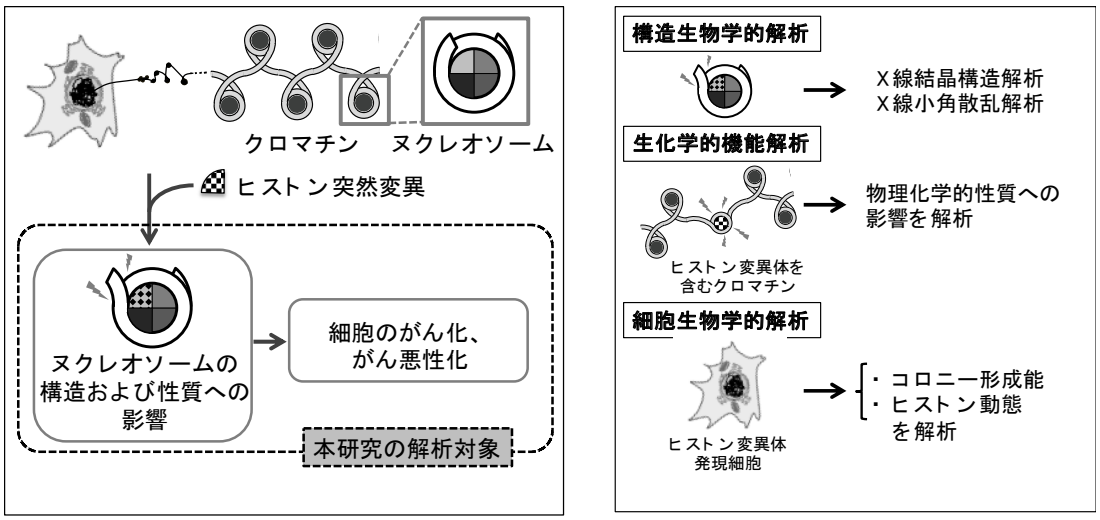
39　ヒストンタンパク質の突然変異による発がん機構の解明	胡桃坂　仁志

【目的】がんは我が国が克服するべき疾病の 1 つであり、日本人の死因のおよそ 3 割を占める。がんに対する効果的な治療法の開発、更にはその予防を実現して、この疾病を克服するためには、細胞がん化やがん抑制機構の分子基盤の理解が必須である。近年、悪性脳腫瘍や骨腫瘍に代表される多様ながん細胞において、染色体構造の基盤因子であるコアヒストンタンパク質群の変異が同定され、これらの変異により細胞のがん化・悪性化が引き起こされることが示された（Schwartzentruber *et al. Nature* 2012; Behjati *et al. Nat. Genet.* 2013）。しかし、これらのヒストンの変異による細胞がん化のメカニズムは未だ不明瞭である。本研究の目的は、がん細胞でみられる変異型ヒストンの機能解析を行い、ヒストンの変異による未解明の発がん機構を明らかにすることである。

【方法】本研究では、がん細胞でみられるヒストンの変異が、ヌクレオソームの構造および細胞での染色体機能に与える影響を解析した。まず、研究対象のヒストン変異の探索を行った。ヒストンバリアント H3.3 の 6 種類の変異（K27M、G34R/V、G34W/L、K36M）は、それぞれ膠芽腫（H3.3 K27M、G34R/V）、骨巨細胞腫（H3.3 G34W/L）、および軟骨芽細胞腫（H3.3 K36M）の原因変異（ドライバー変異）として、すでに報告されていた。これらの変異に加え、がんゲノムデータベースを用いて、新たなヒストン変異を探索した。次に、これらの変異を有するヌクレオソームを試験管内で再構成し、これらのヌクレオソームの立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすると共に、これらのヌクレオソームの性質を生化学的解析によって明らかにした。さらに、これらのヒストンを細胞内で強制発現し、細胞に与える影響を細胞生物学的解析によって調べた。

【結果】がんゲノムデータベースを用いて、新たなヒストン変異を探索した。その結果、多様ながん細胞で共通して存在するヒストンの変異（H2B E76K、H3.1 E97K、H4 R92T）を、3 つの主要型に関して同定した。これらの変異に加え、これまで報告された膠芽腫、骨巨細胞腫、および軟骨芽細胞腫におけるドライバー変異（H3.3 K27M、G34R、G34W/L、K36M）を含むヌクレオソームをそれぞれ試験管内で再構成し、すべてのヌクレオソームについて、X 線結晶構造解析もしくは X 線小角散乱によってその構造的性質を明らかにした。その結果、H2B E76K、H3.1 E97K のヒストン変異については、ヌクレオソームの構造および、安定性が通常のヌクレオソームから、大きく変化することが明らかになった。そこで、これらの変異を有するヒストンを細胞内で発現させ、その形質の変化を解析した。本研究の結果から、このような変異を有するヒストンが、細胞内で不安定なヌクレオソームを形成し、がん細胞の悪性化に関与することが示唆された。本研究によって得られた知見は、ヒストン変異を介した発がんメカニズムを理解するための重要な基盤情報となる。

本研究の目的と研究方法



39. ヒストンタンパク質の突然変異による発がん機構の解明

胡桃坂　仁志

*早稲田大学 理工学術院 大学院先進理工学研究科 電気・情報生命専攻 構造生物学研究室

Key words：ヒストン，ヌクレオソーム，クロマチン，がん関連変異，構造生物学

緒　言

がんは、日本人の死因のおよそ 3 割を占める重大な疾病であり、我が国が克服するべき疾病の 1 つである。がんの効果的な治療法の開発や有効な予防法の確立は、この疾病を克服するための重要である。そのためには、細胞がん化やがん抑制機構の分子基盤の理解が急務である。細胞のがん化・悪性化において、染色体の機能不全、染色体の断裂や転座といった染色体異常などが、主要な要因の一つと考えられている。近年、染色体構造の基盤因子であるコアヒストンタンパク質群の変異が、悪性脳腫瘍や骨腫瘍に代表される多様ながん細胞において次々に同定された。そして、これらのヒストンに起こった変異が、細胞のがん化・悪性化の要因となることが示された［1〜3］。しかし、これらのヒストンの変異が、どのように細胞のがん化に関わっているのか、そのメカニズムに関しては未だ不明瞭である。本研究の目的は、がん細胞で見出された変異型ヒストンの機能解析を、生化学、細胞生物学、構造生物学などの手法によって多面的に行うことで、いまだ未解明のヒストンの変異による発がん機構を明らかにすることである。

真核生物では、ゲノム DNA が高次に折りたたまれて、クロマチンを形成することで細胞核に収納されている。クロマチンでは、その主タンパク質成分である 4 種類のヒストン（H2A、H2B、H3 および H4）が、各 2 分子ずつ会合することでヒストン 8 量体を形成し、その周りに DNA が 2 回転弱巻き付いた、ヌクレオソームという構造体が基本単位となっている［4］。ヌクレオソーム中のヒストン翻訳後修飾や、主要型ヒストンがヒストンバリアントに置き換わることにより、クロマチン中では多様なヌクレオソームが形成されている。これらの多様なヌクレオソームから生み出されるクロマチン構造の多様性こそが、転写、DNA 複製、DNA 修復といった染色体機能の精密な制御を可能にしていることが明らかになってきた［5］。これまで我々は、精製タンパク質群を用いた試験管内でのヌクレオソーム再構成系を独自に開発し発展させてきた。このような技術を用いて、多様なヌクレオソームを高度に精製された均一な状態で調製することに成功し、X 線結晶構造解析などによりヒストンバリアントや翻訳後修飾を含む多種多様なヌクレオソーム構造を決定してきた。そして、それらの多様なヌクレオソームの機能の解明研究を推進してきた。その過程で、悪性度の高いがん細胞にみられた、染色体セントロメア領域特異的なヒストン H3 バリアントである CENP-A と転写活性化領域に多く存在する H3.3 を 1 分子ずつ含むハイブリッド型のヌクレオソームが、CENP-A ヌクレオソームと H3.3 ヌクレオソームの構造的特徴を併せ持つ特異な性質を有することを発見した。そして、この特殊なヌクレオソームの特性とがんとの関連性について報告した［6，7］。これらの背景に基づいて、がん細胞でみられるさまざまなヒストン変異体が、ヌクレオソームの構造とその物理化学的性質に影響を及ぼすことで、発がんやがんの悪性化に繋がる染色体の機能不全または染色体異常を引き起こすと着想し、本研究の提案に至った。

方法および結果

1. がんゲノムデータベースを用いた、がん関連ヒストン変異の探索

ヒストンバリアント H3.3 の 6 種類の変異（K27M、G34R/V G34W/L、K36M）は、それぞれ膠芽腫（H3.3 K27M、G34R/V）、骨巨細胞腫（H3.3 G34W/L）、および軟骨芽細胞腫（H3.3 K36M）の原因変異（ドライバー変異）として、すでに報告されていた。一方で、主要型のヒストン遺伝子の変異に関しても、がん細胞に高頻度に見られることが、近年相次いで報告されている［8，9］。これらの報告においては、ヒストン遺伝子の変異部位と細胞のがん化との関連に

*現在の所属：東京大学 定量生命科学研究所 先端定量生命科学研究部門 クロマチン構造機能研究分野

ついては、詳細な解析がなされていなかった。そこで我々は、まず、主要型のヒストン遺伝子において、がんに関連するヒストン変異情報を収集するために、がんゲノムデータベース（cBioPortal for Cancer Genomics ; http://www.cbioportal.org）を用いて、新たに同定されているヒストン変異群を探索した。ヒトのヒストン（H2A、H2B、H3 および H4）は、複数のヒストン遺伝子が重複してコードされている。それらのうち、通常型のヒストン遺伝子として分類されている 17 コピーの H2A 遺伝子、17 コピーの H2B 遺伝子、10 コピーの H3.1 遺伝子、14 コピーの H4 遺伝子について、がん患者における体細胞変異の情報を収集し、集計した（図 1）。体細胞変異は、がん患者由来の正常細胞とがん細胞の DNA 配列を比較することで同定した変異であり、細胞がん化の過程で患者が後天的に獲得した変異であることを意味する。本集計解析の結果、いくつかの種類の特定のアミノ酸残基の変異が、がん患者に高頻度に見られることが明らかになった。特にこれらの中で、H2B の 76 番目のリジン残基、 H3.1 の 97 番目のグルタミン酸残基、H4 の 92 番目のアルギニン残基については、allele frequency の値が大きく、細胞がん化の比較的初期の段階でこれらのヒストン変異が導入されていることが示唆された。H2B の 76 番目のグルタミン酸と H3.1 の 97 番目のグルタミン酸については、リジンへの置換、H4 の 92 番目のアルギニン残基についてはスレオニンへの置換となるようなミスセンス変異が最も高頻度にみられたため、これらの変異について、以降の解析に用いることとした。

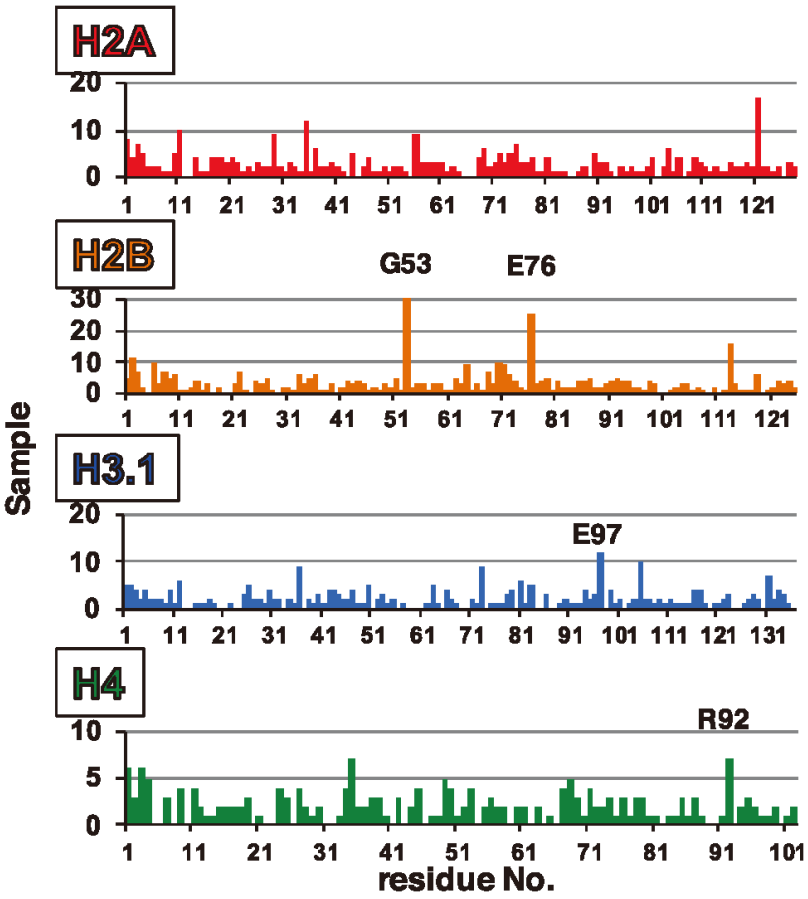


図 1. がんゲノムデータベースより得られたヒストンの点変異

2. がん関連ヒストン変異を含むヌクレオソームの試験管内再構成と精製

次に、ヒストンの変異がヌクレオソームの構造および性質に及ぼす影響を解析するため、ヒストンの変異を含むヌクレオソームを高純度に調製することを試みた。真核生物の細胞は多種多様な種類のヒストンバリアントやヒストン翻訳後修飾を有するため、ヒト培養細胞などから、ヒストンの変異を含むヌクレオソームを直接高純度に調製することは、ほぼ不可能である。そこで、上記のヒストンバリアント H3.3 の点変異（K27M、G34R、G34W、K36M）と、がんに関連すると考えられた主要型ヒストンにみられる 3 種類の点変異（H2B E76K、H3.1 E97K、H4 R92T）のそれぞれ

について、ヒトのヒストンを大腸菌発現系を用いてリコンビナントタンパク質として発現させ、精製した。これらの変異型ヒストンと野生型のヒストン、DNA を用いて、がん関連ヒストン変異を含むヌクレオソームを試験管内で再構成した。試験管内で再構成したヌクレオソームは、分取用電気泳動装置（Prep cell）内で非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことで分画し、高純度にヌクレオソームが含まれる画分を濃縮し、下記の構造解析および生化学的解析に使用した。

3. がん関連ヒストン変異を含むヌクレオソームの構造生物学的解析

試験管内で再構成した上記の、がん関連ヒストン変異を含むヌクレオソームの立体構造を、野生型のヌクレオソームと比較するために、これらのヌクレオソームのX線結晶構造解析を行った。そのために、上記の精製したヌクレオソームを用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散平衡法により、単結晶を作製し、H3E97K ヌクレオソーム以外に関しては、図2、3に示すような良好な単結晶が得られた。これらの単結晶を、SPring-8 もしくは高エネルギー加速研究機構のフォトンファクトリーといった大型放射光施設のビームラインを利用してX線回折実験を行った。まず、正常型の H3.3 および5種類の点変異（K27M、G34R、G34W、K36M）を含むヌクレオソームの構造をX線結晶構造解析によって 2〜3 Å の分解能で明らかにし、それらの構造を比較した。しかし、これらのヌクレオソームと正常型のヌクレオソームの構造のに有意な立体構造上の差は見られなかった。一方で、H2B E76K ヌクレオソームの結晶構造解析の結果、このヌクレオソーム中の H2B E76K に隣接する H4 の立体構造が、正常型のヌクレオソームと比較して大きく異なっていることが判明した。この H4 の構造変化に伴って H2B-H4 間の水素結合および芳香環同士のスタッキング相互作用が壊されていたことから、H2B E76K ヌクレオソームは、ヌクレオソームの安定性の低下を引き起こすと考えられた。また、H3.1 E97K ヌクレオソームに関して、単結晶が得られなかったため、X線小角散乱解析によって、その立体構造の概形を調べた。その結果、H3.1 E97K ヌクレオソームは正常型のヌクレオソームに比べて、立体構造が全体的に大きく広がっていることを明らかにした。

4. がん関連ヒストン変異を含むヌクレオソームの生化学的解析

X線結晶構造解析および、X線小角散乱の結果、H2B E76K 変異および H3.1 E97K 変異を含むヌクレオソームの構造が、正常型のヌクレオソームと大きく異なることが明らかになった。特に、H2B E76K ヌクレオソームについては、H2B-H4 間の結合が部分的に失われていたことから、ヌクレオソームの安定性が低下していると考えられた。そこで、これらのヒストン変異のヌクレオソーム安定性への影響を生化学的に解析した。ヌクレオソームの安定性を解析するためには、我々が以前に確立した熱安定性試験を用いた［10］。この試験は、ヌクレオソームと蛍光色素（sypro orange）を混合したのちに加熱し、温度上昇に伴ってヌクレオソーム中のヒストンが解離する過程を、ヒストンと sypro orange が結合した際に発生する蛍光にもとづいて検出するものである。この試験の結果、H2B E76K 変異および H3.1 E97K 変異を含むヌクレオソームのどちらも、通常のヌクレオソームに比べて 10 度以上低い温度で蛍光が検出され、安定性が著しく低下していることが明らかになった。一方で、ヌクレオソーム構造が変化しないヒストン変異体に関しては、ヌクレオソームの安定性への影響は小さかった。

5. H2B E76K 変異および H3.1 E97K 変異ヒストンの細胞内動態解析

生化学的解析によって、H2B E76K 変異および H3.1 E97K 変異がヌクレオソームの安定性を低下させることが分かった。そこで、これらの性質が細胞内での性質に反映されているのかを解析した。そのために、FRAP（Fluorescence recovery after photobleaching）解析を行った。この方法では、緑色蛍光タンパク質（GFP）とヒストンとの融合タンパク質を安定発現する HeLa 細胞を作製し、核内の一部の領域の GFP 融合ヒストンを退色させ、その後 GFP を退色させた領域に GFP 融合ヒストンが流入して、蛍光が回復するまでの時間を比較することで、GFP 融合ヒストンの動態を解析する。その結果、H2B E76K 変異ヒストンおよび H3.1 E97K 変異ヒストンのどちらも、正常型ヒストンよりも蛍光回復に要する時間が短く、これらの変異ヒストンを含むヌクレオソームが細胞内においても不安定であることが示された。

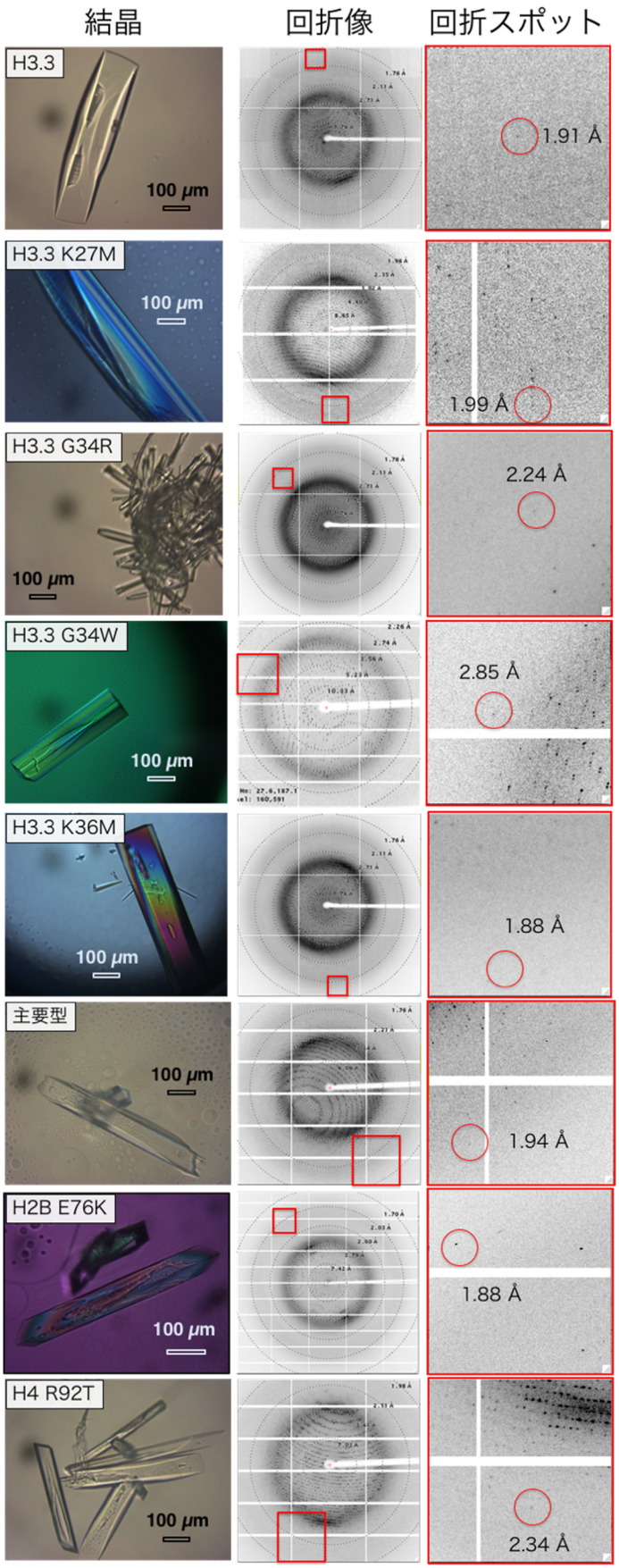


図 2. ヒストン変異を含むヌクレオソームの X 線結晶構造解析

6. H2B E76K 変異および H3.1 E97K 変異ヒストンの発現細胞のコロニー形成能解析

H2B E76K および H3.1 E97K のヒストンの変異が、細胞に及ぼす影響を解析するために、コロニー形成アッセイを行った。培養細胞のコロニー形成能は、がん細胞の悪性度の指標として用いられている。このアッセイにおいては、NIH3T3 細胞に H2B E76K および H3.1 E97K の変異ヒストンを一過的に発現させ、これらの細胞を長期間培養して、コロニーの形成数を測定した。この実験においては、NIH3T3 が本来有する内在性の正常型の各種ヒストンは細胞内に存在したままである。実際のがん患者においては、ヒストンは多コピーの遺伝子にコードされているため、H2B E76K もしくは H3.1 E97K 変異を有する患者でも、細胞中のほとんどのヒストンは正常型であると考えられる。したがって、この実験条件は、実際のがん患者に起こっている変異ヒストンと正常型ヒストンが共在した状況を模倣しており、その状況下での変異ヒストンの細胞への影響を解析している。本実験の結果から、これらの変異ヒストンを発現させた細胞では、正常型ヒストンを発現させた細胞と比較して、コロニー形成能が上昇していることが明らかになった。これらの結果から、H2B E76K および H3.1 E97K を細胞内に一過的に発現させることで、悪性度の高いがん細胞の性質が一部再現されることが明らかになった。

考　察

本研究では、がんに関連するヒストンの変異がヌクレオソームの構造および、性質に与える影響を、構造生物学的解析、生化学的解析、細胞生物学的解析を用いて調べた。まず、がんゲノムデータベースをもちいて、既知のドライバー変異に加えて、幾つかの未解析の点変異に着目した。X 線結晶構造解析および X 線小角散乱解析によって立体構造解析を行ったところ、H2B E76K および H3.1 E97K のヒストンの変異が、ヌクレオソームの立体構造に大きな影響を与えることが明らかになった。さらに生化学的解析によりヌクレオソームの安定性を解析し、これらのヒストン変異がヌクレオソームの安定性を著しく低下させる性質を有することを見出した。加えて細胞内における変異ヒストンの動態解析により、変異ヒストンを含むヌクレオソームが有する不安定な性質が、細胞内での状況を反映していることを示唆する結果を得た。これらの研究から、H2B E76K および H3.1 E97K の変異型ヒストンは細胞内で不安定なヌクレオソームを形成すると結論することができる。さらに、コロニー形成能アッセイを行い、これらの変異ヒストンを発現させた細胞では、正常型ヒストンを発現させた細胞よりコロニー形成能が上昇していることが明らかになった。これらの研究成果を統合し、H2B E76K および H3.1 E97K のヒストンの変異は、ヌクレオソームに不安定化を引き起こすことで、がんの悪性化を誘引すると考えられる。不安定なヌクレオソームが形成されることが、どのようにがん細胞の悪性化に繋がるのかは今後の大きな課題であり、一過的に不安定なヌクレオソームが形成されることで、これらのヒストンを取り込んだ領域の遺伝子発現が上昇するなどの機構が想定される。

本研究を通して、がんに関連するヒストン変異の中に、ヌクレオソームの構造および、安定性を低下させるものが含まれることが明らかになった。本研究の結果から、このような変異を有するヒストンが、細胞内で不安定なヌクレオソームを形成し、がん細胞の悪性化に関与することが示唆された。本研究によって得られた知見は、ヒストン変異を介した発がんメカニズムを理解するための重要な基盤情報を提供する。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にあたり、X 線結晶構造解析のデータ収集は SPring-8 のビームライン BL41XU もしくは、高エネルギー加速器研究機構のフォトンファクトリーのビームライン BL1A、BL5A、BL17A を用いて行いました。これらのビームラインの管理者の皆様に深く感謝いたします。X 線小角散乱実験は、京都大学複合原子力科学研究所教授の杉山正明博士との共同研究のもとで、行いました。また、細胞生物学的解析は、京都大学放射線生物研究センター准教授の井倉毅博士、東京工業大学科学技術創成研究院細胞制御工学研究センター生命理工学院教授の木村宏博士および、広島大学原爆放射線医科学研究所放射線障害機構研究部門教授の田代聡博士との共同研究にて行いました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

1) Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hielscher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bognar L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifenberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. Nature. 2012 Jan 29;482(7384):226-31. PMID: 22286061 DOI: 10.1038/nature10833

2) Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M, Zhang J, Gajjar A, Dyer MA, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Ellison DW, Zhang J, Baker SJ; St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas.Nat Genet. 2012 Jan 29;44(3):251-3. PMID: 22286216 PMCID: PMC3288377 DOI: 10.1038/ng.1102

3) Behjati S, Tarpey PS, Presneau N, Scheipl S, Pillay N, Van Loo P, Wedge DC,Cooke SL, Gundem G, Davies H, Nik-Zainal S, Martin S, McLaren S, Goodie V, Robinson B, Butler A, Teague JW, Halai D, Khatri B, Myklebost O, Baumhoer D, Jundt G, Hamoudi R, Tirabosco R, Amary MF, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Flanagan AM. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. Nat Genet. 2013 Dec;45(12):1479-82. PMID: 24162739 DOI:10.1038/ng.2814.

4) Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature. 1997 Sep 18;389(6648):251-60. PMID: 9305837 DOI: 10.1038/38444

5) Maze I, Noh KM, Soshnev AA, Allis CD. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. Nat Rev Genet. 2014 Apr;15(4):259-71. PMID: 24614311 PMCID: PMC4082118 DOI: 10.1038/nrg3673

6) Lacoste N, Woolfe A, Tachiwana H, Garea AV, Barth T, Cantaloube S, Kurumizaka H, Imhof A, Almouzni G. Mislocalization of the centromeric histone variant CenH3/CENP-A in human cells depends on the chaperone DAXX. Mol Cell. 2014 Feb 20;53(4):631-44. PMID: 24530302 DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.018

7) Arimura Y, Shirayama K, Horikoshi N, Fujita R, Taguchi H, Kagawa W, Fukagawa T, Almouzni G, Kurumizaka H. Crystal structure and stable property of the cancer-associated heterotypic nucleosome containing CENP-A and H3.3. Sci Rep. 2014 Nov 19;4:7115. PMID: 25408271 DOI: 10.1038/srep07115

8) Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature. 2013 Oct 17;502(7471):333-339. PMID: 24132290 PMCID: PMC3927368 DOI: 10.1038/nature12634

9) Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. Science. 2015 Sep 25;349(6255):1483-9. PMID: 26404825 DOI: 10.1126/science.aab4082

10) Taguchi H, Horikoshi N, Arimura Y, Kurumizaka H. A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. Methods. 2014 Dec;70(2-3):119-26. PMID: 25220913 DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.08.019