

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14日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590303

研究課題名（和文） ゲノムへの挿入変異を利用した疾患関連遺伝子の単離とその機能解析

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

研究代表者

鈴木 健之（SUZUKI TAKESHI）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30262075

研究成果の概要（和文）：

レトロウイルス挿入変異によってマウスに発症した腫瘍から、ウイルスタギングを用いて新しいがん関連遺伝子群の探索を進め、これまでにヒストンや DNA のメチル化の制御に関与する酵素群を同定した。さらに、これらのエピジェネティクス制御因子が、がんの発症ばかりでなく、がんの悪性進展の様々なステップにおいて重要な役割を担っていることを示す新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Retroviral insertional mutagenesis in mice is one of the important strategies for high-throughput identification of cancer genes. Using this system, we have so far identified most of histone lysine methyltransferase genes and demethylase genes as candidate oncogenes or tumor suppressor genes. We have found that some of the enzymes are involved not only in the tumor initiation but also in the malignant tumor progression such as cell invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：疾患モデルマウス、挿入変異、がん遺伝子、がん分子標的、レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

高次生命現象や疾患発症の分子メカニズムを理解するためには、関与する遺伝子群を効率よく同定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、ウイルスのゲノムへの挿入が引き

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。これまでに私たちは、ウイルス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《文献：[Suzuki T et al. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. Nature Genetics,](#)

32, 164-74, 2002.》、ゲノムワイドに分布する3,000箇所以上の挿入部位から構成されるがん関連遺伝子のデータベースを作成し公開してきた《文献: Akagi K, Suzuki T et al. RCTGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res.* 32, D523-7, 2004.》。さらに、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、両アレルへの変異導入率を高めて、劣性表現系を示す疾患原因遺伝子を効率的に単離する独自の実験系を構築し、従来の挿入変異の問題点を克服した《文献: Suzuki T et al. Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Blm-deficient mice. *EMBO Journal*, 25, 3411-21, 2006.》。

このようなウイルス挿入変異の大規模解析から、高頻度に単離される標的として、ヒストンのメチル化酵素 (Ezh2, Setd7, Smyd2 など) と脱メチル化酵素 (Fbx110, Jmjd3, Jmjd2c など) を同定した。メチル化、アセチル化、リン酸化などヒストンの翻訳後修飾は、転写制御、DNA複製、X染色体不活性化をはじめとする様々な生物学的現象に関与している (ヒストンコード仮説)。近年、脱メチル化に関与する酵素が次々と発見されたことによって、ヒストンやDNAのメチル化は、可逆的に調節されることで様々な生物学的現象に関与すると理解されるようになった。さらに、ヒトのがんではヒストンのアセチル化の制御異常が観察され、脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として開発されているため、ヒストンのメチル化とがんとの関係性の解明にも期待が集まっている。

2. 研究の目的

従来の研究で確立したウイルス挿入変異法やBlm 遺伝子変異のもとでの両アレル変異法を用いて、腫瘍の発症や細胞の不死化に関連する遺伝子の網羅的な同定を行う。そして、疾患の発症に重要な新しい遺伝子ファミリーを見だし、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進める。特に、既に単離された重要な候補であるヒストンのメチル化を制御する酵素群に注目し、その細胞生物学的機能を詳細に解析して、がんの発症および様々ながんの悪性進展過程 (細胞の浸潤、上皮・間葉転換、薬剤耐性獲得など) における新しい役割を解明す

ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ウイルス挿入変異を利用した疾患関連遺伝子の単離

レトロウイルス感染マウスおよび感染 Blm 遺伝子変異マウスに発症した血液腫瘍を採取する。腫瘍のゲノム DNA 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、ゲノム上にウイルス挿入部位をマップして、新規候補遺伝子の探索を行う。複数の腫瘍由来のコモンサイト (共通挿入部位) の遺伝子が、腫瘍の発症に重要であると判断される。特に、遺伝子の翻訳領域の内部にウイルス挿入をもち、両アレルの変異がサザンプロットで確認されたものが、がん抑制遺伝子の候補と定義される。

(2) 候補遺伝子の機能解析 (全般)

単離された候補遺伝子の発現を恒常的に発現する cDNA 発現レトロウイルスや、ノックダウンできる shRNA 発現ウイルスを構築し、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、がんの悪性化の重要なステップである細胞の運動能、浸潤能、上皮間葉転換、薬剤耐性についても解析する。それに加えて、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

候補遺伝子として同定したヒストンのメチル化を制御する酵素 (メチル化酵素と脱メチル化酵素) については、これらの 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。さらに、薬剤の添加で酵素の発現の ON/OFF を調節できる細胞株を樹立し、酵素が転写調節を行う標的遺伝子探索のために、cDNA の大規模シークエンシングによるデジタル発現プロファイリングを進行する。

4. 研究成果

(1) ヒストンのメチル化を制御する酵素群のがんにおける重要性

ウイルス挿入変異の大規模な解析から、ヒストンのメチル化酵素17種(Ezh2, Setd7, Smyd2など)と脱メチル化酵素12種(Fbx110, Jmjd3, Jmjd2c など)を新たな標的として同定した。ヒストンの翻訳後修飾は、転写制御など様々な生物学的現象に関与している。特に、ヒストンの脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として開発されていることもあり、メチル化と発がんの関係も大変注目される。標的として同定したメチル化を制御する酵素群について、所属研究所のヒトがん組織バンクを利用し、がん組織での発現を調べた結果、酵素の発現異常が高頻度に検出された。また、酵素を高発現する数種類のがん細胞株では、酵素の発現をノックダウンすると、細胞増殖の抑制が観察され、ヒストンのメチル化の脱制御が、がん細胞の増殖に密接に関係していることが確認された。

(2) ヒストンのメチル化制御酵素による遺伝子発現の調節

ヒストンのメチル化制御酵素の発現異常が細胞内の遺伝子発現に与える影響を調べるために、がん遺伝子候補(Jmjd2c, Plu1 など)や、がん抑制遺伝子候補(Utx, Jmjd3 など)の酵素の発現を薬剤の添加によってON/OFFできる細胞株を樹立し、cDNAの大規模シーケンシングによるデジタル発現プロファイリングを行った。

これまでに、食道がんで高発現が見られるJmjd2c脱メチル化酵素が、Mdm2がん遺伝子の発現上昇を誘導し、細胞内のp53がん抑制遺伝子産物の減少を引き起こすことを明らかにした。その際、Mdm2遺伝子発現制御領域にJmjd2cがリクルートされ、その領域に存在するヒストンH3の9番目のリジン(H3K9)の脱メチル化を介して、クロマチン構造を転写抑制状態から転写活性化状態に変換することを見いだした。(発表文献④)

また、ヒト食道がんや腎がんで変異が見られるがん抑制遺伝子候補Utx脱メチル化酵素が、細胞の増殖を負に制御することを見だし、その際、ヒストンH3の27番目のリジン(H3K27)の脱メチル化を介して、RbおよびRb12がん抑制遺伝子の発現上昇を誘導することを明らかにした。(発表文献③)

このように、酵素の標的遺伝子の発現とともに、標的遺伝子の発現制御領域でのヒスト

ンの翻訳後修飾の変化を調べることで、がん細胞における遺伝情報発現異常の本質を理解していきたい。

(3) ヒストン脱メチル化酵素 PLU1 による細胞浸潤能の亢進

乳がんや前立腺がんで高発現が見られるがん遺伝子 PLU1 脱メチル化酵素が、がんの発症だけでなく、がん細胞の細胞浸潤能を亢進する活性をもつことをはじめて示し、がんの悪化における新たな役割を見つけた。デジタル発現プロファイルを用いて PLU1 酵素による転写制御の標的となる KAT5/Tip60 ヒストンアセチル化酵素を同定した。さらにその下流の標的である CD82/KAI1 遺伝子も含めて、PLU1 の制御する遺伝子発現カスケードが、がん細胞の浸潤に重要であることを明らかにした。(発表文献②)

(4) がん関連遺伝子候補 Jmjd5 脱メチル化酵素の機能解析

脱メチル化酵素である Jmjd5 がん関連遺伝子の生理機能や発がんにおける役割を解明するために、Jmjd5 conditional KO マウスを作製した。Jmjd5 null マウスは、胚性致死の表現型を示し、その原因のひとつが、細胞周期制御因子 p21/Cdkn1a の異常な発現亢進であることを見いだした。ChIP 解析の結果、Jmjd5 は p21/Cdkn1a 遺伝子の転写領域上のヒストン H3K36 メチル化を介して、その遺伝子発現を調節していることがわかった。(発表文献①) さらに、p53 KO マウスとの交配実験等から、Jmjd5 が p53 シグナル経路の制御に関わる新しい因子であることを示唆する結果を得ており、Jmjd5 複合体の酵素活性と p53 の機能との関係を今後明らかにしていく計画である。

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4件)

- ① Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T, Suzuki T. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of Cdkn1a expression. *Development*, 139, 749-759, 2012, 査読有 .DOI: 10.1242/dev.074138
- ② Yoshida M, Ishimura A, Terashima M,

- Enkhbaatar Z, Nozaki N, Satou K, Suzuki T. PLU1 histone demethylase decreases the expression of KAT5 and enhances the invasive activity of the cells. *Biochemical J.*, 437, 555-564, 2011, 査読有. DOI: 10.1042/BJ20110343
- ③ Terashima M, Ishimura A, Yoshida M, Suzuki Y, Sugano S, Suzuki T. The tumor suppressor Rb and its related Rbl2 genes are regulated by Utx histone demethylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 399, 238-244, 2010, 査読有. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.07.061
- ④ Ishimura A, Terashima M, Kimura H, Akagi K, Suzuki Y, Sugano S, Suzuki T. Jmjd2c histone demethylase enhances the expression of Mdm2 oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389, 366-371, 2009, 査読有. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.08.155

[学会発表] (計 21 件)

- ① Suzuki T., レトロウイルス挿入変異を利用した新しいがん関連遺伝子の探索, 金沢医科大学ハイテクリサーチセンター公開シンポジウム(招待講演), 2012. 2. 24, 金沢医科大学総合医学研究所 (石川県)
- ② Suzuki T., Terashima M, Enkhbaatar Z, Oktyabri D, Tani N, Ogura M, Ishimura A., Functional analysis of histone methyltransferases and demethylases in the process of malignant progression of cancer. 第 34 回分子生物学会年会, 2011. 12. 14, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T, Suzuki T., Jmjd5, which is identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates embryonic cell proliferation through the epigenetic control of Cdkn1a., 第 34 回分子生物学会年会, 2011. 12. 14, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ Suzuki T., Yoshida M, Terashima M, Enkhbaatar Z, Ishimura A., Identification of cancer related genes regulated by histone methyltransferases and demethylases., 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑤ Terashima M, Ishimura A, Suzuki T., Possible role of histone demethylases in malignant progression of tumors., 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑥ Ishimura A, Terashima M, Suzuki T., Jmjd5, which is identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates Cdkn1a and modulates embryonic cell growth., 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑦ Terashima M, Ishimura A, Yoshida M, Suzuki T., Functional analysis of histone demethylases involved in malignant progression of tumors., The 6th International Symposium of Institute Network, 2011 年 6 月 9 日, 東京医科歯科大学 M&D タワー (東京都)
- ⑧ Suzuki T., Identification of novel cancer related genes using retroviral insertional mutagenesis., 血液フォーラム 21 (招待講演), 2011 年 5 月 28 日, メルパルク京都 (京都府)
- ⑨ Enkhbaatar Z, Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Suzuki Y, Suzuki T., Identification of cancer related genes regulated by histone demethylase, using massively parallel sequencing technology., International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan, 2011 年 5 月 26 日, 石川県立音楽堂 (石川県)
- ⑩ Terashima M, Ishimura A, Yoshida M, Suzuki T., Functional analysis of histone demethylases involved in cancer by identifying its target genes., International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan, 2011 年 5 月 25 日, 石川県立音楽堂 (石川県)
- ⑪ Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T, Suzuki T., Jmjd5, a candidate cancer-related gene identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates the expression of Cdkn1a and modulates embryonic cell proliferation., International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan,

- 2011年5月25日, 石川県立音楽堂 (石川県)
- ⑫ Suzuki T., レトロウイルス感染マウスを用いたがん分子標的の探索, 北海道大学遺伝子病制御研究所共同研究集会 (招待講演), 2010年12月21日, 北海道大学医学部フラス会館 (北海道)
- ⑬ Suzuki T., Terashima M, Yoshida M, Ishimura A., Functional analysis of histone methyltransferases and demethylases identified by mouse retroviral insertional mutagenesis., 第33回分子生物学会年会, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑭ Terashima M, Ishimura A, Yoshida M, Suzuki T., Functional characterization of JmJc domain-containing proteins and SET domain-containing proteins involved in cancer., 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月23日, 大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑮ Ishimura A, Terashima M, Suzuki T., The physiological role of Jmjd5, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis., 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月23日, 大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑯ Suzuki T., Terashima M, Yoshida M, Ishimura A., Functional analysis of histone methyltransferases and demethylases identified by mouse retroviral insertional mutagenesis., The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2010年9月9日, Awaji Yumebutai Conference Center (兵庫県)
- ⑰ Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T, Suzuki T., The role of Jmjd5, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis: Analysis of Jmjd5-deficient mice., The 5th International Symposium of Institutes Network, 2010年6月24日, KKR Hotel Kanazawa (石川県)
- ⑱ Terashima M, Suzuki T., Transcriptional regulation by the JmJc-domain-containing proteins involved in cancer., 第32回分子生物学会年会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑲ Ishimura A, Suzuki T., Functional analysis of Jmjd5, a candidate cancer

- gene identified by retroviral insertional mutagenesis., 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑳ Suzuki T., Involvement of protein methyltransferases and demethylases in oncogenesis identified by viral insertional mutagenesis., 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ㉑ Suzuki T., Involvement of histone methyltransferases and demethylases in mouse retrovirus-induced leukemia/lymphoma., The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2009年9月9日, Awaji Yumebutai Conference Center (兵庫県)

[その他]
ホームページ等
<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/Genomics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健之 (SUZUKI TAKESHI)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 30262075

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し