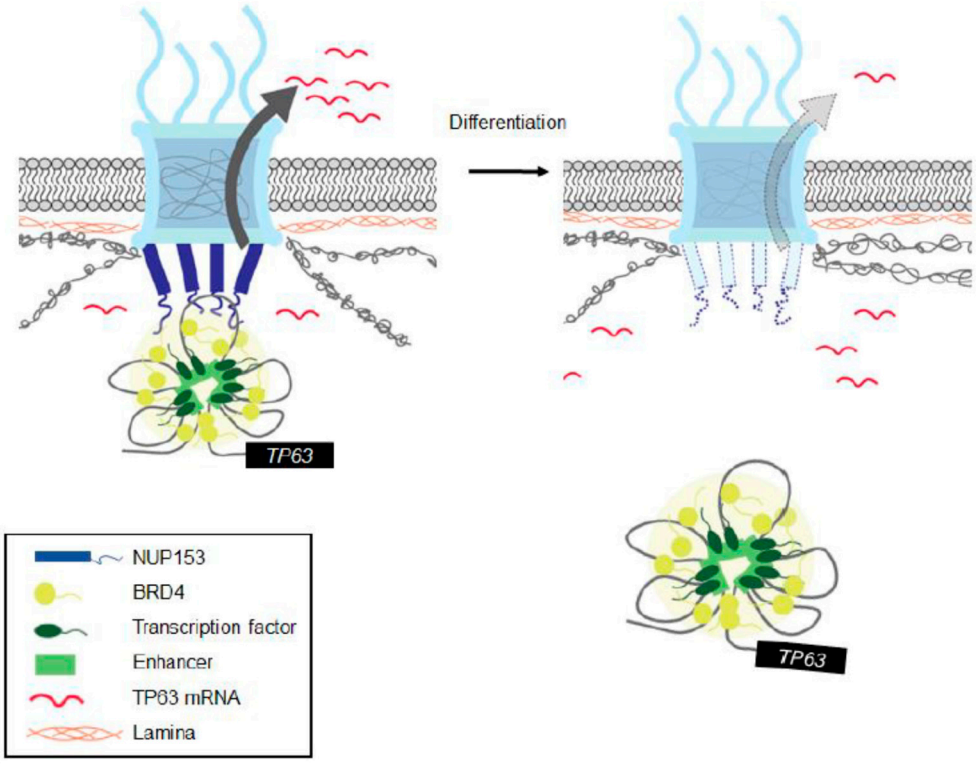
157　がん悪性化の根幹スーパーエンハンサー形成機構の解明	羽澤　勝治

【目的】スーパーエンハンサー（SEs）は遺伝子発現を強力に誘導するゲノム構造であり、がん悪性化シグナルの根幹をなす遺伝子発現ネットワークを確立する。核膜孔近傍に局在する SEs は、mRNA の核外輸送効率が高く、遺伝子発現に最適な環境（Gene-gating）であることがごく最近報告された。そのような核構造と結びついた SE の核内動態とその制御機序については不明である。本研究は、SE の形成因子であるとともに、SE 依存的に誘導されるがん遺伝子 TP63 に注目し、SE 形成機序を解明することを目的とした。

【方法】DNA-FISH 法、RNA-FISH 法、免疫蛍光染色法を組み合わせ、SE ならびに TP63 特異的 SE の核内空間における局在解析を行った。SE の局在制御における核膜孔構成因子 NUP153 の役割を調べるために、遺伝子干渉実験を行った。また、NUP153 と SE 領域ゲノム相互作用を調べるために ChIP-seq を実施した。

【結果】NUP153 との相互作用により、TP63 特異的 SE を含めた約 20%の SE は核膜周縁に局在し、TP63 - mRNA 核外輸送の効率が高く、遺伝子発現に有利な環境であることが明らかとなった。NUP153 をノックダウンした細胞では、SE が核膜孔近傍から核内へ移動し、TP63 の発現量は減少した。共焦点顕微鏡による NUP153 と SE 構成タンパク質の共局在化は観察できるが、免疫沈降法では、これら相互作用は検出できなかった。そこで、タンパク質に存在する天然変性領域（IDRs）を介した弱い分子間相互作用を再構成できる LAIP 法を創出し、分子間相互作用について調べた。LAIP 法により、NUP153 - BRD4 の相互作用が認められた。ChIP-seq 法による NUP153 のゲノム作用領域を解析したが、NUP153 が作用する近傍遺伝子の転写活性は NUP153 にほぼ依存しないことがわかった。これらより、相分離を介したタンパク質相互作用により、NUP153 は SE 形成と機能制御に関わることが明らかになった。

核膜孔複合体による SE 形成と機能制御メカニズム



157. がん悪性化の根幹スーパーエンハンサー形成機構の解明

羽澤　勝治

金沢大学 新学術創成研究機構 ナノ生命科学研究所

Key words：核膜孔複合体，スーパーエンハンサー，TP63，相分離，扁平上皮癌

緒　言

スーパーエンハンサー（SEs）は遺伝子発現を強力に誘導するゲノム構造であり、がん悪性化シグナルの根幹をなす遺伝子発現ネットワークを確立する。TP63 は扁平上皮癌（SCC）の発症・悪性化を導くマスター転写因子であり、コアクチベーター（BRD4 等）と共に巨大な分子集合体から成る SE を形成する［1，2］。TP63 自身の発現も SE により誘導される［1，2］。このように、SE を構成するシスエレメントや標的遺伝子と機能を含め、SE に対する我々の理解は深まりつつある。一方、核膜孔を介した転写後 mRNA の核外搬出は遺伝子発現効率に直結する過程であり、核構造に結びついたゲノム局在は遺伝子発現制御における重要因子であるが、核内における SE の核内動態と形成機序については不明である。

核膜孔複合体(NPC)は核膜孔を形成する筒状のタンパク質構造体であり、NPC は 30 種類のヌクレオポリン(NUPs)によって構築される。2012 年以降、NPC は核膜近傍で細胞の性質決定に関わる遺伝子群を活性化することが注目され始めた。米国の D'Angelo 博士や Gage 博士らにより、NPC s を介した遺伝子転写活性が筋細胞や免疫細胞、神経細胞の性質を決定することが報告されてきた［3〜5］。ごく最近、核膜孔近傍に局在する SE は、mRNA の核外輸送効率が高く、遺伝子発現に最適な環境（Gene-gating）であることが報告された［6］。

これらは、NPC が SE 形成と核内動態を制御する重要因子であることを強く示唆するが、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究は、SE の形成因子であるとともに、SE 依存的に誘導されるがん遺伝子 TP63 に注目し、SE 形成機序を解明することを目的とした。

方法および結果

1. NUP153 は SE の核膜孔近傍へ局在化させる

SE の核内局在情報を得るために、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。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（図 1）。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、研究代表者らが同定した TP63 の SE 領域［1，2］に対するプローブを用いて 3D-DNA-FISH 解析を行った。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（図 1）。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。

2. 核膜孔近傍に局在する SE は、mRNA の輸送効率化により、強力に遺伝子発現を誘導する

次に、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。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（図 2）。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（図 2）。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（図 2）。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。

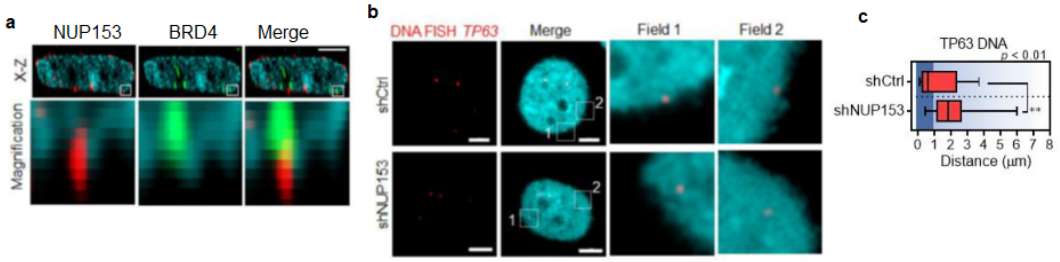


図 1. NUP153 は SE の局在制御因子である

a) 共焦点蛍光顕微鏡による NUP153 と SE 構成分子 BRD4 の局在解析。

b、c) 3D-DNA-FISH 法による、TP63-SE の局在解析（b）ならびに核周辺からの SE の距離を定量化した（c）。Scale bar＝5μm、P 値は Unpaired two-tailed t-test で得た。

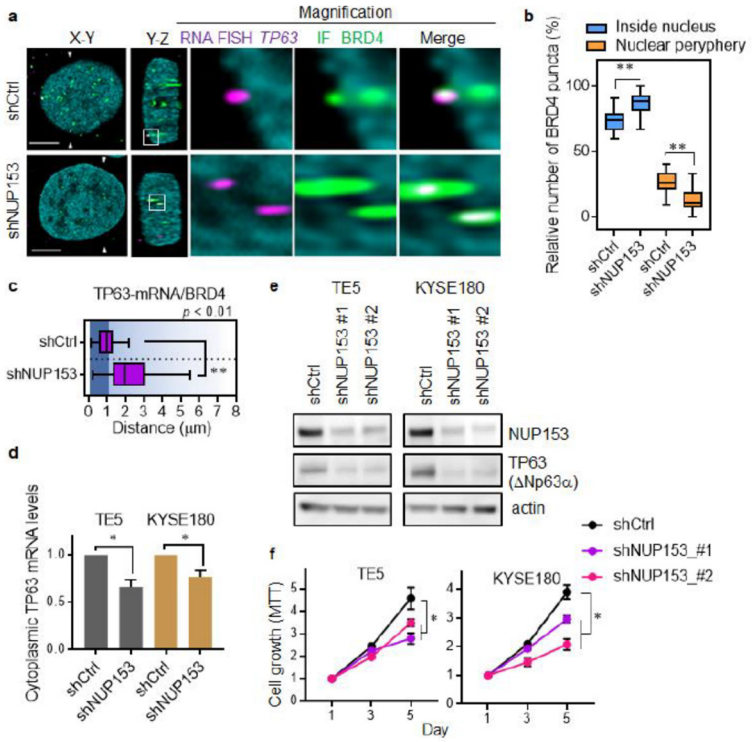


図 2. 核膜孔近傍 SE は、mRNA の輸送効率化により、強力に遺伝子発現を誘導する

a) 共焦点蛍光顕微鏡による TP63-mRNA（RNA-FISH）と SE 構成分子 BRD4 の局在解析。

b、c) BRD4（b）ならびに TP63-mRNA（c）の局在について核周辺からの SE の距離を定量化した。Scale bar＝5μm、P 値は Unpaired two-tailed t-test で得た。

d) 細胞分画法と PCR 法により定量化した、細胞質に運搬された TP63-mRNA の量。

e) WB 法による TP63 の発現量の解析。

f) NUP153 をノックダウンした細胞の増殖能力。

3. NUP153 は、FG 領域を介したタンパク質 - タンパク質相互作用で、SE の核内局在を制御する

次に、NUP153 による SE 相互作用機序の解明に取り組んだ。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（図 3）。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（図 3）。この方法では、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（図 3）。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。

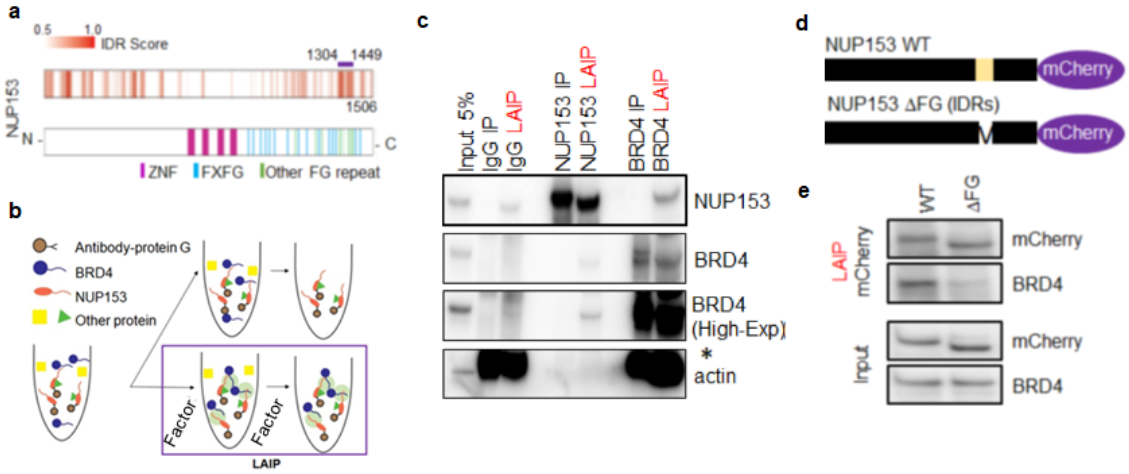


図 3. NUP153 は FG 領域を介した相互作用で、SE 構成因子 BRD4 と結合する

a） NUP153 のアミノ酸配列に依存した物性解析。FG 領域ならびに ZNF ドメインをハイライト。

b） 天然変性領域を介した相互作用を再構築できる LAIP 法の説明。

c） 従来の免疫沈降法（IP）と LAIP 法で回収したタンパク質複合体を WB 法で解析。

d） FG ドメインを欠損型変異体のダイアグラム。

e） LAIP 法で回収したタンパク質複合体を WB で解析。

4. NUP153 が作用するゲノム領域の転写活性は、NUP153 に非依存的である

次に、NUP153 のゲノム結合領域ならびに転写制御能力を評価するために、ChIP-seq および RNA-seq を行った。興味深いことに、NUP153 の作用ゲノム領域と活性化クロマチン構造の指標である H3K27ac 領域は互いに排他的であった（図 4）。また、NUP153 が結合するゲノム領域に存在する遺伝子転写活性は、NUP153 の発現量と相関しなかった（図 4）。以上より、NUP153 による SE の局在制御には、SE 領域ゲノムと相互作用ではなく、SE 構成タンパク質 BRD4 との相互作用に依存することが示唆された。

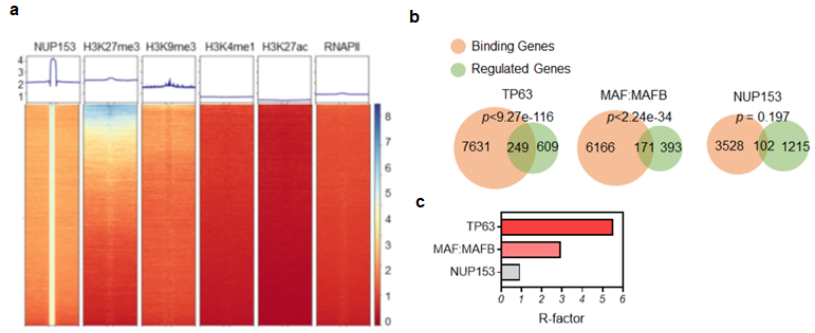


図 4. NUP153 - ゲノム相互作用は周縁遺伝子の発現制御に影響しない

a） NUP153が作用するゲノム領域におけるヒストン修飾ならびに転写制御因子の集積プロファイル。

b、c） MTFならびにNUP153が作用するゲノム領域周縁に存在する遺伝子発現の変化（b）ならびにこれらの相関解析（c）。

考　察

核膜孔複合体（NPC）を構成する分子 NUP153 は、SE を核膜孔近傍に配置し、mRNA の核外輸送効率が高く、遺伝子発現に最適な環境（Gene-gating）を確立する因子であることが本研究により明らかになった。重要なことに、Gene-gating を形成する過程で、NUP153 はゲノムとの相互作用よりも、天然変性領域を介したタンパク質 - タンパク質相互作用に依存することが明らかとなった。

一般的に、核膜周縁は抑制的クロマチンが存在することが知られている。しかし、BRD4 の集積を指標とした SE の核内局在解析の結果から、核内で形成される SE の約 20%が核周縁に存在することが明らかとなった。国外における NPC 研究者の報告では、繊維芽細胞や骨芽細胞においては 30～50%の SE が NPC により制御されるという報告がある［7］。また、NUP153 の共同因子としてポリコーム複合体構成因子や CTCF 等が ES 細胞で報告されている［8, 9］。一方、SCC 細胞においては、これらゲノム機能制御因子と NUP153 のタンパク相互作用は見られなかった（Data not shown）。細胞種に応じた NPC バリエーションと多機能化が報告されているため、本課題により明らかになった NPC による SE 制御機序は SCC 特異的な機能であることが考えられる。この Gene - gating を形成する全分子プロファイリングを達成することで、これらの分子相互作用の遮断による効果的な癌治療戦略に繋がることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行で協力していただいた、金沢大学医薬保健研究域医学系革新ゲノム情報学分野の細道一善准教授ならびに田嶋敦教授に感謝いたします。

文　献

1） 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. TP63, SOX2, and KLF5 Establish a Core Regulatory Circuitry That Controls Epigenetic and Transcription Patterns in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. Gastroenterology. 2020 Oct;159(4):1311-1327.e19. PMID: 32619460 DOI: 10.1053/j.gastro.2020.06.050.

2） Jiang Y, Jiang YY, Xie JJ, Mayakonda A, **Hazawa M**, Chen L, Xiao JF, Li CQ, Huang ML, Ding LW, Sun QY, Xu L, Kanojia D, Jeitany M, Deng JW, Liao LD, Soukiasian HJ, Berman BP, Hao JJ, Xu LY, Li EM, Wang MR, Bi XG, Lin DC, Koeffler HP. Co-activation of super-enhancer-driven CCAT1 by TP63 and SOX2 promotes squamous cancer progression. Nat Commun. 2018 Sep 6;9(1):3619. PMID: 30190462 DOI:10.1038/s41467-018-06081-9.

3） Raices M, Bukata L, Sakuma S, Borlido J, Hernandez LS, Hart DO, D'Angelo MA. Nuclear Pores Regulate Muscle Development and Maintenance by Assembling a Localized Mef2C Complex. Dev Cell. 2017 Jun 5;41(5):540-554.e7. PMID: 28586646 DOI: 10.1016/j.devcel.2017.05.007.

4） Borlido J, Sakuma S, Raices M, Carrette F, Tinoco R, Bradley LM, D'Angelo MA. Nuclear pore complex-mediated modulation of TCR signaling is required for naïve CD4+ T cell homeostasis. Nat Immunol. 2018 Jun;19(6):594-605. PMID: 29736031 DOI: 10.1038/s41590-018-0103-5.

5） Toda T, Hsu JY, Linker SB, Hu L, Schafer ST, Mertens J, Jacinto FV, Hetzer MW, Gage FH. Nup153 Interacts with Sox2 to Enable Bimodal Gene Regulation and Maintenance of Neural Progenitor Cells. Cell Stem Cell. 2017 Nov 2;21(5):618-634.e7. PMID: 28919367 DOI: 10.1016/j.stem.2017.08.012.

6) Scholz BA, Sumida N, de Lima CDM, Chachoua I, Martino M, Tzelepis I, Nikoshkov A, Zhao H, Mehmood R, Sifakis EG, Bhartiya D, Göndör A, Ohlsson R. WNT signaling and AHCTF1 promote oncogenic MYC expression through super-enhancer-mediated gene gating. Nat Genet. 2019 Dec;51(12):1723-1731. PMID: 31784729 DOI: 10.1038/s41588-019-0535-3.
7) Ibarra A, Benner C, Tyagi S, Cool J, Hetzer MW. Nucleoporin-mediated regulation of cell identity genes. Genes Dev. 2016 Oct 15;30(20):2253-2258. PMID: 2780703 DOI: 10.1101/gad.287417.116.
8) Jacinto FV, Benner C, Hetzer MW. The nucleoporin Nup153 regulates embryonic stem cell pluripotency through gene silencing. Genes Dev. 2015 Jun 15;29(12):1224-38. PMID: 26080816 DOI: 10.1101/gad.260919.115.
9) Kadota S, Ou J, Shi Y, Lee JT, Sun J, Yildirim E. Nucleoporin 153 links nuclear pore complex to chromatin architecture by mediating CTCF and cohesin binding. Nat Commun. 2020 May 25;11(1):2606. PMID: 32451376 DOI: 10.1038/s41467-020-16394-3.