

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24年 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700867

研究課題名（和文） UHRF1 が関わる新規ヒストン修飾についての機能解析

研究課題名（英文） Analysis of a novel histone modification associated with the UHRF1 complex

研究代表者

鵜木 元香（UNOKI MOTOKO）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：30525374

研究成果の概要（和文）：私達はヌクレオソーム近傍で機能する UHRF1 タンパク質複合体に水酸化酵素 JMJD6 が含まれている事を発見し、試験管内で JMJD6 がヒストンタンパク質中のリジン残基を水酸化することを見出した。さらに Jmjd6 野生型マウス胚から精製したヒストンに水酸化リジンが含まれ、ノックアウトマウス胚からのヒストンには含まれないことから、生体内で Jmjd6 がヒストンのリジン残基水酸化の責任酵素であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identified a hydroxylase JMJD6 as a member of the UHRF1 complex, which works around nucleosomes, and found that JMJD6 hydroxylates histone lysine residues *in vitro*. We also revealed that histones purified from Jmjd6 wild-type mouse embryos include 5-hydroxylysine, but those purified from Jmjd6 knockout mouse embryos do not include it, indicating that Jmjd6 is a hydroxylase, which hydroxylates lysine residues of histones *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：UHRF1、JMJD6、エピジェネティクス、ヒストン修飾、水酸化

1. 研究開始当初の背景

我々はUHRF1をメチル化DNA結合タンパク質として同定して以来(Unoki et al., 2004)、このタンパク質の機能に興味を持ち、研究を進めてきた。UHRF1はさまざまな癌種で顕著に発現が上昇しており、発現を抑制すると癌細

胞の増殖が抑制されることから癌細胞の増殖に関係が深いと考えた(Unoki et al., 2004)。また我々はUHRF1がヒストン脱アセチル化酵素HDAC1による脱アセチル化を介して遺伝子発現を負に制御している可能性を提示した(Unoki et al., 2004)。その後の研究により

、1)UHRF1はDNAの複製起点でヘミメチル化DNAを認識・結合し、維持メチル化酵素DNMT1をリクルートして、ヘミメチル化DNAを両鎖メチル化することによって、DNAのメチル化状態を親細胞から娘細胞へ継承するのに関与している事、2)ヒストンメチル化酵素G9aをリクルートしてヒストンH3リジン9(H3K9)のメチル化に関与している事、3)UHRF1はメチル化したヒストンH3K9を認識・結合する事などが明らかにされ、UHRF1は「DNAのメチル化」と「ヒストン修飾」というエピジェネティクスにおける二つの重要な修飾に関与することが明らかにされた。我々はUHRF1の機能をさらに解明するためにUHRF1複合体タンパク質の探索をおこない、JMJD6という水酸化酵素をUHRF1複合体の構成タンパク質として同定した(未発表)。JMJD6の基質としてスプライシング因子であるU2AF65が報告されていたが、UHRF1はヌクレオソーム近傍で機能することから、ヒストンがJMJD6の基質になるのではないかと仮説を立て、*in vitro*でリコンビナントJMJD6タンパク質とヒストンペプチドを用いて水酸化アッセイをおこなったところ、JMJD6はヒストンのリジン残基を水酸化した(未発表)。JMJD6抗体を用いて肺癌組織の組織免疫学染色をおこなったところ、JMJD6は隣接する正常細胞と比較して肺癌細胞で高発現していることが分かった(未発表)。そこで、我々は「ヒストンの水酸化という新しい修飾が、*in vivo*でも存在するのか?」、「存在するとして、その生理的意義は何か?」「肺癌で高発現しているJMJD6は発癌に関与しているのか?」という課題に取り組んだ。

2. 研究の目的

UHRF1 複合体に含まれる JMJD6 が生体内でヒストンのリジン残基の水酸化を行う可能性と、正常細胞におけるヒストンの水酸化の

生理的意義について解明する。正常細胞におけるヒストン水酸化の生理的意義が明らかになれば、肺癌で高発現している JMJD6 が癌細胞で果たす役割についても明らかになるものと考ええる。

3. 研究の方法

(1) JMJD6 はリジン残基のどの炭素を水酸化するのかを核磁気共鳴法(京大・白川研との共同研究)およびアミノ酸組成解析(理研・堂前研との共同研究)にて同定する。

(2) 生体内において水酸化されたヒストンリジン残基をアミノ酸組成解析(理研・堂前研との共同研究)にて検出する。

(3) 生体内において JMJD6 はヒストンの水酸化の責任酵素かどうかを、JMJD6 ノックアウトマウスから得たヒストンを用いて検証する(九大 生医所・福井研、理研・堂前研との共同研究)。

(4) ヒストンのリジン残基の水酸化の生理的意義を探るために、試験管内でアセチル化酵素やメチル化酵素が、水酸化リジンを修飾できるかどうかについて、水酸化リジンを含むペプチドを基質に酵素反応をおこない検討する。

(5) ヒストンリジンの水酸化の生体内での生理的意義を解明するために、そのツールとなる水酸化リジン特異的抗体を作製する。そのために、生体から得たヒストンの、どのリジンが水酸化されているかを質量分析で同定する。

4. 研究成果

(1) JMJD6 はリジン残基のどの炭素を水酸化するのかを核磁気共鳴法(京大・白川研との共同研究)およびアミノ酸組成解析(理研・堂前研との共同研究)にて検討し、JMJD6 がリジン残基の5位の炭素に水酸基を付加する事を見だし、アセチル基やメチル基が付

加される6位炭素のアミノ基(εアミノ基)とは異なることを明らかにした。

(2) 我々はJmjd6が高発現しているマウスの精巢および、Jmjd6の発現が中程度であるES細胞および14.5日胚からヒストンを精製した。このヒストンをアミノ酸組成解析(理研・堂前研との共同研究)にて分析し、生体内のヒストン中に水酸化されたリジンが一定量含まれていることを明らかにした。

(3) 生体内においてJMJD6はヒストンの水酸化の責任酵素かどうかを、Jmjd6ノックアウトマウスから得たヒストンを用いて検討した(九大生医所・福井研、理研・堂前研との共同研究)。Jmjd6ノックアウトマウスは周産期致死であることから、Jmjd6ノックアウト14.5日胚と、対照としてJmjd6野生型14.5日胚からヒストンを精製し、アミノ酸組成解析で分析したところ、Jmjd6非存在下では、ヒストンに水酸化リジンが含まれないことが明らかになった。また、JMJD6安定高発現細胞株から得たヒストンには、対照細胞から得たヒストンより多くの水酸化リジンが含まれていた。これらの結果より、ヒストンのリジン残基の責任酵素はJMJD6であることが明らかとなった。

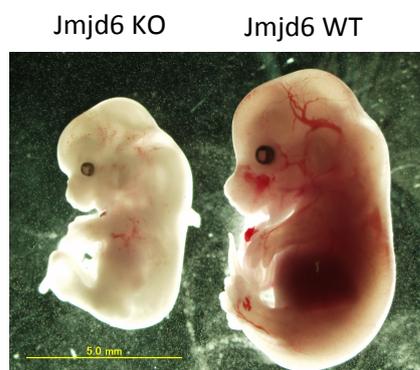


図1 Jmjd6野生型およびノックアウト胚。

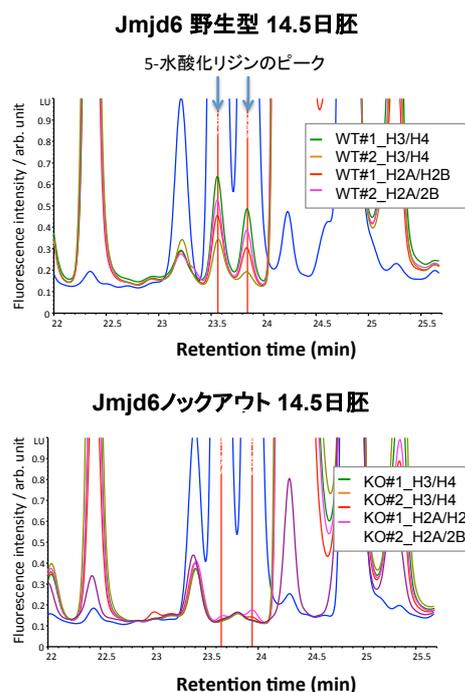


図2 アミノ酸組成解析による5-水酸化リジンの検出。

(4) リジン残基の水酸化される炭素とアセチル化/メチル化される炭素が異なることより、水酸化はこれらの修飾が付与されるのを直接的には阻害しないが、水酸基がつくことで、アセチル化酵素やメチル化酵素の酵素活性部位に影響する可能性が考えられたため、この可能性を試験管内酵素反応にて検討した。この結果、水酸化リジンはアセチル化酵素やメチル化酵素による修飾を非常に受けにくくなっている事が分かり、水酸化はアセチル化やメチル化修飾と拮抗する修飾である可能性が示唆された。

(5) 我々は当初、ヒストンリジンの水酸化の生体内での生理的意義を解明するために、そのツールとなる水酸化リジン特異的抗体を作製するところまでを計画していたが、特異的抗体作製までには至らなかった。これは当初の予想と異なり、質量分析によって水酸化されるリジンが容易に決定できなかったことによる。水酸化リジンが特定のリジン残

基に付加される可能性以外に、生体内では中間産物である可能性や（注：アミノ酸組成解析では加水分解をするため、糖鎖修飾などははずれる）、水酸化がランダムにヒストンのリジン残基に入りヒストンの物性に影響を与える可能性なども視野にいれ、現在、引き続き生体内での水酸化リジンの生理的意義の解明を目指し、さまざまなアプローチを試みている。

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7件)

- ① Mori T, Ikeda DD, Yamaguchi Y, Unoki M & NIRF Project. NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape. *FEBS Lett.*, in press, 2012, 査読あり
- ② Unoki M. Current and Potential Anticancer Drugs Targeting Members of the UHRF1 Complex Including Epigenetic Modifiers. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **6**, 116-130, 2011, 査読あり
- ③ Cho HS, Suzuki T, Dohmae N, Hayami S, Unoki M, Yoshimatsu M, Toyokawa G, Takawa M, Chen T, Kurash JK, Field HI, Ponder BA, Nakamura Y & Hamamoto R. Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. *Cancer Res.*, **71**, 655-660, 2011, 査読あり
- ④ Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Maehara Y, Ponder BAJ, Nakamura Y & Hamamoto R. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int. J. Can.*, **128**, 562-563, 2011, 査読あり
- ⑤ Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Yamaue H, Ponder BAJ, Nakamura Y & Hamamoto R. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int. J. Can.*, **128**,

574-586, 2011, 査読あり

- ⑥ Unoki M, Daigo Y, Koinuma J, Tsuchiya E, Hamamoto R & Nakamura Y. UHRF1 is a novel diagnostic marker of lung cancer. *Br. J. Cancer*, **103**, 217-222, 2010, 査読あり
- ⑦ Hayami S, Yoshimatsu M, Veerakumarasivam A, Unoki M, Iwai Y, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Yamaue H, Ponder BAJ, Nakamura Y & Hamamoto R. Overexpression of the JmJc histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: Involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Mol. Cancer*, **9**, 59, 2010, 査読あり

[学会発表] (計2件)

- ① 鵜木元香、吉松正憲、有田恭平、益田晶子、堂前直、植田幸嗣、岩井裕希子、醍醐弥太郎、浜本隆二、白川昌宏、中村祐輔。UHRF1複合体に含まれるJMJD6によるヒストンリジン残基の水酸化について。第5回エピジェネティクス研究会年会。2011年5月19日～20日。KKR熊本ホテル。
- ② 鵜木元香、益田晶子、堂前直、福井宣規、有田恭平、浜本隆二、岩井裕希子、白川昌宏、佐々木裕之、中村祐輔。In vivoにおけるヒストン水酸化酵素としてのJMJD6の同定。第6回エピジェネティクス研究会年会。2012年5月14日～15日。東京一ツ橋学術総合センター。

[図書] (計2件)

- ① Unoki M. BLADDER CANCER ~ from basic science to robotic surgery ~ (Chapter 6: UHRF1 is a potential molecular marker for diagnosis and prognosis of bladder cancer.) *InTech*, 129-146, 2012
- ② 鵜木元香、佐々木裕之。発生におけるエピジェネティクスとその破綻。SIGMA, 2-8, 2012 Winter

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜木 元香 (UNOKI MOTOKO)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：30525374