

特集 クロマチン構造

ヒストンH3のメチル化によるクロマチン構造の制御

中山潤一

クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを構成するヒストンは、様々な翻訳後修飾を受けることが知られ、エピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な働きをしている。メチル化の修飾についてその役割は長い間不明であったが、2000年に報告されたヒストンのメチル化酵素の発見をきっかけに、新規のヒストンのメチル化酵素が続々と報告され、さらにメチル化修飾がもたらすクロマチン構造変化について分子レベルでの理解が飛躍的に進展した。本稿では、ヒストンの特に H3 のメチル化酵素とその修飾の役割について概説し、ヒストンのメチル化修飾がもたらすクロマチン構造変化とエピジェネティックな遺伝子発現機構について紹介したい。

はじめに

染色体クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、コアヒストンと総称される4種類のヒストン(H2A, H2B, H3, H4)各2分子ずつで形成される八量体の周りに、2本鎖DNAが1.75回巻き付いた構造からなる。これらコアヒストンは、安定な八量体を形成するのに必要なカルボキシル末端側の「フォールドドメイン」と、特定の二次構造を持たないアミノ末端側の「テールドメイン」という二つのドメインを持っており、テールドメインは細胞内で、アセチル化、メチル化、リン酸化、ADP リボシル化、ユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受けることが知られている(図1)。特にリジン残基にアセチル化修飾が入ると、電化を大きく変化させ DNA との相互作用を弱くするという魅力的なモデルに加え、その後の酵素の単離によって転写との関わりが明らかにされることで、その修飾の役割が解き明かされてきた。一方メチル化修飾については、古くからその存在が報告されていたにも関わらず、その生理学的な意味については長い間不明であった。しか

し、2000年にJenuwein等のグループによって実際メチル化修飾を入れる酵素が同定され、メチル化修飾がクロマチンの大きな構造変化に重要な役割を持つことが明らかにされた。本稿ではここ数年で驚くほど進展したメチル化修飾とクロマチン構造の変化について概説したい。紙面の都合上、個々の修飾の詳細については他の優れた総説を参照して頂きたい¹⁾。

1. ヒストンのメチル化修飾とクロマチンの構造変換

ヒストンのアミノ末端にメチル化の修飾があることは、生化学的な解析により20年以上も前から知られていた²⁾。特にヒストンH3の9番目、27番目のリジン残基と、ヒストンH4の20番目のリジンのメチル化はヒトを含め様々な動物や植物種で共通して存在することが確認されていたが、その生物学的な意義については推測の域を超えてはなかった。現在までに上記の3箇所に加えてH3の4番目、36番目、79番目にもメチル化修飾が入ることが明らかになっている(図1)。アセチル化の修飾と異なる大きな特徴の一つに、この修飾によって電荷は変化しないと言う点が挙げられるが、その他にもアセチル化に比べて非常に半減期の長い安定な修飾であるという事、さらに、一つのリジン残基にmono-, di-, tri-と3つのメチル基が付加されうると言う複雑さが存在する。近年実際の修飾酵素の同定が進み、ようやく個々の修飾の持つ役割が解明されてきた。

Key Word

SET ドメイン
ヒストンメチル酵素
ヘテロクロマチン
クロモドメイン
RNAi(RNA 干渉)

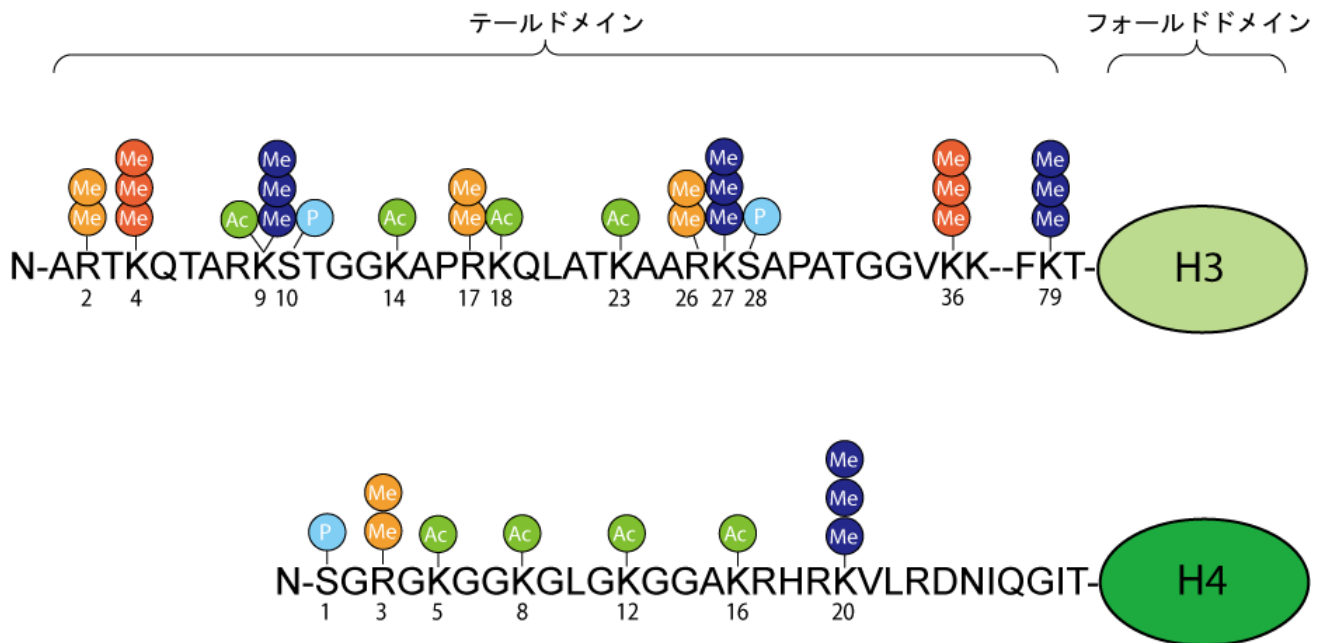


図1 ヒストン H3, H4 のさまざまな翻訳後修飾 (筆者作成)

コアヒストンである H3, H4 のドメイン構造と修飾を受ける残基を色分けで示した. メチル化修飾については修飾されるメチル基の数も示している. メチル化修飾のうちヘテロクロマチン化や遺伝子の発現抑制に関わる修飾(青), 遺伝子活性化や転写に関わる修飾(赤), アルギニン残基の修飾(橙)で区別した. また, アセチル化修飾(緑), リン酸化修飾(水色)も一緒に示した.

1) メチル化修飾と遺伝子発現制御

最初に報告されその後の研究の進展につながったのが, ヒストン H3 の 9 番目のリジンに対するヒストンメチル化酵素である. ショウジョウバエでは, 逆異などの物理的な染色体の構造変化に伴って, ある遺伝子がヘテロクロマチンの近傍に置かれた場合, その遺伝子の発現がヘテロに抑制される, 位置効果 (PEV: Position Effect Variegation) と呼ばれる現象が知られている. これはヘテロクロマチンの高次構造が, 近傍の遺伝子領域まで及ぶために起きる現象と考えられているが, Jenuwein 等はこの効果を抑制する変異の一つ Su(var)3-9 の遺伝子産物とその相同蛋白質 (ヒト: SUV39H1, 分裂酵母: Clr4) が, 植物光合成の CO₂ 固定に重要な Rubisco をメチル化する酵素と同性を有することに着目し, Su(var)3-9 がヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3-Lys9) を特異的にメチル化する酵素 (HMTase: histone methyltransferase) であることを報告した³⁾. Su(var)3-9 は, ヘテロクロマチン蛋白質 HP-1 と同じクロモドメインを N 末端側に, また進化的によく保存された SET (Su(var), E(z), trithorax) ドメインを C 末端側に持っており, 実際の酵素活性は SET ドメインに存在する. その後, H3-Lys9 のメチル化修飾が実際にヘテロクロマチン領域に特異的に局在すること, また

HP-1 (分裂酵母 Swi6) はクロモドメインを介してメチル化修飾されたヒストン H3 に直接結合し, ヘテロクロマチン領域に局在することが示されたのである⁴⁾ (図 2).

この報告の後, SET ドメインを有しクロマチンとの関連が示唆されていた様々な蛋白質と, メチル化修飾との関係が解明されることとなった. まず注目されたのが, ショウジョウバエの発生において, Hox 遺伝子の発現抑制の安定な維持に関わるポリコム遺伝子群に含まれる E(z) と Pc の関係である. 当初大腸菌で発現させた Ezh2 (ヒトの E(z) 相同蛋白質) の SET ドメインには, ヒストンへのメチル化活性は認められなかったが, その後の解析によって E(z) も Ezh2 も複合体中でメチル化活性を持つことが明らかにされている^{5,6)}. ショウジョウバエの E(z) とヒトの相同蛋白質 Ezh2 を細胞抽出液から免疫沈降によって精製したところ, 活性を制御していると考えられる複数の蛋白質と複合体を形成しており, 特にヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3-Lys27) をメチル化する活性を有していること, さらに同じポリコム遺伝子群に含まれるクロモドメイン蛋白質 Pc が, この 27 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 のペプチドを認識して特異的に結合することが示されている^{5,6)}. これらの結果より, セントロメアなどの恒常的なヘテロクロマチン領域 (constitutive

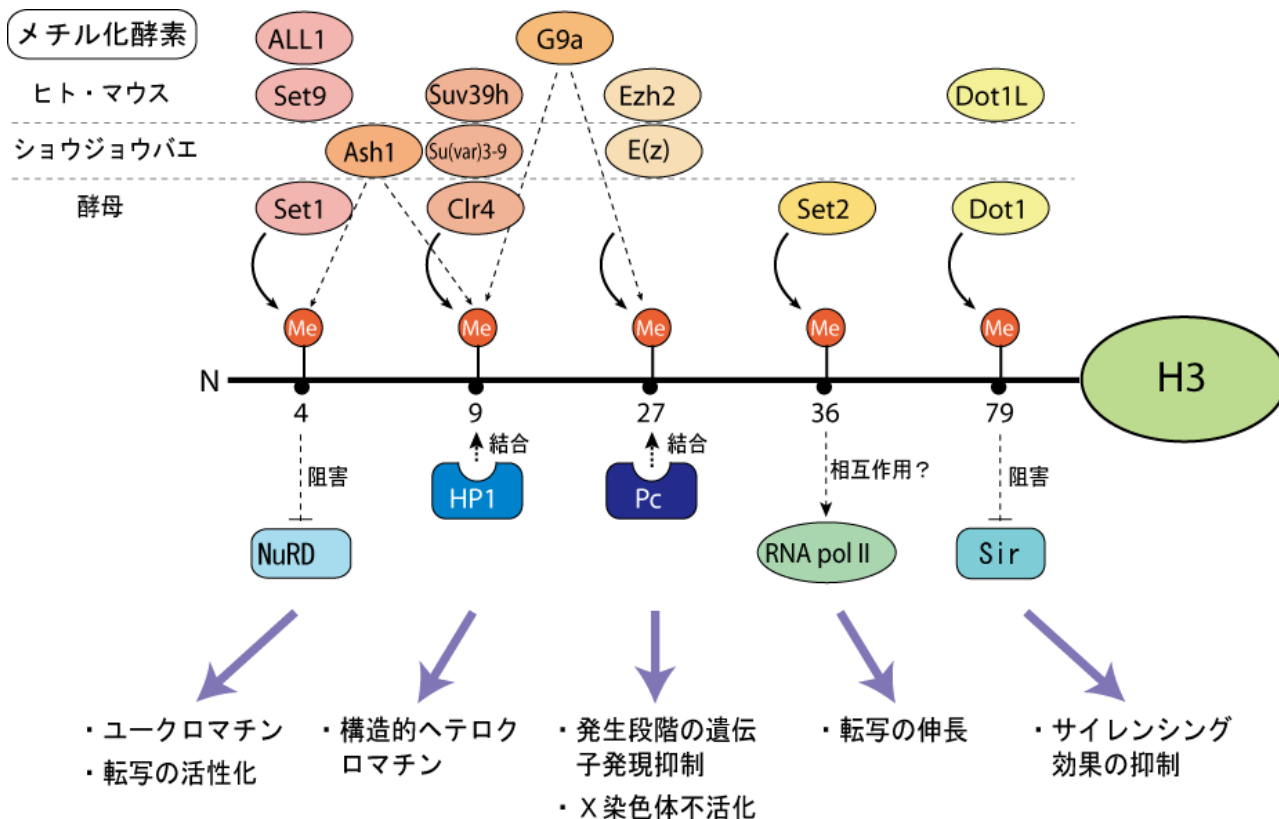


図2 ヒストン H3 のメチル化修飾とその役割 (筆者作成)

本文中で言及した代表的なヒストン H3 のメチル化酵素とその修飾部位を示した(上段). また, それぞれのメチル化修飾に結合するクロモドメイン蛋白質(HP1, Pc)と, 修飾が入ることによって結合が阻害される因子を示した(中段). それぞれのメチル化修飾がクロマチンの構造変化を伴って, どのような細胞内機能を持つのか簡単にまとめた(下段).

heterochromatin)と, 発生段階で抑制される遺伝子特異的な発現抑制では, メチル化修飾とクロモドメイン蛋白質による共通の機構によって抑制的なクロマチン構造を形成していると考えられている. Suv39h1 と Ezh2 はそれぞれ H3-Lys9 と H3-Lys27 をそれぞれ修飾する HMTase であるが, 哺乳類の G9a と名付けられた SET ドメイン蛋白質は, 少なくとも *in vitro* の実験系において H3-Lys9 と H3-Lys27 の両方をメチル化する活性を持つ. この G9a の局在や変異の影響を調べたところ, セントロメア近傍などのヘテロクロマチンには存在せず, ユークロマチン領域での局在が見られることから, 遺伝子レベルでの発現制御に関わっていることが示唆されている⁷⁾.

哺乳類動物細胞でのエピジェネティックな現象として解析が進んでいる, X染色体の不活性化と呼ばれる現象においてもヒストンのメチル化と SET ドメイン蛋白質の関与が明らかにされている. 哺乳類では性染色体としてオスがXY, メスがXXを持っているが, メスの二本のX染色体のうち一本のX染色体が発生の段階でランダムに

選択されて, 高度に凝集するとともに不活性化を受ける. これはX染色体上の遺伝子量の補正に必要な現象と考えられている. 一度不活性化されたX染色体はその後の細胞周期を通じて凝集したままの状態を維持しており, 構造的ヘテロクロマチンと非常によく似た構造を持つと考えられている. このX染色体の不活性化には, 蛋白質をコードしていない Xist と呼ばれる RNA の発現と染色体上への局在が重要な働きをしている事が明らかとなっているが, 不活性化の最初の段階でヒストン H3-Lys27 のメチル化が存在し, この修飾と同じ Ezh2 が関与することが示されている⁸⁾. これまでに不活性化 X 染色体のメチル化ヒストンを認識して結合する蛋白質は報告されていないが, H3-Lys27 のメチル化だけではなく H3-Lys9 のメチル化の関与も示唆されており, 今後さらに詳細な解析によって明らかにされると思われる. また, H3-K9, H3-K27 のどちらのメチル化修飾についても, mono-, di-, tri-のうち, どの修飾が本来の抑制的なクロマチン構造と関わっているか議論されている. 抗体の反応性など技

術的な問題も含まれるが、現在までの所 H3-K9, H3-K27 どちらの修飾においても、特に tri-メチルの状態が不活性なクロマチンと強く関連している事が示唆されている⁹⁾. mono-, di-の修飾が単に tri-に至る遷移的な過程を見ているのか、別の機能的な役割を持つのかについては不明であり、今後それぞれを特異的に認識する抗体を用いた詳細な解析が必要と考えられる。

上記のようにヒストンのメチル化修飾については H3 が注目され解析されているが、ヒストン H4 の 20 番目のリジン (H4-Lys20) をメチル化する酵素も同定され、転写の抑制に大事な働きをしていることが示唆されている。

PR-Set7 は生化学的なアプローチによってヒトの細胞から同定された H4-Lys20 特異的なメチル化酵素であるが、ショウジョウバエにもその相同蛋白質が存在している。ヒト細胞とショウジョウバエを用いた *in vivo* と *in vitro* の解析から、ヒストン H4-Lys20 のメチル化は不活性な染色体領域に存在することが示されている。さらに、他の染色体領域に比べて高い転写活性を示すショウジョウバエの雄の X 染色体では、逆に H4-Lys20 のメチル化は減少しており、転写活性と非常に良く相関する H4-Lys16 のアセチル化と拮抗している事が明らかにされている¹⁰⁾.

この H4-Lys20 のメチル化が、H3-Lys9 あるいは H3-Lys27 のメチル化とどのように関連しているかは不明であるが、ショウジョウバエの Trx に属する Ash1 という SET ドメイン蛋白質を含む複合体が、H3-Lys4, H3-Lys9, H4-Lys20 をメチル化する活性を有しており、ヒストン H3, H4 の分子にまたがる修飾が相互に関係している事が推測されている¹¹⁾.

2) メチル化修飾と遺伝子発現活性化

ヒストンのメチル化修飾の持つ重要な特徴の一つは、多くの場合遺伝子の活性化状態と関連しているアセチル化修飾とは対照的に、この修飾が一方向のクロマチン構造変換を規定するのではなく、様々なクロマチンの構造変換につながっていると言う点であろう。例えばヒストン H3 の 4 番目のリジン (H3-Lys4) のメチル化は Set1 (分裂酵母, 出芽酵母) あるいは Set9 (ヒト) と呼ばれる酵素によって触媒されるが、この H3-Lys4 のメチル化は H3-Lys9 のメチル化とは対照的に遺伝子の活性化領域、あるいはユークロマチン領域に局在し、H3-Lys9 のメチル化修飾とは拮抗しているという結果が報告されている¹²⁾. H3-Lys4 のメチル化がどのような機構で活性化クロマチン構造を規定し H3-Lys9 と拮抗しているのか、その詳細については明らかにされていないが、転写の不活性

化に関わるヒストン脱アセチル化酵素リモデリング複合体 (NuRD) のヒストンへの結合を抑制することで、活性化状態を維持している機構が示唆されている¹³⁾. また、H3-Lys9 と H3-Lys27 のメチル化に関わる不活性な場合と同様に、H3-Lys4 活性化場合についても、mono-, di-, tri-のどの修飾状態が生理的に意味のある修飾か議論がされているが、大きな染色体領域でのサイレンシング解除には di-の状態が、また転写の活性化状態には tri-の状態が重要と考えられている¹²⁾.

出芽酵母の Dot1 は、変異によってテロメアのサイレンシングに異常が見られる遺伝子の産物として同定され、その後の解析によってヒストン H3-Lys79 に特異的なヒストンメチル化酵素 (HMTase) であることが明らかになった¹⁴⁾. Dot1 の相同蛋白質はヒトでも存在し、進化的に良く保存された酵素と考えられるが、Dot1 には他の HMTase に特徴的な SET ドメインは存在せず、特異な酵素ファミリーに属すると考えられている。出芽酵母での解析から、Dot1 によって触媒される H3-Lys79 のメチル化はヘテロクロマチンの侵入を抑制し、サイレンシング蛋白質 (Sir) と拮抗して働いている事が明らかにされている。しかし、ヒストンのアミノ末端側のテールではなく、フォールドドメイン内の修飾がどのように機能しているのか、また H3-Lys4 のメチル化と共役して働いているのかについては今後の詳細な解析が待たれる。

上述のように、ヒストンのメチル化修飾は活性・不活性の染色体領域を規定する安定なエピジェネティック・マークとして寄与していることが明らかになったが、一方で非常にダイナミックなクロマチン構造変換にも関わっていることが報告されている。出芽酵母の Set2 は、生化学的手法で同定されたヒストン H3 の 36 番目のリジン (H3-Lys36) を特異的にメチル化する酵素であるが、後の解析によって Set2 は RNA ポリメラーゼ II の、特に転写伸長型の酵素と特異的に相互作用していることが報告された¹⁵⁾. クロマチン免疫沈降法によって、Set1 を介した H3-Lys4 の tri-メチル化は転写の開始点に近い領域に存在して転写の開始と関わるのに対して、H3-Lys4 の di-メチル化と Set2 を介する H3-Lys36 のメチル化はその後の転写の伸長と関連していることが示された。出芽酵母で明らかにされた H3-Lys36 のメチル化と RNA ポリメラーゼ II の転写伸長の関係が、他の生物種にも当てはまる進化的に保存された現象かどうかは、H3-Lys36 のメチル化の持つ機能も含めてこれから明らかにされると考えられる。

2. ヒストンのメチル化と様々な生命現象

1) RNAi とヘテロクロマチン構造形成

上述のようにヒストンの修飾が様々なクロマチン構造の変化に寄与していることが解明されてきたが、特に H3-Lys9 のメチル化とクロモドメイン蛋白質によって形成されるヘテロクロマチン構造については、その形成過程に 2 本差の RNA によって引き起こされる特異的な RNA の転写後分解の機構 (RNAi) が関与することが示唆されている¹⁶⁾。分裂酵母では、RNAi に関わる因子 (Ago1, Dcr1, Rdp1) の遺伝子破壊によって、セントロメアでの H3-Lys9 のメチル化とヒトの HP1 の相同蛋白質である Swi6 の消失が見られ、ヘテロクロマチン構造に異常をきたすことが報告されている。詳細な遺伝学的解析の結果、これらの RNAi 因子はヘテロクロマチンの維持ではなく確立の過程に重要なことが明らかにされている¹⁷⁾。この RNAi 因子が関与するヘテロクロマチン化については、細胞がゲノム中に存在する単純なリピート配列やトランスポゾンなどの転位因子が、無秩序に発現、増幅するのを抑える手段として、その領域から転写される両方向からの転写を起点にヘテロクロマチン構造をもたらすというモデルが考えられており、現在、生物種間を通じて共通のメカニズムではないかと注目されている。

2) DNA のメチル化とヒストンのメチル化

哺乳類のゲノムにおいて、DNA のシトシン、特に CpG のメチル化は様々な遺伝子の発現制御ばかりでなく、発生やがん化などの過程に重要な働きをしていることが明らかにされている。最近、メチル化 DNA のモデル生物であるシロイヌナズナとアカパンカビを用いた遺伝学的な解析によって、ヒストン H3-Lys9 のメチル化酵素に変異が入ることで、ゲノム中の DNA のメチル化が失われるという興味深い報告がされている^{18,19)}。最近哺乳類細胞においても、ヒストン H3-Lys9 のメチル化酵素 Suv39h1 と DNA メチル化酵素 Dnmt1 が相互作用し、Suv39h1/Suv39h2 をノックアウトしたマウスの細胞では、セントロメアなど構造的ヘテロクロマチンの DNA メチル化が減少する事が報告されている²⁰⁾。これらの結果より、DNA のメチル化とヒストンのメチル化修飾は、お互い協調して働くことで、遺伝子発現の安定な抑制状態を維持していると考えられる。

3) ヒストンのメチル化修飾の異常と疾病

ここ数年間の研究によってヒストンの修飾とクロマチン

の構造の変化に関する分子レベルの理解が飛躍的に進展したが、ヒストンのメチル化修飾は高度な生命現象や疾病とどのように関わっているのだろうか。クロマチン構造の異常が及ぼす影響には大きく二つの段階があると思われる。一つは染色体の機能レベルの影響が考えられる。上述のように、染色体の機能に重要なセントロメアやテロメアには、H3-Lys9 のメチル化による構造的ヘテロクロマチン構造が存在している。哺乳類のヒストン H3-Lys9 のメチル化酵素である Suv39h1/Suv39h2 をともにノックアウトしたマウスでは、染色体構造の不安定化とともに腫瘍化リスクの上昇が報告されており、メチル化修飾に基づく高次なクロマチン構造の重要性が再認識されている²¹⁾。またこのような染色体レベルの異常に加えて、クロマチン構造の異常は個々の遺伝子の発現パターンを大きく変化させ、これが発生・分化の異常や発がん過程へ寄与していることが示唆されている。上述のようにヒストン H3-Lys4 のメチル化は、H3-Lys9 のメチル化とは反対にユークロマチン領域を規定する修飾と考えられている。Hox 遺伝子の発現状態を維持するのに必要な TrxG (trithorax group) に属する ALL-1/MLL/HRX 蛋白質は、H3-Lys4 をメチル化する酵素であるが、しばしば急性白血病の点座部位に存在し、融合蛋白質が標的遺伝子のメチル化状態を変化させてクロマチン構造を変化させることで、この病気の進行に関わっている事が示唆されている²²⁾。また、ヒストン H3-K27 のメチル化酵素である Ezh2 は、転移性の前立腺がんにおいて過剰発現していることが分かり、がん化の進行状態と深い関係があることが報告されている²³⁾。これが直接がん化への引き金になっているのか、あるいはがん化した結果を見ているのかは今後議論される必要があると考えられる。しかし、細胞増殖の抑制に関わる因子の転写がヒストンのメチル化と HP-1 によって制御されている事実もあり、クロマチン構造の変化が様々な疾病に重要な役割を果たしていることは明白と考えられる。

おわりに

以上、ここ数年で大きく進展したヒストンのメチル化酵素とその修飾がもたらす様々なクロマチン構造変換について概説した。アセチル化修飾の場合と同様に、基礎的なメカニズムの解明が進むにつれ、今後は発生や疾病など様々な生命現象との関わりへと研究が進展していくものと考えられる。しかし、まだまだ数多くの不明な点が残されている。例えば、個々のメチル化修飾が持つ

意味が徐々に明らかにされる一方で、それぞれの修飾がどのように制御されているのか、特にアセチル化、メチル化を含めて H3 上の修飾と H4 における修飾がどのように結びついているのかは興味深い所である。また、アセチル化修飾とは異なり、メチル化修飾はどのようにヒストンから取り除かれるのか、その機構については全く明らかにされていない。脱メチルの反応は非常に起こりづらい化学反応であるため、メチル化修飾の入ったヒストン H3 をヌクレオソームから取り除く機構が想定されているが、それを直接支持する結果はまだ得られていない。mono-, di-, tri-の役割の違いも含めて、今後さらに詳細な研究の積み重ねによって明らかにされるべき課題と考えられる。

文献

- 1) Sims RJ 3rd et al: Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**:629-639, 2003
- 2) van Holde KE: *Chromatin*. Springer-Verlag, New York, 1989
- 3) Rea S et al: Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferase. *Nature* **406**: 593-599, 2000
- 4) Nakayama J et al: Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**: 110-113, 2001
- 5) Cao R et al: Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**:1039-1043, 2002
- 6) Czermin B et al: Drosophila Enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone methyltransferase activity that marks chromosomal polycomb sites. *Cell* **111**:185-196, 2002
- 7) Tachibana M et al: Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysine 9 and 27 of histone h3. *J Biol Chem* **276**: 25309-25317, 2001
- 8) Plath et al: Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, **300**: 131-135, 2003
- 9) Tamaru H et al: Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* **34**: 75-79, 2003
- 10) Nishioka K et al: PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* **9**: 1201-1213, 2002
- 11) Beisel C et al: Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**: 857-862, 2002
- 12) Santos-Rosa H et al: Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411, 2002
- 13) Nishioka K et al: Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* **16**: 479-489, 2002
- 14) van Leeuwen F et al: Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**: 745-756, 2002
- 15) Hampsey M, Reinberg D: Tails of Intrigues. Phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**: 429-432, 2003
- 16) Volpe TA et al: Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833-1837, 2002
- 17) Hall IM et al: Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**: 2232-2237, 2002
- 18) Tamaru H, Selker EU: A histone H3 methyltransferase control DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283, 2001
- 19) Jackson JP et al: Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560, 2002
- 20) Lehnertz B et al: Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**: 1192-1200, 2003
- 21) Peters AH et al: Loss of the Suv39h histone methyltransferase impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**: 727-738, 2001
- 22) Nakamura T et al: ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional memory. *Mol Cell* **10**: 1119-1128, 2002
- 23) Varambally S et al: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**: 624-629, 2002.