

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830127

研究課題名(和文)生殖細胞増殖分化におけるヒストンH2Aリン酸化およびユビキチン化の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the interplay between histone H2A phosphorylation and ubiquitylation

研究代表者

相原 仁 (AIBARA, Hitoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：80587717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン修飾酵素や修飾部位の変異がエピゲノム情報を攪乱し、癌化の要因になることが近年明らかにされつつある。本研究は、ヒストンH2AのC末端部分のリン酸化およびユビキチン化修飾のクロストークによる転写制御の破綻によって、細胞の癌化や生殖細胞の増殖異常・不妊が引き起こされるという仮説を証明することが最終目標である。VRK1によるH2Aのリン酸化がサイクリンD1の発現を正に制御し、この制御不全が癌化の引き金になることを証明した。さらに、腫瘍形成能を有するリン酸化およびユビキチン化部位のミスセンス変異を同定した。以上の結果は、癌エピゲノム研究分野に貢献できうる基礎的知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that functional dysregulation of histone modifications leads normal cells to malignant cancer statuses. Too many aberrant expressions, abnormal rearrangements, mutations of genes encoding chromatin modification are occurred in multiple cancer cell types. However, a few mutations of genes encoding histone proteins themselves are identified in patients. Existences of histone mutations in other variants and canonical histones, and their malignancies are largely unknown. Our goal is to demonstrate that the dysregulation of the interplay between phosphorylation of 120th threonine (T120-H2A) and mono-ubiquitylation (K119-H2A) within histone H2A C-terminus region triggers tumorigenesis. We found that phosphorylation of T120-H2A by VRK1 kinase upregulates expression of Cyclin D1. Deregulation of phosphorylation of T120-H2A by VRK1 kinase caused tumorigenesis. We also identified missense mutations of H2A that possess tumorigenic activity.

研究分野：生化学

キーワード：エピゲノム ヒストン修飾 転写制御

1. 研究開始当初の背景

ヒストン H2A リン酸化、ユビキチン化による転写制御メカニズムの破綻がもたらす生殖細胞増殖異常および細胞癌化

我々は、ヌクレオソーム特異的にヒストン H2A の 120 番目スレオニン (H2A-T120) をリン酸化するキナーゼ Nucleosomal Histone Kinase-1 (NHK-1) をショウジョウバエ胚を用いて精製・同定した (Aihara et al. Genes & Dev. 2004)。NHK-1 オースログ VRK1 のノックアウトマウスは雌雄共不妊であり、精原細胞の減少や生殖細胞分化・減数分裂で働く遺伝子群の発現異常が観察され (Wiebe et al. Biol. of Reproduction 2010, Choi et al. PLoS ONE 2010) NHK-1 ファミリーによる H2A リン酸化の重要性を示唆する。

また我々は、他のグループとの共同研究から、癌組織で H2A-T120 リン酸化が亢進していることを見出し (図 1)、VRK1 による H2A-T120 リン酸化異常による癌化のメカニズムを解析し、以下のことを明らかにした。

(1) siRNA による VRK1 の発現低下と発現マイクロアレイの解析の結果、VRK1 がサイクリン D1 の遺伝子転写を活性化することを証明した。(2) H2A-T120 リン酸化と 119 番目リジン (H2A-K119) のユビキチン化が相互に拮抗することを *in vitro* で証明し、培養細胞を用いた ChIP-seq 解析の結果、コアプロモーター領域で両修飾の拮抗作用によって転写制御されるサイクリン D1 を含む遺伝子群を同定した。(3) siVRK1 処理で低下した細胞増殖率が、サイクリン D1 の発現によって回復する。(4) H2A リン酸化模倣体 (H2A-T120D) や VRK1 キナーゼの過剰発現によって、NIH3T3 細胞の癌化が誘発される。我々の過去の研究で、H2A-K119 ユビキチン化が、転写活性化の指標であるヒストン H3 の 4 番目リジン (H3-K4) のメチル化を抑制する一方、USP21 酵素による脱ユビキチン化によりメチル化抑制を解除すると転写活性化することを証明している (Nakagawa et al. Genes & Dev. 2008)。

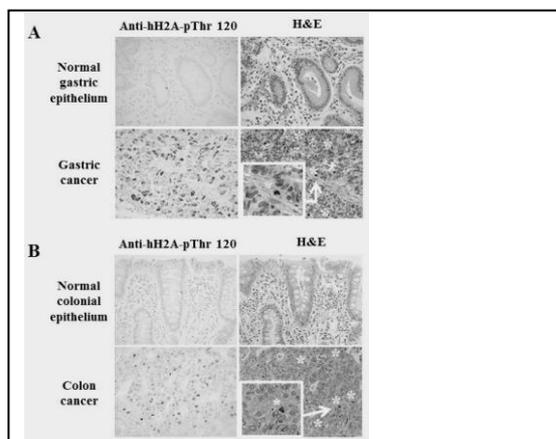


図 1 胃癌 (A) および大腸癌 (B) における H2A リン酸化抗体を用いた免疫組織染色

2. 研究の目的

これら (1) - (4) の結果から、VRK1 の H2A-T120 リン酸化によるサイクリン D1 遺伝子の転写制御が細胞増殖コントロールのメインストリームであると推測され、VRK1 による H2A のリン酸化が転写を活性化する、一方 H2A のユビキチン化が不活性化に働き、両者の相互拮抗作用によって転写状態が調節・維持され、この調節破綻が、癌化や不妊の原因であるという仮説をたて (図 2) これを実証することが最終目標である。本研究では、培養細胞を用いて、1) H2A-T120 リン酸化-H2A-K119 ユビキチン化による転写制御の分子メカニズムを解析し、2) 細胞癌化をもたらす VRK1 や H2A 変異体を見出し、3) ノックアウトマウスを用いて、生殖細胞の増殖・分化における VRK1 および USP21 やヒストン修飾クロストークの生理的役割を明らかにすることを試みた。

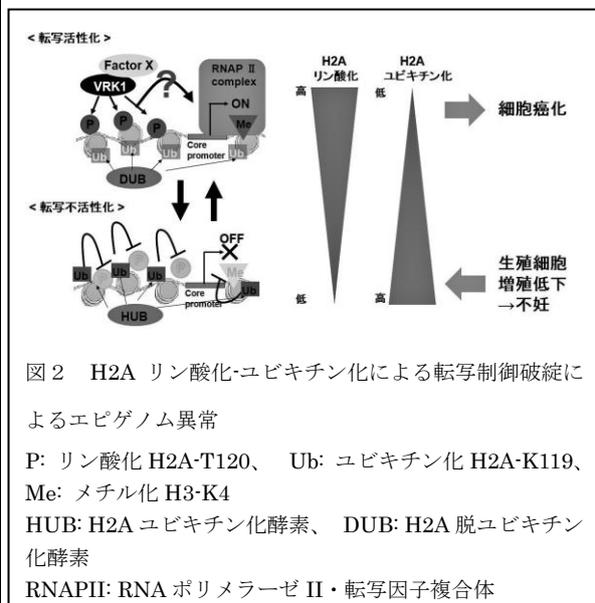


図 2 H2A リン酸化・ユビキチン化による転写制御破綻によるエピゲノム異常

P: リン酸化 H2A-T120、 Ub: ユビキチン化 H2A-K119、 Me: メチル化 H3-K4  
 HUB: H2A ユビキチン化酵素、 DUB: H2A 脱ユビキチン化酵素  
 RNAPII: RNA ポリメラーゼ II・転写因子複合体

3. 研究の方法

1) -1 siRNA による VRK1 ノックダウンや、血清飢餓からの回復段階における VRK1 のクロマチン結合、H2A-T120 リン酸化および H2A-K119 ユビキチン化の動態を調べるため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて解析を行った。

また siRNA 耐性 VRK1 や外來性サイクリン D1 を発現する細胞株を作製し、siRNA による VRK1 ノックダウンによる細胞増殖低下の回復実験を行った

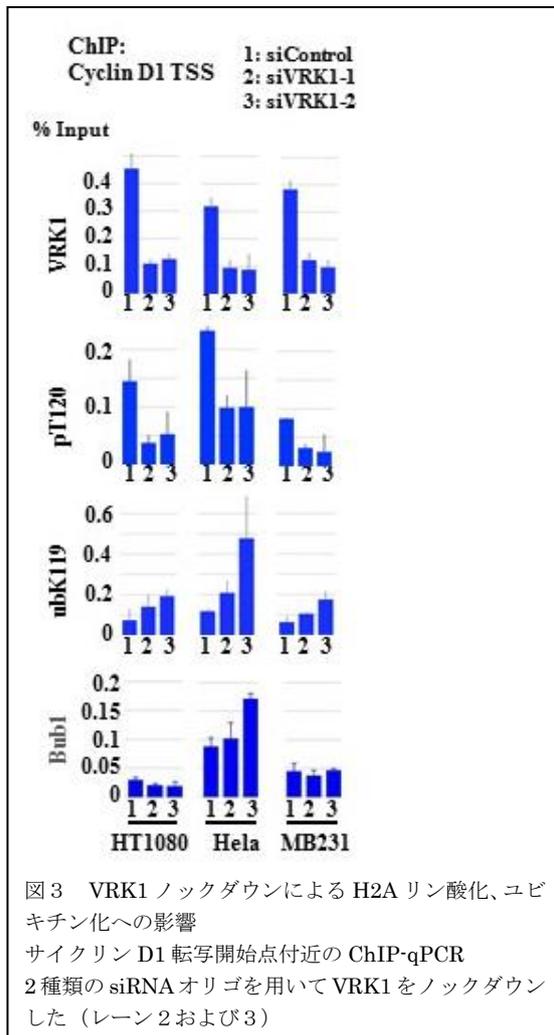
2) 公開データベースを用いて VRK1 や H2A のリン酸化およびユビキチン化部位の変異体を見出し、これら変異体の腫瘍形成能をヌードマウスを用いて検討した。

3) *vrk1* および *vrk1*, *usp21* ノックアウトマウスを作製し、生殖細胞形成過程のどの段階で異常が観察されるかを各分化マーカーを指標に特定し、クロマチン形態レベルの異常も検討する。

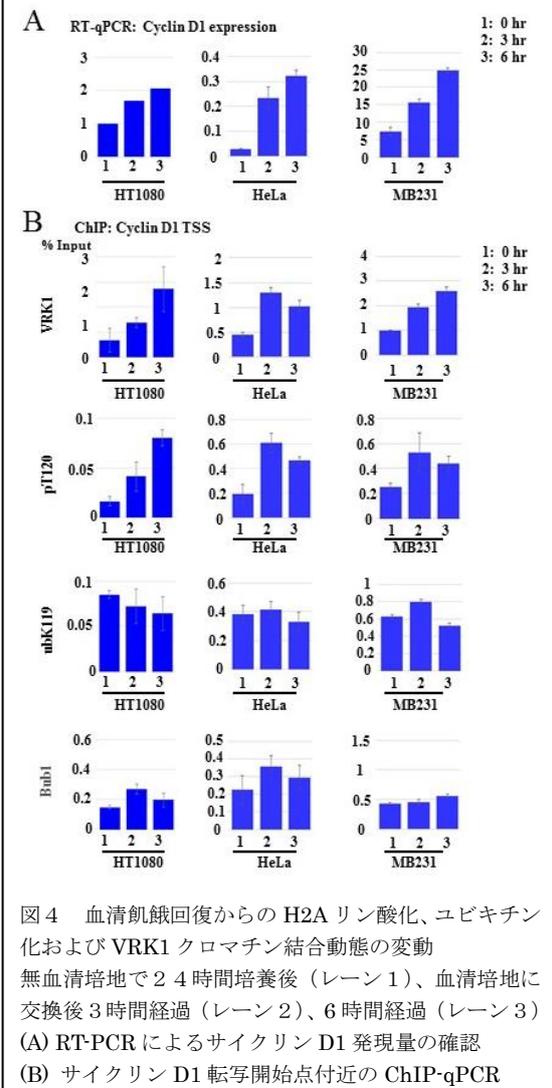
#### 4. 研究成果

1) H2A-T120 リン酸化-H2A-K119 ユビキチン化による転写制御の分子メカニズムの解析

図3に示すように HT1080, HeLa, MDAMB-231 の3種類の癌細胞を用いてサイクリン D1 コアプロモーター付近における ChIP を行った結果、VRK1 ノックダウンによって、H2A-T120 リン酸化は低下する一方、H2A-K119 ユビキチン化は上昇した。また分裂期のセントロメア特異的に H2A-T120 をリン酸化することが知られている Bub1 キナーゼのクロマチン結合変化は見られなかった。このことから、サイクリン D1 コアプロモーター領域における H2A-T120 のリン酸化は VRK1 特異的であること、H2A-T120 リン酸化と H2A-K119 ユビキチン化は相互に拮抗的であることが示唆される。



また血清飢餓からの回復によって、サイクリン D1 の発現量の上昇とともに (図4 A)、サイクリン D1 のコアプロモーター領域において、VRK1 のクロマチン結合量が上昇すると同時に、H2A-T120 をリン酸化も上昇した。このことは、G1 期における H2A-T120 のリン酸化は VRK1 が主体となって行うと考えられる。



さらに siRNA 耐性 VRK1 や外來性サイクリン D1 を発現するコンストラクトを組み込んだ細胞株を作製し、siRNA による VRK1 ノックダウンによる細胞増殖低下の回復実験を行った結果、siRNA 耐性 VRK1 野生型を発現する細胞株では、VRK1 ノックダウンによる細胞増殖低下率が減少していること、キナーゼ不活性化型 VRK1 では細胞増殖低下が回復できていないことが判明した (図5 下段)。また、サイクリン D1 を発現させた細胞株では、VRK1 ノックダウンによる細胞増殖低下が部分的に回復していることが示された (図5 上段)。以上の結果は、VRK1→H2A リン酸化→サイクリン D1 発現上昇が細胞増殖のキーレギュレーターであり、この制御の異常が癌化をもたらすと推測される。

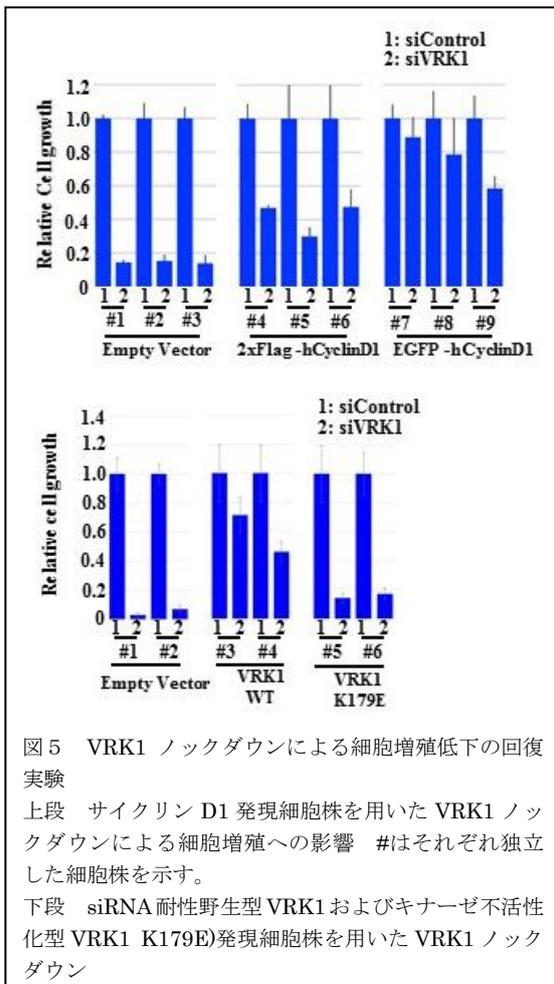


図5 VRK1 ノックダウンによる細胞増殖低下の回復実験

上段 サイクリン D1 発現細胞株を用いた VRK1 ノックダウンによる細胞増殖への影響 #はそれぞれ独立した細胞株を示す。

下段 siRNA 耐性野生型 VRK1 およびキナーゼ不活性化型 VRK1 K179E)発現細胞株を用いた VRK1 ノックダウン

## 2) VRK1 や H2A 変異体による細胞癌化

癌細胞株および癌患者の検体合わせて 2 万以上の全ゲノムシーケンスデータを有する英国サンガーセンターの COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) 公開データベースを用いて、18 遺伝子ある H2A の C 末端部分のミスセンスや欠失変異を調べた結果、図 6 に示す変異を見出した。また約 40 種類の癌細胞で H2A の変異を調べた結果、ヒト結腸癌由来 SW1222 細胞の HIST1H2AC 遺伝子における 119 番目リジンのアスパラギン変異を発見した。

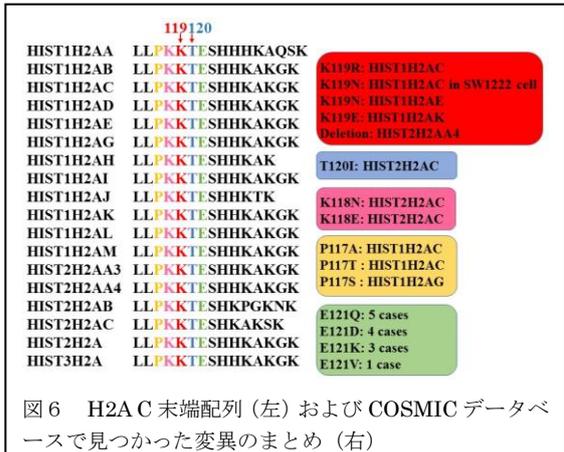


図6 H2A C 末端配列 (左) および COSMIC データベースで見つかった変異のまとめ (右)

これらの変異 H2A の腫瘍形成能を調べるため、pMX レトロウイルスベクターを用いて H2A 変異体を発現させた NIH3T3 細胞を免疫不全ヌードマウスに皮下注射し、8-12 週経過後の腫瘍形成を観察した。その結果、H2A-K119N および H2A-K119R を発現させた細胞を注射したマウスでは、巨大な腫瘍塊が見られ (図 7)、非ユビキチン化 H2A 変異体の強い腫瘍形成能を確認した。また VRK1 野生型を発現させた細胞でも腫瘍塊が観察された (図 8)

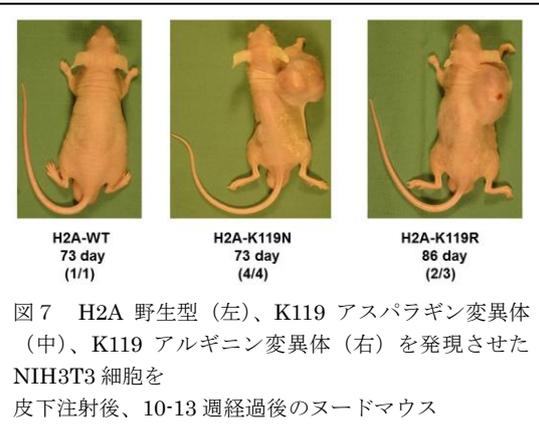


図7 H2A 野生型 (左)、K119 アスパラギン変異体 (中)、K119 アルギニン変異体 (右) を発現させた NIH3T3 細胞を皮下注射後、10-13 週経過後のヌードマウス

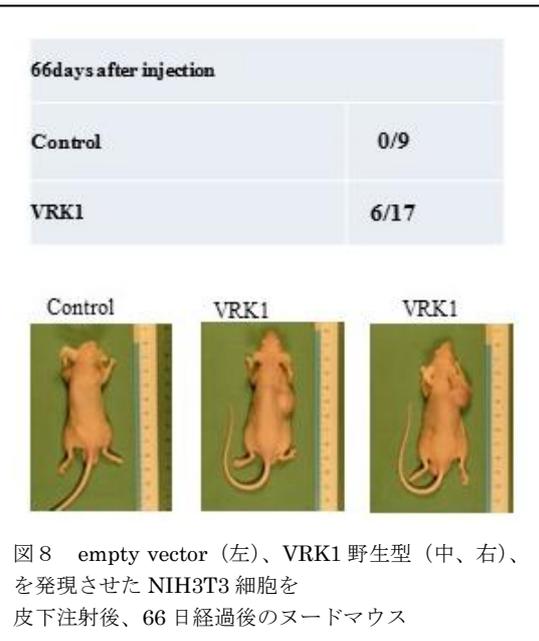


図8 empty vector (左)、VRK1 野生型 (中、右)、を発現させた NIH3T3 細胞を皮下注射後、66 日経過後のヌードマウス

以上の結果から、VRK1 の発現異常や H2A 変異体の存在によって、H2A-T120 リン酸化-H2A-K119 ユビキチン化の制御が攪乱され、バランスが崩れることによって、細胞癌化が誘発される我々の仮説を支持する (図 2)。

今後、注射する細胞数の検討など、詳細な再現性の確認を行う。また他に、同じくユビキチン化部位の 118 番目リジンやリン酸化部位の 120 番目スレオニンの変異体などの腫瘍形成能も調べる。腫瘍の大きさ、形成速度などを考慮し、腫瘍形成能の高い H2A 変異体を見出し、その変異体が細胞癌化をもたらす分子メカニズムをエピゲノム解

析を用いて行うことが重要であると考えられる。

3) 生殖細胞の増殖・分化における VRK1 および USP21 やヒストン修飾クロストークの生理的役割の解析

*Vrk1* ノックアウトマウスおよび *Vrk1*, *Usp21* ダブルノックアウトマウスの作製は行ったが、繁殖の困難などにより、マウスの解析が十分に遂行できなかった。

#### 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 2 件)

1. Inoue, D., Aihara, H., Sato, T., Mizusaki, H., Doiguchi, M., Higashi, M., Imamura, Y., Yoneda, M., Miyanishi, T., Fujii, S., Okuda, A., Nakagawa, T., and Ito, T.

Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation.

*Scientific Report*, 2015 Nov 16;5:16567

2. Mizusaki H, Aihara H. Ito T.

Histone Phosphorylation and Chromatin Dynamics.

Jerry L. Workman, Susan M. Abmayr eds:

*Fundamentals of Chromatin*, Springer-Verlag New York: 341-354. 2014.

[学会発表] (計 2 件)

1 Hitoshi Aihara, Hirofumi Mizusaki, Takeya Nakagawa, Takashi Ito

Histone H2A mutation might play roles in carcinogenesis

Cold Spring Harbor Laboratory 2014 Meeting - Epigenetics & Chromatin

9th - 13th September 2014, New York U.S.A.

2 Hitoshi Aihara, Hirofumi Mizusaki, Takeya Nakagawa, Takashi Ito

Histone H2A mutation might play roles in carcinogenesis

第 37 回日本分子生物学会年会

2014 年 11 月 25 日-27 日

パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/biochem>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

相原 仁 (AIBARA Hitoshi)

長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：80587717