

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390068
 研究課題名 (和文) p53 癌抑制システムにおける転写因子 Bach1 の機能の解明
 研究課題名 (英文) Regulation of the tumor suppressor p53 by Bach1
 研究代表者
 五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)
 東北大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00250738

研究成果の概要：

がん抑制因子 p53 の作用機構として、細胞老化の誘導がある。細胞老化は安定な不可逆的な細胞増殖停止状態であり、発がん防御にも重要とされている。しかし、p53 による細胞老化誘導の制御機構については不明な点が多い。本研究では、転写因子 Bach1 が p53 の働きを阻害することに着目し、その分子機構の解明に取り組んだ。その結果、Bach1-p53 相互作用の制御機構、Bach1-p53 により制御される老化実行遺伝子セットを明らかにし、さらに、Bach1 が発癌促進因子として作用する可能性を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2008 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：遺伝子，ストレス，蛋白質，発現制御，免疫学

1. 研究開始当初の背景

(1) p53 による細胞老化制御とその謎 癌抑制因子 p53 は、アポトーシス、細胞周期停止、そして細胞老化などを誘導することにより癌抑制に寄与する。この p53 機能の一部は、転写活性化因子としての作用による。アポトーシスや細胞周期停止の誘導に関わる p53 標的遺伝子の理解は急速に進んできたが、細胞老化誘導に関わる p53 標的遺伝子の実体については不明な点が多い。一方、p53 依存性細胞老化を誘発する要因としては DNA 損傷や

酸化ストレスが知られており、DNA 損傷から p53 活性化へ至る経路については、ATM の関与など多くの知見が報告されている。しかし、酸化ストレスから p53 の活性化へ至る経路については未知の部分が多い。酸化ストレスが DNA 損傷を引き起こす結果、p53 が活性化される可能性が報告されているが、酸化ストレスが DNA 損傷非依存的にシグナル伝達系を経て p53 を活性化することも予想されている。このように、酸化ストレスにより誘発される p53 依存性細胞老化の分子機構には、p53 標的遺伝子、p53 活性制御の二つの点で大きな

謎が残されており、これらを解明することは、酸化ストレス応答や癌抑制の分子機構の具体的理解へとつながる。

(2) Bach1 によるp53 依存性細胞老化の抑制
代表者らは癌関連転写因子Mafファミリーと結合する転写因子としてBach1 を発見し、Bach1 が酸化ストレス応答の抑制因子として作用すること、Bach1 の活性が補欠分子へムにより制御されることを報告するとともに、2006年に総説論文としてまとめた。最近の研究から、Bach1 がp53 と複合体を形成してp53 の転写活性化能を抑制するという、予想外の知見を得た。また、Bach1 ノックアウトマウス線維芽細胞 (KO MEF) やBach1/p53 ダブルノックアウトMEFの解析から、Bach1 KO MEFでは酸化ストレス応答性の細胞老化が亢進すること、この過剰な細胞老化はp53 依存性であることを明らかにした。Bach1 が何らかの分子機構によりp53 の転写活性を抑制することが予想される。リポーターアッセイ等の予備的検討から、Bach1 はそのDNA結合活性に依存しないで、蛋白質間相互作用によりDNA上のp53 に結合してコレプレッサー的に作用することを想定している。

2. 研究の目的

本研究は、転写抑制因子 Bach1 による癌抑制因子 p53 の活性制御機構、ならびにこの系により制御される「酸化ストレス応答性細胞老化」の分子機構を解明し、さらに Bach1-p53 相互作用の発癌過程における意義を理解することを主題とする。

(1) Bach1-p53 相互作用とその制御の分子機構 両者の結合が直接なのかどうか、間接的なものとしたら介在する分子は何なのか？ Bach1 がp53 のブレーキだとすると、この相互作用は酸化ストレスなど、細胞老化誘発要因により制御されている可能性がある。この機構はどうなっているのか？

(2) Bach1-p53 経路の下流で細胞老化を具現化する下流遺伝子の同定 Bach1 KO MEFでは、p53 標的遺伝子のなかでも細胞老化関連遺伝子の発現が選択的に変動している可能性がある。そこで、遺伝子発現プロファイリングやクロマチン免疫沈降法を用いて、Bach1 によって制御されるp53 標的遺伝子を探す。

(3) Bach1 が癌化因子として作用する可能性 Bach1 がp53 のブレーキだとすると、Bach1 ノックアウトマウスでは発癌過程が抑制されやすいことが予想される。そこでトランスフォーメーションアッセイや化学発癌実験を

用いてこの仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) Bach1-p53 相互作用とその制御の分子機構の解明

① 両者の結合が直接なのかどうか？

今までの研究から MEL 細胞から精製した Bach1 複合体には p53 が含まれることがわかっている。両者の結合が直接的なものか否か、それぞれの組み換え蛋白質を大腸菌で発現させ、その結合を完全精製系で検討する。この際、Bach1 には GST タグを付加しておき、グルタチオンビーズを用いたプルダウンアッセイを行う。結合実験の陽性対照としては、Bach1 結合が確認されている小 Maf 因子などを用いることにより、明確な結論を得る。直接的結合を確認できた場合には、Bach1 および p53 それぞれの各種断片も発現・精製し、両者の結合領域を確定する。

② 間接的結合であれば、介在する分子は何なのか？

上述の Bach1 複合体の中に、p53 との結合を仲介する分子があることも想定される。そこで、複合体を SDS 電気泳動で分離後に膜に転写し、この膜を上記実験で作成する組み換え p53 (His タグを付加済み) を用いたファウエスタン実験を行う。膜上での p53-p53 結合因子複合体は His タグに対する抗体を用いて検出する。候補蛋白質バンドの質量分析を別に行い、そのアミノ酸配列等を決定する。さらにその組み換え蛋白質を調整し、上述のプルダウンアッセイにより Bach1 との直接的結合活性を検証する。

以上の二つの実験から Bach1 と p53 の相互作用原理を理解できる。

③ Bach1-p53 相互作用が細胞老化誘発要因により制御されているか？

先に述べた遺伝学的見地から、Bach1/p53 複合体は、DNA 損傷による p53 経路活性化とは異なった機構で酸化ストレス応答性細胞老化に関わることが強く予想される。しかし、Bach1 KO MEF を用いた解析では、Bach1/p53 複合体がどのように変化して早期老化を来すのかは不明である。これは、遺伝学的解析の限界であり、代表者は以下の方法でその先のメカニズムに迫る。

Bach1 が p53 の抑制因子であることを考えると、両者の相互作用は酸化ストレスや DNA 損傷など、細胞老化を誘発するストレスにより解消される可能性がある。実際、酸化ストレスはこの相互作用を解消することを示唆する予備的知見を得ている。そこで、この知見をさらに検証するとともに、DNA 損傷でも同様のことがおきるか否かを調べる。具体的

には、MEF 細胞や MEL 細胞を過酸化水素、ジエチルマレイン酸、ブレオマイシン、X 線などで処理した後、p53 の免疫沈降を行い、沈降物のウェスタン解析を Bach1 抗体を用いて行う。そして、各種条件下での Bach1-p53 複合体の量を定量する。次いで、Bach1-p53 複合体が解消される分子機構を調べる。代表者らは Bach1 複合体には p19Arf も含まれること、Bach1-p19 複合体と Bach1-p53 複合体は別々に存在することを Bach1 複合体の再免疫沈降実験から明らかにしている。p19 は、p53 のユビキチン化 E3 リガーゼである Mdm2 に直接結合し、Mdm2-p53 結合を阻害することにより、p53 を活性化する。このアナロジーから、p19 は Bach1/p53 複合体形成を阻害することにより、p53 を活性化することが予想される。そこで、この仮説を検証する。

(2) Bach1-p53 経路の下流で細胞老化を具現化する下流遺伝子の同定

p53 の下流で細胞老化を引き起こす遺伝子の実体は不明である。この問題に対して、Bach1 KO MEF は極めて優れたモデル系となる。なぜなら、同細胞では p53 経路が活性化して過剰老化は生じるが、アポトーシスは亢進しない。すなわち、同細胞では p53 標的遺伝子の中でも老化を引き起こす遺伝子の発現がより選択的に上昇していることが予想される。そこで、発現プロファイリングやクロマチン免疫沈降法を用いて Bach1 によって制御される p53 標的遺伝子を探す。RNA サンプルは、20%酸素下で培養した野性型 MEF (老化に時間がかかる)、Bach1 KO MEF (急速に老化する)、Bach1/p53 double KO MEF (老化しない)、そして 3%酸素下で培養した Bach1 KO MEF (老化しない) から調整する。経時的変化にも着目するため、培養開始から 0 日 (老化しない)、14 日 (Bach1 KO MEF は完全に老化する)、28 日 (野性型 MEF も老化を示す) といった時系列でもサンプリングし、DNA アレイを用いて発現プロファイリングを行う。この中から、Bach1 KO により発現が上昇する、3%酸素下で発現が低下する、p53 KO により発現が低下する、といった指標を用いて標的遺伝子候補を絞り込む。

候補遺伝子のゲノム配列をインシリコで解析し、p53 結合配列を調べ、p53 の直接的標的遺伝子候補をさらに絞り込む。これら候補については、リポーター遺伝子を用いた p53 による活性化や Bach1 による抑制、両因子に対する抗体をそれぞれ用いたクロマチン免疫沈降法による直接的作用の確認を行い、下流遺伝子を同定する。

同定された遺伝子が細胞老化に関わる可能性は、siRNA を用いたノックダウン実験で Bach1 KO MEF の老化が遅延するかどうかを調べることにより検証する。この際、ただで

さえ増えにくい Bach1 KO MEF に siRNA 発現ウイルスを感染させた上で細胞を増殖させることが必要になるが、ここでトリックを一つ用いる。先に述べたように、Bach1 KO MEF でも 3%酸素下では老化を示さずに増殖を続ける。そこで、siRNA ウイルス感染などのステップは 3%酸素下で行い、細胞を増やした後に 20%酸素下に移して、老化の経過を比較する。

(3) Bach1 が癌化因子として作用する可能性

最近、モデル動物や患者検体を用いて、細胞老化は臨床的にも重要な癌抑制機構の一つであることが証明されている。Bach1 が p53 依存性細胞老化のブレーキだとすると、Bach1 は癌を促進する方向に作用すること、逆に Bach1 KO MEF や Bach1 ノックアウトマウスでは癌過程が抑制されやすいことが予想される。そこでトランスフォーメーションアッセイと化学癌実験を用いてこの仮説を検証する。

野性型 MEF 細胞は v-Ras と v-Myc の組み合わせによりトランスフォームし、軟寒天培地中でもコロニーを形成するようになる。そこで、野性型 MEF と Bach1 KO MEF にそれぞれ v-Ras と v-Myc を導入し、軟寒天培地中でのコロニー形成数やコロニーの大きさを比較する。

個体レベルでも検証するために、ジメチルベンズアントラセンとホルボールエステルを組み合わせた化学癌実験を行う。野性型および Bach1 ノックアウトマウスの皮膚に、これら薬剤を定法に従って塗布し、その後の癌過程を病理組織学的解析などにより比較する。

4. 研究成果

(1) Bach1-p53 相互作用とその制御の分子機構の解明

① His6-Bach1 および GST-p53 の組み換えタンパク質を大腸菌にて発現し、それぞれ精製した。両者を試験管内で混合したのちにグルタチオンビーズを用いて p53 を沈降させた。p53 とともに Bach1 が沈降している可能性をウェスタンブロット法で調べたが、Bach1 は検出されなかった。陽性対照の MafK と Bach1 は結合したことから、Bach1 と p53 の結合は直接ではなく、何らかの因子を介する可能性が考えられた。なお、Bach1 あるいは p53 の翻訳後修飾に依存する可能性もある。

② Bach1 複合体の質量分析を行い、仲介因子候補を探索し、その生化学的解析を現在進めているところである。うち一つの分子については、仲介能はないことをほぼ示すことができた。残りの分子の解析をさらに進める。

③ 内在性 Bach1 及び p53 の相互作用を免疫沈降法で検討しようと試みたが、うまくいか

なかった。そこで、Bach1 の細胞内分布が細胞老化とともに変化する可能性を検証した。まず、内在性 Bach1 を蛍光抗体染色法で検出できるモノクローナル抗体を作製した。これを用いて MEF 細胞中の Bach1 を検出することに成功した。陰性対照としては Bach1 MEF を用いることにより、間違いないことを示した。この抗体を用いて、老化前および老化した MEF 細胞を染色したところ、老化前は Bach1 は細胞質および核の両領域に分布するのに対して、老化細胞では核にはほとんど存在せず、主に細胞質に分布することを見いだした。細胞老化時の何らかのシグナルにตอบสนองして、Bach1 の核外排出 (EMBO J. 2004; JBC 2003) が誘導されることが予想される。現在、このシグナルを各種シグナル伝達系阻害剤等を用いて確定すべく実験を進めている。

一方、p19Arf-Bach1 の結合は p53 により阻害されることを見いだした。また、細胞より精製した Bach1 複合体をさらに解析した結果、Bach1-p19ARF を含む複合体と Bach1-p53 を含む複合体は互いに排他的であることを確認した。したがって、p19Arf が Bach1-p53 相互作用を抑制する可能性が考えられる。

(2) Bach1-p53 経路の下流で細胞老化を具現化する下流遺伝子の同定

研究方法に述べた戦略により、Bach1 で抑制され、細胞老化に関わる可能性がある遺伝子のリストを作成した。このリストには 16 遺伝子が含まれる。各遺伝子に対する siRNA を作製し、老化 MEF 細胞へ導入し、細胞増殖が回復するか、SA-βGal 活性が減少するか、DNA 合成量が増加するか、などを検討した。単独ノックダウン (KD) では、いずれも有意な再増殖は観察されなかった。しかし、4 種の遺伝子を同時に KD することにより、再増殖を観察した。一連の結果から、p53 は単独遺伝子の活性化を通じて細胞老化を誘導するのではなく、複数の遺伝子を活性化し、これら遺伝子がそれぞれ固有の経路、そして機能的に重複する経路の作用を変えることにより細胞老化を引き起こすことが考えられた。

細胞老化は p53 に加え、pRb が抑制因子によっても制御される。p53 経路と pRb 経路がクロストークする可能性を調べた。KD 実験の結果からすると、上記 4 種遺伝子のうちの少なくとも一つは、pRb 活性化に関わることが推察された。

(3) Bach1 が癌化因子として作用する可能性

まず、老化 Bach1 KO MEF を試験管内で経代を続けることにより、不死化するかどうかを調べた。その結果、野生型細胞と同様の経過で不死化することを確認した。その際、p19Arf や p53 といったがん抑制因子の不活性化

が生じていた。この不死化細胞に活性型がん遺伝子 Ras^{V12} を導入し、形質転換を比較した。すると、野生型 MEF は既報のごとくコロニー形成が観察されたが、Bach1 KO MEF ではほとんどコロニーの形成は認められなかった。ところが Bach1 KO MEF でも Bach1 遺伝子導入を行えばコロニー形成は回復したことから、Bach1 欠損の直接的結果と判断した。軟寒天培地中でのコロニー形成も起きなかったことから、Bach1 は Ras^{V12} による形質転換に必須であると結論した。

一つの可能性として、Ras^{V12} 下流のシグナル伝達に Bach1 が必須であることが考えられる。そこで、MAPK 等の主要なシグナル伝達キナーゼの活性状態を調べたところ、そのうちの一つの活性化がほぼ欠損することを見いだした。Bach1 標的遺伝子の中にこのシグナル伝達経路の修飾因子等があると考えられる。この点は、本研究を新分野へと展開するきっかけになる可能性があり、今後注視していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件、全て査読あり)

1. Ito, N., Watanabe-Matsui, M., Igarashi, K., and Murayama, K. Crystal structure of the Bach1 BTB domain and its regulation of homodimerization. *Genes Cells* 14, 1365-2443 (2009)
2. Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Katoh, Y., Ota, K., Nakanome, A., Muto, A., Omura, S., Ohta, T., Ito, A., Yoshida, M., Noda, T., and Igarashi, K. Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15, 1246-1254 (2008)
3. Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., Tokunaga, F., Iwai, K., and Igarashi, K. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6962-6971 (2007)
4. Hintze, K.J., Katoh, Y., Igarashi, K., and Theil, E.C. Bach1 repression of Ferritin and thioredoxin reductase1 is heme-sensitive in cells and in vitro, and coordinates expression with heme oxygenase1, beta -globin and NADP(H) quinone (oxido)reductase1. *J. Biol. Chem.* 282, 34365-34371 (2007)

[学会発表] (計 1 件)

1. Dohi, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., and Igarashi, K. Bach1-p53 complex mediates histone deacetylation at p53 target genes and sets threshold for cellular senescence. Asian Forum

of Chromosome and Chromatin Biology and
symposium on Nuclear Architecture and
Chromatin Dynamics, Hderabad, India (2008年
11月27日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し