

<平成 30 年度助成>

ヒト正常細胞の恒常性と変化を司る栄養源依存的な遺伝子発現制御機構 —ヒストンH4K20me1メチル化の役割と複製開始複合体MCMタンパク質の制御

林 陽子

(大阪大学大学院 生命機能研究科)

要 旨

細胞の恒常性と変化は、ヒストン修飾を始めとした後天的遺伝子制御によって制御される。ヒストン修飾は、ヒストンタンパク質の様々なアミノ酸残基に、メチル化やアセチル化などが導入され、修飾によって遺伝子発現の活性化や抑制化が促されるとともに、細胞周期に応じて大きく変化する。本研究では、まずヒト細胞へのグルコース投与によるヒストン修飾の変化を調べた。その結果、遺伝子発現に係る修飾だけでなく、細胞周期に応じて変化するヒストン修飾 (H4K20me1) も大きく変化することが分かった。そこで、H4K20me1 の役割を調べたところ、複製開始複合体 MCM (minichromosome maintenance) タンパク質のゲノム領域への集積とよく似ていることを突き止めた。MCM タンパク質は、複製期に DNA を解く働きがあり、複製期前までに複製開始起点である DNA 領域に結合する必要がある。免疫染色の結果から、H4K20me1 と MCM タンパク質の共局在はほとんど認められず、両者は排他的であることが確認できた。さらに、MCM タンパク質の DNA への段階的な結合に H4K20 メチル化が関わっていることが分かった。したがって、グルコースなどの細胞への取り込み量によって、H4K20 メチル化のレベルが調節され、これが複製開始複合体の DNA への結合に影響が及ぼすことで、細胞周期が遅延し、引いては遺伝子発現に影響することが示唆された。

序 論

遺伝子発現は、細胞固有の性質を維持しつつ、栄養条件を含めた外界の環境に大きく影響される。DNA が巻き付いているヒストンタンパク質は、遺伝子発現の制御の役割を持ち、遺伝子発現が活性化する領域、抑制される領域にそれぞれ特徴的な修飾が導入される。例えばアセチル化修飾が多く見られる領域は、DNA が緩んでいるために遺伝子が発現されやすく、また、ある種のメチル化修飾が多い領域では DNA が密になるために、遺伝子の発現は低い。つまりヒストン修飾は、遺伝子の発現しやすさを大雑把に定めていると言える。また申請者は、ヒストン修飾が細胞周期依存的に変化することが見出した¹⁾。遺伝子発現が大きく変化する分化や老化、癌化は、いずれも細胞周期に伴う過程であり、ヒストン修飾はダイナミックな変化を示す。

実際に遺伝子発現制御は、細胞周期とも深く関わることが分かってきた。一般に、複製期において早く複製される領域は遺伝子発現が活性化領域であり、複製が後期に起こる領域は遺伝子発現が抑制される領域である。したがって、遺伝子発現機構を明らかにするためには、複製タイミングのメカニズムを理解する必要がある。

増殖中の細胞の細胞周期には、DNA 複製の準備段階の G1 期、DNA を複製する複製期、細胞分裂の準備をする G2 期、細胞が分裂する分裂期という 4 つの過程がある。一方、ヒトの多くの細胞は、自身の細胞の運命に従って、あるいは周りの環境変化に応じて、細胞周期の活動が見かけ上、休止した G0 期あるいは非常に長い G1 期にある。つまり、次の細

胞周期を進行するかどうかは、複製期に入る前の G1 期までに決定されると考えられ、G1 期は細胞周期の進行を決める時期とも言える。

複製期に入ると、複製開始起点に結合した複製開始複合体 MCM タンパク質が、DNA ヘリケースとして両方向に向かって DNA を解き、複製が進行する。したがって、細胞が増殖する場合は、複製期が始まる前までに MCM タンパク質複合体が複製起点へ結合することが必須である (図 1) が、ヒト細胞においてその結合機構は不明であった。本研究では、G1 期における細胞周期進行の決定がヒストン修飾と MCM タンパク質に関係するのではないかと考え、研究を進めた。

結果

本研究ではまず、低グルコース環境下と高グルコース環境下で、細胞のヒストン修飾がどのように変化するかを調べた (図 2)。その結果、遺伝子発現の抑制マーカーであるヒストン H3 の 9 番目のトリメチル化修飾 (H3K9me3) にはグルコース濃度による効果は認められなかったが、遺伝子発現活性化のマーカー、ヒストン H3 の 9 番目のアセチル化修

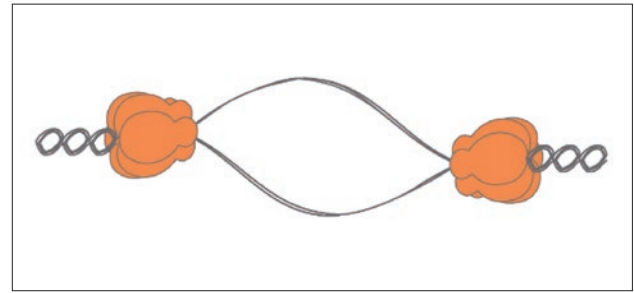


図 1 複製期における MCM タンパク質
 MCM タンパク質は複製期に DNA を解く働きを持つ。DNA 複製は両方向に向かって進んでいくため、複製期が始まる前 (G1 期) までに複製起点に 2 つ DNA に結合しなくてはならない。しかしながら、哺乳類の細胞でどのようなタイミングで MCM タンパク質が結合するかは不明であった。

飾 (H3K9ac) は、低グルコース条件下で修飾レベルが減少することが分かった。グルコースは栄養源として細胞に取り込まれることから、高グルコース下では遺伝子発現が活性化されていると考えられた。一方で、これまでに遺伝子発現の抑制に働く修飾と考えられていたヒストン H4 の 20 番目のモノメチル化修飾 (H4K20me1) が、H3K9ac と同様に、グルコース濃度が低下するとその修飾量が減少することが分かった。しかしながら H4K20me1 は生体内でどのような役割を持つのかは不明であった。

そこで、H4K20me1 修飾がヒトゲノム中でどのような場所に局在するのかを調べた (図 3)。その結果、

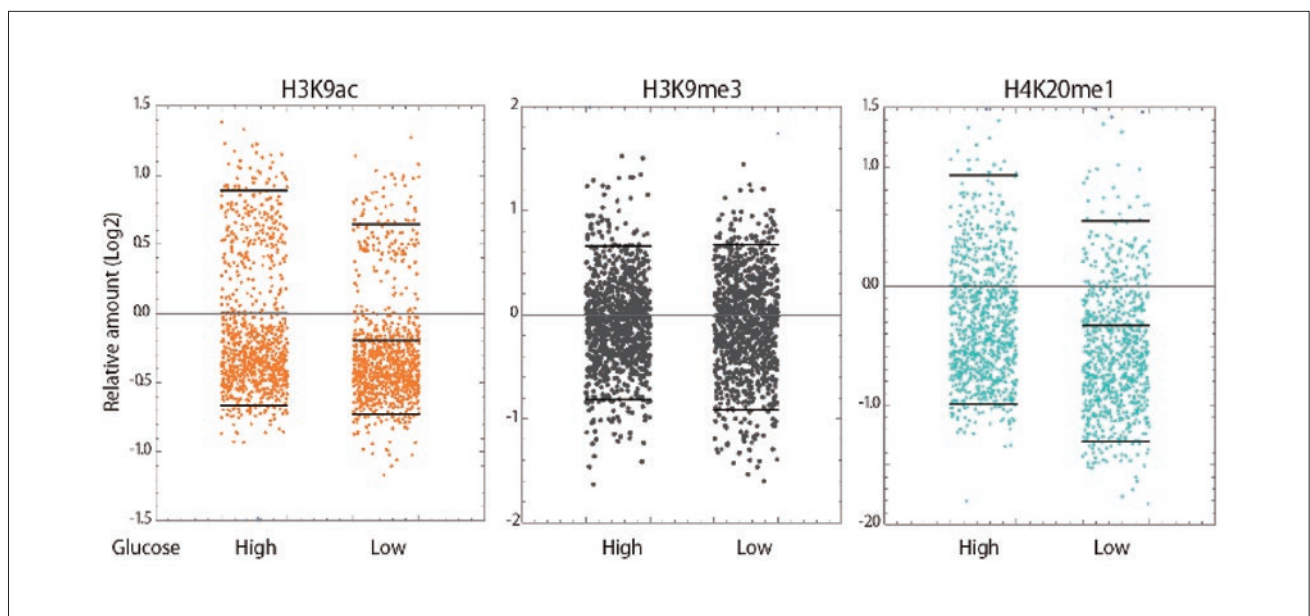


図 2 グルコース環境におけるヒストン修飾の変化
 ヒト細胞を高グルコース濃度 (4g/L) で培養したのち、低グルコース濃度 (1g/L) で一週間培養したときのヒストン修飾レベルを示す。各グラフの右側は高グルコース濃度、左は低グルコース濃度。H3K9ac (右)、H3K9me3 (真ん中)、H4K20me1 (左)。

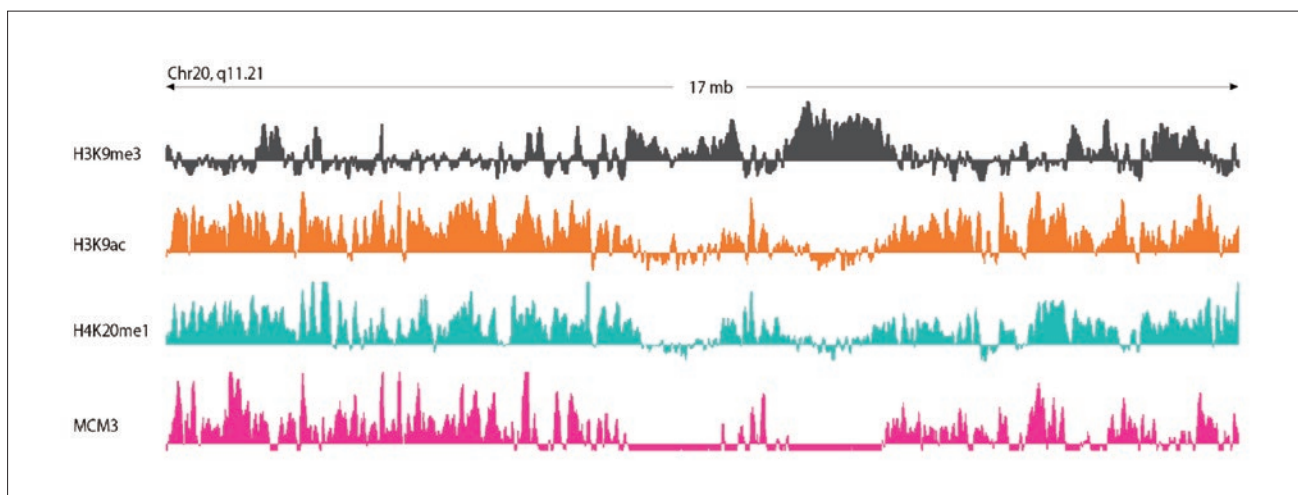


図3 ヒトゲノムにおけるヒストン修飾の局在
染色体 20 番 q11.21 からの 17mb を示した。上から H3K9me3 (IMR90, GSM1528890)、H3K9ac (U87, GSM4796183)、H4K20me1 (HeLa-S, GSM733689) および MCM3 (本実験) の局在を示す。

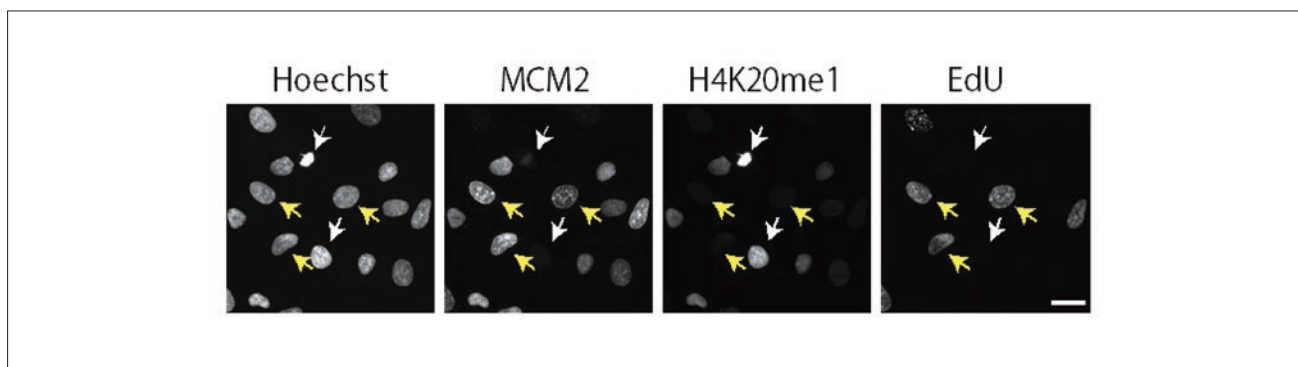


図4 MCM タンパク質とヒストン H4K20me1 修飾の局在
核染色のための Hoechst および複製期のマーカーである EdU と共に、MCM タンパク質と H4K20me1 修飾の共染色を行った。MCM タンパク質が強く染まる細胞（黄色い矢印）では H4K20me1 はほとんど認められず、H4K20me1 が強く染まる細胞（白い矢印）では MCM タンパク質がほとんど認められない。Bar, 10 μ m。

メチル化修飾であることから遺伝子不活性領域に局在すると考えられていた H4K20me1 が、むしろ遺伝子活性化マーカーである H3K9ac の局在に似ていることが分かった。さらにこれまでの研究から¹⁾、H4K20me1 は細胞周期において大きく変化することから、細胞周期と関係する因子との関連を調べたところ、複製開始起点に集積する複製開始複合体 MCM タンパク質のゲノム領域への局在とも似ていることを突き止めた (図 3)。

次に H4K20me1 と MCM タンパク質の関係を調べるために免疫染色を行った。その結果、MCM タンパク質と H4K20me1 の局在はほとんど一致しないことが分かった (図 4)。つまり、ゲノム領域においてはほぼ同じ領域に局在するものの、時期的にはあ

まり重ならないことが分かった。免疫染色の輝度を定量化してグラフ化したところ、図 5 の H4K20me1 の量が多い細胞（水色）では MCM タンパク質の DNA 結合量は少なく、図 5 の MCM タンパク質の DNA 結合量が多い細胞（ピンク色）では H4K20me1 が低いという排他的な関係にあることが分かった。さらに、ヒストン H4K20me1 から me2/me3 へのメチル化転移酵素を欠損させると、MCM タンパク質が低いレベル (図 5 の MCM の水色のレベル) で停止してしまうことが分かった。つまり、ヒストン H4K20 メチル化修飾が複製期の開始に深く関与していることが明らかになった。

さらにこの結果と生化学的実験を比較したところ²⁾、MCM 複合体は、G1 期の初期には DNA にひとつし

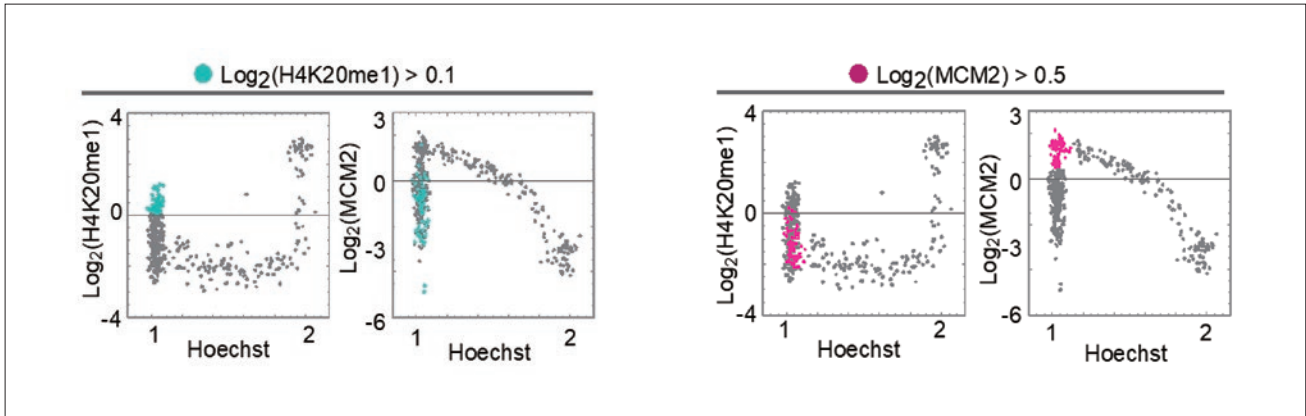


図5 排他的な MCM タンパク質とヒストン H4K20me1 修飾の局在
免疫染色の輝度をグラフ化するシングルセルプロット解析¹⁾を用いて、細胞周期における MCM タンパク質と H4K20me1 の輝度値が高い時期を調べた。ひとつひとつのドットはひとつの細胞の輝度値を示す。また、横軸 Hoechst の値が 1 では G1 期、2 では G2/M 期、その中間は複製期を示す。ここでは特に G1 期の細胞 (Hoechst=1) に着目し、H4K20me1 の高い細胞を水色、MCM の高い細胞をピンク色で示した。

か結合しておらず、複製期が始まる 3～4 時間前になって初めて二つ目の MCM 複合体が DNA に結合することが分かった。また MCM タンパク質が DNA にひとつの状態に結合する時間の長さは、前の細胞周期の複製期から G2 期に細胞がどの程度栄養源などを取り込むかに依存することが示唆された。すなわち、増殖中の細胞や癌細胞の場合は、複製期に栄養を十分に取り込むことで、ヒストン H4K20me1 修飾が G2 期から分裂期に大きく上昇し G1 期には速やかに減少し、MCM タンパク質のゲノム領域への結合を促すと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団と財団関係者の皆様に深く感謝いたします。また、本研究に従事し、精力的に研究を推進してくださった大阪大学大学院生命機能研究科 平岡泰教授および平岡研究室の皆様にご心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Hayashi-Takanaka et al., Histone modification dynamics as revealed by multicolor immunofluorescence-based single-cell analysis. *J Cell Sci.* 2020 Jul 15; 133(14):
- 2) Hayashi-Takanaka et al., Chromatin loading of MCM hexamers is associated with di-/tri-methylation of histone H4K20 toward S phase entry. bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.14.443718>

The progression of MCM complex formation and histone H4K20 methylation levels mediates the cell proliferation-quiescence decision in the G1 phase.

Yoko HAYASHI

Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

Post-translational modifications of histones can be stable epigenetic marks and transient signals that occur in response to internal and external stimuli. Levels of histone modifications fluctuate during the cell cycle and vary across different cell types. In this study, we analyzed the dynamics of histone H3 and H4 modifications under culture conditions, in the presence of high or low glucose concentrations. The levels of histone H4K20 monomethylation (H4K20me1), as well as active markers such as histone H3K9 acetylation, decreased under low glucose concentration. Since H4K20me1 exhibits unique behavior during the cell cycle (Hayashi-Takanaka, *et al.*, JCS 2020), the accumulation of H4K20me1 in the genome was compared with those of proteins involved in cell cycle regulation. The genome localization of MCM protein, which is one of the pre-replication complexes (pre-RC) and works as a DNA helicase during the S-phase, was quite similar to that of H4K20me1. Immunostaining and biochemical analysis (Hayashi-Takanaka, *et al.*, bioRxiv 2021) revealed that the levels of H4K20me1 changed in relation to the formation of MCM complexes, which act as a switch for cell proliferation. The conversion of H4K20me1 to H4K20me2/me3 was required for MCM complexes to function as a DNA helicase, and appears to be an important factor in determining S-phase progression. This finding will provide new insights into the mechanisms through which cell proliferation is regulated by pre-RC formation and histone modification.