

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07305

研究課題名(和文)p53による核内ヒストン動態制御機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of the p53-mediated intra-nuclear dynamics of H3K27me3

研究代表者

及川 司(Oikawa, Tsukasa)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：20457055

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)：がん抑制遺伝子産物p53は上皮性維持に関与するが、これはp53により転写誘導されるmicro RNAsが介在するとされてきた。一方、上皮性の頑強性に関わるp53の機能には、多様性が存在することも示唆されていた。本研究から、p53が存在しない状況では核内においてジアシルグリセロールに比べフォスファチジン酸が増加し、DNA複製期依存性ヒストンH3バリエーションH3.1が核内へ侵入する際、核膜近傍領域に蓄積し、そこで異所性にリジン27トリメチル(H3K27me3)化された。従って、p53は上皮性遺伝子発現調節領域においてH3K27me3化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

p53は上皮細胞の分化形質の維持において重要な働きをする。その機構として、p53が発現誘導するmicro RNAsを介し、上皮間葉転換に関連した遺伝子発現変化を引き起こす転写因子(ZEB1, SNAIL1など)の発現が抑制されることが重要であるとされてきた。しかし、p53喪失は上皮性を失わせる場合がある一方、そうでない場合もある。さらに、線維芽細胞などの間葉系細胞においてもp53は発現しているが、ZEB1等が常に発現し、上皮性は認められない。従って、細胞の分化形質維持におけるp53機能について我々の理解は十分とは言えず、本研究による成果はこの点で我々の理解を拡大するものである。

研究成果の概要(英文)：H3.1 is a DNA replication-dependent histone, predominantly synthesized and enters into the nucleus during S phase of the cell cycle. Although molecular chaperones that guide H3.1 to sites of the DNA replication are identified, processes related to the H3.1 nuclear entry remain largely unknown. We showed that p53 is involved therein. C-terminal domain nuclear envelope phosphatase 1 (CTDNEP1) was found within the H3.1 interactome. CTDNEP1 is known to convert phosphatidic acid (PA) to diacylglycerol (DAG) via lipin PA phosphatases, and we found that H3.1 exhibits a significantly higher affinity to PA than to DAG. Loss of p53 increased nuclear PA levels, in which CTDNEP1 levels were downregulated. Intriguingly, H3.1 molecules, not yet interacting with DNA, were accumulated in the vicinity of the nuclear envelope (NE) and K27-trimethylated perhaps by EZH2. These events were predominantly observed during the S phase.

研究分野：細胞生物学

キーワード：H3.1 p53 H3K27me3

1. 研究開始当初の背景

上皮-間葉転換(EMT)は上皮細胞に運動性と浸潤性をもたらし、発生や組織形成、傷の修復を含む様々な生理的過程だけでなく、がんの悪性化過程に重要な役割を果たすと考えられている。一方、これまでの細胞生物学的解析からは、EMTは容易には誘導されないことが知られている。例えば、TGF β 、HGF、IGFなどがEMTを誘導する細胞外因子として知られるが、それらに対する応答性や上皮性遺伝子群(CDHI:E-cadherin 遺伝子など)の発現低下、あるいは間葉系遺伝子群(N-cadherin 遺伝子など)の発現上昇の程度はセルラインごとに大きく異なる。またTP53はがん抑制遺伝子として知られているが、その産物であるp53の喪失は、上皮性を失わせる場合がある一方、そうでない場合もある(Mizuno et al., *PNAS*, 2010)。

p53は上皮細胞の分化形質の維持において重要な働きをすることが知られている(Biegging et al., *Nat Rev Cancer*, 2014)。その機構として、p53が発現誘導するmicro RNAsを介して、EMTに関連した遺伝子発現変化を引き起こす転写因子(ZEB1, SNAI1など)の発現が抑制されることが重要であるとされている(Kim et al., *J Exp Med*, 2011; Chang et al., *Nat Cell Biol*, 2011)。しかしこの機構は、p53喪失に伴いEMTしない上皮細胞もあること(上述)や、p53結合可能配列が上皮性遺伝子の発現制御領域(エンハンサー)に濃縮していること(ENCODE Project Consortium, *Nature*, 2012)を説明するものではなかった。

研究代表者らは、上皮形質をp53に依存し、p53喪失に伴いEMTする「不安定上皮細胞」の中には、上記領域にp53が結合し、ZEB1やSNAI1とは独立に上皮性遺伝子群のH3K27me3化を抑制するものがある一方、上皮形質をp53に依存しない「安定上皮細胞」では、この領域にp53が結合しないことを見出した(Oikawa et al., *Sci Rep*, 2018)。上記知見を含む申請者らのH28-H30年度基盤研究(C)による研究成果から、「p53結合を介したH3K27me3化抑制による上皮性維持」という、p53の新しい機能的側面が示唆されたが、このようなp53機能の土台となる詳しい分子メカニズムは不明なまま残された。

2. 研究の目的

上述の新しいp53機能は、細胞内外のストレスに応じ、下流の遺伝子発現等を通して機能するというp53のこれまでの概念の拡張を迫るものである。この機能に関して、一部の上皮性遺伝子発現制御領域においては、ゲノムDNAへのp53結合が重要であることを見出している(Oikawa et al., *Sci Rep*, 2018)。一方、高濃度酪酸などによるヒストン修飾の揺らぎがゲノムDNAへのp53結合性に影響することから(Oikawa et al., *Sci Rep*, 2018)、この新しいp53機能は、様々な細胞内代謝擾乱に抗して細胞形質を維持するfailsafe機構に関連している可能性がある。研究代表者らによる予備的知見から、p53は複製期のH3インタラクトームからEZH2を排除し、H3のK27me3化ダイナミクスを制御することが示唆された。本研究はこの知見に焦点を当て、その分子的基盤とともに、上皮性維持への寄与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

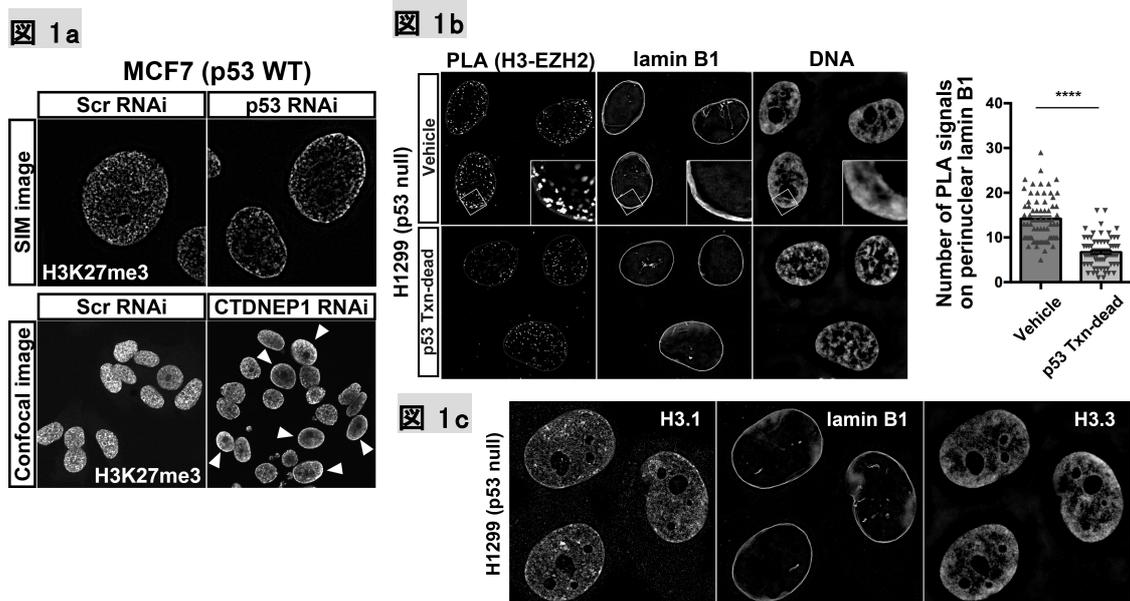
- (1) 細胞微細構造観察のために共焦点レーザー顕微鏡や超解像度顕微鏡を用いた。核膜に近接した領域における分子間相互作用の解析には、Proximity ligation assay (PLA)と超解像顕微鏡を組み合わせた解析を行った。
- (2) ヒストンH3と相互作用する分子を網羅的に同定するために、抗H3抗体を用いた免疫沈降と、その共沈物に対する質量分析解析を行った(癌研究所・植田幸嗣博士との共同研究)。
- (3) 細胞核脂質に含まれる脂質種を定量的な質量分析により解析した(東京医科歯科大学・佐々木雄彦博士との共同研究)。

4. 研究成果

p53が如何にしてH3K27me3化を制御するのかを解析することを目的とし、様々ながん細胞株及び正常細胞、p53^{-/-}マウス由来線維芽細胞(MEF)を用い、H3K27me3の核内局在を超解像顕微鏡(SIM)解析した。その結果、(1) p53存在時に核内にほぼ一様に分布しているH3K27me3が、p53欠失と共に核膜近傍領域に異所性に濃縮すること(図1a上)、(2) それを観察されるのはDNA

複製期であること、(3) Proximity ligation assay (PLA)から、異所性 H3K27me3 が見られる時、核膜近傍領域において H3 と EZH2 の分子近接が増強していること(図 1b)、(4) 野生型 p53 だけでなく、p53 の N 末端に存在する transactivation ドメイン内に変異を導入することにより、転写活性の大部分を失わせた p53 変異体(Txn-dead)によってもこの現象が弱められることを見出した(図 1b)。この核膜近傍 H3K27me3 の由来を確かめるべく、DNA 複製依存的に合成され核内に取込まれるヒストン H3 バリエント H3.1 と、DNA 複製非依存性ヒストン H3 バリエント H3.3 の特異抗体を用い、それらの局在を SIM 解析した。その結果、DNA 複製期に核膜近傍領域に蓄積する異所性 H3 は H3.1 であり(図 1c)、さらに PLA と SIM を組み合わせた解析から、この H3.1 はヌクレオソーム状態にない(単量体である)ことが示唆された。従って、p53 はその典型的な転写活性とは独立に、H3.1 の核内侵入を制御すると考えられた。

上記結果を受け、H3.1 の interactome 解析を行った(癌研究所・植田幸嗣博士との共同研究)。p53 欠失時に H3.1 interactome に多く含まれる分子として、PRC2 複合体の触媒サブユニットであり H3K27me3 化を担う EZH2 を、p53 存在時に H3.1 interactome に多く含まれる分子として CTDNEP1 を同定した。CTDNEP1 は核辺縁及び ER 様に局在し、核ラミナと共局在した。さらに、p53 Txn-dead 変異体の強制発現または p53 の発現抑制は、CTDNEP1 の mRNA 発現量を変えることなく、タンパク発現量をそれぞれ増加または減少させた。一方、CTDNEP1 の発現抑制は、核膜近傍領域における異所性 H3K27me3 を再現した(図 1a 下)。従って、CTDNEP1 は p53 の下流で H3.1 動態を制御することが示唆された。CTDNEP1 は *Xenopus* において BMP シグナルと神経系の発生に関与する因子として同定された(Satow et al., *Dev Cell*, 2006)。CTDNEP1 は、フォスファチジン酸 (PA)フォスファターゼとして PA からジアシルグリセロール (DAG)への変換を触媒する Lipin の活性化を担い、酵母、線虫、ヒトで核膜や小胞体 (ER)膜の生合成に寄与する (O'Hara et al., *J Biol Cell*, 2006; Bahmanyar et al., *Genes Dev*, 2014; Merta et al., *Dev Cell*, 2021)。申請者は、新たに示唆された p53 機能として、CTDNEP1-Lipin 経路を介して核脂質組成を調節すると仮説立て、核脂質の定量を行なった(東京医科歯科大学・佐々木雄彦博士との共同研究)。その結果、p53 または CTDNEP1 の欠失は、核内 PA/DAG 比を増加させた。一方、H3.1 の脂質結合能を検証した結果、H3.1 は DAG よりも PA に強く結合した。以上のことから、p53 は CTDNEP1 を介して核脂質組成を調節し、H3.1 の核内侵入に影響を与えると考えられた。ヒストンは細胞質で合成された後、それ自身やシャペロン分子が持つ自由エネルギーを駆動力として核内へ侵入し、DNA 複製部位へ導かれ、ヌクレオソーム形成に至ると考えられている(Das et al., *Trends Biochem Sci*, 2010; Liu et al., *Nucleic Acids Res*, 2012)。一方、研究代表者らによる知見は、この過程で p53 はヒストン H3.1 に「核膜通過の許可」を与えていることを示唆する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 及川 司
2. 発表標題 p53によるヒストンメチル化制御機構の解析
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及川 司
2. 発表標題 細胞核内ヒストンメチル化ダイナミクスの理解に向けた数理解析
3. 学会等名 第31回日本数理生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及川 司
2. 発表標題 p53によるヒストンメチル化調節機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Naomi Ohnishi, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Koji Ueda, and Hisataka Sabe
2. 発表標題 p53 counteracts EZH2 at the nuclear lamina to prevent H3K27 hypermethylation
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Junya Hasegawa, Naomi Ohnishi, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Koji Ueda and Hisataka Sabe
2. 発表標題 p53 は核脂質を調節しヒストンH3.1の核内侵入に影響を与える
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsukasa Oikawa, Junya Hasegawa, Naomi Ohnishi, Yasuhito Onodera, Ari Hashimoto, Junko Sasaki, Takehiko Sasaki, Koji Ueda and Hisataka Sabe
2. 発表標題 p53 modulates nuclear lipid composition and affects the nuclear entry of histone H3.1
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

research map https://researchmap.jp/read0135625

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------