が何らかの寄与をしていることが示唆されている (40)。そこで、上述したリン酸化が、HP1 α のヒンジ領域の核酸結合能とどのように機能的に関与しているのかを検証するために、核酸結合能を欠いた変異体を作製し、ヌクレオソーム結合におけるリン酸化の影響を調べた。ヒンジ領域を介した核酸の結合には、リジン残基のクラスター領域が重要であることがすでに報告されている (図 2-4C) (39,40)。そこでこの領域のアラニン置換変異体 (hinge mutant; HM)を用いて同様の解析を行うことにした。最初にこの変異体のリコンビナントタンパク質 (HP1 α -HM)を調製して、その DNA 結合能を検証したところ、DNA 結合能が失われることが確認できた (図 2-7A,C)。興味深いことに、リン酸化の付加による核酸結合能の減少と (図 2-7A,B)、ヒンジ領域の変異による核酸結合能の減少は同程度であり (図 2-7B,C)、さらに HP1 α -HM にリン酸化を付加しても相加的な影響は見られなかった (図 2-7B,D)。以上の結果より、HP1 α の N 末端領域のリン酸化は、ヒンジ領域の持つ強い核酸結合能を減少させていることが示唆された。

次に、HP1 α -HM 変異体を用いてヌクレオソームへの結合特異性をプルダウンアッセイによって調べた。従来の報告通り、リン酸化されていない HP1 α -HM は、メチル化修飾の有無に関わらずヌクレオソームに対してほとんど結合しなかった (図 2-7F ; 左からレーン 3、5 番目) (40)。一方、CK2 によってリン酸化された HP1 α -HM は、H3K9 が未修飾のヌクレオソームと比較して H3K9me3 ヌクレオソームに対して高い結合能を示すことが明らかとなった (図 2-7F ; 左からレーン 6 番目)。

以上の結果より、CK2 による哺乳類 HP1 α のリン酸化は、H3K9me3 への結合強度を高め、さらにヌクレオソーム DNA への非特異的結合を抑制する二重の役割によって、H3K9me3 ヌクレオソームに対する結合特異性を上げていると結論付けた。また、HP1 α のヒンジ領域の核酸結合能は、ヌクレオソームに対する非特異的な結合は促進するものの、H3K9me3 ヌクレオソームに対する安定的な結合には重要ではないことが示唆された。

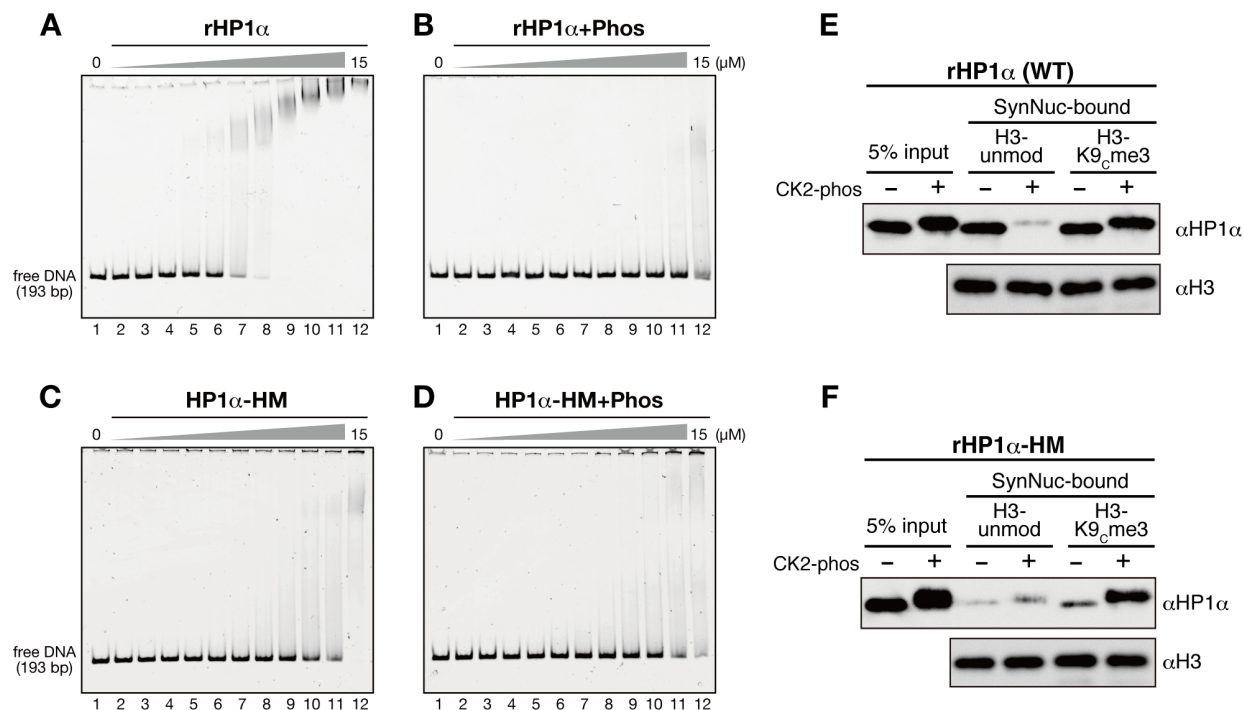


図 2-7 ヒンジ領域の核酸結合能欠失変異体を用いた解析

(A-D) DNA と HP1 のゲルシフトアッセイの結果。それぞれ、非リン酸化 HP1 α -WT (A)、リン酸化 HP1 α -WT (B)、非リン酸化 HP1 α -HM (C)、リン酸化 HP1 α -HM (D)を用いて図 2-6 と同様の実験を行った。(E, F) ヌクレオソームプルダウンアッセイの結果。HP1 α -WT (E)、HP1 α -HM (F)を用いて図 2-5 と同様の実験を行った。

2-4 考察

ヒト培養細胞において HP1 α のリン酸化状態を調べ、ヒトの HP1 α がマウス HP1 α と同様に恒常的にリン酸化されていることが分かった。一般にリン酸化修飾は、ダイナミックに変化して細胞内のシグナル伝達で機能する事が知られている。HP1 α の N 末端領域のリン酸化について、培養細胞だけでなくマウス ES 細胞など未分化な細胞でも検討したが、リン酸化されていない HP1 α の検出はできていない (筆者等、未発表データ)。また、同定した CK2 による N 末端領域のリン酸化は非常に効率が良く、このリン酸化は HP1 α の機能にとって必須なものであると考えられる。一方で HP1 β は N 末端領域にリン酸化が起こらない代わりに、セリンクラスター領域が酸性アミノ酸残基に置き換えられており、またヒンジ領域の核酸結合能も弱い。HP1 α はわざわざリン酸化を入れることで核酸結合能を負に制御するという、一見すると無駄なことをしているように見える。しかし、分裂酵母 Swi6 やショウジョウバエ HP1 α も CK2 でリン酸化されていることから、リン酸化を利用して H3K9me3 や核酸結合を制御する仕組みの方が進化的にも古く、より保存されたシステムであると考えられる。

HP1 α と CK2 を *in vitro* で反応させると、生体内ではほとんど見られない 97 番目に、N 末端領域より効率が悪いもののリン酸基が付加される。生体内ではほとんど見られない理由として、脱リン酸化酵素の関与や他の因子の相互作用によってリン酸化が起こり難くなっている可能性が考えられる。第三章で後述するが、ヒンジ領域のリン酸基は PP2 ファミリーのホスファターゼによって効率良く脱リン酸化されるが、N 末端領域のリン酸基は脱リン酸化され難く、アルカリホスファターゼでないと脱リン酸化されない。細胞内における HP1 α のリン酸化は、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素による拮抗的なバランスによって、適切なリン酸化状態が維持されているのではないかと考えられる。

これまでに、様々な HP1 が DNA や RNA に結合することが示され、その機能との関連が示唆されてきた。本研究によって、少なくとも H3K9me3 ヌクレオソームの結合に関して、HP1 α の DNA 結合能は必須ではないことが分かった。しかしながら、界面活性剤で膜を処理した培養細胞を RNase で処理すると、HP1 α の局在が消失することや、分裂酵母で Swi6 の核酸結合能を欠くと、H3K9me3 ヌクレオソームへの結合

は保持されるが、RNA 結合を介したヘテロクロマチン形成ができなくなることが報告されている (37,38)。したがって、ヌクレオソームに結合した状態で、HP1 がヒンジ領域を介して DNA や RNA と結合している可能性は否定できない。

N 末端領域とヒンジ領域は CD を挟んで離れた場所にある。しかしながら、本研究によって N 末端領域のリン酸化がヒンジ領域の核酸結合能に影響を与えることが明らかになった。全長の HP1 β を用い NMR 構造解析を行った研究では、DNA やヌクレオソームに対して二つの領域が共に弱く結合していることが示されている (50)。これら二つの領域は柔軟な構造を取るため、三次元的に近接しているかどうかは確認できないが、HP1 α においても核酸結合に関して協調的に機能すると考えられる。

当研究室の以前の報告では、HP1 α の N 末端領域のリン酸化によって H3K9me3 ペプチドの結合力が上昇することを示した。今回 DNA との結合能の低下を新たに示し、リン酸化が二重の効果を持つことが分かった。リン酸化によってヌクレオソーム結合の特異性が変化するという点を見出したのは、今回の研究が初めてである。興味深いことに、HP1 α は分裂期に付加的にリン酸化されることが示されている (35,54)。しかしながら、その機能は未だ解明されていない。続く三章では、その分裂期特異的リン酸化の制御機構とその機能について解析し、議論する。

第三章

HP1 α の分裂期特異的リン酸化修飾制御とその機能

3-1 緒言

分裂期において、大部分の HP1 は染色体から解離する。この現象では、HP 1 が認識するメチル残基の隣の H3S10 が、分裂期特異的にリン酸化されることで、HP1 が結合できなくなるということが主な原因だと考えられている (23,26)。しかしながら、ヒト HP1 α は分裂期の染色体のセントロメア領域に弱く局在していることから (25)、HP1 のクロマチン結合を制御する別の機構の存在が示唆される。1999 年に E. Minc 等は、HP1 α , β , γ の抗体を用いて局在やリン酸化状態の解析を行い、HP1 α と γ がどちらも分裂期にリン酸化されていることを明らかにした (55)。当研究室の先行研究において、マウス HP1 α の分裂期特異的なリン酸化部位は、ヒンジ領域に位置する 93 番目のセリン残基であることが分かっている。しかしながら、ヒト HP1 α では、この部位のセリン残基はアスパラギン残基に置換しており、異なる場所に導入されと考えられる。そこでこの章では、まずヒト HP1 α の分裂期特異的リン酸化の検出および部位の同定を行い、次に相互作用する因子の探索により、リン酸化を制御する因子の同定を試みた。さらに、大腸菌内でリン酸化酵素を共発現させる系を用いて分裂期様の HP1 α を調製し、第二章と同じ方法で生化学的性質について検証した。

3-2 実験方法

3-2-1 使用した発現プラスミド

HP1 α の一過的発現及び大腸菌内での発現には、第二章で示したプラスミドを使用した。安定発現細胞株樹立にあたり、pcDNA4/TO_3xFLAG_puro ベクターに HP1 α を組込んだ。ゲノムに導入するために作製したコンストラクトは FspI 制限酵素サイトを利用し、1 本鎖化した。大腸菌内で Aurora B を発現させるために、クローニングしたヒト Aurora B (NM_001284526) を pACYCDuet (Novagen) ベクターに移した。ヒト PP2C β (NM_002706) のクローニングからリコンビナントタンパク質の精製までは、pColdI を用いた同様の手法で行った。

3-2-2 使用した細胞の培養条件とプラスミドの導入

HeLa、HEK293T 細胞の培養及びプラスミドの導入は第二章と同じ方法で行った。Invitrogen 社の Tet-ON システムを利用するための TRex-HeLa 細胞は、10 % FBS、1 mM Sodium pyruvate (ナカライ)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む MEM 培地 (ナカライ) で培養した。3xFLAG タグを融合した HP1 α を挿入し、一本鎖化したプラスミドは PolyFect 溶液 (QIAGEN) を用いて細胞に導入し、2 μ g/ml のピューロマイシン で 48 時間セクションした。クローニングし誘導条件下での発現を確認した細胞株を 15 cm シャーレ 50 枚分に撒き、翌日 5 μ g/ml の濃度になるようにドキシサイクリンを添加し、48 時間、5% CO₂、37°C で培養し回収した。同時に空ベクターのみを挿入し、選択マーカーでセクション後、クローン化した細胞をコントロールとして培養し、同様の操作を行った。

3-2-3 ウェスタンブロット解析

G2/M で細胞周期を止めるために培地に 200 ng/ml のノコダゾールを添加した。タンパク質の調製方法及びウェスタンブロットは第二章と同じ手法を用いた。第三章でのみ使用した抗体を以下に示す。

- anti-HP1 α _Sp92 (癌研究所 広田研究室より分与)
- anti-PP2A_A (81G5 ; Cell Signaling)
- anti-PP2C β (PA5-29263 ; Thermo Scientific)
- anti-TIF1 β (MAB3662 ; Chemicon[Millipore])

3-2-4 組換えタンパク質の調製

HP1 の組換えタンパク質の調製方法は、第二章と同じ手法を用いた。pACYCDuet_AuroraB を同時に発現させる場合は、同時に形質転換し、他の耐性マーカーに加え、さらに 25 µg/ml のクロラムフェニコールを培地に添加した。

3-2-5 FLAG タグを利用した免疫沈降

HP1α 安定発現細胞株を大量培養し、回収した細胞から核抽出液を調製した。10 mg の核抽出液を 1 mg/ml に IP buffer で希釈し、Sephacrose 4B ビーズ 1 ml を添加し 1 時間 4℃でローテーションした。遠心後上清を IP buffer で平衡化した M2 agarose 100 µl に添加し over night 4℃でローテーションした。翌日レジンをカラムに移し、IP buffer 8 ml で 8 回洗浄した。レジンを 1.5 ml チューブに回収し、250 µl の溶出バッファーで 2 回溶出した。溶出後の精製産物に 2 倍量のエタノールを加えよく攪拌した後、-30℃で over night インキュベーションした。翌日 15,000rpm 4℃で 30 分間し、風乾した。サンプルバッファーに懸濁後、ボイルし、全量を SDS-PAGE によって解析した。泳動後のゲルは銀染色し、LC/MS/MS 解析を行った (MS 解析は理研 CDB プロテオミクス解析ユニットに依頼した)。ノコダゾールで処理した分裂期の細胞は IP buffer で回収した後、freeze-thaw で細胞を破碎した。その後の精製は同じ方法で行った。

3-2-6 *in vitro* リン酸化及び脱リン酸化アッセイ

全長の HP1α を用いた *in vitro* リン酸化アッセイには 50 units の Aurora A (Invitrogen)もしくは Aurora B (Invitrogen)を用いた。アッセイの条件は第二章と同じである。脱リン酸化アッセイには、20 units PP2A (Invitrogen)もしくは精製した PP2Cβ (2 µg)を用いた。細胞抽出液を RIPA buffer で抽出した後、等量の PP2 buffer (80 mM Tris-HCl pH8.4, 60 mM MgCl₂)と PP2 を加え 30℃で 3 時間反応させた。

3-2-7 ヌクレオソームプルダウンアッセイ

ヌクレオソームプルダウンアッセイは第二章と同じ手法を用いた。

3-2-8 ゲルシフトアッセイ

HP1 α と DNA のゲルシフトアッセイは第二章と同じ手法を用いた。

3-2-9 クロマチン分画アッセイ

トリプシン処理によって細胞を回収し、PBS で洗浄後、ペレットに 200 μ l の Chromatin fractionation buffer (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 50-150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.2% NP-40, 10% Glycerol, 1 mM NaF)を添加し、10 回ピペッティングにより懸濁した。懸濁液を 100 μ l 取分け (Whole cell lysate; WCL)、残りを 12,000 rpm 4°C で 10 分間遠心した。上清を取分け (Supernatant; Sup)、WCL と Sup に 100 μ l の 2x SDS サンプルバッファーを、ペレット (Ppt)のクロマチンを含むフラクションに 200 μ l の 1x SDS サンプルバッファーを加えた、WCL、Ppt は超音波処理によってクロマチンを分断した後、ボイルした。

3-3 実験結果

3-3-1 ヒト HP1 の分裂期特異的リン酸化修飾の検出

ヒト HP1 α の分裂期特異的なリン酸化はすでに報告されているが、その検証は 2 次元電気泳動を利用したものである (55)。本研究では、その後の解析を行いやすいように Phos-tag を利用したウェスタンブロットを行い、分裂期特異的リン酸化を検出することを試みた。HeLa 細胞をノコダゾールで処理して分裂期の細胞を濃縮して HP1 α を検出したところ、処理時間に依存して移動速度が遅いバンドを複数検出することができた (図 3-1 左)。付加的に検出されるバンドの数が 3 本であることから、少なくとも 2 種類以上の分裂期特異的リン酸化部位が存在することが示唆される。また、同じサンプルを用いて、HP1 β 、HP1 γ に対する抗体でウェスタンし、同様に分裂期特異的なリン酸化を受けるかどうか検討した。その結果、HP1 β には分裂期特異的なリン酸化は認められなかった (図 3-1 中央)。一方 HP1 γ は、リン酸化に由来すると考えられる複数のバンドが検出され、ノコダゾール処理後 24 時間でほとんどの HP1 γ が、泳動度の遅いリン酸化フォームに変化することが分かった (図 3-1 右)。これらの結果は二次元電気泳動を用いた先行研究の結果とよく相関する。興味深いことに、HP1 γ の 2 次元展開による結果では複数のドットが検出されていたことから、Phos-tag WB で検出された泳動度の遅いバンドには、複数のリン酸化 HP1 γ が含まれていると推測される。以後、HP1 α の分裂期特異的リン酸化についてさらに検証する。

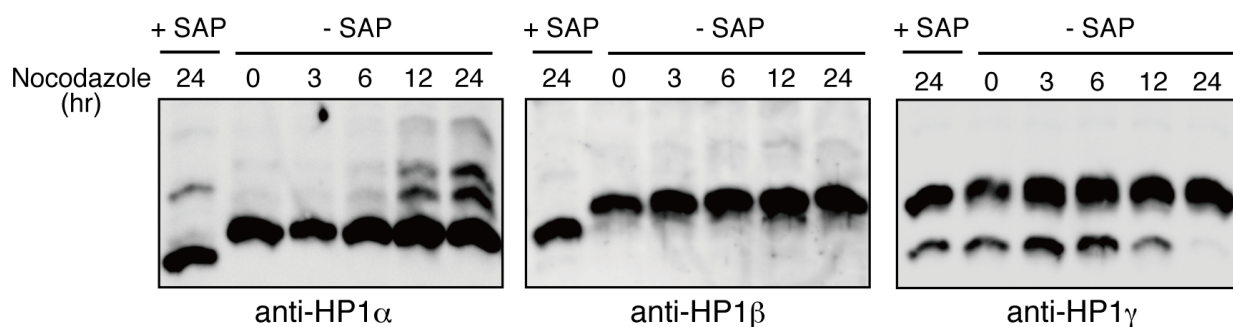


図 3-1 HP1 の分裂期特異的なリン酸化の検出

分裂期特異的なリン酸化を Phos-tag WB により検出した結果。ノコダゾールを 3、6、12、24 時間処理した細胞からそれぞれタンパク質を回収し、図中に示した各抗体で検出した。

3-3-2 HP1α の分裂期特異的リン酸化部位の同定

マウス HP1α を用いた解析から、分裂期特異的なリン酸化部位として、93 番目のセリン残基が同定されている (35)。しかしながら、このアミノ酸残基はヒトとマウスで異なる (図 3-2、赤字で表記)。ヒト HP1α の分裂期特異的なリン酸化部位を同定するため、ヒト HP1α の N 末端領域、ヒンジ領域に存在するセリン、スレオニンをそれぞれアラニンに置換した変異 HP1α を作製した。それぞれの変異体を FLAG タグ融合タンパク質として細胞内で一過的に発現した後、ノコダゾールを用いて分裂期で停止させてから細胞を回収することで、リン酸化部位の同定を試みた。一過的に発現させた野生型の HP1α では、内在性の HP1α を検出したときに見られていた付加的な 3 本のバンドのうち、一番上のバンドはほとんど検出できず、また下のバンドも薄いことが分かった。これは、発現しているタンパク質が多く、分裂期のリン酸化が効率よく行われていないためではないかと考えられる。しかしながら、S92A 変異体では顕著に真ん中のバンドが消失することが確認できた (図 3-3)。また S85A、S87A 変異体では、下のバンドが検出できなかった。これらは互いに近接しており、どちらかが一方のリン酸化に必要なアミノ酸残基の可能性もあるので、リン酸化されるのはどちらか一方、または両方の可能性がある。S97A でバンドのパターンが異なるが、これはアラニン置換により S92 のリン酸化バンドの移動度が変わることが原因だと考えられる。以上の結果より、分裂期特異的な HP1α のリン酸化は主にヒンジ領域に起こり、S92 がリン酸化部位の一つであることが分かった。

HsHP1α	1	MGKK ⁵ TKRTAD ⁸ SSSS ¹¹⁻¹⁴ EDDEEYVVEKVLDRRVVKGQVEYLLKWKGFSEEHTWEPEKNLDCP	60
MmHP1α	1	MGKKTKRTADSSSS ¹¹⁻¹⁴ EDDEEYVVEKVLDRRMVKGQVEYLLKWKGFSEEHTWEPEKNLDCP	60
HsHP1α	61	ELISEFMKKYKKMKEGENNKPRES ⁸⁵ SE ⁸⁷ SNKRKS ⁹² NS ⁹⁵ NS ⁹⁷ ADDIK ¹⁰³ SKKKRE ¹¹⁰ QSN ⁹³ DIARGFERG	120
MmHP1α	61	ELISEFMKKYKKMKEGENNKPRES ⁸⁵ SE ⁸⁷ SNKRKS ⁹² NS ⁹⁵ NS ⁹⁷ ADDIK ¹⁰³ SKKKRE ¹¹⁰ QSN ⁹³ DIARGFERG	120
HsHP1α	121	LEPEKIIGATDSCGDLMLMKWKDTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYEERLTWHAYPED	180
MmHP1α	121	LEPEKIIGATDSCGDLMLMKWKDTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYEERLTWHAYPED	180
HsHP1α	181	AENKEKETAKS	191
MmHP1α	181	AENKEKESAKS	191

図 3-2 ヒト HP1α とマウス HP1α の配列比較

ヒトとマウスで異なるアミノ酸を赤字で示した。赤丸 (枠) で囲んだアミノ酸をそれぞれアラニン置換した。青色の部分は CD を、緑色の部分は CSD をそれぞれ表している。

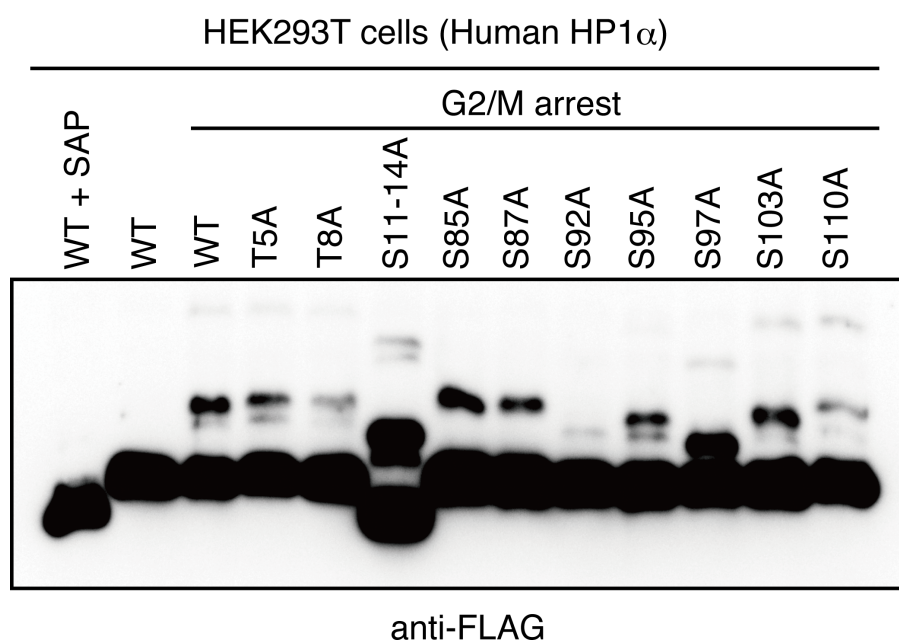


図 3-3 HP1 の分裂期特異的な部位の同定

FLAG タグを付加した HP1 α を 293T 細胞で一過的に発現させ、分裂期特異的リン酸化部位を検証した結果。

3-3-3 HP1 α の分裂期特異的リン酸化状態を制御する酵素の同定

3-3-1 で述べたように HP1 α と HP1 γ は分裂期特異的にリン酸化修飾が付加される。しかしながら、間期の HP1 α は HP1 γ と異なり、分裂期のリン酸化バンドがほとんど検出できない。したがって、HP1 α には分裂期終了後直ちに脱リン酸化される反応が存在すると考えられる。そこで、分裂期特異的なリン酸化を制御するリン酸化酵素と脱リン酸化酵素を探索することを目的として、HP1 α と相互作用する因子の単離を試みた。HP1 α の相互作用因子解析はいくつかの研究室から報告されているが、HP1 α に結合するリン酸化酵素として、Aurora B キナーゼが同定されている (56)。Aurora B は H3S10 をリン酸化する酵素であることがすでに示されており、Aurora B が含まれる Chromosome passenger complex と HP1 が相互作用することが分かっている (26,56)。また、HP1 と相互作用する因子の中に、脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) である PP2A サブユニットが含まれていることが報告されている (56)。PP2A はセントロメアでの姉妹染色分体の接着に関わる Shugoshin を介して HP1 と相互作用し、機能することが報告されている (57)。

非同調の細胞と分裂期に同調させた細胞から FLAG タグを使って HP1 α を免疫沈降

し、沈降後のサンプルを質量分析によって解析した。その結果、同調していない細胞から精製したサンプルでは **Aurora B** は同定できたが、**PP2A** サブユニットは同定できなかった。また、分裂期での機能が報告されているような、他のリン酸化酵素、脱リン酸化酵素は同定できなかった。一方、分裂期で停止させた細胞から精製した **HP1 α** と相互作用する因子の中に、**PP2C β** と呼ばれるホスファターゼが同定された (図 3-4)。**PP2C** ファミリーに属するホスファターゼは単量体で働くホスファターゼであり、現在までにヒトで 16 種類同定されている。また、活性中心には 2 価の陽イオンが配位する (58)。

今回の Mass 解析で確認できなかった **PP2A** サブユニット、そして新たに見出した **PP2C β** に関して、免疫沈降した産物をウェスタンブロットによって解析する手法 (IP-WB) で相互作用を確認した。その結果、Mass 解析の結果と同様に **PP2C β** は分裂期に **HP1** と相互作用することがわかった。また、**PP2A** サブユニットは非同調の細胞でも結合していることが確認できた (図 3-5)。

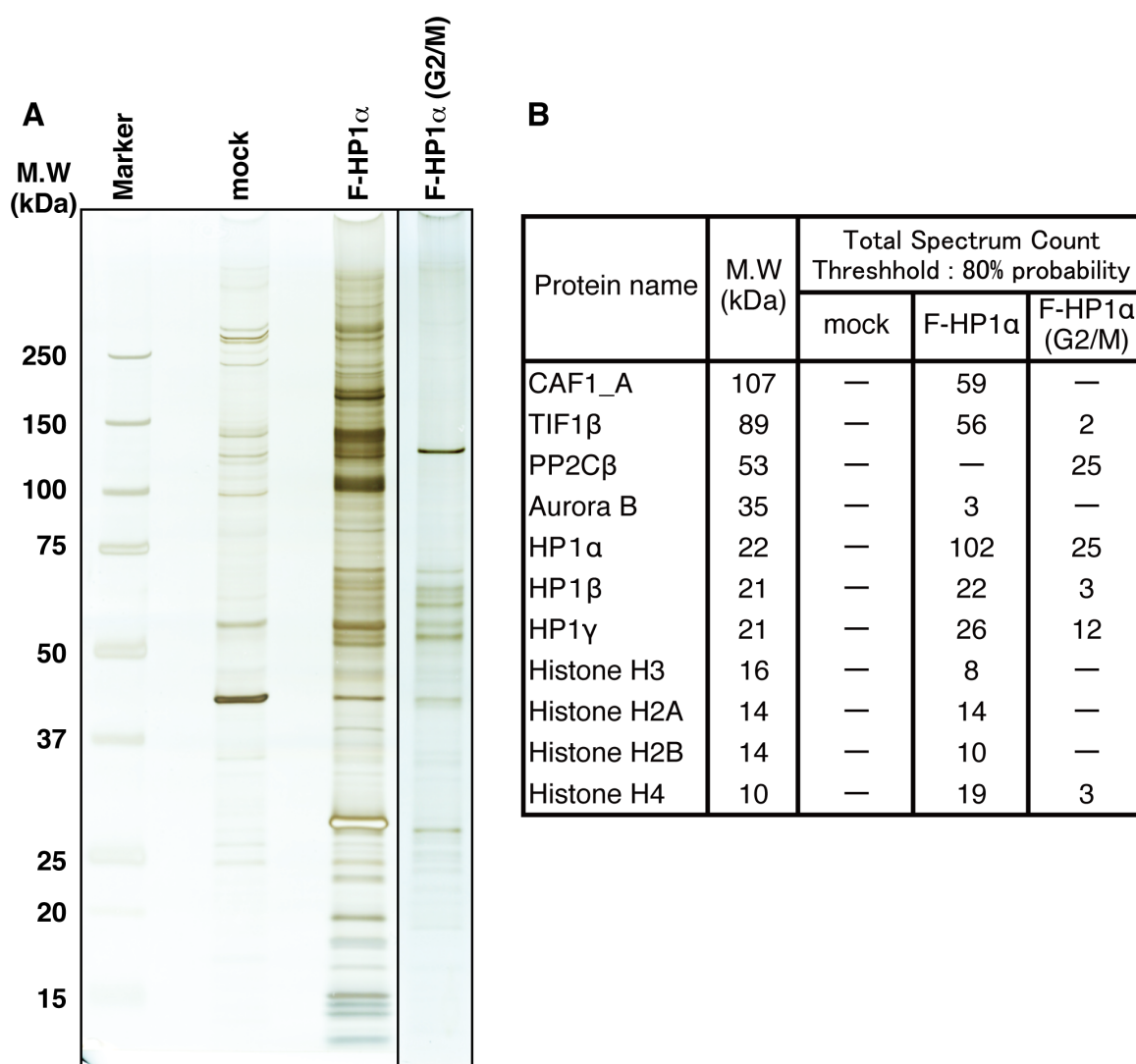


図 3-4 FLAG タグを利用した HP1 α のアフィニティー精製

FLAG タグを付加した HP1 α を安定発現する細胞から、アフィニティー精製によって相互作用因子を精製した。精製産物の銀染色図 (A)と Mass 解析の結果、同定されたペプチドの数を代表的なものだけまとめた表 (B)を示した。

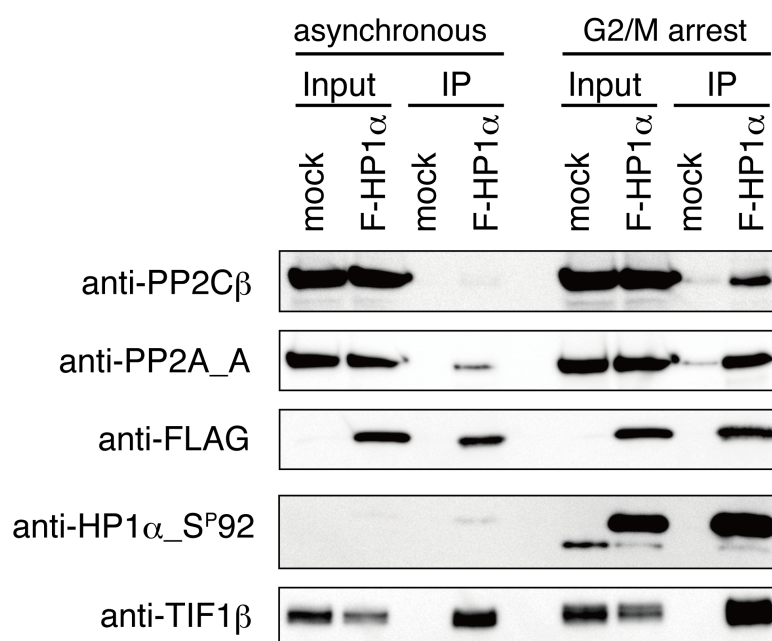


図 3-5 免疫沈降産物の WB による相互作用の確認

FLAG タグを付加した HP1 α を HEK293T 細胞で一過的に発現し、非同調の細胞と分裂期に同調させた細胞から HP1 α を精製し、それぞれの抗体で結合を確認した。

次に、実際にこれらの因子が HP1 α のヒンジ領域のリン酸化を制御しているかどうか確認した。まず、*in vitro* で Aurora キナーゼによるリン酸化反応を行った。この際、HP1 γ のリン酸化酵素として報告のある Aurora A についても同様に実験を行った (44)。その結果、HP1 α は Aurora B でより強くリン酸化されることが分かった (図 3-6A)。また、リン酸化された HP1 α が S92 リン酸化抗体で検出できること、S92A 変異体ではリン酸化されないことから、Aurora B によるリン酸化はヒンジ領域の S92 に起こることが分かった (図 3-6A)。さらに、細胞培養液に Aurora B 阻害剤である ZM-447439 を添加するとノコダゾールで処理しても分裂期のリン酸化は起こらないことから、細胞内でも S92 のリン酸化を担うのは Aurora B であることが分かった (図 3-6B)。今回の研究では、S85、S87 のリン酸化酵素については同定できなかった。

次に分裂期で停止した細胞からタンパク質抽出液を調製し、そこに同定した PP2C β もしくは PP2A の活性サブユニットを添加し、脱リン酸化反応を行った。その結果、PP2C β 、PP2A のどちらもヒンジ領域のリン酸基を脱リン酸化することが分かった (図 3-C)。一方で、これら脱リン酸化酵素を反応させても一番泳動度の早い主要なバンドは変化しないことから、N 末端領域のリン酸基は基質にならないと考えられる。

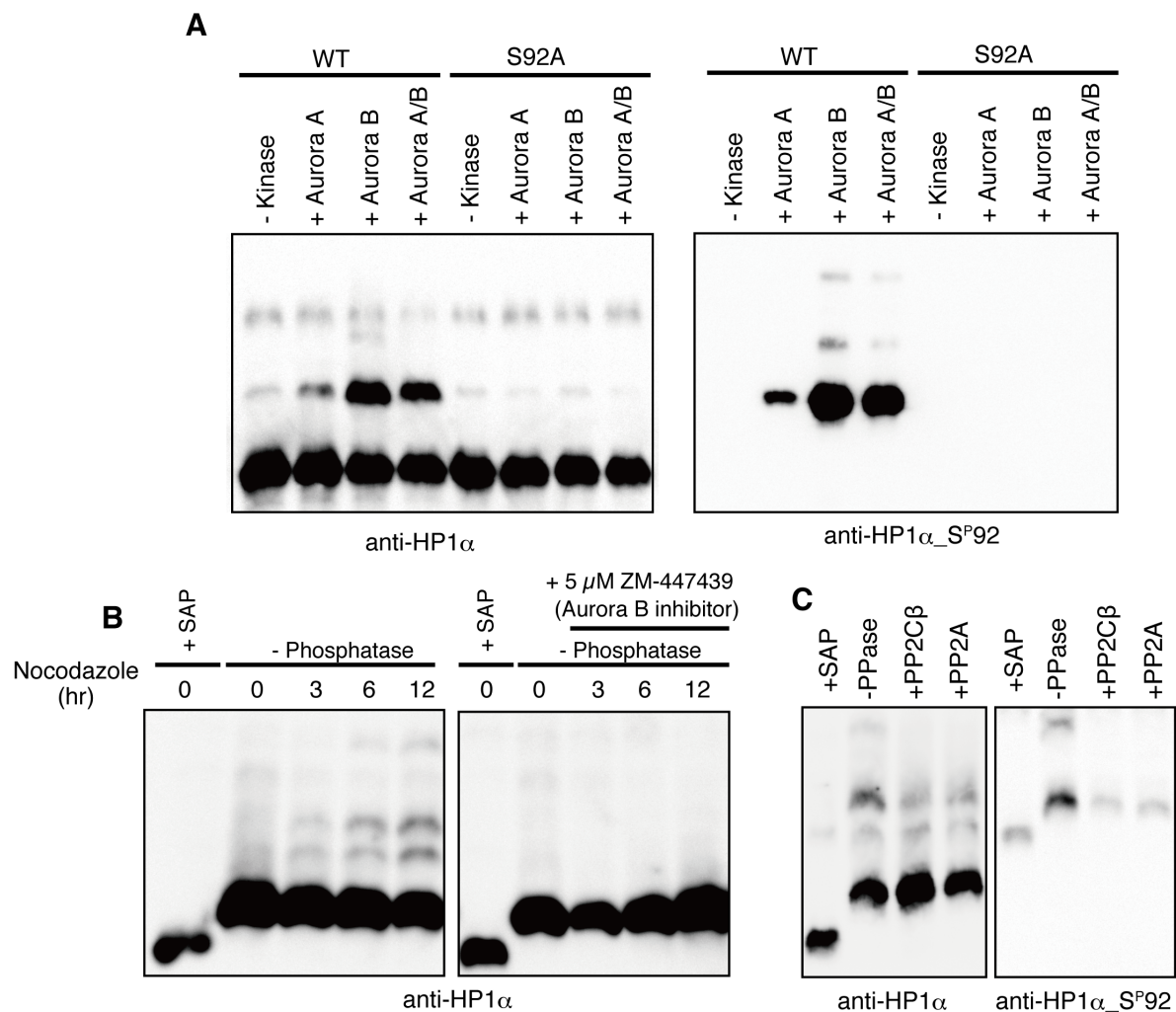


図 3-5 HP1 α ヒンジ領域のリン酸化制御機構

(A) *in vitro* で HP1 α と Aurora kinase を反応させ、Phos-tag WB にてリン酸化状態を確認した。(B) HEK293T 細胞に 5 μ M ZM-447439 を添加し、Phos-tag WB でリン酸化状態を確認した。(C) ノコダゾールで 12 時間処理した HEK293T 細胞からタンパク質抽出液を調製し、ホスファターゼを添加することで脱リン酸化アッセイを行った。

3-3-4 大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製

大腸菌内で共発現する手法を応用して、分裂期型のリン酸化HP1 α の調製を試みた。分裂期のHP1 α は同定したAurora Bだけでなく、恒常的なリン酸化も存在する。そこで異なる複製起点と耐性マーカーを持つプラスミドにAurora Bを組み込み、3種類の発現ベクターを大腸菌に導入し、リン酸化HP1 α の精製を行った(図3-6A)。以降の解析では、分裂期に起こるヒンジ領域のリン酸化について検証するため、CK2の基質となるS97を置換したS97A変異体を用いた(図3-6C参照)。精製後のサンプルを確認した結果を図3-7Bに示す。大腸菌の共発現を利用したこの系では、S92がリン酸化されたHP1 α は全体の70~80%程度にとどまり、S92がリン酸化されていないHP1 α が一部残ることが分かった。このような条件を踏まえた上で、分裂期特異的なリン酸化の影響を生化学的解析によって検討した。

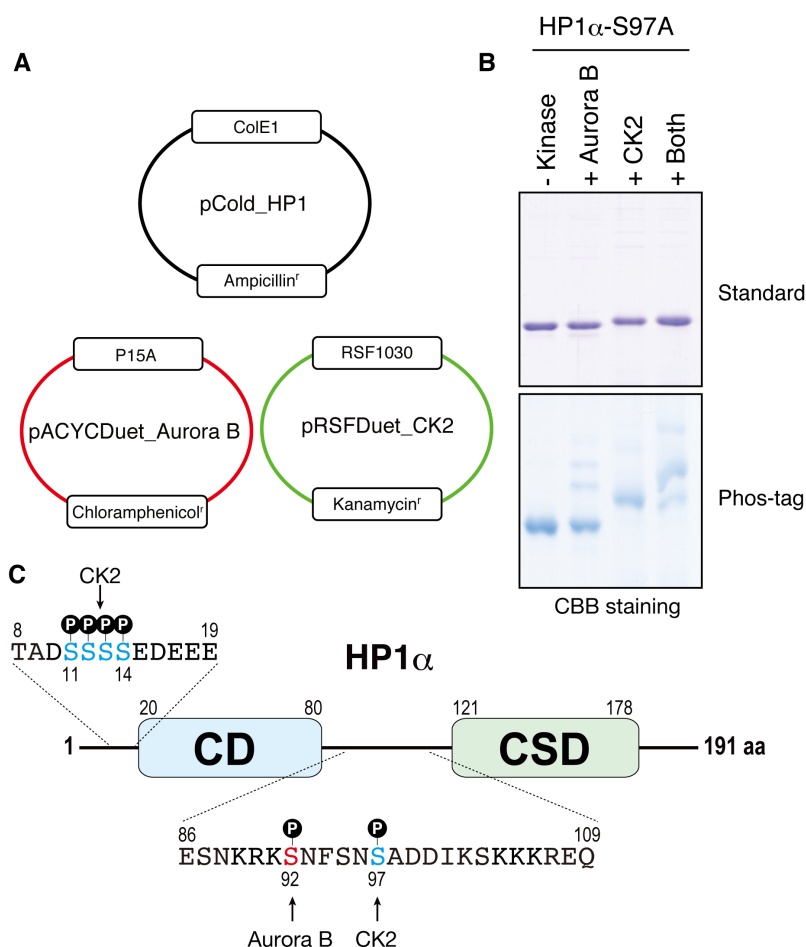


図 3-6 調製した組換えタンパク質の確認

(A) 使用したそれぞれのプラスミドの複製起点と耐性マーカーを示した。(B) 最終精製産物のCBB染色図。(C) HP1 α の全体図にそれぞれのリン酸化部位を示した。

3-3-5 HP1 α の分裂期特異的リン酸化修飾の機能

第二章で、N 末端側のリン酸化がヌクレオソーム結合特異性に寄与していることを示した。ここではヒンジ領域のリン酸化の影響を考察するため、N 末端側のリン酸化に加えてさらに Aurora B による S92 のリン酸化を付加した HP1 α を調製し、その影響を検証した。まず、再構成ヌクレオソームを用いたプルダウンアッセイによって、ヌクレオソームの結合特性を解析した。その結果、CK2 と Aurora B の両方によってリン酸化した HP1 α は、CK2 だけでリン酸化した HP1 α とほぼ同等の H3K9me3 ヌクレオソームに対する結合能を示した (図 3-7A)。次に、DNA との相互作用をゲルシフトアッセイで検証した。その結果、CK2、Aurora B 両方でリン酸化した HP1 α は、CK2 のみでリン酸化した HP1 α よりも DNA への結合が弱くなることが分かった (図 3-7B)。これは、CK2 によって付加された S97 のリン酸化による影響と似ている (図 2-6)。第二章で、HP1 α の N 末端領域のリン酸化によって DNA との結合力が大きく下がることを示したが、分裂期特異的なヒンジ領域のリン酸化は、さらなる核酸結合能の低下を示すことが分かった。しかしながら、その効果は弱く、*in vitro* のアッセイだけで議論することは難しい。そこで細胞を用いてクロマチン分画アッセイを行うことでヒンジ領域のリン酸化が HP1 α のクロマチン局在に寄与しているか検討することにした。ノコダゾール処理によって分裂期で停止させた細胞から可溶性画分 (Sup) とクロマチン画分 (Ppt) を分離し、HP1 α のリン酸化状態を調べたところ、抽出の際の塩濃度に関わらず、ヒンジ領域がリン酸化された HP1 α は、クロマチンから容易に解離することが分かった (図 3-7C)。以上の結果より、ヒンジ領域がリン酸化された HP1 α は、分裂期染色体からの解離に寄与していることが示唆された。

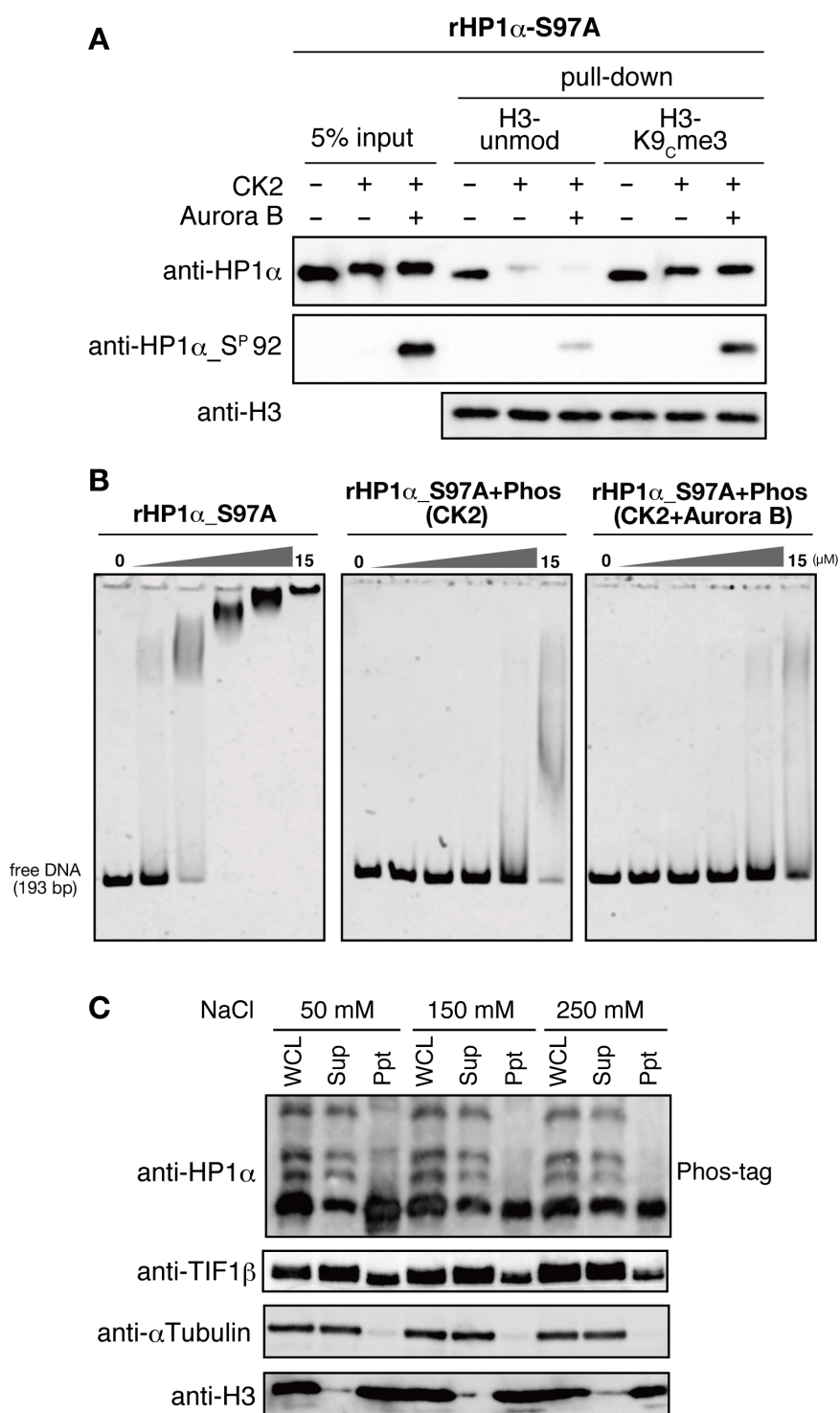


図 3-7 HP1 α ヒンジ領域のリン酸化のクロマチン結合における意義

(A,B) リン酸化 HP1 α を用いたヌクレオソームプルダウンアッセイ (A) と DNA ゲルシフトアッセイ (B)。 (C) HeLa 細胞を用いたクロマチン分画アッセイ。チューブリン (Tubulin) と H3 をそれぞれ可溶性画分とクロマチン画分のコントロールとして使用した。

3-4 考察

本研究によって、ヒト HP1 α の分裂期特異的なリン酸化部位は複数あることが分かった。その中の一つのリン酸化部位は S92 であり、Aurora B によってリン酸化されることを示した。またその他の部位として S85, S87 のどちらか、またはその両方が候補と考えられる。*in vitro*での結果を見る限り S85、S87 のリン酸化酵素は Aurora B では無いが、細胞内では Aurora B 阻害剤を添加すると分裂期特異的なリン酸化バンドは観察できなくなることから、S85、S87 のリン酸化反応は、Aurora B のリン酸化活性の下流の反応である可能性が示唆された。最近マウスの細胞を用いた解析から、NDR と呼ばれるリン酸化酵素が、HP1 α の S95 を分裂期特異的にリン酸化することが報告された (45)。しかしながら、ヒト HP1 α を用いた本研究では、S95 の変異は分裂期特異的なリン酸化に大きな影響を及ぼさなかった (図 3-3)。ただし、Phos-tag を用いた時の分裂期特異的なリン酸化バンドのパターンがマウスとヒトで異なること、複数のアミノ酸がリン酸化されることから考えて、マウス HP1 α において S95 がリン酸化されている可能性は否定できない。

本研究では、新たな知見として HP1 α の脱リン酸化酵素の関与を明らかにした。HP1 は分裂期において染色体から解離し、分裂期終了後直ちに染色体上に戻る。PP2C β は細胞質に局在するタンパク質であるが (59)、核膜が崩壊する分裂期には HP1 α を基質とすることができると考えられる。一方、HP1 α は分裂期の染色体のセントロメア上にわずかに局在し続けている (25)。また、HP1 は Shugoshin (Sgo1) のセントロメア領域への局在に重要であること、さらに Sgo1 と相互作用する PP2A はコヒーシンサブユニットの脱リン酸化を担っていることが報告されている (58,60)。今回の研究によって、分裂期特異的な HP1 α のリン酸化がクロマチンとの解離を促すこと、また、PP2A によって脱リン酸化されることを示した。以上の先行研究と今回の結果より、通常 H3S10 のリン酸化で制御され则认为られている HP1 α の解離には、さらにヒンジ領域のリン酸化が必要であり、一方で HP1 α が PP2A によって染色体上で脱リン酸化されることによって、分裂期での Sgo1 のセントロメア局在に寄与しているのではないかと推測される (図 3-8)。

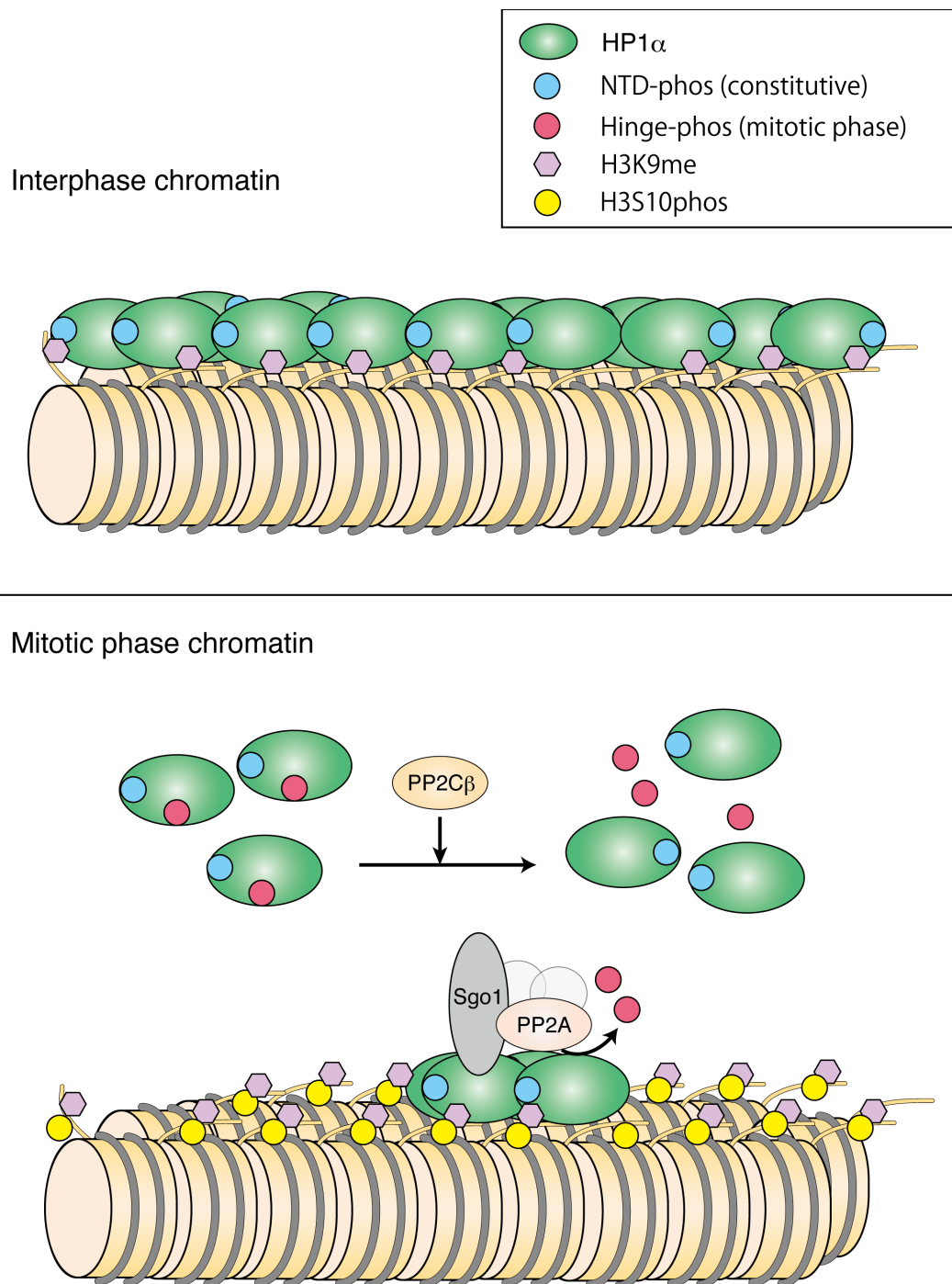


図 3-8 HP1 α のリン酸化修飾による機能制御モデル

間期 (Interphase)において、HP1 α は N 末端側領域 (NTD)のリン酸化依存的に、H3K9me 修飾を含むヘテロクロマチンへと局在する。分裂期 (Mitotic phase)に入ると、HP1 α はヒンジ領域がさらにリン酸化され、クロマチンからの解離を促進する。ヒンジ領域のリン酸化は、可逆的な制御を受けており、ダイナミックな分裂期における HP1 α の局在に寄与していると考えられる。

第四章

結論

4 結論

ヘテロクロマチンの代表的なヒストン修飾である H3K9me 修飾は、HP1 によって認識される。H3K9me の認識には CD が重要であり、2001 年にその機構について一連の報告がなされた (18-20)。その後の約 10 年の間に、構造解析を含めて多くのことが解明されてきたが、再構成ヌクレオソームを使った最近の研究から、CD によるヒストンテイルへの結合だけでは、H3K9me ヌクレオソームに対する特異性は説明できないという問題が生じてきた。しかしながら、ヘテロクロマチン領域は凝集した構造でありモノヌクレオソームの領域はほとんど存在しない。そのため、先行研究では複数のヌクレオソームからなるオリゴヌクレオソームという状況が、HP1 の結合特異性に寄与していることが提唱された (48,49)。その一方、別のグループから、モノヌクレオソームを使った実験でも、H3K9me3 ヌクレオソームに対する結合特異性が見られるということが報告された (50)。これらの報告は一見矛盾するが、使用している HP1 の種類が異なっていた。前者は分裂酵母 Swi6 や哺乳類 HP1 α であり、後者は哺乳類 HP1 β である。また、これら二つの大きな違いは、前者が細胞内では CK2 によってリン酸化されている点にある。本研究では、哺乳類 HP1 α の N 末端領域のリン酸化がヌクレオソームの結合特異性を制御している点を明らかにした。またその原因が、ヒンジ領域の DNA 結合を介した未修飾ヌクレオソームに対する結合であることを新たに明らかにすることができた。今後、他のクロマチン結合タンパク質でも、リン酸化によって結合が制御されているような例が報告されることが期待される。

今回の研究では、リン酸化以外の翻訳後修飾は全く検討していない。SUMO 化された HP1 は RNA との相互作用に重要であることが示されており (46)、HP1 のクロマチン結合に他の翻訳後修飾が働く可能性は十分考えられる。しかしながら、これまでのヒストンの翻訳後修飾の認識に関する解析のほとんどは、認識する側の翻訳後修飾をあまり考慮しないで検討が行われていた。また、通常リン酸化の解析には、合成したリン酸化ペプチドやリン酸化部位を酸性アミノ酸残基に置換したものを利用することが多いが、前者は全長のタンパク質での調製がほぼ不可能であること、後者は構造や電荷の強さが必ずしも同じでないことが問題としてある。今回用いた大腸菌内でリン酸化する系を用いれば、理論上 4 つのリン酸化酵素を同時に発現することができ、

生体内のより複雑なリン酸化状態を模倣することができ、今後様々な分野に応用されることが期待される。しかしながら、生体内ではほとんど見られないようなリン酸化が起こる場合もあるので、その点は注意しなければならない。

ヒンジ領域のリン酸化に関して、第三章の考察では現時点でのモデルを提唱したが、実験的な証拠が乏しいのが実情である。細胞内にヒンジ領域のリン酸化が起こらない変異体を発現させてもその局在はほとんど変化しない（筆者等未発表データ）。その原因の一つは、CSD を介してどの種類の HP1 同士でも二量体を形成できる点にある。細胞内の HP1 の量は非常に多く、常に HP1 α 変異体がホモ二量体を形成する可能性は低い。また、内在性の HP1 α が存在する場合、変異体がドミナントに機能しない限り影響が見えないことも原因の一つである。そこで少なくとも、内在性のタンパク質をノックダウンし、変異を含む HP1 α を発現する手法を用いて、細胞内での機能解析を行う必要があると思われる。また、分裂酵母を用いることでよりシンプルに分裂期特異的なリン酸化の機能を解析できるかもしれない。本研究で記述したほとんどの因子は、分裂酵母においても保存されている。また、H3K9me と HP1 の関係や細胞分裂の機構も良く保存されている。分裂酵母で Aurora キナーゼによって HP1 が細胞周期依存的にリン酸化されるかどうかは、不明であるが、今後の解析による進展が期待される。

<特記事項>

本研究における DNA 組換え実験は、遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経て適切に行われた。承認番号: 12-301, 13-302

参考文献

1. Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, & Richmond TJ (2002) Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 angstrom resolution. *J Mol Biol* 319 (5):1097-1113.
2. Allis CD, Jenuwein T, & Reinberg D (2007) EPIGENETICS. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1:31.
3. Jost KL, Bertulat B, & Cardoso MC (2012) Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? *Chromosoma* 121 (6):555-563.
4. Grewal SI & Elgin SC (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2):178-187.
5. Goto DB & Nakayama J (2012) RNA and epigenetic silencing: insight from fission yeast. *Dev Growth Differ* 54 (1):129-141.
6. Martens JH, *et al.* (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J* 24 (4):800-812.
7. Allfrey VG, Faulkner R, & Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51:786-794.
8. Csordas A (1990) On the biological role of histone acetylation. *Biochem J* 265 (1):23-38.
9. Brownell JE, *et al.* (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84 (6):843-851.
10. Tschiersch B, *et al.* (1994) The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* 13 (16):3822-3831.
11. Rea S, *et al.* (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406 (6796):593-599 .
12. Czermin B, *et al.* (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111 (2):185-196.
13. Klose RJ & Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (4):307-318.

14. Bannister AJ & Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21 (3):381-395.
15. James TC, *et al.* (1989) Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* 50 (1):170-180.
16. Eissenberg JC, *et al.* (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (24):9923-9927.
17. Paro R & Hogness DS (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1):263-267.
18. Bannister AJ, *et al.* (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410 (6824):120-124.
19. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, & Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410 (6824):116-120.
20. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, & Grewal SI (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292 (5514):110-113.
21. Nielsen PR, *et al.* (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* 416 (6876):103-107.
22. Fischle W, *et al.* (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 17 (15):1870-1881.
23. Fischle W, *et al.* (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438 (7071): 1116-1122 .
24. Festenstein R, *et al.* (2003) Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* 299 (5607):719-721.
25. Hayakawa T, Haraguchi T, Masumoto H, & Hiraoka Y (2003) Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci* 116 (16):3327-3338.

26. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, & Peters JM (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438 (7071):1176-1180.
27. Terada Y (2006) Aurora-B/AIM-1 regulates the dynamic behavior of HP1alpha at the G2-M transition. *Mol Biol Cell* 17 (7):3232-3241.
28. Vermeulen M, *et al.* (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142 (6):967-980 .
29. Aasland R & Stewart AF (1995) The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res* 23 (16):3168-3173.
30. Brasher SV, *et al.* (2000) The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J* 19 (7):1587-1597.
31. Nielsen AL, *et al.* (2001) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Molecular cell* 7 (4):729-739.
32. Nishibuchi G & Nakayama J (2014) Biochemical and structural properties of heterochromatin protein 1: understanding its role in chromatin assembly. *J Biochem* 156 (1):11-20.
33. Zhao T, Heyduk T, & Eissenberg JC (2001) Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem* 276 (12):9512-9518.
34. Shimada A, *et al.* (2009) Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. *Genes Dev* 23 (1):18-23.
35. Hiragami-Hamada K, *et al.* (2011) N-terminal phosphorylation of HP1α promotes its chromatin binding. *Mol Cell Biol* 31 (6):1186-1200.
36. Zhao T, Heyduk T, Allis CD, & Eissenberg JC (2000) Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem* 275 (36):28332-28338.
37. Keller C, *et al.* (2012) HP1 (Swi6) mediates the recognition and destruction of heterochromatic RNA transcripts. *Molecular cell* 47 (2):215-227.

38. Meehan RR, Kao CF, & Pennings S (2003) HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J* 22 (12):3164-3174.
39. Muchardt C, *et al.* (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep* 3 (10):975-981.
40. Mishima Y, *et al.* (2013) Hinge and chromoshadow of HP1alpha participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J Mol Biol* 425 (1):54-70.
41. LeRoy G, *et al.* (2009) Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* 8 (11):2432-2442.
42. Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, & Venkitaraman AR (2008) HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453 (7195):682-686.
43. Lomberk G, Bensi D, Fernandez-Zapico ME, & Urrutia R (2006) Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* 8 (4):407-415.
44. Grzenda A, *et al.* (2013) Functional impact of Aurora A-mediated phosphorylation of HP1gamma at serine 83 during cell cycle progression. *Epigenetics Chromatin* 6 (1):21.
45. Chakraborty A, Prasanth KV, & Prasanth SG (2014) Dynamic phosphorylation of HP1alpha regulates mitotic progression in human cells. *Nat Commun* 5:3445.
46. Maison C, *et al.* (2011) SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat Genet* 43 (3):220-227.
47. Shin JA, *et al.* (2005) SUMO modification is involved in the maintenance of heterochromatin stability in fission yeast. *Molecular cell* 19 (6):817-828.
48. Canzio D, *et al.* (2011) Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Molecular cell* 41 (1):67-81.

49. Azzaz AM, *et al.* (2014) Human heterochromatin protein 1alpha promotes nucleosome associations that drive chromatin condensation. *J Biol Chem* 289 (10):6850-6861.
50. Munari F, *et al.* (2012) Methylation of lysine 9 in histone H3 directs alternative modes of highly dynamic interaction of heterochromatin protein hHP1beta with the nucleosome. *J Biol Chem* 287 (40):33756-33765.
51. Dignam JD, Lebovitz RM, & Roeder RG (1983) Accurate Transcription Initiation by Rna Polymerase-Ii in a Soluble Extract from Isolated Mammalian Nuclei. *Nucleic Acids Research* 11 (5):1475-1489.
52. Tachiwana H, *et al.* (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (23):10454-10459.
53. Simon MD, *et al.* (2007) The site-specific installation of methyl-lysine analogs into recombinant histones. *Cell* 128 (5):1003-1012.
54. Pagano MA, *et al.* (2007) Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors. *Chembiochem* 8 (1):129-139
55. Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, & Buendia B (1999) Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108 (4):220-234.
56. Nozawa RS, *et al.* (2010) Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat Cell Biol* 12 (7):719-727.
57. Kitajima TS, *et al.* (2006) Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441 (7089):46-52.
58. Shi Y (2009) Assembly and structure of protein phosphatase 2A. *Sci China C Life Sci* 52 (2):135-146.
59. Seroussi E, *et al.* (2001) Uniquely conserved non-translated regions are involved in generation of the two major transcripts of protein phosphatase 2Cbeta. *J Mol Biol* 312 (3):439-451.
60. Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M, & Watanabe Y (2008) Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455 (7210):251-255.

学会発表一覧と出版物目録 (2012 年 4 月～2015 年 3 月)

<学会発表>

1. 西淵剛平、柴田幸政、早川典代、大谷寧子、早川智博、新名主カオリ、中山潤一
「ヒストン脱メチル化酵素 RBP2 と相互作用する因子の探索と転写調節における役割の解明」第 6 回エピジェネティクス研究会年会、東京、2012 年 5 月
2. 西淵剛平、柴田幸政、早川典代、大谷寧子、早川智博、新名主カオリ、中山潤一
「ヒストン脱メチル化酵素 RBP2 と相互作用する因子の探索と転写調節における役割の解明」第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月
3. 西淵剛平、中山潤一
「哺乳類 HP1 のリン酸化制御メカニズムと染色体機能維持におけるその役割の解析」第 30 回染色体ワークショップ、淡路、2012 年 12 月
4. 西淵剛平、中山潤一
「哺乳類 HP1 のリン酸化制御メカニズムと高次クロマチン構造形成における役割の解析」第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良、2013 年 5 月
5. 西淵剛平、町田晋一、越阪部晃永、鈴木美恵子、大屋恵梨子、中川れい子、胡桃坂仁志、中山潤一
「ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 のリン酸化修飾と高次クロマチン構造形成のダイナミクス」第 31 回染色体ワークショップ、箱根、2013 年 11 月
6. 西淵剛平、町田晋一、越阪部晃永、鈴木美恵子、大屋恵梨子、中川れい子、胡桃坂仁志、中山潤一
「ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 のリン酸化修飾と高次クロマチン構造形成のダイナミクス」第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013 年 12 月
7. G. Nishibuchi, Y. Shibata, T. Hayakawa, K. Shinmyozu and J. Nakayama.
「Physical and functional interaction between histone H3K4 demethylase JARID1A and NuRD complex」Keystone Symposia Conference [Chromatin Mechanisms and Cell Physiology], Oberstdorf (Germany), March 2014.

8. G. Nishibuchi, Y. Shibata, T. Hayakawa, K. Shinmyozu, H. Tagami and J. Nakayama.

「Physical and functional interaction between histone H3K4 demethylase JARID1A and NuRD complex」 IAS Research Conference [Chromatin Decoding], Kyoto, May 2014.

9. 西淵剛平、町田晋一、越阪部晃永、村越大夢、浜田京子、中川れい子、Fischle Wolfgang、胡桃坂仁志、田上英明、中山潤一

「HP1 のリン酸化は H3K9me3 nucleosome に対する結合特異性を制御している」
第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月

10. 西淵剛平、中山潤一

「HP1 における分裂期特異的リン酸化の動的制御とその機能」第 32 回染色体ワークショップ、広島、2014 年 12 月

<原著論文>

1. Nishibuchi G, Shibata Y, Hayakawa T, Hayakawa N, Ohtani Y, Shinmyozu K, Tagami H and Nakayama JI.

「Physical and Functional Interactions between the Histone H3K4 Demethylase KDM5A and the Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) Complex.」

The Journal of Biological Chemistry. 289(42):28956-70 (2014)

2. Nishibuchi G, Machida S, Osakabe A, Murakoshi H, Hiragami-Hamada K, Nakagawa R, Fischle W, Nishimura Y, Kurumizaka H, Tagami H and Nakayama JI.

「N-terminal phosphorylation of HP1 α increases its nucleosome-binding specificity.」

Nucleic Acids Research. 42(20):12498-511 (2014)

<総説論文>

1. Nishibuchi G and Nakayama JL.
「Biochemical and structural properties of Heterochromatin Protein 1:
understanding its role in chromatin assembly」
The Journal of Biochemistry. 156(1):11-20 (2014)

<邦文総説・書籍>

1. 西淵剛平、中山潤一「エピジェネティクス;第4章ヒストンアセチル化制御」p49-65、
化学同人、2013年
2. 西淵剛平、中山潤一「エピジェネティクスキーワード事典;第5章 ヒストンのアセチル化」 p43-51、羊土社、2013年

謝辞

卒業研究から 6 年間、基礎的な実験方法から丁寧に指導して下さった指導教官の中山潤一教授に深く感謝致します。

本研究を進めるに当たり、システム自然科学研究科准教授 田上英明先生には、研究室の立ち上げから論文投稿に至るまで、大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。また、本研究に必要な多くの研究試料を提供して下さいった早稲田大学先進理工学部教授 胡桃坂仁志先生、並びに胡桃坂研究室の皆様、質量分析を行って下さった理研 CDB 質量分析ユニット 中川れい子氏、日々の実験を行うにあたり大変お世話になった中山研究室の皆様に心より感謝致します。

最後に、自由に研究生活を送れるように支援してくれただけでなく、時には議論の相手をしてくれた両親、姉に深く感謝致します。

解説

生物がもつ遺伝情報を、コードしている DNA (ゲノム)は、基本的にその生物の複雑さに比例してより長くなる。そして酵母からヒトに至るまで、細胞内に核構造を持つ真核生物はその長大なゲノムを核という小さな領域に収納する必要がある。そのためにゲノム DNA はヒストンと呼ばれるタンパク質に巻き付いた構造 (ヌクレオソーム構造)を取っており、それらがさらに高度に折りたたまれコンパクトにまとめられている。一方で、個体発生、組織分化、外部環境に応じて使用する遺伝情報を制御し、適切なレベルに調節しなければならない。その際、DNA とヒストンなどのタンパク質からなる、コンパクトに凝縮した構造 (クロマチン構造)を部分的に緩めたり、きつくしたりする制御が重要となってくる。このようなクロマチンの構造変換は、DNA の一次配列の変化を伴わない遺伝現象として知られる「エピジェネティクス」を制御する重要な分子機構の一つとして注目されている。特に、クロマチンを構成するヒストンに目印をつける制御方法は、このエピジェネティックなクロマチンの構造変換において重要な役割を果たしている。

ヒストンにはアセチル化、メチル化、リン酸化などの様々な化学修飾が付加される。その中でもヒストンのメチル化は、付加される残基によってその役割が大きく異なることが知られている。ヒストン H3 タンパク質の 9 番目のリジン残基のメチル化修飾 (H3K9me)はヘテロクロマチンと呼ばれるクロマチンの中でもさらに高度に凝縮したクロマチン構造の構築に必要である。反対に、ユークロマチンと呼ばれる緩んだ状態のクロマチン領域では遺伝子の転写が活発であり、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基にメチル化修飾が付与される。ヒストンのメチル化修飾はメチル化酵素、脱メチル化酵素によって可逆的に制御される反応であり、メチル化ヒストンを認識するリーダータンパク質によってその情報が読み取られ、各々の構造を形作る。

これまで分裂酵母、ショウジョウバエなどのモデル生物や哺乳類の培養細胞を用いた解析から、ヘテロクロマチン構造のマークである H3K9me を認識して結合する Heterochromatin Protein 1 (HP1)が、高度に凝縮した抑制的なクロマチン構造の形成に重要な役割を果たしている事が明らかにされている。HP1 には α 、 β 、 γ の 3 種類のファミリータンパク質が存在するが、どの HP1 も自身のクロモドメインと呼ばれる領

域でメチル化ヒストンに結合し、クロマチン構造変換を促進すると考えられている。

一方で、その HP1 自身の翻訳後修飾も HP1 の機能を制御する上で重要である。これまでに、哺乳類の HP1 α の N 末端側のセリンクラスターが常時リン酸化されていること、そしてこの HP1 のリン酸化がメチル化ヒストンへの結合を促進していることが明らかにされている。また、HP1 α が細胞分裂期特異的にリン酸化されていることも示されている。しかしながら、依然として HP1 のリン酸化修飾がどのようにクロマチン結合に寄与しているのか、その詳細には不明な点が多く残されている。

本研究では、HP1 α のリン酸化修飾とクロマチン構造の制御機構の関係を解明することを最終目標とし、まずリン酸化酵素や脱リン酸化酵素の同定によって、翻訳後修飾の動的制御機構の解明を目指した。次に試験管内でリン酸化 HP1 を調製する手法を確立し、クロマチンを構成する DNA やヌクレオソームとの結合を評価することで、HP1 のヘテロクロマチン結合におけるリン酸化修飾の役割を明らかにすることにした。

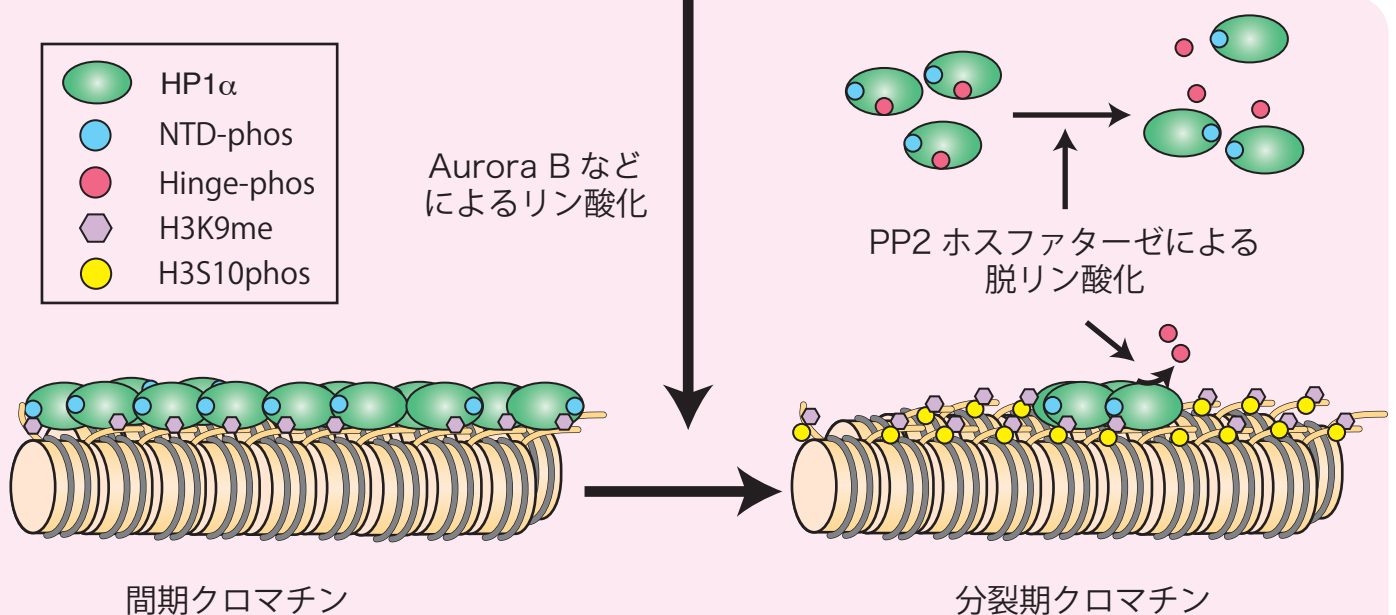
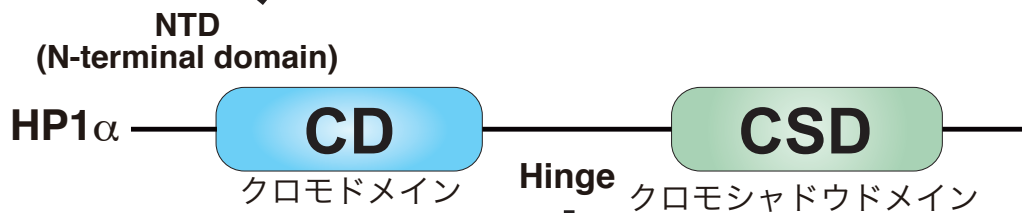
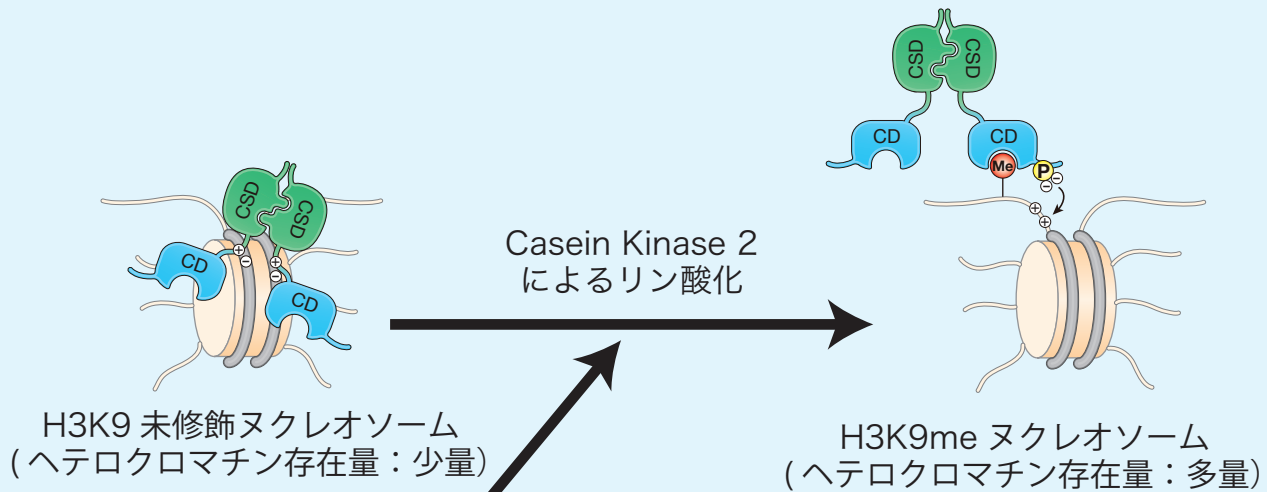
解析の結果、常に N 末端領域で起こるリン酸化の酵素として、カゼインキナーゼ 2 (Casein Kinase 2; CK2) を、分裂期に起こるリン酸化の内、主要な酵素として、Aurora B キナーゼを同定することができた。また分裂期のリン酸化が脱リン酸化酵素によって可逆的に制御されるリン酸化修飾であることを同時に明らかにした。HP1 α のリン酸化の機能の中でもっとも興味深かった知見は、哺乳類 HP1 α の N 末端側で起こる恒常的なリン酸化が、HP1 α と DNA との相互作用を大きく減少させることであった。この効果により、H3K9 未修飾のヌクレオソームに対する親和性が減少し、ヘテロクロマチン上に存在する H3K9me ヌクレオソームに対して高い特異性を獲得できることが新たに分かった (解説図参照)。また、細胞分裂時に HP1 α に起こる付加的なリン酸化は、さらなる DNA との結合力の低下を示すことが分かった。そして、細胞を用いた解析ではこのリン酸化が分裂期クロマチンからの解離に寄与していることを示すことができた (解説図参照)。以上の結果より、HP1 のリン酸化修飾は、HP1 のクロマチン結合をダイナミックに制御することで、ヘテロクロマチン動態制御に寄与していると考えられる。

生物が複雑になるのに比例して、遺伝情報量は増え、ゲノム DNA はより長大になる。ヘテロクロマチン内は遺伝子をコードする領域は少ないが、ゲノムの安定性に非常に重要である。実際に、今回発見した HP1 の適切なヘテロクロマチンへの結合を抑制す

ると、染色体分配が正常に行われず、染色体の脱離や融合が観察される。今回、HP1αのリン酸化修飾とヒストンのメチル化修飾の認識機構に着目したが、その他にもこれまでに数多くのヒストン修飾が発見され、その情報を認識する因子が同定されている。今回の研究が、従来の研究と異なる点として、生体内のリン酸化状態を再現し、生化学的解析を行った点が挙げられる。今後のクロマチン情報の認識機構において、より生体内に近い条件で行われた本実験が、様々なクロマチン結合タンパク質の新しい機能を見いだすために応用されることが期待される。

HP1 α のリン酸化修飾による ダイナミックな機能制御メカニズム

恒常的なリン酸化による H3K9me ヌクレオソームへの結合促進



分裂期特異的なリン酸化によるクロマチンからの解離の促進

用語集

- ・ エピジェネティクス: Epigenetics

広義には、DNA 配列の変化を伴わない遺伝情報の変化を研究する学問分野全体を指す。エピジェネティクスという言葉自体は、1942 年に C. Waddington によって提唱された。その当時の定義は「発生過程で遺伝子型が表現型を決めるようになる仕組み」であった。その後、解析の進展と共に「体細胞分裂の際に保存される DNA 配列以外の情報」と再定義された。現在、エピジェネティクスは主に DNA メチル化とヒストンの翻訳後修飾を研究する分野の総称として用いられている。

- ・ クロマチン: Chromatin

核内で塩基性の色素でよく染色される物質を指す言葉として 1879 年に W. Flemming によって名付けられた。Chroma-はギリシャ語の色のついたという意味に起因する。現在では、DNA とヒストンを含む様々なタンパク質の高次構造体を指す。

- ・ クロモソーム: Chromosome

染色体、一般的に有糸分裂時に形成される棒状の構造体を指す。

- ・ ヒストン

真核生物で進化的に保存された塩基性タンパク質。ヌクレオソームを形成するコアヒストンである H2A、H2B、H3、H4 と、リンカーヒストンの H1 からなる。H4 以外のヒストンには、それぞれバリエーションが存在し、遺伝子制御における多様な機能との関連が示唆されている。

- ・ ヌクレオソーム : Nucleosome

4 種のコアヒストンそれぞれ二量体からなるヘテロオクタマーに DNA が約 1.6 回巻き付いた構造体。クロマチンの基本構造である。

- ・ ヒストンテイル: Histone tail

ヒストンは C 末端側のヒストンフォールドドメインで安定な八量体を形成する。N 末端側のヒストンテイル領域は特定の二次構造を持たないが、クロマチンの状態を制御する様々な化学修飾が付加される。

- ・ ユークロマチン : Euchromatin

クロマチンの中でも凝縮度が低い領域。転写の活発な遺伝子領域で構成される。ユークロマチンの代表的なヒストンマークとしてアセチル化、H3K4, H3K36 のメチル化修飾が挙げられる。

- ・ ヘテロクロマチン : Heterochromatin

クロマチンの中でも特に凝縮度が高い領域を指す。転写が抑制されている領域や反復配列が多い領域で観察される。セントロメア周縁部のペリセントロメア、末端のテロメア、不活性化 X 染色体が代表的なヘテロクロマチン領域として知られる。ヘテロクロマチン領域は低アセチル化状態であり、代表的なヒストン修飾として、H3K9, H3K27, H4K20 のメチル化修飾が挙げられる。

- ・ セントロメア: Centromere

細胞分裂期の染色体で観察される動原体(キネトコア)が形成される場所。分裂期染色体の中央部のくびれた位置に存在する。基本的にセントロメアは繰り返し配列で構成され、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A タンパク質がセントロメアの構築に必要である。また周辺部のペリセントロメア領域は H3K9me 修飾によって制御されるヘテロクロマチン構造を形成している。

- ・ Heterochromatin protein 1; HP1

免疫染色の結果から、ヘテロクロマチン領域に局在するタンパク質として単離された。進化的に高度に保存されたタンパク質であり、その後 H3K9me を認識し、結合することで凝集したクロマチン構造の形成に寄与していることが明らかにされた。

- ・クロモドメイン: Chromodomain (CD)

ショウジョウバエの Polycomb 遺伝子群の一つである Pc タンパク質と HP1 に共通するドメインとして同定された。Chromatin organization modifier domain の略である。その後メチル化ヒストンを認識するドメインであることが分かった。現在では、クロモドメインの他にも PHD ドメインなど様々なドメインがメチル化ヒストンを認識することが分かっている。

- ・Phos-tag

Wako 社より販売されているリン酸化タンパク質解析試薬。Phos-tag は二価の陽イオン存在下でリン酸基を捕捉することが可能であり、SDS-PAGE ゲルに添加することで、リン酸化タンパク質の分離を容易に行うことができる。