

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 3 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590276

研究課題名（和文） DNA複製に関与するヒストンアセチラーゼHbo1の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of histone acetylase Hbo1, involved in DNA replication

研究代表者

飯塚 眞由 (IIZUKA MASAYOSHI)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：20232118

研究成果の概要（和文）：

年間約 1 万人の日本女性の命を奪う乳がんは、その 3 分の 2 が女性ホルモン（エストロゲン）の影響を受けて増殖することが知られる。エストロゲンの作用を弱める薬剤が開発され、効果をあげている。しかし、そのような薬剤に抵抗する症例もあり、エストロゲン受容体の変化が想定されている。今回、クロマチンの修飾酵素である Hbo1 が、意外なことに、エストロゲン受容体のタンパク質の不安定化に寄与することを発見した。

研究成果の概要（英文）：

Approximately ten thousands Japanese women die of breast cancers. About two-thirds of breast cancers were regulated by sex hormone, estrogen. Anti-estrogen therapy has been developed with considerable success. However, some breast cancers are resistant to that treatment presumably due to functional alteration of the estrogen receptor. I found that a chromatin modifying enzyme, Hbo1, contributes to protein degradation of the estrogen receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：乳がん アセチル化 エストロゲン受容体 ユビキチン化 Hbo1

1. 研究開始当初の背景

ここ十年のクロマチン研究によって転写に対する分子的理解は格段に深まった。特にヒストンのアセチル化メチル化、脱アセチル化脱メチル化、ATP 依存的なクロマチンリモデリング、異型ヒストンによる置換等を通じて、クロマチン構造が変化し転写に多大な影響を与えることが明らかとなった。一方、(i)

DNA 複製は転写同様二本鎖 DNA を一本鎖にする必要があること、(ii) DNA 複製が起こる前に Orc、Cdc6、Cdt1、Mcm2-7 タンパク質群の複合体 (pre-replicative complex、pre-RC) がクロマチン上で形成される (Bell および Dutta, 2002) ことから、クロマチンリモデリングが起こることが充分想定されたものの、DNA 複製分野でのクロマチ

ン研究は転写に比して立ち遅れている。その一つの理由は、DNA 複製の分野では、配列の定まった DNA エLEMENTが複製開始を支配するというレプリコン仮説が支配的で、クロマチンの寄与を過小評価するきらいがあったことである。現在、以下の3つの証拠から、哺乳類においてクロマチンの構造が複製開始において重要な役割を果たすことが認識されている。(I) ヒト複製起点認識複合体 (Origin Recognition Complex, ORC) の DNA 結合の配列特異性がない (Vashee ら、2003)。(II) ハムスターの DHFR 部位の 10 kb ないし 50kb の限局した領域内の多くの場所でランダムに複製が起こっている (Dijkwel および Hamlin, 1995)。(III) ヒト DNA 配列の複製開始の時期が個々の配列のヒストンの修飾と非常によく相関している (The Encode Project Consortium, 2007)。申請者は、DNA 複製でのクロマチン構造の役割にいち早く着目し、世界にさきがけて、Orc1 に結合するヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 (Histone Acetyltransferase binding to Orc1) を発見した (Iizuka および Stillman, 1999)。Nevins 研究室 (Duke 大) は、Orc1 に加えて Mcm2 タンパク質と Hbo1 タンパク質とが相互作用することを見出した (Burke ら、2001)。これらの知見を踏まえ、申請者は、Hbo1 が G1 期に起こる脊椎動物の pre-RC の形成、Mcm タンパク質のクロマチンへの結合に必須であることを、ヒトの培養細胞、アフリカツメガエルの試験管内複製系を用いて証明した (大阪大学滝澤研究室との共同研究) (Iizuka ら、2006)。同時期に、Côté 研究室 (Laval 大学) は、Hbo1 タンパク質複合体を生化学的に精製し、腫瘍抑制遺伝子産物 Ing4、Ing5 をその中に同定し、Hbo1 が S 期の DNA 複製に必要なことを示した (Doyon ら、2006)。ショウジョウバエにおいて、ショウジョウバエの Hbo1、Chameau を人工的な複製起点の近傍に動員すると、複製の活性が上昇することを Calvi 研究室は見出し、Hbo1 によるヒストンのアセチル化が DNA 複製に重要な役割を果たす可能性を示唆した (Aggarwal および Calvi, 2004)。申請者はさらに、Hbo1 のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を腫瘍抑制遺伝子 p53 が抑制すること、p53 が蓄積するようなストレス負荷に反応して、Hbo1 のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性が p53 依存的に低下し、pre-RC の形成も抑制されることを見出した。このことから、Hbo1 がストレスのシグナリングに関与することも判明した (Iizuka ら、2008)。p53 にその酵素活性が抑制されるのと符合するように、一部の原発性腫瘍 (辜丸腫瘍) で Hbo1 が過剰発現し、細胞増殖促進への関与が示唆された (Iizuka ら、2009)。実際、

Genetech の研究室が、乳がん細胞で足場非依存性増殖を Hbo1 が高めることを報告している (Hu ら、2009)。Hbo1 が、発がんウイルスであるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) のゲノムの複製を制御していることも判明した (Stedman ら、2004)。今川研究室 (名古屋市立大学) は、クロマチン免疫沈降法により、脂肪細胞分化促進因子 Fad24 が Hbo1 の複製起点のクロマチン結合に必要なことを示した (Johmura ら、2004)。それに引き続いて、Struhl 研究室 (Harvard 大学) では、細胞周期の G1 期依存性に複製起点のクロマチンと相互作用することを示した (Miotto および Struhl, 2008)。Liu 研究室 (Pardue 大学) は、細胞周期の M 期において、Hbo1 タンパク質が Polo-like kinase でリン酸化されることが pre-RC 形成に必須であることを示した (Wu および Liu, 2008)。

ここ数年の研究で、Hbo1 が DNA 複製の開始初期に複製起点のクロマチンに結合し、Mcm タンパク質をクロマチンと結合させることがわかった。これからの 3 年間で、解決すべき重要な問題は、以下の点である。(1) Hbo1 のヒストンアセチル化酵素としての活性が、pre-RC 形成に必要なか、あるいは、Hbo1 の構造自体で十分に酵素活性は必要ないか？

(2) もし、酵素活性が必要ならば、その基質は何か？

2. 研究の目的

(1) DNA 複製における、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 の酵素活性の意義

テトラサイクリンで誘導可能な Hbo1 の発現抑制系を構築し、内因性の Hbo1 の発現を抑制した状態で、野生型 Hbo1 あるいは、酵素活性欠損変異型 Hbo1 (G485A) を外来的に発現させる。Mcm タンパク質のクロマチン結合を生化学的あるいは免疫染色することにより pre-RC 形成能に変化がないかどうか検討する。

(2) Hbo1 の真正な基質の探索

Hbo1 を過剰発現させ、抗アセチル化リシン抗体で免疫沈降する方法、p53 タンパク質の 120 番目のリシンのアセチル化に対する抗体が認識する、20 kDa のクロマチン結合性タンパク質を免疫アフィニティ精製する。

3. 研究の方法

(1) レンチウイルスを用いた誘導性 Hbo1 発現抑制の実験系構築

Hbo1 発現を誘導性に抑制するのに、Block-iT Inducible H1 Lentiviral RNAi System (インビトロジェン) を用いた。ヒ

ト Hbo1 cDNA 非翻訳領域から、発現抑制のためのオリゴヌクレオチドを合成し、pENTER/H1/TO プラスミドにクローン化した。このプラスミドと、pLenti4/BLOCK-iT-DEST との組換えを起こさせた後、大腸菌を形質転換する。得られた組換えプラスミド pLenti4/BLOCK-iT-Hbo1 と ViraPower Packaging Mix とをウイルス産生細胞である 293FT 細胞にトランスフェクトし、レンチウイルスを回収しウイルス価を測定した。これと同時にラミン発現抑制プラスミドも同時期にウイルスを産生、回収し、陽性対照ウイルスとする。並行して、MCF-7 細胞に、Tet レプレッサー発現用ベクター pLenti6/TR をトランスフェクトし、Blasticidine 耐性細胞を選択し、受容細胞 (MCF-7-Rex、3T3-L1-Rex) として使用した。MCF-7-Rex 細胞にレンチウイルスを感染させ、Blasticidine および Zeocine 存在下で培養する。コロニーを単離し、ストックを作った。テトラサイクリン依存性に、Hbo1 (ラミンも同様) の発現抑制がかかることを免疫ブロット法で確認した。

(2) ドミナントネガティブ変異 Hbo1 タンパク質を誘導性に発現する系の構築

上述のレンチの系で望ましいクローンがとれないので、実験系を放棄し、平成 23 年 2 月から Hbo1 のドミナントネガティブ変異タンパク質を誘導性に発現する系の構築に努力を傾けた。pTet-On Advanced plasmid を安定に発現する MCF-7 細胞のクローンを 65 個獲得した。それぞれのクローンに対し、pRE-TIGHT-Luc を一過性にトランスフェクトし、ドキシサイクリンでルシフェラーゼの活性の上昇が誘導されるクローン上位の 3 種選んだ。それら 3 種の細胞に対して、ドミナントネガティブ変異 Hbo1 を持つ pTRE-TIGHT-Hbo1 (G485A) をトランスフェクトし、安定発現クローンを得て、ドキシサイクリンでドミナントネガティブ変異 Hbo1 が誘導されることを確認した。それらの細胞で、ドミナントネガティブ変異 Hbo1 を過剰発現させると、予想に反して、ヒストン H4 のアセチル化の程度も変化せず、MCM タンパク質のクロマチン結合も変化を認めなかった。

(3) Hbo1 のエストロゲン受容体の安定性への影響

①乳癌における Hbo1 の役割を追究する目的で、乳癌細胞株 MCF-7 で Hbo1 の発現抑制をすると、ER α タンパク質の発現量が増加するが、ER α の mRNA 量は増加しなかった。タンパク合成阻害剤存在下で、Hbo1 を発現抑制すると ER α タンパク質の安定化を認め、Hbo1 は ER α タンパク質の不安定化に働くことが示唆された。

②ER α タンパク質の Hbo1 によるユビキチン化を検討する目的で、Hbo1、Jade-1、ING4(あるいは ING5) 複合体と HA タグの付いたユビキチン、ER α を外来性に 293T 細胞に導入した。変性剤存在下で ER α を免疫沈降し、抗 HA 抗体でウェスタンブロット解析を行った。Hbo1 を含むタンパク質複合体をトランスフェクトした細胞の ER α で著明にポリユビキチン化を認めた。また、Hbo1 のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を欠損した変異体では、ER α タンパク質のユビキチン化が著明に低下した。このことから、アセチル化酵素能と ER α ユビキチン化能は密接に関連している、と考えられた。ポリユビキチン化の性質を調べる目的で、ユビキチンの 48 番目のリシンのみに変異のある変異体 (K48R) と Hbo1、Jade-1、ING4 と ER α を 293T 細胞にトランスフェクトし、変性剤存在下で ER α を免疫沈降し、抗 HA 抗体でウェスタンブロット解析を行った。野生型のユビキチンに比べ、K48R を導入した場合、ER α タンパク質のユビキチン化のレベルが著明に減少した。このことは、Hbo1 による ER α のユビキチン化は、ユビキチンタンパク質の 48 番目のリシンを介したポリユビキチン化であることを示していた。ユビキチンタンパク質の 48 番目のリシンを介したポリユビキチン化はタンパク質分解の特徴であり、Hbo1 による ER α の不安定化と矛盾しない結果である。

③Hbo1 の発現抑制によって、ER α の発現量が増えることから予想されるように、Hbo1 の発現抑制によって、MCF-7 細胞において、ER α 依存性の PS2 や プロゲステロン受容体の発現も増加した。MCF-7 細胞のタモキシフェンの感受性も Hbo1 の発現抑制によって高まった。

4. 研究成果

(1) レンチウイルスを用いた誘導性 Hbo1 発現抑制の実験系構築

DNA 複製に関与するヒストンアセチル化酵素 Hbo1 の発現を、レンチウイルスを用いて誘導性に抑制する系の構築を平成 22 年度の目標としたが不成功に終わった。レンチウイルスが宿主のゲノムに入りこむのに転写活性の高い領域に組み込まれるため、RNA ポリメラーゼ II の転写と、siRNA を発現するための RNA ポリメラーゼ III の転写とが拮抗するため、siRNA の発現が抑制されるのではないかと推定した。成果を望むのは無理と考え、実験系の構築を断念した。

(2) ドミナントネガティブ変異 Hbo1 タンパク質を誘導性に発現する系の構築

ドキシサイクリン誘導性にドミナントネガ

ティブ変異 Hbo1 が発現される MCF-7 細胞を樹立した。それらの細胞で、ドミナントネガティブ変異 Hbo1 を過剰発現させると、予想に反して、ヒストン H4 のアセチル化の程度も変化せず、MCM タンパク質のクロマチン結合も変化を認めなかった。この予想外の結果は、おそらく、過剰発現すると変異 Hbo1 タンパク質がクロマチンに多量に結合するため、ヒストン脱アセチル化酵素が接近できなくなるために、ヒストンのアセチル化の程度が低下しなかった、と推測している。これ以上の進捗は期待できないと判断し、実験計画を練り直し、エストロゲン受容体のタンパク質安定性のプロジェクトを立ち上げた。下記参照。

(3) Hbo1 によるエストロゲン受容体の不安定化

ヒトの乳がんの約 3 分の 2 はホルモン依存性で、その増殖にエストロゲン受容体 (ER α) が中心的な役割を果たしている。実際 ER α の作用を抑制・修飾する薬剤が乳がんの増殖を抑制する。しかしそのような薬剤も効かなくなり、再発の転帰をたどることも少なくない。治療不応性の原因として、近年の研究からスプライシングのバリエーションや多彩な翻訳後修飾や乳がんでの変異など、ER α が複雑な分子制御を受けていることが考えられる。ER α タンパク質の安定性の制御に関しては、詳細は不明である。今回、クロマチン修飾の酵素である Hbo1 が、驚くべきことに、ER α タンパク質の不安定性に寄与していることを発見した。その分子機能の詳細な解析により、エストロゲン依存性乳がんの進展・発生に関わる新規の分子制御が明らかになる可能性が充分ある (投稿準備中)。この研究は、第 35 回日本分子生物学会年会でワークショップの口演にも選ばれた (2012 年 12 月 14 日)。

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 Sugimoto, N, Yagawa, T, Iizuka, M, Kiyono, T, Fujita, M. The chromatin remodeler sucrose nonfermenting 2 homologue (SNF2H) is recruited onto DNA replication origins through interaction with cdc-10 dependent transcript (CDT1) and promotes the pre-replication complex formation. **J. Biol. Chem.** 査読有 286:39200-10 (2011).

DOI:10.1074/jbc.M111.256123

- ② Yamada, K, Tamamori-Adachi, M, Goto I, Iizuka, M, Yasukawa, T, Asao, T, Okazaki, T, Kitajima, S. Degradation of p21Cip1 through APC/CCdc20 mediated ubiquitylation is inhibited by cyclin dependent kinase 2 in cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.** 査読有 286: 44057-66 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M111.236711.

- ③ Kajitani, T, Tamamori-Adachi, M, Okinaga, H, Chikamori, M, Iizuka, M, Okazaki, T. Negative regulation of parathyroid hormone-related protein expression by steroid hormones. **Biochem Biophys Res Commun** 査読有 407:472-8 (2011). DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.03.037.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 飯塚真由、ヒトアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 タンパク質複合体によるエストロゲン受容体タンパク質のユビキチン化を介した不安定化、日本分子生物学会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡)。
- ② 飯塚真由、Regulation of estrogen receptor stability by histone acetyltransferase Hbo1 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ Hbo1 によるエストロゲン受容体タンパク質の安定性の制御、2012 年 9 月 20 日、さっぽろ芸文館 (札幌)。
- ③ Masayoshi Iizuka、Characterization of Hbo1 histone acetyltransferase、日本分子生物学会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜)。

[その他]

ホームページ等
<http://iizukalab.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 真由 (IIZUKA MASAYOSHI)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：20232118

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：