

特集：タンパク質修飾がもたらす遺伝子発現調節

タンパク質修飾によるエピゲノム制御因子の機能調節と転写制御

藤木 亮次, 加藤 茂明

最近の研究から、転写制御をはじめとした遺伝子発現制御は、染色体構造変換を伴うことが明らかにされつつある。これら染色体の構造調節を指示するヒストンタンパク質修飾は、広義のエピゲノムとして捉えられ、DNAメチル化と同様に染色体の機能を規定すると考えられている。これらエピゲノム調節を担う因子群の種類や性状についてはその大部分が未だ不明である。本稿では、転写制御を担うエピゲノム制御因子群の生化学的解析から、筆者らのグループが見出したエピゲノム制御因子のタンパク質修飾による機能調節の例を、その背景とともに概説する。

1. はじめに

遺伝子の発現制御については、近年染色体構造調節の観点から飛躍的に研究が進展した。実際の染色体上での転写制御反応は、染色体の構造調節やヒストンタンパク質の様々な修飾を伴うことが示されつつある^{1,2)}。基本転写因子群やRNAポリメラーゼIIと転写開始複合体を形成するDNA結合性転写制御因子群が、実際の転写開始を行うためには、標的遺伝子プロモーター近傍の染色体環境を整えることが必須である。この転写反応に適した染色体環境を整えるプロセスは、当初の想像を超え複雑であることが徐々に判明しつつある。またこのような染色体構造調節は、転写反応のみならず、DNA修復やDNA複製といった染色体DNA上で起きるイベントと共通な基本原理に基づくことが明らかになりつつある^{2,3)}。これらの染色体構造調節は、ヒストンタンパク質N末端の翻訳後修飾により制御されることが明らかになってきている。これらヒストンタンパク質の修飾は、広義のエピゲノムと称されるようになってきている。筆者らのグループは、DNA結合性転写制

御因子の一つである核内ステロイドホルモン受容体群を材料に、転写制御の分子機構について、転写共役因子群の同定に焦点を合わせこの約15年間研究を展開してきた⁴⁻⁶⁾。その過程で、当初の予想とは異なり、これら転写共役因子は、単独分子としてではなく、核内で巨大複合体を形成するものが多々存在することに気付いた^{7,8)}。更にそれを利用して転写共役因子複合体群の同定を進め、この7年間の間に数々の新しい複合体の生化学的同定に成功した⁹⁻¹⁵⁾。複合体群の同定や機能解析を行う過程で、これら複合体群の主たる機能は染色体構造調節やヒストンタンパク質修飾であることを証明し^{14,15)}、転写共役活性の実態の一部は、エピゲノム制御であることを明らかにすることができた。本レビューでは、これら転写制御を支えるエピゲノムとその制御因子について概観し、筆者らのグループが最近見出したタンパク質修飾によるエピゲノム制御因子の機能調節と転写制御について概観したい。

2. エピゲノムと転写制御

転写制御を支えるエピゲノム制御には現在三種のメカニズムが考えられている。一つは古くから知られているDNAのメチル化による染色体の不活性化と転写抑制である¹⁾。二つめとして近年small RNA等のnoncoding RNAによる染色体構造調節が知られつつあるが、哺乳類では未だ不明な部分が多い¹⁶⁻¹⁸⁾。ここでは三つめで本稿の中心であるヒストンタンパク質の修飾とその修飾酵素について概観する。

東京大学分子細胞生物学研究所核内情報研究分野 (〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1)

Chromatin regulation by transcriptional co-regulator complexes

Ryoji Fujiki and Shigeaki Kato (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

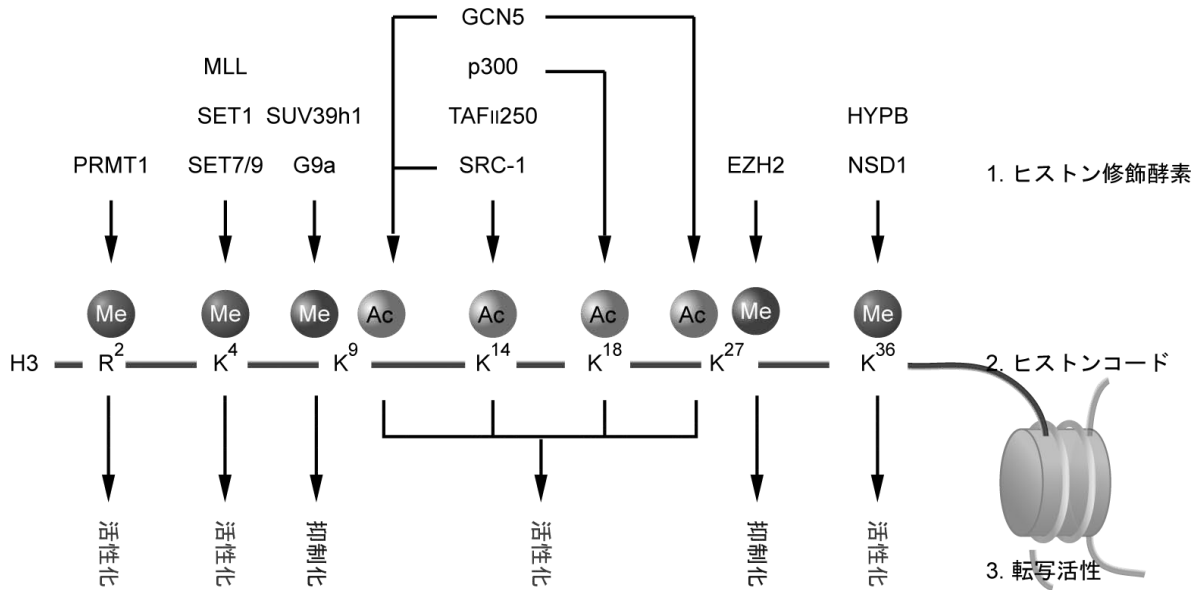


図1 ヒストンコード

それぞれのヒストンタンパク質の分子内には二つの特徴的な構造が存在する。C末端側の領域にはDNAが巻きついており、ヒストンコア構造と呼ばれている。一方、N末端側はヒストンテールと呼ばれ、コア構造から外側に向けて張り出した構造となっている。一般に、ヒストンテールのアミノ酸残基は高度に翻訳後修飾を受けており、その修飾パターンは染色体の活性化/抑制化領域などに対応している。中でも、図に示したH3のヒストンテールについては最も解析が進んでいる。近年では、このようなヒストン修飾は染色体の高次構造を反映する第二の遺伝暗号(コード)と考えられるようになった。

ヒストンの翻訳後修飾には、アセチル化、メチル化、リン酸化などが知られている。それぞれの修飾は近傍遺伝子群の転写活性を示す良い指標となり、ヒストンコードと呼ばれている¹⁻³⁾(図1)。一般に、ヒストンのアセチル化は転写の活性化と相関する。当初はヒストンのアセチル化は染色体の活性化の引き金と考えられたが、最近ではむしろ染色体の活性化状態の指標と捉えられてきている。従って脱アセチル化された染色体領域は、転写レベルでは不活性化された状態と考えられる^{2,3)}。

一方、様々なヒストンタンパク質の修飾の中で、染色体状態を規定する最も重要な修飾はメチル化と考えられるようになってきている。メチル化は修飾されるリシンやアルギニン残基によって意味が異なり、ヒストンH3のリシン4番目(H3K4)やH3K36のメチル化修飾は活性化を、一方H3K9やH3K27のメチル化修飾は抑制化を引き起こすことが知られている。また興味深いことに一つのアミノ酸残基に転移されるメチル基は最大3個である。またこれらメチル化を行う酵素は、同一のアミノ酸残基に対し複数存在することがわかっている^{2,19)}。一方、最近脱メチル化する酵素も発見されたが、同様に複数存在することが知られている。このようにヒストンタンパク質を修飾する酵素は、一般に複数存在すると予想されている^{2,20)}。

これらヒストンタンパク質の修飾を精密かつ迅速に解析する手法が続々と開発されてきた。とりわけ、次世代高速

シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)-シーケンス(ChIP-Seq)法の開発は、ゲノムワイドなヒストンコード解析を可能にした。これによって、ヒストンコードは転写制御領域のみに限定された局所的な指標から、遺伝子発現パターンを染色体レベルで俯瞰する鳥瞰図へとその意味合いが変わりつつある。このような背景から、ゲノムワイドなヒストンコードを遺伝子発現の多様性を規定する第二の遺伝暗号として捉え、エピゲノムと称するようになった¹⁾。

当然ではあるが、細胞系譜の分岐点ではエピゲノムのダイナミックな再編成が生じると考えられている。既に、幹細胞やそこから派生する前駆細胞、体細胞などを用いたエピゲノム解析がデータベース化されており、この仮説は実証されつつある^{1,21,22)}。しかし、細胞種特異的なエピゲノム情報が蓄積していく一方で、その分岐点に関する分子機構については依然として多くの謎が残されている。

3. 核内受容体を介するエピゲノム変換

筆者らは、このようなエピゲノム調節のモデル系として、核内受容体を介する転写制御に興味をもって研究を進めてきた^{9,15,23)}(図2)。特に、核内受容体の転写共役因子群の同定や、その分子機能の解明に注力している。核内受容体は、ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンなど、生理活性低分子をリガンドとするDNA結合性の転写因子であ

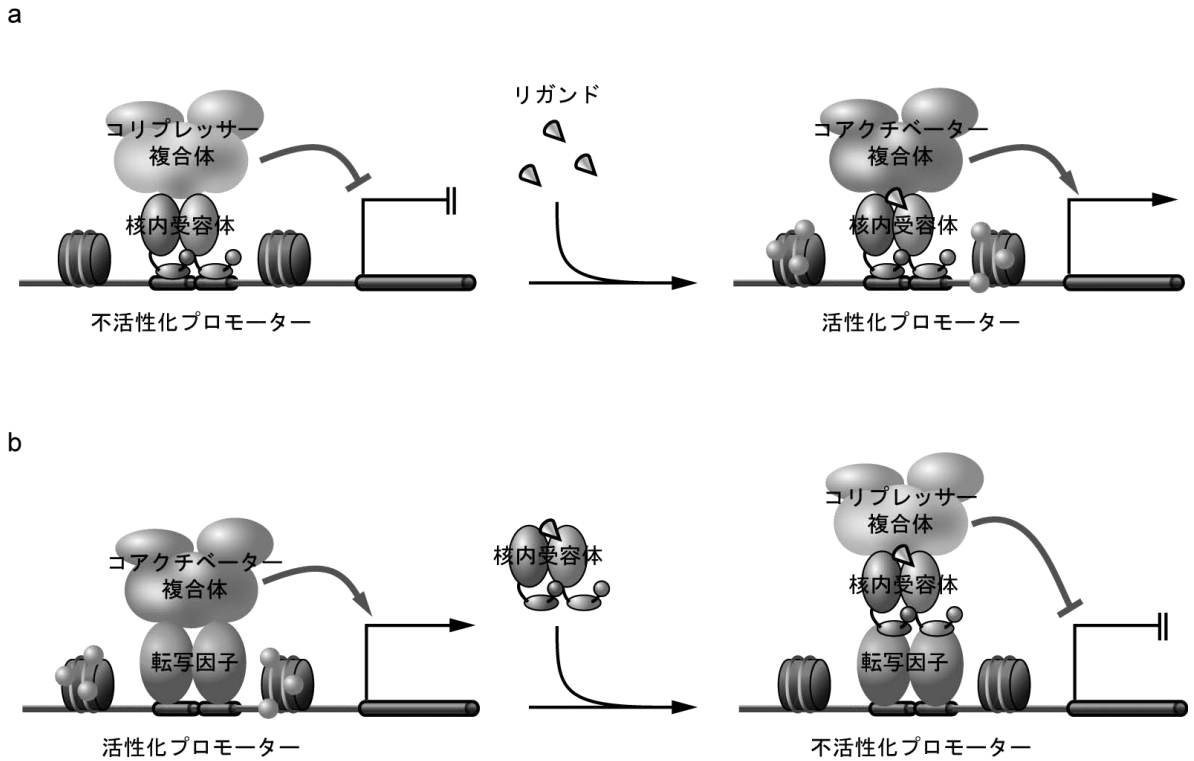


図2 核内受容体を介するリガンド依存的な転写制御機構 (概念図)

核内受容体は標的遺伝子群の発現を転写レベルで調節する。一般に、その転写活性はリガンド結合に依存し、これによってコアクチベーターもしくはコリプレッサーとの親和性が著しく変化する。そのため、標的遺伝子に応じたリガンド依存的な活性化(a), もしくは抑制化(b)の転写応答が達成される。ここ数年で活性化の機構は理解が進んだのに対し、抑制の機構に関しては未だ不明な点が多く、統一的な見解は得られていない。図中には、核内受容体が上流の負の応答配列に直接結合せず、それ以外の転写因子とのリガンド依存的な結合を介し、間接的にリクルートされる例を示した。

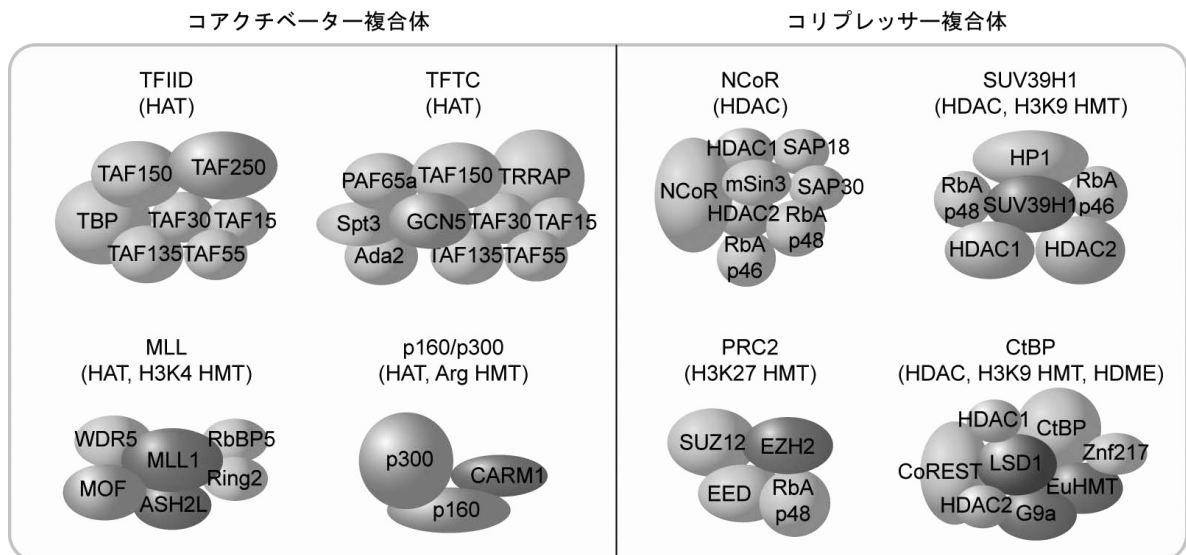


図3 ヒストンコードの制御因子複合体群

主な転写共役因子複合体のうち、ヒストン修飾酵素を含む複合体の構成を示した。HAT, ヒストンアセチル化酵素; HDAC, ヒストン脱アセチル化酵素; HMT, ヒストンメチル化酵素; HDME, ヒストン脱メチル化酵素。

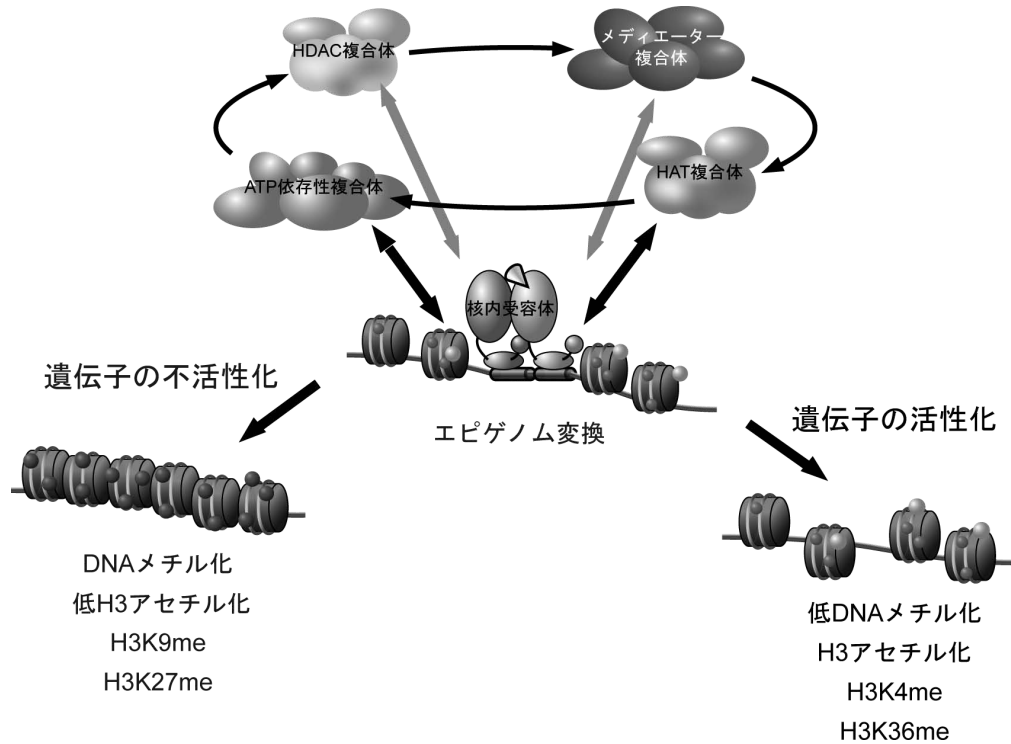


図4 核内受容体を介するリガンド依存的なエピゲノム変換 (概念図)

近年、多くの転写共役因子複合体群がエピゲノム制御因子そのものであることが報告された。従って、図に示したように、核内受容体は周辺のクロマチン環境をリガンド依存的に変化させていると予想される。核内受容体のリガンド作用は細胞の増殖制御や分化誘導など実に多彩である。そのため、ポストゲノムの最大の課題の一つは、細胞周期や分化段階など環境に応じたダイナミックな転写共役因子の移り変わりを分子実体として捉えることにある。

る。その転写制御の特徴はリガンド依存性にあり、これは分子内のリガンド結合ドメインと転写制御ドメインが一致することに起因している。すなわち、リガンド結合は転写制御ドメインの構造変化を引き起こし、これに伴って、転写共役抑制因子（コリプレッサー）複合体の解離と転写共役活性化因子（コアクチベーター）複合体の結合が誘導される。

ヒストンコードの概念が定着するとともに、いくつかの転写共役因子がそれ自身ヒストン修飾酵素であることが発見された（図3）。また同時に、それ以外の転写共役因子の多くもヒストン修飾酵素と複合体を形成しており、エピゲノムを調節していることが報告されてきた。特定の修飾酵素でも、それを含む複合体のバリエーションは無数に存在することがわかっている。現在では、核内受容体は状況に適した転写共役因子複合体群を使い分け、細胞に特異的なヒストンコードを再編成すると考えられるようになった（図4）。

3-1. ビタミンA誘導性の細胞分化を促進するヒストンH3K4メチル化酵素複合体—血球分化を担う転写共役因子の探索とMLL5の同定—

筆者らは、不可逆的なエピゲノム変換のモデル系として、レチノイン酸（RA）が急性白血病由来の前骨髄球様HL60細胞を顆粒球様の成熟細胞へと分化させる系に着目した（図5a）。未分化細胞の核からレチノイン酸受容体（RAR）に結合する因子群を生化学的に同定したところ、全43因子の同定に成功した。同定した因子のうち21因子が転写制御に関連しており、14因子がエピゲノム変換に関連すると予想された。代表的なものとして、ヒストンアセチル化酵素（HAT）やヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）などアセチル化修飾に関連する因子群、またH3K36のヒストンメチル化酵素群（HMT）などが同定された。筆者らはその中で機能未知のmixed lineage leukemia 5（MLL5）に着目し、さらなる解析を進めた。

MLL5は、分子中央にPHDフィンガーを、C末端領域にSETドメインを有している。SETドメインはHMT活性の触媒ドメインであり、修飾するリシン残基に応じてそのアミノ酸配列に特徴がある。一方、PHDフィンガーは核内因子によく見られ、タンパク質-タンパク質相互作用に

機能する。ヒトでは、これら SET ドメインと PHD フィンガーの両方をもつ因子として、MLL5のほか MLL1 から MLL4 までの因子が知られている²⁴⁾。ゲノムバンク上では、いずれも ショウジョウバエ トリソラックス 遺伝子 (*Trx*) のヒトホモログとされており、MLL ファミリーと称されるヒストン H3K4 メチル化酵素群に登録されている。

た。しかしながら、アミノ酸配列を MLL ファミリー間で比較したところ、MLL5 のみで特徴的な結果が得られた。そこで、筆者らは MLL5 の分子機能を明確にする目的で、その核内複合体の単離とその詳細な解析を試みた。

3-2. HMT 活性を有する MLL5 複合体の同定

核内の MLL5 複合体には MLL5-L 複合体 (約 2 MDa) と MLL5-S 複合体 (約 600 kDa) の 2 種類が同定された (図 5b)。L 複合体と S 複合体に共通の構成因子として、MLL5、セリン/トレオニンリン酸化酵素 p38 (STK38)、タンパク質脱リン酸化酵素 1 α / β / γ (PP1 α / β / γ) と β -アクチンが同定された。一方、L 複合体には二つの特徴的な構成因子が含まれていた。一つは HCF-1N であり、この因子は MLL1 や MLL2 などの HMT 複合体構成因子として既に報告がある²⁴⁾。二つめの因子は *O*-結合型 β -*N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 転移酵素 (OGT) であった。MLL5 には SET ドメインが含まれるため、まずこれら二つの複合体の HMT 活性を評価した。MLL5 複合体の基質は H3K4 であったが、興味深いことに、その活性は S 複合体では検出できず L 複合体でのみ検出された。従って、MLL5 の HMT 活性は、その複合体の構成に応じて調節されていることが予想された。

翻訳後修飾による MLL5 自体の活性調節である。最近のエピゲノムの分野では、ヒストンのみならずその制御因子群の翻訳後修飾もホットトピックである。質量分析計の飛躍的な技術革新に伴って、細胞内の翻訳後修飾を網羅的に解析するプロテオミクス研究がこのフィールドを盛り上げている。その結果によれば、約半数以上の核内の因子が恒常的に何らかの修飾を受けており、その修飾の種類もまた 300 以上と推定されている。しかし、その複雑さゆえに未だ全貌は明らかでないが、ヒストン以外の翻訳後修飾もまた遺伝子発現の多様性を説明する大きな鍵と考えられている。実際、H3K9 や H3K27 などを基質とする HMT がリン酸化修飾やアセチル化修飾などによって活性調節を受ける可能性が示されている^{25,26)}。そこで、MLL5-L 複合体に含まれる OGT が *O*-GlcNAc 転移酵素である点に着目した。

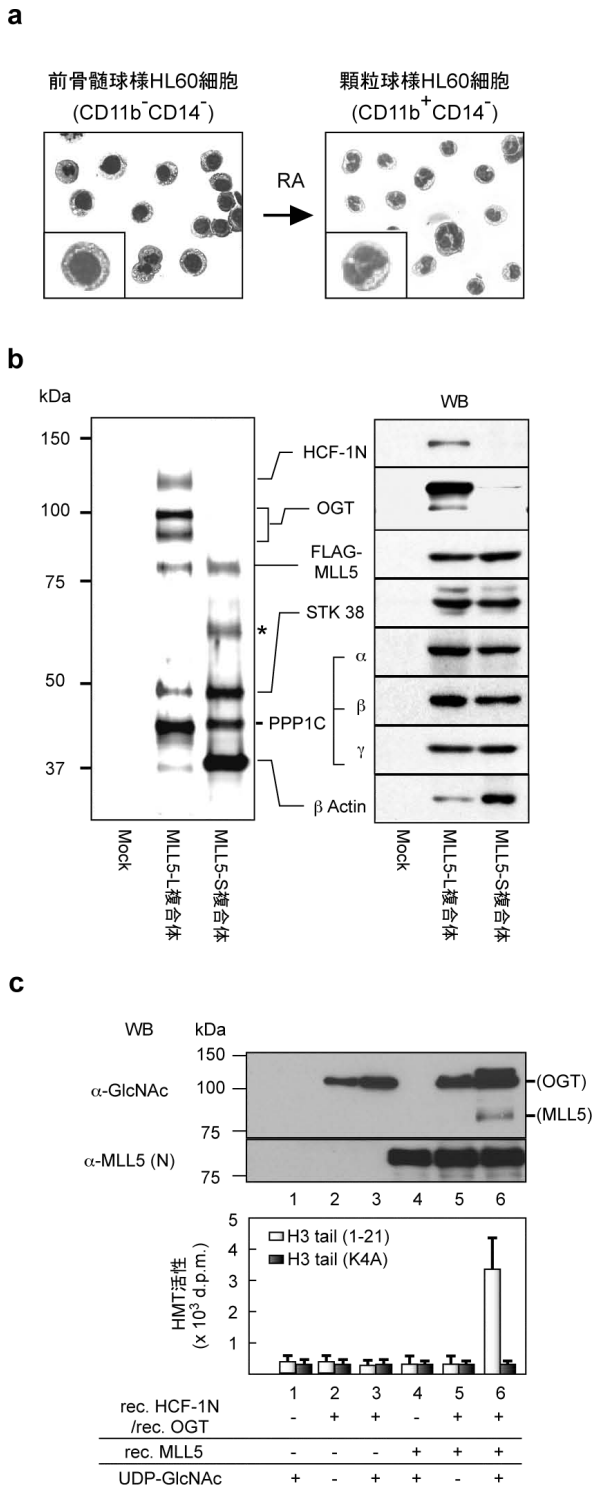


図5 MLL5の分子機能

(a)前骨髄球様HL60細胞は、RA処理により約4日間で成熟顆粒球様細胞へと分化する。これに伴って、核の分様形態が観察される(ギムザ染色)。(b)MLL5複合体の同定。FLAG-MLL5の安定発現HL60細胞株を樹立し、そこから α -FLAG抗体アフィニティー抗体精製と、それに続くゲルろ過精製、小麦胚芽レクチン(wheat germ agglutinin, WGA)精製によって、L型、S型のMLL5複合体を単離した。それぞれの構成因子群は質量分析器によって同定を行った。(c)MLL5の*O*-GlcNAc修飾依存的なHMT活性。リコンビナントMLL5(rec.MLL5)はrec.OGTによって*O*-GlcNAc修飾されると(上図)、H3K4メチル化活性を有するようになる(下図)。

3-3. O-GlcNAc 修飾依存的なヒストンメチル化酵素

1) O-GlcNAc 修飾と OGT

O-GlcNAc 修飾は、その名の示すとおり、セリン/トレオニンの水酸基を基質とするタンパク質翻訳後修飾である²⁷⁾。今のところ、チロシン残基に対する修飾は見出されていない。一般に、O-GlcNAc 修飾部位はリン酸化部位と一致しており、その性質から互いに拮抗関係となる場合も多い。そのため、これら修飾のクロストークは古くから Yin-Yang (陰陽) の関係などと呼ばれてきた。教科書的には、O-GlcNAc 修飾は細胞やオルガネラの膜上タンパク質、あるいは分泌性のタンパク質に多く見出されている。しかし、最近では細胞質や核など細胞内のいたるところで、この修飾をもつ因子群が多く見出されるようになった²⁷⁾。このような背景から、O-GlcNAc 修飾はシグナル伝達や遺伝子の発現制御、タンパク質の分解などさまざまな細胞内プロセスに極めて重要な役割を担っていると考えられるようになっている。

O-GlcNAc 修飾は、細胞外からのグルコース流入とこれに伴うヘキソサミン生合成経路の活性化に影響を受けている。また、その半減期はタンパク質の半減期に比べて短いことが知られており、そのダイナミックな制御に関わる責任因子として多くの酵素群が同定されてきた。特に、OGTはO-GlcNAc基を付加する酵素であるが、よく知られたほかの糖転移酵素とは異なり、核に局在するのがその特徴の一つである²⁷⁾。一方、その逆の働きをもった酵素として、核内でこの修飾を除くO-GlcNAcaseが同定されて

いる。最近では、これら酵素群の基質が盛んに探索されるようになった。転写因子や基本転写装置、RNAポリメラーゼIIなどもOGTの基質となることが明らかにされ、リン酸化とのYin-Yang作用を介してその機能調節に寄与することが明らかとなりつつある。

2) O-GlcNAc 修飾を介する MLL5 の活性調節

以上の知見をふまえ、まずOGTがMLL5-L複合体を核内においてO-GlcNAc修飾する可能性について検討を加えた。まず、HMT活性型のMLL5-L複合体では、OGTのほかにO-GlcNAc修飾されたMLL5も検出することができた(図5b)。しかも、この修飾はHMT不活性型のS複合体では全く見られなかった。この結果はMLL5のO-GlcNAc修飾とHMT活性を間接的に関連付けるものである。そこで、両者の関係をより明確にする目的で、詳細な生化学実験を行った(図5c)。MLL5とOGTのリコンビナントタンパク質をそれぞれ調整し、これらを試験管内でO-GlcNAc付加させた。引き続き、HMT活性の基質となるヒストンH3を加え、2段階目のHMT反応を行った。図5cの結果は、MLL5のHMT活性がHCF-1NやOGTによって補助されるものではなく、MLL5自身のO-GlcNAc修飾によって発揮されていることを示している。この結果から、MLL5がO-GlcNAc修飾依存的なHMTであることを、世界に先駆けて証明することができた。

本稿では、MLL5がO-GlcNAc修飾依存的なHMTであることを紹介してきた。加えて、筆者らはHL60細胞核内

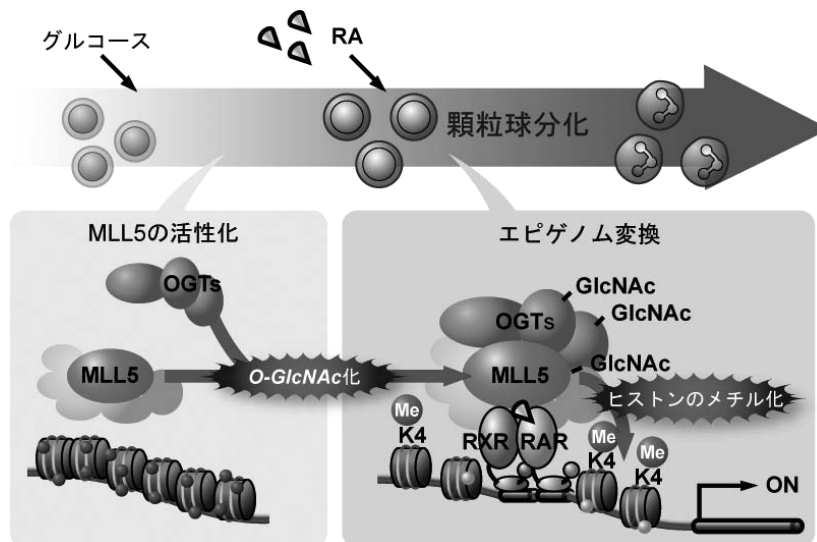


図6 MLL5を介する核内の糖修飾依存的なエピゲノム制御 (概念図)

一般的に、細胞内のO-GlcNAc修飾のドナー基質は、グルコースからの代謝によって供給される。細胞外グルコースが豊富な状態では、核内のOGTがMLL5のSETドメインをO-GlcNAc修飾して活性化する。引き続きRAのシグナルを受容した核内では、活性型MLL5がRAR標的の遺伝子上にリクルートされ、近傍のH3K4をメチル化修飾する。このエピゲノム変換に伴い、細胞は成熟顆粒球へと分化する。

の *O*-GlcNAc 修飾制御が RA 誘導性のエピゲノムの変換と分化誘導に重要であることを明らかにしている (図 6)。従来の研究では、タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾は細胞膜上のイベントなどに重要とされてきた。しかし、今回の知見から、*O*-GlcNAc 修飾の作用点が細胞膜から核内のクロマチン上まで広がり、核内糖修飾を介するエピゲノム制御といった新たなモデルを提唱することができた。また、最新のプロテオミクス解析によれば、核内の多くの機能未知因子も *O*-GlcNAc 修飾を受けていることが次第に明らかとなりつつある^{28,29)}。このような因子群の *O*-GlcNAc 修飾は、遺伝子発現制御の根幹をなす可能性を秘めている。また、核内糖修飾を介するエピゲノム制御は、その性質上、がん化や代謝性疾患などさまざまな病気と関係することが予想される。今後は、その病態解明や治療法の開発に応用が期待できるだろう。

4. DNA メチル化・脱メチル化と転写制御

先にも述べたように DNA のメチル化は染色体を不活性化し、転写を抑制することがよく知られている^{30,31)}。一方、いったんメチル化された DNA は、一般に DNA 複製による受動的な DNA の脱メチル化は広く認められているが、動物の体細胞での積極的な脱メチル化反応は一般的ではなかった^{30~32)}。そのためメチル化されたプロモーター領域では固定的な転写抑制が世代を超えて維持されるという考え方が主流であった³²⁾。

一方、筆者らはビタミン D 受容体による転写抑制機構を解析する過程で、ビタミン D によって、転写が抑制される CYP27B1 遺伝子プロモーター上で、DNA のメチル化

が誘導されることで、転写が抑制されることを見出した。更にこの DNA メチル化が副甲状腺ホルモン (PTH) によるホルモン刺激により積極的な DNA 脱メチル化反応が誘導されることを観察した¹⁴⁾。この DNA 脱メチル化反応は、植物で見られる直接的な DNA の脱メチル化反応ではなく³³⁾、DNA 修復経路を利用した DNA 脱メチル化反応であった¹⁴⁾。この脱メチル化反応のきっかけは、メチル化 DNA を認識する MBD4 のリン酸化による基質特異性の変化に起因することを生化学的に証明した。以下これらの知見の詳細を述べる。

4-1. CYP27B1 遺伝子の転写制御

CYP27B1 は、p450 ファミリーに属する酵素であり、活性型ビタミン D 生合成鍵酵素である^{34~36)}。肝臓で変換された 25(OH)D₃ 前駆体がこの酵素により、1 α ,25(OH)₂D₃ に変換されると、活性型ビタミン D となり、ビタミン D 受容体 (VDR) のリガンドとして生理作用を発揮する (図 7)。この酵素遺伝子は、主に腎臓の近位尿細管に発現し、他の臓器では極く低レベルでしか発現していない³⁴⁾。このため腎臓が、活性型ビタミン D 産生の責任臓器と考えられている。ビタミン D は、血中カルシウム・ミネラルを制御する主要ホルモンであり、かつ食事中から摂取されるべき微量栄養素 (脂溶性ビタミン) である。そのため、この酵素活性は、血中ミネラル濃度に鋭敏に反応し、主として転写レベルでその発現が制御されることが古くから知られている。血中ミネラルを制御する主たるもう一つのホルモンである PTH は、この酵素遺伝子の発現を転写レベルで、正に制御することが知られており、その転写制御には A

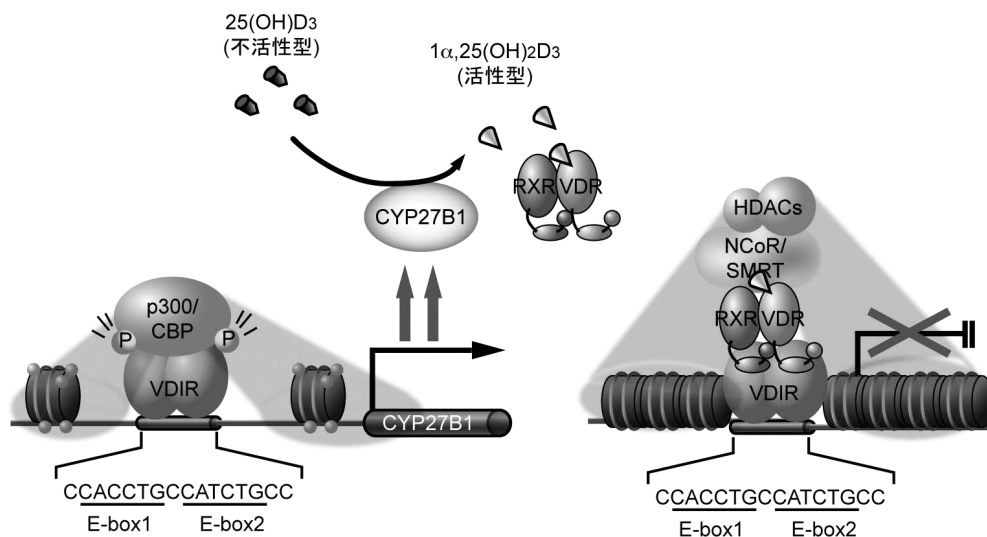


図 7 CYP27B1 遺伝子のネガティブフィードバック機構 (概念図)

CYP27B1 は活性型ビタミン D [1 α ,25(OH)₂D₃] 生合成の鍵酵素である。合成された活性型ビタミン D は核内の VDR と結合し、これを CYP27B1 遺伝子上流の負の応答配列 (nVDRE) に結合した VDIR 上にリクルートさせる。さらに、NCoR/HDAC といった抑制性的なエピゲノム制御因子複合体の結合を誘導し、近傍の染色体構造を不活性化させる。

キナーゼ (PKA) が関与することも示されている³⁷⁾。逆にビタミン D は、負のネガティブフィードバックを引き起こし、この酵素の活性を抑制することが既に 30 年前から知られていた。

筆者らのグループは、1997 年に VDR ノックアウトマウスを作製したが³⁸⁾、このマウスでは血中の活性型ビタミン D 濃度が異常に亢進していることを観察した。このことは、上述したネガティブフィードバック機構の破綻と考えられ、ビタミン D による転写抑制には VDR が必須であると考えた。そこで、この VDR ノックアウトマウスの腎臓から cDNA ライブラリーを作成し、VDR を利用した発現クローニングにより、高発現していると予想された CYP27B1 転写産物の cDNA クローニングに成功した³⁵⁾。次いで、この cDNA を用いることで、このマウスでは mRNA の異常高発現が観察され、このことからビタミン D による負のネガティブフィードバックの主たる制御段階は、転写レベルであることを証明することができた。また、このマウス cDNA を利用することで、ヒト CYP27B1 cDNA の取得にも成功し、同様のビタミン D による転写抑制が起こることを観察した。更に、この酵素の生理学的重要性が、不活性型変異による先天性疾患 (I 型くる病) の遺伝的原因であるということも突き止めることができた³⁶⁾。

4-2. ビタミン D によるヒストン脱アセチル化を伴う CYP27B1 転写抑制機構

上記のノックアウトマウスを用いた解析から、CYP27B1 プロモーター上では VDR がビタミン D 依存的に転写抑制を誘導すると考えられた³⁵⁾。当時ビタミン D による転写抑制は、ビタミン D による負の標的遺伝子プロモーター上の負のビタミン D 応答配列 (nVDRE) を介すると信じられていた。nVDRE は、正のビタミン D 応答配列 (VDRE) コンセンサス配列の半配列 (5'-AGGTCA-3') と考えられてきたが、ヒト及びマウスの CYP27B1 プロモーター上にはこのような既知 nVDRE は存在しない。そこで、筆者らは、プロモーターの機能解析を行うことで新たな nVDRE を検索し、CYP27B1 プロモーターでは、T-box 様配列が nVDRE として機能することを見出した³⁹⁾ (図 7)。そこで、この T-box 様配列に直接結合する因子を酵母内 one-hybrid 法を用いて cDNA クローニングを行い、VDIR を見出した。VDIR は、bHLH 型の DNA 結合性転写制御因子であった。このファミリーは、実際 T-box 様モチーフに結合することが知られていることから、更に VDIR の機能を解析した。VDIR は、ビタミン D 非存在下ではリン酸化されており、そのキナーゼは PKA であった。PKA は、PTH によって活性化されるキナーゼであるため、PTH 及び PKA による VDIR の転写活性化を検討したとこ

ろ、PKA-リン酸化依存的な活性化が見られた。また、このリン酸化依存的な転写促進活性は、ヒストンアセチル化酵素である CBP/p300 をリクルートすることも示すことができた³⁹⁾。このことから、CYP27B1nVDRE は、PTH-PKA に応答する正の DNA 配列であり、その結合因子は VDIR であることがわかった (図 7)。

ところが、ここにビタミン D を添加すると、転写の抑制が観察できる。その際には、CBP/p300 の解離が見られ、代わりに HDAC のリクルートが見られた。また、Sin3A, NCoR 等の HDAC コリプレッサー複合体の構成因子群のリクルートも観察された。このような、ビタミン D 依存的なコリプレッサー複合体構成因子群の会合には VDR は必須であったが、CYP27B1nVDRE への直接的な DNA 結合は見出されなかった。このように、この CYP27B1 遺伝子プロモーター上での転写抑制においては、VDR は DNA に結合することなく、VDIR とビタミン D 依存的に会合することで、HDAC コリプレッサー複合体をリクルートすると考えられた。そこで、リクルートされた HDAC が、周辺のヒストンを脱アセチル化することで積極的にクロマチンを不活性化すると考えた³⁹⁾ (図 7)。

4-3. DNA メチル化を介したビタミン D による CYP27B1 転写抑制

上記のようにビタミン D による CYP27B1 遺伝子の転写抑制にはヒストン脱アセチル化を伴うことを見出したので、これを更に確認するために、HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) による転写抑制解除の効果を探った。その結果、TSA による脱転写抑制効果は限定的であり、ヒストン脱アセチル化のみではすべての転写抑制が説明できないことがわかった。転写抑制には、ヒストンの脱アセチル化のみならず、メチル化/脱メチル化を初めとした他のヒストンタンパク質修飾による転写抑制も知られつつあったので、筆者らは、VDR/VDIR が NCoR/Sin3A 等を含む HDAC コリプレッサー複合体以外の複合体と相互作用 (会合) する可能性を考えた。そこで内因性 CYP27B1 遺伝子発現し、ビタミン D に応答するマウス近位尿管由来の MCT 細胞の核抽出液から、VDR/VDIR を含む複合体群を生化学的に単離した。この VDR/VDIR 複合体は複数存在することが、密度勾配遠心法による分画によりわかったが、おのおの単独の複合体に生化学的に分画することができなかった。そこでこの VDIR/VDIR 相互作用因子について網羅的な同定を行った。その結果、この相互作用因子の一つが、DNA メチル化転移酵素である Dnmt1 であることを見出した⁴⁰⁾ (図 8)。そこで、この CYP27B1 プロモーターの DNA メチル化として、CpG 部位にあたるシトシンへのメチル化を調べたところ、MCT 細胞内ではビタミン D 依存的にメチル化が誘導されることを見出した。

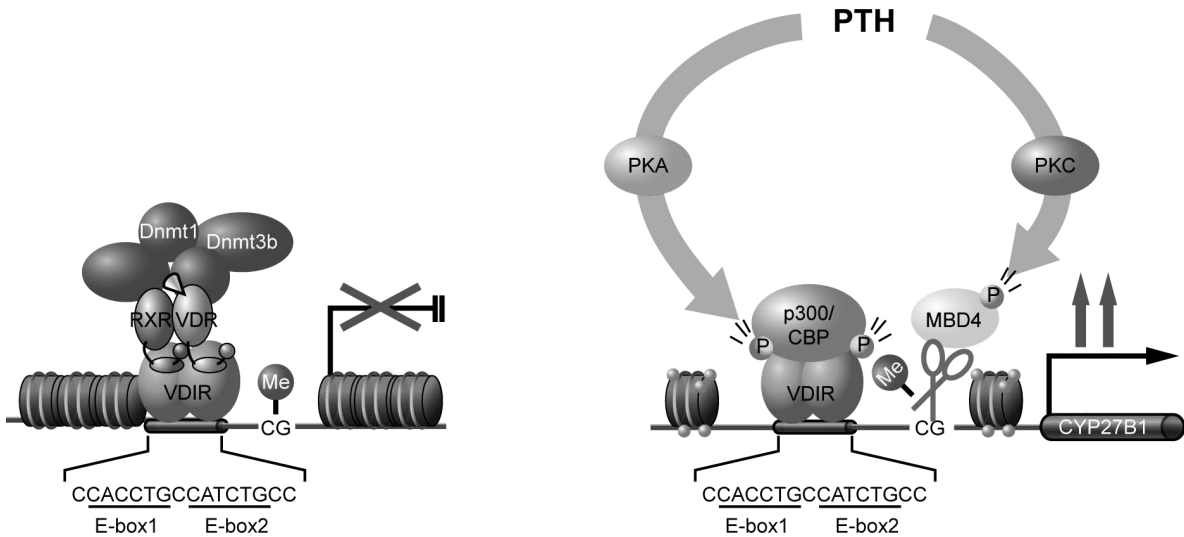


図8 新たなCYP27B1遺伝子制御の分子機構(概念図)

過剰な活性型ビタミンD存在下では、DNAメチル化酵素であるDnmt1とDnmt3bがCYP27B1遺伝子プロモーターの応答配列(nVDRE)に転写因子VDRを介してリクルートされ、プロモーター領域のシトシンをメチル化する。これに伴って、近傍の染色体構造は不活性化し、CYP27B1遺伝子の発現も抑制される(図左)。そこにPTHシグナルが入ると、リン酸化酵素PKCによってリン酸化を受けたMBD4がメチル化シトシンを切り出し、非メチル化シトシンと置き換えることでDNAを脱メチル化し、CYP27B1遺伝子発現が活性化する(図右)。

また、ロックダウン法により、Dnmt1のパートナーは、Dnmt3bであることがわかった。DNAのメチル化は、ヘテロクロマチン化に代表されるように一般に染色体の不活性化を引き起こし、転写を抑制することがわかっている^{30,31)}。また、このヘテロクロマチン化には、ヒストンの脱アセチル化や、ヒストンH3K9のメチル化やHP1のリクルートが伴うことがわかっている^{41,42)}。そこでビタミンDによりDNAメチル化されたCYP27B1プロモーター上の各種ヒストン修飾マーカーを調べたところ、転写抑制を反映する修飾の変化は見られたものの、HP1のリクルートは見られなかった。このことは、DNAメチル化による染色体不活性化がある程度誘導されているものの、ヘテロクロマチンのように完全にプロモーター領域が不活性化されていないことを示唆している。

以上の観察を考えあわせるとビタミンDによる転写抑制では、初期にはヒストンの脱アセチル化が誘導されるが、更にビタミンDが存在すると、DNAメチル化が誘導され、より転写抑制の程度が強くなるものと考えられた。

4-4. PTHシグナル依存的なDNA脱メチル化によるCYP27B1の転写抑制解除

CYP27B1遺伝子の発現は、血中のミネラル濃度に呼応して調節されるため、生理的にはビタミンDによる一方向での転写抑制だけではなく、PTHによる転写活性化が誘導されている^{34,37)}。このような正負の転写調節が腎臓では実際に繰り返されていると考えられている。そのため、ビタミンDにより誘導されたDNAメチル化は、脱メチル

化されることが期待された。しかしながらDNAの脱メチル化は、核内では不可逆的の反応と考えられており、一般にはDNA複製に伴う受動的な脱メチル化反応が良く知られている^{30,31)}。

しかし、このような受動的なDNA脱メチル化では、PTHによる生理的な転写活性化を上手く説明できないため、我々はこのような受動的なDNA脱メチル化反応ではなく、いわゆる能動的なDNA脱メチル化(active DNA demethylation)反応の存在を想定した。そこでMCT細胞をPTHで処理するとCYP27B1遺伝子の転写誘導が観察されたので、ビタミンDで24時間処理した後にPTH処理24時間を行い、転写の状態を観察した。その結果PTHは、ビタミンD処理の有無に拘らず、転写を誘導した。次にプロモーター上のCpG部位でのメチル化の程度を観察したところ、ビタミンD処理24時間で誘導されたDNAメチル化は、更にPTHで処理することによりDNA脱メチル化されることを見出した。次に同様にビタミンDで前処理したマウス個体を用いた実験で、腎臓でのCYP27B1プロモーター上でPTHによる脱メチル化が見られた。このようなPTH処理24時間の間に、明らかな細胞分裂の誘導は見られず、またDNA複製阻害剤で処理したMCT細胞でも、同様にPTHによるDNA脱メチル化反応が観察された。これらの結果から、腎臓でのCYP27B1遺伝子プロモーター上では、能動的なDNA脱メチル化反応が存在するものと判断した。

4-5. PTHによるDNA脱メチル化はMBD4を介する

最近植物界では、DNA脱メチル化酵素が同定されたが³³⁾、動物界では未だ見出されていない。実際VDR/VDIR相互作用因子群の中にも、そのような酵素活性は見出せなかった。そこでこれらVDR/VDIR複合体群の構成因子を精査したところ、MBD4を見出した。MBD4は、MBDファミリーに属する因子であり、メチル化したCpG部位に結合するものの、他のメンバーであるMBD1-3とは異なり、染色体を不活性化に導く機能がないことがわかってきた^{43,44)}。しかしながら、MBD4は、そのC末端に存在するチミングリコシラーゼ活性により、ミスマッチ修飾部位でのDNA修復に関与することが知られていた⁴⁵⁻⁴⁷⁾。そこで、このMBD1-4までのプロモーター上でのリクルートを調べたところ、MBD4のみ検出された。またVDIRと直接的に相互作用することもわかった。MBD4をノックダウンすると、PTHによるDNAの脱メチル化が見られなくなった。一方、最近ドイツのグループが、Dnmt1によるDNAの脱メチル化を報告したが^{48,49)}、この系でのDNA脱メチル化には関与しないこともわかった。またMBD4ノックアウトマウスでは⁴⁶⁾、PTHによるCYP27B1の転写促進とDNA脱メチル化が著しく低下していることが確認できた。これらのことから、PTHによる脱メチル化反応には、MBD4が関与すると結論した。

4-6. MBD4によるDNA脱メチル化反応は、DNA修復経路を介する

次にMBD4による脱メチル化機構を生化学的に検討した。MBD4機能がPTHにより誘導されることから、PTH下流に位置するPKAとPKCによるリン酸化を調べたところ⁵⁰⁾、MBD4は、PKCの基質であることがわかった。更にこのリン酸化MBD4を用いることで、MBD4は、リン酸化依存的にメチル化されたCpGをグリコシル化することを見出した。このようにグリコシル化されたメチル化シトシンは、核内ではDNAの損傷と認識されるため、DNA修復経路の一つであるbase excision repair (BER)が働く可能性が考えられた^{48,51)}。そこで脱DNAメチル化部位でのBERに関与する因子群のリクルートを検討したところ、脱メチル化に伴い、この因子が検出できた。これらの結果から、PTHによるDNA脱メチル化は、MBD4のリン酸化によるメチル化シトシンのグリコシル化とそれに続くDNA修復による可能性が考えられた(図8)。

5. おわりに

これまでにDNA結合性転写制御因子がタンパク質修飾を受けることにより、その転写制御機能が様々な段階で調節を受ける例が無数報告されてきた。最近、これら転写制御因子群による転写制御は、染色体構造調節を必須とする

ことが明らかになり、転写制御研究の最先端は、染色体構造調節との接点に移行しつつある。この染色体構造調節を指示する様々なヒストン修飾や、DNAのメチル化は、いわゆるエピゲノム制御として捉えられるようになってきている。これらエピゲノムを制御する因子群については、その種類や性状について大部分が未知である。また核内で複合体を形成するようでもある。本稿でも示したように、これらエピゲノム制御因子/複合体群もタンパク質修飾により、様々な制御を受けると予想され、生化学的アプローチこそこれらの問題解決の鍵と思われる。また本稿でも述べた“ヒストンコード”仮説はヒストンのみならず遺伝子発現に関連する因子群にも該当することから、いわゆる“クロマチンコード”の存在を想定している。現在筆者らのグループは、この仮説の検証を行っているところである。

文 献

- Bernstein, B.E., Missner, A., & Lander, E.S. (2007) *Cell*, 128, 669-681.
- Li, B., Carey, M., & Workman, J.L. (2007) *Cell*, 128, 707-719.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) *Nature*, 403, 41-45.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchimiya, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., & Chambon, P. (1995) *Science*, 270, 1491-1494.
- Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Toriyabe, T., Kawabata, M., Miyazono, K., & Kato, S. (1999) *Science*, 283, 1317-1321.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., & Kato, S. (1999) *Mol. Cell Biol.*, 19, 5363-5372.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., & Kato, S. (2001) *EMBO J.*, 20, 1341-1352.
- Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S.B., Cole, M.D., Tora, L., Takahashi, N., & Kato, S. (2002) *Mol. Cell*, 9, 553-562.
- Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., & Kato, S. (2003) *Cell*, 113, 905-917.
- Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., & Kato, S. (2003) *Nat. Cell Biol.*, 5, 224-230.
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B.W., & Kato, S. (2007) *Nat. Cell Biol.*, 9, 604-611.
- Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, M. Y., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H.,

- Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., & Kato, S. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1273–1285.
- 13) Yamagata, K., Fujiyama, S., Ito, S., Ueda, T., Murata, T., Naitou, M., Takeyama, K., Minami, Y., O'Malley, B. W., & Kato, S. (2009) *Mol. Cell*, **36**, 340–347.
- 14) Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shirode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa, H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F., & Kato, S. (2009) *Nature*, **461**, 1007–1012.
- 15) Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H., & Kato, S. (2009) *Nature*, **459**, 455–459.
- 16) Ponting, C.P., Oliver, P.L., & Reik, W. (2009) *Cell*, **136**, 629–641.
- 17) Moazed, D. (2009) *Nature*, **457**, 413–420.
- 18) Siomi, H. & Siomi, M.C. (2009) *Nature*, **457**, 396–404.
- 19) Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 2343–2360.
- 20) Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., & Glass, C.K. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 1405–1428.
- 21) Schones, D.E. & Zhao, K. (2008) *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 179–191.
- 22) Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.D., Jaenisch, R., Lander, E.S., & Meissner, A. (2007) *Nature*, **448**, 553–560.
- 23) Fujiki, R., Kim, M.S., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H., & Kato, S. (2005) *EMBO J.*, **24**, 3881–3894.
- 24) Dou, Y., Milne, T.A., Ruthenburg, A.J., Lee, S., Lee, J.W., Verdine, G.L., Allis, C.D., & Roeder, R.G. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 713–719.
- 25) Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., & Reinberg, D. (2007) *Nature*, **450**, 440–444.
- 26) Cha, T.L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.C., Chen, C. T., Ping, B., Otte, A.P., & Hung, M.C. (2005) *Science*, **310**, 306–310.
- 27) Hart, G.W., Housley, M.P., & Slawson, C. (2007) *Nature*, **446**, 1017–1022.
- 28) Khidekel, N., Ficarro, S.B., Clark, P.M., Bryan, M.C., Swaney, D.L., Rexach, J.E., Sun, Y.E., Coon, J.J., Peters, E.C., & Hsieh-Wilson, L.C. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 339–348.
- 29) Chalkley, R.J., Thalhammer, A., Schoepfer, R., & Burlingame, A.L. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8894–8899.
- 30) Reik, W. (2007) *Nature*, **447**, 425–432.
- 31) Bird, A. (2007) *Nature*, **447**, 396–398.
- 32) Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P.A. (2004) *Nature*, **429**, 457–463.
- 33) Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., & Fischer, R.L. (2006) *Cell*, **124**, 495–506.
- 34) Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Ho-soya, T., & Kato, S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 11–16.
- 35) Takeyama, K., Kitanaka, S., Sato, T., Kobori, M., Yanagisawa, J., & Kato, S. (1997) *Science*, **277**, 1827–1830.
- 36) Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Sato, T., Okumura, K., Nogami, M., Hasegawa, Y., Niimi, H., Yanagisawa, J., Tanaka, T., & Kato, S. (1998) *N. Engl. J. Med.*, **338**, 653–661.
- 37) Brenza, H.L., Kimmel-Jehan, C., Jehan, F., Shinki, T., Wakino, S., Anazawa, H., Suda, T., & DeLuca, H.F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1387–1391.
- 38) Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T., & Kato, S. (1997) *Nat. Genet.*, **16**, 391–396.
- 39) Murayama, A., Kim, M.S., Yanagisawa, J., Takeyama, K., & Kato, S. (2004) *EMBO J.*, **23**, 1598–1608.
- 40) Kim, M.S., Fujiki, R., Kitagawa, H., & Kato, S. (2007) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **265–266**, 168–173.
- 41) Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., & Kouzarides, T. (2000) *Nat. Genet.*, **24**, 88–91.
- 42) Maison, C. & Almouzni, G. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **5**, 296–304.
- 43) Ballestar, E. & Wolffe, A.P. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1–6.
- 44) El-Osta, A., Kantharidis, P., Zalcborg, J.R., & Wolffe, A.P. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1844–1857.
- 45) Hendrich, B., Haradeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J., & Bird, A. (1999) *Nature*, **401**, 301–304.
- 46) Millar, C.B., Guy, J., Sansom, O.J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P.D., Bishop, S.M., Clarke, A.R., & Bird, A. (2002) *Science*, **297**, 403–405.
- 47) Zhu, B., Zheng, Y., Angliker, H., Schwarz, S., Thiry, S., Siegmann, M., & Jost, J.P. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4157–4165.
- 48) Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F., & Salbert, G. (2008) *Nature*, **452**, 45–50.
- 49) Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F., & Reid, G. (2008) *Nature*, **452**, 112–115.
- 50) Potts, J.T. & Gardella, T.J. (2007) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1117**, 196–208.
- 51) Waters, T.R., Gallinari, P., Jiricny, J., & Swann, P.F. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 67–74.