

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670152

研究課題名(和文)代謝とポリコム群によるがん制御

研究課題名(英文)Roles of Polycomb-group in links between metabolism and cancer

研究代表者

磯野 協一 (Isono, Kyoichi)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：90323435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は自己増殖に必要なエネルギーを確保するために解糖系を活性化させている。一方、ポリコム群タンパク質による遺伝子抑制機能はがん化の原因要因の1つと考えられている。我々は、過去の研究結果から「がん細胞ではエネルギー代謝とポリコム群機能は相互依存している」という仮説を立てた。本研究では本仮説の確度を得ることを目的とした。研究成果として、3種の代謝系キナーゼがポリコム群機能に関わっていることが示唆された。これは我々の仮説を支持するものであった。今後、本研究を前進させることで生物学的のみならず医学的貢献を図りたいと思う。

研究成果の概要(英文)：Massive proliferation of cancer cells needs energy produced mainly by activating glycolysis. On the other hand, it is thought that elevated activities of Polycomb-group (PcG) proteins are one of causes for tumorigenesis. Understanding them will be helpful for cancer therapies. We have already identified mine metabolic kinases, which might affect PcG functions. This evidence has made us speculate interdependence between energy metabolism and PcG functions in cancer cells. In this study, we addressed this hypothesis by using gene knockdown experiments and co-immunoprecipitation assay, revealing that three of them could have something to do with PcG proteins or their functions. These results are supporting our hypothesis. We therefore believe that this project is worth being investigated continuously, contributing to applied medical science.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：エネルギー代謝 ポリコム群 遺伝子制御 がん

1. 研究開始当初の背景

がん細胞が増殖するためのエネルギー源は主として解糖系から供給されている。事実、がん細胞の解糖系はそのオリジナル正常細胞と比べて200倍以上も活性化していると言われている。なぜエネルギー生産率の低い解糖系を選ぶかは不明であった。一方、ポリコム群と呼ばれるクロマチン作用タンパク質は遺伝子発現制御に働く因子として広く知られている。さらにその機能の過剰な活性化は、がんの原因要因の1つと考えられている。なぜポリコム群機能ががん細胞で亢進しているのか、そのメカニズムも理解されていない。

我々は、ポリコム群機能に影響するキナーゼ siRNA ライブラリーの探索研究から、エネルギー代謝に関与する9種のリン酸化酵素を選別していた。そこで作業仮説として、エネルギー代謝系リン酸化酵素がポリコム群機能を活性化し、がん細胞の増殖を安定化させていると考えた。逆にポリコム群機能を亢進させるために解糖系を活性化させる必要がある。つまり解糖系活性化とポリコム群機能活性化は相互依存していると考えた。

2. 研究の目的

がん細胞の解糖系利用とポリコム群機能活性化のメカニズムを理解することは、がん治療に大きく貢献するはずである。一見、両者は相容れないメカニズムに属しているように思えるが、我々の siRNA スクリーニング結果は両者間のリンクを示唆している。本研究の目的はこのリンクが本当に介在しているのかを確かめることであった。

3. 研究の方法

(1) 解糖系とポリコム群機能との直接的リンクの証拠を得るために、エネルギー代謝あるいは候補キナーゼ特異的な阻害剤がポリコム群機能に影響するかを調査した。

(2) 代謝系キナーゼがポリコム群を直接的にリン酸化しているという仮説を支持するために、免疫共沈降実験によって候補9種キナーゼとポリコム群との物理的相互作用を調べた。

(3) siRNA ライブラリースクリーニングで得られた結果には、その実験の性格上、必ずオフターゲット効果(偽陽性)がある。それを否定するために、1キナーゼ遺伝子に対して4種の siRNA を個別に検証するという再現性実験をおこなった。

4. 研究成果

(1) マウス胚繊維芽細胞(MEF)に解糖系あるいはキナーゼ特異的な阻害剤(2-DG、Bromopyruvate など4種)を添加し、ポリコ

ム群によって抑制されている Cdkn2a 遺伝子の発現変化を調べた。Cdkn2a 遺伝子は主要がん抑制遺伝子であり、ポリコム群活性化によるがん化を直接的に結びつける要因である。薬剤の添加時間を変え、それぞれについて数回のテストを行ったが、結果のばらつきが非常に大きく、阻害剤の使用によっては解糖系とポリコム群機能の相関の有無を判断することができなかった。

この不明瞭さは阻害剤の作用範囲の大きさによるものかもしれない。あるいは、MEFの特性である不安定性や複合性が結果をばらつかせているのかもしれない。本実験にはもっと単一で安定した細胞集団(ES細胞や神経幹細胞)が望ましいと考えられる。

(2) 候補9遺伝子に対してcDNAクローニングし、発現ベクターを構築した。各キナーゼ発現ベクターとポリコム群遺伝子発現ベクターを293T細胞へと同時導入し、強制発現させた。これら遺伝子導入細胞を使って免疫共沈降実験をおこなった。その結果として、3つの遺伝子産物が弱いながらもポリコム群と結合することがわかった。一般的にキナーゼと基質タンパク質との相互作用は一時的であることから、この弱い結合能はむしろリーズナブルであると考えている。

このような相互作用は条件的に促進されたり、解除されたりする可能性があると考えている。つまり、解糖系の活性度に依存するかもしれない。これを示すことができれば、我々の仮説を強力に支持するものとなる。したがって、今後の対応として、解糖系の阻害剤あるいは促進剤の存在下でキナーゼ-ポリコム群の相互作用を調査してみたいと思う。

(3) スクリーニングで使用した siRNA ライブラリーでは各1遺伝子について4種の siRNA が混在している。siRNA ノックダウン実験では目的遺伝子とは異なる遺伝子をノックダウンしてしまうというオフターゲット効果がつきまとう。したがって、オフターゲット効果を否定するために個々の siRNA を使ってポリコム群機能への影響を調査した。同定していた9種キナーゼのうちいくつかについて検証した。MEFに siRNA を導入48時間後にRNAを精製し、定量的RT-PCRによってポリコム群標的遺伝子 Cdkn2a および Pitx2 の発現を調べた。図1では、4種キナーゼ(#1-4)についての結果を表している。キナーゼ#1と#3のノックダウンでは Cdkn2a 遺伝子の脱抑制が少なくとも2つの siRNA で観察されたことから、再現性を確認できたと考えている。興味深いことに、このキナーゼ#1および#3は、(2)でポリコム群と免疫共沈殿したキナーゼと同一であった。

もう1つのポリコーム群結合性キナーゼについては、まだsiRNAノックダウンによる検証をおこなっていない。

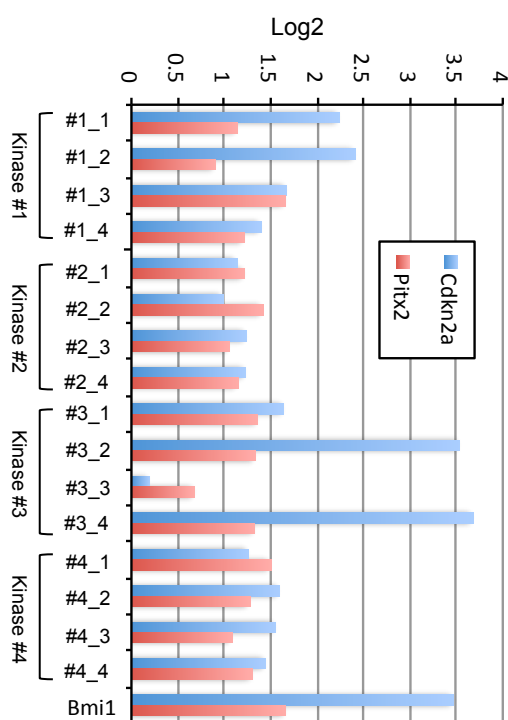


図1 キナーゼ遺伝子ノックダウン後の発現解析
各キナーゼに対して4種のsiRNAで検証。縦軸の発現レベルはネガティブコントロールに対しての値であり、2回の独立した実験の平均値である。横軸はsiRNAの種類。Bmi1はポリコーム群遺伝子の1つで、そのノックダウンはCdkn2aおよびPitx2遺伝子脱抑制を誘導した（ポジティブコントロール）。

本研究は、「がん細胞ではエネルギー代謝機能とポリコーム群機能が相互依存している」という仮説の確度を得ることを目的とした。そのため研究期間は1年間とした。実際の成果として、ポリコーム群機能に影響する可能性のある9種の代謝系キナーゼから3種までの絞り込みに成功した。これら3種のキナーゼは、ポリコーム群機能に直接的に作用している可能性がある。しかしながら、現時点での成果は、我々の仮説を支持してはいるが、確信を得るには十分ではない。まだまだ仮説の域を超えておらず、その検証にはさらに研究が必要である。生物学的および医学的に本仮説は魅力的であると考えており、引き続き実施できる環境を整えていきたいと考えている。

キナーゼcDNAのクローニング、MEFを使った阻害剤実験で予想外に時間を費やしたことで、研究期間内では本仮説の信頼できる確度を得ることができなかった。余裕を持たせない期間設定は反省すべき点である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

① Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Otsu M, Isono K, Hoseki H., Nakauchi H, Ogawa S. (2014) Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*, doi: 10.1038/leu.2014.73.、査読有

② Kondo T, Isono K, Kondo K, Endo TA, Itohara S, Vidal M, Koseki H. (2014) RING1 activates Meis2 by mediating interaction of its promoter with a tissue-specific enhancer. *Dev Cell* 28, 94-101.、査読有

③ Isono K, Endo AT, Ku M, Yamada D, Suzuki R, Sharif J, Ishikura T, Toyoda T, Bernstein BE, Koseki H. (2013) SAM domain polymerization links subnuclear clustering of PRC1 to gene silencing. *Dev Cell* 26, 565-577.、査読有

④ Choi DW, Na W, Kabir MH, Yi E, Kwon S, Yeom J, Ahn JW, Choi HH, Lee Y, Seo KW, Shin MK, Park SH, Yoo HY, Isono K, Koseki H, Kim ST, Lee C, Kwon YK, Choi CY. (2013) WIP1, a Homeostatic Regulator of the DNA Damage Response, Is Targeted by HIPK2 for Phosphorylation and Degradation. *Mol Cell*. 51, 374-385.、査読有

⑤ 磯野協一 (2013) ポリコーム群による遺伝子抑制とエピジェネティック治療への貢献. *遺伝子医学 MOOK エピジェネティクスと病気*, 25, 37-42.、査読無

〔学会発表〕(計2件)

① 磯野協一、ポリコーム群 Phc2 リン酸化による遺伝子サイレンシング、日本分子生物学会、2013年12月5日、神戸ポートピアホテル

② 磯野協一、遺伝子サイレンシングにおけるポリコーム群 Phc2 リン酸化の役割、エピジェネティクス研究会、2013年5月30日、奈良県新公会堂

〔その他〕

プレスリリース

「細胞の運命を左右する新しい分子メカニズムの一端を解明」(2013年10月)

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20131001_1/digest/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野協一 (Isono, Kyoichi)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学

研究センター・上級研究員

研究者番号：90323435