

令和元年6月3日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06870

研究課題名(和文) ATAD2によるクロマチン動態制御機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ATAD2 in mouse embryonic stem cells

研究代表者

両角 佑一 (MOROZUMI, Yuichi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80571439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々のがんで過剰発現が見られ、その発現量とがんの悪性度に正の相関が見られるATAD2は、ES細胞において機能しているが、その機能は依然として曖昧であった。本研究では、ATAD2がES細胞の分化時のクロマチン動態制御に重要な可能性を見出した。また、ATAD2が有するATPaseドメインは、ATAD2が多量体を形成するために必要であり、ATPaseドメインを介した多量体形成はATAD2が機能する上で重要なことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々ながんにおいて、その悪性度とATAD2発現量の間には正の相関がみられることから、ATAD2の過剰発現はがん患者の予後不良を引き起こすことが示唆されている。そのため、ATAD2の機能を明らかにすることは、その理解のみならずATAD2異常発現によるがん悪性化メカニズムの理解にも繋がることが期待できる。また、がん悪性化にATAD2が関わることから、ATAD2は抗がん剤の標的因子として近年注目を集めている。従って、本研究で得られた成果は、ATAD2を標的とした新たな抗がん剤やがんの治療および診断方法の開発に貢献するような基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：ATAD2 is ectopically expressed in many unrelated solid human tumours, and its association with poor prognosis in various cancers strongly suggest that ATAD2 overexpression favours malignant transformation and cancer progression. Although we previously showed that ATAD2 is involved in the regulation of chromatin dynamics in mouse embryonic stem (ES) cells, the function of ATAD2 remains elusive. In this study, we further investigated the role of ATAD2 in mouse ES cells and found the possibility that ATAD2 is required for chromatin dynamics regulation during ES cell differentiation. In addition, we also revealed that ATPase domain of ATAD2 is responsible for its multimerization and multimerization of ATAD2 is important for its functions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：プロモドメイン ATAD2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム DNA は、ヒストン八量体に DNA が巻きついたヌクレオソームを基本単位構造としたクロマチンを形成することで細胞核内に収納されている。アセチル化やメチル化などのヒストン化学修飾は、転写や複製といった DNA 機能発現のエピジェネティックな制御に重要であり、“リーダー”と呼ばれる修飾認識ドメインを有するタンパク質と相互作用することでその役割を果たす。プロモドメインはヒストンアセチル化の認識に機能するドメインであり、ヒトでは 46 種類のプロモドメインタンパク質が同定されている。そのうち、BET (bromodomain and extra-terminal) と呼ばれるタンパク質ファミリーを標的としたプロモドメイン阻害剤は、種々のがん細胞の増殖を抑制することから、新規抗がん剤としての応用が期待されている。しかし一方で、BET ファミリー以外を標的としたプロモドメイン阻害剤の有効性についてはあまり検討されていない。

プロモドメインタンパク質の 1 つである ATAD2 は、酵母からヒトまで高度に保存されており、哺乳類では精巣特異的に発現し機能するが、様々ながん細胞において異常な発現がみられることが報告されている。とりわけ、肺、乳、肝細胞、卵巣、大腸、胃、子宮、腎臓および前立腺がんにおいて、ATAD2 の発現量に依存してがん患者の予後も不良になることから、**ATAD2 の過剰発現が、がんの悪性化や進行を促進する**と考えられている。実際に、がん細胞において ATAD2 をノックダウンすると細胞増殖は抑制されることがわかっている。また、ATAD2 は発がんや細胞増殖に関わる estrogen receptor、androgen receptor、E2F および Myc などの転写因子と相互作用し、転写制御に関わることが報告されている。これらの事実から、ATAD2 はプロモドメイン阻害剤の新規標的として近年注目を集めており、既にいくつかの ATAD2 のプロモドメイン阻害剤が報告されている。しかし、ATAD2 の機能には未だ不明な点が多く、とりわけ ATAD2 が異常発現を示すがん細胞ではなく、ATAD2 が正常に発現している細胞を用いた解析はほぼなされていない。

研究代表者は本研究開始以前に、ATAD2 の正常細胞における機能を明らかにするために ATAD2 の各組織における発現を調べた結果、ATAD2 は精巣だけでなく ES 細胞でも発現していることを見出した。そこで、マウス ES 細胞を用いた解析によって、ATAD2 の ES 細胞における機能を明らかにしてきた (Morozumi et al., 2016)。ATAD2 の正常細胞に終える機能を明らかにすることは、ATAD2 を介したがん悪性化メカニズムを理解するためでも重要である。

2. 研究の目的

研究代表者は、ES 細胞において ATAD2 が ES 細胞の特徴であるオープンかつダイナミックなクロマチンを維持する上で重要な役割を果たすことを既に明らかにしている (Morozumi et al., 2016)。しかし、依然として ES 細胞における ATAD2 の役割や重要性に関しては不明瞭な点が多く残されている。そこで本研究では、ES 細胞を用いた ATAD2 の機能解析を通じて、ES 細胞における ATAD2 の機能や重要性をより詳細に明らかにすることを目的とした。ATAD2 の機能のさらなる理解を通じて、ATAD2 の異常発現によるがんの悪性化機構の解明にも貢献することを目指す。

3. 研究の方法

本研究開始以前に研究代表者は、ATAD2 の発現を安定的に抑制した ES 細胞（以下 ATAD2 ノックダウン ES 細胞）は、未分化時においては野生型 ES 細胞とほぼ同じ速度で増殖する一方で、試験管内で分化を誘導し胚様体 (embryoid body) を形成させると、胚様体の成長が野生型に比べて遅いことから、ATAD2 が ES 細胞の分化初期に重要な役割を果たすことを既に報告している (Morozumi et al., 2016)。しかし、なぜ ATAD2 ノックダウン ES 細胞がこのような表現型を示すのかはわかっていない。そこで、本研究では ES 細胞の分化誘導時における ATAD2 の機能を解析する。また、がん細胞における ATAD2 の機能の重要性を解析するために、ATAD2 が異常発現を示すがん細胞由来の培養細胞において ATAD2 をノックダウンし、その表現型を解析する。ATAD2 はプロモドメインのほかにも AAA ATPase ドメインを有しているが、ATPase ドメインの機能はほとんどわかっていない。そこで、本研究では、ATAD2 の ATPase ドメインに変異を導入した ATAD2 変異体を用いることで、ATAD2 の ATPase ドメインの役割を調べた。

4. 研究成果

(1) ES 細胞の分化誘導時における ATAD2 の機能解析

上述のように、ATAD2 ノックダウン ES 細胞において胚様体の成長に遅延が見られることから、ATAD2 が ES 細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆されている。また ES 細胞において、ATAD2 はクロマチンの動態制御に機能し、クロマチン上のヌクレオソームのヒストン交換に重要であることから、ES 細胞の分化の過程で生じるクロマチン再編成に ATAD2 が重要であることが考えられた。そこでこの可能性を検討するために、ES 細胞の培地中から LIF を取り除いて分化を誘導し、4 日後および 7 日後に形成された胚様体から、細胞質および核可溶性画分を含む可溶性画分とクロマチン画分を含む不溶性画分を別々に調整し、それぞれに含まれるヒストンの量を比較した。その結果、特に分化誘導後 7 日後の ATAD2 ノックダウン細胞において、可溶性画分に含まれるヒストン (H2A, H2B, H3, H4) の量が野生型に比べて顕著に

増加していることがわかった。このことから、ATAD2 は ES 細胞の分化時のクロマチン動態制御に重要であり、ATAD2 によるクロマチン動態の制御が胚様体の成長に重要であることが示唆された。

(2) がん細胞を用いた解析

がん細胞における ATAD2 の機能を解析するために、肺がん由来細胞である H1299 において ATAD2 のノックダウンし、その表現型を観察した。その結果、まず培地中に常に血清が含まれている場合、野生型と ATAD2 ノックダウン細胞において細胞増殖の違いは見られなかった。しかし、細胞を血清飢餓の状態にした後、培地に血清を加えて細胞の増殖速度を比べた結果、興味深いことに ATAD2 ノックダウン細胞において細胞増殖の顕著な遅延が認められた。このことと、ATAD2 ノックダウン ES 細胞の分化誘導時において胚様体の成長遅延がみられることから、ATAD2 は細胞が環境変化に適応する必要が生じた際に、特に重要となることが示唆された。

(3) ATAD2 の ATPase ドメインの機能解析

AAA ATPase ドメインを有するタンパク質の多くは、多量体を形成し機能することがわかっている。そこでまず、FLAG あるいは HA タグを付加した ATAD2 を共発現させ、Co-IP により両者の相互作用を調べた。その結果、FLAG-ATAD2 は HA-ATAD2 と相互作用することから ATAD2 は多量体を形成することが示唆された。さらに、プロモドメインおよび ATPase ドメインに機能欠損を引き起こす点変異を導入し、ATAD2 の多量体形成能を更に解析した結果、プロモドメインに点変異を導入した ATAD2 は多量体形成ができる一方で、ATPase ドメイン点変異体は多量体が形成できなくなったことから、ATPase ドメインは ATAD2 が多量体を形成するために重要であることが示唆された。さらに、多量体形成能が ATAD2 の機能に及ぼす影響を解析するために、ヒストン H4 のアセチル化された N 末端領域のペプチドを用いたプルダウンアッセイを行った。その結果、野生型 ATAD2 はペプチドと結合する一方で、ATPase ドメインの点変異体は、プロモドメイン点変異体と同様に H4 アセチル化 N 末端ペプチドと相互作用できなくなったことから、ATAD2 がその機能を果たすためには多量体を形成することが重要であることが明らかになった。このことは、ATPase ドメインを阻害することで、ATAD2 の機能を抑制できることを示唆しており、今後 ATAD2 の多量体形成と機能の関連をさらに調べることで、ATPase ドメインを標的とした ATAD2 阻害剤の探索・開発にもつながりうる知見が得られることが期待される。

(4) ATAD2 ノックアウト ES 細胞の作製

研究代表者は、以前より shRNA を用いた ATAD2 ノックダウン ES 細胞を用いていたが、この細胞には継代培養によって ATAD2 の発現が徐々に回復するという問題点があった。そこでこの問題点を克服するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて ATAD2 遺伝子をノックアウトした ES 細胞株の作製を試みた。3 種類の異なるガイド RNA を用いた結果、いずれも効率よく ATAD2 遺伝子をターゲットすることができ、ATAD2 ノックアウト細胞株をいくつか単離することに成功した(図 1)。また、ATAD2 ノックダウン ES 細胞は、分化により胚様体形成を誘導した際に胚様体の成長に遅延が見られるが、ATAD2 ノックアウト細胞においても同様の表現型が観察され、ATAD2 が胚様体の正常な成長に重要なことが確認された。今後、ATAD2 ノックアウト細胞を用いて解析を進めることで、ATAD2 のより詳細な機能が明らかになることが期待される。

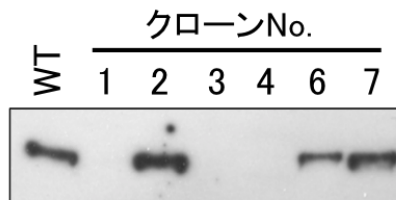


図 1 CRISPR-Cas9 システムを用いた ATAD2 ノックアウト ES 細胞の作製

(5) ATAD2 の ATAD2 相互作用因子候補との結合解析

研究代表者は、共免疫沈降法(Co-IP)を用いて ATAD2 とその相互作用因子を精製し、質量分析装置により解析することで、多数の ATAD2 相互作用因子を既に同定している(Morozumi et al., 2016)。本研究では、質量分析によって同定された ATAD2 相互作用因子群からいくつかの因子を選定し、ATAD2 との相互作用を個別に解析した。Co-IP を行った結果、選定した Ki67、CUL4B (図 2:右)、ATAD2B(図 2:左)はいずれも ATAD2 と相互作用することが確認された。今後は、これら相互作用が確認された因子の機能と ATAD2 の機能的な関連を明らかにすることが ES 細胞の細胞における ATAD2 の機能を明らかにするうえで重要である。また、ATAD2B も ATAD2 同様に ATPase ドメインとプロモドメインを有すること、および(2)の結果から、

ATAD2 は ATAD2 のみで多量体を形成するのでなく、ATAD2B も多量体を形成して機能する可能性が考えられる。今後、ATAD2 と同時に ATAD2B の発現を抑制した場合にみられる ES 細胞の表現型を解析するなど、ATAD2 と ATAD2B も併せて調べることで ES 細胞における ATAD2 の機能解析をさらに進めるうえで有用だと考えられる。

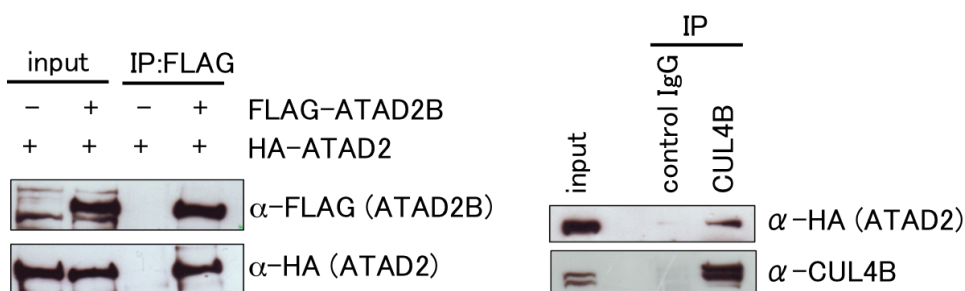


図 2 Co-IP による ATAD2 の ATAD2B (左) および CUL4B (右) との相互作用解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Govin J., Barral S., Morozumi Y., Hoghoughi N., Buchou T., Rousseaux S., Khochbin S. Characterization of Post-Meiotic Male Germ Cell Genome Organization States. *Methods Mol. Biol.*, 1832, 293-307, 2018, DOI: 10.1007/978-1-4939-8663-7_16. 査読有
- ② Barral S., Morozumi Y., Hoghoughi N., Rousseaux S., Khochbin S. The mystery of histone disappearance during spermatogenesis. *Med. Sci (Paris)*, 33, 588-590, 2017, DOI: 10.1051/medsci/20173306010. 査読無
- ③ 両角 佑一, 胡桃坂 仁志, Saadi Khochbin. 精子の形成の際のヒストン H2A.L.2 を介したクロマチンリモデリングの機構. *ライフサイエンス新着論文レビュー*, 2017, DOI: 10.7875/first.author.2017.035. 査読無

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 両角 佑一, 建部 恒, 塩崎 一裕 “分裂酵母 TORC1 の基質認識機構”, 第 41 回 日本分子生物学会年会, 2018
- ② 両角 佑一, Faycal Boussouar, Minjia Tan, Apirate Chaikuad, Sandrine Curtet, Anne-Laure Vitte, Clotilde Rabatel, Alexandra Debernardi, Sophie Rousseaux, Matthieu Gerard, Stefan Knapp, Yingming Zhao, Saadi Khochbin “The role of ATAD2 in mouse embryonic stem cells.” *ConBio2017*, 2017

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。