

クロマチン暗号解明と疾患治療への応用 (CREB/CBPをアンカーとして)

— Arthritis Investigator Award Hulda Irene Duggan Arthritis Investigator Award を受賞して —

浅原 弘 嗣^{1, 2, 3)}

キーワード；クロマチン，転写制御，慢性関節リウマチ

要 旨

それぞれがノーベル賞の対象となった G プロテイン，サイクリック AMP，プロテインカイネース A という細胞内シグナル情報伝達メインストリームの遺伝子発現における最終的なゴールが転写因子 CREB (サイクリック AMP レスポンスエレメント結合タンパク) だった。CREB 研究はさらに，世界で初めての転写因子のリン酸化による遺伝子発現機構の証明，そのシグナル依存的なコアクティベータ

一の発見と，いよいよ全貌が明らかとなってきた基本転写因子と外界からのシグナルの接合調節メカニズムの解明においても常に分子生物学をリードしてきた。

我々は CREB 研究を通し，クロマチンを加味した新しい遺伝子発現機構を解明し，さらには遺伝子治療，再生医療への応用において，最先端の分子生物学と臨床医学をまっすぐに結ぶストラテジーとなりうることを示してきた。丁度，打鍵器のように CREB をツールとして使い，その生体内情報系を震わせてやることで，CREB 周辺の組織特異的なモレキュラーメカニズムが次々と明らかになってきている。

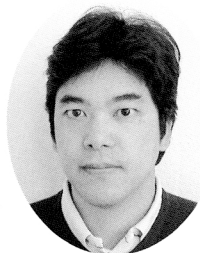
ポストゲノム時代の溢れかえる分子情報のノイズの波に押し流されないためのアンカーとして，そしてサイエンスにおける次のパラダイムの扉をあける鍵として，古くて新しい CREB そしてクロマチン研究を，私たちの研究を中心に紹介したい。

- 1) アメリカ，スクリプス研究所
- 2) 科学技術振興事業団，さきがけ研究21
- 3) 岡山大学医学部整形外科

論文請求先：The Scripps Research Institute
Department of Molecular and Experimental
Medicine
10550 North Torrey Pines Road, MEM161, La
Jolla, CA 92037, USA

電話：1-858-784-9026 FAX：1-858-784-2744
E-mail：asahara@scripps.edu

● プロフィール ●



外科医としてメスをもってしても完治することのできなかった整形外科難病，すなわち慢性関節リウマチ，骨軟部腫瘍，脊髄損傷，などの患者さんへ新しい治療を届けるとの誓いをもって，直接病態にせまるために，患部を切り，病理を切り，細胞膜をきり，そして核膜をきってあらわれたのが，転写因子／クロマチンでした。病理検体をいかに転写研究の手法にのせるか，岡山大学，井上一教授，小川紀雄教授の指導のもと研究を開始し，引き続き，聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターにて，西岡久寿樹教授，現東京大学，山本一彦教授，現筑波大学，住田孝之教授，現獨協大学，小端哲二教授の指導のもと，さらに，ハーバード大学，ソーク研究所において，Montminy教授の研究室にて研究を続けさせて頂きました。その後，スクリプス研究所ならびに科学技術振興事業団のさきがけ21研究において独立した研究者となるにあたり，運動器科学（ロコモーターサイエンス）を自分のフィールドとして，最後の遺伝子暗号といわれる新しいクロマチン制御機構の研究とその応用による癌，関節炎の治療をおこなっています。これらの研究をとおして，今後サイエンスの用（患者，社会への還元）と美（他の学問との競争，またより純粋なサイエンスのテーマ）を追求できればと思います。

(岡山大学医学部 平成4年卒業)

はじめに

病理組織を切り、細胞膜を切り、核膜を切り最後に現れる転写因子とクロマチン、そしてそれにより制御される遺伝子発現は、それ自体が生物の営みにも例えられるかのごとくダイナミックで、そのシステムの解明が多くの医学、分子生物学者の興味を引き寄せてきた。その意味で、転写因子 CREB (サイクリック AMP レスポンスエレメント結合タンパク) は、それぞれがノーベル賞の対象となった G 蛋白質、サイクリック AMP (cAMP)、プロテインカイネース A (PKA) という細胞内シグナル情報伝達メインストリームの遺伝子発現における最終的なゴールとして、さらに、転写因子のリン酸化による遺伝子発現機構の最初の報告として、分子生物学をリードしてきた。また、そのシグナル依存的なコアクティベーター CBP の発見により、いよいよ全貌が明らかとなってきた基本転写因子と外界からのシグナルの接合調節メカニズムの解明においても新しいパラダイムを提供している。

そんな中で、驚くことに、転写コファクター CBP がクロマチンをアセチル化修飾し、遺伝子発現を調節していることが示唆されるようになった。本稿では、クロマチンを介した CREB/CBP 転写メカニズムの研究を通して、最後の遺伝子暗号とも呼ばれるクロマチンコードを解く先陣争いのアップデートとリウマチ性疾患を中心とした医療応用について概説する。

1 A. クロマチンと遺伝子発現制御

真核生物において DNA はヌクレオソームを基本単位としたクロマチン構造をとっている。ヌクレオソームは 146bp の DNA がヒストン H2A, 2B, H3, H4 からなるコアヒストンに巻き付いた構造で、さらにヒストン H1 がヌクレオソームのリンカーとしてモノヌクレオソームをつなぎ合わせクロマチン構造をつくる¹⁾。この、クロマチン構造は転写において抑制的にはたらく。試験管内における転写再構成による実験では、多くの転写因子がクロマチン構造をとらない DNA の上では活性があるのに対し、クロマチン DNA 上では転写活性が抑制さ

れる。最近になり、CBP/P300, PCAF, SRC などはコアヒストンをアセチル化することによりクロマチンを修飾することが明らかとなってきた。さらにはヒストンのリン酸化、メチル化はクロマチン構造の弛緩をきたし、DNA の暗号に並ぶ、最後の遺伝子暗号となる可能性が示唆されてきた。我々はこの、新しい遺伝子暗号であるクロマチンコードの謎ときを CREB/CBP をツールとして用いながら行っている。

1 B. クロマチン上での CREB の二つの活性化ドメインの遺伝子発現における協調制御

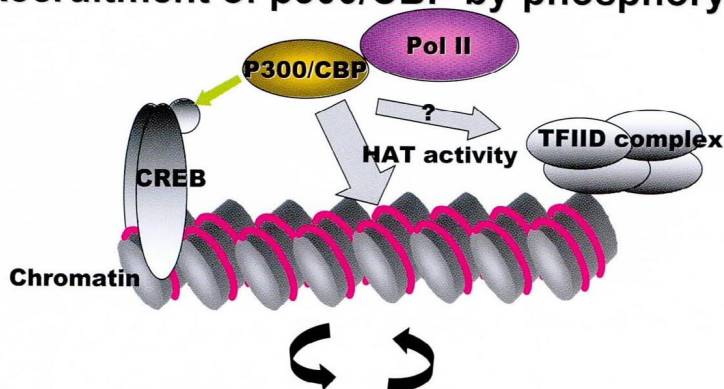
CREB は cAMP などの細胞内シグナルに応じて標的遺伝子発現を誘導する転写調節因子である。CREB には KID ドメインと Q2 ドメインの二つの転写調節ドメインが存在し、このうちの KID ドメインが cAMP で刺激された PKA によってリン酸化され、CBP と結合する。

我々はクロマチン DNA を試験管内に再構成することで、クロマチン状態の DNA を用いた場合には普段転写活性は抑制されており、リン酸化された CREB に結合した p300 の HAT 活性により、その抑制が解除されることを示した。つまり、HAT 活性が、プロモーター領域におけるヌクレオソームの修飾と基本転写装置の誘導を介し、標的遺伝子発現を制御していることを示している²⁾ (図 1)。

1 C. クロマチン上での CREB 依存的な脱リン酸化と脱アセチル化制御の協調

これまでの HAT の作用機構の研究では、ヒストンのアセチル化が及ぼすクロマチン構造の変化に重点がおかれている。HAT は、その逆の反応を行う脱アセチル化酵素 (HDAC) とともにヒストン分子上のアセチル化状態を制御している。我々は HAT による CREB の活性制御のメカニズムのひとつとして、クロマチンのアセチル化の状況が転写因子のリン酸化修飾状態に影響を及ぼすことを発見した³⁻⁵⁾。すなわち、細胞内の HAT と HDAC が調節したクロマチンのアセチル化状態が、転写調節因子のリン酸化状態を変化させるという機構と、それによる CREB 活性の制御機構が考えられ

1st: Recruitment of p300/CBP by phosphorylation of CREB



2nd: Recruitment of TFIID and Pol II by P300/CBP

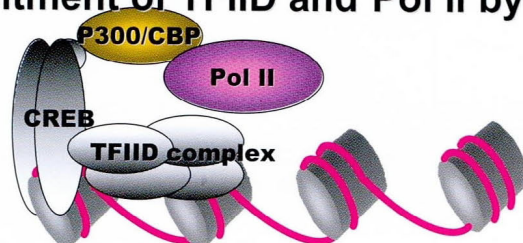


図1 クロマチンによる CREB の段階的遺伝子発現調節

た. PKA による CREB のリン酸化は CRE プロモーター配列上に周期的に再構成されたヌクレオソームにより阻害され, テンプレート DNA に結合したヌクレオソームを p300によりアセチル化するとレスキューされる事実もこの機構の存在を裏付けている. さらに, 最近, 我々は CREB 依存的転写活性のストップ機構におけるフォスファターゼと HDAC の相互作用を検討, 転写の時間軸をこの二つの負の調節機構が制御していることを確認している¹¹⁾.

1 D. CREB/CBP シグナルの蛋白メチル化制御

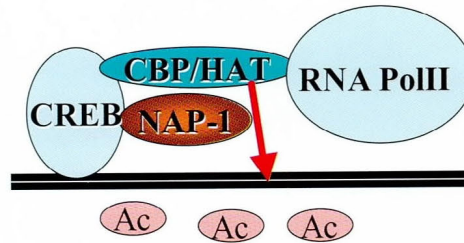
それでは CBP 制御はどのようになされているのだろうか? これまでの研究から, CBP は general な機能を担うものの, ほとんどの細胞では, 全ての需要を同時に賄うだけの分量は存在しないことが示されている. そして限られた CBP との相互作用は常に競合的であり, CBP を枯渇させる実験では phenotype にまで影響することがわかってきた. 細胞内では CBP の需要に対応するための, 状況に応

じた切り替えが起こっているはずなのである. しかし, CBP の異なるパートナーを切り替える「スイッチ」の仕組みについては解明されていなかった. この「スイッチ」メカニズムの一端が Evans らとの共同研究によって明らかにされた. CARM1 が CBP の KIX ドメインのアルギニン残基をメチル化することを明らかにした. KIX ドメインは CREB と相互作用するドメインであるため, CARM1 による KIX ドメインのメチル化は CBP と CREB 間の相互作用を不安定にする. 結果として CREB による転写活性化が起こらなくなり, また KIX ドメインを介さない相互作用に利用可能な CBP 量が増加するので, 「スイッチ」が入れ代わると考えられる⁶⁾.

1 E. クロマチンの上での転写と複製のリンク

さらに, クロマチンを修飾する一連のファクターは転写おいてのみならず, 遺伝子複製においても大きな役割をはたしていることが示唆されてきている. 例えば, クロマチン構造において大きな役割を果たすのが NAP-1 というヒストンシャペロン蛋

Transcription



DNA assembly and replication

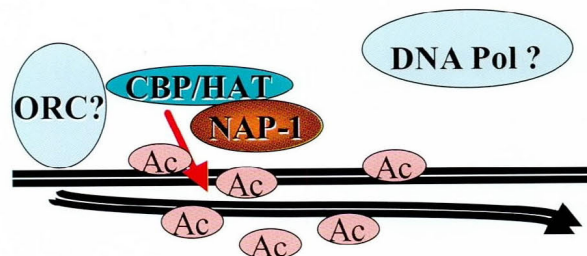


図2 CBP/NAP-1による遺伝子発現と遺伝子形成の協調制御

白であるが、この NAP-1は CBP と協調して転写と DNA assembly の両方に働いていることがあきらかとなった⁷⁾。(図2) とくに DNA assembly において CBP はその HAT を使い効率を助けている。生命の定義を個の表現と存続(生殖)とするなら、それは DNA・クロマチンにおいて、それぞれ転写と複製とおきられるかもしれない。そのふたつの営みを巧みにリンクさせているクロマチン関連因子には生命の存在という大問題にも何らかの suggestion を与えてくれる可能性をもっている。

2 A. 疾患と CREB/CBP

以上のように、DNA とヒストンからなる遺伝子のクロマチン構造は、遺伝子のロック(鍵)機構ともいえ、最近の研究によりその動的な変化が遺伝子の発現制御にダイナミックな役割を果たしていることが明らかになってきた。

以上の知見、すなわち新しいクロマチン暗号が病態解明、疾患治療にいかに役立つであろうか。私たちは、すでに、神経、癌、血管新生などおおくの分野において、その暗号の意義をたしかめ、医療応用をおこなっているが、ここでは、関節疾患をモデ

ルに行った研究について概説したい。

生物をして、動物たらしめる運動器(ロコモータシステム)において、関節は重要な組織である。その主要要素である軟骨細胞は初期軟骨凝集から内軟骨性骨形成にいたるまで動物を形どる四肢「形成」において中心的な役割を果たしており、「生物の形づくり」において大変興味深い対象である(図3)。きたる高齢化社会において、関節炎の治療と失われた骨、軟骨組織の修復、再生医療の確立は急務であるが、そのために分子発生学レベルでの炎症、免疫メカニズムそして軟骨組織形成メカニズムの解明が必須とされている。我々は上記のクロマチン暗号の知見を応用、これらの病態解明と治療戦略を提示することができた。

2 B. リウマチ疾患における転写研究

慢性関節リウマチは滑膜組織の異常増殖と免疫、炎症細胞の浸潤によって全身の関節が破壊される難病である。罹患関節の増殖滑膜は、メタロプロテアーゼ、一酸化窒素などの組織障害性因子あるいは IL-6 などの炎症性サイトカインを産生し、関節、軟骨組織を破壊してゆく。これらのリウマチに関係す

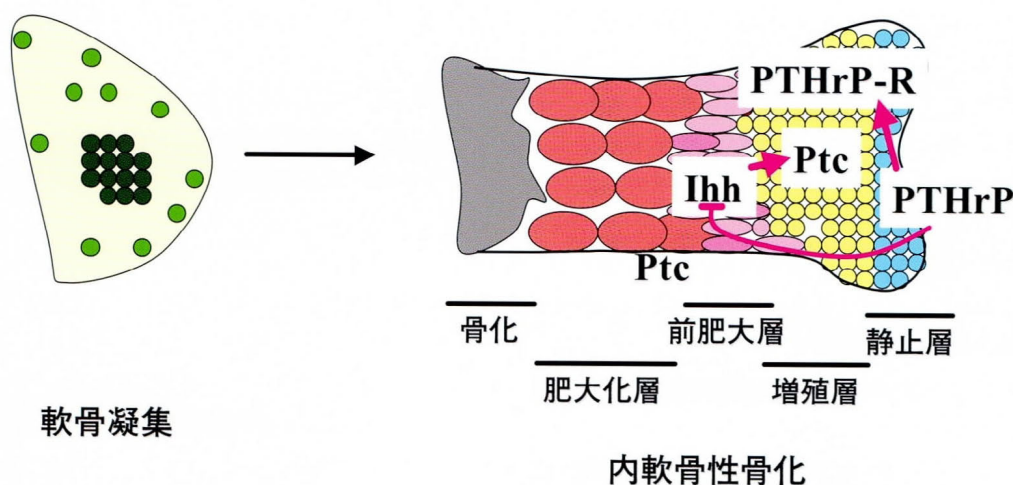


図3 軟骨細胞の四肢形成における役割

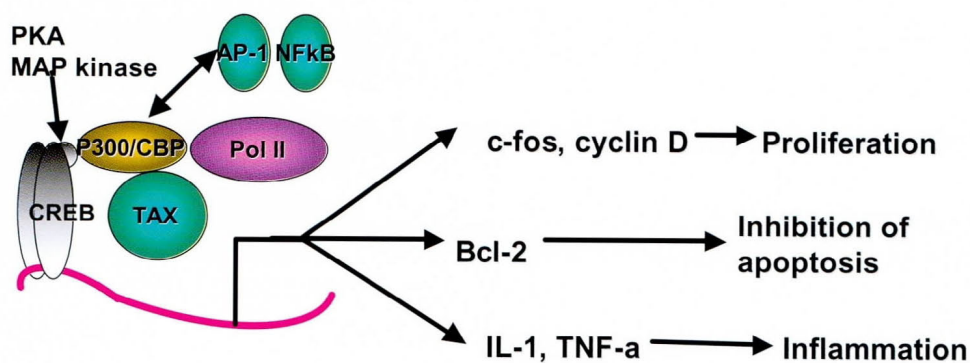


図4 CREB/CBP のリウマチ病態への関与

ると考えられる重要な遺伝子群のプロモータ、すなわち遺伝子スイッチ部分に転写因子AP-1とNF-kBの結合サイトがみられる。これらの転写因子は実際慢性関節リウマチ滑膜細胞において活性化されていること、すなわちスイッチオンになっていることが、免疫染色、あるいはゲルシフトを用いた研究によって明らかにされた^{8, 9)}。さらに、慢性関節リウマチの治療薬であるステロイドや金のターゲットが転写因子AP-1とNF-kBであることが示唆された。しかしながら、さらなる効果的な治療法の確立、すなわち副作用を抑え、より特異的な作用を得るためには、従来の古典的転写理論ではまかないきれないところにきている。我々は、CREB/CBPがこれらの転写因子を包括し、病態に関与していることを示した。さらにクロマチン構造を遺伝子導入によって

人為的に修飾することで、疾患モデル動物においては治療効果を確認することができた。また、その特異的な治療効果のある分子において、経口投薬の可能な薬剤のスクリーニングを行っており、クロマチンの制御という切り口から、新しい治療戦略を生み出している(図4)。

2C. 関節再生医療とCREB

さて、失われた軟骨形成においても、我々のクロマチンの知見から軟骨にとどまらず、広く発生学に新しい概念をもたらす発見があった(未発表)。ここではキープレイヤーであるPTHrPのターゲットとしてのCREBとその周辺の組織特異的なモレキュラーメカニズムを概説したい。

PTHrPは元々悪性腫瘍に併発する高カルシウム

血症に関与する液性因子として同定されたものであるが、Ihh は PTHrP レセプターを刺激することで軟骨細胞を増殖軟骨層に留めるように働き、肥大軟骨化することを遅延させる。PTHrP レセプターは G-protein にカップルして働くレセプターであり cAMP をセカンドメッセンジャーとしている。そしてこのセカンドメッセンジャーとしての cAMP は PKA を介し、CREB の133番目のセリンをリン酸化することにより遺伝子発現をコントロールしていることが明らかとなった。また、成長軟骨組織における活性型であるリン酸化 CREB をリン酸化 CREB 特異的抗体にて免疫染色したところ、CREB は増殖軟骨層において特異的にリン酸化されていることが明らかとなった¹⁰⁾。

2 D. CREBドミナントネガティブトランスジェニックマウスは四肢短小を示す

さらに、CREB のとその下流のシグナルの解析において、個体レベルでの研究が必要とされた。CREB 欠損マウスでは肺の発達不全、T細胞の分化不全を除くと骨軟骨成長を含む他の組織の分化は正常であったが、これは CREB ファミリーの CREM や ATF1 (activating transcription factor 1) によ

て機能が代償されることによる可能性が考えられた。

そこで、我々は内軟骨骨化の過程に CREB ファミリーがどの程度関与するものかをドミナントネガティブ様式の CREB インヒビター (A-CREB と名付けられている) を、軟骨細胞に特異的な collagen typeII のプロモータ・エンハンサーでコントロールすることで調べた。A-CREB は CREB のロイシンジッパーに加え CREB, ATF1, CREM との結合部位にまで延びた酸性基を有しており、これによりワイルドタイプのタンパクが DNA に結合するのを阻止している (Ahn et al., 1998)。A-CREB は CREB ファミリーに特異性が高く他の bZIP ファミリーには影響しないことがわかっている。

A-CREBトランスジェニックマウスは短肢型のフェノタイプを呈したが、これは CREB がリン酸化、活性化される増殖軟骨層における細胞増殖の減少に引き続き生ずる分化不全によるものであった (図5)。このマウスではワイルドタイプのマウスに比べて、形成途上にある骨に於いて重要な信号伝達系分子である indian hedgehog receptor patched (Ptc) の発現が著しく低下していた¹⁰⁾。合わせて考えてみると、こうした結果は CREB ファミリー

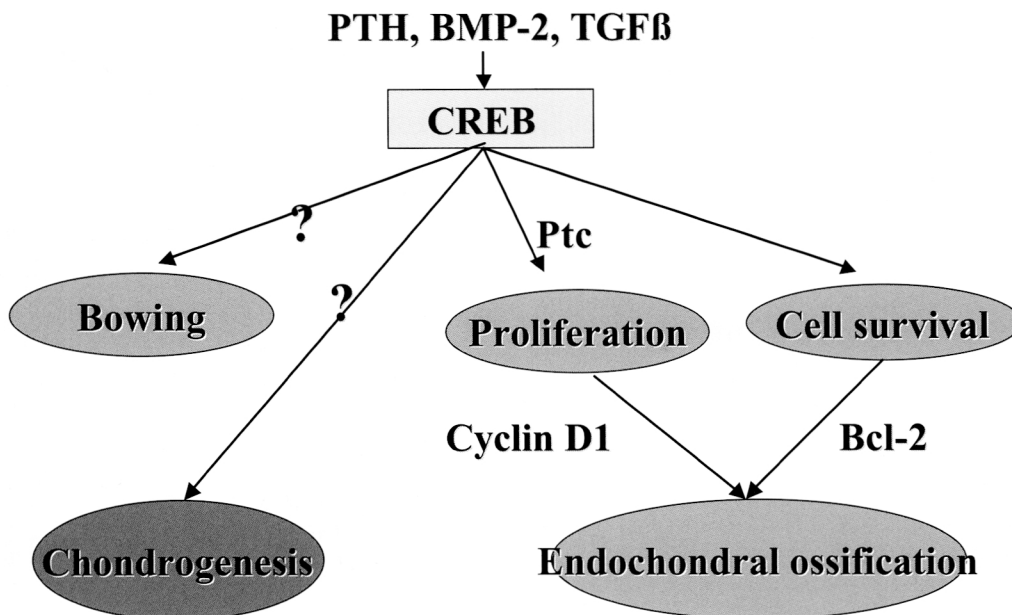


図5 骨形成におけるCREBの役割

の転写因子が発生の過程で<PTHrP-CREB-Ptch>という経路で細胞増殖をコントロールしていることを示すものである。

2E. クロマチンからみた疾患治療戦略

以上は、内軟骨骨化における CREB の役割をのべたが、四肢発生を決定づける最初のステップである軟骨凝集と軟骨細胞分化においても、TGF/BMPのシグナルをうけ CREB が重要な役割を果たしていることがわかり、そのメカニズムが同定された(未発表)。これは、クロマチンを加味することで、今まで謎であった発生メカニズムに、新しい概念をもたらすかもしれない。同時に、我々は神経再生、癌、血管新生など多岐にわたる医学分野においてクロマチン暗号からみた新しい知見を得ており、その全貌解明に全力をあげている。

今後の展望

クロマチン研究は、長い歴史があるにもかかわらず、その爆発的な飛躍は始まったばかりである。本稿で紹介したクロマチン研究の最新の知見は、副作用を抑えたより効果的な創薬、遺伝子治療における効果的なベクター開発、疾患責任遺伝子の発現異常などを考えるときなしには語れないところまでできている。ポストゲノムプロジェクトの大きな柱の一つとして、クロマチン研究をあげたい。

謝 辞

本研究は、Montminy 教授研究室での研究を中心に、多くの方との共同研究の成果であり、著者がアメリカ arthritis investigator award, アメリカ hulda irene duggan arthritis investigator award として2002年に表彰をうけました。また、発生学、再生医療の分野は科学技術振興事業団さきがけ研究21として、リウマチ研究の分野はアメリカ国際リウマチ研究基金からの研究費によって、著者が Principle Investigator (独立研究室主宰) として研究を続けています。本稿の内容につきまして、岡山大学 井上一教授、ソーク研究所 Montminy 教授に貴重な助言、ご指導をいただきましたことをここに深謝いたします。

文 献

- 1) Jones KA, Kadonaga JT (2000) Exploring the transcription-chromatin interface. *Genes and Development*, 14, 1992–96
- 2) Asahara H, Santoso B, Guzman E, Du K, Cole PA, Davidson I, Montminy M (2001) Chromatin dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB. *Mol Cell Biol*, 21(23): 7892–7900.
- 3) Michael LF, Asahara H, Shulman AI, Montminy M (2000) Analysis of a cAMP responsive activator reveals a novel mechanism by which histone acetyl transferases regulate expression of signal dependent genes. *Mol Cell Biol*, 20 (5): 1596–603.
- 4) Asahara H, Dutta S, Kao HY, Evans RM, Montminy M (1999) Pbx-Hox Heterodimers Recruit Coactivator-Corepressor Complexes in an Isoform-Specific Manner. *Mol Cell Biol*, 19 (12): 8219–8225
- 5) Du K, Asahara H, Jhala US, Wagner BL, Montminy M (2000) Characterization of a CREB gain-of-function mutant with constitutive transcriptional activity *In vivo*. *Mol Cell Biol*, 20 (12): 4320–7.
- 6) Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM (2001) A Transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science*, 294: 2507–2511.
- 7) Asahara H, Tartare-Deckert S, Nakagawa T, Ikehara T, Hirose F, Hunter T, Ito T, Montminy M. Dual roles of p300 in chromatin assembly and transcriptional activation in cooperation with nucleosome assembly protein 1 *in vitro*. *Mol Cell Biol*. 2002 May; 22 (9): 2974–83.
- 8) Asahara H, et al. (1997) Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*, 40 (5): 912–8.
- 9) Asahara H, et al. (1995) High DNA-binding activity of transcription factor NF-kappa B in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Mol Biol Int*, 37 (5): 827–32
- 10) Long F, Schipani E, Asahara H, Kronenberg H, Montminy M. The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development*. 2001 128 (4): 541–50.
- 11) Canettieri G, Morantte I, Guzman E, Asahara H, Herzig S, Anderson SD, Yates JR, Montminy M. Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nature Struet. Biol*. 2003 10: 175–81