

20030631

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

クロマチン転写制御を目的とした人工酵素の開発に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 鈴木 亨

平成16(2004)年 3月

目次

I. 総括研究報告

クロマチン転写制御を目的とした人工酵素の開発に関する研究 ----- 1

鈴木 亨

II 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 6

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 7

総括研究報告書

クロマチン転写制御を目的とした人工酵素の開発に関する研究

主任研究者 鈴木 亨 東京大学大学院 医学系研究科 特任教員

研究要旨

真核生物における転写制御を理解するためには、クロマチン構造を解除する機構を解明しない限り、転写調節の制御機構論を理解することはできない。クロマチンの制御には3種類の酵素（化学修飾酵素、ATP非依存ならびに依存のクロマチン構造変換因子）が重要な役割を果たすことが近年明らかになった。クロマチン構造変換酵素は、DNA結合型転写因子と相互作用することにより特定のプロモーターへ誘導されるという真核遺伝子転写の選択性、特異性を説明する新しいメカニズムを我々は提唱してきた。

本計画では、クロマチン構造変換酵素とDNA結合型転写因子の相互作用に着目し、協調性を生み出す酵素・基質両者の機能上重要な領域を特定し、その制御（増減）を可能にすることを目的としている。DNA結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用は細胞や個体分化において重要な働きがある事を示唆する知見が得られており、本研究は細胞分化制御の理解、さらに細胞分化誘導をはじめとした疾患（癌、臓器再生）の新しい治療法の開発につながると期待できる。最終的にはヒトに代表される真核細胞のクロマチンからの選択的な転写制御を可能にし、人工転写酵素（クロマチン構造変換酵素）を用いたピンポイントでのナノ治療（ナノミセル等の導入）の基盤となる情報及び技術を開発する。

A 研究目的

本研究の目的は、ヒトにおけるクロマチン状態からの遺伝子転写を制御することを可能にするための基盤情報の集積及び技術の開発であり、最終的にはナノ技術を応用したクロマチンからの転写の操作を可能にする新しい治療法を開発することである。

転写因子をターゲットとする治療戦略の開発は受容体や酵素に比し、遅れている状況にある。その理由は、従来の転写研究は裸のDNAの状態を想定した研究が中心に発展したためと考えられる。すなわち、ヒトでは遺伝子転写を解明するうえで、クロマチン状態での制御の理解が不可欠であるが、過去の研究はin vitroでの裸のDNAの状態を対象としてきたため、クロマチン状態からの転写を十分に説明できなかった。そのため、真核転写を対象とした治療戦略が発展しなかったと考えられる。しかしながら、遺伝子転写制御は病態をはじめ、あらゆる生命現象において中心的な役割を担っている。遺伝子転写制御を解明することは極めて重要な分野であり、クロマチンからの転

写制御の理解が真核転写を理解する鍵になると考えられる。本計画で真核転写の基盤を明らかにし、真核細胞のクロマチンをターゲットとする遺伝子発現転写調節の新しい治療戦略を可能にすることが目的である。クロマチン構造変換酵素とDNA結合型転写因子の相互作用の制御は、細胞分化や癌化と密接に関わっていることは既に知られており、幅広く生命現象の制御に関わっている。この相互作用の制御が可能になれば、細胞分化誘導をはじめとする疾患

（癌、臓器再生）の新しい治療法の開発につながると期待できる。具体的な例としては、ホメオボックス蛋白を標的とした臓器再生、E2Fによる細胞周期制御あるいはオンコジーン転写因子の不活化を通じた抗癌療法などが考えられる。特定組織、細胞への導入には人工的なナノ技術が理想と考えられる研究課題である。このように、クロマチンレベルでの遺伝子発現転写調節を通じた普遍的な治療法は、ナノマシンによるピンポイント・デリバリーとの併用により、癌から特定臓器疾患（心血管疾患等）に幅広く応用できる新しい治療法の開発につながると期待できる。

B 研究方法

遺伝子発現転写制御におけるクロマチンの役割及びその制御は約5年前から内外において注目されている分野である。DNAとともにクロマチンの基本コンポーネントを構成するヒストンの役割が主に研究されてきた。しかしながら、ヒストンは普遍的に存在するため、遺伝子特異性・選択性は説明できないといち早く注目した我々は、DNA結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用が真核生物での転写活性化の機構論の解明の糸口になると考え、転写反応の特異性を決定する上でもっとも重要なDNA結合型転写因子との協調的な相互作用を通じた制御機構に注目した。

具体的には、以下のような実験を行った。

1. クロマチン構造変換酵素とDNA結合方転写因子の相互作用の単離・同定

・相互作用因子単離同定法 Sp/KLF因子の6HIS (hexahistidine) エピトープを付加したリコンビナント蛋白質を調製し、細胞核抽出液からSp/KLF因子と相互作用する因子をHISエピトープに対するアフィニティ精製を用いて単離した。SDS-PAGEゲル電気泳動にて展開後、Coomassie Brilliant Blueで染色し、分離の良いバンドは切り出した。分離の悪いバンドについては、pH勾配で二次元電気泳動を行い、切り出したバンドは、酵素消化後質量分析器(MALDI TOF-MS)にて質量パターンを解析し、さらにフィンガープリント法でアミノ酸配列を推定した。

2. クロマチン構造変換酵素とDNA結合方転写因子の相互作用の機能的意義の解析

・相互作用の検討 リコンビナント蛋白質を用いた直接相互作用の解析には、GST pull-down法を用いた。具体的には、リコンビナント蛋白質にはGSTを付加し、GSTに対するアフィニティ・レジンを固定した。相互作用因子側(エピトープに対するウエスタン、His等)で検出した。細胞免疫沈降にはProtein-A/G sepharoseに抗体を固定し、細胞抽出液を添加後、相互作用因子側に対

する抗体でイムノフロッティングした。

・DNA結合能の検討 ゲルシフトアッセイを Suzuki et al 2000の方法にしたがって行った。³²PでラベルしたDNAプローブにリコンビナント蛋白質を反応後、アクリルアミドゲルにて電気泳動し、オートラジオグラフィにて結合の有無と程度を検出した。Sp1はSV40のGC配列、KLF5はSE1配列をプローブに用いた。

・転写活性の検討 レポーター・トランスフェクション・アッセイを行った。4x10⁶個の細胞を24穴プレートにまき、24時間後にリポフェクション法を用いてプラスミドを細胞に導入し、さらに48時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイのプロトコール通り(Promega)にルシフェラーゼ・レポーター活性を測定した。Sp1はSV40のearlyプロモーターを、KLF5にはSMembとPDGF-A鎖両遺伝子のプロモーターのレポーターコンストラクトを用いた。

・アセチル化能の検討 アセチル化反応を Suzuki et al 2000の方法にしたがって行った。具体的には、¹⁴Cでラベルした acetyl CoAをアセチル化酵素反応に加え、SDS-PAGE電気泳動後、オートラジオグラフィにてアセチル化の有無と程度を評価した。

・細胞内遺伝子発現調節の検討 フォルホル・エステルをはじめとする増殖刺激剤を添加した培養細胞株を経時的にサンプリングし、RT-PCR解析(PDGF-A鎖遺伝子)用にRNAを、ウエスタンブロット解析用に蛋白質をそれぞれ調製した。

・血管病態モデルでの検討 ラットでのバルーン障害モデルは、頸動脈をバルーンで拡張後、2週後に病理切片を作製し、免疫組織評価を行った。

・安定発現細胞株の作製並びに細胞増殖能の検討 安定発現細胞株は、G418カセットを含む発現ベクターを構築後、ネオマイシンに対する耐性を基に安定発現細胞を株化した。細胞増殖の検討は、細胞の経時的な細胞数の計測の他、BrdUの導入効率を測定した。

・点変異ならびにアデノウイルスのコンストラクトの作製 アセチル化残基の点変異はPCR法を用いて導入した。アデノウイルスはDNA-TPC法を用いて作製した。

3. クロマチン構造変換酵素の結晶構造解

析

・結晶作製、結晶構造解析 リコンビナントを大腸菌内で発現後、アフィニティ精製した。濃縮とサイズ分画を行い、高純度の標品を得た。hang ing drop法で結晶を作製し、X線ビームで回折像を得た。

(倫理面への配慮)

本計画は、本学の組み替え実験計画の承認を得ている。生化学、細胞生物学的実験は、当施設の実験ガイドラインを遵守する。また、動物実験については、動物愛護の観点から配慮する。

C 研究結果

クロマチン構造を解除する機構を解明しない限り、真核生物における転写調節の制御機構論を理解することはできない。クロマチンの制御には3種類の酵素(化学修飾酵素、ATP非依存ならびに依存のクロマチン構造変換因子)が重要な役割を果たすことが近年明らかになった。クロマチン構造変換因子は化学修飾酵素(アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化)及びATP依存(SWI/SNF等)とATP非依存(ヒストンシャペロンASF/CIA/RCAF、TAF-I等)のクロマチン構造変換因子の3群に大別されるが、これらの因子の酵素活性の機能ならびに構造は十分に明らかにされていない。しかしながら、酵素活性がクロマチン構造変換にとって必須であるため、活性制御がクロマチン構造変換の制御の鍵になると考えられる。そのため、酵素活性領の制御(増減)を通じたクロマチンへのアクセスの調節の視点からの研究を進めることは、真核転写を解明し、さらに調節を可能にするうえで重要と考えられる。実際に、世界でもっとも解析が進んでいるアセチル化酵素p300の酵素活性領域をマップするための点変異ミュータントは我々自身が世界に先駆けて作製した(Suzuki et al, 2000)。

クロマチン構造変換酵素は、DNA結合型転写因子と相互作用することにより特定のプロモーターへ誘導されるという真核遺伝子転写の選択性、特異性を説明する新しいメカニズムを我々は提唱してきた。今までに、DNA結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用及び制御の機能的な意義を明ら

かにしてきた。まず、アセチル化酵素とDNA結合蛋白の相互作用を解析した。過去に我々が単離同定したDNA結合蛋白Sp/KLFファミリー因子間(Suzuki et al, 1998)にアセチル化酵素との相互作用に特異性があり、また相互間の制御を明らかにした(Suzuki et al, 2000)。ファミリー因子間の特異的な制御におけるアセチル化酵素との相互作用の役割、またDNA結合蛋白によるアセチル化酵素活性の制御を明らかにした世界ではじめての例であった。

本年度は、同DNA結合蛋白Sp/KLFファミリー因子の相互作用因子を単離・同定し、ATP非依存のクロマチン構造変換因子との相互作用を明らかにした。その結果、世界ではじめてDNA結合蛋白ファミリー因子とATP非依存クロマチン構造変換因子間の相互作用とその特異性を示し、さらにその機能的な意義を示した(Suzuki et al, 2003, Miyamoto, Suzuki et al, 2003)。

具体的には、Sp/KLFのリコンビナント蛋白質を用いて細胞核抽出液から相互作用因子をアフィニティ精製後、バンドをTOF-MS法にて同定した。今回は、ATP非依存のクロマチン構造変換因子TAF-Iの単離に成功した。Sp/KLF因子とTAF-Iの相互作用を確認するために、リコンビナント蛋白質を用いたin vitroでのGST pull-downアッセイで直接結合を確認後、抗体を用いた免疫沈降を施行し、細胞内で実際に相互作用することを確認した。Sp1はHeLa細胞からアフィニティ精製の結果、TAF-Iの α と β の両アイソフォームと相互作用したが(Suzuki et al, 2003)、KLF5はTAF-I β /SETのみと相互作用した(Miyamoto, Suzuki et al, 2003)。また、TAF-Iはp53, MyoD, NFkappaB等他のDNA結合型転写因子と相互作用しなかった。さらに、TAF-Iと同様にATP非依存クロマチン構造変換因子(ヒストンシャペロン)であるASF/CIA/RCAFはSp/KLFと相互作用しなかったため、DNA結合型転写因子Sp/KLFとATP非依存クロマチン構造変換因子(ヒストンシャペロン)TAF-Iの相互作用に特異性を認めた。

次に、相互作用の機能的な意義を検討するために、Sp/KLF因子のDNA結合能ならびに転写活性化能への影響を検討した。ケルシフトアッセイ、レポーター・コトランスフェクションアッセイを施行した結果、TAF-IはSp/KLF因子(Sp1, KLF5)のDNA結合

活性及び転写活性化能を抑制し、リプレッサーとして作用することを明らかにした。具体的には、TAF-I α と β は両方ともSp1のDNA結合配列(SV40遺伝子配列)への結合を抑制し、Sp1によるSV40遺伝子プロモーターの転写活性化を阻害した。また、SETはKLF5のDNA結合配列(SMem β 遺伝子SE配列)への結合を抑制し、KLF5によるSMemb、PDGF-A鎖両遺伝子のプロモーターの活性化を阻害した。よって、TAF-IはSp/KLF因子の複数の活性を抑制した。

TAF-Iの細胞ないし個体のレベルでの機能を解析するために、細胞機能が明らかでないKLF5を中心に解析した。KLF5はprotooncogeneであり、心血管系を中心に細胞レベルでは細胞増殖を促進し、病態形成に関わる。組織レベルでは、心血管系臓器の病態刺激に対するリモテリング反応を制御する(Shindo et al, 2002)。一方、TAF-Iはtumor suppressor因子と考えられており、それに対してKLF5はprotooncogeneであることから、TAF-IはKLF5の細胞機能を負に制御する可能性があると考えた。KLF5を発現する細胞株を樹立した結果、細胞増殖が促進された。TAF-Iを同細胞にトランスフェクトした結果、細胞増殖が抑制された。また、病態においてもKLF5とTAF-Iは興味深くカップリングした発現パターンを認めた。KLF5とTAF-Iはともに正常血管ではほとんど発現を認めないが、ハルーン障害後の新生内膜で両者とも発現が誘導された。病態における発現を検討するために、モデルアゴニストとしてphorbol ester刺激を用いた細胞実験の結果、刺激後KLF5は発現が誘導されるのに対して、TAF-Iは発現が抑制された。これらの知見より、TAF-IはKLF5の抑制因子であり、刺激(phorbol ester)によりTAF-I自身の発現が抑制され、さらにKLF5の発現が亢進することにより、KLF5が活性化されるメカニズムが考えられた。現在、TAF-Iのアデノウイルス等の発現コンストラクトを用いて、遺伝子導入による治療効果を検討している。

DNA結合型転写因子Sp/KLFとクロマチン構造変換酵素TAF-Iの相互作用を制御し、物理化学的な基盤を明らかにする目的で、TAF-IとSp/KLFの結晶構造を解析中である。現時点では、KLF5とTAF-I両方の結晶が得られたが、TAF-Iは成長が良く、ヒームラインを当て、2.8Åオンクストロームの解像度のX線回

折像をすでに得た(Muto et al, in press)。最終的には、複合体解析を行い、相互作用の作用点をピンポイントで制御するコンパウンドをデザインすることを考えている。

D 考察

我々は、クロマチン構造変換酵素とDNA結合型転写因子が相互作用することにより特定のプロモーターへ誘導されるという真核遺伝子転写の選択性、特異性を説明する新しいメカニズムを提唱してきた。今までに、我々の仮説に基づき、DNA結合蛋白とクロマチン構造変換因子の相互作用及び制御の機能的な意義を明らかにしてきた。アセチル化酵素とDNA結合蛋白の相互作用及び、相互間の制御さらにDNA結合蛋白によるアセチル化酵素活性の制御を世界ではじめて明らかにした研究実績に立脚し、今回新たにATP非依存クロマチン構造変換因子との相互作用を明らかにした。

E 結論

本研究の基礎となるクロマチン構造変換酵素とDNA結合型転写因子の協調的な相互作用のメカニズムは我々が世界に先駆けて見出したことであり(Suzuki et al, 2000)、このメカニズムの応用である本計画は極めて独創性が高く、また内外において他に研究されていない状況にある。

本計画の特徴のひとつは、クロマチン構造変換因子の酵素活性に着目した点にある。すなわち、クロマチン構造変換因子は化学修飾酵素(アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化)及びATP依存(SWI/SNF等)とATP非依存(ヒストンシャペロンASF/CIA/RCAF、TAF-I等)のクロマチン構造変換因子の3群に大別されるが、これらの因子の酵素活性の機能ならびに構造は十分に明らかにされていない。しかしながら、酵素活性がクロマチン構造変換にとって必須であるため、活性制御がクロマチン構造変換の制御の鍵になると考えられる。そのため、酵素活性の制御(増減)を通じたクロマチンへのアクセスの調節の視点からの研究を進めることは、真核転写を解明し、さらに調節を可能にするうえで重要と考えられる。

F 研究発表

1 論文発表

Suzuki T, Horikoshi M, Nagai R
Regulation of the Sp/KLF-family of
transcription factors focus on post-
transcriptional modification and
protein-protein interaction in the
context of chromatin *Gene Ther Mol
Biol* 2003, 7, 91-97

Suzuki T, Muto S, Miyamoto S, Aizawa K,
Horikoshi M, Nagai R Functional
interaction of the DNA-binding
transcription factor Sp1 through its
DNA-binding domain with the histone
chaperone TAF-I *J Biol Chem*
2003, 278, 28758-28764

Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K,
Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y,
Adachi N, Horikoshi M, Nagai R
Positive and negative regulation of the
cardiovascular transcription factor
KLF5 by p300 and the oncogenic
regulator SET through interaction and
acetylation on the DNA-binding domain
Mol Cell Biol 2003, 23, 8528-41

Muto S, Senda M, Adachi N, Suzuki
T, Nagai R, Horikoshi M
Purification, crystallization and
preliminary X-ray diffraction
analysis of human oncoprotein
SET/TAF-1 β *Acta
Crystallographica*, in press

2 学会発表

・Zinc Signals 4th Annual International
Conference (平成15年5月2日-同9
日、イギリス領ケイマン諸島)

Suzuki T, Nagai R Functional Roles
of SP/KLF-family Zinc-finger
Transcription Factors Focus On Role of
KLF5/BTEB2 in the Cardiovascular System

・アメリカ心臓病学会 American Heart
Association (平成15年11月9日-同1
2日、米国オーランド)

Shindo T, Manabe I, Suzuki T, Aizawa K,
Miyamoto S, Nagai R Kruppel-Like
Zinc-Finger Transcription Factor
KLF5/BTEB2 is an Essential Regulator of
Cardiovascular Remodeling

・日本分子生物学会 (平成15年12月1
0日-同13日、神戸)

武藤真祐、梅原崇、葛原隆、鈴木亨、永
井良三、堀越正美。ヒストンシャペロンに
よる抗サイレンシング反応の分子機構

G 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)。

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki T, Horikoshi M, Nagai R	Regulation of the Sp/KLF-family of transcription factors focus on post-transcriptional modification and protein-protein interaction in the context of chromatin	<i>Gene Ther Mol Biol</i>	7	91-97	2003
Suzuki T, Muto S, Miyamoto S, Aizawa K, Horikoshi M, Nagai R	Functional interaction of the DNA-binding transcription factor Sp1 through its DNA-binding domain with the histone chaperone TAF-I	<i>J Biol Chem</i>	278	28758-28764	2003
Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, Aizawa K, Kimura A, Mizuno Y, Nagino T, Imai Y, Adachi N, Horikoshi M, Nagai R	Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain	<i>Mol Cell Biol</i>	23	8528-8541	2003

20030631

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。