

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25年 6月 7日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591495

研究課題名（和文） DNA 修復遺伝子発現制御機構の解明：新規因子 CXXC5 に着目した制御複合体の解析

研究課題名（英文） Molecular mechanism of transcriptional regulation for DNA repair genes: Identification of partner proteins for CXXC5, a novel MLH1 transcriptional factor

研究代表者

有田 通恒 (ARITA MICHITSUNE)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80307719

研究成果の概要（和文）：

CXXC5 タンパクは DNA に直接結合し DNA 修復遺伝子 MLH1 の転写を正に制御する因子であることが明らかとなった。また、CXXC5 は他のタンパク性因子 SYF2 や HNRNPH1 と相互作用し、協同して MLH1 の転写制御に関与することも示唆された。低酸素下ではこれら 3 因子のタンパク量はいずれも低下するが、強制的な発現によりこれら因子の低下を補完すると低酸素性 MLH1 発現抑制が緩和された。従って、これら 3 因子が介在する MLH1 の低酸素性低下の新たな経路が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, CXXC5, DNA-binding protein recognizing the FP3CAT site of MLH1 promoter, was identified as an activator of MLH1 transcription. Co-immunoprecipitation and LC/MS/MS analysis revealed that CXXC5 and SYF2, previously screened as an FP3 site-binding protein, share common interacting protein HNRNPH1 and may co-operatively trans-activate MLH1. In hypoxia, all three protein levels were down-regulated and endogenous over-expression of them partially rescued MLH1 down-regulation. Hypoxic down-regulation of MLH1 may be mediated by CXXC5, SYF2, and HNRNPH1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景

ゲノム安定性は種々の DNA 修復機構の連携により維持されている。修復遺伝子の異常はゲノム不安定性を引き起こすことから、癌や加齢性疾患、早老症など様々な疾病の原因となる。大腸癌では散発性症例や腫瘍塊の

低酸素部位で DNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子 MLH1 の発現抑制がしばしば認められる。前者はプロモーター領域の高メチル化が主因とされるが、我々が経験した発現抑制例では遺伝子変異はもちろんのこと高メチル化も認められず、これら症例での抑制の原因は依然不明であった。

後者については、我々や他の多くのグループが、低酸素状態 (hypoxia) にある腫瘍部において MMR を含めた修復に関わる遺伝子の発現が低下することを報告していた。しかしながら、本研究課題申請時にはその抑制機構も十分に解明されておらず、MLH1 を含め種々の DNA 修復遺伝子の転写制御機構に再び注目が集まっていた。

我々はそれまで、MLH1 の定常状態での転写制御機構の解明を目的として、重要な転写調節領域の特定化ならびに調節領域に結合する転写制御因子の同定を行っていた。その過程で、申請の前年に CXXC5 を見いだした。当初、本因子はメチル化 DNA 結合タンパクによく保存された CXXC タイプの Znフィンガードメインを有することが知られているのみで、その機能については不明だった。細胞内局在や MLH1 転写調節活性の検討から CXXC5 が MLH1 の転写制御因子であることが裏付けられ、本因子による転写制御の分子機序と転写制御複合体の機能障害が病態に及ぼす影響の解明を目的とする本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が見いだした MLH1 の新規転写因子 CXXC5 を中心に、生理条件での MLH1 転写制御機構を分子レベルで解明し、大腸癌をはじめとした病態での修復遺伝子発現抑制の仕組みを理解することを目的とした。また、得られた知見をもとに、制御因子異常を指標とした病理診断や病態予測への応用研究の基盤を築くことも目指した。そこで以下の研究項目を計画した。

- (1) CXXC5 を含む転写制御複合体の同定
- (2) 複合体各因子の MLH1 発現抑制に対する影響の検討
- (3) 複合体の病態への関与の検証
- (4) 転写制御複合体の新規ターゲットの網羅的検索

3. 研究の方法

本研究課題の目的は、MLH1 転写の生理条件での制御機構を足場として病態での修復遺伝子発現抑制の仕組みを理解し、さらには病理診断や病態予測への応用基盤を構築することである。その実現のために計画した4つの研究項目を以下の方法に従って遂行した。

- (1) CXXC5 を含む転写制御複合体の同定
免疫沈降法と LC/MS/MS 法を用いて、CXXC5 と相互作用する因子を網羅的に検索する。見いだされた相互作用因子の中から MLH1 転写制御に関わる因子を特定する。

- (2) 複合体各因子の MLH1 発現抑制に対する影響の検討

各因子について、MLH1 発現が抑制されたヒト大腸癌由来細胞株での遺伝子変異や発現量、細胞内動態などの異常を検索する。

- (3) 病態への関与の検証

分子生物学的手法や実験的がん微小環境の再現により各因子の異常を誘導し、MLH1 発現が抑制されるかを調べる。

- (4) 転写制御複合体の新規ターゲットの網羅的検索

本研究で見いだされた因子により制御される MLH1 以外の遺伝子を網羅的に検索することで、各因子の異常が引き起こす病態を考察する。

4. 研究成果

- (1) CXXC5 を含む転写制御複合体の同定

CXXC5 を含む転写制御複合体を同定するために、免疫沈降法、電気泳動、ならびに nanoLC/MS/MS 解析を用いて、CXXC5 と相互作用するタンパクの同定を行った。一方、CXXC5 が結合するプロモーター部位と非常に近接した配列への結合因子候補として既に見いだしていた SYF2 についても同様の解析手法を用いて相互作用因子を検索した。その結果、HNRNPH1 が共通の結合因子として見いだされ、SYF2 もまた HNRNPH1 を介して CXXC5 と相互作用し協同して働くことが示唆された。しかしながら、これら因子による複合体形成の様式についてはこれまでのところ明らかとなっていない。

- (2) 複合体各因子の MLH1 発現抑制に対する影響の検討

各因子の MLH1 転写制御に及ぼす影響をヒト大腸癌由来細胞株を用いて検討した。RNAi 法による各因子のノックダウンは、いずれも MLH1 の mRNA レベルでの低下を引き起こした。また、CXXC5 については、強制発現の量に依存して MLH1 mRNA 量の上昇を認めた。一方、他の 2 因子については過剰発現下でも MLH1 の量的変化は認められなかった。これらの結果から、いずれの因子も MLH1 を正に制御するが、SYF2 や HNRNPH1 の機能発現にはパートナーとなる CXXC5 が不可欠である可能性が考えられた。生理的条件下ではこれらの因子は協調して MLH1 を制御していることが示唆された。

- (3) 病態への関与の検証

実験的病態の一例として腫瘍塊で認められる低酸素状態に着目し、3 因子の動態と MLH1 の低酸素性発現抑制への影響を検討した。3

因子は低酸素下でいずれもタンパクレベルでの低下を示した。また、発現プラスミドの導入により低酸素下で 3 因子を強制発現させると MLH1 転写の低下は緩和されたことから、これら 3 因子は腫瘍塊低酸素という病態での MLH1 発現抑制にも関与していることが示された。

(4) 転写制御複合体の新規ターゲットの網羅的検索

本研究期間内には着手することができなかった。

本研究により、これまでほとんど知られていなかった MLH1 の生理条件下での発現調節に関わる因子が複数明らかとなった。各因子間の相互作用の様式など不明な点はあるものの、これら因子の異常と腫瘍塊で繰り返し生じている低酸素環境での MLH1 発現低下との直接的な関与も示唆された。従って、本研究成果はこれら因子の発現異常などを指標とした腫瘍悪性化予測や化学療法による治療効果予測への応用に発展させうるものであると考える。また、CXXC5 が結合する DNA 配列は CCAAT-box 様であり、同様の配列がゲノム上に広く存在すると考えられる。即ち、MLH1 以外にも標的遺伝子が複数存在することが予測され、それら新たな標的遺伝子の把握は癌を含めた他の病態の分子機序解明に繋がることも期待される。

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. Li J, Koike J, Kugoh H, Arita M, Ohhira T, Kikuchi Y, Funahashi K, Takamatsu K, Boland CR, Koi M, Hemmi H. (2012) Down-regulation of MutS homolog 3 by hypoxia in human colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1823, 889-99. [査 読 有] doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.017.
2. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Tai R, Hattori Y, Muto A, Suzuki Y, Ohashi Y, Sakai K, and Aikawa A. (2011) Effluent markers related to epithelial mesenchymal transition with adjusted values for effluent cancer antigen 125 in peritoneal dialysis patients. *Int J Nephrol*. 2011:261040. Epub. [査 読 有] doi: 10.4061/2011/261040.
3. Mizuiri S, Aoki T, Hemmi H, Arita M, Sakai K, and Aikawa A. (2011) Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in

patients with CKD. *Nephrology* (Carlton) 16(6), 567-72. [査 読 有] doi: 10.1111/j.1440-1797.2011.01467.x.

4. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Aoki T, Ohashi Y, Miyagi M, Sakai K, Shibuya K, Hase H, and Aikawa A. (2011) Increased ACE and decreased ACE2 expression in kidneys from patients with IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 117(1), c57-66. Epub. [査 読 有] doi: 10.1159/000319648.

[学会発表] (計 11 件)

1. 有田通恒, 児井稔, 久郷裕之, 近藤元就, 逸見仁. DNA ミスマッチ修復遺伝子 MSH3 による EMAS 腫瘍発生の分子機構. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012. 12.13.
2. Hemmi H, Arita M, Koike J, Kikuchi Y, Funahashi K, Ohira T, Kugoh H, Kondo M. Hypoxic down-regulation of DNA mismatch repair gene hMSH3 and genetic instability of colorectal cancer. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20.
3. 有田通恒, 李傑, 菅野新一郎, 菊池由宣, 安井明, 近藤元就, 逸見仁道. 低酸素による hMLH1 発現抑制時の転写因子 CXXC5, SYF2 および hnRPH1 の関与. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.14.
4. 李傑, 有田通恒, 柴田祐充子, 岩崎維和夫, 黒岩実, 近藤元就, 逸見仁道. N-myc 非増幅神経芽腫細胞における N-myc の役割. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27.
5. 有田通恒, 李傑, 安井明, 近藤元就, 逸見仁道. 低酸素による hMLH1 発現抑制における SYF2 および hnRPH1 の役割. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4.
6. 李傑, 有田通恒, 児井稔, 逸見仁道. 大腸がん由来細胞株における hMSH3 転写制御機構. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.9.
7. 有田通恒, 李傑, 菅野新一郎, 安井明, 逸見仁道. CXXC5 と SYF2/p29 による hMLH1 転写制御. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12.8.
8. Li J, Arita M, Koike J, Hemmi H. Regulation of MMR genes and stem cell markers in hypoxia in colorectal cancer cells. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪,

2010.9.22.

9. Arita M, Li J, Yasui A, Hemmi H. A novel transcriptional regulator, CXXC5 zinc finger protein, for a DNA mismatch repair gene, hMLH1. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.22.
10. 水入苑生, 逸見仁道, 有田通恒, 酒井謙, 大橋靖, 田中仁英, 服部吉成, 鈴木康紀, 渋谷和俊, 相川厚. 腎 ACE2 発現低下は糖尿病腎症に特異的か?. 第 53 回日本腎臓学会総会, 神戸, 2010.6.17.
11. 青木敏行, 水入苑生, 有田通恒, 逸見仁道, 大谷隆俊, 鈴木康紀, 服部吉成, 田中仁英, 大橋靖, 酒井謙, 相川厚. ヒト尿細管上皮細胞におけるブドウ糖, ヒト血清アルブミンによる ACE2 発現の変化. 第 53 回日本腎臓学会総会, 神戸, 2010.6.16.

6. 研究組織

(1)研究代表者

有田 通恒 (ARITA MICHITSUNE)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号:80307719

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

菅野 新一郎 (KANNO SHIN-ICHIRO)
東北大学・加齢医学研究所・講師
研究者番号:10400417