

平成22年 5月14日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013018

研究課題名（和文） 転座型クロマチンリモデリング因子による細胞がん化機構の解析

研究課題名（英文） The mechanism for cell oncogenesis by chromosome-translocated chromatin remodeling factors

研究代表者

永田 恭介 (NAGATA KYOSUKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：40180492

研究成果の概要（和文）：本研究は、未分化骨髄性白血病に関連したクロマチンリモデリング因子とヌクレオポリンの融合遺伝子である *TAF-I-CAN* による細胞がん化機構を明らかにすることを目的としてすすめた。構築した *TAF-I-CAN* トランスジェニックマウスを用いて、*TAF-I-CAN* が造血細胞の分化を阻害し、幼若な細胞画分を増加させることを見いだした。一度 *TAF-I-CAN* により形質転換した細胞から、*TAF-I-CAN* をノックアウトしても、完全にごん形質が戻らないことから、*TAF-I-CAN* による細胞がん化にはエピジェネティックな変化が関わっている可能性が考えられた。*TAF-I-CAN* が核外輸送される転写因子の輸送を阻害し、あるいは転写因子を奪うことで、NF- κ B や CBP による転写を負に制御する可能性も示された。一方、小児の急性リンパ性白血病において最も高頻度に観察される *TEL-AML1* の染色体転座に、RAG による RAG 偽シグナル配列依存的な切断が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the mechanism of oncogenesis by *TAF-I-CAN* generated by chromosomal translocation and associated with undifferentiated acute myeloma. In *TAF-I-CAN* transgenic mice that we constructed, haemopoietic cell differentiation was blocked. When *TAF-I-CAN* in the cell that had been once transformed by *TAF-I-CAN* was eliminated, some oncogenic phenotypes were not cancelled, suggesting that an epigenetic change(s) is involved in cell transformation by *TAF-I-CAN*. *TAF-I-CAN* was found to inhibit NF- κ B- and CBP-mediated transcription by their being mislocalized and squelched, respectively, by *TAF-I-CAN*. In addition, we found the possibility that RAG proteins and their cryptic signal sequences are involved in translocation for generation of *TEL-AML1*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	10,700,000	0	10,700,000
2006年度	10,700,000	0	10,700,000
2007年度	10,700,000	0	10,700,000
2008年度	10,700,000	0	10,700,000
2009年度	10,700,000	0	10,700,000
総計	53,500,000	0	53,500,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：遺伝子、癌、分子生物学、染色体転座、転写、クロマチン、細胞死、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

本研究でその機能解析の対象となる TAF-I/SET-CAN/Nup214 (以後 TAF-I-CAN と表記) は、未分化骨髄性白血病に関連した染色体転座部位に同定されたクロマチンリモデリング因子とヌクレオポリン融合遺伝子産物である。TAF-I-CAN 融合遺伝子による細胞がん化のメカニズムを明らかにすることを目的とした本研究を計画するにあたり、以下の研究成果が得られていた。すなわち、TAF-I-CAN の正常細胞の形質転換能については、3T3 細胞への遺伝子 DNA 導入により足場非依存性増殖能、低血清での増殖およびヌードマウスでの造腫瘍能が認められ、この融合遺伝子のがん遺伝子であることが実証されていた。細胞がん化の分子機構の理解のための手掛かりとして、TAF-I-CAN がすくなくとも CAN の活性の一部を保持したまま、TAF-I や CAN とは一部異なる細胞内局在を示すことが示されていた。その結果、核外輸送に関わる hCRM1 の局在変化をまねき、NES タンパク質や mRNA の核外輸送に変調をもたらすことが明らかとなっていた。融合遺伝子を形成するパーツである TAF-I は、我々がアデノウイルスクロマチンの構造変換を介して複製と転写を誘起する因子として同定した宿主細胞因子である。TAF-I は、ヒストンシャペロン/酸性分子シャペロンの一員でありクロマチンのリモデリングとアセンブリー活性を持つのみならず、強力なプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) の阻害活性を持っていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たながん化機構の解明を念頭に、未分化骨髄性白血病に関連したクロマチンリモデリング因子とヌクレオポリンの融合遺伝子による細胞がん化機構を明らかにすることにある。その範疇の融合遺伝子として、我々が同定したクロマチンリモデリング因子の一つである TAF-I (Template Activating Factor-I) /SET をコードする遺伝子と核膜孔構成成分である CAN/Nup214 をコードする遺伝子の融合遺伝子である TAF-I-CAN を対象とした。さらに、小児の急性リンパ性白血病において最も高頻度 (約 25%) に観察される TEL-AML1 を対象として、白血病でよく見られる染色体転座そのものの分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 個体レベルで TAF-I-CAN の機能を検討するため、TAF-I-CAN 遺伝子を持つトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作成した。プ

ロモーターには赤芽球系及び巨核球系細胞で活性のみられる GATA-1 プロモーターを用いた。マウスの解析では、末梢血の血球数測定、および骨髄細胞の FACS 解析を行った。

(2) 培養細胞で TAF-I-CAN の細胞がん化機構を調べるため、マウス繊維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて TAF-I-CAN 恒常発現株を構築した。発現抑制には、RNAi 法と Cre-loxP システムを用いた。RNAi 法では TAF-I と CAN のつなぎ目を認識する siRNA を恒常的に発現するベクターを導入することで、TAF-I-CAN の発現抑制を行った。また、Cre-loxP システムでは、LoxP 配列で cDNA の両側を挟んだ TAF-I-CAN 発現ベクターを用いて TAF-I-CAN 発現細胞株を作成した後、Cre リコンビナーゼを発現させて TAF-I-CAN の cDNA 配列を除き発現抑制をした。細胞がん化能は、コロニー形成アッセイおよび低濃度血清条件での増殖を調べた。

(3) TAF-I-CAN の転写に与える影響を検討するため、培養細胞にレポーター遺伝子と共に TAF-I-CAN 遺伝子を導入し、レポーターアッセイを行った。また、間接蛍光抗体法によって TAF-I-CAN による他の因子の細胞内局在への影響を検討した。

(4) V(D)J 組換えに関わるタンパク質である RAG の TEL-AML1 の形成への関与の有無を明らかにするため、TEL、および AML1 遺伝子座での RAG 依存的な DNA 切断について解析実験を行った。ヒト RAG-1 と RAG-2 を過剰発現させた細胞に、TEL および AML1 遺伝子座の染色体転座点付近の配列 1-2 Kbp を組込んだベクターを導入し、それらの組換え効率を測定し、組換え産物の塩基配列を決定した。さらに細胞内染色体上の TEL 転座領域における RAG 依存的な DNA 切断も検討した。試験管内再構成系では、精製 RAG タンパク質を調製し、TEL-AML1 染色体転座における転座領域の切断点付近への結合能や片鎖切断の導入効率を調べた。

4. 研究成果

(1) 個体レベルでの TAF-I-CAN の機能解析：個体レベルで TAF-I-CAN の機能を検討するため、赤芽球系、及び巨核球系細胞で活性のみられる GATA-1 プロモーターに TAF-I-CAN を挿入したトランスジェニックマウス (Tg マウス) を構築したところ、顕著な血小板減少が認められた。加えて、大球性貧血が認められたラインも出現し、また脾臓の増大が観察された。骨髄細胞の FACS 解析を行った結果、Tg マウスでは骨髄細胞数の増加と骨髄前駆細胞の割合の増加

が認められた。一方、赤芽球系の細胞分化において、前駆細胞より分化が進行したステージの細胞群の割合が減少していた。従って、TAF-I-CAN の発現によりマウス造血細胞において造血細胞の分化が阻害され、幼若な細胞画分の増加が生じた可能性が考えられる。また、白血病患者においては染色体転座により TAF-I と CAN の発現量が半分になっていることから、TAF-I-CAN の発現だけでなくそれぞれの遺伝子の発現量の低下も細胞がん化に関与する可能性が考えられる。そこで *TAF-I* 遺伝子ヘテロマウスと Tg マウスをかけ合わせ、*TAF-I* 遺伝子ヘテロ Tg マウスを作成したところ、白血病の発症は観察されなかったが、更なる血小板減少と貧血が観察され、著しく生存期間が減少した。このことから、白血病患者においては TAF-I の発現量の低下も細胞がん化に関与することが推測される。

(2) 細胞レベルでの TAF-I-CAN の機能解析: TAF-I-CAN による細胞がん化機構を明らかにする目的で、TAF-I-CAN で形質転換した細胞での TAF-I-CAN の発現抑制を行なった。遺伝子発現抑制には siRNA 法および Cre-loxP システムを用いた。その結果、TAF-I-CAN で形質転換した際に獲得した足場非依存的な増殖能を失い、低血清培地存在下における細胞死も誘導されるようになったが、低血清培地存在下での細胞増殖能は維持されていた。これらの結果は、TAF-I-CAN が足場非依存性増殖能に関わると考えられている G1/S 期のチェックポイントおよびアポトーシス経路の破綻に直接的に関与する可能性を示している。細胞周期およびアポトーシス経路の異常を引き起こす機能は、TAF-I-CAN による細胞がん化の過程に密接に関わっている可能性がある。加えて、TAF-I-CAN による細胞がん化には、低濃度血清下での増殖能で観察されたようなエピジェネティックな機構が存在する可能性も示された。更に、マイクロアレイ解析を行なったところ、発現量に変動の見られた遺伝子の中には、TAF-I-CAN 発現細胞で TAF-I-CAN の発現を抑制した際、非発現細胞での発現量とほぼ同程度まで戻ったものがある一方、TAF-I-CAN 発現細胞とあまり差異が見られないものも存在した。これらの結果からも、TAF-I-CAN による細胞がん化にはエピジェネティックな変化が関わっている可能性が考えられる。

(3) TAF-I-CAN の分子機能解析: 構成因子である CAN は核膜孔タンパク質であり、TAF-I-CAN が有する CAN 機能により一部の細胞内輸送が阻害されることがこれまでに報告されている。TAF-I-CAN は CRM1 結合領

域である FG リピート領域を保持したまま核に局在することから、発現細胞では核膜での CAN の機能が阻害される可能性が考えられる。そこで、核外輸送シグナルを有する内在性タンパク質 I κ B および NF- κ Bp65 の細胞内局在を免疫染色法により観察したところ、正常細胞での I κ B と p65 の局在は細胞質であるのに対し、TAF-I-CAN が発現している細胞では I κ B あるいは p65 の一部は核に局在が観察された。このことから、TAF-I-CAN が発現している細胞ではタンパク質の核外移行が一部阻害されていることが明らかとなった。そこで、I κ B および p65 の局在変化が転写に与える影響を検討するため、レポーター遺伝子を用いてその転写活性を測定したところ、正常細胞で観察される TNF- α 添加による NF- κ B の転写活性化能が TAF-I-CAN が発現している細胞では抑制された。この転写抑制能は FG リピート領域を除いた欠損変異体を用いた実験では見られなかったことから、CAN の FG リピート領域に依存していることが明らかとなった。TNF- α 添加時における I κ B の局在を観察したところ、正常細胞では I κ B の局在は TNF- α 非添加時と変わらず細胞質で、その発現量は減少していたのに対し、TAF-I-CAN が発現している細胞では I κ B の核への局在が観察された。以上の結果から、TAF-I-CAN の発現により NF- κ B の転写活性化能が抑制された原因は、正常細胞では I κ B の分解が細胞質で起こるが、TAF-I-CAN によって I κ B が核に蓄積して分解されなくなったためではないかと推測される。次に、CBP を介した転写における FG リピート領域の影響を観察した。CMV エンハンサーあるいは GATA-1 結合配列をエンハンサーとして有するレポーター遺伝子は CBP の発現に依存して転写が活性化される。TAF-I-CAN を CBP とともに発現させ、レポーター遺伝子の活性を観察したところ、CBP に依存して活性化された転写の抑制がみられた。さらに CBP と TAF-I-CAN は相互作用し、TAF-I-CAN の量依存的に CBP と転写因子との相互作用が弱まった。これらの結果から、TAF-I-CAN が NF- κ B や CBP による転写を抑制する可能性が明らかとなった。

(4) *TEL-AML1* 染色体転座の分子機構: *TEL-AML1* 染色体転座の転座部位近傍には、V(D)J 組換えのシグナル配列に類似した配列が複数存在することから *TEL-AML1* 染色体転座形成機構に V(D)J 組換え反応が関与している可能性が示唆されている。V(D)J 組換えは抗原受容体遺伝子の多様性を生み出す体細胞組換えであり、リンパ球細胞特異的に発現が観察される RAG 組換え酵素が組換え反応の実行因子として機能するが、RAG

の誤った DNA 認識による異常な V(D)J 組換え反応が染色体転座を引き起こす可能性が示唆されている。そこで培養細胞における V(D)J 組換えアッセイ系を用い、*TEL-AML1* および他の様々な染色体転座の切断点密集領域における RAG 依存的な組換え反応の有無について検討した。その結果、*TEL-AML1* の転座領域 DNA 間において RAG 依存的な組換えが検出された。また、RAG を過剰発現させた 293T 細胞の細胞核内染色体上の *TEL* 転座領域においても RAG 依存的な 2 本鎖 DNA 切断が観察され、さらに RAG 複合体が *TEL* 転座密集領域のクロマチン DNA に結合していることが明らかとなった。*TEL-AML1* 染色体転座の転座領域の DNA 断片と RAG 組換えタンパク質を用いた、試験管内再構成系による実験の結果、RAG が *TEL* および *AML1* の転座領域 DNA 断片に片鎖切断を導入すること、また、一部の RAG 依存的切断箇所には V(D)J 組換えのシグナル配列に類似した配列が多数存在し、RAG はそれらの偽シグナル配列に結合および切断することが明らかとなった。これらの結果から、急性リンパ性白血病に属する *TEL-AML1* の染色体転座形成に RAG が関与している可能性が示唆された。

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 17 件)

すべて査読あり

- ① Murayama A, Omori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*, 2008; 133: 627-639.
- ② Saito S, Nouno K, Shimizu R, Yamamoto M, Nagata K. Impairment of erythroid and megakaryocytic differentiation by a leukemia-associated and t(9;9)-derived fusion gene product, SET/TAF- $I\beta$ -CAN/Nup214. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 214: 322-333.
- ③ Jin C, Kato K, Chimura T, Yamasaki T, Nakade K, Murata T, Li H, Pan J, Zhao M, Sun K, Chiu R, Ito T, Nagata K, Horikoshi M, Yokoyama K. Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006; 13: 331-338.

[学会発表] (計 98 件)

- ① Nagata K, Kato K, Murano K. Molecular and physiological roles of nucleolar histone chaperones. The 24th Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA. Sapporo, 2009. 6. 23-26
- ② Jin C, Kato K, Chimura T, Yamasaki T, Nakade K, Murata T, Li H, Pan J, Zhao M, Sun K, Chiu R, Ito T, Nagata K, Horikoshi M, Yokoyama K. Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006; 13: 331-338.

[図書] (計 13 件)

- ① Nagata K, Takeyasu K. *Nuclear Dynamics -Molecular Biology and Visualization of the Nucleus-*. Springer, 2006, Tokyo 279 ページ

[その他]

ホームページ等

http://www.md.tsukuba.ac.jp/basicmed/infectionbiology/virology/Site_2/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 恭介 (NAGATA KYOSUKE)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：40180492

(2) 研究分担者

竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：00192162

奥脇 暢 (OKUWAKI MITSURU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：50322699