

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590065

研究課題名 (和文) ヒストン関連因子の機能的相互作用の解析および
細胞がん化における意義研究課題名 (英文) Analysis of the functional interactions of factors concerned
with histones in malignant transformation.

研究代表者

長田 茂宏 (OSADA SHIGEHIRO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40263305

研究成果の概要 (和文)：これまでの研究により、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が細胞がん化を導くことが明らかにされた。近年、遺伝子の変異のみではなく、クロマチンを構成するヒストンや DNA の化学修飾の異常もがん化に関与することが明らかにされつつある。本課題において、化学発がん過程において発現上昇するヒストンアセチル化酵素、メチル化酵素、コアヒストンに類似のヒストンバリエーションなどが腫瘍マーカーの発現や細胞増殖、足場非依存的増殖能に与える影響を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)： Mutations in oncogene and tumor suppressor gene lead to malignant transformation. Dysregulation of DNA methylation and histone modification is also found in cancer. Epigenetic studies are also required to understand molecular mechanisms of carcinogenesis and tumorigenesis. Here, we revealed that epigenetics regulatory factors, which induced hepatocarcinogenesis, including histone acetyltransferase, histone methyltransferase, and histone variant, regulated gene expression of tumor marker, cell proliferation, and anchorage-independent growth.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：エピジェネティクス、ヒストン、クロマチン、アセチル化、メチル化、発がん、
細胞がん化、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

真核生物の核内 DNA はヒストンに巻きついたヌクレオソームを基本単位としたクロマチンに存在し、転写、複製などの生命現象の基本となる DNA を介した反応にはクロマチン構造変換を介した制御が重要となる。遺伝子機能の制御において、1990年代後半からクロマチン修飾因子と遺伝子機能制御の

研究が急速に展開された。そして、DNA のメチル化、ヒストン修飾 (アセチル化、メチル化、リン酸化など)、ATP 依存的にクロマチンの構造変換に関与する因子 (クロマチンリモデリング因子) が同定された。さらに近年では、通常のヌクレオソームを形成するヒストンとは若干異なるヒストン (ヒストンバリエーション)、ヌクレオソームへのヒストンの

運搬・解離に関与するヒストンシャペロンの解析が進められている。生命現象の総括的理解のためには、個々のエピジェネティクス制御因子の理解だけでなく、それらの機能的相互作用を考慮した解析が必要とされている。

エピジェネティクス異常と発がんの関係は DNA メチル化異常との関係が解析されていたが、ヒストン修飾などの DNA メチル化以外のエピジェネティクス異常とがん化の関係は不明な点が多く残されている。エピジェネティクスは酵素により制御されていることが多いので、その酵素活性を制御する薬剤は抗がん剤として注目されており、DNA メチル化阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) 阻害剤の臨床応用が進められている。それ故、エピジェネティクスに注目した創薬は今後の応用・開発が期待されている分野である。

2. 研究の目的

がん対策の基本として、早期発見・早期治療がある。研究代表者は発がん早期における遺伝子発現異常・エピジェネティクス異常を明らかにすることを目的に、肝化学発がんの腫瘍マーカーである胎盤型グルタチオントランスフェラーゼ (glutathione transferase placental form, GST-P) 陽性細胞における遺伝子発現変化、エピジェネティクス制御因子の発現変化および機能変化について解析してきた。そして、前がん病変状態である腫瘍マーカー陽性細胞において発現上昇するヒストン修飾因子 ((脱)アセチル化酵素、メチル化酵素など)、ヒストンバリエント、ヒストンシャペロンを同定している。そこで、これらの因子が腫瘍マーカーの発現に与える影響および細胞がん化に与える影響を明らかにすることを本課題の目的とした。

クロマチン関連因子およびその作用機構は進化の過程において保存されていることが多い。そこで、クロマチン関連因子の機能解析を遺伝子改変操作が容易な出芽酵母を用いて進めている。そこで、上記、クロマチン関連因子の酵母対応遺伝子の機能解析も本課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) クロマチン関連因子の相互作用が遺伝子発現に与える影響の解析

これまでに化学発がん過程で発現上昇するヒストンアセチル化酵素 MOZ が転写因子 Nrf2/MafK を介して GST-P 発現上昇に関与することを明らかにしている。前述のクロマチン関連因子が GST-P 遺伝子の発現制御に与える影響をラット肝がん由来細胞株

H4IIE にクロマチン関連因子を導入することにより検討した。また、発現抑制が GST-P 発現に与える影響も併せて検討した。

(2) クロマチン関連因子の相互作用が細胞がん化に与える影響の解析

肝前がん病変において発現上昇する前述のクロマチン関連因子について、正常細胞の性質を含むマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞、ラット線維芽細胞株 3Y1 細胞に導入し、細胞増殖に与える影響を検討した。また、発現抑制による影響も併せて検討した。

細胞の接触阻止能の喪失については、上記細胞に発現プラスミドを導入し、フォーカスが形成されるか否かにより評価した。

足場非依存的増殖能については、上記細胞に発現プラスミドを導入し、ソフトアガロース中における増殖能により評価した。がん遺伝子過剰発現により獲得した足場非依存的増殖能に与える影響については、クロマチン関連遺伝子とがん遺伝子を共発現した細胞を用いることにより検討した。

(3) 出芽酵母対応遺伝子によるクロマチン関連因子の機能解析

化学発がん過程において発現上昇するクロマチン関連遺伝子の出芽酵母対応遺伝子の破壊株を作成し、DNA 損傷誘発薬剤等に対する感受性を検討した。

また、出芽酵母対応遺伝子産物の相互作用因子を同定し、その機能解析および表現系の解析を行った。

4. 研究成果

(1) クロマチン関連因子の相互作用が遺伝子発現に与える影響の解析

①ヒストンアセチル化酵素 MOZ とヒストンメチル化酵素 CARM1 の協調作用が GST-P プロモーター活性に与える影響

GST-P 遺伝子の肝がん特異的な発現に必要なエンハンサーエレメント (GST-P enhancer, GPE) に作用する転写因子のひとつとして、Nrf2/MafK が知られている。ラット肝がん由来細胞株 H4IIE を用いた解析により、CARM1 が Nrf2 と相乗的に GST-P のプロモーター活性を上昇させることを明らかにした。また、この作用には CARM1 のメチル化活性は必要としないことも示された。

さらに、このプロモーター活性増強作用に CARM1 と MOZ が協調的に作用することが示された。また、クロマチン免疫沈降実験により、Nrf2, CARM1, MOZ が GPE に局在する可能性が示された。

②ヒストンメチル化酵素 PR-SET7 が GST-P プロモーター活性に与える影響

PR-SET7 は GST-P プロモーター活性を H4IIE 細胞において抑制することを明らかにした。またその抑制は肝がん特異的発現に重要な GPE を介さないことも示された。

③ヒストンバリエント H2A.Z が GST-P プロモーター活性に与える影響

H4IIE 細胞において、H2A.Z は GPE を介して、GST-P プロモーター活性を抑制することが明らかとなった。

④ヒストンバリエント H2A.Z がオートファジー関連遺伝子の発現に与える影響

オートファジー誘導に関与する遺伝子 damage-regulated autophagy modulator (DRAM) は、正常肝臓と比較して、肝前がん病変において発現上昇することが明らかとなった。アデノーマにおいても高い発現が観察されたが、カルシノーマへの進行に伴いその発現は減少傾向にある可能性が示された。

化学発がん過程において発現上昇する H2A.Z を H4IIE 細胞において発現抑制すると、DRAM の発現は上昇し、H2A.Z は DRAM の発現の負の制御因子として機能することが示された。さらに、DNA 損傷誘発薬剤存在下においてはその傾向が大きくなることが示された。

(2) クロマチン関連因子の相互作用が細胞がん化に与える影響の解析

①ヒストンメチル化酵素 PR-SET7、ヒストンバリエント H2A.Z が足場非依存的増殖能に与える影響

PR-SET7 もしくは H2A.Z の過剰発現はマウス線維芽細胞 NIH-3T3 に足場非依存的増殖能を獲得させることはなかった。

一方、がん遺伝子 ras の恒常的活性体による足場非依存的増殖能を両因子の過剰発現は抑制した。PR-SET7 のメチル化酵素活性の欠損体およびメチル化酵素活性に必要な領域の点変異体は ras による足場非依存的増殖能を抑制しなかったことから、メチル化酵素活性依存的に足場非依存的増殖能を PR-SET7 は抑制していることが明らかとなった。

②ヌクレオホスミン NPM1 が足場非依存的増殖能に与える影響

化学発がん過程において発現上昇する核内因子ヌクレオホスミン NPM1 はがん遺伝子産物 c-Myc と相互作用し、c-Myc を介したプロモーター活性を上昇させることを明らかにした。

NPM1 の過剰発現により、線維芽細胞が足

場非依存的増殖能を獲得することはなかった。しかし、ラット線維芽細胞株 3Y1 の ras、c-Myc による足場非依存的増殖能を NPM1 の過剰発現は促進させた。

また、NPM1 の過剰発現は肝がん由来細胞の増殖を促進させ、発現抑制は細胞増殖を抑制した。

(3) 出芽酵母対応遺伝子によるクロマチン関連因子の機能解析

①ヒストンシャペロン ASF1 の相互作用因子の機能解析

ASF1 の相互作用因子として、イノシトールリン酸をリン酸化する酵素 VIP1 を同定しており、VIP1 破壊株の解析から、VIP1 が転写伸長反応に関与する可能性を示した。

ASF1 の相互作用因子として、レトログレードシグナルに関与する RTG2 を同定している。RTG2 はヒストンアセチル化酵素複体のサブユニットとしても機能することが知られている。レトログレードシグナルの標的であり、クエン酸合成酵素をコードする CIT2 遺伝子の発現誘導に RTG2 は関与するが、ASF1 破壊株においても CIT2 の発現誘導が観察されたことから、ASF1 はレトログレードシグナルに関与しない可能性が示された。

②HMG-box を含む ABF2 の機能解析

high-mobility group (HMG)-box を含む因子の化学発がん過程における増殖を明らかにしている。そこで、N 末端側と C 末端側の二つの HMG-box を含む因子である ABF2 の機能解析を行った。ABF2 はミトコンドリアに局在し、ヒストンタンパク質様の機能を持ち、ミトコンドリア DNA の高次構造維持に関与する。

ABF2 破壊株に N 末端側 HMG-box もしくは C 末端側 HMG-box を発現させることにより、破壊株の表現系を回復する傾向が観察された。しかし、全長 ABF2 に比べるとタンパク質の発現量が少なく、完全には表現系が回復されなかった。

ABF2 破壊株に ABF2 発現プラスミドを導入し、ABF2 を精製した。電気泳動により分離後、抗アセチル化リシン抗体を用いることにより、ABF2 は細胞内においてアセチル化されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Hashizume, H., Gomita, U., Imagawa, M., and Osada, S.
Histone methyltransferase PR-Set7 and histone variant H2A.Z, induced during hepatocarcinogenesis, repress the promoter activity of the tumor marker gene and the ras-induced colony formation activity.
J. Health Sci., 2011, in press. 査読有.
- ② Yura, T., Hashizume, H., Suzuki, E., Imagawa, M., and Osada, S.
Promotion of anchorage-independent growth by cytoplasmic and nuclear histone deacetylase 9.
J. Health Sci., 2010, 50, 581-588. 査読有.
- ③ Gomita, U., Imagawa, M., and Osada, S.
Toxicity of nickel compounds mediated by *HTZI*, histone variant H2A.Z, in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biol Pharm Bull., 2008, 31, 2007-2011. 査読有.

[学会発表] (計9件)

- ① 小松浩大、五味田麗、今川正良、長田茂宏
肝化学発がん過程で発現上昇するヒストンバリエント H2A.Z とその制御遺伝子の解析
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2010 静岡 (2010年11月28日)
- ② Osada, S., Maeda, Y., and Imagawa, M.
Identification of factors interacting with histone chaperon Asf1p.
International Symposium on Biodiversity Sciences 2010 (ISBDS2010) Nagoya (2010年8月3日)
- ③ 長田茂宏
化学発がん過程において発現上昇するクロマチン関連因子の解析.
第130年会 日本薬学会 岡山 (2010年3月29日)
- ④ 吉見千明、今川正良、長田茂宏
ヒストンメチル化酵素 *CARM1* が腫瘍マーカーのプロモーター活性に与える影響の解析.
第32回 日本分子生物学会年会 横浜

(2010年12月11日)

- ⑤ 長田茂宏
肝化学発がん過程において発現上昇するヒストン修飾因子の機能解析.
第82回 日本生化学会大会 神戸 (2009年10月24日)
- ⑥ Osada, S., Yura, T., Maeda, M., Hashizume, H., and Imagawa, M.
Enhancement of anchorage-independent growth by histone deacetylase 9.
21th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular, Biology and 12th FAOBMB Congress, Shanghai, China (2009年8月5,6日)
- ⑦ 長田茂宏、由良隆行、前田誠、橋爪博司、今川正良
肝前がん病変において発現上昇するヒストン脱アセチル化酵素の解析.
第129年会 日本薬学会 京都 (2009年3月26日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

長田 茂宏 (OSADA SHIGEHIRO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：40263305

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし