

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：72602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890022

研究課題名(和文)新規がん促進分子Merm1の機能解明と阻害剤探索

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel metastasis-promoting factor Merm1

研究代表者

竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・研究員

研究者番号：20706494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん転移促進因子Merm1による転移制御機構を明らかにし、転移抑制の標的となり得る作用点を示すことを目的とした。Merm1のMTaseドメインは、転移促進に関与することが示唆されているが、その基質は不明である。本解析から、このドメインが浸潤促進に寄与することが示された。また相互作用因子として、Merm1の機能的複合体因子とMerm1制御に関与するユビキチン化因子を同定した。さらに、Merm1がその酵母ホモログ同様、核小体で機能することと、その核小体機能にもMTaseが関与することが示唆された。相互作用因子、及び核小体制御がMerm1による転移制御と関係するかは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Merm1 is a metastasis-promoting factor isolated from in vivo screening. We performed the analysis of Merm1 to elucidate the mechanism of Merm1-regulated metastasis and to propose the new target for metastasis therapy. We found Merm1 MTase domain related to invasion ability of Merm1-expressing high metastatic cells. We searched Merm1-interactants and identified the conserved component of Merm1-holo complex and the ubiquitinylation enzymes which possibly regulate Merm1. And we observed that the some population of nuclear Merm1 localized in a nucleolus and Merm1 level and its MTase domain affected nucleolus morphology. Further analysis of the relationship between the interactants, the function in nucleolus and metastasis regulation by Merm1 is required.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん転移

1. 研究開始当初の背景

がん患者の死亡原因の9割ががん転移であることから、転移ががんの予後を決定するといえる。したがって、がん転移の効果的な抑制法の開発はがん治療における最重要課題である。転移抑制の分子標的を提案するには、転移に関わる分子機構の理解が不可欠である。

Merm1(metastasis-related methyltransferase 1)/ Wbscr22 は、高転移性メラノーマ細胞株 B16-BL6 から作製した cDNA ライブラリーを用い、マウス血行性転移モデルによるスクリーニングで肺転移を促進する因子として同定された¹。興味深いことに、Merm1 は SAM(S-adenosylmethionine) 依存的 MTase (methyltransferase) ドメインを有し、転移制御に関与することが示唆されていることから、このドメインが転移抑制の標的となる可能性があるが、その基質や Merm1 が転移を制御する機構については未解明な点が多く残っている。Merm1 の発現は、乳がん、皮膚がん、ミエローマなどで高く、乳管癌で進行ステージと Merm1 の発現に相関が観察されている。Merm1 の転移への作用機序として示唆されていることとしては、p53 コファクターである ZAC1 の発現を抑制することで Zacl/p53 依存的アポトーシスを抑え、転移を促進することである。ZAC1 は卵巣がん、乳がん、扁平上皮がん等の細胞株で発現が抑制されていることや、発現抑制が転移促進に関与することが報告されている²。また、ZAC1 プロモーター上の CpG メチル化亢進とがんとの相関は示されており²、Merm1 の MTase ドメインの関与についての検討が必要と考えられた。加えて、Merm1 は Williams-Beuren 症候群で欠損している7番染色体の領域に含まれる WBSR22 と同一遺伝子産物であるが、その生理的役割及び、がん転移における機能は本研究開始時まで報告がなく、Merm1 の生理的機能も不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、がん転移促進因子として同定された Merm1 によるがん転移制御機構を明らかにすることで、新たな転移抑制法を提案することを目的とした。まず、特に転移促進に関与することが示唆されている Merm1 の MTase ドメインに着目し、メチル化によるエピジェネティックな制御を介した経路が Merm1 によるがん転移の促進に関与している可能性を検討することにした。また、Merm1 による転移制御機構の解明に加え、Merm1 自体の機能的制御、及び Merm1 の生理的機能についての理解を深めることも、治療標的として妥当か評価する上で重要と考え、Merm1 の機能解析を目的とした相互作用因子の同定とその解析を行うことにした。以上の解析で明

らかになった因子や機能については、がん転移との関係を in vivo 転移モデルで検証し、がん治療薬の標的としてより効果的な機構を示すことで、創薬への足掛かりとすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) Merm1 によるエピジェネティクス制御を介した下流遺伝子の発現制御の検討

下流遺伝子 ZAC1 のプロモーター上のヒストン H3 の Lys9 メチル化が Merm1 と関係している可能性が示唆されている¹。そこで、選択的エピジェネティクス阻害剤を用いた検討により、どのタイプの酵素によるヒストン及び DNA メチル化が ZAC1 発現に影響するかを検討し、変化が観察されたものについて、Merm1 ノックダウン及び発現の影響を解析した。また、ヒストンをメチル化の基質とするかを in vitro メチル化アッセイによって調べた。

(2) Merm1 の相互作用因子の同定と解析

Merm1 を高発現する高転移性のメラノーマ細胞に Merm1 をタグ付きで安定的に発現させ、タグで精製し、結合タンパク質を Mass 解析により同定した。さらに、同定した相互作用因子のノックダウンや、Merm1 に変異を導入することで相互作用領域を特定し、相互作用因子と結合できない Merm1 を発現させることによる転移への影響を解析することを試みた。以上により、Merm1 による転移制御機構、Merm1 自体の制御機構などに関わる因子を明らかにすることにした。

(3) Merm1 の生理的機能の解析

本研究期間中に、Merm1 が出芽酵母 Bud23 の機能的ホモログで、Bud23 欠損変異を部分的であるものの相補できることと、リボソーム合成に関与することが報告された³。すなわち、Merm1 が種間で保存された重要な機能としてリボソーム制御に役割を持つと考えられた。また、Bud23 については rRNA にメチル化を導入することもすでに示唆されていた⁴。Merm1 について rRNA を基質としているか、また、その転移への寄与を明らかにする必要がある。まず、Merm1 のリボソーム合成の場、核小体への局在とノックダウンによる効果を調べることにした。また、そのとき観察された効果に対して MTase ドメインが関与するかも MTase の変異体及び野生型を発現した細胞を比較することで検討した。さらに、上記で同定された相互作用因子によって Merm1 の機能に影響があるかも解析した。

4. 研究成果

(1) Merm1 によるエピジェネティクス制御を

介した下流遺伝子の発現制御の検討

Merm1 を高レベルに発現するメラノーマ細胞 A375M を DNA メチル化酵素阻害剤として RG108、ヒストンメチル化酵素阻害剤として SAM 競合的阻害剤 BIX-01338 および G9a 特異的阻害剤 BIX-01294 で処理し、Merm1 によって制御されると報告のある ZAC1 の発現レベルを qRT-PCR で解析した。その結果、RG108, BIX-01338 処理によりそれぞれ ZAC1 の発現が増加してくることが確認され ZAC1 が DNA およびヒストンのメチル化によりエピジェネティックな制御を受けることが示唆された。一方、G9a 特異的阻害剤 BIX-01294 処理によっては変化が見られなかったことから、G9a によるヒストンメチル化は関与していないと考えられる。次に、ZAC1 遺伝子領域について Merm1 の結合をクロマチン免疫沈降法により調べたところ、Merm1 は ZAC1 の遺伝子全域に渡ってある程度局在していることが示唆された。比較的結合のレベルが高かった箇所についてヒストン H3 Lys9 のメチル化レベルを調べた。しかし、Merm1 ノックダウンによって ZAC1 の発現が上昇する条件でもヒストンメチル化に影響は観察されなかった。そこで、DNA メチル化についても検討を行った。ZAC1 遺伝子領域に存在する 2 ヶ所の CpG island についてメチル化感受性の制限酵素処理と PCR によるメチル化レベルの解析を行ったが、Merm1 ノックダウンによってメチル化レベルへの影響を検出することはできなかった。さらに、示唆されているようにヒストンが Merm1 のメチル化の基質になるかを *in vitro* で検証するために、A375M 細胞に Merm1 をタグ付きで発現させ、タグで pull-down 精製し、ヒストンメチル化アッセイに用いた。しかし、H3 を含めてどのヒストンに対しても Merm1 によるメチル化導入を検出することはできなかった。以上の検討から、Merm1 による直接的なメチル化を介した遺伝子発現制御を示唆する結果は得られなかった。

(2) Merm1 の相互作用因子の同定と解析

Merm1 の相互作用因子の解析から、Merm1 と stoichiometric な複合体を形成する TRMT112、ユビキチン化システム因子、多数のリボソーム構成因子を同定した。TRMT112 は、Merm1 の酵母ホモログ Bud23 が結合し、Bud23 による rRNA メチル化のアダプターとして働くことが報告されている Trm112 のヒトホモログであり、この結合が種間で保存されていることが明らかとなった。この Merm1-TRMT112 間の相

互作用は高転移性株、低転移性株及び Merm1 高発現、低発現に依存せず確認された(図 1 左)。TRMT112 のノックダウンにより Merm1 のタンパク質レベルの減少、Merm1 のノックダウンにより TRMT112 のタンパク質レベルの減少が観察されたことから、相互作用によって互いに安定的複合体として存在することが示唆された(図 1 右)。

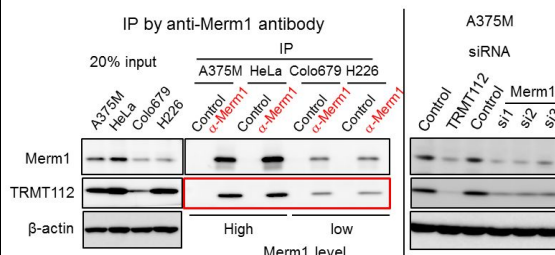


図1. Merm1とTRMT112は安定的複合体を形成する

酵母 Bud23-Trm112 の相互作用部位の報告から、Merm1 の TRMT112 相互作用予測配列にいくつかの変異を導入し、実際に TRMT112 との相互作用に必要な部位を特定した。その TRMT112 非結合 Merm1 変異体を発現し、野生型 Merm1 発現による転移促進作用と比較することを計画したが、前述のノックダウンの結果と合致し、TRMT112 非結合型 Merm1 変異体は不安定で安定的に高レベルに発現させることができず Merm1 による転移促進への影響の解析に用いることができなかった。以上の結果から、TRMT112 は Merm1 と安定的複合体を形成して機能していることが明らかとなった。したがって、Merm1 による転移制御にも関与すると考えられる。現在、Merm1 高発現 A375M 細胞株で TRMT112 をノックダウンし、血行性転移への影響を検討中である。

一方、特異的なユビキチン化酵素 E2, E3 とユビキチンタンパク質も Merm1 相互作用因子として同定された。そこで、ユビキチン化によるタンパク質分解制御について検討を行ったところ、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により Merm1 のタンパク質レベルが増加することが確認された。さらに、Merm1 抗体を用いて免疫沈降しユビキチン化を認識する抗体で検出した場合、及びユビキチン化抗体で免疫沈降し Merm1 の抗体で検出した場合のどちらでも、Merm1 より高分子領域にポリユビキチン化と思われるバンドが確認され、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理でそのバンドが増強したことから、Merm1 がユビキチン化によりプロテアソーム分解制御を受けていることが示唆された。そこで、この分解制御に同定されたユビキチン化酵素が関与するのか、もしくは機能的な制御に関係するのかを調べる

ためにE3のsiRNAによるノックダウン実験を行った。E3ノックダウンによりウエスタンブロッティングにより総タンパク質量あたりの顕著なMerm1タンパク質の増加は観察されず、ポリユビキチン化と考えられたバンドシフトもほとんど変化しなかった。しかしながら、Merm1を免疫染色してみると細胞あたりのシグナルは増加し、細胞質では4-5割、核では7-8割程度のシグナル増加が観察された。さらに、機能的制御に関与する可能性を検討するためにこのE3をノックダウンしたA375M細胞を用いてマウスの血行性肺転移モデルで肺生着への影響を調べたところ、E3ノックダウンにより約半分程度に生着が抑えられた。これらの結果から、このE3はMerm1のポリユビキチン化を介したプロテアソーム分解制御には関与していない可能性が高いものの、Merm1の機能的制御に関与している可能性がある。

(3) Merm1の生理的機能の解析

Merm1の相互作用因子に多くのリボソーム因子が含まれ、かつ本研究期間中にMerm1のリボソーム生合成への関与を示唆する報告があったことを受け、Merm1高発現細胞A375MにおいてMerm1のリボソーム生合成への寄与を検討した。まず、Merm1の細胞内局在を生化学的分画により解析したところ、以前の報告通り、主には核内に存在し、単離した核小体に一部局在していることが示された。このことは、異なる細胞株を用いて解析していた他のグループによる核小体タンパク質のプロテオミクス解析⁵、リボソーム制御に関する因子の網羅的同定⁶でMerm1がリストアップされていたことと合う結果であった。そこで、A375M細胞株でMerm1ノックダウンをして解析したところ、興味深いことに核小体の形態に変化が観察された。特に、細胞あたりの核小体数が1-2個に減少するものが増加した(図2上)。また、核小体は数の減少とともにそのサイズが増大する傾向が見られた。その

ときの核小体画分について核小体因子を調べると、rRNA転写制御因子UBF、核小体クロマチン修飾/rRNAプロセッシング因子FBL、rRNAプロセッシング因子B23/NPMがそれぞれ減少していた。さらにrDNAから転写されるrRNA前駆体(pre-rRNA)のレベルをqRT-PCRで調べたところ、一過的に増加ののち低下する傾向が見られた。これは、核小体からのrRNAプロセッシング因子の脱落によってrRNAのプロセッシングが進まず、一旦pre-rRNAの蓄積が起こり、その後pre-rRNAの転写およびリボソーム生合成が抑制されたことによると考えられる。(2)で同定されたMerm1相互作用因子TRMT112のノックダウンでもMerm1ノックダウンと同様、核小体の減少が観察され、この機能に関してもMerm1-TRMT112複合体として機能している可能性がある。さらに、低転移性のCHO細胞にMerm1を過剰発現させ転移能が増加した細胞(CHO/Merm1-WT)とMTaseドメインの変異体を発現させ、低転移性の細胞(CHO/Merm1-MD)の核小体を観察したところ、CHO/Merm1-WTでCHO/mock細胞に比べて核小体数の増加が観察され、CHO/Merm1-MDでは変化がなかったことから(図2下)、このMerm1の核小体での機能はMTase活性に依存していることが示唆された。また、CHO/Merm1-WTはCHO/Merm1-MDに比べin vivo血行性転移活性が高いことが報告されているが、in vitroで浸潤活性が高いことも明らかとなった。Merm1によるリボソーム制御と転移活性がどのように関係するかは今後の課題である。

核小体はリボソーム合成の場であり、古くからそのサイズと数はがんの悪性度の指標として観察されてきた。実際、多くのがんでrRNA転写の亢進とリボソームタンパク質の増加が知られている。しかし、リボソーム制御とがん転移との関連についての報告はほとんどなく、本研究から明らかになったMerm1と核小体/リボソーム制御の関係は新たながんの悪性化の機構に繋がる可能性がある。

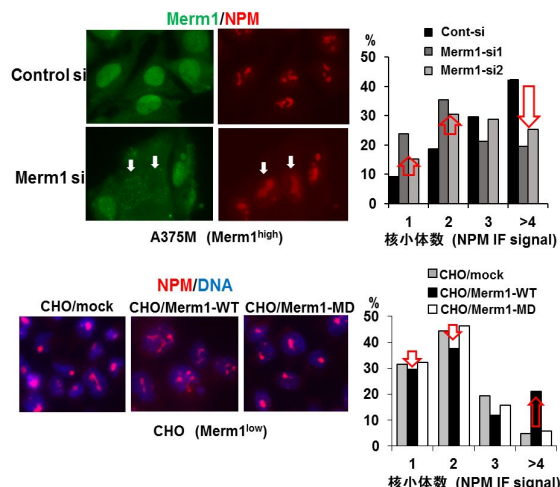


図2. Merm1のレベルは核小体形態に影響する

< 引用文献 >

1. Nakazawa Y. et al. Cancer Res. 2011, 71, 1146-1155.
2. Abdollahi A. J Cell Physiol. 2007, 210, 16-25. review.
3. Öunap K. et al. PLoS One 2013, 8, 275686.
4. White J et al., Mol. Cell Biol. 2008, 28, 3151-3161.
5. Ahmad Y. et al. Nucl. Acid Res. 2009, D181-184.
6. Wild T. et al. PLoS Biology 2010, 8, e1000522.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Satoshi Takagi, Ai Takemoto, Miho Takami, Tomoko Oh-hara, Naoya Fujita, Platelets promote osteosarcoma cell growth through activation of the PDGFR-Akt signaling axis. Cancer Science (査読有), 105: 983-988, 2014.
doi: 10.1111/cas.12464.

〔学会発表〕(計5件)

竹本愛、高木聡、高見美穂、大原智子、藤田直也、血小板は PDGFR-Akt 経路活性化を介して骨肉腫の悪性化に寄与する、平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ、2014 年 9 月 4 日、蓼科

竹本愛、高木聡、高見美穂、大原智子、藤田直也、血小板は PDGFR-Akt 経路活性化を介して骨肉腫の悪性化に寄与する、第 73 回 日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、横浜

大原智子、高木聡、竹本愛、佐藤重男、高見美穂、藤田直也、膀胱がんにおける Aggrus/podoplanin 発現と肺転移能の解析、第 73 回 日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、横浜

Ai Takemoto, Satoshi Takagi, Mina Okitaka, Miho Takami, Shigeo Sato, Tomoko, Oh-hara, and Naoya Fujita, Aggrus-induced platelet aggregation promotes tumor metastasis by enhancing EMT. Joint International Symposium on TGF-beta Family and Cancer Signal Network in Tumor Microenvironment, January 12, 2015, Tsukuba

竹本愛、大原智子、藤田直也、Aggrus 依存的な血小板凝集は EMT を介してがん転移を促進する、第 19 回 日本がん分子標的治療学会学術集会、2015 年 6 月 11 日、松山

〔図書〕(計1件)

竹本 愛、藤田 直也
羊土社、実験医学増刊号 がん微小環境と標的治療、「がん悪性化に関わる血小板の凝集機構を標的とした治療」Vol.33, No.5, 186-191, 2015.

〔その他〕

ホームページ
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/researcher/2652.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法セ

ンター・基礎研究部・研究員
研究者番号：20706494