

## 転写抑制因子 G9a の機能ドメインの解析

太田 力

常葉大学保健医療学部理学療法学科

## 要 旨

真核生物のゲノムは、4種類のコアヒストン8量体に巻き付いたヌクレオソーム構造を基本単位としたクロマチン構造をとっている。コアヒストンは多くのタンパク質によって化学修飾を受け、ヌクレオソーム構造に含まれる DNA やコアヒストンとの相互作用に変化を与えることで転写・DNA 複製・DNA 修復などの調節に利用されている。特に、コアヒストンのアミノ末端（N 末端）やカルボキシル末端（C 末端）には化学修飾されるアミノ酸が数多く存在し、アセチル化、メチル化、リン酸化の3種類の化学修飾が行われることが知られていた。さらに、最近、これら3種類の化学修飾に加え、ユビキチン化、SUMO 化、ADP リボース化、脱アミノ化、ビオチン化、プロリンの異性化などもコアヒストンの化学修飾として見つかった。ヌクレオソーム構造に含まれる DNA に作用する生体反応は、コアヒストンに付加される化学修飾によって複雑に制御されており、その制御メカニズムを理解するには化学修飾を行う酵素の機能解析が重要となってきた。

本研究では、転写抑制に働くことが示唆されている「ヒストン H3 の9番目のリジンにメチル基を導入するマウス G9a タンパク質」の機能解析を行なった。G9a タンパク質は、N 末端から C 末端に向かって、グルタミン酸に富む領域（Polyglutamic acid stretch）、システインに富む領域（Cysteine stretch region）、アンキリン繰り返し領域（ANK repeats）、および、SET ドメインが見出されている。G9a タンパク質の C 末端部分の SET ドメインにはヒストン H3 にメチル基を付加する酵素活性があることが示されているが、他の部分の機能はよくわかっていなかった。そこで、本研究では、G9a タンパク質に見られる長い N 末端部分の機能解析を試みた。その結果、G9a タンパク質の N 末端部分は、基質であるヒストン H3 テールとの結合能を介して C 末端部分の SET ドメインによるメチル化修飾の活性を高めていることがわかった。

キーワード：ヒストン、ヌクレオソーム、SET ドメイン、G9a タンパク質

## はじめに

ヒトを含めた真核生物のゲノムはコアヒストンや多くの染色体タンパク質が結合し、コ

ンパクトにパッケージ化され、クロマチン構造を形成している。このクロマチン構造は、転写制御因子（転写因子）をはじめ、DNA

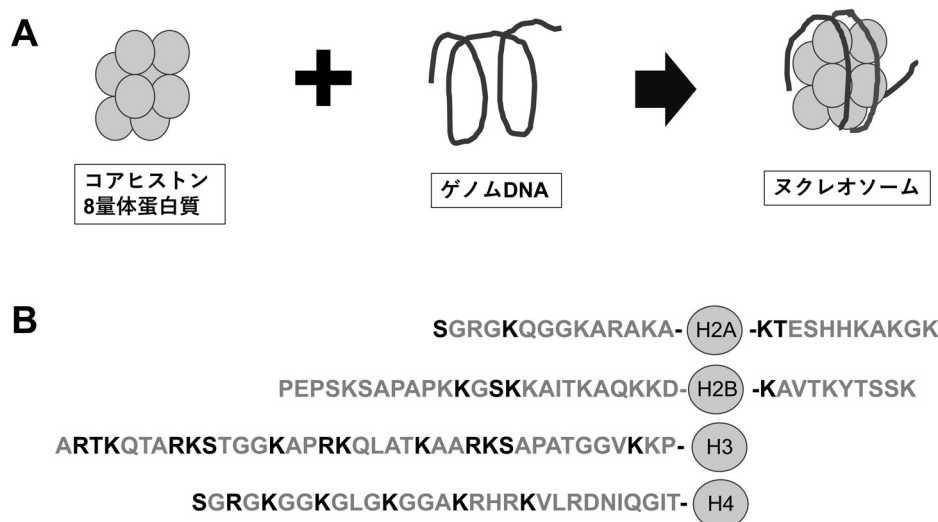


図1. ヌクレオソーム構造のモデル図とヒストン末端の化学修飾アミノ酸配列

**A**：ヌクレオソーム構造のモデル図を示す。真核生物のゲノムはコアヒストンや多くの染色体タンパク質が結合し、コンパクトにパッケージ化され、クロマチン構造を形成している。ヌクレオソームはクロマチンを構成する最小単位であり、4種類のコアヒストン（ヒストン H2A, H2B, H3, および H4）が各2分子から成る8量体で形成されたタンパク質の周りを146塩基対（146 bp）のDNAが巻き付いたDNA-タンパク質複合体を形成している。

**B**：ヒストン末端部分のアミノ酸配列（1文字表記）を示す。コアヒストンのN末端テールやC末端テールはヌクレオソームから突き出ており、多くのタンパク質が作用できる構造をとっている。コアヒストンの末端部分に存在する太文字で表したリジン（K）はアセチル化修飾、メチル化修飾、SUMO化修飾、あるいはユビキチン化修飾を、アルギニン（R）はメチル化修飾を、セリン（S）およびスレオニン（T）はリン酸化修飾をそれぞれ受ける。特に、コアヒストンの末端部分の太文字で表したリジン（K）は多くの化学修飾を受けるが、化学修飾を受ける側鎖が同一のため、これらの化学修飾は同時に導入されることは無く競合することになる。

複製因子やDNA修復因子などがゲノムDNAと相互作用し難い環境を作り出している。ヌクレオソームはクロマチンを構成する最小単位であり、146塩基対のDNAで包まれた4種類のコアヒストン（ヒストン H2A, H2B, H3, および H4）が各2分子から成る8量体で形成されたDNA-タンパク質複合体を形成している（図1-A）。コアヒストンのアミノ末端（N末端）テールやカルボキシル末端（C末端）テールはヌクレオソームから突き出ており、生体反応に関与するタンパク質が作用できる構造をとっている（図1-B）。特に、コアヒストンN末端テールの特定のアミノ酸残基は、遺伝子発現（転写）調節時に、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化、ADPリボース化、脱

アミノ化、ビオチン化、プロリンの異性化などのさまざまな化学修飾を受けることが知られている<sup>1)</sup>（図1-B）。

これまでに、コアヒストンのN末端テールにアセチル化修飾を導入する酵素（ヒストンアセチルトランスフェラーゼ；HAT）やアセチル基を除去する酵素（ヒストンデアセチラーゼ；HDAC）が数多く報告されている。さらに、コアヒストンのN末端テールのアセチル化修飾は転写活性化に、アセチル基の除去は転写抑制に作用することが明らかになってきた<sup>2,3)</sup>。コアヒストンのN末端テールのアセチル化は、付加されたアセチル基によってコアヒストンテールが負電荷を帯びることになる。ヌクレオソーム上のDNAは負に帯電しているため、電気的な反発が起こる。こ

の電気的な反発によって DNA-コアヒストン複合体内（ヌクレオソーム内）の部分的な緩みが生じ、転写活性化因子がヌクレオソーム上の DNA に結合し易い状況が生まれる。また、コアヒストン N 末端テールのリン酸化は、発生初期遺伝子の活性化マーカーであり、有糸分裂クロマチン凝縮のシグナルであることが示唆されている<sup>4)</sup>。ヒストンテールに付加されたリン酸基の機能は、アセチル基の場合と異なり、リン酸化されたヒストンテールの構造を認識するタンパク質をヌクレオソームに呼び込むことにある。このタンパク質を足掛かりに多くの関連タンパク質が集積され、転写や DNA 修復が引き起こされる。つまり、ヒストンテールに付加されたリン酸基の機能は、タンパク質集積の足場（ハブ）となることである。

2000 年に、キイロショウジョウバエのヘテロクロマチンタンパク質 su (var) 3-9 の哺乳類ホモログ Suv39h1 が、ヒストン H3 の 9 番目のリジン（H3-K9）を特異的にメチル化する最初のヒストンメチルトランスフェラーゼ（HMTase）として発見された<sup>5)</sup>。この発見後、多くの HMTase 活性を示すタンパク質が同定され、その一つが G9a タンパク質である。G9a 遺伝子は、ヒトの主要組織適合遺伝子複合体（MHC）のクラス III 領域内にコード化された BAT8 遺伝子として最初に報告されていたものである<sup>6)</sup>。その後、G9a タンパク質は Suv39h1 タンパク質と同様に C 末端部分に SET ドメインを持ち（図 2）、ヒストン H3-K9 をメチル化する HMTase 活性を持つことが判明した。さらに、その活性は *in vitro* で Suv39h1 タンパク質の 10~20 倍強いことがわかった<sup>7)</sup>。

## 解析方法

### 1. 組換えタンパク質の発現と精製：

3 種類のマウス G9a 遺伝子[全長遺伝子(3,003 bp)；G9a Full Length (G9a-FL), C 末端欠

失遺伝子 (2,086 bp)；G9a delta C-terminal (G9a-ΔC), N 末端欠失遺伝子 (915 bp)；G9a delta N-terminal (G9a-ΔN)]を、PCR 法を用いて合成し、塩基配列を確認した。これら 3 種類の G9a 遺伝子を、N 末端側に FLAG タグと 6 個のヒスチジンを繋げた His6 タグ遺伝子が挿入されている pFastBac ベクター (Invitrogen) に組み込んだ。各遺伝子を Sf-9 細胞にトランスフェクトし、4 日後に組換え体ウイルスを含む培地を回収した。回収した培地を用いて新たな Sf-9 細胞にウイルスを感染させ、Sf-9 細胞内で組換えタンパク質を過剰発現させた。感染させてから 4 日後に細胞を回収し、PBS で洗浄した。洗浄後、300 μL の溶解バッファー [10 mM Tris-HCl pH7.9, 10% グリセロール, 0.5 M NaCl, 0.1%NP-40, 5 mM 2-メルカプトエタノール, および 1 mM Pefabloc (Roche)] に懸濁し、超音波処理によって細胞を破壊した。細胞溶解物を 15k rpm, 30 分間 4 °C で超遠心分離し、上澄み液を回収した。上澄み液に 10 μL の M2-アガロースビーズ (SIGMA) を加え、4 °C で 60 分間回転させながら組換え体タンパク質をビーズに結合させた。M2-アガロースビーズを 400 μL の溶解バッファーで 3 回洗浄後、さらに、400 μL の BC100 バッファー (20 mM Tris-HCl pH7.9, 20%グリセロール, 100 mM KCl, および 5 mM 2-メルカプトエタノール) で 3 回洗浄した。M2-アガロースビーズに結合している組換え体タンパク質は、0.2 mg / ml FLAG ペプチド (SIGMA) を含む 50 μL の BC100 バッファーで 3 回溶出し、3 種類の組換え体タンパク質 (G9a-FL；1-1001 aa, G9a-ΔC；1-696 aa, G9a-ΔN；697-1001 aa) は -80 °C で保存した。

### 2. N 末端ペプチド結合アッセイ：

合成したヒストン H3 の N 末端部分の 20 個のアミノ酸 (ARTKQTARKSTGGKAPRKQL；1-20 aa) の C 末端にビオチン化リジン残基

を付加した (図 3A) . ビオチン化リジン残基を付加した合成ペプチドを, 0.2 mg / ml BSA を含む IP バッファー (25 mM HEPES-KOH pH7.9, 10% グリセロール, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, および 0.5 mM DTT) に溶解し, 10  $\mu$ L の Dynabeads M-280 (DYNAL) を加えた. その後, 4  $^{\circ}$ C で 2 時間回転させながらビーズにペプチドを結合させた. ビーズを 500  $\mu$ L の IP バッファーで 3 回洗浄し, 3 種類の蛋白質各 100 ng を含む 500  $\mu$ L の IP バッファーを加えた. 4  $^{\circ}$ C で 4 時間回転させながら混和後, ビーズを 500  $\mu$ L の IP バッファーで 3 回洗浄した. ビーズに 10  $\mu$ L の SDS サンプリングバッファー (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 5% グリセロール, 2% SDS, 0.005% BPB, 5% 2-メルカプトエタノール) を加えてから 95  $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸後, SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE ゲル) で分離を行なった. ゲルからタンパク質をナイロン膜 (PVDF メンブレン) に転写後, 抗 FLAG ペプチド抗体 (M2 抗体; SIGMA) を用いてウェスタンブロット解析を行なった.

### 3. *In vitro* ヒストンメチルトランスフェラーゼアッセイ:

組換え体 G9a タンパク質とコアヒストンを 10  $\mu$ L の反応液 (50 mM Tris-HCl pH8.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 250 mM スクロース, および 2.5 nCi /  $\mu$ L S-アデノシル [14C] メチオニン) に加え, 37  $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした. その後, 2  $\mu$ L の 6xSDS サンプリングバッファー (400 mM Tris-HCl pH6.8, 60% グリセロール, 12% SDS, 0.06% BPB, 5% 2-メルカプトエタノール) の追加により反応を停止した. サンプルを 95  $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸後, 20% ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE ゲル) で分離を行なった. ゲルをクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行っ

た後, BAS 2500 (Bio-Imaging analyzer System; Fuji) で [14C] の取り込み量を測定した.

## 結 果

### 1. バキュロウイルスによる組換え G9a タンパク質の発現と精製:

G9a 遺伝子は, ヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のクラス III 領域内にコードされている BAT8 遺伝子として最初に同定され, アミノ酸の配列から G9a タンパク質には複数の機能ドメインが予想されている<sup>6,7)</sup>. G9a タンパク質の C 末端部分には, Suv39H1 ヒストンメチル化酵素の活性化領域 (pre-SET, SET, post-SET 領域を含むヒストンメチル化酵素ドメイン; HMTase ドメイン) と類似するドメインが見出されている<sup>7)</sup> (図 2) . SET ドメインを含むマウスの G9a タンパク質の C 末端部分にヒストン H3 の N 末端から 9 番目に存在するリジン残基 (H3-K9) および N 末端から 27 番目に存在するリジン残基 (H3-K27) にメチル基を導入する活性 (メチル化活性; HMTase 活性) があることが報告されており<sup>7)</sup>, このドメインは機能的にも Suv39H1 ヒストンメチル化酵素の活性化領域と類似していることが明らかとなっている. G9a タンパク質の他の部分には, グルタミン酸に富む領域 (Polyglutamic acid stretch) , システインに富む領域 (Cysteine stretch region) , およびアンキリン繰り返し領域 (ANK repeats) が見出されている (図 2) . これらの領域は, Suv39H1 ヒストンメチル化酵素には見られない G9a タンパク質に特徴的な領域と考えられるが, この長い N 末端部分の機能に関してはわかっていない. そこで, G9a タンパク質の長い N 末端部分の機能を調べるため, マウスの G9a 全長蛋白質 (G9a-FL; 1-1001 aa) , C 末端のヒストンメチル化酵素ドメインを欠失した部分を含む G9a タンパク質 (G9a- $\Delta$ C; 1-696 aa) ,



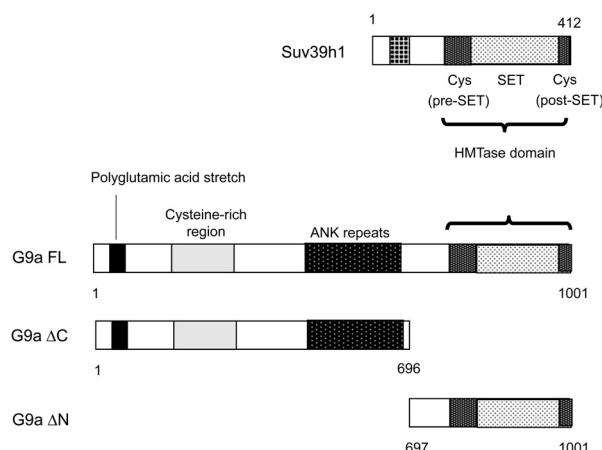


図 2. Suv39h1 および G9a タンパク質の機能ドメイン

ヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3-K9) を特異的にメチル化する最初のヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMTase) として発見された Suv39h1 タンパク質は, C 末端部分にヒストンメチル化酵素の活性化領域 (pre-SET, SET, post-SET 領域を含むヒストンメチル化酵素ドメイン; HMTase ドメイン) がある. ヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3-K9) および 27 番目のリジン (H3-K27) にメチル基を導入する HMTase 活性として発見された G9a タンパク質は, C 末端部分に Suv39h1 タンパク質と類似した HMTase ドメインがある. さらに, G9a タンパク質の他の部には, N 末端側からグルタミン酸が多く連なる Polyglutamic acid stretch (ポリグルタミン酸ストレッチ), システインが多く連なる Cysteine stretch region (システインリッチ領域), 6 個の ankyrin (ANK) を含む ANK repeats (アンキリンリピート) がある.

および C 末端のヒストンメチル化酵素ドメインのみの部分を含む G9a タンパク質 (G9a-ΔN; 697-1001 aa) を解析することにした. そこで, まず, これら 3 種類のタンパク質を発現する cDNA を構築した (図 2).

バキュロウイルス発現システムを用いて, これら 3 種類の組換え G9a タンパク質を発現させた. これら 3 種類の組換え G9a タンパク質の N 末端には FLAG タグが付加されており, タンパク質の精製には FLAG-エピトープ部分を特異的に認識するモノクローナル抗体が付加されたアフィニティークロマトグラフィー (M2-アガロースカラム) を用いた. 精製途中のサンプル, および, 得られた精製標品を SDS を含む 8% アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離後, クーマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した (図 3). 図 3 の精製標品 (eluate) の染色等から, 90% 以上の純度で組換え体 G9a タンパク質を得ることに成功した.

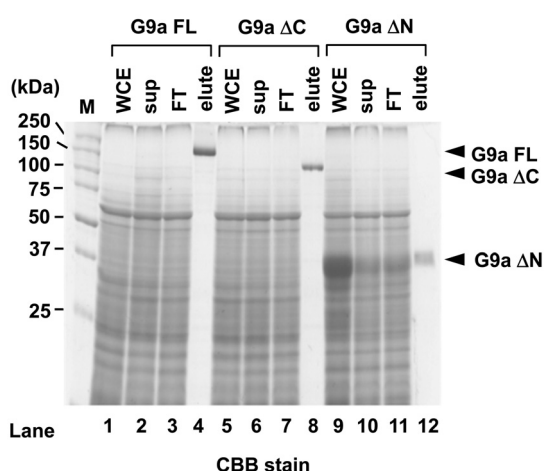


図 3. G9a タンパク質の精製

バキュロウイルスを用いて過剰発現させた 3 種類の G9a タンパク質 (G9a-FL, G9a-ΔC, G9a-ΔN). Sf9 細胞の全抽出液 (WCE), 超遠心後の上澄み液 (sup), M2 アガロース非結合液 (FT), Flag ペプチドを用いた精製標品 (elute) を 8% SDS-PAGE で分離後, クーマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した.

## 2. G9a タンパク質の N 末端部分の酵素活性 (HMTase) に与える影響:

これまでの研究からマウス G9a タンパク

質はヒストン H3 の N 末端テールにメチル基を付加する HMTase 活性を持っていることが明らかとなっている<sup>7)</sup>。そこで、G9a タンパク質の N 末端部分の HMTase 活性への役割を調べた。基質としてコアヒストンを用い、異なる塩濃度条件下 (150 mM, 300 mM, 500 mM KCl) で、3 種類の組換え G9a タンパク質 (G9a-FL, G9a-ΔC, G9a-ΔN) の HMTase 活性を比較した。G9a-FL タンパク質は 3 種類の塩濃度全てにおいてほぼ一定の HMTase 活性を示した (図 4)。しかし、G9a-ΔN タンパク質は低塩濃度 (150 mM KCl) では G9a-FL タンパク質と同程度の HMTase 活性を示したが、中塩濃度および高塩濃度 (300 mM および 500 mM KCl) では HMTase 活性が段階的に低下することが判明した (予想通り G9a-ΔC タンパク質は 3 種類の塩濃度全てにおいて HMTase 活性を示さなかった) (図 4)。この解析結果から、N 末端部分は、G9a タンパク質の HMTase 活性を高めていることがわかった。

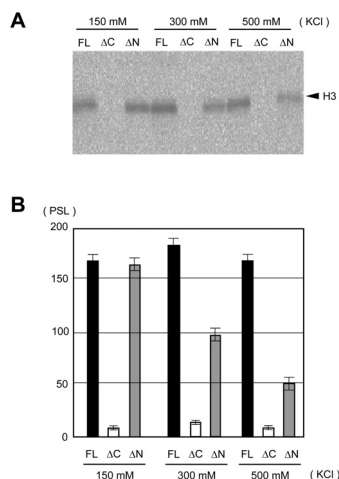


図 4. G9a タンパク質の HMTase 活性

**A** : 3 種類の組換え G9a タンパク質 (G9a-FL, G9a-ΔC, G9a-ΔN) 各 100ng, 300ng のコアヒストン, S-アデノシル [14C] メチオニンを異なる塩濃度条件下 (150 mM, 300 mM, 500 mM KCl) で反応を行なった。サンプルを 15% SDS-PAGE で分離後 BAS 2500 で解析した。

**B** : 上記 A の解析を 3 回行い数値化したもの。エラーバーは標準誤差を示す。

### 3. G9a タンパク質の N 末端部分のヒストンとの相互作用に与える影響 :

Suv39h1 がヒストン H3 の N 末端テールと相互作用することが観察されていることから、G9a タンパク質も基質であるヒストン H3 テールと直接相互作用することが予想される。そこで、ヒストン H3 の N 末端テール (1-20 aa ; 図 4-A) を付加したレジンを用い、異なる塩濃度条件下 (150 mM, 200 mM, 500 mM KCl) で、3 種類の組換え G9a タンパク質 (G9a-FL, G9a-ΔC, G9a-ΔN) とヒストン H3 の N 末端テールとの結合能力を比較した。

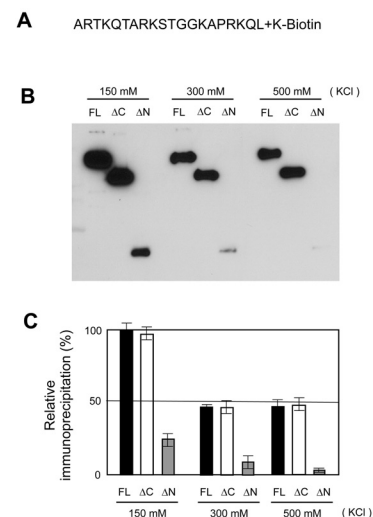


図 5. G9a タンパク質のヒストン結合活性

**A** : ヒストン H3 の N 末端に存在する 20 個のアミノ酸を順に並べたペプチド配列 (1 文字表記) で、その C 末端にビオチン化リジン (K) を付加した。

**B** : 3 種類の組換え G9a タンパク質 (G9a-FL, G9a-ΔC, G9a-ΔN) 各 100 ng とビオチンに結合したペプチド 100 ng のヒストン H3 の N 末端 20 個のアミノ酸 (A) を異なる塩濃度条件下 (150 mM, 300 mM, 500 mM KCl) で結合反応を行なった。反応後、サンプルを 8% SDS-PAGE で分離し、ナイロン膜に転写後、Flag 抗体を用いてウェスタン解析を行なった。

**C** : 上記 B の解析を 3 回行い数値化したもの。エラーバーは標準誤差を示す。

低塩濃度 (150 mM KCl) において、G9a-FL タンパク質および G9a-ΔC タンパク質の

ヒストン H3 テールとの結合能はほぼ同一であったが, G9a- $\Delta$ N タンパク質の結合能は G9a-FL タンパク質や G9a- $\Delta$ C タンパク質の約 25%であった. 中塩濃度あるいは高塩濃度 (300 mM, 500 mM KCl) では 3 種類のタンパク質全てがヒストン H3 テールとの結合能は低下することが判明したが, G9a- $\Delta$ N タンパク質の結合能は G9a-FL や G9a- $\Delta$ C の結合能に比べ, 中塩濃度 (300 mM KCl) で約 10%に, 高塩濃度 (500 mM KCl) で約 5%に低下した. この解析結果から, N 末端部分は, G9a タンパク質のヒストン H3 テールとの結合能を高めていることがわかった.

## 考 察

これまでの研究から, SET ドメインを含むマウス G9a タンパク質の C 末端部分にヒストン H3 に対して HMTase 活性を示すことが明らかになっていたが<sup>7)</sup>, G9a タンパク質の N 末端の機能は不明であった. 今回の解析によって, G9a タンパク質の N 末端がヒストン H3 テールを強く認識し, ヒストン H3 テールのメチル化活性に寄与することが明らかとなった (図 4 および図 5). G9a タンパク質の N 末端部分には図 2 に示すように 3 つの機能ドメインが存在することがわかっている<sup>7)</sup>. これらのドメインの中で, ヒストン H3 テールの認識に関与するドメインの候補としては, ポリグルタミン酸ストレッチが有力である. ヒストン H3 の N 末端テールは, リジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸が多く並んでおり, 負に帯電している. 従って, 正に帯電しているポリグルタミン酸ストレッチが電氣的に相互作用を示している可能性が高いと考えている. G9a タンパク質の N 末端部分には, Notch, NF- $\kappa$ B, SW14 などのタンパク質に見出されている 6 つの連続した 33 アミノ酸のアンキリン (ANK) リピートも含まれている. ANK リピートは, 特定のタンパク質間相互作用のために機能すること

が報告されており<sup>8)</sup>, ヒストン H3 テールの構造を認識する可能性も考えられる. 今後, G9a タンパク質によるヒストン H3 テールの認識に, N 末端のどのドメインが働いているのか詳細な解析が必要と思われる.

## 謝 辞

真貝洋一博士 (理化学研究所) には, マウス G9a 遺伝子の cDNA を分与して頂き感謝致します. また, 本研究は国立がん研究センター研究所の疾病ゲノムセンターのスタッフの皆様 [特に, 粥川堅太郎博士 (現ライフテックロジーズジャパン株式会社)] に手助けして頂き感謝致します.

## 引用文献

- 1) Berger SL: Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12:142-148, 2002.
- 2) Marmorstein R. and Roth SY.: Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 11: 155-161, 2001.
- 3) Cress WD. and Seto E.: Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 184:1-16, 2000.
- 4) Cheung P., Allis CD. et al: Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103:263-271, 2000.
- 5) Rea S., Eisenhaber F. et al: Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593-599, 2000.
- 6) Milner CM. and Campbell RD.: The G9a gene in the human major histocompatibility complex encodes a novel protein containing ankyrin-like repeats. *Biochem J* 290:811-818, 1993.
- 7) Tachibana M., Sugimoto K. et al: Set domain-containing protein, G9a, is a

novel lysine-preferring mammalian histone methyl-transferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. J Biol Chem 276:25309-25317, 2001.

- 8) Mosavi LK., Minor DL. et al: Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. Proc Natl Acad Sci USA 99:16029-16034, 2002.