

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590274

研究課題名（和文）両アリルへの挿入変異導入を利用した疾患原因遺伝子の単離と機能解析

研究課題名（英文）Functional characterization of candidate disease genes identified by the efficient bi-allelic insertional mutagenesis

研究代表者

鈴木 健之（SUZUKI TAKESHI）

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号：30262075

研究成果の概要：

がんの発症や悪性化の分子メカニズムを解明するためには、原因となる遺伝子の同定とその機能解析が重要となる。我々は、ウイルス感染発がんモデルマウスを用いて、発がんに関係する遺伝子を網羅的に同定し、その機能や相互作用を解析している。同定された標的遺伝子のなかでも、タンパク質のメチル化・脱メチル化に関与する酵素群は、がんの新しい分子標的の候補として、特に注目して解析を進めている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ゲノム、挿入変異、がん遺伝子、がん抑制遺伝子、ウイルス

1. 研究開始当初の背景

高次生命現象や疾患の分子メカニズムを理解するためには、それに関与する遺伝子群を効率よく単離できる手法が必要であり、挿入変異はその重要なひとつと考えられる。マウスレトロウイルスによる血液腫瘍の発症には、ゲノムへのウイルスの挿入が引き起こす遺伝子の変異や発現変化が深く関係するため、ウイルス挿入部位を特定すれば原因遺伝子が同定できる。我々は、このウ

イルス挿入変異の研究に取り組み、挿入部位の大規模同定によるがん関連遺伝子の網羅的解析を最初に報告した《文献：Takeshi Suzuki（他7名、1番目）New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. **Nature Genetics**, **32**, 164-74, 2002.》。これまでに、ゲノムワイドに分布する3,000箇所以上のウイルス挿入部位をマップし、発がん重要なコモンサイト（共通挿入部位）を250箇所以上同定し、がん関連遺伝子のデータベースを構築してきた

《文献：Keiko Akagi, Takeshi Suzuki (他3名、2番目) RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D523-7, 2004.》。

この従来の実験系では、挿入変異で発現や機能が活性化されるがん遺伝子が主に同定され、不活性化されるがん抑制遺伝子がほとんど同定されないという問題点があった。不活性化に必要な両アリルへのウイルス挿入は極めて確率が低いため、と考えられる。そこで我々は、分裂組換えを頻発するブルーム症候群モデルマウス (Blm遺伝子変異マウス) を用いて、ウイルス挿入変異を行うことで、両アリルへの変異導入率を高めて、がん抑制遺伝子を効率的に単離する実験系を構築した。これまでに、このマウスの腫瘍から、Rb関連遺伝子 (p107, p130)、ファンコニ貧血原因遺伝子 (Fancg) など既知の遺伝子を含むがん抑制遺伝子の候補を数十個発見した《文献：Takeshi Suzuki (他4名、1番目) Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Blm deficient mice. *EMBO J.*, **25**, 3411-21, 2006.》。機能未知の新しい候補遺伝子として単離したもののうち、Fbx110とJmjd5は、Jumonji (JmjC) ドメインという共通の構造をもっており、これらの遺伝子発現をノックダウンした細胞で突然変異率が顕著に上昇したことから、ゲノムの恒常性を維持する役割が示された。最近、Fbx110がヒストン脱メチル化酵素であり、JmjCドメインがその重要なモチーフであることが、他の研究者によって報告された。すなわち、我々の実験結果は、ヒストン脱メチル化酵素が、がん抑制遺伝子の候補となりうることを初めて示したもので、ヒストンのメチル化制御と発がんとの重要な関連性が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

本研究では、分裂組換えを頻発するBlm変異マウスや変異細胞を用いてウイルス挿入変異を行うことにより、両アリルへの変異導入効率を高め、これまで難しかった劣性表現型を示す疾患原因遺伝子の効率的なスクリーニングを目的としている。レトロウイルス感染Blm変異マウスに発症した血液腫瘍から、ウイルスタギングによって、疾患の原因となる劣性遺伝子の単離を進めていく計画である。また、優性原因遺伝子の網羅的な同定が可能な従来挿入変異法ともあわせて、疾患

の発症に重要な新しい遺伝子ファミリーを同定し、その生物学的な機能や疾患における役割を明らかにするための実験を並行して進める。

3. 研究の方法

(1) ブルーム症候群モデルマウスを用いた候補がん抑制遺伝子の単離

ウイルス感染Blm変異マウスに発症した腫瘍から、ゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にInverse PCRを行い、ウイルス挿入部位を含むゲノム断片を増幅する。この塩基配列を決定し、マウスのゲノム上にウイルス挿入部位をマップして、候補遺伝子の探索を行う。共通挿入部位の遺伝子が、腫瘍の発症に重要であり、特に、翻訳領域の内部にウイルス挿入をもつ遺伝子が、がん抑制遺伝子の有力な候補である。候補遺伝子は、由来した腫瘍において、両アリルでの変異が生じているか、サザンブロットでまず確認する。

(2) 候補遺伝子の機能解析 (全般)

候補遺伝子の発現を恒常的にノックダウンできるshRNA発現レトロウイルスを構築し、培養細胞に感染させて、細胞増殖、細胞周期制御、アポトーシスなどにおける機能を解析する。また、感染細胞のmutator表現型やUV・放射線に対する感受性や抵抗性を調べる実験も行う。さらに、shRNA発現レトロウイルスをマウスの血球前駆細胞に感染させ、ガンマ線照射したレシピエントマウスに感染細胞を移植する実験を行い、in vivoでの表現型の発現を調べる。こうした実験に加えて、FLAGおよびHisタグを融合した候補遺伝子産物を発現する細胞株を樹立し、その細胞抽出液から、抗タグ抗体を用いて遺伝子産物を含む複合体を精製する。複合体の構成要素を質量分析で解析して、相互作用する分子を同定し、候補遺伝子の生物学的な役割の解析に活用する。

(3) ヒストンのメチル化を制御する酵素群の機能解析

ウイルスの標的遺伝子 (がん遺伝子またはがん抑制遺伝子の候補) として同定されたヒストンのメチル化酵素9種と脱メチル化酵素11種について、cDNAまたはshRNA発現レトロウイルスを構築し、上記の培養細胞での機能解析、複合体解析の実験を行う。また、テトラサイクリンの添加で遺伝子発現のON/OFFを調節できる細胞株を樹立し、ヒストンのメチル化変化に伴う遺伝子発現プロファイルを調べる研究も計画している。

(4) ホメオボックス転写因子Meis1の機能

解析

ウイルス挿入変異によって同定された白血病の原因遺伝子 Meis1 は、ホメオボックス転写因子をコードし、がん発症に関与するだけでなく、目の形成や血液細胞の発生に重要な役割を持つことが知られている。血液や血管の発生の研究に適したゼブラフィッシュを用いて、個体発生における Meis1 の機能解析を行う。タンパク質翻訳阻害を誘導するアンチセンスモルフォリーノをゼブラフィッシュ胚に導入して効果を観察する。

4. 研究成果

(1) ブルーム症候群モデルマウスおよびその細胞を用いた候補がん抑制遺伝子の単離

従来の Blm 変異マウスを用いたスクリーニングに加えて、Blm 変異細胞を用いる実験系を構築した。Blm 遺伝子変異マウスの骨髄由来の細胞に遺伝子トラップ型自己不活性化レトロウイルスを感染させた。このウイルスは、ゲノムの遺伝子の内部に挿入しトラップした場合にネオマイシン耐性遺伝子を発現するため、G418 を含む培地で感染細胞を培養して選択した。感染直後の細胞を多数の小集団に分割し、G418 を含む培地で培養し、継代を繰り返すと、増殖を停止せず3ヶ月以上培養可能な細胞集団を取得することができた。そのゲノム DNA から、Ligation-mediated PCR を用いてウイルス挿入部位を含む断片を単離し、トラップされた細胞の不死化に関与する劣性遺伝子の候補を同定した。現在までに、Blm 変異マウスおよびその細胞を利用することで、ウイルス挿入変異によって同定された既知のがん抑制遺伝子の数が、従来の2遺伝子から21遺伝子に増加し、取得効率が大幅に改良された。

(2) ヒストンメチル化制御酵素群の機能解析

挿入変異の大規模な解析の結果、高頻度に同定される標的として、タンパク質、特にヒストンのメチル化を制御する酵素群(メチル化酵素17種と脱メチル化酵素11種)を見いだした。リン酸化、アセチル化、メチル化のようなヒストンの翻訳後修飾は、転写制御、DNA複製・修復、ヘテロクロマチン形成などさまざまな生物学的現象に重要な役割を担っている(ヒストンコード仮説)。また、ヒトのがんでは、ヒストンのアセチル化酵素の変異や脱アセチル化酵素の発現異常が観察され、脱アセチル化酵素の阻害剤が既に抗がん剤として開発されている。これに対し、ヒストンのメチル化と発がんの関係は、

解析がまだ十分進んでおらず、がんの新しい分子標的の候補として、メチル化を制御する酵素群は大変注目される。私たちは、標的として同定したメチル化制御酵素について、ヒト肺がんにおける発現解析や、遺伝子発現に与える影響の網羅的な解析を現在進行している。最近、これらの酵素のなかに、ヒストンばかりでなく、p53などの転写制御因子や、NFkBやWntシグナル経路の因子に影響を与える酵素がいくつか存在することがわかった。すなわち、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾と同様、メチル化が、広くタンパク質の機能調節に重要であることを示す証拠と考えられる。

(3) 標的となる non-coding RNA および micro RNA の同定

従来の解析で、共通挿入部位として同定されていたものの、その近傍にタンパク質をコードする候補遺伝子が見つからない部位が存在していた。我々は、このような挿入部位について、micro RNA や non-coding RNA 遺伝子が標的になっている可能性を見いだした。サンガー研究所の microRNA 遺伝子データベース(miRBase)を参考にすると、マウスで同定されている microRNA 遺伝子とそのクラスターは、染色体上257箇所マップされる。そのうち、48箇所(約2割)がウイルス挿入変異の標的となっていることがわかった。このなかには、既知のがん遺伝子である mir17-92 遺伝子クラスターと mir21 遺伝子が含まれていた。我々は、候補 microRNA 遺伝子のうち、ウイルス挿入によって発現が上昇し、同時に Ras シグナル伝達経路と協調して発がんに関与することが示唆される遺伝子を同定しており、その協調性に注目して解析を進めている。また、non-coding RNA 遺伝子についても、ウイルスの標的となる遺伝子を現在十数個同定している。non-coding RNA は、ほとんど機能がわかっておらず、その機能を発見するためのツールとしてウイルス挿入変異が利用できるのではないかと期待している。

(4) ホメオボックス転写因子 Meis1 の機能解析

血液腫瘍の原因遺伝子は、正常な血液・血管の機能に極めて重要な役割をもつことが多い。ウイルス感染マウスの血液腫瘍から同定したがん遺伝子 Meis1 は、ホメオボックスをもつ転写制御因子をコードしており、ヒトの急性骨髄性白血病にも関与が認められる。私たちは、血液・血管の発生の研究に適したゼブラフィッシュを用いて、Meis1 がん遺伝子産物の機能を調べた。ゼブラフィッシュの

体幹部では、頭側・尾側方向に伸びた主要血管である背側大動脈(DA)と後主静脈(PCV)が存在し、体節間を通して腹側・背側方向に伸びる体節間血管(ISV)がDAとPCVを結ぶことで血流の循環が成立している。モルフォリンによるMeis1のタンパク質翻訳阻害胚では、主要血管は存在していたが、ISVの背側方向への伸長が認められなかった。また、予定DA領域において、動脈のマーカー遺伝子であるFlk1, ephrinB2の発現が顕著に低下し、静脈特異的なEphB4, Flt4の異所的発現が認められた。Flk1は動脈分化に重要な働きを持つ血管内皮細胞増殖因子VEGFの受容体であり、Flk1のタンパク質翻訳阻害胚を調べたところ、Meis1の場合と同様の表現型が観察された。したがって胚発生において、Meis1がFlk1の発現を介してVEGFシグナルを制御し、血管網形成や血管内皮細胞、特に動脈の分化に関わっていることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Minehata K, Kawahara A, Suzuki T. Meis1 regulates the development of endothelial cells in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374, 647-52, 2008, 査読有.
- ② Suzuki T. ウイルス挿入変異によるがん関連遺伝子の同定, *細胞*, Vol. 40, No. 2, 56-59, 2008, 査読無.

[学会発表] (計9件)

- ① Suzuki T, Ishimura A, Terashima M, Suzuki Y, Sugano S, Yoshida M. Identification of novel cancer genes using retroviral insertional mutagenesis in mice. 第31回分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.10, 神戸
- ② Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T, Suzuki T. 新規がん抑制遺伝子候補Jmjd5の機能解析 第31回分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.10, 神戸
- ③ Suzuki T. Involvement of histone methyltransferases and demethylases in cancer identified by retroviral insertional mutagenesis. 第67回日本癌学会学術総会, 2008.10.28, 名古屋
- ④ Suzuki T. ウイルス感染マウスを用いた新しいがん分子標的の探索. The 22nd

Meeting of the Society for the study of Mammalian Genetics, 2008.9.12, 東京

⑤ Suzuki T, Ishimura A, Terashima M. Identification of the genes involved in mouse retrovirus-induced leukemia/lymphoma by high-throughput retroviral tagging. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008.9.10, 淡路島

⑥ Suzuki T. Identification of novel cancer genes using retroviral insertional mutagenesis in mice. The Joint Symposium of the 3rd International Symposium of Institutes Network and Hot Spring Harbor-Global COE Symposium, 2008.2.1, 別府

⑦ Suzuki T. Identification of novel cancer genes using retroviral insertional mutagenesis in mice. 第30回分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007.12.14, 横浜

⑧ Suzuki T. Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Bloom syndrome model mice. 第66回日本癌学会学術総会, 2007.10.5, 横浜

⑨ Suzuki T, Ishimura A. High-throughput retroviral tagging for identification of the genes involved in mouse retrovirus induced lymphoma. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007.9.1, 淡路島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健之 (SUZUKI TAKESHI)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号: 30262075

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし