

癌抑制遺伝子 p53 はヒストン修飾を制御する

論文名 "Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway" (p53-PADI4 経路はヒストン修飾とクロマチン構造を制御する)

谷川千津¹, Martha Espinosa¹, 鈴木亜香里², 益田健¹, 山本一彦^{2,3}, 土屋永寿⁴, 植田幸治², 醍醐弥太郎^{1,5}, 中村祐輔¹, 松田浩一¹

1 東京大学医科学研究所 ゲノムシーケンス解析分野/シーケンス技術開発分野 2 理化学研究所 ゲノム医科学研究センターとの共同研究によって DNA ダメージに応答して p53 がシトルリン化修飾酵素である PADI4 を発現誘導し、ヒストン H4 の3番目のアルギニン残基 (H4R3) をシトルリン化することを明らかにした。さらに核膜の裏打ち蛋白質である LaminC の C 末も DNA ダメージによってシトルリン化修飾を受け、その結果クロマチン構造が弛緩し DNA の切断が促進された。Padi4 ノックアウトマウスでは、放射線照射による H4R3 のシトルリン化が認められず、胸腺組織においてアポトーシス抵抗性を示した。また非小細胞肺癌症例においてシトルリン化 H4R3 は腫瘍サイズや p53 の染色像と負の相関を示し、さらに癌細胞株で高頻度に PADI4 の機能喪失型の変異が認められた。本研究によって p53-Padi4 経路によるヒストン修飾がアポトーシス誘導に重要な役割をはたすこと、また PADI4 は癌抑制遺伝子として機能することが示された。

概要 ヒストン修飾によるクロマチンの高次構造の変化が遺伝子発現調節や発生・分化・癌化において重要な役割を果たす事が知られているが、その制御機構についてはこれまで十分には明らかとなっていなかった。東京大学医科学研究所の谷川千津研究員（ゲノムシーケンス解析分野）と松田浩一准教授（シーケンス技術開発分野）らは、理化学研究所ゲノム医科学研究センターとの共同研究によって DNA ダメージに

応答して p53 がシトルリン化修飾酵素である PADI4 を発現誘導し、ヒストン H4 の3番目のアルギニン残基 (H4R3) をシトルリン化することを明らかにした。さらに核膜の裏打ち蛋白質である LaminC の C 末も DNA ダメージによってシトルリン化修飾を受け、その結果クロマチン構造が弛緩し DNA の切断が促進された。Padi4 ノックアウトマウスでは、放射線照射による H4R3 のシトルリン化が認められず、胸腺組織においてアポトーシス抵抗性を示した。また非小細胞肺癌症例においてシトルリン化 H4R3 は腫瘍サイズや p53 の染色像と負の相関を示し、さらに癌細胞株で高頻度に PADI4 の機能喪失型の変異が認められた。本研究によって p53-Padi4 経路によるヒストン修飾がアポトーシス誘導に重要な役割をはたすこと、また PADI4 は癌抑制遺伝子として機能することが示された。

p53 は様々なダメージによって活性化し、100 以上の下流遺伝子の転写誘導を介して細胞周期停止や老化、アポトーシスを引き起こす。特に修復不能な重篤な障害を細胞が受けた場合に、この細胞を我々の体から排除する仕組みは癌化を予防する上で必要不可欠な機構である。p53 は BAX や FAS, p53AIP1 等の下流遺伝子を誘導してアポトーシス反応を開始させるが、p53-PADI4 経路はアポトーシスの最終的な段階である DNA の切断や核の断片化を促進することでアポトーシス反応を完了させると考えられる。本研究成果によって、最も高頻度に変異が見られる癌抑制遺伝子である p53 がヒストン修飾を直接制御する事が初めて示された。メチル化やアセチル化等のヒストン修飾が細胞や組織特異的な遺伝子の発現制御に重要であり、これらは”ヒストンコード”と呼ばれている。H4R3 のシトルリン化は DNA ダメージによって誘導され DNA の切断・アポトーシスを促進する事から、"アポトーシス・コード"として機能すると考えられる。

研究の背景

修復不能な強い DNA 損傷を受けた細胞は発癌リスクが高いため、これらの細胞を速やかに駆逐する事が生体の恒常性が維持する上で重要となる。DNA ダメージなどのストレスに応答して癌抑制遺伝子 p53 はその N 末領域にリン酸化修飾を受け、質的・量的に活性化される。細胞のダメージが小さい場合は、p53 は p21^{WAF1} を誘導し細胞増殖を停止させ p53R2 の誘導により DNA 修復を促進し細胞が生存する様に働きかける。一方 DNA の障害が重篤である場合は、活性型 p53 は BAX, FAS, p53AIP1, p53RDL1 などのアポトーシス関連遺伝子を誘導し、アポトーシス反応を引き起こす事が知られている。クロマチンの凝集や DNA の切断、核の断片化などはアポトーシス細胞の特徴的な形態変化であるが、これらアポトーシスの最終過程における p53 の役割については明らかになっていなかった。

シトルリン化とは蛋白質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する翻訳後修飾で、側鎖の荷電状態を変えることによって蛋白質の構造に大きな影響を与える事が知られている。このシトルリン化反応は PADI ファミリーによって制御されており、ヒトには 5 種類存在する (PADI1-4,6)。例えばシトルリン化されたフィラグリンは非自己と認識され、免疫反応を惹起することによって自己免疫疾患の発症原因となるが、我々のグループは 2004 年に PADI4 の遺伝子多型が慢性関節リウマチの発症リスクと関連することを明らかにした。2009 年に我々は PADI4 が p53 によって発現誘導されることを報告したが、PADI4 によるシトルリン化修飾の発癌における意義はこれまで明らかとなっていなかった。今回我々は、p53-PADI4 経路によりヒストン H4 がシトルリン化されること、またこの経路の癌化における意義を明らかにした。

研究結果

ヒストン H4 と H3 は共に PADI4 のシトルリン化基質であるとこれまで報告されていたことから、DNA ダメージによってヒストンがシトルリン化を受けるかどうかについて検討した。その結果、ヒストン H4 の 3 番目のアルギニン残基 (H4R3) のみが DNA ダメージによって p53-PADI4 経路依存的にシトルリン化修飾を受ける事が明らかとなった (図 1)。さらにシトルリン化 H4R3 は断片化した核に局在し、アポトーシスのマーカーである TUNEL 染色陽性像と局在が一致した (図 1)。また *in vitro* の解析によってシトルリン化によりヌクレオソームの構造が緩み、DNA が切断されやすくなっていることが示された (図 2)。

さらなるシトルリン化のターゲットを探索した結果、核膜の裏打ち蛋白質である Lamin C の C 末端 (197 番目と 198 番目のアルギニン残基) がシトルリン化を受けることが明らかとなった。また Lamin C も H4R3 と同様、DNA ダメージを介して p53-PADI4 依存的にシトルリン化され、断片化した核周囲に局在した。更に生理的な PADI4 の機能を解析する目的で、PADI4 ノックアウトマウスを作成した。野生型のマウスではγ線照射によって胸腺組織に Padi4 が p53 依存的に誘導されると共に、シトルリン化 H4R3 の染色像が確認され

た。一方 Padi4 ノックアウトマウスでは、放射線照射後のシトルリン化 H4R3 の染色像が有意に減少していた (図 3)。さらにアポトーシスのマーカーである TUNEL 染色、cleaved caspase-3 陽性細胞も減少しており、Padi4 を介したヒストン修飾が p53 依存的なアポトーシス誘導の重要なメディエーターであることが示された。

また発癌における PADI4 の機能を検証するために、22 の乳癌、21 の大腸癌及び 37 の肺癌細胞株にて PADI4 遺伝子の変異を検索した所、6 細胞株で PADI4 の変異が同定され、内 3 細胞株ではもう一方のアレルが欠失していた (図 4)。さらに 6 つの変異の内、5 つで酵素活性が野生型に比べ著しく低下していた事から、PADI4 は癌組織において、高頻度に不活性化されている事が示された。また非小細胞肺癌 309 症例における検討の結果、シトルリン化 H4R3 陽性像と腫瘍サイズ及び p53 の染色像とは負の相関を示した ($P=0.0136, 0.0079$)。さらにシトルリン化 H4R3 陽性症例では陰性例に比べ 5 年生存率が長くなる傾向を示した ($58.1\% \text{ vs } 52.7\%, P=0.27$)。以上の結果より、PADI4 は癌抑制遺伝子として機能している可能性が示された。

今後の展開

今回の研究成果で、代表的な癌抑制遺伝子である p53 が PADI4 の発現誘導を介してヒストン修飾を制御すること、またこの修飾によって、アポトーシスの最終段階である DNA の切断や核の断片化が促進されることが示された。p53 は様々な下流遺伝子を誘導することによってアポトーシスカスケードの起点となるが、今回の成果によって、アポトーシスシグナルの開始から最終段階までを p53 が制御することにより、効率的に細胞死を誘導することが明らかとなった。今後、PADI4 やシトルリン化 H4R3 が予後因子となるだけでなく、この経路を活性化する薬剤を抗癌剤と併用することで、治療効果の増強が期待できる。

用語解説

p53 : ヒトの癌の約半数で変異が認められ、発癌の過程において最も重要な癌抑制遺伝子である。生まれつき p53 遺伝子の異常を持つ人・家系では若年発症の癌が多発し、このような疾患を Li-Fraumeni 症候群という。p53 は転写因子として働き、その下流遺伝子は報告されているものだけで 100 以上存在する。これらの下流遺伝子を介して、p53 は細胞の増殖を停止させたり、細胞死を誘導することによって癌化を防ぐ役割を担っている。

アポトーシス : 核の凝縮、断片化を特徴とするプログラムされた細胞死。FAS など介したレセプター経路と、BAX や PUMA 等を介したミトコンドリア経路があり、いずれの経路も p53 によって制御されている。最終的にカスパー 3 が活性化されることによってアポトーシスが誘導される。

シトルリン化：蛋白質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する修飾。アミノ酸の側鎖の正電荷が消失する結果、蛋白質の高次構造、活性にも大きな影響を与える。また修飾を受けた蛋白質が非自己と認識される事によって免疫反応が活性化される事が自己免疫疾患の発症に寄与すると考えられている。

問い合わせ先

松田浩一（マツダ コウイチ）

東京大学医科学研究所 シークエンス技術開発分野 准教授

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

tel 03-5449-5376

E-mail koichima@ims.u-tokyo.ac.jp

HP: <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/nakamura/matsuda/index.html>

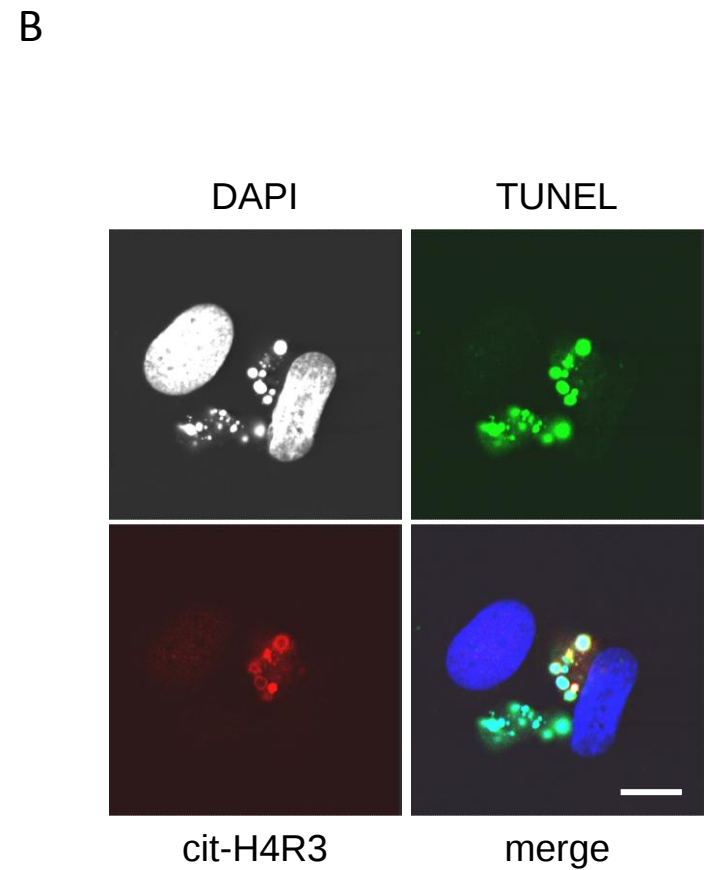
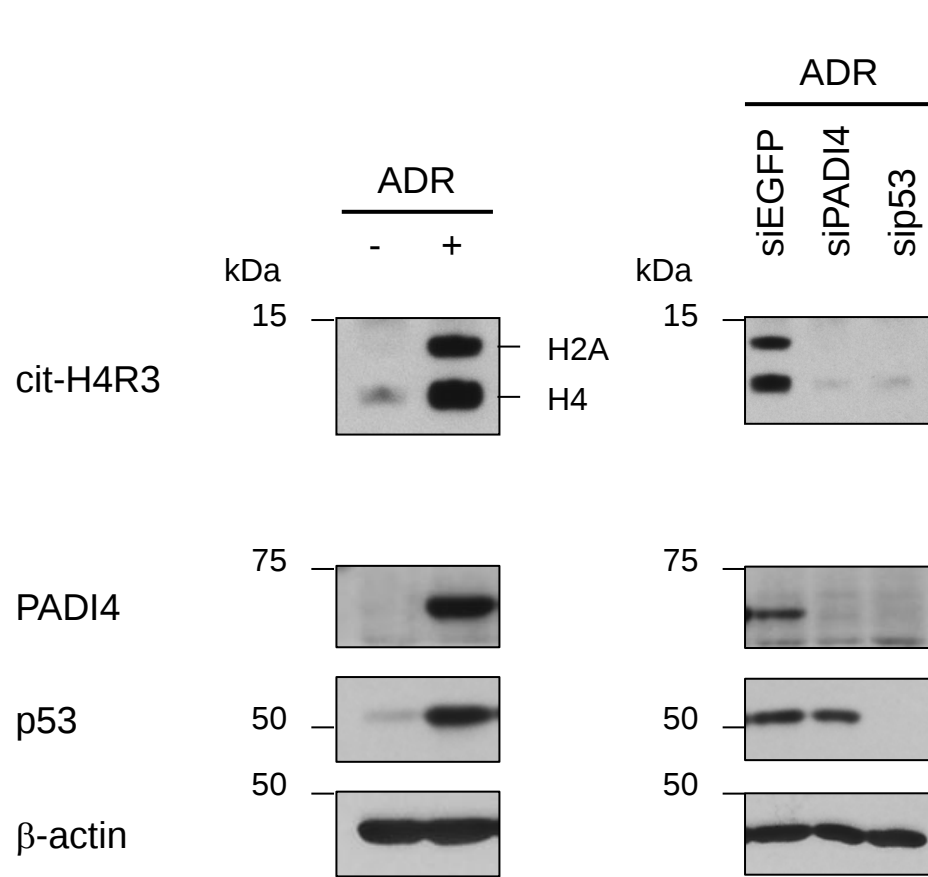
谷川千津（タニカワ チヅ）

東京大学医科学研究所 ゲノムシークエンス解析分野 博士研究員

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

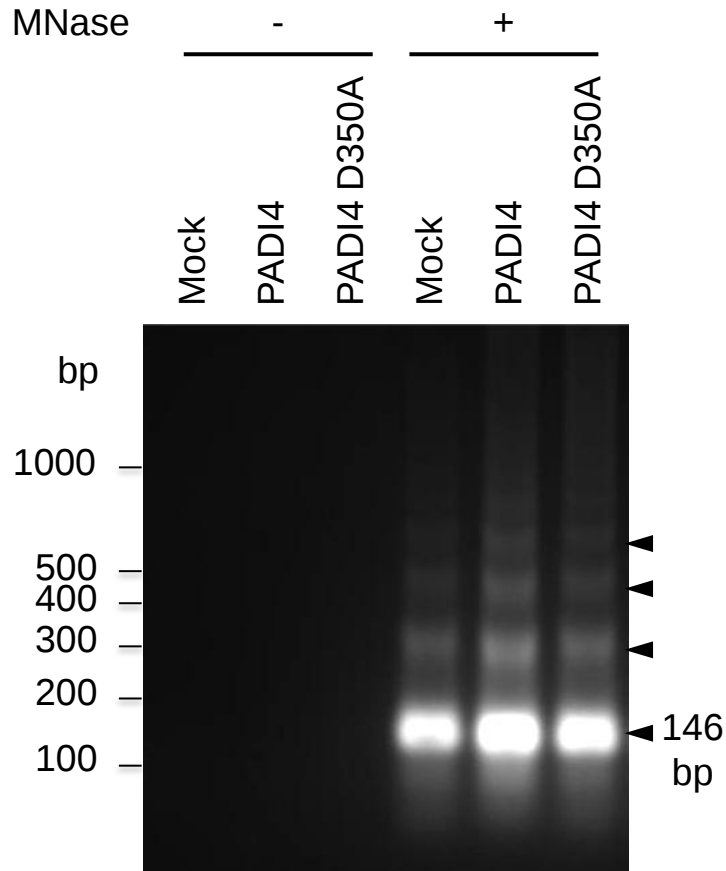
tel 03-5449-5376

E-mail tanikawa@ims.u-tokyo.ac.jp

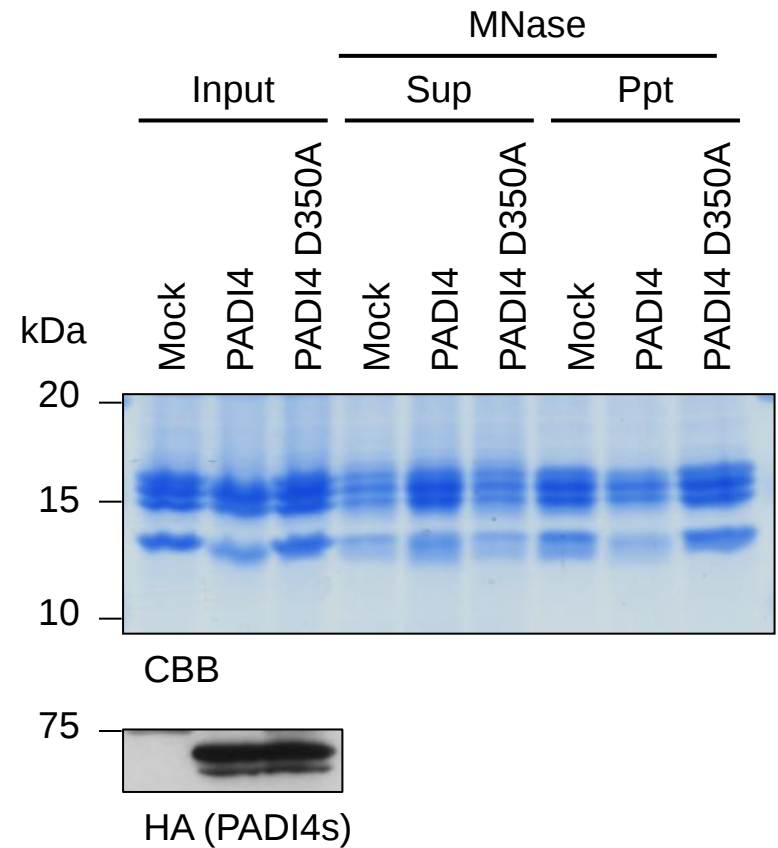


- (A) U-2 OS細胞をアドリマイシン(ADR)で処理するとヒストンH4の3番目のアルギニン残基のシトルリン化が増加した。p53およびPADI4を介したものであることを右のsiRNAを使用した系で検討した。H4とN末領域の相同性が高いヒストンH2Aもシトルリン化される可能性が示唆されている。
- (B) U-2 OS細胞をADR処理しアポトーシスを誘導した際に、断片化したDNAはTUNEL陽性となるが、シトルリン化ヒストンH4(cit-H4R3)も同じ場所に局在した。

A



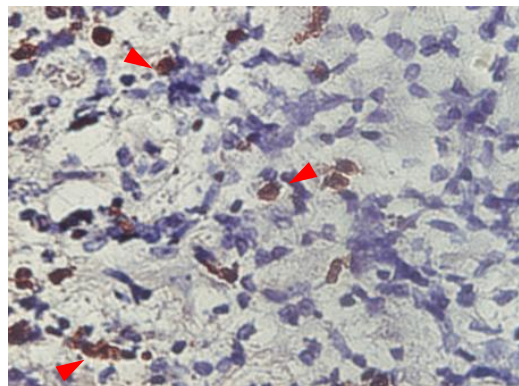
B



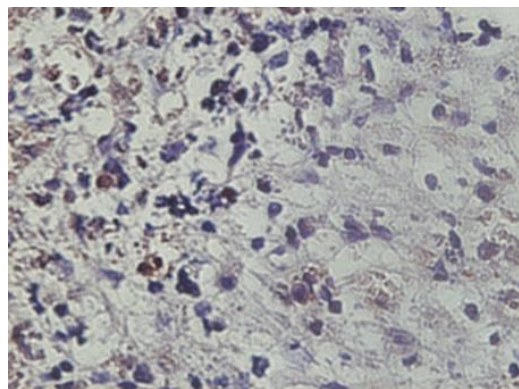
- (A) HEK293T細胞にPADI4およびコントロールとして空ベクター、活性のないPADI4の変異型をそれぞれ導入した。抽出した核をMicrococcal Nuclease (MNase)で処理することにより弛緩したクロマチンをヌクレオソーム単位(146bp)に切断したところ、PADI4導入細胞ではコントロールと比較しクロマチンが弛緩した状態になっていることが示唆された。
- (B) (A)と同様に核をMNaseで処理した後、核外へ出てくる切断されたヌクレオソームを回収し、そこに含まれるヒストンをCBB染色で検討した。(A)で得られた結果と同様、PADI4の導入によりクロマチンが弛緩し切断されやすくなっていることが示された。

A TUNEL

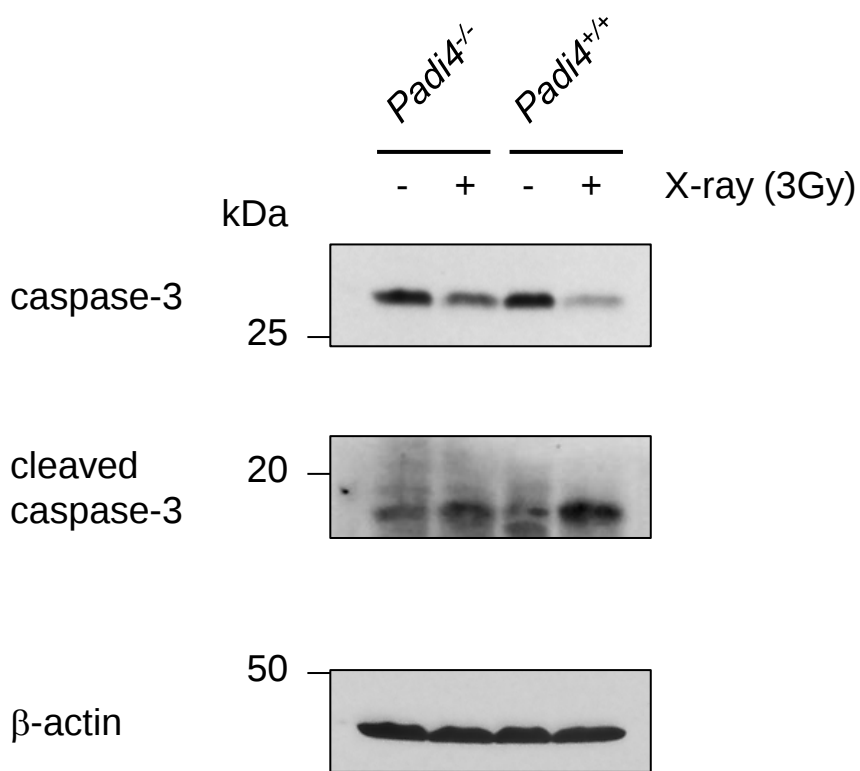
B



Padi4^{+/+}



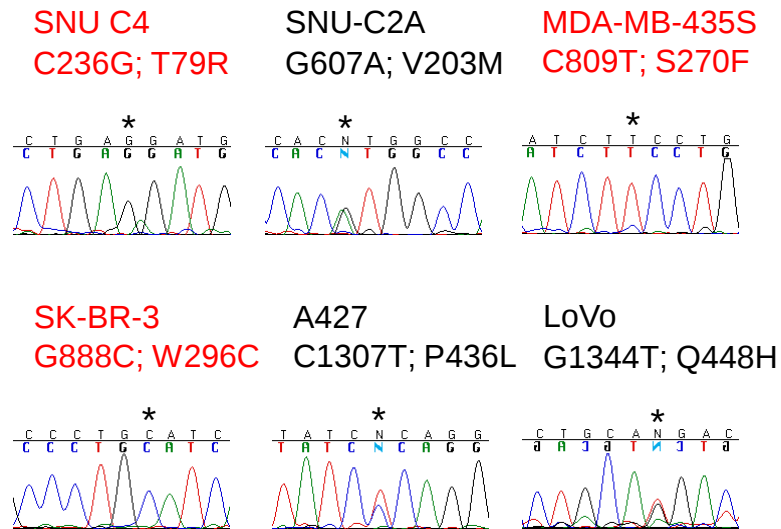
Padi4^{-/-}



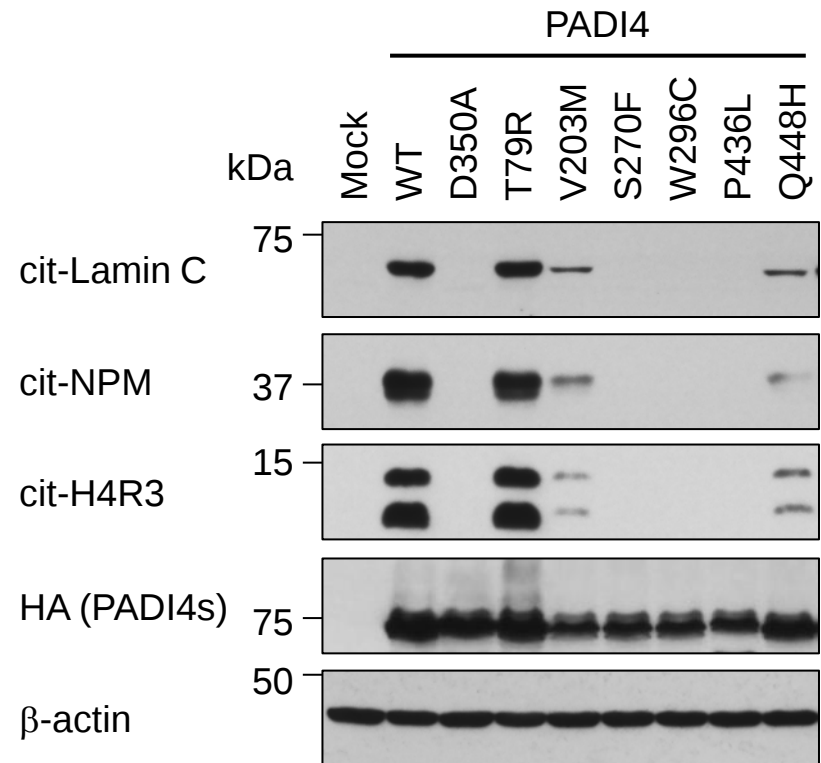
(A) *Padi4*^{+/+}マウスと*Padi4*^{-/-}マウスにガンマ線を照射し24時間後に胸腺を回収した。切片を用いてTUNEL染色を行い、陽性細胞を赤矢頭で示している。*Padi4*^{-/-}マウスではアポトーシス細胞が少ないことが示された。

(B) マウスをX線照射し48時間後に胸腺を回収した。Western blottingを施行して、Caspase-3と切断後のCaspase-3を検討したところ、*Padi4*^{-/-}マウス胸腺では野生型と比較しCaspase-3の切断が抑制されており、アポトーシス誘導能が低下していることが示された。

A



B



- (A) 乳癌細胞株、大腸癌細胞株、肺癌細胞株における遺伝子変異を検討した結果、6細胞株においてPADI4遺伝子内にアミノ酸置換を伴う変異を同定した。赤字の細胞株においてはLoss of heterozygosity (LOH)が示唆された。
- (B) 6つの変異をそれぞれ有する発現ベクターを作成し、野生型(WT)とシトルリン化活性の比較を行った。Lamin C、NPM、ヒストンH4のシトルリン化抗体を用いたWestern blottingの結果、6変異の内5つで活性の顕著な低下を認めた。D350Aは活性の低下が報告されているアミノ酸置換である。