

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430116

研究課題名(和文)がんエピゲノムを制御するリジンメチル化タンパク質の探索と難治がん治療への応用

研究課題名(英文)Molecular research of non-histone lysine methylation in cancer epigenome and its potential as a therapeutic target

研究代表者

渡邊 すぎ子 (WATANABE, SUGIKO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：10433012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞には、遺伝情報をコードするゲノム異常と共に、その活用システムであるエピゲノムにも異常が見られる。エピゲノムは、DNAメチル化や様々なクロマチン因子とその翻訳後修飾の連携によって制御されるが、詳細な分子機構は不明な点が多い。

本研究では、DNA損傷修復時のクロマチン応答に重要なリジンメチル化に焦点をあて、抗がん剤感受性の制御を目指して解析を行った。まず抗がん剤への応答因子がDNA損傷部に集まるのに必要なリジンメチル化酵素を同定し、さらにその分子制御機構を明らかにした。この酵素を治療標的として阻害することは、抗がん剤抵抗性を克服する可能性があり、新たな治療法開発への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)： A variety of epigenetic changes occur early in carcinogenesis in parallel with genetic mutations and represent in cancer development. The cancer epigenome is regulated by many kinds of factors, such as DNA methylation, chromatin factors and their posttranslational modification, while these precise molecular mechanisms are largely unknown.

In this research, I focused on lysine methylation, which is important for chromatin dynamics in DNA damage response, and analyzed their biological function aiming to control the cellular sensitivity against anti-cancer reagents. I have identified lysine methyltransferases that are required for proper recruitment of repair factors on damaged chromatin and clarified their molecular mechanisms. These molecules potentially present new opportunities for deriving therapeutic strategies for cancer.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：DNA損傷修復応答 クロマチン がん

1. 研究開始当初の背景

がんの発生、進展において、ゲノム異常と共にエピゲノム異常が重要な役割をもつ。通常の細胞では細胞周期チェックポイント機構が働き、細胞死が誘導されるゲノムストレス下でも、がん細胞はクロマチン構造を変化させて適応し、ときにはその悪性を加速させることもある。このがん特異的なエピゲノム構築は、DNAメチル化、ヒストン修飾とその認識タンパク質、クロマチン因子および転写調節因子等様々な因子の連携によってなされている。中でも、タンパク質の可逆的な翻訳後修飾の一つであるリジンのメチル化は、エピジェネティック制御機構の重要な因子であり、その制御異常とがんの発生、進展との関連が報告されている。しかしながら、詳細な分子制御機構は不明な点が多い。

種々の癌治療において、各種の抗がん剤投与や放射線照射が標準的に行われているが、それによって惹起されるDNA損傷にตอบสนองして、クロマチン因子をはじめとする細胞内タンパク質は、リン酸化やユビキチン化といった様々な修飾を受け、緊急事態にตอบสนองし、適切なシグナルを伝搬する(図1)。

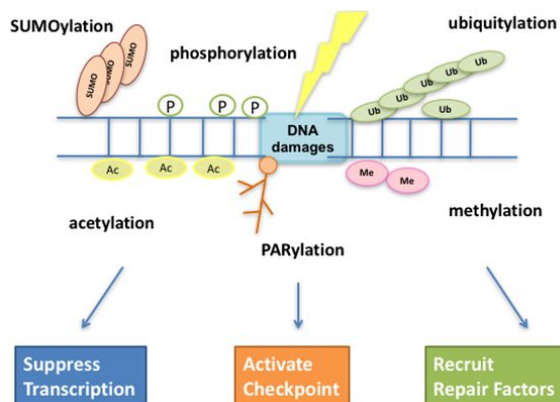


図1: posttranslational modification of damaged chromatin in DNA damage response

これまでの研究で、DNA損傷部クロマチンの重要な構成因子であるMDC1のメチル化が、DNA損傷修復因子のリクルートの連携をとしたシグナル伝搬に必要であることを見出している。その結果を受けて、非ヒストンタンパク質のリジンのメチル化の制御機構の解明が、今まで理解しえなかった発がんやがんの治療抵抗性の分子メカニズムを説明し、新たな治療標的や治療戦略をみいだす可能性があるのではないかと考え、本課題研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、種々の細胞応答におけるクロマチン構造の制御機構に焦点をあて、そのときに生じるタンパク質のリジンメチル化を

はじめとする翻訳後修飾をとおして、責任因子の同定とその分子生物学的機能を解析することを目的とした。

さらに、異常増殖下でもテロメアを維持しながら細胞周期を進行させるがん特異的なエピゲノムを理解することを見据えて、通常DNA損傷応答が活性化するテロメア機能不全部に着目し、同部のクロマチン構造にもリジンメチル化修飾が同様の分子生物学的役割を持つかを解明したい。

これらDNA損傷応答時のクロマチン制御の分子基盤を足がかりとして、治療抵抗性を示すがん細胞を、抗がん剤感受性に誘導するという新たな治療法開発への発展を目指した。

3. 研究の方法

1) ヒト培養細胞を用いたリジンメチル化酵素のスクリーニング:

siRNAによるノックダウンの実験系を用いて、DNA損傷部クロマチンへの損傷修復因子のリクルートに不可欠なリジンメチル化酵素を細胞免疫蛍光染色法によってスクリーニングした。

2) メチル化リジン特異的認識抗体の作成とその特異性の検証:

DNA損傷部クロマチンの重要な構成因子のメチル化リジン残基を含むメチル化ペプチドを合成し、それを特異的に認識する抗体を作成し、さらにその特異性を野生型メチル化リジンとその変異体を区別しうるかによって検証した。

3) クロマチン因子のメチル化解析:

2)で作成したメチル化リジン特異的認識抗体用い、クロマチン因子のメチル化が、1)で見出されたメチル化酵素によるものか、遺伝子導入、siRNAによるノックダウン法を組み合わせることで生化学的に検証した。

4) DNA損傷修復複合体の機能解析:

クロマチン因子のメチル化修飾が、損傷シグナルの伝搬の過程で、他のDNA損傷修復応答因子の連携にいかにか作用するか、免疫沈降法や細胞免疫蛍光染色法を組み合わせることで細胞・分子生物学的に解析した。

5) テロメア機能不全部でのDNA損傷修復因子複合体の形成機構の解析:

通常DNA損傷応答が活性化するテロメア機能不全部でそれらの因子がどのように連携し作用するか検討した。

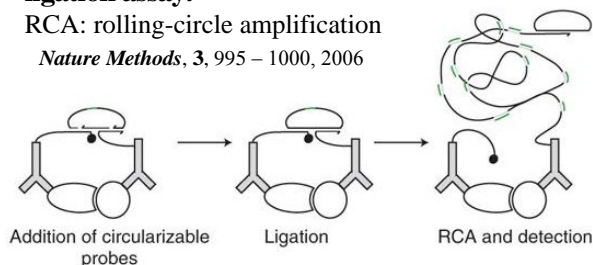
具体的には、レトロウィルスベクターを用い、同種指向性受容体(ecotrophic receptor)を発現するヒト初代培養細胞に遺伝子導入し、TRF2-Dominant negativeを発現させ、テロメ

ア機能不全を誘発の上、proximity ligation assay(PLA) (図 2)においてシグナルを解析することにより、テロメア機能不全部への DNA 損傷修復因子集積をメチル化の有無の条件で評価した。

図 2 : Schematic presentation of proximity ligation assay.

RCA: rolling-circle amplification

Nature Methods, 3, 995 – 1000, 2006



4 . 研究成果

1) DNA 損傷応答に不可欠なリジンメチル化酵素の同定とその酵素活性の証明 :

培養細胞を用い、siRNA によるスクリーニングを行い、抗がん剤に対する細胞応答で実働するクロマチン因子のメチル化に必要なメチル化酵素を同定した。この酵素が標的とするリジンメチル化特異的認識抗体を作成した上で、その特異性をウェスタンブロットで検証した。野生型メチル化リジンを持つ因子のみシグナルとして検出し、その変異体は認識しないことから、確かにメチル化を特異的に認識することが確認できた。さらにその酵素を siRNA でノックダウンしたところ、DNA 損傷応答で作用するクロマチン因子のメチル化が、実際低下する。

2)リジンメチル化の DNA 損傷修復複合体への分子生物学的役割の証明 :

DNA 損傷応答におけるクロマチン因子複合体を免疫沈降法にて解析したところ、このリジンメチル化が起らない状態では、DNA 損傷修復因子の DNA 損傷部クロマチンへの初期のリクルート自体は可能でも、その後の分子の相互作用が適切に行われず、十分なシグナル伝達が行われないことが明らかになった。この表現型は、メチル化される因子のノックアウト細胞の表現型と同等であることから、クロマチン因子のリジンメチル化が、その因子の DNA 損傷応答におけるハブ機能それ自身に、極めて重要な役割を持っていることを示唆している。

3) テロメア機能不全部での DNA 損傷修復因子複合体の形成機構への作用の証明 :

テロメア機能不全部において、同様の制御機構が作用しているか、テロメア構成タンパク質との共同在を in situ PLA によって解析した。通常のテロメア機能不全部に集積する

DNA 損傷修復因子複合体を観察したところ、メチル化リジン酵素を siRNA でノックダウンすると、シグナル伝達に必要なクロマチン因子のリクルートが顕著に低下していた。この時作用するメチル化責任酵素は、癌でしばしば高発現することが知られており、癌がテロメア機能不全を overcome して異常増殖しうるのに役割を持つことが示唆される(以上、投稿準備中)。

4) DNA 損傷修復因子のリン酸化制御と PARP 阻害剤感受性の連携機構の証明 :

DNA 複製と損傷修復において、多くの因子と相互作用し、そのハブ機能をとおしてゲノム安定性を維持しているとされる TOPBP1 が、DNA 2 本鎖切断修復に重要な RAD51 のリン酸化を制御するメカニズムを見出した。さらにこれらの制御因子が、抗がん剤として注目されている PARP 阻害剤の感受性を決定付ける要素となることが判明した。このことは、抗がん剤治療抵抗性を克服する上で不可欠な情報であり、がんの集学的治療方法選択における重要な要素となりうると思われる(論文 4)。

5) 微小管タンパク質のリン酸化とゲノム安定性維持機構の証明 :

細胞分裂時、微小管タンパク質 EB2 の適切なリン酸化が、均等な染色体分配に必要で、ゲノム安定性維持に不可欠であることを明らかにした。EB2 の過剰発現は膵臓がんの神経浸潤と相関があり、発現のみならずそのリン酸化ががんの進展に関与している可能性が十分考えられる(論文 3)。

6) DNA 損傷修復への細胞応答と細胞運命決定に対する知見 :

通常の細胞は、抗がん剤処理に対する細胞応答として、まずは細胞周期を停止し、停止後の損傷修復が適切に行われなければ、細胞死や細胞老化に陥る。細胞のストレス応答後の運命決定は、がん抑制因子 p53 が正常に作用しうるかどうかが大きく左右される(論文 5 及び 6)。これらの研究成果から、リジンメチル化が関与する DNA 損傷修復応答と細胞の運命決定、中でも細胞老化と発がんの関係解明へ発展させ、さらなる解析を進めているところである(論文 1 及び 2)。

このように DNA 損傷応答に伴う細胞内タンパク質の翻訳後修飾によるシグナルは、ゲノム及びエピゲノムの変動と連携しており、がんの異常増殖や抗がん剤治療抵抗性を克服する上で不可欠な情報であるとともに、またその制御が有望な新規治療法につながると期待できる。

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6件)

Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. The impact of SASP and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci* 108:563-569. 2017. 査読有

河本新平、渡邊すぎ子、原英二.
発がんにおける細胞老化と腸内細菌の影響
実験医学 34: 2300-6, 2016. 査読無。

Iimori M, Watanabe S., Kiyonari S, Matsuoka K, Sakasai R, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y. Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nat Commun.* 7:11117. 2016. 査読有

Moudry P, Watanabe K, Wolanin KM, Bartkova J, Wassing IE, Watanabe S., Strauss R, Troelsgaard Pedersen R, Oestergaard VH, Lisby M, Andújar-Sánchez M, Maya-Mendoza A, Esashi F, Lukas J, Bartek J. TOPBP1 regulates RAD51 phosphorylation and chromatin loading and determines PARP inhibitor sensitivity. *J Cell Biol.* 212:281-8. 2016. 査読有

Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S., Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Tokunaga E, Oki E, Morita M, Kadomatsu K, Maehara Y, Kitao H. The 1,2-Diaminocyclohexane Carrier Ligand in Oxaliplatin Induces p53-Dependent Transcriptional Repression of Factors Involved in Thymidylate Biosynthesis. *Mol Cancer Ther.* 14: 2332-42. 2015. 査読有

Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S., Kiyonari S, Kiniwa M, Ando K, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Kitao H. Trifluridine induces p53-dependent sustained G2 phase arrest with its massive misincorporation into DNA and few DNA strand breaks. *Mol Cancer Ther.* 14: 1004-13. 2015. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

渡邊すぎ子. テロメア構成タンパク質修飾とエピゲノム異常の関連性 -DNA 損

傷に対するクロマチン応答からの解析-第47回アステラス病態代謝研究会研究報告会(東京都千代田区) 2016年10月15日

渡邊すぎ子. がん・老化細胞の運命決定におけるDNA損傷応答の役割. 第5回浜名湖DNA損傷応答ワークショップ.(静岡県浜松市) 2016年4月4日

渡邊すぎ子. DNA損傷修復応答におけるクロマチン修飾連携によるシグナル伝達機構. 第8回symphony.(東京都千代田区) 2015年9月26日

渡邊すぎ子. DNA損傷応答におけるクロマチン修飾のクロストーク-抗がん剤治療応答制御と新規治療戦略を目指して-. 第28回先端研究セミナー.(東京都江東区) 2014年10月3日

渡邊すぎ子. DNA損傷修復応答制御におけるクロマチン修飾のクロストーク. 第26回高遠分子生物学シンポジウム.(長野県伊那市) 2014年8月28日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/molmicro/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊すぎ子 (WATANABE SUGIKO)
大阪大学・微生物病研究・遺伝子生物学分野
准教授
研究者番号: 10433012

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし