

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07568

研究課題名(和文) がん悪性化の根幹であるマスター転写因子の発現誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms to drive oncogene expression

研究代表者

羽澤 勝治 (Hazawa, Masaharu)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：40622460

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)：本研究では、核構造と結びついたゲノム構造・機能環境に着目し、扁平上皮癌特異的マスター転写因子TP63の発現が誘導され維持されるメカニズムを解明することを目的とした。TP63の発現を誘導するスーパーエンハンサー(SE)をDNA-FISH法可視化し、核内空間における局在解析を実施した。TP63を含めたいくつかのSEが核膜孔近傍に局在化することが明らかになった。この局在化にはSE構成タンパク質と核膜孔構成分子の分子間相互作用が関わっていた。この分子間相互作用を生化学的に検出するための方法を考案し、MS解析を組み合わせることで、SE構成因子や核膜孔相互作用因子について完全プロファイリングを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞の重要な機能発現に関わるマスター転写因子の発現量は、核構造と結びついた分子基盤により保証されていることが明らかとなった。とりわけ、ゲノムの空間的な配置に関わる分子基盤の一面が明らかとなり、これら进行操作する低分子化合物開発がすすむことで、目的とする細胞分化誘導技術の創成やがん治療戦略につながることを期待される。また、近年注目される相分離現象に関与するタンパク質の網羅的な解析技術基盤の開発にも成功し、この技術は核内相分離によるゲノムトポロジー形成機序の解明に役立ち、生命科学の発展に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanisms by which the expression of the squamous cell carcinoma-specific master transcription factor TP63 is induced and maintained, focusing on the genomic structure and functional environment associated with nuclear architecture. The super-enhancers (SEs) that induce the expression of TP63 were visualized using DNA-FISH method, and their localization within the nuclear space was analyzed. It was revealed that several SEs, including TP63, localize near the nuclear pore. This localization was found to involve molecular interactions between SE component proteins and nuclear pore complex constituents. A method was devised to biochemically detect these molecular interactions, and by combining it with MS analysis, a comprehensive profiling of SE components and nuclear pore interaction factors was achieved.

研究分野：Cancer cell biology

キーワード：nucleus nuclear transport gene regulation genomic function phase separation super enhancer squamous cell carcinoma

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、研究者個人に帰属します。

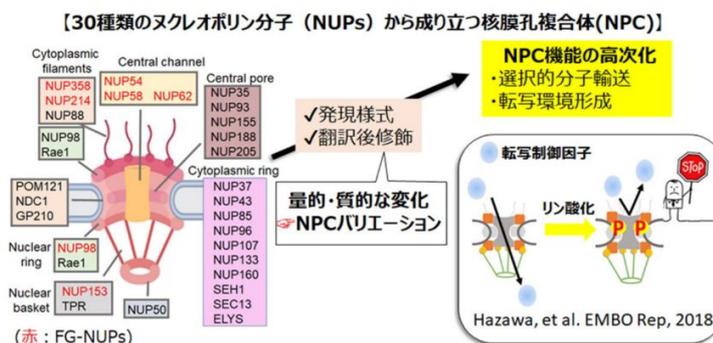
1. 研究開始当初の背景

転写因子は、DNA に結合し、遺伝子の発現を調節するタンパク質である。マスター転写因子は、細胞の性質を決定する遺伝子発現ネットワークを確立するコア転写因子であり、その影響は幹細胞の性質管理からがん細胞への形質転換・悪性化まで及ぶ。

申請者は、上皮組織に由来する扁平上皮癌 (Squamous Cell Carcinomas; SCCs) におけるマスター転写因子が制御する遺伝子ネットワークを解明してきた^(1, 2)。MTF の機能を阻害するとがん細胞は死滅するため、マスター転写因子と DNA の結合を阻害する化合物は有効ながん治療薬になると期待されてきたが、化合物創製の難しさもありそのようなアプローチでの成功例はない。よって、マスター転写因子を分子標的とした治療法を確立するには、新たな視点でマスター転写因子を遮断する必要がある。

私たちは、着眼点を『マスター転写因子が制御するものは何か：遺伝子発現ネットワーク』から『マスター転写因子を制御するメカニズム：マスター転写因子の発現誘導、マスター転写因子の核内移行』へと変更することで、マスター転写因子を制御する新たな因子、核膜孔複合体分子ヌクレオポリン (NUP) を同定した。30 種類存在する NUP 分子の中で、NUP62 は SCCs 特異的マスター転写因子 TP63 の核内移行を制御することを解明した⁽³⁾。この TP63 の新規核内移行メカニズムは、同誌 EMBO Reports の news & view に採用されるなど高く評価された。

一方、未だ解明されていない点の本課題の核心をなす学問的問い、「どのようにマスター転写因子の発現が誘導・維持されるのか？」である。最近、NUP の一つ NUP153 は特定ゲノム領域と認識し、遺伝子の発現環境を整備することが報告された⁽⁴⁾。申請者は、現行若手研究 B(H29-H31) の成果から NUP153 が SCCs 特異的マスター転写因子 p63 の発現を誘導・維持することを世界で初めて見出している。この NUP153 による p63 遺伝子領域を認識するメカニズムを解明し、本課題の核心をなす問いに答えたい。



2. 研究の目的

NUP153 が TP63 遺伝子領域を認識するメカニズムを明らかにし、細胞の運命を決定するマスター転写因子 TP63 の発現が誘導され、維持される機構を解明する。

3. 研究の方法

【3-1】TP63 遺伝子の発現を誘導するスーパーエンハンサー (SE) の核内局在解析

TP63 遺伝子領域の核内局在情報を得るために、TP63 遺伝子の転写を促進する SE に注目し、Se 構成因子である BRD4 タンパク質の集合体 (Puncta) を指標にした共焦点レーザー顕微鏡解析を行った。さらに、TP63 遺伝子に対して確立される SE の核内分布を調べるために、申請者が同定した TP63 の SE 領域に対するプローブを用いて 3D-DNA-FISH 解析を行った。

【3-2】TP63 mRNA 搬出効率の解析

TP63 に由来する mRNA の核内局在について RNA-FISH 法と免疫染色法を用いたアプローチで、共焦点顕微鏡による 3D 解析イメージングを行った。

【3-3】核膜孔 NUP153 と SE の相互作用解析

共焦点顕微鏡による解析から、NUP153 と SE 構成因子である BRD4 の共局在化は認められたが、免疫沈降法による解析では両者の相互作用が認められなかった。NUP153 の C 末領域には、フェニルアラニン-グリシンのリピート配列 (FG 領域) が存在し、NPC 構造上核内へ突出している。FG 領域は天然変性領域としてふるまうが、天然変性領域を介した分子間相互作用は、環境依存性が強いことが知られている。そこで、NUP153 と BRD4 の相互作用が、天然変性領域に依存している可能性を検討するために、これらを再構成できる液液相分離 (LLPS) 再構成 (Assist) 免疫沈降法 (LAIP 法) を開発した。

4. 研究成果

【4-1】TP63 遺伝子の発現を誘導するスーパーエンハンサー (SE) は核膜孔近傍に局在する

共焦点レーザー顕微鏡解析から、約 20% の SE は核周縁に存在し、これらの大部分が NUP153 と共局在することがわかった。3D-DNA-FISH 解析から、TP63 の SE は核周縁に局在するが、NUP153

の発現量を抑制すると核内へ移行することがわかった。これらより、NUP153 は、TP63 を含めたいくつかの SE を核膜孔近傍に局在化させる因子であることが示唆された。

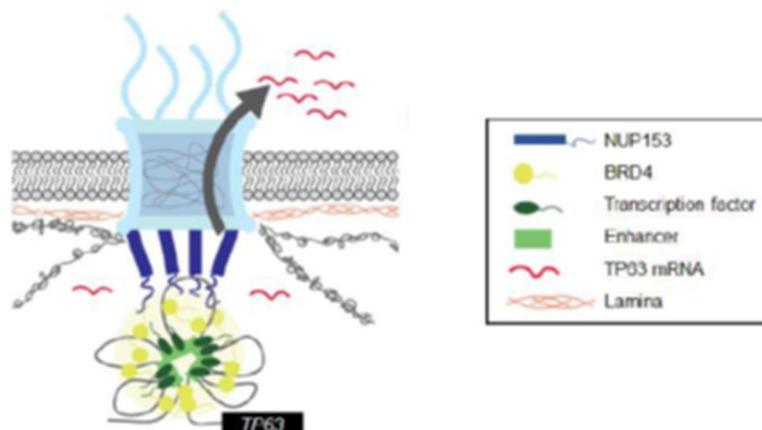
【4-2】TP63 遺伝子の核膜孔近傍への局在化は TP63mRNA 搬出効率を高める

TP63mRNA の核内局在について RNA-FISH 法と免疫染色法を用いたアプローチで、共焦点顕微鏡による 3D 解析イメージングを行った。3D-DNA-FISH 法の結果と一致し、NUP153 の発現量を抑制した細胞では、TP63 を含めた複数の SE が核内に移行した。このとき、細胞外に運搬される TP63 mRNA は有意に減少し、その結果 TP63 タンパク質の発現量も減少した。TP63 は SCC の悪性形質の根幹となる転写因子であるため、NUP153 を抑制した細胞の増殖能は有意に減少した。以上より、NUP153 は SE を核膜孔近傍に局在化し、効率的に遺伝子発現を誘導する機能があることが明らかになった。

【4-3】NUP53 と BRD4 は天然変性領域を介した分子間相互作用は TP63 遺伝子の核膜孔近傍局在化の分子基盤である

免疫沈降後のサンプルに 5%-PEG を添加することで、タンパク質による相分離をアシストする LAIP 法を開発した。この方法では、共焦点顕微鏡による NUP153 と BRD4 の共局在の結果と一致し、NUP153 と BRD4 の相互作用が認められた。重要なことに、FG 領域を欠損した NUP153 は BRD4 との相互作用が著しく減少した。これらは、FG 領域を介した分子間相互作用が、SE の核膜孔近傍配置に関与していることが示唆された。

以上より、核膜孔によるゲノム構造の空間的な局在制御は、遺伝子発現制御機序を理解するうえで重要な役割を果たすことが明らかになった（下図）。



○引用文献

- 1 Hazawa M, et al., *Oncogene* 36(16):2243-2254. 2017
- 2 Jiang YY, et al., *Gut* 66(8):1358-1368. 2016
- 3 Hazawa M, et al., *EMBO Rep* 19(1):73-88. 2018
- 4 Toda T, et al., *Cell Stem Cell* 21(5):618-634.e7. 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jiang YY, Jiang Y, Li CQ, Zhang Y, Dakle P, Kaur H, Deng JW, Lin RY, Han L, Xie JJ, Yan Y, Doan N, Zheng Y, Mayakonda A, Hazawa M, Xu L, Li Y, Aswad L, Jeitany M, Kanojia D, Guan XY, Said JW, Yang W, Fullwood MJ, Lin DC, Koeffler HP.	4. 巻 154
2. 論文標題 TP63, SOX2, and KLF5 Establish a Core Regulatory Circuitry That Controls Epigenetic and Transcription Patterns in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1311-1327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.06.050.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mohamed MS, Hazawa M, Kobayashi A, Guillaud L, Watanabe-Nakayama T, Nakayama M, Wang H, Kodera N, Oshima M, Ando T, Wong RW	4. 巻 256
2. 論文標題 Spatiotemporally tracking of nano-biofilaments inside the nuclear pore complex core.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.120198.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Lim K, Kodera N, Wang H, Mohamed MS, Hazawa M, Kobayashi A, Yoshida T, Hanayama R, Yano S, Ando T, Wong RW.	4. 巻 20
2. 論文標題 High-Speed AFM Reveals Molecular Dynamics of Human Influenza A Hemagglutinin and Its Interaction with Exosomes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nano Lett.	6. 最初と最後の頁 6320-6328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.0c01755.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato K, Ikliptikawati DK, Kobayashi A, Kondo H, Lim K, Hazawa M, Wong RW.	4. 巻 536
2. 論文標題 Overexpression of SARS-CoV-2 protein ORF6 dislocates RAE1 and NUP98 from the nuclear pore complex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 59-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.115.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masaharu Hazawa, Takeshi Suzuki, Toshinari Minamoto, Richard Wong
2. 発表標題 NUP153 drives oncogenic TP63 expression through liquid-liquid phase separation mediated gene-gating in squamous cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩嶋友紀、羽澤勝治、Qui Yujia, Dini Kurnia Ikliptikawati, 西出梧朗、小林亜紀子、Lim Kee Siang, Richard Wong
2. 発表標題 核膜孔複合体による核膜近傍での転写制御機構
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaharu Hazawa, Richard Wong
2. 発表標題 Gene-expression regulation by nuclear pore complex in squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------