

【別紙】

悪性黒色腫の進展を支える遺伝子発現メカニズムを解明 ～がんの治療法開発に期待～

【ポイント】

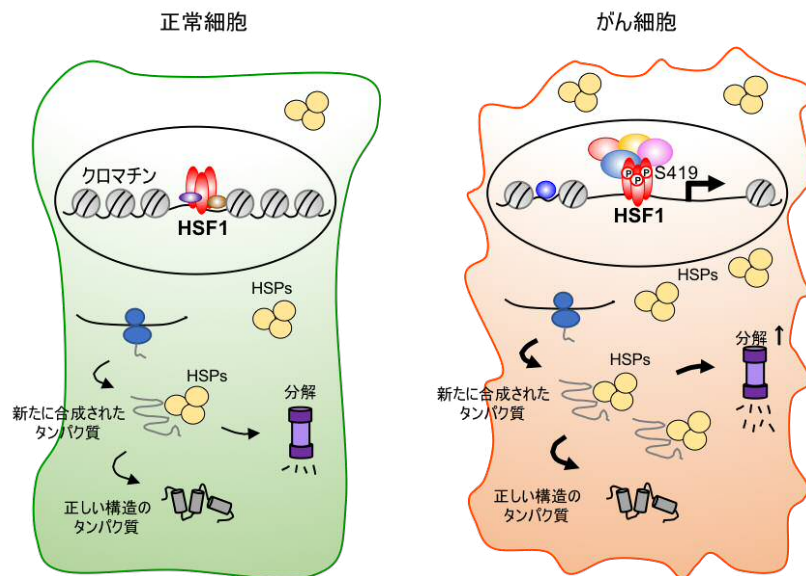
- 転写因子 HSF1 のリン酸化がクロマチン状態と遺伝子発現を調節する。
- HSF1 リン酸による遺伝子発現変化は悪性黒色腫の腫瘍形成に必要である。

【概要】

熱ストレスなどによるタンパク質の構造異常に対して、細胞は一群の熱ショックタンパク質（HSP）の転写を誘導することで適応します。この転写誘導はクロマチン構造変化を伴っており、活性化された転写因子 HSF1 によって制御されます。興味深いことに、活性化 HSF1 はヒトのがんの発症と進展を支えることも知られています。山口大学大学院・医学系研究科の藤本充章准教授、中井彰教授らの研究グループは、熱ストレス時に活性化された HSF1 がクロマチン構造変化を引き起こす仕組みを明らかにしました。さらに通常状態のがん細胞では、この HSF1 リン酸化を介する仕組みが作動することでその増殖を促進することが分かりました。特に、悪性黒色腫細胞のマウスでの腫瘍形成は、この HSF1 リン酸化に強く依存していることを見出しました。

本研究結果は、細胞のストレス応答におけるクロマチン制御機構の解明につながる成果であると同時に、リン酸化をターゲットとする悪性黒色腫の新規治療法を提案しています。

本研究結果は、2022年7月29日に、英国の国際学術誌「Nature Communications」にオンライン掲載されました。



概要図 がん細胞における HSF1 とタンパク質恒常性

正常細胞では新しく合成されたタンパク質は、HSP 群によるタンパク質フォールディングと分解のバランスによって正しい構造に保たれる（左）。この時、HSF1 の一部はクロマチンに結合して HSP 群の構成的発現を調節している。がん細胞では HSF1-S419 リン酸化によって HSP 遺伝子のクロマチン構造の弛緩と転写亢進が引き起こされる。がん細胞内は凝集体を形成しやすい状態にもかかわらず、HSP 群が増加することでタンパク質は正しい構造に保たれる（右）。

1. 背景

細胞はゲノムが指令する様々な機能を持つタンパク質によって営まれる生命の最少単位です。細胞が正しく働くために、タンパク質の構造と濃度が一定に保たれる必要があります。それらは主にタンパク質の合成、折りたたみによる高次構造の形成（フォールディングと呼ばれる）、そして分解による排除によって維持されています。これらのバランスが崩れると、異常タンパク質が凝集体やアミロイド線維を形成して細胞内へ蓄積し、細胞の機能異常を引き起こします。

病気であるがんの細胞内はタンパク質の構造異常が生じやすい環境に変化していますが、フォールディングと分解の過程が促進されることで細胞毒性のある凝集体やアミロイド線維の蓄積が抑制されています。したがって、フォールディングや分解の過程を阻害するがんの治療法が期待されます。実際にタンパク質分解の阻害剤は、多発性骨髄腫に対する抗腫瘍剤として使われています。

タンパク質のフォールディングを介助するのが一群の熱ショックタンパク質（HSP）です。そして、これらの HSP 遺伝子群の発現調節を担うのがそれらの遺伝子領域のクロマチン（染色体）に結合する転写因子 HSF1 です。ヒトのがん細胞の HSF1 は、326 番目のセリン（S326）がリン酸化を受けることで活性化され、HSP 群の発現を促進することでタンパク質フォールディングと細胞増殖を促します。しかし、HSF1 のリン酸化による転写活性化機構もそれぞれのがん細胞における役割も不明でした。これまでに当研究チームは、HSF1 転写複合体の解析を糸口として HSF1 活性調節の分子機構を解明してきました。その過程で、HSF1 の S419 リン酸化がクロマチン状態の変化を介して転写を促進すること、そしてその 1 カ所のリン酸化の阻害が悪性黒色腫のマウスでの腫瘍形成を顕著に抑制することを明らかにできました。

2. 研究の成果

当研究チームは、クロマチン上の HSF1 転写複合体を構成するタンパク質を網羅的に同定するために、ヒトがん細胞 HeLa に熱ストレス処理して HSF1 を活性化させました。その細胞を用いてクロマチン免疫沈降法（ChIP）と質量分析法（MS）を統合した ChIP-MS 解析を行いました（[図 1](#)）。その結果、クロマチンを構成する一群のヒストンタンパク質の修飾酵素（TRRAP、および既知の p300 と CBP）、修飾されたヒストンを認識するタンパク質（TRIM33 と TRIM24）を同定しました。まず、HSF1-TRRAP 複合体形成について解析したところ、*HSP70* プロモーターへ結合した HSF1 は、S419 のリン酸化によって TRRAP と相互作用し、それを *HSP70* プロモーター上へリクルートすることを見出しました（[図 2](#)）。

TRRAP はヒストンアセチル基転移酵素（HAT）である TIP60 や GCN5 を含むいくつかの HAT 複合体の共通サブユニットです。熱ストレスで TRRAP と複合体を形成するタンパク質群を質量分析法で解析した結果、TRRAP-TIP60（NuA4 と呼ばれる）複合体の構成要素（p400、ING3、GAS41、BAF53、そして HAT である TIP60 など）が含まれていました。実際に、TIP60 は熱ストレス条件下で *HSP70* プロモーターへリクルートされ、クロマチン構造を弛緩させて転写を促進することが分かっているヒストン H3K18 のアセチル化（H3K18ac）および H4K16ac に必要でした。

一方、TRIM33 は H3K18ac を認識するとともにユビキチン化酵素としても働きます。そこでやはりクロマチン構造の弛緩を介して転写を促進する修飾であるヒストン H2B の K120 ユビキチン化（H2BK120ub）への影響を調べました。その結果、H3K18ac 依存的に TRIM33 が *HSP70* プロモーターへリクルートされ、H2BK120ub に必要であることが分かりました。つまり HSF1 リン酸化による HSP 群の転写誘導には、クロマチン構造の弛緩と関連するヒストンのアセチル化を介したユビキチン化が寄与していることが明らかとなりました。

次に、熱ストレス条件下での HSF1-S419 のリン酸化酵素を探索しました。今回の

ChIP-MS 解析から、3つのタンパク質リン酸化酵素が *HSP70* プロモーターヘリクルートされることが示唆されました。それらの解析から、PLK1 が熱ストレスによる HSF1-S419 リン酸化を担うことが分かりました。実際に PLK1 を抑制すると、熱ストレス条件下で TRRAP や TRIM33 が *HSP70* プロモーターヘリクルートされず、ヒストンユビキチン化が阻害されました。以上の結果は、PLK1 を介する HSF1 リン酸化が活性型のクロマチン構造を確立することを示唆しています (図 2)。

さらに当研究チームは、この *HSP* 群の転写調節に重要な HSF1-S419 リン酸化の生理機能とがんにおける役割について調べました。がん細胞に内在する HSF1 を HSF1-S419 変異体 (S419A または S419G) へ置換すると、熱ストレス条件下での細胞生存率が著しく減少しました。この際に、細胞内のユビキチン化された異常タンパク質の蓄積の増加を伴っていました。これらの結果は、HSF1-S419 のリン酸化が熱ストレス条件下でのタンパク質恒常性を維持するために重要であることを示唆します。

興味深いことにがん細胞では PLK1 の発現が高く、恒常的に HSF1 が活性化されていました。様々ながん細胞株の増殖は HSF1 に依存しますが、その中でも悪性黒色腫細胞株 (MeWo、HMV-1、そして MMAc 細胞株) の増殖が強く HSF1 に依存することが分かりました。そこで悪性黒色腫 MeWo 細胞に焦点を当てて解析を進めたところ、HSF1-S419A 変異体への置換は、その細胞の増殖を半減させました。次に、内在性 HSF1 を HSF1-S419A あるいは HSF1-S326A との両変異体に置換した MeWo 細胞をヌードマウスの皮下に投与して異種移植実験を行いました。その結果、HSF1-S419A へ置換した細胞による腫瘍形成は、野生型 HSF1 を再導入した細胞の腫瘍形成と比較して顕著に抑制されました。さらに両変異体へ置換された細胞による腫瘍形成はより強く抑制されました (図 3)。これらの結果は、HSF1-S419 リン酸化が悪性黒色腫細胞の増殖や腫瘍形成に強く影響することを示しています。

3. 研究の意義と今後の展望

熱ストレス応答における *HSP* 遺伝子のクロマチン構造と転写の調節機構は、急激で顕著な変化を伴うことから古くから遺伝子発現誘導のモデルとして研究されてきました。この過程でヒストンのアセチル化を介したクロマチン弛緩が引き起こされることは知られていましたが、その分子機構は不明のままでした。本研究によって、TRRAP-TIP60 HAT 複合体による特定のヒストンアセチル化、そしてそれによってリクルートされる TRIM33 と TRIM24 によるヒストンユビキチン化が重要な役割を担うことが明らかになりました。また転写活性化と関連する HSF1 リン酸化の中で、HSF1-S419 のリン酸化がこの一連のクロマチン状態の変化を導くことも分かりました。つまり、哺乳動物細胞の熱ショック応答におけるクロマチン構造と転写誘導の分子機構の一端を初めて明らかにできたと言えます。

さらに熱ストレス応答の分子機構解明を基盤として、通常状態の HSF1 活性異常とがんを結びつけることができました。がん細胞では PLK1 を介した HSF1-Ser419 リン酸化が構成的に亢進していること、さらにこのセリンをアラニンに置換することで様々ながん細胞の増殖が抑制されることをつきとめました。特に、この置換による悪性黒色腫細胞のマウスにおける腫瘍形成の抑制は顕著でした。以上の研究によって、HSF1 の特定アミノ酸の翻訳後修飾ががんの病態進行と密接に関連することを初めて明らかにでき、そのリン酸化の抑制が悪性黒色腫をはじめとするがんの新規の治療ターゲットとなることを提案します。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は新潟大学、九州大学、東京大学と共同で行われたものです。また、本研究プロジェクトは、日本学術振興会・基盤研究 B「クロマチン制御による熱ショック応答の調節機構の解明」、日本学術振興会・基盤研究 C「HSF1 複合体によるエピジェネティッ

クな遺伝子発現制御機構の解明」、上原記念生命科学財団助成「HSF1 複合体によるエピジェネティックな遺伝子発現制御」、武田科学振興財団助成「染色体分配関連因子による転写開始前複合体形成の制御」、九州大学生体防御医学研究所・共同研究課題「生細胞内で形成される HSF1 転写複合体の解析」及び「エピジェネティック制御を担う HSF1 転写複合体の解明」、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS)・支援課題「ヒストンアセチル化を介した熱ショック応答の分子機構解明」のご支援によって遂行されました。

<論文タイトルと著者>

タイトル：HSF1 phosphorylation establishes an active chromatin state via the TRRAP-TIP60 complex and promotes tumorigenesis

(HSF1 リン酸化は TRRAP-TIP60 複合体を介して活性クロマチン状態を確立して腫瘍形成を促進する)

著者：Fujimoto M, Takii R, Matsumoto M, Okada M, Nakayama KI, Nakato R, Fujiki K, Shirahige K, and Nakai A.

山口大学：藤本充章准教授、瀧井良祐助教、岡田真理子大学院生、中井彰教授

新潟大学：松本雅記教授

九州大学：中山敬一教授

東京大学：中戸隆一郎准教授、藤木克則助教、白髭克彦教授

掲載誌：Nature Communications (2022) DOI: 10.1038/s41467-022-32034-4

<問い合わせ先>

山口大学大学院医学系研究科医化学講座

中井 彰 教授

藤本 充章 准教授

TEL: 0836-22-2214/2215 FAX: 0836-22-2315

E-mail: anakai@yamaguchi-u.ac.jp

<図と説明>

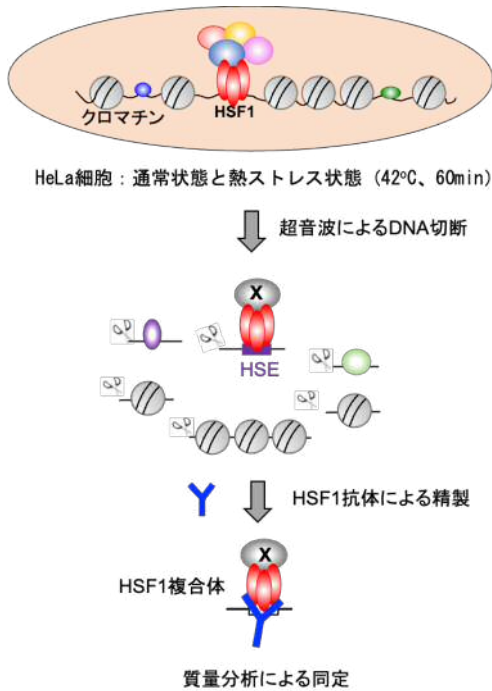


図1 HSF1 転写複合体のChIP-MS解析による同定

熱ストレス処理したものと処理しないヒトがん細胞 HeLa を用意した。この細胞に架橋剤処理して DNA とタンパク質を結合させた後、DNA を超音波破碎した。抗 HSF1 抗体を用いて HSF1 転写複合体を精製し (ChIP)、その中に含まれるタンパク質群 (X で示す) を質量分析 (MS) 法により同定した。

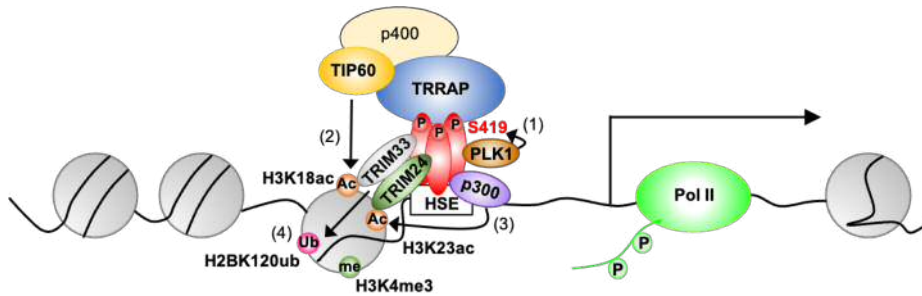


図2 熱ショック応答における HSP 遺伝子のクロマチンの調節機構

熱ストレス条件下でタンパク質リン酸化酵素 PLK1 は HSF1-S419 をリン酸化し (1)、TRRAP-TIP60 HAT 複合体をリクルートする。TIP60 ともう一つの HAT である p300 は、それぞれヒストン H3K18ac と H3K23ac の修飾を担う (2、3)。HSF1 とこれらのヒストンアセチル化を認識する TRIM33 と TRIM24 がリクルートされて、ヒストン H2B-K120 をユビキチン化する (4)。これらのヒストン修飾が HSP 遺伝子のクロマチンを弛緩させることでその転写を促進する。

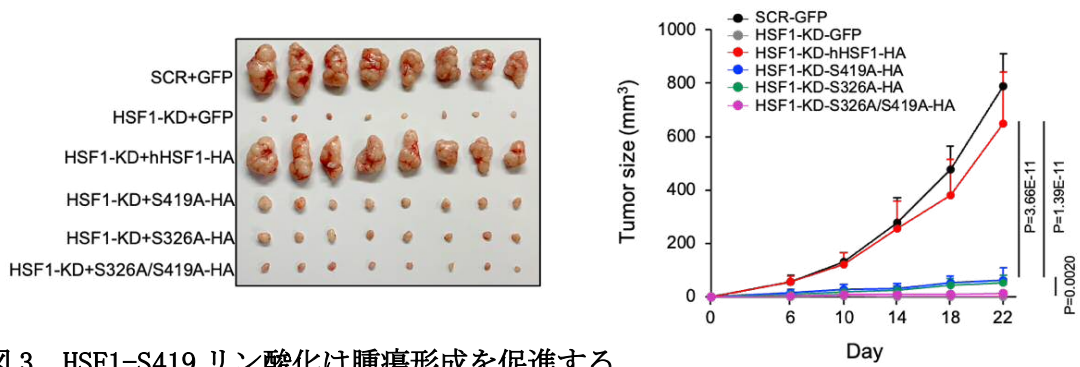


図3 HSF1-S419リン酸化は腫瘍形成を促進する

ヒト悪性黒色腫細胞株 MeWo を用いて、内在性の HSF1 を GFP、野生型 HSF1 (hHSF1-HA)、あるいは S419 変異体 (S419A) に置換した。その細胞をヌードマウスの背部皮下の 2 カ所に移植した (n=8)。摘出した腫瘍の写真 (22 日後) (左)、及び腫瘍の容量変化の時間経過を示す (右)。もう一つのリン酸化部位である S326 変異体 (S326A) に置換した細胞、さらに S419A/S326 両変異体に置換した細胞の腫瘍形成も示す。有為差を右に示す ($p < 0.01$ 、ANOVA 検定)。