

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460072

研究課題名(和文) 前がん病変で発現上昇するクロマチン関連因子による細胞死制御

研究課題名(英文) Regulation of cell death by epigenetics regulatory factors upregulated during the early stages of hepatocarcinogenesis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のがん化はDNAの変異だけでなく、ヒストン修飾などのエピジェネティクス制御の異常にも制御される。本研究において、発がん初期に発現上昇するヒストン修飾因子の発現およびタンパク質安定性について検討した。加えて、相互作用因子や細胞死制御に関わる遺伝子の発現に与える影響を解析した。さらに、オートファジーに与える影響についても検討した。そして、エピジェネティクス制御因子が細胞死制御に関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Malignant transformation is caused by epigenetic mutations, including histone modification, as well as DNA mutations. In this study, we observed the expression and the stability of arginine methyltransferase CARM1, upregulated during the early stages of hepatocarcinogenesis. In addition, we analyzed effects of histone deacetylase HAC9 on the interaction factors and expression levels of cell death-related genes. Furthermore, we investigated the role of histone acetyltransferase HBO1 and histone variants H2a.z in autophagy. Our findings reveal that some of histone modification enzymes upregulated during the early stages of hepatocarcinogenesis might be involved in regulation of cell death.

研究分野：生物系薬学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン ヒストン修飾酵素 アセチル化 メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) がんは遺伝子に傷が入る遺伝子変異が原因であることが明らかにされている。それに加えて、遺伝子を細胞の核に収納するために必要なヒストンタンパク質の化学修飾、そのヒストンに類似のタンパク質であるヒストンバリエーションなどの異常も関与することが知られている。ヒストンタンパク質の修飾などによる遺伝子発現制御は DNA 配列変化を伴わないエピジェネティクスといわれ、がん化機構の解明、診断、治療への応用が重要視されている。

代表者らは、発がん初期(肝前がん病変)に発現変化するエピジェネティクス制御に関わるクロマチン関連因子を複数単離し、それらの因子の細胞増殖、細胞がん化、腫瘍マーカー発現制御における役割の解明を進めている。発がん初期に発現上昇する因子の中には、ヒストン修飾酵素に加えて、ヒストンバリエーションやヒストンのクロマチンへの移行に関与するヒストンシャペロンも含まれる。ヒストン修飾酵素については、分子標的治療薬の標的分子としても注目されており、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などは臨床応用されている。

(2) アポトーシスなどのプログラムされた細胞死は生体の恒常性維持に重要である。酸化ストレスや DNA 損傷によるアポトーシス誘導は発がんに対して抑制に働く。オートファジーは細胞成分分解システムであり、エネルギー源確保・細胞死制御に重要である。細胞内品質管理の点からオートファジーは発がん抑制に働く。一方で、エネルギー確保の点からはがん細胞の維持・促進に働く。前がん病変では、アポトーシス、オートファジーともに変動が起きる時期であることから、この時期におけるエピジェネティクスを考慮した細胞死制御機構の解明が必要とされている。

(3) クロマチン関連因子およびその因子を介した作用機構、細胞死やオートファジーなどの基本的な生命現象の機構は進化の過程で保存されており、酵母を用いた系の研究がすすめられている。代表者らは出芽酵母を用いたクロマチン関連因子の解析も進めており、ヒストンシャペロン ASF1、ヒストンバリエーション H2A.Z の解析から、エピジェネティクス変異誘発化合物による細胞死感受性などについて明らかにしている。また、ヒストンアセチル化酵素複合体とヒストンシャペロンの機能的相互作用についてもこれまでに明らかにしている。

(4) 前がん病変において発現上昇していることを明らかにした因子の中で、本研究においてはヒストンメチル化酵素 CARM1、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9、ヒストンバリエーション H2A.Z を中心に解析を行う。これ

らの因子の解析にあたり、以下の予備的知見をこれまでに得ていた。

・ヒストンメチル化酵素 CARM1 について：CARM1 が酸化ストレス制御に関わる転写因子 Nrf2 と機能的に相互作用することを明らかにした。さらに最近、CARM1 がポリユビキチン分解系を介して、タンパク質安定性の制御を受けていることを明らかにした。

・ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 について：

HDAC9 がヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞の足場非依存的増殖能を促進することを明らかにした。また、神経細胞死制御に関与するハンチントン病関連因子 HAP1 と HDAC9 が相互作用することを明らかにした。

・ヒストンバリエーション H2A.Z について：正常細胞およびがん細胞のオートファジーの誘導過程において、H2A.Z の発現が減少することを明らかにした。

2. 研究の目的

ヒストンメチル化酵素 CARM1、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9、ヒストンバリエーション H2A.Z が細胞死制御に与える影響について明らかにし、発がん初期過程である肝前がん病変で発現上昇するクロマチン関連因子が細胞死制御に与える影響を明らかにすることを目的とする。

(1) 酸化ストレス制御に関わる転写因子 Nrf2 と CARM1 が協調的に機能することに注目し、Nrf2 の標的遺伝子の発現制御に CARM1 が与える影響を明らかにする。酸化ストレスにより誘導されるアポトーシス、オートファジーにおける CARM1 の役割を解明する。加えて、CARM1 の分解制御による影響も明らかにする。

(2) がん抑制遺伝子産物 p53 を介した細胞死の制御に HDAC9 が与える影響を明らかにする。HDAC9 細胞内局在に影響を与える HAP1 が p53-HDAC9 細胞死制御系への影響を明らかにする。さらに、HAP1 のアセチル化/脱アセチル化の制御の意義を解明する。

(3) オートファジー制御における H2A.Z の役割を明らかにする。さらにオートファジー関連遺伝子の発現制御領域における H2A.Z のクロマチンへの取り込みとヒストンのアセチル化との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内局在の検討

各種培養細胞に Flag タグもしくは Myc タグ融合タンパク質を導入し、それぞれのタグを認識する抗体および TRITC もしくは FITC 標識二次抗体を用いて反応を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。一部の実験は共焦点レーザー顕微鏡を用いた。また、内在性 CARM1 の局在は抗 CARM1 抗体を用いて検出した。

(2) CARM1 スプライシングバリエントおよび p53 標的遺伝子の発現の検出

各種培養細胞から RNA を調製し、逆転写酵素により cDNA を調製し、PCR の鋳型とした。CARM1 スプライシングバリエントの発現はエキソン 15 を挟む位置の上流と下流のエキソンのプライマーを用いて PCR を行い、その PCR 産物を電気泳動法により分離し、発現を検討した。

p53 標的遺伝子の発現はそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて、定量 PCR 法により検討した。

(3) 安定発現細胞株の作製

耐性遺伝子含有プラスミドを導入後、細胞を播種しなおし、G418 含有培地で 2 週間程度培養し、耐性細胞株を選択した。

(4) ユビキチン化、SUMO 化タンパク質の検出

Flag タグもしくは Myc タグ融合 CARM1 を HA タグ融合ユビキチンもしくは SUMO 発現プラスミドとともに導入後、細胞溶解液を調製し、抗 Flag 抗体もしくは抗 Myc 抗体で免疫沈降した。免疫沈降産物を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、抗 HA 抗体により、ユビキチン化もしくは SUMO 化タンパク質を検出した。

(5) オートファジーの誘導および検出

ラパマイシン添加もしくは血清除去により行った。また、オートファジーの検出はマーカータンパク質の発現、LC3-I から LC3-II への変換、および GFP-LC3 のドット形成により評価した。

4. 研究成果

(1) ヒストンメチル化酵素 CARM1 の細胞内局在およびスプライシングバリエントの機能解析

CARM1 は主に核において発現している因子であるが、発がん進行過程において、細胞質においても発現が上昇している可能性を見出している。発がん過程の酸化ストレスに注目し、酸化ストレス応答に関わる因子の共発現が CARM1 発現場所に与える影響を検討した。酸化ストレス制御に関わる転写因子 Nrf2 および Nrf2 と相互作用する Keap1 の共発現は CARM1 の細胞内局在に影響を与えなかった。また、トポイソメラーゼ を阻害することにより DNA 損傷を誘発するエトポシド添加も CARM1 の局在に顕著な変化を与えなかった。

CARM1 スプライシングバリエントが複数単離されており、そのうちのひとつエキソン 15 を欠いた CARM1.v4 の局在および発現を検討した。各種培養細胞において、すべてのエキソンを含む CARM1.v1 と CARM1.v4 で局在に違いが観察されなかった。CARM1.v1 と

CARM1.v4 とともに前がん病変において発現上昇しており、また、各種培養細胞においてこれらの発現の割合は異なることが明らかとなった。調べた細胞種の中では、がん細胞の方が CARM1.v4 の発現割合が高い傾向が観察された。

CARM1.v1 およびスプライシングバリエント CARM1.v4 の局在を検討するため、GFP-CARM1.v1 および GFP-CARM1.v4 安定発現細胞の作製を試みた。これらの安定発現株の単離が困難であり、タンパク質分解系を考慮した。プロテアソーム阻害剤 MG-132 添加により、これらのタンパク質が MG-132 濃度依存的に検出された。そして、ユビキチン発現プラスミドを用いることにより、CARM1.v1 だけでなく、CARM1.v4 もユビキチン化されることが示され、その程度に明確な違いはなかった。small ubiquitin-related modifier, SUMO1 および SUMO2 についても同様に解析したが、SUMO 化修飾は検出されなかった。これらの解析から、これらの因子はプロテアソーム系で分解され、タンパク質の安定性については違いが観察されなかった。

続いて、CARM1.v1、CARM1.v4 が標的遺伝子の発現に与える影響を検討した。CARM1 はがん抑制遺伝子産物 p53 の転写共役因子として機能する。そこで、p53 標的遺伝子 p21、Bax に CARM1.v1、CARM1.v4 が与える影響を DNA 損傷誘発薬剤エトポシド非存在下および存在下において検討した。エトポシド非存在下の p53 標的遺伝子の発現に CARM1.v1 は影響を与えなかったことに対し、CARM1.v4 は発現をわずかながら上昇させた。一方で、エトポシド添加により p53 標的遺伝子の発現は誘導されたが、CARM1.v4 はその誘導を抑制する傾向が観察された。これらの結果から、p53 標的遺伝子の発現に与える影響は CARM1 スプライシングバリエントにより異なる可能性が示された。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 の p53 標的遺伝子の発現および HAP1 との相互作用に関する解析

細胞死制御関連遺伝子 Bax は p53 依存的にプロモーター活性が制御される遺伝子のひとつである。HeLa 細胞において、HDAC9 は Bax のプロモーター活性を抑制した。核移行シグナルをコードするエキソン 7 を欠く HDAC9 Δ 7 も Bax プロモーター活性を抑制する傾向が観察された。

がん細胞の足場非依存的増殖能を HDAC9 は促進すること、および神経細胞死制御に関わる因子 HAP1 が HDAC9 と相互作用することを明らかにしている。これらのことから、HDAC9 が細胞死を抑制する可能性が考えられた。そこで、エトポシド処理により誘発された細胞死に HDAC9 が与える影響を検討した。しかし、エトポシド処理により誘発される細胞死には HDAC9 は影響を与えないこと

が示された。

HDAC9 およびエキソン 7 を欠くスプライシングバリエーション HDAC9Δ7 も前述の HAP1 と相互作用することをこれまでに明らかにしている。しかし、相互作用領域の詳細は明らかにされていない。HDAC9 の脱アセチル化活性領域は HDAC9 のほぼ中央からカルボキシ末端側に存在する。その脱アセチル化酵素活性領域を欠き、エキソン 12 までの領域および 16 アミノ酸からなるスプライシングバリエーションとして、myocyte enhancer factor-2 interacting transcriptional repressor (MITR) が知られている。この MITR も HAP1 と相互作用することが免疫沈降法により示された。また、MITR の局在に HAP1 が影響を与えることも示された。続いて、エキソン 12 までの部分欠失体 (HDAC9N) とエキソン 13 以降の部分欠失体 (HDAC9C) についても相互作用を検討した。その結果、HDAC9C は HAP1 と相互作用せず、HDAC9N とは相互作用し、さらに HAP1 により、局在制御を受けた。これらの結果から、HDAC9 と HAP1 の相互作用は HDAC9 のアミノ末端領域を含むエキソン 12 までの領域を介していることが示された。HDAC はアミノ酸配列の類似性から複数のクラスに分類され、HDAC9 はクラス IIa に属する。このエキソン 12 までの領域はクラス IIa HDAC に特徴的なアミノ酸配列を含む。また、クラス IIa に属する HDAC5 も HAP1 と相互作用した。これまでにクラス I、クラス IIb などの他のクラスの HDAC は相互作用を示さなかったことから、HAP1 はクラス IIa HDAC と特異的に相互作用し、機能制御に関わる可能性が考えられた。今後、クラス IIa の HDAC が HAP1 のアセチル化状態に与える影響を解明することにより、互いの因子の機能制御の解明につながると考えられる。

(3) ヒストンバリエーション H2a.z のオートファジー制御に与える影響の解析

オートファジー制御に関わるリン酸化酵素 mammalian target of rapamycin 阻害剤であるラパマイシン添加により、ヒストン H2a のバリエーションである H2a.z の発現が減少することを見出してきた。H2a.z には 2 種類の遺伝子が存在する。これらの遺伝子は、ラット胎仔肝由来細胞においてはラパマイシンによるオートファジー誘導過程において発現減少の傾向を示したが、ヒト子宮頸がん由来細胞においては、顕著な変化を示さなかった。ヒストンバリエーション H2a.z がラパマイシン誘導オートファジー誘導過程で発現減少していることを明らかにしている。オートファジーの指標のひとつである GFP-LC3 のドット形成は H2a.z 過剰発現により影響を受けなかった。しかし、H2a.z 発現抑制は LC3 発現に影響を与える可能性が示された。

H2a.z 解析過程において、ヒストンアセチル化酵素 HBO1 はラパマイシン誘導のオートファジーの過程において発現上昇すること

が明らかとなった。しかし、高濃度ラパマイシンにより細胞死が誘導される過程においては、発現量がタンパク質レベルで減少することが示された。また、HBO1 はオートファジーを抑制する傾向が観察された。これらの結果から、発がん初期過程において発現上昇する複数のクロマチン制御に関わる因子が細胞死制御に関わるオートファジーに影響を与えることが示された。

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 1 件)

長田 茂宏

発がん初期に発現上昇するヒストン修飾酵素の役割、細胞、査読無、Vol. 49、2017、pp.412-415

[学会発表](計 15 件)

Shigehiro Osada

Histone deacetylase 9 interacts with huntingtin associated protein 1、NCU Global Young Investigator Forum 2018 on "Regulatory Mechanisms of Epigenetic Information and Their Clinical and Applications" (2018)

長田 茂宏

ヒストンアセチル化酵素 HBO1 のオートファジーにおける役割、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)

長田 茂宏

オートファジー誘導過程におけるエピジェネティクス制御因子の発現変化、第 137 年会日本薬学会 (2017)

長田 茂宏

Interaction of huntingtin associated protein 1 with histone deacetylases、第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

長田 茂宏

ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 とハンチントン病関連因子の相互作用、第 136 年会日本薬学会 (2016)

長田 茂宏

オートファジー誘導過程におけるエピジェネティクス関連因子の発現、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015)

長田 茂宏

肝前がん病変において発現上昇するクロマチン関連因子の解析、第 135 年会日本薬学会 (2015)

長田 茂宏

Characterization of coactivator-associated arginine methyltransferase 1, CARM1, induced at the early stage of hepatocarcinogenesis、第 37 回日本分子生物学会年会 (2014)

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

(4)研究協力者

なし