

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390078
 研究課題名（和文） 発生・再生現象における SUMO 修飾機構と細胞核リモデリングの解析

研究課題名（英文）SUMO modification and nuclear remodeling in cell development

研究代表者

中尾 光善（NAKAO MITSUYOSHI）
 熊本大学・発生医学研究所・教授
 研究者番号：00217663

研究成果の概要：発生・再生現象における SUMO タンパク質修飾機構と細胞核内構造のリモデリングを解析し、タンパク質修飾機構の意義を示すとともに、遺伝情報制御の基本メカニズムを解明することを目的とした。メチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1 とポリコームタンパク質群の協働性の解析：DNA メチル化とヒストン H3 の 9 番目のリジン（H3K9）のメチル化を介する MBD1 複合体経路、ヒストン H3 の 27 番目のリジン（H3K27）のメチル化を介するポリコーム複合体経路が発生分化に働く遺伝子制御に関わっている。MBD1 の結合因子を探索し、ポリコームタンパク質群（Ring1b、hPc2）と相互作用することを見出した。両経路が直接的に相互作用することで、HOXA 遺伝子群の転写抑制とヘテロクロマチン形成に協働することが示唆された。細胞周期におけるポリコームタンパク質群の解析：ポリコーム群には PRC1 と PRC2 の 2 つの複合体があり、PRC2（メチル化酵素 EZH2 を含む）は H3K27 をメチル化し、PRC1（SUMO リガーゼ hPc2 を含む）はメチル化 H3K27 を認識し転写抑制型のクロマチンを形成する。PRC1 が結合したクロマチンが細胞周期の G1 期に再構築され、次の S 期への進行に必要であることを見出した。細胞が G1 期に刺激を受けた場合、PcG の標的クロマチンが再編される可能性を示唆した。SUMO 結合モチーフをもつ MCAF1 の解析：ユビキチン様 SUMO で修飾された MBD1 が MCAF1 分子内の SUMO 結合モチーフと相互作用することを報告したが、新たに MCAF1 が転写因子 Sp1 に直接結合し、Sp1 依存性のテロメラーゼ遺伝子発現を促進することを見出した。MCAF1 が相互作用する標的タンパク質の SUMO 修飾が異なる複合体を形成する可能性を示唆した。SUMO 修飾が関わる核内構造の解析：核膜孔に存在する SUMO リガーゼ RanBP2 が、SUMO 修飾と関連する核内構造、とくに PML ボディーや上記のヘテロクロマチン等の形成に関わることを見出した。このように、タンパク質の SUMO 修飾機構が、遺伝子発現と核内構造体の形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：発生医学、SUMO、クロマチン、細胞核

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生・再生現象は、細胞個性を変換するエピジェネティックな高次生命現象として捉えられる。ひとつの受精卵が多種多様に増殖・分化することで、1個体内では200種を超える細胞群およびその集団である組織・器官が形成されている。個々の細胞群は異なる形態と働きを持っているが、基本的に同一のゲノムを有するものである。このような発生現象は、新しいエピジェネティックな状態を確立・維持することで、固有の遺伝情報発現を可能にすると考えられる。他方、再生現象は、多能性を有する幹細胞が発生過程に準じた内在性プログラムを再び進行することで、必要な分化型細胞を創出するものである。発生・再生現象のメカニズムを解明することは、これからの発生医学・再生医学の重要な基盤研究に位置づけられる。

(2) 遺伝情報発現を担うエピジェネティクスの機構には、DNAメチル化とクロマチン形成を主とするゲノム制御、ヒストン等の細胞核内タンパク質の翻訳後修飾が含まれている。これらは転写調節因子が標的遺伝子に作用し得る核内環境をつくり、また転写調節因子そのものの機能を制御しており、互いに連携することで遺伝情報を調節している。発生・再生の過程では、これらのエピジェネティクスの機構が大きく変動することから、生命現象を理解する上で重要な観点であると考えられる。申請者は、エピジェネティクスの機構および生命現象との関わりについて一連の研究を進めてきた。その中で、ユビキチン様SUMOによる修飾が核内タンパク質を主な標的にすること、SUMO修飾がタンパク質機能をダイナミックに変換できることに基づいて、本研究では、SUMOによるタンパク質修飾と細胞核リモデリングの視点から発生・再生現象のメカニズムを明らかにすることを着想した。

2. 研究の目的

(1) エピジェネティクスの機構による生命現象の成立機序において、ユビキチン様SUMOによる修飾が核内タンパク質を主な標的にしており、SUMO修飾がタンパク質機能をダイナミックに変換できることに基づいて、本研究では、発生・再生現象におけるSUMOタンパク質修飾機構と核内構造

リモデリングの基本メカニズムを明らかにすることが目的とした。

(2) 具体的には、SUMO修飾で機能制御されるMBD1による転写抑制とヘテロクロマチン形成機構、ポリコームタンパク質複合体(SUMOリガーゼhPc2を含む)の細胞周期制御、SUMO結合因子MCAF1による遺伝子制御およびクロマチン形成機構、核膜に局在するSUMOリガーゼRanBP2による核内構造体(PMLボディーなど)の形成機構、について解析を行う。よって、発生・再生現象におけるSUMO修飾機構と細胞核リモデリングに関する新たなコンセプトを創出することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類の培養細胞株とその解析：マウスのES細胞と間葉系細胞株、ヒトのHeLa細胞とC33細胞などを用いた。各種のクロマチン因子に関して、遺伝子導入および特異的なsiRNAによるノックダウン法、生化学的手法および1細胞レベルの免疫染色等の解析を行った。

(2) MBD1-MCAF1複合体の機能解析：DNAメチル化領域では、MBD1がMCAF1-SETDB1(H3K9のトリメチル化酵素複合体)をリクルートすることで、ヘテロクロマチン形成と転写抑制を可能とする。SUMO修飾を受けたMBD1がMCAF1分子内のSUMO結合モチーフと相互作用すること、H3K27のメチル化に作用するポリコーム複合体(SUMOリガーゼhPc2を含む)とMBD1が協働することについて検討した。

(3) ポリコーム複合体の局在解析：細胞周期において、遺伝子発現とクロマチン形成が再構築されることが、細胞個性の維持に重要であるが、ポリコームタンパク質複合体の動態は不明であった。そのPRC2およびPRC1の複合体の細胞内局在について、細胞周期を同調させた細胞株で解析を行った。

(4) Sp1-MCAF1複合体の機能解析：MCAF1が多くの遺伝子発現に関わるSp1と直接に相互作用すること、MCAF1はRNAポリメラーゼIIおよび基本転写因子群と複合体を形成することを見出し、Sp1-MCAF1複合体による遺伝子制御について検討した。また、MCAF1と相互作用するタンパク質因

子について、酵母 2 ハイブリッド法や細胞内免疫沈降法を用いて検討を行った。

(5) 細胞核内構造の形成機構の解析：
核膜孔に存在するSUMOリガーゼRanBP2の特異的なノックダウン細胞において、PMLポドイン等の核内構造体形成が変化するかについて解析した。

4. 研究成果

(1) メチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1 とポリコームタンパク質群の協働性の解析：
ヒト遺伝子の転写抑制には、DNA メチル化を認識するメチル化 DNA 結合 (MBD) タンパク質を介する経路、ヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のメチル化を認識するポリコームタンパク質群を介する経路が知られている。しかし、この 2 つの転写抑制経路の関連性は不明である。

本研究では、MBD1 の結合因子を探索し、ポリコームタンパク質群 (Ring1b、hPc2) と相互作用することを見出した。細胞内で MBD1 は Ring1b-hPc2 とともに、転写抑制に相互作用すること、HOXA 遺伝子群のプロモーター領域に存在することが判明した。DNA 脱メチル化剤 (5-aza-deoxycytidine) RNA 干渉法による MBD1 または hPc2 のノックダウンによって、HOXA2 遺伝子等が再活性化することが分かった。また、MBD1、Ring1b、hPc2、さらにメチル化 H3K9、メチル化 H3K27 が細胞核内のヘテロクロマチンの一部に共局在していた。興味深いことに、DNA 脱メチル化剤または MBD1 ノックダウンでは、MBD1 とメチル化 H3K9 のヘテロクロマチン形成が消失するが、hPc2-Ring1b のヘテロクロマチン形成に変化はなかった。一方、hPc2 ノックダウンでは、hPc2 と Ring1b のヘテロクロマチン形成が消失し、MBD1 とメチル化 H3K9 のヘテロクロマチン形成は影響を受けなかった。MBD1 はメチル化 DNA に結合し、ポリコームタンパク質群はメチル化 H3K27 に結合することが知られるが、このように異なる足場に結合しながら、直接的に相互作用することで、HOXA 遺伝子群の転写抑制とヘテロクロマチン形成に協働することが示唆された。本研究は、ヒトゲノムの遺伝子制御の一端を明らかにするもので、発生分化、癌などの遺伝情報発現制御への応用が十分期待できるものである。

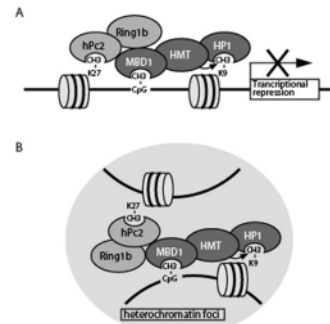


図1 MBD1複合体とhPc2複合体の独立形成と相互作用

(2) 細胞周期におけるポリコームタンパク質群の解析：

ポリコーム群タンパク質 (PcG) は PRC1 と PRC2 の 2 つの異なる複合体を形成し、発生分化に関わる標的遺伝子のエピジェネティックな制御を行う。PRC2 はヒストン H3 のリジン 27 (H3K27) をメチル化し、PRC1 はメチル化された H3K27 を認識し抑制クロマチンを形成することが示されているが、PcG が細胞周期を通してどのように安定かつ柔軟なクロマチンを維持するかは、不明である。本研究で、PcG 結合クロマチンが細胞分裂終了後の G1 期に再構築されること、そしてそれが次の S 期への移行に必要であることを見出した。分裂期の細胞では、PcG 結合クロマチンはいったん解除され、トリメチル化 H3K27 (H3K27Me³) が染色体腕上に沿って PRC2 と共局在し、PRC1 はセントロメア周辺部位に点状に局在した。G1 中期から後期にかけて PRC1 は H3K27Me³ を基盤とした高度に組織化されたクロマチン、PRC フォーカスを形成した。よって、分裂期から G1 期への移行期は PcG クロマチンの再構築と次世代への継承に重要な時期であると考えられた。PRC2 の構成タンパク質である Suz12 のノックダウンは、分裂期染色体上の H3K27Me³ の量を顕著に減弱させ、その結果として分裂後の娘細胞に PRC フォーカスが十分に伝達されなかった。PcG に結合したクロマチンは分裂後の G1 期で再構築されるという発見は、PcG タンパク質が G1 期において細胞刺激を受けた場合、標的クロマチンをリモデルできることを示唆した。本研究は、発生分化の過程に重要なポリコーム群タンパク質がダイナミックな分子機序を介して細胞記憶に関わることを示し、発生分化等の機構解明に資するものである。

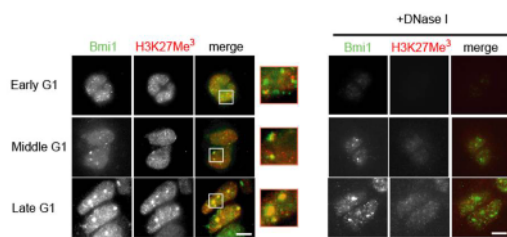


図2 細胞周期におけるポリコム複合体によるヘテロクロマチン形成

(3) SUMO 結合モチーフをもつ MCAF1 の解析：ユビキチン様 SUMO で修飾されたメチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1 が MCAF1 分子内の SUMO 結合モチーフと相互作用することを既に報告している。テロメラーゼは、テロメア長を維持し、哺乳類細胞の老化と不死化に関わり、テロメラーゼ逆転写酵素 TERT と RNA 因子 TERC から構成されている。このテロメラーゼサブユニットの遺伝子群は主に Sp1 によって発現調節されることが判明している。MCAF1 は遺伝子発現調節のメディエーターであるが、その機能については未知の部分が多い。本研究では、癌細胞において MCAF1 が Sp1 に依存したテロメラーゼ活性の維持に関与することを見出した。MCAF1 のふたつの保存されたドメインは Sp1 と基本転写装置に直接結合した。MCAF1 または Sp1 の選択的ノックダウンは TERT と TERC 遺伝子の転写を低下し、その結果、テロメラーゼ活性の低下をもたらした。MCAF1 と Sp1 のノックダウン細胞では、TERT 遺伝子のプロモーター領域に結合する活性型 RNA ポリメラーゼ II と基本転写因子 ERCC3 の結合性が低下した。さらに、MCAF1 は組織型が異なる種々の癌組織において、高頻度に過剰発現していた。これらのデータは、MCAF1 が Sp1 によるテロメラーゼ遺伝子の活性化を維持すること、またそれが自己増殖する癌細胞の多くに共通したメカニズムであることを示唆している。本研究は、MCAF1 が転写調節に二面性を有すること、すなわち、MBD1-MCAF1-SETDB1 複合体で転写抑制に働き、他方、Sp1-MCAF1 複合体で転写活性化に働くことを解明した。

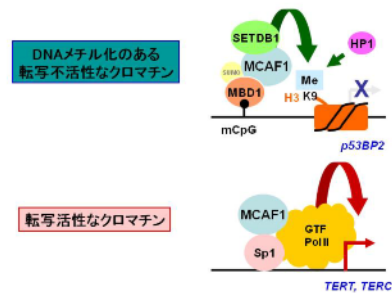


図3 MCAF1によるエピジェネティックな制御機構

(4) SUMO 修飾が関わる核内構造の解析：核膜孔に存在する SUMO リガーゼ RanBP2 が、SUMO 修飾と関連する核内構造、とくに PML ボディやヘテロクロマチン等の形成に関与することを見出しており、本研究については継続して進める予定である。

(5) HMGA2 の上皮間葉転換に関する解析：HMGA タンパク質は、未分化細胞に高発現するが、分化細胞で発現が低下し、癌細胞で再活性化する。膀胱癌細胞において、HMGA2 が上皮間葉転換 (EMT) に関与することを見出した。膀胱癌細胞株において、HMGA2 の選択的ノックダウンで、E-カドヘリン発現上昇を伴う高接着性の上皮様に変化した。HMGA2 は E-カドヘリンの発現を抑制する転写因子 *SNAIL* のプロモーター活性を促進することが判明し、HMGA2 が発生過程に重要な EMT に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

【雑誌論文】(計10件)

- L. Liu, K. Ishihara, T. Ichimura, N. Fujita, S. Hino, S. Tomita, S. Watanabe, N. Saitoh, T. Ito, and M. Nakao. MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. *J. Biol. Chem.* 284: 5165-5174, 2009. 査読有。
- S. Watanabe, Y. Ueda, S. Akaboshi, Y. Hino, Y. Sekita, and M. Nakao. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Am. J. Pathol.* 174: 854-868, 2009. 査読有。
- T. Zhao, J. Yasunaga, M. Nakao, M. Fujii, and M. Matsuoka. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. *Blood* 113: 2755-2764, 2009. 査読有。

K. Kuwayama, K. Matsuzaki, Y. Mizobuchi, H. Mure, K. Kitazato, T. Kageji, M. Nakao, S. Nagahiro. Promyelocytic leukemia protein induces apoptosis due to caspase-8 activation via the repression of NF- κ B activation in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 11:132-141, 2009. 査読有。

T. Aoto, N. Saitoh, Y. Sakamoto, S. Watanabe, and M. Nakao. Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and required for S phase progression. *J. Biol. Chem.* 283: 18905-18915, 2008. 査読有。

K.S. Wendt, K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, G. Nagae, K. Ishihara, T. Mishiro, K. Yahata, F. Imamoto, H. Aburatani, M. Nakao, N. Imamoto, K. Maeshima, K. Shirahige, and J.M. Peters. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451: 796-803, 2008. 査読有。

Y. Sakamoto, S. Watanabe, T. Ichimura, M. Kawasuji, H. Koseki, H. Baba, and M. Nakao. Overlapping roles of the methylated DNA binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HoxA genes and heterochromatin foci formation. *J. Biol. Chem.* 282: 16391-16400, 2007. 査読有。

Y. Ueda, S. Watanabe, S. Tei, N. Saitoh, J. Kuratsu, and M. Nakao. The high mobility group protein HMGA1 inhibits retinoblastoma protein-mediated cellular G0 arrest. *Cancer Sci.* 98: 1893-1901, 2007. 査読有。

S. Kobayakawa, K. Miike, M. Nakao, and K. Abe. Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 12: 447-460, 2007. 査読有。

日野信次郎、渡邊すぎ子、中尾光善. DNAメチル化を介したエピジェネティック制御機構、*実験医学増刊号* 25: 118-123, 2007. 査読無。

〔学会発表〕(計5件)

中尾光善. クロマチン因子による遺伝子・細胞制御機構、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(シンポジウム)、平成20年12月11日、神戸市

中尾光善. エピジェネティクス機構による細胞制御と病態、日本人類遺伝学会第53回大会(シンポジウム)、平成20年9月29日、横浜市

中尾光善. 細胞異型の成立を探る: がんのエピジェネティクスと核内構造、第46回日本臨床細胞学会秋期大会(特別講演)、平成19年12月1日、仙台

M. Nakao. Epigenetic regulation and deregulation in cancer. Northeastern Asian Symposium on Cancer Epigenetics. November 7, 2008 (Jeju, Korea)

M. Nakao, Epigenetic gene and cell regulation by chromatin factors, The 21th Naito Conference on Nuclear dynamics and RNA [1], June 27, 2008 (Yamanashi)

〔図書〕(計2件)

中尾光善. エピジェネティクスと疾患、*小児内科増刊号(小児疾患診療のための病態生理1、第4版)*、東京医学社、30-35、2008年

日野信次郎、中尾光善. DNAメチル化と転写制御機構、*転写制御とエピジェネティクス*(The Frontiers in Medical Sciences, 加藤茂明編)、南山堂、91-98、2008

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: THERAPEUTIC AGENT FOR CANCER

発明者: 中尾光善、石原宏、劉立峰

権利者: 熊本大学、リンク・ジェノミクス株式会社

種類: 特許権

番号: 特願2008-311403

出願年月日: 2008年12月5日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾光善 (NAKAO MITSUYOSHI)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号: 00217663

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし