

核内 c-Abl チロシンキナーゼの新規機能： ヒストン脱アセチル化を介したクロマチン構造変換

千葉大学大学院医学薬学府 4年博士課程2年 青山和正

チロシンリン酸化シグナルは、細胞増殖、細胞死、接着、分化などの重要な制御機構であることが知られている。チロシンリン酸化反応を触媒するチロシンキナーゼの一つ c-Abl は、非受容体型で組織普遍的に発現している。他のチロシンキナーゼと異なり、分子内に核移行シグナル (NLS) を持っており、特に DNA 損傷時に核移行が促進することがわかっている。しかし、核内の c-Abl に関しては、未知な部分が多いため、我々は核内 c-Abl の新規機能解明を目指して研究を行った (発表論文1)。

細胞の DNA を染色すると、染色強度が濃い高密度クロマチン領域と薄い低密度クロマチン領域に分かれている様子が観察できる。Na₃VO₄ (チロシン脱リン酸化酵素阻害剤) で、細胞内チロシンリン酸化レベルを亢進させたところ、DNA 染色強度が濃い領域はより濃く、薄い領域はより薄くなった。ピクセル蛍光強度の標準偏差 (SD) を用いてこの変化を定量したところ (図1)、有意であることがわかった。また、この変化は、imatinib (c-Abl 阻害剤) によって有意に抑制された (control, SD = 598; Na₃VO₄, SD = 734; Na₃VO₄+imatinib, SD = 665)。よって、c-Abl によるチロシンリン酸化反応がクロマチン凝縮・脱凝縮に関与していることが示された。

核内の c-Abl がクロマチン構造に与える影響を検証するため、野生型 c-Abl のアミノ末端に核移行シグナル (NLS) を結合させた核移行型 c-Abl (NLS-c-Abl) の発現ベクターを作成した。polyethylenimine (pH 4.0) を用いた高効率の遺伝子導入法を開発し (発表論文2)、細胞に発現させた。野生型 c-Abl は主に細胞質に局在し、SD をわずかに上昇させただけであったが、NLS-c-Abl は主に核に局在し、より大きく SD を上昇させた (vector, SD = 553; c-Abl, SD = 625; NLS-c-Abl, SD = 815)。NLS-c-Abl 発現細胞では、SD が 1000 を超える非常に強いクロマチン凝縮・脱凝縮も見られた。また、imatinib は、NLS-c-Abl による SD 上昇を有意に抑制した。これらから、核内 c-Abl が活性依存的にクロマチン構造変換を誘導することが示された。

クロマチン構造変換は、ヒストン修飾によって制御されることが知られている。そこで、ヒストン修飾と核内 c-Abl によるクロマチン構造変換の関係を調べるため、ヒストン修飾抗体を用いた免疫染色を行った。興味深いことに、SD が高い細胞で、ヒストン H3 lysine 9 trimethylation (H3K9Me3) の上昇、H3K4Me3、H3K14Ac、H4K16Ac な

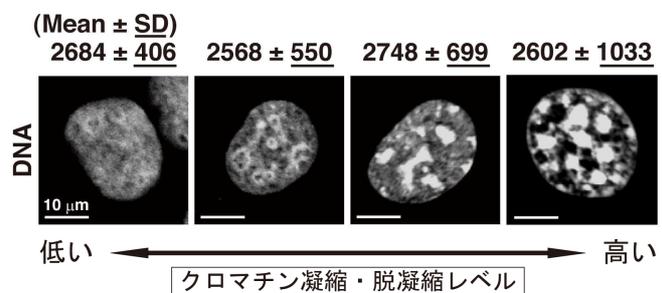


図1. 当研究室で確立したピクセルイメージング法

DNA 染色をした核を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、クロマチン密度が高い (蛍光強度高い) 領域と低い (蛍光強度低い) 領域を含む細胞は、核内ピクセル蛍光強度の平均値 (Mean) が一定のとき標準偏差 (SD) が高くなる (参考論文)。

どの低下が見られた。特に、H4K16Ac の低下は顕著で、染色強度による定量値は SD と負に大きく相関した (相関係数 $r = -0.86$)。さらに、trichostatin A (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) は、NLS-c-Abl の活性を阻害することなく、SD と H4K16Ac の変化を阻害した。よって、核内 c-Abl によるチロシンリン酸化反応が、ヒストン脱アセチル化反応を介してクロマチン構造を制御していることが示された。

c-Abl は DNA 損傷時に核移行が促進される。そこで、DNA 損傷時において c-Abl がクロマチン構造を変化させるか調べた。野生型 c-Abl を発現させた細胞に、adriamycin (ADR) で DNA 損傷を与えたところ、細胞質に局在する c-Abl の一部が核移行することを確認した。SD および H4K16Ac を測定したところ、ADR 処理により、SD の上昇、H4K16Ac の低下が見られた。これらの変化は、imatinib で抑制された。さらに、内在性 c-Abl の阻害、あるいはロックダウンは、ADR による SD の上昇、H4K16Ac の低下を有意に抑制した。これらから、DNA 損傷時に核移行した c-Abl がクロマチン構造変換およびヒストン脱アセチル化を誘導することが示された。

上記した核内 c-Abl によるヒストン修飾は、一般に遺伝子発現を負に制御していることが知られている。がん抑制遺伝子 RASSF1A の転写もそのプロモーター領域におけるヒストン修飾により負に制御されている。そこで semiquantitative RT-PCR を用いて、RASSF1A の mRNA 量を定量したところ、NLS-c-Abl の発現により低下することがわかった。よって、核内 c-Abl によるヒストン修飾およびクロマチン構造変換は、転写を制御していることが示唆された。

以上から、核内 c-Abl によるチロシンリン酸化反応が、ヒストン脱アセチル化を介してクロマチン構造変換に関わることを見出すことができた。DNA 損傷によりこの機能が促進されたことから、DNA 損傷応答においてこのクロマチン構造変換が重要な働き、特に転写制御を担っていることなどが考えられる (図 2)。現在、c-Abl の核内基質探索により、ヒストン修飾およびクロマチン構造を動かすメカニズムを解析中である。

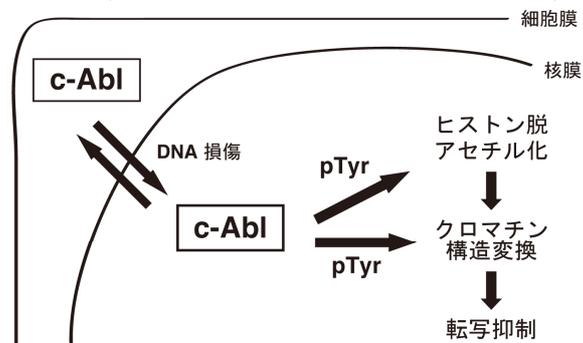


図 2. 核内 c-Abl によるクロマチン構造変換誘導のモデル
DNA 損傷によって核移行が促進される c-Abl チロシンキナーゼは、核内でヒストン脱アセチル化を介してクロマチン構造を変化させ、転写を抑制的に制御していると考えられる。

(発表論文 1) **Aoyama, K.**, Fukumoto, Y., Ishibashi, K., Kubota, S., Morinaga, T., Horiike, Y., Yuki, R., Takahashi, A., Nakayama, Y., and Yamaguchi, N. : Nuclear c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation induces chromatin structural changes through histone modifications that include H4K16 hypoacetylation. *Exp. Cell Res.*, 317: 2874-2903, 2011.

(発表論文 2) Fukumoto, Y., Obata, Y., Ishibashi, K., Tamura, N., Kikuchi, I., **Aoyama, K.**, Hattori, Y., Tsuda, K., Nakayama, Y., and Yamaguchi, N. : Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*, 62: 73-82, 2010.

(参考論文) Takahashi, A., Obata, Y., Fukumoto, Y., Nakayama, Y., Kasahara, K., Kuga, T., Higashiyama, Y., Saito, T., Yokoyama, K.K., and Yamaguchi, N. : Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp. Cell Res.*, 315: 1117-1141, 2009.