

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09927

研究課題名(和文) 口腔癌の核内マーカーp63のブックマーキング機能

研究課題名(英文) Bookmarking function of p63, a nuclear marker of oral carcinomas

研究代表者

加藤 伊陽子 (Kato, Iyoko)

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：20333297

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)：TP63(p63)は悪性度の低い頭頸部癌で発現し、エピゲノム制御により分化関連遺伝子を活性化して癌細胞の分化能を維持し、浸潤癌への進行を抑制する。本研究ではp63のヒストン・アセチル化(ブックマーキング)機能に関して、p63-p300(ヒストン・アセチル基転移酵素)の複合体形成過程を解析した。p63とp300のドメインに異なるエピトープ・タグと核移行シグナルをつけて強制発現させ、免疫沈降で相互作用を調べた。その結果、p63のC末端領域がp300の活性中心近傍に親和性を示し、p63は多くの転写因子とは異なる部位に結合して酵素活性を調節する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究で、組織分化や癌の悪性転化で起こる遺伝子発現パターンの大きな変化はスーパーエンハンサー形成によるクロマチン・リモデリング、ヒストン・アセチル化等のエピゲノム制御によることが明らかになりつつある。本研究成果は頭頸部癌のエピゲノム制御の中心であるp63とp300の相互作用を解析し、これまで知られていた多数の一般的な転写制御因子とは異なる結合様式を検出した。

研究成果の概要(英文)：TP63 (p63) is expressed in lower grade head-and-neck carcinomas to block malignant progression by maintaining the epidermal/craniofacial differentiation potential through its epigenetic regulatory functions. To gain insights into histone acetylation at the p63-binding enhancers (book-marking function of p63), we focused on the p63-p300 (histone acetyltransferase) binding process. p63 and p300 segments, as well as their truncated forms, were expressed with different epitope-tags and the nuclear localization signal to analyze the interactions by immunoprecipitation. Results suggest the possibility that a region proximal to the active center of p300 and the extremely C-terminal domain of p63 are involved in the interaction. Unlike many other transcription regulatory factors, p63 could possibly control the acetyltransferase activity.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：p63 TP63 p300 histone acetylation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TP63(p63)遺伝子はがん抑制遺伝子TP53(p53)ファミリーの新しいメンバーとして1998年に発見されたが、ノックアウトマウスの解析や、ヒトでの家族性p63遺伝子変異の表現型の検出などの詳しい研究から、p63外胚葉性上皮(表皮、頭頸部、尿路上皮など)の組織幹細胞で発現し、細胞分化を誘導する重要な遺伝子であることが理解された。その後長い間p63がどのようにして分化を誘導するかについて明確な説明は得られていなかったが、研究提案時にはp63の主要タンパク質($\Delta Np63\alpha$)が分化関連遺伝子周辺に複数存在するエンハンサーに結合すると、その部位のヒストン・アセチル化(H3K27ac)が誘導され、転写が活性化されることが報告された。その活性は転写開始部位に印をつけるという意味で「ブックマーキング機能」と呼ばれていた。

p63は悪性度の低い(高分化型の)頭頸部癌、表皮基底細胞癌、尿路上皮癌などで高発現し、p63の発現が失われると浸潤・転移に進展する。すなわち、p63はヒストン・アセチル化を含むエピゲノム制御により細胞分化能を維持し癌の進行を抑制すると考えられた。研究開始当初、研究代表者らはp63タンパク質がp300ヒストン・アセチル基転移酵素と結合することを見出し、p63-p300の結合様式や活性調節がヒストン・アセチル化(ブックマーキング機能)を上手く説明できると考えた。

その後のエピゲノム解析の進展によって、P63タンパク質はクロマチン・リモデリングを起こさせ、多数の転写因子、調節因子、クロマチン制御因子を集合させて、スーパーエンハンサーを形成し、分化関連遺伝子発現を強く活性化することが明らかにされた。当然、スーパーエンハンサーのモデルにおいてもヒストン・アセチル化は必須であり、p63のブックマーキング機能の重要性は変わらない。

2. 研究の目的

上述のように、頭頸部扁平上皮癌の制御法を探る基盤研究としてp63のスーパーエンハンサーを形成する仕組みの解明は非常に重要である。多くの分子が関係しているが、一般的なクロマチン制御因子の集合に関する知識を除けば、p63と他の転写因子の間に生じるタンパク質相互作用はほとんど明らかにされていなかった。p63-p300の相互作用を明らかにする目的で、次の事項を具体的な目標として本研究を実施した。

(1) 相互作用に関わる各分子のドメインの検索 p300タンパク質は構造と機能から6以上の主要ドメインから成る。多くの転写因子がp300と結合するが、どのドメインに対して親和性があるかは、転写因子によってさまざまである。一方、p63は4または5のドメインからなり、各ドメインの機能は広く理解されているが、異なるタンパク質との結合はあまり知られていない。両タンパク質のドメイン間での相互作用を明らかにすることを目標とした。

(2) p63-p300結合による遺伝子発現調節の意義 p300は細胞の系譜を問わず、広く発現して様々な転写因子と結合し、機能を果たしている。P63が他のp300結合分子の活性にどのような影響を与える可能性があるのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) p300の各ドメインの発現。p300はいくつかのドメイン構造からなるが、結合部位を検索するために、大まかに(N末端)-TAZ1-KIX-Bromo-HAT-TAZ2-Q(IBiD)-(C末端)と考え、各ドメインに対して適切な制限酵素開裂配列を付けてプライマーを設計し、高精度DNA(PrimeStar Max DNA polymerase)で増幅したのち、pCMV6-AC-3xFポリメラーゼIag、pCMV6-Entry(Myc-Flag)ベクターなどにクローニングした。この際、p300はN末端部に核移行シグナル(NLS)を持つため、中央部、C末端部のドメインについては、翻訳フレームを維持するようにNLSの下流にあるBsaBIサイトに連結した。DNA配列を確認し、トランスフェクション後、産生されたタンパク質を抗Flag抗体で検出し、免疫沈降が可能なプラスミドを使用した。

(2) p63の発現。TP63遺伝子から産生される主要mRNA($\Delta Np63\alpha$)のクローンを入手し、pCMV6-AC-HAとpCMV6-AC-3HAに再クローニングした。トランスフェクション後、抗HA抗体で検出や免疫沈降を実施した。さらに、結合部位を検索するために各ドメインの欠失体を制限酵素や上記のように高精度PCR法で作成した。オリゴマー形成ドメイン近傍にあるNLSが保存されるように種々のドメイン欠失体を作成した。

(3) 培養細胞へのトランスフェクション、免疫沈降、ウエスタンブロット。上記(1)と(2)のプラスミドを組み合わせてHeLa細胞に導入48時間後、細胞溶解液として二分し、一方は抗Flag抗体コンジュゲート・ビーズ、他方は抗HA抗体コンジュゲート・ビーズで免疫沈降を行った。細胞溶解液、免疫沈降タンパク質(共沈)の検出には各エピトープ抗体やp63抗体によるウエスタンブロットを行った。

(4) ルシフェラーゼ・アッセイでの活性制御の検討。P300は普遍的に発現しており、ドメインの機能を直接調べることは不可能である。分子結合と生物活性を関連付けるために、レポーターアッセイを用いた。一方、 $\Delta Np63\alpha$ 自体はトランスアクチベーションドメインを持たず標的遺伝子の転写を活性化しないが、カテニンによる転写活性化系で隣接DNA領域にp63配列がある

と Δ Np63 α による共活性化を見ることができる。P300 結合配列が明らかにされているアデノウイルスの調節因子 E1A がこの共活性化に対して、競合・抑制するかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) p63 と p300 の相互作用ドメインの検索

p300 分子側の解析。 p300 の主要ドメインの発現はおおむね成功した。ただ、bromo ドメインについては範囲を変えて試みたが、プラスミドが大腸菌で維持されなかったため、除外した。HeLa 細胞において、HA 抗体で p63 を捕集する実験で結合が検出されたのは p300 の中央部にあるアミノ酸番号 1300-1618 を含む HAT (histone acetyltransferase) ドメインであった。N 末端のトランスアクチベーションドメイン TAZ1 への結合は非常に低く、C 末端のトランスアクチベーションドメイン TAZ2 や IRF3-binding domain (IBiD) を含む Q (グルタミン) リッチドメインとの結合は検出されなかった。

p63 分子側の解析。 p63 に関してはドメインを欠失させる方法により解析を行った。抗 p300 抗体で p300 沈殿させる実験で p63 が共沈したが、p63 の C 末端 ドメインを欠失させると結合能が消失した。HAT ドメインを抗 Flag 抗体で沈降する実験でも同様の結果が得られた。

HAT ドメイン内の解析。 HAT ドメインの活性中心には基質ヒストンが結合するが、隣接領域に多数の Lysine を持つ塩基性の領域が存在する。この領域 (1520-1581) を欠失させると p63 との結合が大幅に低下したが、その領域内の Lys トリプレット (K1568-K1569-K1570) に限定した欠失の影響は小さかった。

p63 ドメインの解析。 ドメインには SAM 配列と類似し多数の分子と相互作用可能なサブドメイン、および N 末端と相互作用して転写活性化能を抑制する TID (transcription inhibitory domain) サブドメインの存在が推測されている。TID サブドメイン (516-585) 欠失体を用いて解析した結果、HAT ドメインとの相互作用には TID が関係することが示唆された。

(2) p300 結合タンパク質 E1A と p63 の機能的競合の解析。 発現量やバランスを調整することにより カテニン依存性の Luc 遺伝子発現を p63 が共活性化する条件でレポータアッセイを行った。その結果、E1A は カテニンによる転写活性化を阻害したが、p63 による共活性化を抑制しなかった。この条件では p63 の作用が優位に表れ、E1A は p63 と競合しないと考えられた。上記の研究成果 (1) から、p63 はすでに報告されている E1A の p300 結合ドメインとは異なる部位に結合すると推測され、それを支持する結果であった。

(3) 要約

p63 と p300 の HAT ドメイン間での結合が検出された。HAT 活性中心に近接する塩基性領域がその相互作用に関与する可能性がある。

p63 ドメインの C 末端部にある TID サブドメインが HAT ドメインとの結合に関与する。

p63 は多くの転写制御因子とは異なる p300 のドメイン構造に結合し、ヒストン・アセチル化の基質結合を容易にし、ブックマーキング機能を果たすと推測できる。

(4) 考察

P300 は性質の異なる様々なドメインから成り、多くの転写因子と多様な相互作用を行うことが知られている。例として、p53 ファミリーの代表であるがん抑制因子 p53、は TAZ1、TAZ2 と結合、NF- κ B は TAZ1 に、CREB や BRCA は KIX に、また E2F や MyoD をはじめとする転写活性化因子は TAZ2 に結合する。それら転写活性化因子と異なり、本研究で解析した p63 の機能分子 Δ Np63 α は、N 末端にトランスアクチベーションドメインを持たない分子であることから、N 末端の TAZ1 や C 末端の TAZ2 に結合しない結果は納得できる。

活性中心近傍の塩基性領域は、基質が活性中心に結合するのを阻害しており、p300 の自己 (分子相互の) アセチル化によって活性中心に基質が結合できるというモデルが提案されている。もし p63 が作用して直接的にヒストン・アセチル化の酵素活性を強めるなら、本研究の当初の目的であるブックマーキング機能の解明に対する直接的な説明になる。

本研究では数種のタグを使用したが、例えば 3xFlag、3xHA を用いて結合解析を実施すると、発現したタンパク質の検出や沈殿は効率化されたが、逆にタンパク質相互間の結合を低下させた。特に Flagx3 は分子量を 3kDa 増加させ、正電荷を増加させるので、立体障害と電荷によって分子間相互作用が損なわれた可能性がある。また、Flag 抗体で沈降させる実験と HA 抗体で沈殿させる実験を平行して実施したが、両者の結果が一致しない例もあり、未解決の問題として残っている。さらに、p300 はいくつものドメインが立体的に関連して機能することから、ここで得られた結果は p300 分子全体を使った反応系で検証する必要がある。

p63 の C 末端に存在する TID サブドメインは TAp63 α タンパク質が自身の転写活性化能を抑制することで発見されたが、本研究によって Δ Np63 α タンパク質においては p300 との結合に關与する可能性が示唆された。ヒトの家族性 TID 配列変異による発生形態異常が知られており、この結合の異常が表皮幹細胞の分化誘導と關連する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Iyoko Katoh, Ryuichiro Hata, Shunichi Kurata
2. 発表標題 Impacts of TA-p63 specific exon knockout by genome editing: DeltaN-p63 silencing and loss of cell differentiation
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 Iyoko Katoh, Ryuichiro Hata, Shunichi Kurata
2. 発表標題 TP63(p63) knockout induced epithelial mesenchymal transition through DNA methylation control in squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	倉田 俊一 (Kurata Shun-ichi) (60140901)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	

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