

分子間架橋技術を応用したp53転写因子複合体によるクロマチン/ エピジェネティクス制御機構の解明

千葉大学大学院 医学研究院 細胞治療内科学
田中 知明

1. はじめに

ゲノムの守護神と称されるp53の新たな側面として、老化・エネルギー代謝調節²⁾以外にも、幹細胞や核初期化に関わるエピゲノム制御作用を持つことがわかってきた。転写因子であるp53が様々な下流遺伝子を時間的・空間的に支配する為には、ヒストンコード仮支える遺伝子発現制御の分子基盤と共通のメカニズムが機能している。そこには、複雑な化学修飾状態: 「タンパクコード」や、リン酸化・メチル化などの修飾酵素: 「書き出し分子」、コードの「読み取り分子」、転写共役因子など、多くのパーツが複雑に絡み合っている⁴⁾。これらの分子ネットワークによる核内情報制御システムがエピゲノムの中心にあると想定されるが、実体は謎に包まれている。そこで本研究では、がん抑制遺伝子p53を中心に、その*in vivo*クロマチン複合体中に含まれる機能的会合分子群を網羅的に同定し機能解析することで、がん幹細胞制御の根底で作用する核内シグナルとクロマチン制御メカニズム解明へのアプローチを試みた。

2. 方法

- 次世代型シーケンサーによる老化細胞や ES/iPS に特異的に発現する p53 依存的な non-coding RNA を含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析。ES/iPS 細胞から RNA を抽出して、次世代型シーケンサーによる RNA-sequence と Transcription Start Site (TSS) 解析を施行し、ゲノムワイドの遺伝子発現プロファイルのライブラリーを構築した。また、OCT3/4・Nanog・ヒストンコード (3meK4-H3/AcK9-H3/3meK27-H3/3meK36-H3) の ChIP-seq を施行し、iPS/ES に特異的な linc RNA の抽出と読み出しパターンの解析を行った。
- 比較的未分化な肺癌細胞株 H1299 (p53 欠失細胞株) を用いて、(1) 分子間架橋技術とシェーククロスグラディエントによるサイズ分画を用いた p53 クロマチン複合体の精製とその転写活性の測定を行った。更に、クロマチン制御能を有する可能性が高い分子を絞り込み、それらの特異的バンドを全て切り出し LC-MS/MS で網羅的同定を行う目的で、(2) サイズの異なる p53 クロマチン複合体の ChIP プロファイリングとその複合体中に含まれる分子の同定を行った。
- 老化細胞・ES/iPS 細胞における p53 クロマチン複合体に含まれる機能的分子群の網羅的同定。比較的未分化な肺癌細胞株 H1299 (p53 欠失細胞株) を用いて、(1) 分子間架橋技術とシェーククロスグラディエントによるサイズ分画を用いた p53 クロマチン複合体の精製とその転写活性の測定を行った。更に、クロマチン制御能を有する可能性が高い分子を絞り込み、それらの特異的バンドを全て切り出し LC-MS/MS で網羅的同定を行う目的で、(2) サイズの異なる p53 クロマチン複合体の ChIP プロファイリングとその複合体中に含まれる分子の同定を行った。
- 同定された分子群のクロマチン構造の調節 (Histone modification のプロファイリング) や epigenetic な遺伝子発現に及ぼす影響の解析を目的として、p53 クロマチン複合体へ CAS/CSE1 の会合と選択的転写活性化調節機能の解析を施行した。

3. 結果 研究成果

- 次世代型シーケンサーによる ES/iPS に特異的に発現する p53 依存的な non-coding RNA を含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析
最近になって高速シーケンサーなどを用いた大規模なトランスクリプトーム解析が行われるようになり、たんぱく質をコードしない長鎖の RNA (linc RNA) の同定とその解析が進んでいる。これらの linc RNA がクロマチン制御や核内構造体の構成を介して、癌の転移や悪性化に関係しているばかりでなく、幹細胞性の機能維持や核リプログラミングにおける iPS 樹立効率や性質に重要な役割を果たすことが示唆されている (図 1)。そのような背景の中、

転写因子 p53 によって制御される linc RNA の報告がなされているが、その発現制御や機能など十分に明らかにされていない。正常のヒト線維芽細胞と比較して、iPS 細胞 (253G1) と ES 細胞 (khES1) において 2 倍以上の発現 (RPKM) を示す linc RNA を解析した。その結果、iPS と ES に共通する linc RNA 候補が 1292 遺伝子検出された (図 2)。Chr5 から読み出される linc RNA に関して、ChIP-seq を施行して、その詳細な発現プロファイル解析と epigenetic パターンを解析した。TSS 解析にて転写開始点の明らかなピークを認め、RNA-seq から約 102, 4kb に渡る転写産物が確認された。興味深いことに転写開始点領域近傍に Nanog の結合が観察され、また読み出し領域に一致して、active ヒストンコードである AcK9-H3、3meK4-H3 と同時に、repressive ヒストンコードである 3meK27-H3 のピークが認められた (図 3)。これらの結果は、bivalent な epigenetic regulation を受ける linc RNA の存在を示唆している。また、p53 依存的に DNA 傷害にて転写誘導を受ける linc RNA 候補を 72 遺伝子同定した (data not shown)。これらの一部は、ES/iPS の pluripotency 制御に関わるものが shRNA による機能的スクリーニング解析から確認された。

- 老化細胞・iPS 細胞における p53 クロマチン複合体に含まれる機能的分子群の網羅的同定 (1) 分子間架橋技術とシュクロースグラディエントによるサイズ分画を用いた p53 クロマチン複合体の精製とその転写活性能の測定

従来の解析方法では、各パラメータの個別解析のため複合体としての情報が失われるので、ChIP アッセイの分子間架橋技術を応用し、Sucrose Gradient によるサイズ分画を組み合わせ、p53 転写因子複合体の精製を試みた。架橋剤には formaldehyde を用いたが、この利点としてモノアーム型のため resolution が (約 2 Å) 非常に高いこと、リバースクロスリンクが効率良く容易に可能 (酸性・60°C 以上の条件下) であることが挙げられる (図 4A)。また、実験のアウトラインを図 4B に示す。H1299 細胞に p53WT アデノを感染させ 24 時間後に、細胞を回収した。細胞回収に先んじて、in vivo での機能的クロマチン複合体を回収するために 1% の formaldehyde 処理した細胞としない細胞を用意した。粗核分画を調整し、超音波処理にて DNA を平均約 600bp の長さに sharing した核抽出液を、10-40% の Sucrose Gradient において分離を行った。20Fr. に分画し、各分画中に含まれる p53 を Western blot 法にて検出した (図 5A)。Formaldehyde で Cross-link (-) には、p53 のほとんどは比較的軽い分画に認められた。一方、Cross-link (+) には、p53 複合体が Sucrose Gradient を通して広く分画された。このことは、細胞内において p53 が、DNA も含め様々な multiple cross-linkable complexes を形成していることを示している。つぎに生理的な p53 発現量にコントロール可能な Tet-off p53 inducible cell line を用いて同様の実験を行った (図 5B)。Cross-link (+) と (-) を比較すると、p53 のサイズ分画パターンは大きく変化しておりアデノの系と同じ結果であった。一方、アクチンの分画パターンを検討すると、Cross-link (+) と (-) においてほとんど差を認めなかった。このことは、cross-link によって生じる p53 複合体のサイズの変化は、過剰発現によるアーチファクトではなく、in vivo での複合体形成を反映していることを示している。そこで、これらのサイズの異なる p53 複合体がどのような標的遺伝子のプロモーターと結合しているのかを調べるため、各分画における p53 の ChIP アッセイを施行した (図 5C)。興味深いことに、p21WAF1 や HDM2 などの non-proapoptotic gene promoter への結合は、Sucrose Gradient 全体を通して広範に検出されたのに対して、p53AIP1 や PIG3 などの proapoptotic gene promoter への結合は、比較的 High-sedimenting な分画にのみ検出された。これらの結果は、proapoptotic gene promoter に結合している p53 転写複合体中に特異的に含まれる分子を同定できる可能性を示している。

- (2) サイズの異なる p53 クロマチン複合体の ChIP プロファイリングとその複合体中に含まれる分子の同定

更に、サイズの異なる p53 複合体における多彩な p53 下流遺伝子の p53 結合配列への結合状態を検討するために、代表的な Fr. 11 と Fr. 17 を選択して ChIP profiling を行った。p21WAF1 および HDM2 遺伝子のプロモーターは、両者とも non-apoptotic gene であるが、これらの異なるサイズの p53 複合体間に均等に検出された。一方で、BAX、PUMA、PIG3、p53AIP1 これらは全てアポトーシス実行分子であるが、大きなサイズの p53 複合体に優位に認められた。この結果は、この方法を用いることにより、少なくとも異なる性質の p53 複合体に分離できることを示しており、アポトーシス遺伝子プロモーターに結合している p53 クロマチン複合体中に特異的に含まれている分子の同定が可能である。そこで、システムをスケールアップして、Fr. 17 の p53 複合体に含まれる分子群を p53 特異抗体の affinity column を用いて精製した後 SDS-PAGE で展開し、銀染色 (非グルタルアルデヒド固定) にて

同定した。興味深いことに、サイズの異なる p53 複合体間にそれぞれ、特異的に存在するバンドが多数認められた。そこで Fr. 17 にのみ存在するバンドを切り出し、トリプシン処理した後 MALDI-TOF を用いて同定した。Cellular Apoptosis Susceptibility gene (CAS) は、Yeast における chromosome-segregation gene (CSE1) のヒトホモログである。CAS/CSE1 は、Importin α と結合して Importin α を核外に運び出す Nuclear transport factor として機能することが報告されている⁵⁾。p53 などの転写因子は、核内での機能発現に Nuclear Pore と呼ばれる構造体を通して核内に運び込まれることが重要であり、癌においてこれらの Nuclear Pore と Nuclear Transport Machinery の生理作用が破綻していることが近年示唆されている⁵⁾。

- p53 クロマチン複合体へ CAS/CSE1 の会合と選択的転写活性化調節機能
実際に CAS/CSE1 が p53 のクロマチン複合体の中に存在しているかどうかを、IP-Western 法を用いて確認した。H1299 細胞に p53WT アデノを感染させ 24 時間後に、1%の formaldehyde 処理した細胞を回収した。そして、p53 特異抗体で免疫沈降し、CAS/CSE1 タンパクとの結合を確認した。すると cross-link された p53 クロマチン複合体に、CAS/CSE1 の会合タンパクが認められた。また、size Fr. fractionation 後の p53 複合体を用いて同様の検討を行うと、High-sedimenting p53 complex 中には、CAS/CSE1 が認められるが、Intermediate-sedimenting complex 中には、検出されなかった。更に、乳癌細胞株 MCF-7 細胞に DNA 傷害を与え、IP-western 及び confocal microscopy を用いて生理的条件下で p53 と CAS/CSE1 の共沈及び細胞内局在を解析した。予想通り、DNA 傷害後の p53 複合体に CAS/CSE1 は含まれていた。また、NCS (γ -Irradiation mimic agent) で処理すると、p53 は核内に集積する。一方、主に核内にドット状に認められる CAS/CSE1 は、発現量や細胞内局在において大きな変化を示さなかったが、p53 の一部と CAS/CSE1 の一部に co-localization が認められた。これらの結果は、p53 と CAS/CSE1 が生理的条件下において相互作用する可能性を裏づけるものである。また、このシステムが p53 クロマチン複合体中に含まれる分子を同定する方法として有用なことを示している。
- 同定された分子群のクロマチン構造の調節 (Histone modification のプロファイリング) や epigenetic な遺伝子発現に及ぼす影響の解析
次に、p53 の転写活性調節における CAS/CSE1 の機能的な役割を調べるために、p53 下流遺伝子誘導に及ぼす CAS ノックダウン (siRNA) の効果を検討した。MCF-7 細胞に CAS/CSE1 特異的 siRNA あるいは control siRNA を導入した後、Camptotecin を培養液に加え p53 を活性化させた。Western blot を用いて比較検討すると、CAS/CSE1 タンパクの発現が抑制されたとしても、p53 や Actin の発現量には影響がなかった。ところが、アポトーシスに参与する PIG3 (p53 下流遺伝子) の発現誘導は著明に抑制されていた。一方で、p21WAF1 の発現には、ほとんど影響は認めなかった。そこで、p53 の様々な下流遺伝子の転写活性化に及ぼす CAS siRNA の影響を Real-Time PCR 法を用いて詳細に検討した。Western blot の結果に一致して、PIG3、p53AIP1 及び p53R2 の mRNA レベルの誘導は有意に抑制された。一方で、p21WAF1、NOXA、PUMA の誘導はほとんど変化を示さなかった。これらの結果は、CAS/CSE1 が、p53 の転写機能を選択的に制御していることを示唆している。hCAS/CSE1 は、yeast ではもともと chromosome segregation gene として機能していることが知られており、またドメイン構造からは zinc-finger 様のモチーフも持つことから、クロマチン制御に関わることが推定されている。そこで、hCAS/CSE1L のノックダウンが、ヒストン修飾におよぼす影響を検討した。p53 下流遺伝子の中で、発現に影響のあった PIG3 のプロモーターにおける AcH3、tri-K4M-H3、di-K9M-H3、tri-K27-M-H3 の動態を ChIP-assay を用いて解析した結果、tri-K27-M-H3 のヒストンコードに大きな変化を認めた。実際に、hCAS/CSE1L は PIG3 プロモーター上の -300~-700b の領域に強く結合しており、その付近から coding sequence の下流に向かって、tri-K27-M-H3 の修飾パターンが影響を受けることが明らかとなった。これらの結果は、p53-hCAS/CSE1L クロマチン複合体が、epigenetics 制御を介して、遺伝子発現と細胞応答を調節していることを示している

4. 考察 まとめ

クロマチン機能の制御機構にアプローチする目的で、ChIP アッセイのプロトコルを応用し生化学的手法と組み合わせることで、細胞内のクロマチン上で機能している p53 複合体を精製し、そこに含まれる機能的な分子群の同定を試みた。この方法は、従来の単純な結合タンパク同定実験ではなく、活性化のプロセスですぐにはずれてしまう分子、結合が弱く通常の免疫沈降ですぐにはずれてしまう因子、直接的にインタラクトしないが大きなクロマチン複合体の中で作用する重要な分子など、今まで発見されなかった生理的に意味のある分子の

発見を可能にする。実際に、p53 クロマチン複合体に特異的に存在する分子を解析した結果、p53 機能を切り替えるスイッチ的な役割を果たす因子である human Cellular Apoptosis Susceptibility protein (hCAS/CSE1L)やTranscriptional coactivator Sp110 など新たな会合分子を複数同定することに成功した。Yeast におけるその相同遺伝子 CSE1 は、boundary protein と呼ばれクロマチンと結合し、ヘテロクロマチンの伸長を阻害することで特定のクロマチン領域に存在する遺伝子の発現調節機能を持っていることが示されている。ChIP アッセイやsiRNAの解析結果から、hCAS/CSE1Lは特定のp53下流遺伝子のプロモーターと結合し、アポトーシス誘導遺伝子である PIG3 の転写を正に調節していることが明らかとなった。そのメカニズムとして、hCAS/CSE1L がクロマチンと結合し、主にヒストン H3 の K27 のメチル化制御を介して、標的遺伝子の選択的転写活性化に関与していることを我々は明らかにした⁷⁾。これらの結果は、p53-hCSE1L クロマチン複合体が、ゲノムの特定領域に作用し、エピジェネティックな制御を介して、遺伝子発現とそれに引き続く細胞応答を制御していることを示している。またゲノムワイドの解析から p53 の新たな側面として代謝調節機能を明らかにすることに成功した²⁾。これらのシステムによって同定された分子群が、単に転写能をコントロールするだけでなく、クロマチン制御と転写調節の接点で作用する機能的分子であることを示している。従って、がん幹細胞制御の根底で作用する核内シグナルでの解析を進めることにより、p53 によるクロマチン制御機構を明らかにするだけでなく、新しいタイプの抗癌剤の開発に結びつくことが期待される。

5. 発表論文、参考文献

1. Hosokawa H, Tanaka T, Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y, Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. *Proc Natl Acad Sci USA*. (in press)
2. Sugiyama T, Suzuki S, Yoshida T, Mayama T, Hashimoto N, Suyama K, Tanaka T, Sueishi M, Tatsuno I. Age, Initial Dose and Dose Increase are Independent Risk Factors for Symptomatic Vertebral Fr. actures in Glucocorticoid-Treated Male Patients. *Intern Med*. 50(8):817-24. (2011)
3. Toyoda A, Yokota A, Saito T, Kawana H, Higashi M, Suzuki Y, Tanaka T, Kitagawa M, Harigaya K. Overexpression of human ortholog of mammalian enabled (hMena) is associated with the expression of mutant p53 protein in human breast cancers. *Int J Oncol*. 38(1):89-96. (2011)
4. Horiuchi S, Onodera A, Hosokawa H, Watanabe Y, Tanaka T, Sugano S, Suzuki Y, Nakayama T. Genome-Wide Analysis Reveals Unique Regulation of Transcription of Th2-Specific Genes by GATA3. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6378-89. (2011)
5. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C. : Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(16), 7461-7466 (2010)
6. 田中知明/企画・編集: p53 ワールド。実験医学(羊土社)、28 (2010)。
7. 田中知明: 転写因子 p53 の翻訳後修飾と転写活性化機構。生化学, 82 No. 3, 200-209 (2010)。
8. 田中知明 癌抑制遺伝子 p53 による細胞老化のメカニズム。日本臨床, 69(10) (2011)
9. 田中知明, 横手幸太郎 p53 による細胞内代謝調節機構。Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌、中外医学社、191-198 (2011)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りましたアステラス病態代謝研究会に心より深く感謝致します。

LincRNA

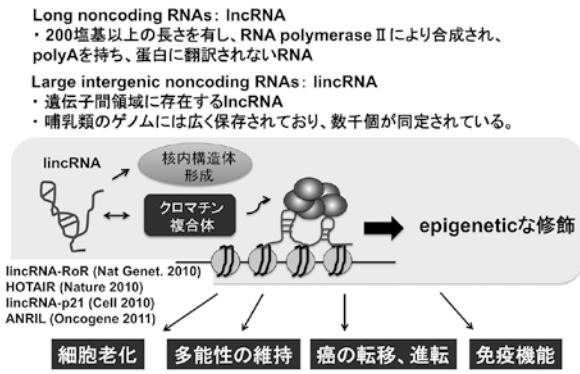


図 1. linc RNA の多彩な生理機能

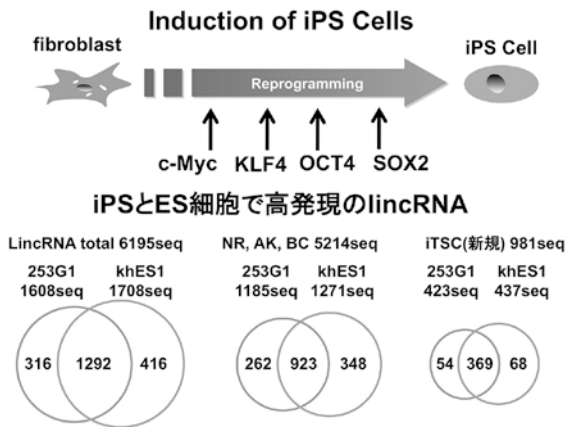


図 2. iPS/ES 細胞における linc RNA の同定

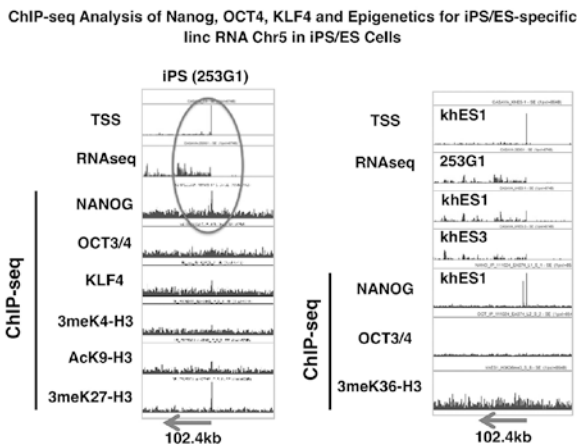
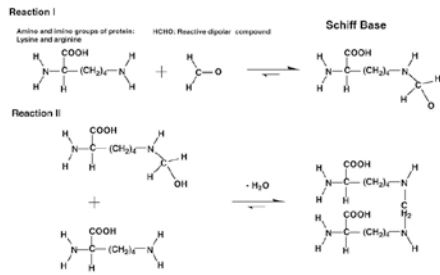


図 3. ChIP-seq・RNA-seq・TSS による新規 Chr5 linc RNA の解析

A. Chemical Cross-linking of DNA and Proteins by Formaldehyde



B. Schematic Procedure for Identification of Epigenetic Regulators in p53 Chromatin Complex (Cross-linkable Complex)

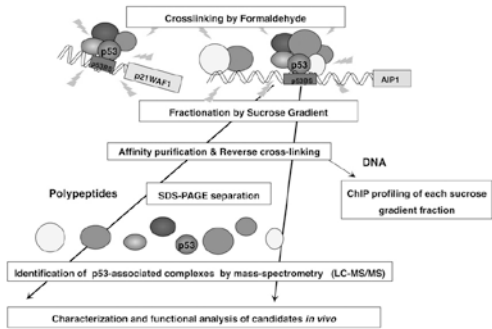


図 4. フォルムアルデヒドによる分子間架橋と実験のアウトライン

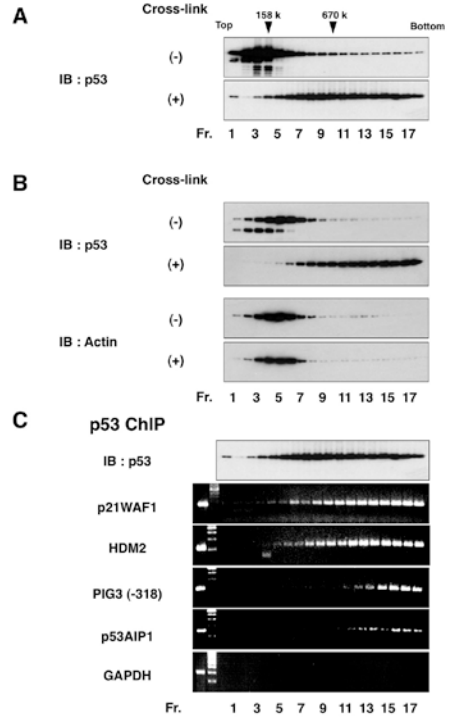


図 5. 様々な p53 クロマチン複合体のサイズ分画と標的プロモーター結合能