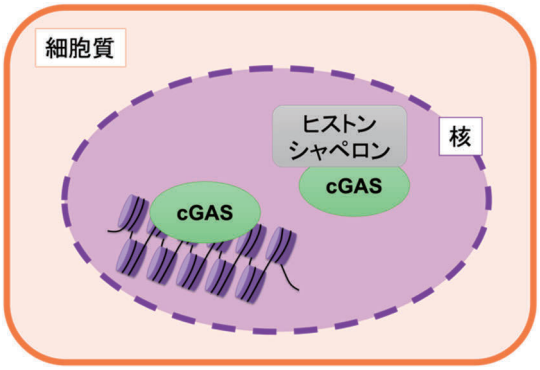
120　自然免疫とクロマチンの相互作用とその機能解析	鯨井　智也

【目的】生物は、ウイルスなどの外来 DNA に対する防衛機構を備えている。脊椎生物においてその機構の中心的な役割を果たすのが自然免疫である cGAS（cyclic GMP-AMP synthase）-STING（stimulator of interferon genes）経路である。この経路では、cGAS が外来 DNA に結合して活性化し、環状ジヌクレオチド cGAMP を合成する。そして、STING が cGAMP を認識してその後に続く経路を活性化し、最終的にインターフェロンを産生して炎症反応を引き起こす。cGAS-STING 経路は、自己免疫疾患、がん、脳炎など非常に広範な疾病の原因となることが日進月歩で解明されており、その制御機構の解明が期待されている。これまで cGAS は細胞質因子として考えられてきたが、最近になって細胞核内でゲノム DNA と一緒に存在することが報告された。本研究では、核内に存在する cGAS とクロマチンとの相互作用とその機能の解明を目的とする。核内における cGAS の制御機構はまだまだ不明な点が多いだけでなく、cGAS がこれまで予期されていなかった新たな機能を持つ可能性がある。特に、先行研究区から、cGAS は核内因子との相互作用よってクロマチンを制御、またはクロマチンによって制御されているという、クロストークが存在する可能性が考えられた。そこで、クロマチンと cGAS のクロストークとその意義を解明するために、細胞核内の cGAS の相互作用因子を探索した。

【方法】細胞の核内での cGAS の相互作用因子を探索するため、まず、タグを融合した全長のヒト cGAS タンパク質と細胞の核抽出液を調製した。ヒト cGAS タンパク質を大腸菌にて発現させ、アフィニティクロマトグラフィによって精製した。また、HeLa 細胞の核から、クロマチン結合タンパク質を抽出した。そして、タグを利用して cGAS ビーズを作製し、核抽出液から cGAS 結合因子を精製した。得られた cGAS 結合タンパク質について、質量分析によってタンパク同定を行った。

【結果】cGAS 相互作用因子を同定するために、MBP タグ融合の全長のヒト cGAS の精製系を確立した。また、HeLa 細胞の核抽出液を調製した。cGAS を固定した cGAS ビーズを核抽出液と混合し、cGAS をプルダウンすることで cGAS の相互作用因子を精製した結果、cGAS に特異的に結合するタンパク質が観察された。これらの結合因子について、LC-MS によりタンパク質同定を行い、cGAS に特異的に結合した因子を解析した。その結果、ミトコンドリアタンパク質 C1QBP や、リボソームを構成するタンパク質 60S acidic ribosomal protein P2、ヌクレオソームを形成するヒストンタンパク質 H2A、H2B、H4 などの、cGAS に結合する因子として知られている既知の因子を同定した。興味深いことに、これらの因子に加えて、Anp32e、FACT 複合体（SPT6 および SSRP1）、Nap1L4、SET、Nucleolin、Nucleophosmin などのヒストンシャペロンが複数同定された。本結果から、ヒストンシャペロンが cGAS 相互作用因子であることが示唆された。既知の cGAS 相互作用因子の C1QBP がヒストンシャペロンであり、cGAS の負の制御因子であるという先行研究の知見を踏まえると、核内ではヒストンシャペロンが cGAS を負に制御することが考えられる。核内にはゲノム DNA が存在するため、cGAS は抑制されていなければならないことを考えると、核内ではヒストンシャペロンによって cGAS のゲノム DNA に対する応答を抑制されている可能性が考えられた。

本研究により示唆された細胞核内での cGAS の相互作用因子の概念図



120. 自然免疫とクロマチンの相互作用とその機能解析

鯨井　智也

東京大学 定量生命科学研究所 クロマチン構造機能研究分野

Key words：cGAS，クロマチン，ヒストンシャペロン，質量分析

緒　言

生物は、ウイルスなどの外来 DNA に対する防衛機構を備えている。脊椎生物においてその機構の中心的な役割を果たすのが自然免疫である cGAS（cyclic GMP-AMP synthase）-STING（stimulator of interferon genes）経路である。この経路では、cGAS が外来 DNA に結合して活性化し、環状ジヌクレオチド cGAMP を合成する。そして、STING が cGAMP を認識してその後に続く経路を活性化し、最終的にインターフェロンを産生して炎症反応を引き起こす。cGAS-STING 経路は、自己免疫疾患、がん、脳炎など非常に広範な疾病の原因となることが日進月歩で解明されており、その制御機構の解明が期待されている［1］。これまで cGAS は細胞質因子として考えられてきたが、最近になって細胞核内でゲノム DNA と一緒に存在することが報告された［2，3］。本研究では、核内に存在する cGAS とクロマチンとの相互作用とその機能の解明を目的とする。

核内に存在する cGAS は、自己応答を回避するために、自身の設計図であるクロマチンを形成したゲノム DNA に対しては不活化していなければならない。ゲノム DNA は、ヌクレオソームを基本単位として数珠状に連なったクロマチンを形成している。先行研究から、cGAS はヌクレオソームを手がかりに自己応答を回避している可能性が示唆されていた［3，4］。我々は、cGAS-ヌクレオソーム複合体の立体構造を決定し、cGAS がヌクレオソーム中のヒストンタンパク質に結合して不活化することを明らかにすることで、自然免疫が自己のクロマチン DNA に反応しないメカニズムを解明した（図 1）［5］。

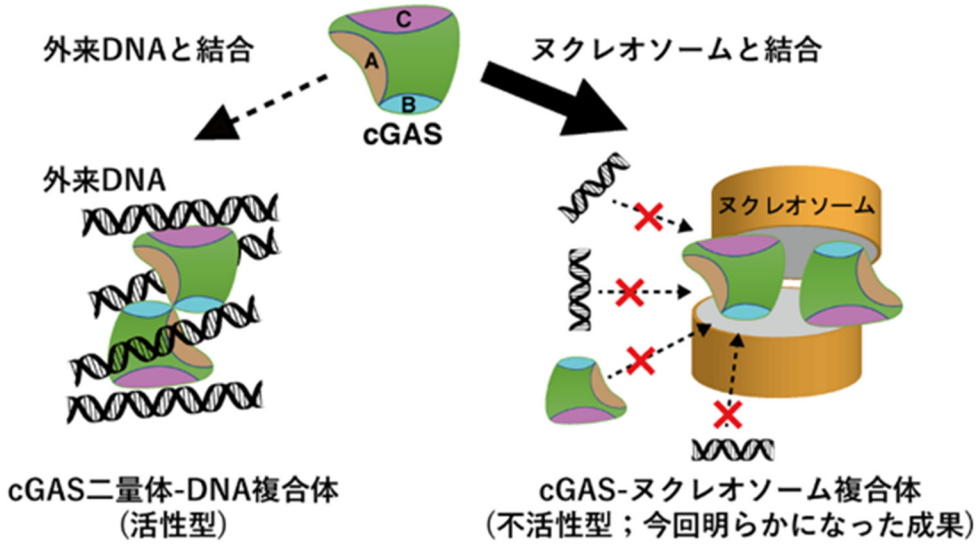


図 1．cGAS 制御機構の概念図
cGAS は、二量体化した 3 つの DNA 結合サイトで DNA に結合し活性化するが、ヌクレオソームに結合した場合、二量体形成と DNA 結合がヌクレオソームに阻害され不活性型となる。

cGAS がクロマチンと相互作用することが明らかになり、クロマチン結合型 cGAS の生物学は今まさにスタート地点に立ったところである。核内における cGAS の制御機構はまだまだ不明な点が多いだけでなく、cGAS がこれまで予期されていなかった新たな機能を持つ可能性が考えられている。具体的には、cGAS の制御機構としては、ウイルス感染、老化、癌などの特定の条件下は cGAS がクロマチンから解離して活性化することが示唆されているが［6]、どのような因子によって核内 cGAS がクロマチンから解離し活性化するのかは不明である。また、核内 cGAS の新たな機能として、DNA 修復や、エピゲノムの導入など、クロマチン上で起こる様々な反応に影響を与えることが示唆されつつある。そのため、cGAS は核内因子との相互作用よってクロマチンを制御、またはクロマチンによって制御されているという、クロストークが存在する可能性が考えられた。そこで、クロマチンと cGAS のクロストークとその意義を解明するために、細胞の核抽出液から cGAS の相互作用因子を探索し、その機能解析を行う。相互作用因子の情報を手がかりに、cGAS の機能を制御する新たな機構同定が可能になるだけでなく、cGAS が核内で関与する反応経路が明らかになり、核内 cGAS の機能の推定が可能になる。これらの情報を足掛かりに、核内 cGAS の新たな機能を明らかにすることで、自然免疫とクロマチン生物学の学際分野の開拓が期待できる。

方　法

1. プルダウンアッセイのための精製タンパク質および核抽出液の精製

まず、プルダウンアッセイに用いるタグ融合の全長のヒト cGAS タンパク質を精製した。pMAL ベクターに組み込まれたマルトース結合タンパク質（MBP）-ヘキサヒスチジン（His_6）タグ融合 cGAS を含むプラスミドを用いて、大腸菌を用いて MBP-cGAS-His_6を過剰発現させた。その後、大腸菌を回収し、超音波破砕によって大腸菌細胞を破砕し、遠心分離によって可溶性画分を回収した。Ni-NTA アガロースを用いて MBP-cGAS-His_6をアフィニティクロマトグラフィによって精製した。その後、ヘパリンカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィによって MBP-cGAS-His_6を精製した。

cGAS の相互作用因子を核抽出液から同定するために、HeLa 細胞の核を NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents（Thermo Scienctific）キットを用いてマニュアルに従って調製した。

2. cGAS 相互作用因子の同定のためのプルダウンアッセイ

まず、MBP タグを用いて cGAS 融合ビーズを作製した。cGAS タンパク質をアミロースレジンと混合し、1 時間インキュベーションして cGAS タンパク質をビーズに結合させた後、150 mM NaCl を含む洗浄液によりビーズを洗浄した。その後、cGAS 結合ビーズを HeLa 細胞の核抽出液と混合し、3 時間 4℃にてローテンションした。遠心によりビーズを回収した後、150 mM の NaCl を含む洗浄液によってビーズを洗浄し、非特異的にビーズに結合している因子を洗い落とした。その後、ビーズに対して変性剤である SDS を含む緩衝液を加え、ビーズに結合していたタンパク質を変性することで回収した。比較対象として、同様の実験を TEV プロテアーゼによって MBP を切断し精製した MBP タグについても行った。

3. 質量分析による因子の同定

プルダウンアッセイによって得られた MBP-cGAS 相互作用因子とコントロールの MBP 相互作用因子は、それぞれ塩酸グアニジン溶液に溶解し、還元アルキル化を行った後、メタノール／クロロホルム処理で精製、トリプシン消化を行った。これらの溶液消化試料を LC-MS/MS（UPLC/ UltiMate3000, MS/Orbitrap VELOS Fusion）で分析し、得られたデータに対して MaxQuant を用いてラベルフリー定量解析を行った。

結　果

1. cGAS 相互作用因子の精製

cGAS 相互作用因子を同定するために、MBP タグ融合 cGAS を精製した（図 2a）。また、コントロールの実験のために、MBP タグを調製した（図 2a）。また、HeLa 細胞の核抽出液を調製した（図 2a）。アミロースレジンに cGAS を固定した cGAS ビーズを HeLa 細胞の核抽出液と混合し、cGAS をプルダウンすることで cGAS の相互作用因子を精製した（図 2b）。コントロールとして、MBP 結合タンパク質に結合する因子も同様に精製した。その結果、cGAS に特異的に結合するタンパク質が観察された（図 2b）。

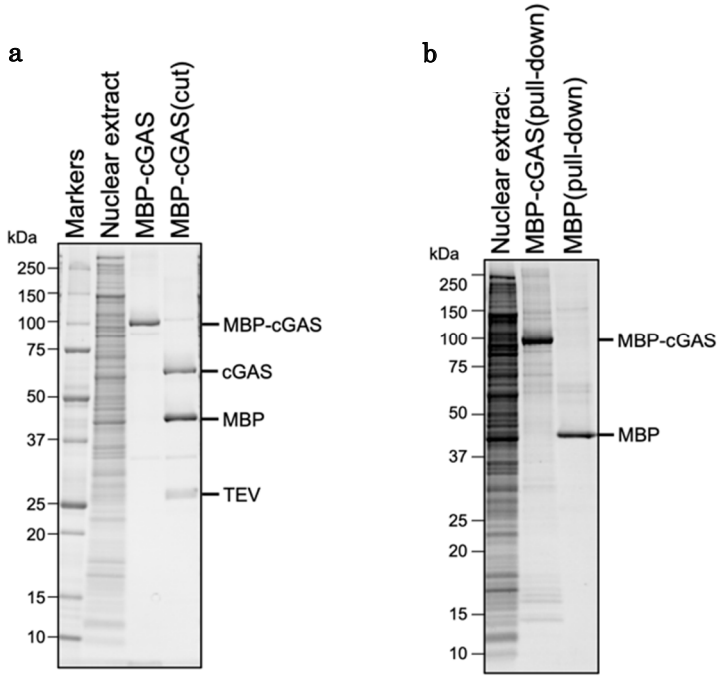


図 2. 核抽出液からの cGAS 結合因子の精製

a）調製した核抽出液、MBP-cGAS、および MBP-cGAS を TEV プロテアーゼによりカットしたプロダクトの SDS-PAGE による展開結果。Oriole によりタンパク質を染色した。

b）MBP-cGAS および MBP 結合因子の SDS-PAGE による展開結果。Oriole によりタンパク質を染色した。

2. cGAS 相互作用因子の同定

これらの結合因子について、LC-MS によりタンパク質同定を行い、ラベルフリー定量によって cGAS にエンリッチした因子を解析した（図 3）。その結果、ミトコンドリアタンパク質 C1QBP や、リボソームを構成するタンパク質 60S acidic ribosomal protein P2、ヌクレオソームを形成するヒストンタンパク質 H2A、H2B、H4 などの、cGAS に結合する因子として知られている既知の因子を同定した［4，5，7，8］。興味深いことに、これらの因子に加えて、ANP32E、FACT 複合体（SPT16 および SSRP1）、NAP1L4、SET、Nucleolin、Nucleophosmin などのヒストンシャペロンが複数同定された。

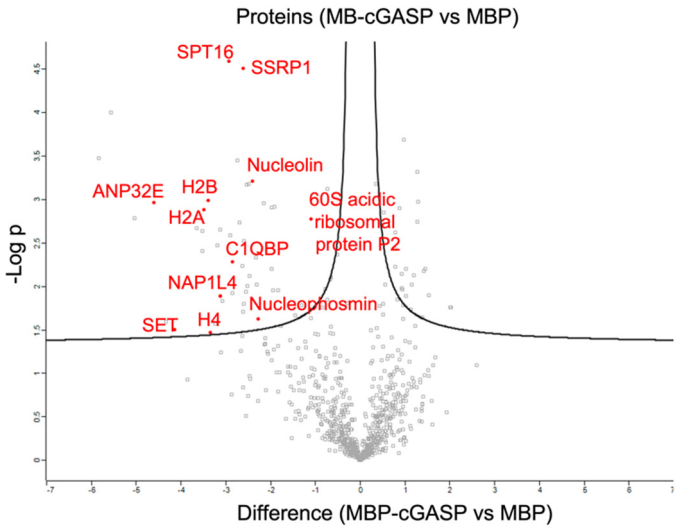


図 3. 核抽出液からの cGAS 結合因子の同定

cGAS 結合因子と MBP 結合因子の volcano plot による網羅的定量比較解析。cGAS に比較的多く結合した因子が、X 軸上で負の値を取る。既知の cGAS 結合因子と、ヒストンシャペロンについてハイライトした。

考　察

本研究により、ヒストンシャペロンが cGAS と相互作用する可能性が示唆された。ヒストンシャペロンは酸性のテール領域を有しており、このテールを介してヒストンタンパク質の塩基性の DNA 結合領域と結合すると考えられている。そのため、ヒストンシャペロンは cGAS に結合したヒストンタンパク質を介して cGAS 相互作用因子として同定された可能性がある。一方で、cGAS もヒストンタンパク質と同様に DNA 結合タンパク質であるため、ヒストンシャペロンが cGAS と直接結合する可能性も有り得る。この仮説をサポートする先行研究として、すでに cGAS 相互作用因子として知られる C1QBP は、酸性のパッチを持つタンパク質であり、この酸性パッチを介して cGAS と直接結合することが考えられている［8］。また同時に、C1QBP はヒストンタンパク質と結合する性質を持つことも報告されている［9］。これらの報告は、cGAS が今回同定されたと直接相互作用する可能性を支持していると考えられる。

これらのヒストンシャペロンが cGAS と結合する意義として、cGAS を負に制御する機能が考えられる。C1QBP は cGAS と結合すると、cGAS の DNA 結合部位を塞ぐことで外来ウイルスが細胞に侵入した際や、ミトコンドリアが崩壊した際のミトコンドリア DNA に対する cGAS の活性化を低下させることが報告されている［8］。細胞核内には、自身のゲノム DNA が存在するため、cGAS は核内では自己の DNA に対する応答を回避するために不活化していなければならない。我々は、これまでに cGAS が細胞核内でヌクレオソームに結合することで不活化することを示した［5］。本研究から cGAS 相互作用因子としてヒストンシャペロンが同定されたことは、cGAS がヒストンシャペロンによっても負に制御されている可能性を示唆しているのかもしれない。今後のさらなる解析が必要と考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学定量生命科学研究所クロマチン構造機能研究分野にて行ったものであり、サポートしてくださった胡桃坂仁志先生、伊藤友子氏、加藤淳子氏そして研究室のメンバーに感謝申し上げます。また、質量分析を進めてくださった根岸瑠美博士に感謝申し上げます。

文　献

1) Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. Science. 2019 Mar 8;363(6431):eaat8657. doi: 10.1126/science.aat8657. PMID: 30846571.

2) Jiang H, Xue X, Panda S, Kawale A, Hooy RM, Liang F, Sohn J, Sung P, Gekara NO. Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. EMBO J. 2019 Oct 4;38(21):e102718. doi: 10.15252/embj.2019102718. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31544964; PMCID: PMC6826206.

3) Volkman HE, Cambier S, Gray EE, Stetson DB. Tight nuclear tethering of cGAS is essential for preventing autoreactivity. Elife. 2019 Dec 6;8:e47491. doi: 10.7554/eLife.47491. PMID: 31808743; PMCID: PMC6927687.

4) Zierhut C, Yamaguchi N, Paredes M, Luo JD, Carroll T, Funabiki H. The Cytoplasmic DNA Sensor cGAS Promotes Mitotic Cell Death. Cell. 2019 Jul 11;178(2):302-315.e23. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.035. PMID: 31299200; PMCID: PMC6693521.

5) Kujirai T, Zierhut C, Takizawa Y, Kim R, Negishi L, Uruma N, Hirai S, Funabiki H, Kurumizaka H. Structural basis for the inhibition of cGAS by nucleosomes. Science. 2020 Oct 23;370(6515):455-458. doi: 10.1126/science.abd0237. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32912999; PMCID: PMC7584773.

6) Sun H, Huang Y, Mei S, Xu F, Liu X, Zhao F, Yin L, Zhang D, Wei L, Wu C, Ma S, Wang J, Cen S, Liang C, Hu S, Guo F. A Nuclear Export Signal Is Required for cGAS to Sense Cytosolic DNA. Cell Rep. 2021 Jan 5;34(1):108586. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108586. PMID: 33406424.

7) Wan L, Juszkiewicz S, Blears D, Bajpe PK, Han Z, Faull P, Mitter R, Stewart A, Snijders AP, Hegde RS, Svejstrup JQ. Translation stress and collided ribosomes are co-activators of cGAS. Mol Cell. 2021 Jul 1;81(13):2808-2822.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2021.05.018. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34111399; PMCID: PMC8260207.

8) Song K, Wu Y, Fu B, Wang L, Hao W, Hua F, Sun Y, Dorf ME, Li S. Leaked Mitochondrial C1QBP Inhibits Activation of the DNA Sensor cGAS. J Immunol. 2021 Oct 15;207(8):2155-2166. doi: 10.4049/jimmunol.2100392. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34526378; PMCID: PMC8492507.

9) Lin J, Bao X, Li XD. A tri-functional amino acid enables mapping of binding sites for posttranslational-modification-mediated protein-protein interactions. Mol Cell. 2021 Jun 17;81(12):2669-2681.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2021.04.001. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33894155.