

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790290  
 研究課題名（和文）クロマチンリモデリング因子 CHD8 によるアポトーシス制御機構の解明  
 研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of apoptosis by the chromatin remodeling factor CHD8

研究代表者  
 西山 正章（NISHIYAMA MASAOKI）  
 九州大学・生体防御医学研究所・助教  
 研究者番号：50423562

## 研究成果の概要：

クロマチンリモデリング因子 CHD（Chromodomain-Helicase-DNA binding domain protein）ファミリーに属する酵素群は、クロマチン構造の変化を介して遺伝子発現の制御に関わると考えられているが、特定遺伝子の発現制御における役割は不明であった。最近申請者は、このファミリーの一つである CHD8 が発生早期に高発現し、がん抑制タンパク p53 によるアポトーシスを抑制することを発見した[Nishiyama M, et al., Nature Cell Biol. (2009)]。CHD8 は p53 とヒストン H1 との三量体を形成することによって、p53 の転写活性を抑制し、最終的にアポトーシスを阻害する。つまり CHD8 はヒストン H1 を呼び込むことによってクロマチン構造を変化させ、p53 による転写を抑制することによって、細胞運命をアポトーシスから生存へと 180 度変化させる。CHD8 が欠損すると、p53 が異常に活性化してアポトーシスが誘導される。CHD8 ノックアウトマウスでは胚発生早期に広範なアポトーシスを来し死亡するが[Nishiyama M, et al., Mol. Cell. Biol. (2004)]、p53 を同時欠損させるとアポトーシスが抑制され、この発生停止が回復した。これらの生化学的・遺伝学的知見により、CHD8 は既にクロマチン上に結合している p53 すらも抑制できる“抗 p53 最終機構”を形成していることが判明した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：エピジェネティクス、クロマチンリモデリング、アポトーシス、がん遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、発がんの機構について遺伝子のエピジェネティックな制御異常が重要であるとの認識が広まり、特にヒストンの翻訳後修飾におけるメチル化の役割が注目を集めている。クロマチンリモデリング因子 CHD

（Chromo-ATPase/helicase-DNA binding protein）はメチル化されたヒストンに結合し、ATP 依存的なヌクレオソーム形成や移動を行うと考えられている分子ファミリーである。CHD は種を超えて保存されており、ヒトでは CHD1～9 の 9 つのメンバーが存在する。

その一つである CHD1 は最近 K4 メチル化ヒストン H3 に結合し、転写活性化に関わることが示された [Pray-Grant et al., Nature (2005)] が、他の CHD ファミリーメンバーに関しては機能的解析はほとんど進んでいない。申請者は、CHD8 のノックアウトマウスを作製し、胎生早期にアポトーシスの異常な亢進によりマウス胚が死亡することを見出した [Nishiyama M, et al., Mol. Cell. Biol. (2004)]。そこで CHD8 の欠損がなぜアポトーシスを引き起こすかという分子機序を解明する過程で、申請者はこの CHD8 が p53 を介してアポトーシスを抑制する新規のがん遺伝子である可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では生物学的機能がほとんどわかっていないこの新規がん遺伝子 CHD8 の生物学的な作用を細胞レベル・個体レベルで詳細に解析し、アポトーシス制御の詳細や発がんの分子機構を明らかにする。また、がん細胞において CHD8 の合成を妨げることにより、新しい抗がん剤を開発することを試みる。

## 3. 研究の方法

### 1) CHD8 による p53 の転写抑制メカニズムの解析

申請者は CHD8 がクロマチン上で p53 と結合し、さらにヒストン H1 をリクルートすることによって、p53 の転写活性を抑制する可能性を見出したが、そのメカニズムについて詳細に検討した。

### 2) 変異 CHD8 によるドメイン機能解析

予備的研究により、CHD8 はそのアミノ末端で p53 と結合することが分かっているが、ヒストン H1 との結合領域をも明らかにし、p53 の抑制機能について詳細に検討した。

### 3) プロテオミクス技術を用いた CHD8 の複合体解析

CHD8 と複合体を形成するタンパク質を網羅的に同定し、さらなる機能解析を行った。

### 4) RNAi を用いたノックダウン実験による CHD8 の機能解析

非がん細胞や p53 欠損がん細胞株でも RNAi によって CHD8 の発現をノックダウンし、その効果を検討した。

### 5) がん細胞における内在性 CHD8 の発現の発現解析

培養がん細胞株やヒトがん組織における CHD8 の発現状態について調べた。

### 6) p53/CHD8 ダブルノックアウトマウスの作製による個体機能解析

申請者は、p53/CHD8 ダブルノックアウトマウスを作製し、哺乳類個体における p53 と CHD8 の機能的関係について検討した。

## 7) CHD8 コンディショナルノックアウトマウスの作製による個体機能解析

### 4. 研究成果

今回申請者は、SNF2 様クロモドメインヘリカーゼタンパク CHD8 がヒストン H1 とがん抑制タンパク p53 の両方に結合し、それによって p53 依存的な転写活性化とアポトーシスを抑制することを発見した(図1)。

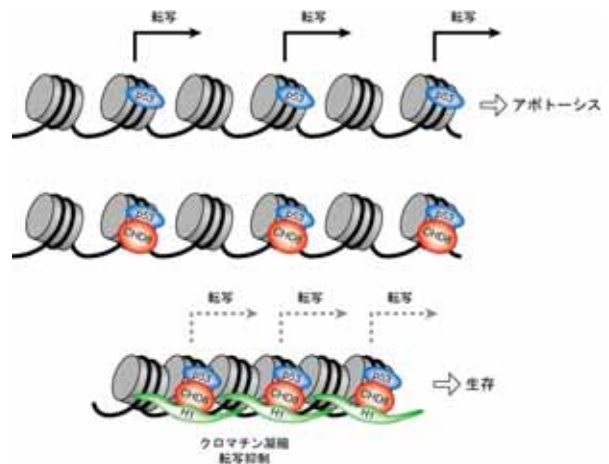


図1 CHD8 の機能モデル

CHD8 は p53 と結合し、ヒストン H1 をリクルートすることによってクロマチン構造を変化させ、p53 の転写活性を抑制する。それによってアポトーシスを抑制し、細胞を生存へと向かわせることが可能になる。

CHD8 は p53 の標的遺伝子のプロモーターへのヒストン H1 リクルートを p53 依存性に促進し、p21、Mdm2、Bax、Noxa などの遺伝子の発現を抑制した。CHD8 の過剰発現は p53 依存的なアポトーシスを抑制する。対照的に、RNAi による CHD8 の枯渇は p53 依存性のアポトーシスの引き金となる。CHD8 は p53 と結合し、それによってその機能を負に制御する。マウスモデルにおいて Chd8 ノックアウトマウスは胚発生早期に広範なアポトーシスを来し死亡するが、p53 を欠損させるとこの発生停止が改善した。

さらにプロテオーム解析によって、CHD8 はヒストン H1 とも結合することが明らかになった。クロマチン免疫沈降解析によって、p53RE 上に p53/CHD8/ヒストン H1 複合体が形成されることが示唆された。この複合体が形成できないと、予定外の p53 の活性化とアポトーシスが起る。ヒストン H1 ノックアウト ES 細胞において、遺伝毒性ストレスによって誘導されるアポトーシスの程度と同様

に、p53 標的遺伝子の発現は著明に増加した。このように、申請者の研究はクロマチンリモデリング因子 CHD8 によって触媒される新たなヒストン H1 リクルートのメカニズムを明らかにするだけでなく、このリクルート活性と p53 の制御およびアポトーシスを関連づける。これは、元来ほとんど独占的に翻訳後修飾のレベルで触媒されるとされていた p53 経路のエピジェネティック制御機構の最初の証明である (図 2)。

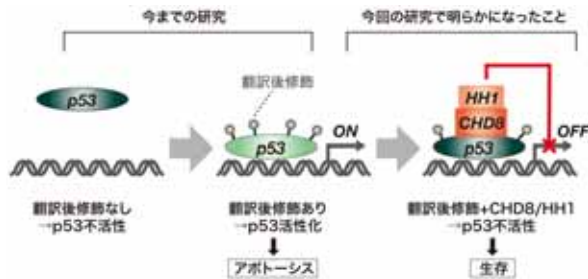


図 2 p53 を制御するメカニズム

p53 タンパク質が翻訳後修飾を受けると DNA に結合して転写が開始され、アポトーシスが引き起こされる。しかし CHD8 とヒストン H1 (HH1) がそこへ結合すると、p53 の活性は抑制され、細胞は生存へ向かう。このように、今まで p53 の活性化は p53 タンパク質の翻訳後修飾によって主に制御されていると考えられてきたが、今回の研究で、それ以後のレベルでも CHD8/HH1 複合体によって制御されていることが明らかとなった。

申請者は今回 CHD8 による新しい p53 の制御機構を明らかにしたが、CHD8 は初期発生において、ヒストン H1 は、リンカー DNA の出入口付近でヌクレオソームのコア粒子と結合し、それによってクロマチンの 30-nm ファイバーへの折り畳みを促進する。ヒストン H1 のリクルートを介して p53 の機能を抑制することによって、アポトーシス誘導の閾値を決定しているのかもしれない (図 3)。

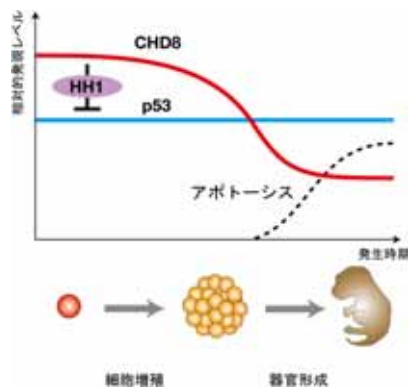


図 3 CHD8 機能の生物学的役割

CHD8 の発現が高い胚発生早期には p53 機能は抑制されており、中期以降 CHD8 の発現が低下するとアポトーシス

が誘導され、器官形成が起こる。CHD8/ヒストン H1 複合体は p53 機能を抑制することにより、胚発生初期における高速な細胞増殖によって誘導される有害なアポトーシスを防ぐために機能している。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoutchi, Al., Nakayama, KI.: CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nature Cell Biol.*, 11: 172-182 (2009). 査読有り

西山正章らが *Nature Cell Biology* 誌に発表した論文の内容につき、2009 年 1 月 19 日の NHK ニュースおよび同日付朝日新聞、読売新聞、毎日新聞等で取り上げられた。

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

Masaaki Nishiyama, Keiichi I. Nakayama: Epigenetic control of p53 function by CHD8 through recruitment of histone H1

The 3rd Global COE International Symposium (Singapore, 2009.2.15-16)

Masaaki Nishiyama, Keiichi I. Nakayama: Epigenetic control of p53 function by CHD8 through recruitment of histone H1

THE 21st NAITO CONFERENCE on "Nuclear Dynamics and RNA [ ]" (Yatsugatake, 2008.6.24-27)

Masaaki Nishiyama, Yu-ichi Tsukada, Kiyotaka Oshikawa, Tadashi Nakagawa, and Keiichi I. Nakayama: EPIGENETIC CONTROL OF p53 FUNCTION BY CHD8 THROUGH RECRUITMENT OF HISTONE H1

Cold Spring Harbor Laboratory The Cell Cycle meeting (CSHL, 2008.5.14-18)

Masaaki Nishiyama, Yu-ichi Tsukada, Kiyotaka Oshikawa, Tadashi Nakagawa, Keiichi I. Nakayama: EPIGENETIC CONTROL OF p53 FUNCTION BY CHD8 THROUGH RECRUITMENT OF HISTONE H1

The Joint Symposium of the 3rd International Symposium of Institutes Network and Hot Spring Harbor-Global COE Symposium (Beppu, 2008.2.1-2)

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

西山正章, 中山敬一: クロマチンリモデリング因子 CHD8 による p53 機能のエピジェネティック制御機構 *実験医学* 27: 536-539 (2009)

西山正章, 中山敬一 : p53 の新しい制御機構 : ヒストン H1 によるエピジェネティックコントロール **細胞工学** 28: 270-271 (2009)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西山 正章 (NISHIYAMA MASAOKI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号 : 5 0 4 2 3 5 6 2

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :