

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15043

研究課題名(和文) がん抑制タンパクp53のヌクレオソーム認識機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying the p53-nucleosome interaction

研究代表者

有村 泰宏 (Arimura, Yasuhiro)

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：80754697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝情報の担い手であるDNAは、約150塩基対のDNAとヒストンタンパク質から構成される、ヌクレオソームを形成して核内に収納されている。代表的ながん抑制タンパク質であるp53は、ヌクレオソームを形成しているDNA配列を認識可能である。我々は本課題において、p53のN末端側がヌクレオソームとp53の結合を促進すること、p53のN末端側にヒストンと直接結合する領域が存在することを見出した。これらの成果はp53-ヌクレオソーム結合を介したがん抑制メカニズムの理解に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p53は、代表的ながん抑制タンパク質であり、がん患者の4割以上がp53遺伝子に変異を有する。p53は、特定のDNA配列を認識して結合し、近傍領域にコードされた遺伝子の転写を活性化する「転写因子」とよばれるグループのタンパク質であるが、ヌクレオソームを形成しているDNA配列を認識可能であるという点において、一般的な転写因子とは異なる性質を有する。本研究ではこの性質の理解を目指して研究を行った。本研究の成果は、p53が、がん抑制の最上流で働くメカニズムを理解する上で重要な知見である。これらの知見は将来的には、がん抑制メカニズムの理解や、がんに対する治療法の確立につながる。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, DNA binds with histones and forms nucleosome. p53, the principal tumor repressor, can bind to the nucleosome and recognize the target DNA sequence on the nucleosome. In this project, we found that the N terminal region of p53 facilitates p53-nucleosome binding and this region directly binds to the histone. These findings contribute to understanding the mechanism that represses the tumor via p53-nucleosome interaction.

研究分野：エビジェネティクス、構造生物学

キーワード：クロマチン p53 転写因子 がん ヌクレオソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

p53 は、代表的ながん抑制タンパク質であり、がん患者の 4 割以上が p53 遺伝子に変異を有する。がんに対する治療法等の開発には、p53 の機能とその分子機序の理解が必須である。p53 は、がん抑制遺伝子群の転写制御において、最上流で働く転写因子(パイオニア転写因子)であり、下流のがん抑制遺伝子近傍の標的 DNA 配列に結合し転写を活性化する。p53 がパイオニア転写因子として機能するために最も重要な性質は、p53 が“ヌクレオソーム”の中に存在する標的 DNA 配列を認識可能という点である。

ヌクレオソームは、約 150 塩基対の DNA がヒストンタンパク質 8 量体に 1.7 回転巻き付いた構造体である。真核生物のゲノム DNA はヌクレオソームを基本構造単位として、クロマチンとよばれる高次構造体を形成している。ヌクレオソーム中では、DNA が大きく湾曲し、さらに溶液中に露出する DNA 表面が限定されるため、ほとんどの転写因子は、ヌクレオソーム内に存在する標的 DNA 配列を認識しない。そのためクロマチンリモデリング因子などによって、標的 DNA 上からヌクレオソームが除かれなければ機能しない。一方で、p53 をはじめとするパイオニア転写因子は標的 DNA 配列上のヌクレオソーム形成の有無に影響されずに結合し、クロマチンリモデリング因子などをリクルートしてクロマチン状態の変化を主導することで、転写制御における最上流因子として機能する。このように、p53 のヌクレオソーム結合能は、極めて重要な機能であるが、その分子機序はほとんど解析されておらず、なぜ p53 は他の転写因子と異なり、ヌクレオソーム中の DNA 配列を認識可能なのか、全く理解されていない。

2. 研究の目的

p53 のヌクレオソーム結合メカニズムの理解が不十分であるために、p53 を介した転写制御においてヌクレオソーム(ヌクレオソーム形成位置や、ヒストン翻訳後修飾・ヒストンバリエーションの取り込み)が果たす役割についての解析は進んでいない。この問題を解決するために、本研究は、p53 のヌクレオソーム結合メカニズムを生化学的・構造生物学的解析によって解明することを目的として行った。

3. 研究の方法

研究立案時の計画に沿って、以下の方法で研究を実施した。

【方法 I】 タンパク質の調製

ヒト由来のコアヒストンタンパク質(H2A,H2B,H3.1,H4)および p53 の各種変異体を大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として精製した。

【方法 II】 DNA 配列の検討と DNA 調製

ヌクレオソームの試験管内再構成に用いる DNA には、ヒトの p21 遺伝子の p53 結合領域である 5' エンハンサー領域(5' RE)近傍の DNA 配列を用いた。この DNA 領域は、細胞内で p53 の局在が報告されているが、p53 が結合した際のヌクレオソーム形成位置が正確には明らかになっていない。そこで、生化学的解析によってヌクレオソームへの p53 結合に適した DNA 配列および、その長さを検討した。そのために、この領域近傍の DNA 配列を用いて、数種類の DNA 断片を作製した。これらの DNA を用いてヌクレオソームを再構成したのち、ヌクレオソームの形成位置と p53(全長)の結合効率の関係を検討し、その後の生化学的解析および X 線結晶構造解析に適した DNA 配列を決定した。解析に用いる DNA 配列を決定した後、プラスミドにこの DNA 断片をクローニングし、大腸菌を用いてプラスミドを大量に調製し、制限酵素を用いて目的 DNA 配列を切り出して精製した。

【方法 III】 p53 のヌクレオソーム結合ドメインの同定

p53 N 末端側のアミノ酸領域(1-93)に含まれるヌクレオソーム結合ドメイン(NBD)を同定するため、p53 欠失変異体を作製し、ヌクレオソームとの結合能を解析した。用いる変異体としては、p53 の N 末端側アミノ酸に含まれる転写活性ドメインもしくは、プロリンリッチドメインを欠いた変異体、p53 の転写活性ドメインもしくは、プロリンリッチドメイン単独を用意した。これらの p53 変異体の精製は方法 I の p53 と同様の方法にて行う。ヌクレオソーム結合能の評価には EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) やプルダウンアッセイを用いた。

【方法 IV】 p53-ヌクレオソーム複合体の X 線結晶構造解析

p53 のヌクレオソーム結合メカニズムを原子分解能で明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。高純度に精製した p53-ヌクレオソーム複合体の結晶化条件のスクリーニングを、結晶化ロボットを用いて行った。良質な結晶が得られる結晶化条件の選択、および抗凍結溶液の最適化を行った。結晶化条件を最適化した後、大型放射光施設においてデータ収集を行った。

また、上記の解析では十分な分解能のデータが得られなかったことから、結晶の質を向上させるため、DNA の長さの検討、p53 欠失変異体、熱安定性の高い p53 変異体を用いた結晶化も試みた。

【方法 V】 p53 のヌクレオソーム結合ドメインと相互作用する領域の同定

プルダウンアッセイによって、p53 のヌクレオソーム結合ドメインがヌクレオソーム中のどの

領域と結合しているのか解析した。

まず p53 がヒストンを認識している可能性を考慮して、p53 欠失変異体を GST 融合タンパク質として精製し、ヒストン H2A-H2B 2 量体、およびヒストン H3-H4 4 量体とそれぞれプルダウンアッセイにて結合の有無を調べた。この実験により、p53 の N 末端にヒストンを直接結合する性質があることを明らかにした。さらにヒストンの欠失変異体を作製し、p53 ヌクレオソーム結合ドメインが、ヒストン中のどの領域と相互作用するか解析した。

また、良質な結晶を得るために、この実験によって明らかになったヒストン結合ドメインを含むペプチドを用いた結晶化も試みた。

並行して、p53 がヌクレオソーム中の DNA 構造を認識している可能性を考慮して、様々な長さの DNA を用いて、DNA の構造がそれぞれ大きく異なるヌクレオソームを再構成し、これらを用いて、ゲルシフトアッセイを行い p53 結合の有無を調べた。

これらの研究立案時の計画した方法に加え、p53 欠失変異体、ヒストン複合体および、再構成ヌクレオソームをもちいて、等温滴定型カロリメトリー(ITC)を用いた相互作用解析を行い相互作用メカニズムを明らかにすることを試みた。

4 . 研究成果

2017 年度までに、p53 の N 末端側がヌクレオソームと p53 の結合を促進すること、さらに p53 の N 末端側にヒストン H3-H4 と結合する 20 アミノ酸の領域が存在することを見出した。2018 年度は、この領域が H3-H4 と結合するメカニズムを明らかにするために、生化学的解析と立体構造解析の 2 つのアプローチを併用し研究を進めた。これらの結果、p53 の N 末端側が疎水性相互作用を介して H3-H4 と結合することを明らかにした。また、この結果に基づいて設計した H3-H4 との結合能が弱い p53 点変異体は、ヌクレオソームとの結合を保持していた。この結果は、p53 の N 末端側によるヌクレオソームと p53 の結合促進と、p53 と H3-H4 の結合は独立したメカニズムによって担われる可能性を示唆している。

また、がん細胞では、いくつかの特異的なヒストンの変異が報告されている。これらのヒストン変異は、ヌクレオソームの性質や構造に変化を引き起こし、p53 との相互作用に影響を与えることで細胞のがん化を引き起こす可能性がある。そこで、まず、がん患者に高頻度にみられるヒストンの変異を有するヌクレオソームの構造および性質を X 線結晶構造解析および生化学解析によって明らかにした(Nucleic Acids Res. 2018)。さらに、がん細胞において高発現することが報告されている CENP-A を含むヌクレオソームにヒストン翻訳後修飾 H4K20me1 が導入されるメカニズムを明らかにした(Nature Commun. 2019)。これらの研究は、p53-ヌクレオソーム結合を介したがん抑制メカニズムの解明を目指す本研究の基盤情報となる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Arimura, Y., Tachiwana, H., Takagi, H., Hori, T., Kimura, H., Fukagawa, T. and Kurumizaka, H. (2019) The CENP-A centromere targeting domain facilitates H4K20 monomethylation in the nucleosome by structural polymorphism. 査読有, *Nat Commun.* 10, 576., DOI: 10.1038/s41467-019-08314-x

Arimura, Y., Ikura, M., Fujita, R., Noda, M., Kobayashi, W., Horikoshi, N., Sun, J., Shi, L., Kusakabe, M., Harata, M., Ohkawa, Y., Tashiro, S., Kimura, H., Ikura, T. and Kurumizaka, H. (2018) Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome. 査読有, *Nucleic Acids Res.* 46, 10007-10018., DOI: 10.1093/nar/gky661

Kujirai T, Arimura Y, Fujita R, Horikoshi N, Machida S and Kurumizaka H.(2018) Methods for Preparing Nucleosomes Containing Histone Variants. 査読有, *Methods Mol Biol.* 1832, 3-20., DOI: 10.1007/978-1-4939-8663-7_1

[学会発表](計 4 件)

○有村泰宏「失敗から学ぶヌクレオソーム構造・機能解析」, 『第 5 回ヒストンバリエーション研究会』, 首都大学東京, 2018 年 2 月 10 日(国内学会口頭発表、招待講演)

○有村泰宏, 西村正宏, 胡桃坂仁志「試験管内再構成ヌクレオソームを用いた転写因子 p53 の機能解析」, 『ConBio2017』, 神戸ポートピアホテル, 2017 年 12 月 8 日(国内学会口頭発表、招待講演)

○有村泰宏, 西村正宏, 胡桃坂仁志「転写因子 p53 のヒストンとの相互作用」, 『第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会』, グリーンホテル三ヶ根, 2017 年 (国内学会口頭発表)

○Arimura, Y., Kato, D., Yajima, N. and Kurumizaka, H. 「Chromatin Remodeler or Histone Chaperone Independent Histone Exchange Activity of Histone Variant H2A.B」, 『EMBO Conference: The Nucleosome: From Atoms to Genomes』, Heidelberg, Germany, August 30-September 1, 2017 (ポスター発表、査読あり)

〔図書〕(計1件)

胡桃坂仁志, 有村泰宏 / 編、羊土社、(実験医学別冊)あなたのタンパク質精製、大丈夫ですか?、2018年、186ページ、978-4-7581-2238-2

〔産業財産権〕○出願状況(計0件)○取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西村 正宏

ローマ字氏名：NISHIMURA, Masahiro

※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。