

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591548

研究課題名(和文) EVI1 癌遺伝子活性化によるゲノム不安定化の分子機構

研究課題名(英文) Genome instability caused by EVI1 oncogene activation

研究代表者

久米 晃啓 (Kume, Akihiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10264293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：近年注目されている発癌過程におけるエピジェネティックな変化の中でも、H3ヒストン第9位リジン(H3K9)のメチル化は動原体付着部近傍のヘテロクロマチン形成に必須であり、染色体分配の足場形成、ひいてはゲノム安定化に必須であるため興味深い。そこでH3K9を特異的にメチル化してモノメチルH3K9(H3K9me)・ジメチルH3K9(H3K9me2)を生成する酵素G9aと、H3K9me2にメチル基を付加してトリメチルH3K9(H3K9me3)を生成する酵素SU(V39)H1の作用意義について検討した。

研究成果の概要(英文)：H3K9 methylation is considered to be one of crucial factors in tumor progression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝子 ゲノム エピジェネティクス ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

EVI1 は、マウス腫瘍におけるレトロウイルスの染色体挿入部位及び、ヒト白血病においてもしばしば見られる染色体転座の切断点 (3q26 ; MDS1-EVI1 遺伝子領域) に存在する癌遺伝子であり、骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) の発症・進展に関わるが、その分子機構については不明な点が多い。さらに、EVI1 とともに MDS の独立予後不良因子である第 7 番染色体の欠失 (モノソミー-7) は EVI1 活性化と合併することも多く、両者の因果関係に興味を持たれてきた。

EVI1 は約 1000 個のアミノ酸からなる核蛋白で、2 つの Zn フィンガードメインを介して DNA に結合しうるが標的 DNA 配列は不明で、転写抑制・促進どちらにも作用し、細胞内シグナル伝達系を修飾するなど、その機能は非常に多彩である。研究開始当初、これら多彩な EVI1 の機能を説明しうる知見が発表されつつあった。すなわち、EVI1 は CtBP・BRG1・MBd3 等アダプター分子、CBP/p300 等ヒストン脱アセチル化酵素、SUV39H1・G9a 等ヒストンメチル化酵素など転写のコアクチベータやコリプレッサを構成する多数の蛋白と結合する。状況に応じて形成された転写のマシナリーは、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化・メチル化など、主にエピジェネティックな修飾を介して転写を調節する。染色体転座やレトロウイルス挿入により EVI1 遺伝子が異常に活性化されると、このような機構によって造血系、特に骨髄球系前駆細胞では増殖を促進するような遺伝子発現パターンに傾き、次第に EVI1 高発現クローンが優勢になってくる (MDS の状態)。しかしこれだけでは AML は発症せず、発癌に至るにはモノソミー-7 など付加的な変異が必要である。そのような染色体異常の発生には、ゲノムの不安定性が関与すると考えられる。

ここで申請者は、EVI1 のパートナー役の中にゲノムの安定性、中でも細胞分裂時の染色体分配に関わる分子がないかを検索し、ヒストンメチル化酵素に注目した。G9a と SUV39H1 はヒストン H3 の第 9 番目のリジン (H3K9) を特異的にメチル化する酵素で、それぞれ H3K9 のジメチル化 (2me)、トリメチル化 (3me) を担う。SUV39H1 とそのホモログ SUV39H2 の遺伝子のダブルノックアウトや、G9a ノックダウンによりゲノムが不安定化するが、そのメカニズムの一つとして考えられるのが、セントロメア領域 (染色体分配時に紡錘糸が付着する) のヘテロクロマチン形成不全で、その過程にヒストンメチル化の乱れが関与しうる。SUV39H1 や G9a が EVI1 蛋白と結合することは既に知られているが、その意義はもっぱら転写調節のコンテキストにおいて注目されており、染色体分配などゲノムの安定性維持における役割は検討されていなかった。

2. 研究の目的

ヒストンメチル化酵素 G9a と SUV39H1 が細

胞内でどのような作用をもつか実際に検証する。その上で、EVI1 の過剰発現がヒストンのメチル化、さらにはゲノムの安定性にどのような影響を及ぼすかを検討する。

3. 研究の方法

ヒストンメチル化酵素 G9a と SUV39H1 の発現プラスミドを構築し、それぞれ単独あるいは組み合わせて HEK293 細胞にトランスフェクトする。その前後で、ヒストンメチル化の状態と、ヘテロクロマチン形成に関わる他の因子の発現を解析する。次いで、癌遺伝子 EVI1 の発現プラスミドベクターを構築し、HEK293 細胞にトランスフェクション実験にて上記のヒストンメチル化酵素の作用に対する影響を解析する。

4. 研究成果

ヒストンメチル化酵素 G9a と SUV39H1、癌遺伝子 EVI1 のコード領域に Myc または FLAG エピトープを付加した融合タンパク質を発現するプラスミドベクターを構築した (pG9a-Myc-FLAG、pMyc-SUV39H1、pFLAG-EVI1)。これらのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクトすると、イムノプロットでは、それぞれの融合タンパク質が予想された分子量に相当するバンドとして検出された (図 1A、C、E)。免疫蛍光顕微鏡観察では、それぞれ核に局在する導入遺伝子産物が検出された (図 1B、D、F)。

次に、HEK293 細胞にヒストンメチル化酵素である G9a や SUV39H1 を強制発現させ、その影響を調べた。イムノプロットにて、G9a を強制発現させたときには H3K9me2 は変化なし、SUV39H1 を強制発現させたときには H3K9me3 のシグナルが増強していた (図 2A)。これを定量化してトータル H3 のシグナルで補正すると、H3K9me3 は SUV39H1 の単独発現時に 1.5-2 倍、G9a と SUV39H1 の共発現時には 1.8-2.6 倍と増加していた (図 2B)。

このことから、SUV39H1 の強制発現によって H3K9 がトリメチル化され、ヘテロクロマチン蛋白 HP-1 α のドッキングサイトが形成されたと考え、HP-1 α の動態を詳細に調べた。親株の HEK293 細胞から蛋白を抽出する際、膜分画、細胞質分画、核可溶分画、クロマチン分画、細胞骨格分画の 5 つに分けてイムノプロットを行うと、HP-1 α は主にクロマチン分画にあり、少量が細胞質および核可溶分画に存在していた。ここに SUV39H1 を強制発現させると、細胞質~核可溶分画にあった HP-1 α が消失し、ほぼクロマチン分画にしか認められなくなった。細胞全体を電気泳動のサンプルバッファーで可溶化してイムノプロットをすると、HP-1 α の総量は変化していないので、この現象は主に HP-1 α の局在の変化を反映していると考えた。

細胞質や核可溶分画における HP-1 α の減少が転写レベルの変化を伴う可能性も考え、G9a および SUV39H1 の強制発現前後の HEK293

細胞における HP-1 α の mRNA を RT-PCR 法で比較した。ヒストンメチル化酵素の強制発現後 HP-1 α のメッセージレベルは対照とほぼ同等で、HP-1 α 蛋白の総量が変わらなかったことに矛盾しない。定量的 RT-PCR の結果でも、HP-1 α の相対的メッセージレベルは有意な差を認めなかった。

さらに、SUV39H1 の高発現が HP-1 α の分解を促進している可能性も考え、プロテアソーム阻害剤としてボルテゾミブ (1, 3, 10 nM) および MG-132 (0.1, 0.3, 1 μ M) をトランスフェクション直後から添加してみた。高濃度の MG-132 添加で核可溶画分とクロマチン画分で HP-1 α の減少がみられたが、これは細胞毒性によるものと考えられる。これ以外の濃度では、プロテアソーム阻害剤添加による明らかな変化は見られなかった。すなわち、プロテアソームを介した蛋白分解系は、ヒストンメチル化酵素強制発現時の HP-1 α の動態の変化には関与していないと考えられる。

最後に、EVI1 の強制発現が H3K9 のメチル化や HP-1 α の局在に影響を与えるかを検討した。先に示したように、SUV39H1 発現により細胞質～核可溶画分にあった HP-1 α が消失し、ほぼクロマチン画分にしか認められなくなった。ここに EVI1 を強制発現させた場合も、HP-1 α 蛋白の細胞内分布の変化は認められなかった。

また、ヒストンメチル化酵素と EVI1 の共発現下で H3K9 のメチル化の状態を確認したが、EVI1 の有無による H3K9me2・H3K9me3 の差異は認められなかった。従って、EVI1 の高発現は、少なくともクロマチン画分総体における H3K9 メチル化には明らかな影響を及ぼしていないと結論づけられる。

以上、HEK293 細胞における SUV39H1 遺伝子の強制発現により、トリメチル化 H3K9 (H3K9me3) のレベルが上昇することを明らかにすることができた。本酵素の活性は、これまで精製ヒストンや合成ペプチドを基質として用いる *in vitro* の実験では示されていたが、生細胞内の現象として生化学的に確かめられたのは初めてのことである。これに伴い、H3K9me3 に結合するクロマチン蛋白 HP-1 α が細胞質や核可溶画分から消失し、クロマチン画分に移動したことが示唆された。このような HP-1 α の動きについても、これまで詳細に示されたことはなく、新たな知見と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Kikuchi Y, Kume A, Urabe M, Mizukami H, Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, Ozawa K. Reciprocal upregulation of Notch signaling molecules in hematopoietic progenitor and mesenchymal stromal cells. *J Stem Cells Regen Med* 7:61-68, 2011.
2. Yagi H, Sanechika S, Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Mizukami H, Urabe M, Ozawa

- K, Kume A. Recovery of neurogenic amines in phenylketonuria mice after liver-targeted gene therapy. *NeuroReport* 23:30-34, 2012.
3. Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, Ozawa K. Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. *Gene Ther* 19:476-482, 2012.
4. Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K. NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. *Cancer Res* 73:364-372, 2013.
5. Takahashi K, Mizukami H, Saga Y, Takei Y, Urabe M, Kume A, Machida S, Fujiwara H, Suzuki M, Ozawa K. Suppression of lymph node and lung metastases of endometrial cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGF receptor-3. *Cancer Sci* 104:1107-1111, 2013.
6. Tsukahara T, Ohmine K, Yamamoto C, Uchibori R, Ido H, Teruya T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J, Takesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K. CD19 target-engineered T-cells accumulate at tumor lesions in human B-cell lymphoma xenograft mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 438:84-89, 2013.
7. Miyata S, Urabe M, Gomi A, Nagai M, Yamaguchi T, Tsukahara T, Mizukami A, Kume A, Ozawa K, Watanabe E. An R132H mutation in isocitrate dehydrogenase 1 enhances p21 expression and inhibits phosphorylation of retinoblastoma protein in glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 53:645-654, 2013.
8. Uehara T, Kanazawa T, Mizukami H, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Misawa K, Carey T, Suzuki M, Ichimura K, Ozawa K. Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 105:72-80, 2014.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Kume A. Gene therapy for phenylketonuria. Japan Society of Gene Therapy 17th Annual Meeting (Invited), July 17, 2011, Fukuoka.
2. Kume A, Yagi H, Mizukami H, Urabe M, Tsukahara T, Uchibori R, Ozawa K. Muscle-directed gene therapy for phenylketonuria with self-complementary AAV vectors. XIXth Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, October 28, 2011, Brighton, UK.
3. Tsukahara T, Ohmine K, Uchibori R, Ido H, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K. Evaluation of anti-tumor effects mediated by engineered T lymphocytes expressing a CD19

specific CAR for B cell lymphoma. American Society of Gene and Cell Therapy, May 19, 2012, Philadelphia, PA, USA.

4. Mizukami H, Mimuro J, Hishikawa S, Ikemoto T, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Sakata Y, Ozawa K. Precise evaluation of Nab status against adeno-associated viral vectors and an approach toward managing its inhibitory effect. American Society of Gene and Cell Therapy 16th Annual Meeting, May 16, 2013, Salt Lake City, UT, USA.

5. Tsukahara T, Ohmine K, Uchibori R, Ido H, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Mineno J, Takesako K, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K. Tumor targeting using CD19-specific CAR (chimeric antigen receptor) for B-cell lymphoma. American Society of Gene and Cell Therapy 16th Annual Meeting, May 18, 2013, Salt Lake City, UT, USA.

6. Mizukami H, Mimuro J, Hishikawa S, Ikemoto T, Uchibori R, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Sakata Y, Ozawa K. Accurate measurement of Nab status against AAV vector capsids and an approach toward managing its inhibitory effect. European Society of Gene and Cell Therapy and French Society for Cell and Gene Therapy Collaborative Congress 2013, October 25, 2013, Madrid, Spain.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久米 晃啓 (Kume Akihiro)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10264293

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小野寺 雅史 (Onodera Masafumi)
(独)国立成育医療研究センター・部長
研究者番号：10334062

図 1. pG9a-Myc-FLAG、pMyc-SUV39H1、pFLAG-EV11 の遺伝子導入産物

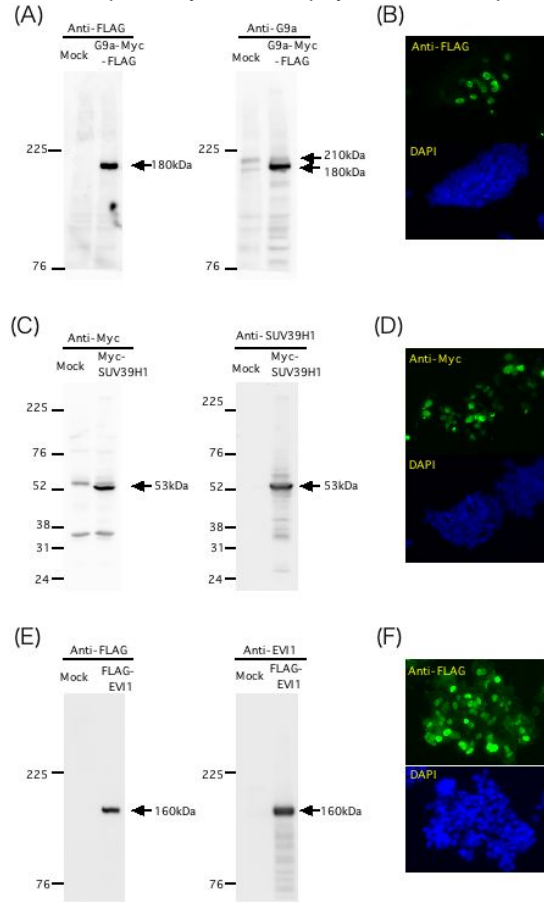


図 2. G9a・SUV39H1 によるヒストンメチル化

