

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07059

研究課題名(和文)オートファジー関連遺伝子の発現制御に関する研究

研究課題名(英文) Expressional analysis of autophagy-related genes

研究代表者

吉田 健一 (Yoshida, Kenichi)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：20345036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは飢餓時における不要タンパクのバルク分解・リサイクルシステムとしての役割に加え、癌をはじめとする様々な疾患の病態に関与することが知られている。本研究では、オートファジーに関与するMAP1LC3遺伝子ファミリーに着目し、ヒト子宮頸がん細胞株におけるエピジェネティック制御が発現に及ぼす影響の一端を解明した。また、小胞体ストレスに関与する転写因子CHOPに着目し、ULK1およびULK2遺伝子プロモーター内のCHOP応答配列を解析した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is known to participate in the condition of a patient of various diseases including cancer in addition to the role as the bulk degradation and the recycling system of the unnecessary protein at the time of the starvation. In this study, I paid my attention to the MAP1LC3 gene family which participated in autophagy and elucidated one end of the influence that epigenetic control in the human uterine cervix cancer cell strain gave to expression. In addition, I paid my attention to transcription factor CHOP which participated in endoplasmic reticulum stress and analyzed the CHOP responsive element in ULK1 and the ULK2 gene promoter.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーは飢餓時における不要タンパクや細胞小器官のバルク分解・リサイクルシステムとしての役割に加え、癌や神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の病態に深く関与することが知られている (Mizushima et al., 2011; Choi et al., 2013)。最近、オートファジー関連遺伝子(以下 ATG 遺伝子)のエピジェネティックな発現制御が注目されており、いくつかの癌において MAP1LC3、ATG5 や BECN1 などのエピゲノム異常が報告されている (Sui et al., 2015)。

(2) また、小胞体は分泌および膜タンパク質の折りたたみを担う細胞小器官であるが、折りたたみが正しく行われなかったタンパク質が蓄積すると小胞体ストレスと呼ばれる状態になる。近年、小胞体ストレスが長時間持続する場合には、アポトーシスを誘導する経路とオートファジーが誘導される経路がはたらくことが報告されている (Ogata et al., 2006; Tabas & Ron, 2011)。しかし、移行経路の詳細については明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、オートファジー誘導のマーカーとして知られる MAP1LC3 遺伝子ファミリー (MAP1LC3A、MAP1LC3B および MAP1LC3C) に着目し、ヒト子宮頸がん細胞株におけるエピジェネティック制御とその役割の解明を目指した。

(2) また、小胞体ストレス下で高発現している転写因子であり、かつ ATG 遺伝子の発現制御への関与が知られている CHOP (C/EBP-homologous protein) に着目し、ATG 遺伝子プロモーター内の CHOP 応答配列を解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa (RCB0007、理研バイオリソースセンター) および GFP-MAP1LC3B を安定的に発現する HeLa (東大・水島研究室より供与)、ヒト肺がん細胞株 A549 (RCB3677、理研バイオリソースセンター) およびヒト肺由来線維芽細胞 TIG-1 (JCRB0501、ヒューマンサイエンス研究資源バンク、現・JCRB細胞バンク) は、1%非必須アミノ酸を含む Minimum Essential Medium (以下 MEM) で、ヒト子宮頸がん細胞株 Ca Ski (RCB1947、理研バイオリソースセンター) および ME-180 (RCB2106、理研バイオリソースセンター) は RPMI1640 で、同じくヒト子宮頸がん細胞株 (以下すべて JCRB細胞バンクより入手) SKG-I (IF050308)、SKG-II (IF050309) および SKG-IIIa (IF050310) は Ham 's F12 Nutrient Mixture で、BOKU (IF050323)、HCA-1 (JCRB1153) お

よび HCSC-1 (JCRB1205) は Eagle 's MEM で継代培養 (5% CO₂、37 °C) した。すべての培地は 1%抗生物質-抗菌性物質および 10%牛胎仔血清を含み、Eagle 's MEM (和光純薬) 以外すべてサーモフィッシャーサイエンティフィックより入手した。

(2) 試薬

5-Aza-2 ' -deoxycytidine (以下 5-aza-CdR、シグマ) は 3 μM となるようにジメチルスルホキシド (以下 DMSO) に、Trichostatin A (以下 TSA、シグマ) は 0.3 μM となるようにエタノールに、Splitomicin (和光純薬) は 400 μM となるように DMSO に、MS-275 (Cayman) は 4 μM となるように DMSO に溶解した。

(3) 定量的リアルタイム RT-PCR

RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて抽出した RNA (500 ng) は Deoxyribonuclease I (ライフテクノロジーズ) 処理し、High-capacity cDNA reverse transcription kit (アプライドバイオシステムズ) を用いて cDNA を合成した。PCR 反応液 (20 μl) の組成は cDNA 1 μl、TaqMan gene expression assay primer 1 μl および Taqman universal PCR master mix 10 μl (ともにアプライドバイオシステムズ) であり、7500 fast real-time PCR systems (アプライドバイオシステムズ) にて 95 °C 10 分変性後、95 °C 15 秒と 60 °C 1 分を 1 セットとした PCR 反応を 40 サイクル実施した。内在性コントロールとして GAPDH (Assay ID Hs02758991_g1) を用い、比較 Ct 法 (Ct 法) で解析した。MAP1LC3A、MAP1LC3B および MAP1LC3C の検出に用いた TaqMan primer の Assay ID は、それぞれ Hs01076567_g1、Hs00797944_s1 および Hs01374916_m1 である。

(4) バイサルファイトシーケンシング

細胞から抽出したゲノム DNA (3 μg) は EcoRI 処理後、MethylEasy Xceed rapid DNA bisulphite modification kit (タカラ) を用いて非メチル化シトシンをウラシルに変換した。PCR 反応は EpiTaq HS (タカラ) で、94 °C 1 分変性後、94 °C 30 秒、56 °C 1 分、72 °C 30 秒を 1 セットとした PCR 反応を 40 サイクル実施した。予備伸長は 72 °C で 5 分行った。TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (ライフテクノロジーズ) で PCR 産物をクローン化後、得られた塩基配列は QUMA (http://quma.cdb.riken.jp/index_j.html) で解析した。85%以上の変換効率を示すクローンのみデータとした。

(5) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

24 ウェルプレート 1 ウェルあたり、0.2 μg の pGL3 レポータープラスミド (プロメガ) 共発現の場合、0.2 μg の発現ベクター および 0.6 ng の *Renilla* ルシフェラーゼレポータープラスミド pRL-TK (プロメガ) を 1 μl の

FuGENE6 (ロシユ)と共に 20 μ l の MEM 内で 15 分間室温にてインキュベートし、トランスフェクション 24 ~ 48 時間後、Dual luciferase reporter assay kit (プロメガ)を用いて、細胞内のルシフェラーゼ活性を GloMax20/20n luminometer (プロメガ)で測定した。1 サンプルあたり 3 ウェルの平均値を求め、ウェル間のトランスフェクション効率はホタルルシフェラーゼ活性値 / *Renilla* ルシフェラーゼ活性値で補正した。

(6) ウェスタンブロッティング

NuPAGE LDS Sample Buffer と 0.5 M DTT (サーモフィッシャーサイエンティフィック)を抽出タンパクに添加し、70 °C で 10 分間処理した。NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gel を用いた SDS-PAGE 後、タンパクは Hybond-P (GE ヘルスケア)に転写した。その後、5%スキムミルク (和光純薬)および 0.1% のポリオキシエチレン(20)ソルピタンモノラウレート (和光純薬)を含む PBST でブロッキングし、抗体反応を実施した。発色は Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (プロメガ)を用い、検出したバンドは Quantity One 1-D Analysis Software (バイオラッドラボラトリーズ)で定量化した。

(7) パンクタフォーメーションアッセイ

共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 (オリンパス)を用いて取得した画像におけるパンクタを計測した。

4. 研究成果

(1) DNA 脱メチル化とヒストンアセチル化促進時における ATG 遺伝子の網羅的発現解析

DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-aza-CdR (3 μ M) を 72 時間投与後、ヒストン脱アセチル化酵素 (以下 HDAC) 阻害剤 TSA (0.3 μ M) を 24 時間 HeLa 細胞に連続投与し、33 種類の ATG 遺伝子 (ULK1, ULK2, ATG2A, ATG2B, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, BECN1, ATG7, MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, ATG9A, ATG9B, ATG10, ATG12, ATG13, ATG14, ATG16L1, ATG16L2, WIPI1, WIPI2, WIPI3, WIPI4, DRAM1, C12orf44 および RB1CC1) の mRNA 発現変動を定量的リアルタイム RT-PCR で解析した。結果、MAP1LC3A と MAP1LC3C の発現量上昇が顕著であり、それら以外の ATG 遺伝子の発現はほとんど変化しなかった。

(2) エピジェネティクスによる MAP1LC3 遺伝子ファミリーの発現制御

MAP1LC3 遺伝子ファミリー (MAP1LC3A, MAP1LC3B および MAP1LC3C) の内、HeLa 細胞への 5-aza-CdR の 72 時間単独投与の結果、MAP1LC3C のみ約 10 倍程度の発現増加を示した。DNA 脱メチル化に伴う発現変化を経時的 (5-aza-CdR を 2, 4, 8, 12, 24 および 48 時

間投与)に解析した結果、MAP1LC3C mRNA の転写は投与 8 時間後までは変化せず、投与 12 時間後から亢進した。5-aza-CdR の 72 時間投与と同程度である約 10 倍程度の発現増加は、投与 24 時間後に確認できた。

次に、HeLa 細胞以外のヒト子宮頸がん細胞株である Ca Ski および ME-180 を用い、5-aza-CdR 単独投与後、定量的リアルタイム RT-PCR で MAP1LC3C の mRNA 発現解析を実施した。結果、Ca Ski と ME-180 の両細胞においても、MAP1LC3C の発現増加を認めた。この際、内部コントロールとして GAPDH 以外に α アクチンと 18 リボソーム RNA も用いた。結果、GAPDH に加えて、 α アクチンと 18 リボソーム RNA を内部コントロールとした場合でも、5-aza-CdR 単独投与による MAP1LC3C の発現増加を検出することができた。

興味深いことにヒト子宮頸がん細胞株以外のヒト肺がん細胞株 A549 およびヒト正常肺線維芽細胞株 TIG-1 に 5-aza-CdR を単独投与した場合、MAP1LC3 遺伝子ファミリーの発現に変化は認められなかった。

5-aza-CdR 投与による MAP1LC3C mRNA の転写亢進は、GFP-MAP1LC3B を安定的に発現する HeLa 細胞株でも確認できた。MAP1LC3B タンパク (フォーム II) のオートファゴソーム膜局在 (パンクタ形成) を指標にオートファジーの誘導を評価した。5-aza-CdR と TSA の連続投与の結果、パンクタ数はコントロールである DMSO 投与が約 5 個であるのに対し、約 20 個と増加した。また、MS-275 投与においても、経時的なパンクタ数の増加を確認し、ウェスタンブロッティングによる解析では、MAP1LC3 タンパクのフォーム I および II の増加を確認した。

HeLa 細胞で HDAC1 を阻害するとオートファジーが誘導されると報告されている (Oh *et al.*, 2008)。そこで、TSA 以外の HDAC 阻害剤として、Splitomicin と MS-275 が MAP1LC3C の発現に与える影響を解析した。5-aza-CdR との連続投与の結果、Splitomicin は TSA 同様、MAP1LC3C の発現を約 10 倍程度上昇させた。一方、5-aza-CdR と MS-275 の連続投与の結果、MAP1LC3C mRNA 量は約 80 倍増加した。

(3) バイサルファイトシーケンシングによるメチル化状態の解析

CpG island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) を用いて MAP1LC3C 遺伝子の CpG アイランドを調べた結果、転写開始点 (+1) 上流の -592 から -388 bp およびエキソン 3 を含む +423 から +785 bp の 2 つの領域を確認できた。まず、HeLa 細胞に DMSO または 5-aza-CdR を 72 時間投与後、ゲノム DNA を抽出し、バイサルファイトシーケンシングにより CpG 配列シトシンのメチル化状態を確認した。結果、-592 から -388 bp 領域内の 7 ヶ所のメチル化率は 89.9% (17 クローンの平均値)、5-aza-CdR 投与後のメチル化率は 48.0% であった (14 クローンの平均

値)。一方、+423 から+785 bp 領域内の 13 ヶ所のメチル化率は 35.9% (9 クローンの平均値) 5-aza-CdR 投与後のメチル化率は 28.8% であった (8 クローンの平均値)。

5-aza-CdR 単独投与した Ca Ski 細胞では、MAP1LC3C より MAP1LC3A mRNA 量の増加がより顕著であった。まず、UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) より、MAP1LC3A 遺伝子の転写開始点を+1 としたとき、-365 から+818 bp の CpG アイランドを確認した。バイサルファイトシーケンシングにより -419 から+14 の領域について CpG 配列シトシンのメチル化状態を解析した。結果、CpG 配列シトシンのメチル化率は約 99% であった (13 クローンの平均値)。

(4) 子宮頸がん細胞株における MAP1LC3 遺伝子ファミリーのエピジェネティックな発現制御

9 種類のヒト子宮頸がん細胞株 (SKG-I、SKG-II、SKG-IIIa、BOKU、HCA-1、HCSC-1、Ca Ski、ME-180 および HeLa) に MS-275 または 5-aza-CdR を処理し、定量的リアルタイム RT-PCR で mRNA の発現変化を解析した。結果、MS-275 処理時には ME-180 を除くすべての細胞株で、いずれかの MAP1LC3 遺伝子の発現量増加を確認した。また、5-aza-CdR 処理時には、BOKU および HCSC-1 を除くすべての細胞株で、いずれかの MAP1LC3 遺伝子の発現量増加を確認した。次いで、MAP1LC3A または MAP1LC3B タンパクに特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した。MAP1LC3A および MAP1LC3B タンパクの検出はそれぞれ SAB4300571 (シグマアルドリッチ) および M186-3 (MBL) を用いた。結果、MS-275 処理時には、MAP1LC3A および MAP1LC3B タンパクの発現量増加は 5 種類の細胞株で確認できた。一方、5-aza-CdR 処理時には、MAP1LC3A および MAP1LC3B タンパクの発現量増加は、それぞれ 4 および 3 種類の細胞株で確認できた。MAP1LC3C を認識するとされる 18726-1-AP (プロテインテック) および PA1-18286 (サーモフィッシュサイエンティフィック) は、HeLa 細胞に一過性に発現させた GFP-MAP1LC3C を検出できなかった。

以上より、MS-275 処理時の MAP1LC3A は mRNA の発現量が増加した 4 種類中 3 種類 (75%) の細胞株で、また MAP1LC3B は mRNA の発現量が増加した 5 種類中 4 種類 (80%) の細胞株でタンパク発現量との相関性を示した。一方、5-aza-CdR 処理時の MAP1LC3A は 5 種類中 3 種類 (60%) の細胞株で、MAP1LC3B は 3 種類中 2 種類 (67%) の細胞株でタンパク発現量との相関性を示した。

(5) MAP1LC3 遺伝子ファミリーの mRNA およびタンパク発現増加とアポトーシスの関連性

MS-275 または 5-aza-CdR 処理時のヒト子宮頸がん細胞株において、オートファゴソーム形成の誘導と共にアポトーシスが誘導され

るか検証する目的で、アポトーシス誘導のマーカーである Cleaved PARP タンパクを検出した。結果、MS-275 処理時には 9 種類中 6 種類の細胞株において、一方 5-aza-CdR 処理時には 9 種類中 2 種類の細胞株において Cleaved PARP タンパクの増加を確認した。また、5-aza-CdR 処理より MS-275 処理の方がアポトーシスを誘導しやすいことが判明した。さらに、MAP1LC3 mRNA およびタンパク発現増加と Cleaved PARP タンパク発現増加との相関性を調べた。結果、MAP1LC3A または MAP1LC3B 遺伝子の転写を伴うタンパク量の増加とアポトーシス誘導が同時に検出できたのは、MS-275 処理時では SKG-I、SKG-II および SKG-IIIa の 3 つの細胞株、5-aza-CdR 処理時では ME-180 のみであった。

(6) MAP1LC3C 遺伝子の発現を制御するプロモーター領域の解析

UCSC Genome Browser より、MAP1LC3C 遺伝子は複数の *Alu* 配列を含むことが判明した。このうち、転写開始点 (+1) 上流の *AluSq2* (-755 ~ -472) に着目した。MAP1LC3C 遺伝子の転写開始点付近から *AluSq2* を含む領域 (-903 から+17) を PCR で増幅後、pGL3-Basic のルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入し、pGL3 -903/+17 を作製した。同様に、*AluSq2* のみを含む pGL3 -903/-464 ならびに *AluSq2* を含まない pGL3 -483/+17 も作製した。これらルシフェラーゼレポータープラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性値を測定した。結果、pGL3 -903/+17 と pGL3 -483/+17 は pGL3-Basic に対して約 3 倍強のルシフェラーゼ活性上昇を示した。一方、*AluSq2* のみを含む pGL3 -903/-464 のルシフェラーゼ活性は、pGL3-Basic に対し変化を示さなかった。

-903 から+17 領域は CpG アイランド (-592 から-388) を含む。そこで、-903 から+17 領域を CpG フリーのルシフェラーゼレポータープラスミド pCpGL3-Basic のルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入し、pCpGL3 -903/+17 を作製した。次に、pCpGL3 -903/+17 と pCpGL3-CMV (CMV プロモーターは CpG フリー) を CpG Methyltransferase M.SssI によりメチル化し、それぞれメチル化前とメチル化後の 2 種類のプラスミドを用意した。メチル化は制限酵素 PmlI による切断の有無で判定した。ルシフェラーゼアッセイの結果、メチル化前後で pCpGL3 -903/+17 および pCpGL3-CMV のルシフェラーゼ活性に顕著な変化を認めなかった。以上より、-903 から+17 領域に含まれる CpG のメチル化は、MAP1LC3C 遺伝子の転写に決定的な影響を及ぼすとは考えにくい。

(7) 異常タンパク応答に関与する転写因子 CHOP による ATG 遺伝子プロモーターの制御

小胞体ストレスからオートファジーへ移行する制御機構を解明する目的で、転写因子 CHOP に着目した。まず、CHOP 発現ベクター

との共発現により、pGL3-BiP レポータープラスミドのルシフェラーゼ活性が HeLa 細胞で上昇する事を確認した。次いで、CHOP タンパクの一過性発現時に 21 種類の ATG 遺伝子 (ULK1、ULK2、ATG2A、ATG2B、ATG3、ATG4A、ATG4B、ATG4C、ATG4D、ATG5、BECN1、ATG7、MAP1LC3B、GABARAP、GABARAPL1、ATG9A、ATG9B、ATG10、ATG12、ATG16L1 および DRAM1) のプロモーター・ルシフェラーゼレポーター (Kusama et al., 2009) がいかなる挙動を示すのか解析した。結果、CHOP によって直接制御されることが報告されている ATG5、GABARAP および ATG10 (B'chir et al., 2013) を含む 11 種類 (ULK1、ULK2、ATG4A、ATG4C、ATG4D、ATG5、ATG7、GABARAP、GABARAPL1、ATG9A および ATG10) について 3 倍以上のルシフェラーゼ活性上昇を確認した。以上より、小胞体ストレス応答に関わる CHOP は、多くの ATG 遺伝子の発現を制御する可能性が得られた。

CHOP タンパク一過性発現時に最も大きなルシフェラーゼ活性の上昇を示した ULK1 および ULK2 プロモーター・ルシフェラーゼレポーターについて、CHOP に応答する配列の限局化を目指した。結果、それぞれの遺伝子の転写開始点を +1 とした際、ULK1 では -114/-102 領域に、ULK2 では -133/-81 領域に CHOP による転写制御に重要な配列が存在する可能性が得られた。これら 2 つの領域は CHOP 応答配列に加え、それに類似した配列もいくつか含んでいた。

<引用文献>

B'chir W, Maurin A, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. The eIF2a/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 16: 7683-99. 2013.

Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 368(7):651-62, 2013.

Kusama Y, Sato K, Kimura N, Mitamura J, Ohdaira H, Yoshida K. Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis.* 14: 1165-75. 2009.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:107-32, 2011.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.*

26(24):9220-31, 2006.

Oh M, Choi IK, Kwon HJ. Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 369(4):1179-83, 2008.

Sui X, Zhu J, Zhou J, Wang X, Li D, Han W, Fang Y, Pan H. Epigenetic modifications as regulatory elements of autophagy in cancer. *Cancer Lett.* 360(2):106-13, 2015.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 13(3):184-90, 2011.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

石田憲香、小倉一樹、平山響子、三津田秋雅、石川春風、小宮南海、吉田健一、転写因子 CHOP によるオートファジー関連遺伝子の発現制御に関する研究、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年
石田憲香、勝俣圭一郎、高野恵太、丹野夏美、三津田秋雅、小倉一樹、平山響子、吉田健一、ヒト子宮頸がん細胞における MAP1LC3 遺伝子ファミリーのエピジェネティック制御、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

丹野夏美、林哲郎、馬野彩音、三橋祐太、石田憲香、勝俣圭一郎、高野恵太、吉田健一、エピジェネティックな制御を受けるオートファジー関連遺伝子の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 健一 (YOSHIDA, Kenichi)
明治大学・農学部・専任教授
研究者番号：20345036