

令和元年6月11日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07201

研究課題名(和文) ヒストンH2A変異体による癌化とエピゲノム攪乱メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms to promote epigenomic disturbances and oncogenic transformation by histone H2A mutants

研究代表者

相原 仁 (AIBARA, Hitoshi)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・特任助教

研究者番号：80587717

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)：クロマチンの主要構成因子であるヒストンH2AのC末端領域は、ヌクレオソームの外部に露出し、リン酸化およびユビキチン化の修飾を受ける。我々は先行研究により、VRK1キナーゼがH2Aをリン酸化し、サイクリンD1の転写を活性化させ、腫瘍形成を促進することを示した。本研究は、両修飾のクロストークによる転写制御バランスの破綻が癌化を引き起こすという仮説のもとに、癌ゲノムデータベースを用いて、両修飾部位を含むH2AのC末端周辺部位に焦点を絞り、H2Aの変異を見出した。次にこれらのH2A変異体の腫瘍形成能を調べた結果、リン酸化およびユビキチン化部位が腫瘍形成に必須なアミノ酸残基であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストン修飾酵素の発現異常、遺伝子増幅、ナンセンス・ミスセンス変異と細胞癌化の直接的な関連性は多数報告されているが、ヒストン自体の変異が癌化に関連する報告は、典型的なヒストンH3に対して存在比わずか1%のバリエーションH3.3のケースの2例のみである。この変異は、小児神経腫瘍の高グレードで顕在し、有効な治療法確立の標的あるいは突破口になる可能性があり注目度は高い。それに対し本研究は、バリエーションでない典型的H2A変異を見出したこと、H2Aのリン酸化およびユビキチン化部位の変異が癌化を誘発することを初めて示している。将来的なエピゲノム修正・調節による癌治療の礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The C-terminal region of histone H2A is phosphorylated or ubiquitylated in human cancer cell lines. Previous our study has demonstrated that VRK1 kinase phosphorylates threonine 120 in H2A (H2A-T120) on the core promoter region of the cyclin D1 gene which is a master regulator of cell proliferation. VRK1 knockdown showed loss of H2A-T120 phosphorylation and increased ubiquitylation of lysine 119 in H2A (H2A-K119). In vitro studies demonstrated that H2A-T120 phosphorylation and H2A-K119 ubiquitylation were mutually inhibitory. Furthermore, expression of phospho-mimic mutant of H2A (H2A-T120D) transformed NIH/3T3 cells. Finally, utilizing COSMIC database, we identified several missense mutations of H2A-K118, K119, T120 that exhibited tumorigenic activities. These results suggest that bankruptcy of balance between H2A-T120 phosphorylation and H2A-K118, K119 ubiquitylation causes inappropriate gene expression, including upregulated cyclin D1, which promotes oncogenic transformation.

研究分野：生化学

キーワード：クロマチン ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

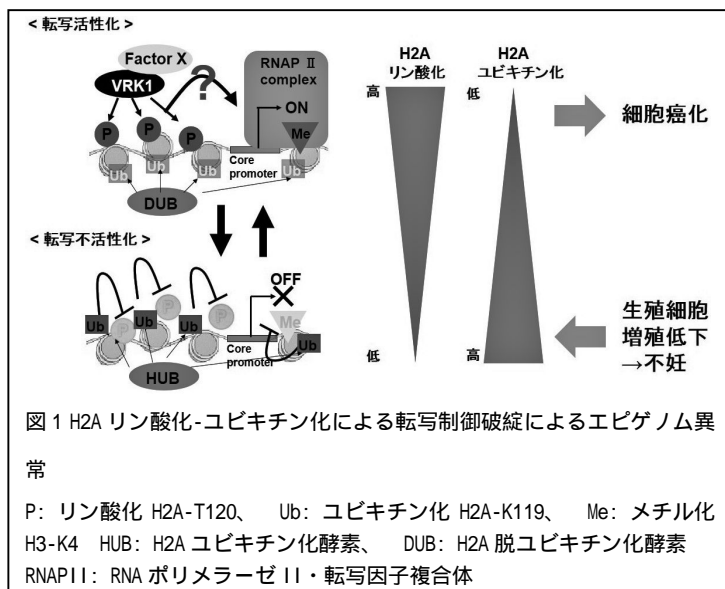
1-(1) 研究動機

哺乳類のクロマチン主要構成因子であるヒストンタンパク質 (H1, H2A, H2B, H3, H4) の翻訳後修飾 (アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化) は、遺伝子転写、染色体凝縮・分配、ゲノム修復の制御に関わることが知られている。近年、このヒストン修飾の制御破綻すなわちエピゲノム異常が、癌などの疾病の原因であることが明らかになりつつある。ヒストン修飾酵素の異常な発現、遺伝子増幅、ナンセンス・ミスセンス変異と癌の直接的な関連性は多数報告されている (Miremadi et al. Hum. Mol. Genet. 2007)。一方、ヒストン自体の変異が癌化に関与する報告は、ヒストンバリエント H3.3 の 27 番目リジンのメチオニン変異および 34 番目グリシンのアルギニン又はバリン変異の 2 例のみである (Schwartzentruber et al. Nature 2012)。これらの変異は、大規模エクソームシーケンス解析によって、小児の原発性脳腫瘍の中で最も悪性度の高いグリオブラストーマ (神経膠芽腫 GBM) で高頻度に認められた。GBM は、外科手術、放射線療法、化学療法を組み合わせた集学的治療を行っても生存期間は 2 - 3 年と予後不良かつ根治困難な疾患であるため、分子標的治療薬など有効な治療方法の確立が切望されている。H3.3 の 27 番目リジンは、ポリコム転写抑制複合体 (PRC2) の構成因子 Ezh2 酵素によってトリメチル化される。典型的な H3 に対して、H3.3 の発現量は全体の 1% 程度であるにもかかわらず、H3.3 メチオニン変異体によってクロマチン全般的な H3 の 27 番目メチル化レベルの著しい低下、いわば波及効果が生じる (Lewis et al. Science 2013)。しかしながら、この波及効果のメカニズムは明らかにされていない。また他のヒストン変異の存在については報告例がない。

1-(2) これまでの研究経過

我々は、ヌクレオソーム特異的にヒストン H2A の 120 番目スレオニン (H2A-T120) をリン酸化するキナーゼ Nucleosomal Histone Kinase-1 (NHK-1) をショウジョウバエ胚から精製・同定し、このキナーゼおよびリン酸化部位が進化的によく保存されていることを明らかにした (Aihara H, et al. Genes Dev. 2004)。NHK-1 オートログ VRK1 のノックアウトマウスは雌雄共不妊であり、精原細胞の減少や生殖細胞分化・減数分裂で働く遺伝子群の発現異常が観察され (Wiebe et al. Biol. of Reproduction 2010, Choi et al. PLoS ONE 2010) NHK-1 ファミリーによる H2A リン酸化の重要性を示唆する。さらに我々は、他のグループとの共同研究から、癌組織で H2A-T120 リン酸化が亢進していることを見出し、NHK-1 の哺乳類ホモログ VRK1 による H2A-T120 リン酸化異常による癌化メカニズムについて以下のことを明らかにした。

siRNA による VRK1 の発現低下と発現マイクロアレイの解析の結果、VRK1 がサイクリン D1 の遺伝子転写を活性化することを証明した。H2A-T120 リン酸化と 119 番目リジン (H2A-K119) のユビキチン化が



拮抗関係にあることを証明し、培養細胞を用いた ChIP-seq 解析の結果、コアプロモーター領域で両修飾の拮抗作用によって転写制御されるサイクリン D1 を含む遺伝子群を同定した。siVRK1 処理で低下した細胞増殖率が、サイクリン D1 の発現で回復した。H2A リン酸化模倣体 (H2A-T120D) や VRK1 を過剰発現させたところ、NIH3T3 細胞のトランスフォームおよび腫瘍形成が誘発された。我々の先行研究において、H2A-K119 ユビキチン化が、転写活性化の指標であるヒストン H3 の 4 番目リジン (H3-K4) のメチル化を抑制する一方、脱ユビキチン化によりメチル化抑制を解除すると転写を活性化することを証明している (Nakagawa et al. Genes & Dev. 2008)。以上 - の結果から、H2A リン酸化・ユビキチン化を担う C 末端は、癌細胞の増殖に必要な不可欠な領域であり、VRK1 の H2A-T120 リン酸化によるサイクリン D1 遺伝子の転写制御が細胞増殖制御のメインストリームであると推測され、VRK1 による H2A のリン酸化が転写を活性化する、一方 H2A のユビキチン化が不活性化に働き、両者の相互拮抗作用によって転写状態が調節・維持され、この調節破綻が、癌化や不妊の原因であると考察される (図 1)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒストン H2A C 末端領域の T120 リン酸化部位、K119 ユビキチン化部位およびその周辺領域アミノ酸残基におけるナンセンス・ミスセンス・フレームシフト変異の有無を調べ、その変異の癌化への関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

3-(1) 癌細胞株および癌患者の組織検体合わせて 2 万以上の全ゲノムシーケンスデータを集積した英国サンガーセンターの COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) 公開データベースを用いて、18 遺伝子ある H2A の C 末端部分のアミノ酸変異を調べた。

3-(2) これらの変異 H2A の腫瘍形成能を調べるため、pMX レトロウイルスベクターを用いて H2A 変異体を発現させた NIH3T3 細胞を、免疫不全ヌードマウスに皮下注射し、8-12 週経過後の腫瘍形成を観察した。

3-(3) H2A 変異体を発現させた NIH3T3 細胞を用いて細胞増殖、サイクリン D1 の発現、サイクリン D1 プロモーター領域における H2A-T120 リン酸化を調べた。

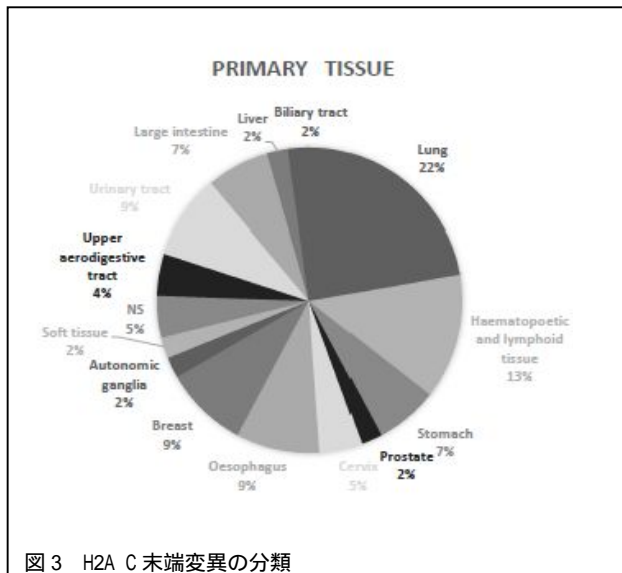
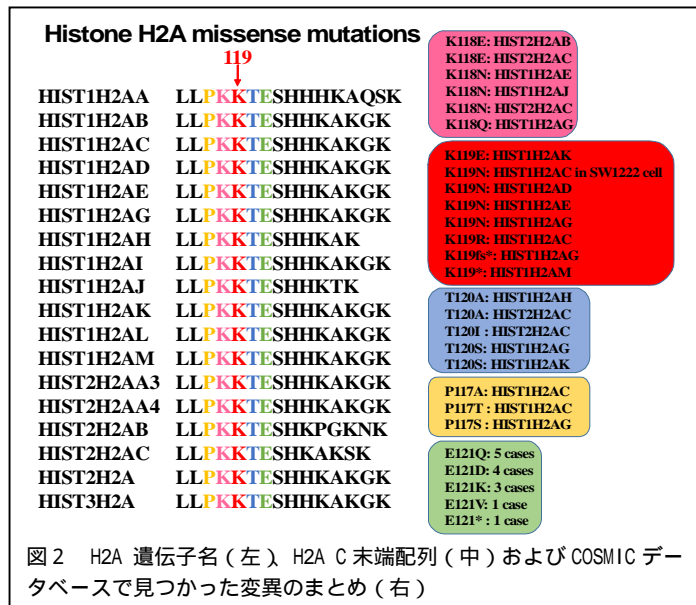
4. 研究成果

4-(1) COSMIC データベースを用いて、H2A C 末端領域の変異を見出した (図 2 右)。また次世代シーケンサーを用いて 39 種類の癌細胞における H2A 変異を調べた結果、ヒト結腸癌由来 SW1222 細胞の HIST1H2AC 遺伝子における 119 番目リジンのアスパラギン変異 (K119N) を同定した。さらに、見出した H2A 変異の分類を行ったところ、肺癌が約 20% で最も多かったが、全般的に多くの癌細胞種で H2A の変異が認められた (図 3)。

4-(2) 次にこれらの H2A 変異体の腫瘍形成能を調べた結果、H2A-K118, H2A-K119, H2A-T120,

の変異体で強い腫瘍形成能が認められた。周辺残基の H2A-P117 や H2A-E121 の変異体については、腫瘍形成能が極めて弱い、もしくは腫瘍形成能は認められなかった (図 4)。

以前の我々の培養解析を用いた解析から、H2A-K118 も K119 と同様にユビキチン化されることを確認していることから、上記の結果は、リン酸化やユビキチン化修飾を受けるアミノ酸残基は、細胞の増殖・悪性化に強く関与することを示している。



4-(3) H2A リン酸化模倣体 (H2A-T120D) を発現させた NIH3T3 細胞をクローン化し、腫瘍形成能を確認した (図 5 A)。これらの細胞は、H2A 野生型を

< H2A mutant >< Tumorigenesis >	
H2A-WT	-
H2A-K118E	+++
H2A-K118M	+++
H2A-K118N	+++
H2A-K118R	+++
H2A-K119E	+++
H2A-K119M	+++
H2A-K119N	+++
H2A-K119R	+++
H2A-K119del	+++
H2A-T120I	+++
H2A-P117A	+
H2A-P117S	++
H2A-P117T	+
H2A-E121D	-
H2A-E121K	-
H2A-E121Q	-
H2A-E121V	+

図 4 H2A C 末端変異体の腫瘍形成能

発現させた細胞よりも、増殖速度が速く(図5B)、サイクリンD1の発現亢進も認められ(図5C)、H2A-T120のリン酸化も上昇していた(図5D)。これらの細胞において、サイクリンD1をsiRNAノックダウンしたところ、細胞増殖は低下し、siRNA耐性のサイクリンD1の発現で部分的にレスキューできることを確認した(図5E)。これらの結果に一致して、サイクリンD1のコアプロモーターおよびエンハンサー領域におけるH2A-T120のリン酸化の上昇がクロマチン免疫沈降法による解析で認められた(図5F)。

以上の結果は、H2A C末端のリン酸化およびユビキチン化部位の変異が癌化を誘発することを初めて示すだけでなく、H2A変異が存在比の少ないバリエーションでなく典型的なH2Aに見られること、またH2Aリン酸化や他の修飾を含めたヒストン修飾のクロストーク制御の異常も癌化に関与することを示している。今後、H2Aの変異によってその部位自体の修飾や、他のヒストン修飾にどのような影響があるかを調べるだけでなく、VRK1やH2Aユビキチン化のE3リガーゼRing1Bを構成因子とするポリコーム抑制複合体1などの修飾酵素の変異の有無およびその腫瘍形成への関与に言及する必要があると考えられる。

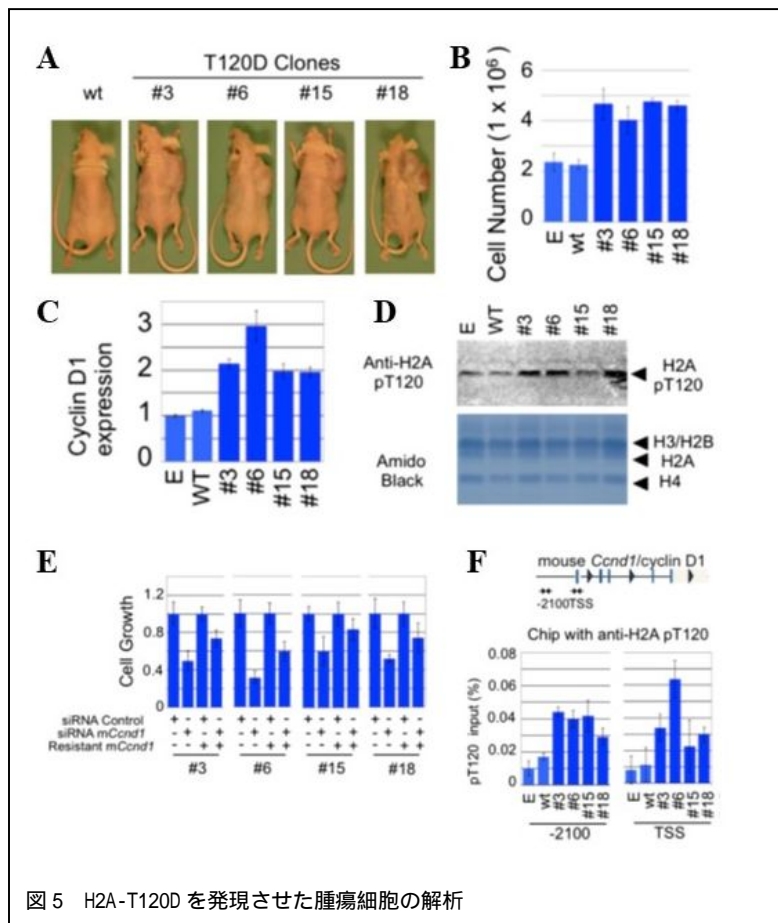


図5 H2A-T120Dを発現させた腫瘍細胞の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hitoshi Aihara, Takeya Nakagawa, Hirofumi Mizusaki, Mitsuhiro Yoneda, Masanori Kato, Masamichi Doiguchi, Yuko Imamura, Miki Higashi, Tsuyoshi Ikura, Tomonori Hayashi, Yoshiaki Kodama, Masaya Oki, Toshiyuki Nakayama, Edwin Cheung, Hiroyuki Aburatani, Ken-ichi Takayama, Haruhiko Koseki, Satoshi Inoue, Yukio Takeshima, and Takashi Ito1,

Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1.

Molecular Cell. 64, 176-188. 2016 (査読有り) doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.012

〔図書〕(計1件)

相原 仁、伊藤 敬

基礎分子生物学 : 遺伝子発現制御機構 田村 隆明 浦 聖恵 編著

p1-264 東京化学同人 2017 4/3 出版

担当: 第4章 ヒストンアセチル化・ユビキチン化

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。