

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16087

研究課題名(和文)アダプター分子PTIPの造血系における生物学的機能および複合体選択性の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of the adaptor protein PTIP

研究代表者

中田 雄一郎(Nakata, Yuichiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90793430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：白血病発症に促進的に作用するレトロウイルスMOL4070Aをマウスに感染させ、内在性の遺伝子発現変化を誘導するin vivo mutagenesisを行い、白血病発症に至る期間を比較した結果、コントロールマウスと比較してPtip cKOマウスは白血病の発症が有意に促進された。さらに、白血病を発症した Ptip cKOマウスの腫瘍細胞から DNAを抽出し、ウイルス特異的なプライマーを用いて inverse PCRを行い、ウイルス挿入遺伝子部位を同定した。その結果、Evi1遺伝子の高発現がPtipの機能欠失と協調的に作用し、白血病の発症を促進させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線や薬剤によって誘導される染色体異常は白血病を含む悪性腫瘍の原因となる。造血幹細胞におけるDNA損傷修復機構の正確な理解は、白血病に対する予測因子の同定やそれを応用した新規治療法の開発に繋がることが期待される。本申請では、PTIPがDNA修復蛋白質として直接的に損傷部位の修復に関与する一方で、ヒストン修飾を介したDNA損傷修復関連遺伝子の発現制御によって間接的にDNA修復応答を支持することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We applied MOL4070A-mediated mutagenesis to Ptip cKO mice. During the observation period, the MOL4070A-infected Ptip cKO mice developed acute leukemia. We then analyzed retroviral integration sites of MOL4070A in the leukemic tissues. We identified the Evi1 gene as a common integration site.

研究分野：エビジェネティクス

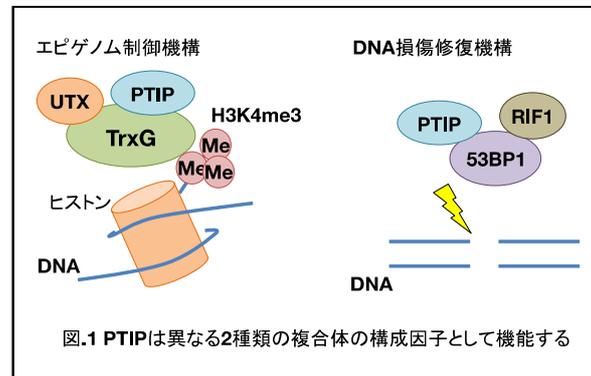
キーワード：白血病 エビジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現調節はDNAのメチル化やヒストン修飾を含めたエピジェネティック制御によって厳密に行われ、この機構の破綻は、遺伝子発現の均衡性の崩壊およびクロマチン状態の不安定化を介して、老化や腫瘍感受性の亢進を誘導する。ヒストン H3 の第 27 番目のリジン残基(H3K27)は、ポリコーム複合体 2(PCRC2)によりメチル化され、トリメチル化された H3K27(H3K27me3)は遺伝子の転写抑制に関与する。申請者は、これまで遺伝子改変マウスの作製と解析を通じて、造血細胞および白血病細胞における H3K27me3 制御機構を明らかにしてきた。

H3K27me3 制御に関連する蛋白質の解析を行う過程で、PTIP が H3K27me3 の脱メチル化酵素 UTX やトリソックス複合体(TrxG)と複合体を形成し、遺伝子発現を制御することに着目した。PTIP は明らかな酵素活性ドメインを持たず、様々な蛋白質と結合する BRCT ドメインを有するアダプター分子である。PTIP を先天性に欠損したマウスは胎生 9.5 日目に死亡することから、PTIP は個体の発生や生命維持に必須な蛋白質であると考えられる。

PTIP は、(1) 遺伝子の転写を促進するヒストン修飾であるヒストン H3 の第 4 番目のリジン残基のトリメチル化 H3K4me3 制御を媒介する TrxG と H3K27me3 脱メチル化制御を媒介する UTX と複合体を形成し、遺伝子の転写の活性化を制御する、(2)DNA 修復蛋白質複合体(53BP1、RIF1)と複合体を形成し、DNA の二本鎖切断が生じた際に非相同末端結合(NHEJ)により DNA を修復する、という 2 種類の異なる生物学的機能を媒介する(図.1)。また、ヒト造血器腫瘍における発現解析の結果、PTIP の発現低下と腫瘍化に関連性があることが示唆されるが、PTIP の造血系における役割は明らかになっていない。



2. 研究の目的

PTIP は、ヒストン修飾蛋白質複合体と DNA 損傷修復蛋白質複合体の両者に含まれるアダプター因子である。これまでエピゲノム制御機構と DNA 損傷修復機構は、別々の独立した生命現象と捉えられてきたが、最近、H3K4me3 制御と DNA 損傷応答にある程度の関連性や連動性があることが明らかになりつつある。ある細胞応答制御に複数の独立経路を介して関わる分子の報告例は乏しく、その点において、PTIP がどのように DNA 損傷応答に関与するのかを解明することは、生物学的および医学的に重要な研究課題と考えられる。また、PTIP はそれらの機能的特徴から、がん抑制因子の一種と推察されるが、PTIP の機能欠失変異と腫瘍化の関連性も明らかにされていない。そこで本申請では、PTIP が DNA 修復蛋白質として直接的に損傷部位の修復に関与する一方で、ヒストン修飾を介した DNA 損傷修復関連遺伝子の発現制御によって間接的に DNA 修復応答を支持する、そして、その二つの経路を介して腫瘍化を抑制しており、PTIP の機能欠失変異によって白血病発症・進展が誘発されるという仮説を立て、それらを実験的に検証することを目的とする。また、エピゲノムの攪乱および DNA 修復機構の破綻によって腫瘍感受性が亢進する可能性について、レトロウイルス感染による *in vivo* mutagenesis により検討を行う。

3. 研究の方法

(1) マウス HSC における PTIP のエピゲノム制御を介した DNA 損傷応答への関与

申請者は白血病細胞株において、放射線(X線)処理後に H3K4me3 レベルが亢進し、それが PTIP の欠失によって抑制されることを明らかにしている(図2)。今回、H3K4me3 制御を介した DNA 損傷応答への PTIP の関与をさらに詳細に解析する目的で、白血病細胞株に加えて、培養細胞より正確に生体内造血組織の特性を反映するマウス造血幹細胞(HSC)を用い、放射線処理後の HSC の H3K4me3 レベルの変動および PTIP の関与を明らかにする。また、申請者は、tamoxifen 処置により後天性に *Ptip* 欠損を誘導できるマウスを独自に作製している(未発表)。野生型と *Ptip* 欠損マウスから HSC を単離し、放射線処理による DNA 二本鎖切断を誘導した後の H3K4me3 レベルにつき、蛍光標識抗体とフローサイトメトリーを用いて比較する。

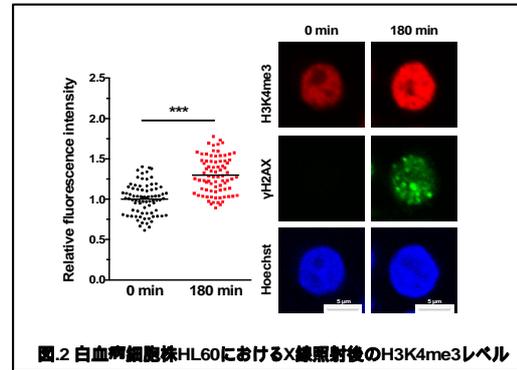


図2 白血病細胞株HL60におけるX線照射後のH3K4me3レベル

また、申請者は、tamoxifen 処置により後天性に *Ptip* 欠損を誘導できるマウスを独自に作製している(未発表)。野生型と *Ptip* 欠損マウスから HSC を単離し、放射線処理による DNA 二本鎖切断を誘導した後の H3K4me3 レベルにつき、蛍光標識抗体とフローサイトメトリーを用いて比較する。

(2) H3K4me3 制御を介した DNA 損傷応答における PTIP の制御遺伝子群の同定

PTIP による H3K4me3 を介した DNA 損傷応答制御機構を解明する目的で、定常状態と DNA 二本鎖切断を誘導した野生型および *Ptip* 欠損 HSC を対象として、遺伝子発現量の変動を RNA-sequencing で網羅的に解析する。この解析によって、DNA 損傷に反応して発現亢進する遺伝子群の中で、PTIP によって発現制御される遺伝子群を同定できる。またその遺伝子群が、どのような細胞機能あるいはシグナル経路に関連しているのか Gene set enrichment analysis によって評価し、これまで知られていなかったエピゲノム制御を介する間接的な DNA 修復反応における PTIP 制御遺伝子の特性を解明する。

(3) PTIP の機能欠失と腫瘍化との関連性の解明

PTIP はその機能的特徴に加え、造血器腫瘍(特に骨髓球系白血病)で発現低下がみられることから、がん抑制因子の可能性が高い。本研究では、PTIP の機能欠失と腫瘍化の因果関係を明らかにする目的で、野生型および *Ptip* 欠損マウスにおいて、白血病発症に促進的に作用するレトロウイルス MOL4070A を *Ptip* cKO マウスに感染させ、内在性の遺伝子発現変化を誘導する *in vivo* mutagenesis を並行して行い、白血病発症に至る期間を比較する。さらに、MOL4070A 感染により白血病を発症した *Ptip* cKO マウスの腫瘍細胞から DNA を抽出する。ウイルス特異的なプライマーを用いて inverse PCR を行い、ウイルス挿入遺伝子部位を同定し、PTIP の欠損と協調的に作用し、白血病発症を促進させる遺伝子の同定を試みる。

4. 研究成果

マウス HSC は白血病細胞株同様に、放射線処理後に H3K4me3 レベルが亢進し、PTIP の欠失によってその効果は抑制された。このことから、DNA 損傷後の H3K4me3 の上昇に PTIP が関与することが明らかとなった。DNA 損傷後の H3K4me3 上昇の生物学的意義を解明する目的で、定常状態および放射線処理後の白血病細胞株を用いて RNA-seq を行なった。その結果、放射線処理後の H3K4me3 の上昇に伴って細胞増殖を抑制する pathway の活性化が認められ、さらに PTIP の欠失によってこの pathway の活性化が抑制された。このことから、PTIP は、DNA 損傷後の間接的修復機構として H3K4me3 修飾による遺伝子発現制御を介して細胞増殖の抑制を促進す

ることが明らかとなった。MOL4070A を Ptip cKO マウスに感染させ、内在性の遺伝子発現変化を誘導する *in vivo* mutagenesis を行い、白血病発症に至る期間を比較した結果、コントロールマウスと比較して Ptip cKO マウスは白血病の発症が有意に促進された。さらに、白血病を発症した Ptip cKO マウスの腫瘍細胞から DNA を抽出し、ウイルス特異的なプライマーを用いて *inverse* PCR を行い、ウイルス挿入遺伝子部位を同定した。その結果、Evi1 遺伝子の高発現が Ptip の機能欠失と協調的に作用し、白血病の発症を促進させることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田 雄一郎, 山崎 憲政, 神沼 修, 本田 浩章
2. 発表標題 DNA損傷修復反応におけるH3K4me3制御の解明
3. 学会等名 第42回 分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----