

金沢大学がん進展制御研究所共同研究成果報告書

平成24年4月10日提出

対象研究テーマ：がんの発症・悪性化におけるヒストンのメチル化制御に関する研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：ヒストン修飾解析ツールの開発とがんのエピゲノム解析

研究代表者：東京工業大学バイオフィロンティアセンター 特任准教授 野崎直仁

研究成果の概要：

がんの発症や悪性化に関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析するために、メチル化・脱メチル化酵素および様々なメチル化修飾ヒストンに特異的なモノクローナル抗体の開発を進めた。作製した抗体を用いた ChIP 解析によって、ヒストン H3 の K4 (4 番目のリジン残基) 脱メチル化酵素である PLU1 が、その標的遺伝子 KAT5/Tip60 の発現をエピジェネティックに制御することにより、がん細胞の細胞浸潤能を亢進することを見だし、がんの悪性進展過程における酵素の新しい役割を明らかにした。

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス、ヒストン、翻訳後修飾、がん

1. 研究開始当初の背景

がんの発症や悪性化の分子メカニズムの解明には、原因遺伝子の同定が重要である。レトロウイルス感染発がんモデルマウスでは、ウイルスがゲノムへ挿入することで、挿入部位の遺伝子変異や周辺遺伝子の発現異常を誘導し、がんを発症する。そのため、ウイルス挿入部位を解析することで、原因遺伝子を容易に同定することができる。ウイルス挿入変異の標的として高頻度に同定される宿主因子として、ヒストンのメチル化酵素・脱メチル化酵素の多くがこれまでに同定されてきた。ヒストンの翻訳後修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化等）は、転写制御、DNA 複製、ヘテロクロマチン形成など様々な生物学的現象に関与している。ヒトのがんでは、ヒストンのアセチル化酵素の変異や脱アセチル化酵素の発現異常が観察されており、脱アセチル化酵素の阻害剤（Trichostatin A, SAHA 等）が抗がん剤として開発されている。一方、ヒストンのメチル化と発がんの関係は、まさに現在解析が進んでいる注目される研究分野である。

2. 研究の目的

がんに関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析し、エピゲノム異常によるがんの発症と悪性化の分子機構を解明することを目的とする。そのために、ヒストンの翻訳後修飾の詳細な解析に必要な修飾特異的、修飾部位特異的なモノクローナル抗体や、メチル化・脱メチル化

酵素自身に対する抗体の開発を進行する。また、開発した抗体を用いた ChIP 法などによって、エピゲノム変化を解析し、がん細胞の悪性進展過程における遺伝情報発現異常の本質を明らかにする。さらに、ヒストンのメチル化制御酵素を標的とする阻害剤のスクリーニングシステムの構築を目指した抗体の活用法を検討する。

3. 研究の方法

ヒストン H3 の重要なメチル化修飾部位である K4 (4 番目のリジン残基)、K9、K27、K36、K79 等について、それぞれモノメチル、ジメチル、トリメチル修飾、あるいは未修飾の状態を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製を進行する。また、ヒストンのメチル化制御酵素の発現異常によるがんの発症と悪性化の分子機構を解明するために、作製した抗体を用いた ChIP 法などによって、がん細胞のエピゲノムを解析する。さらに、大規模 DNA シークエンスによる転写開始点決定を利用したデジタル発現プロファイリングの結果とあわせて、がん細胞における遺伝情報の発現異常のメカニズムを調べる。

4. 研究成果

ヒストン H3 の重要なメチル化修飾リジン残基 (K4, K9, K27, K36, K79) について、さまざまなメチル化修飾状態 (mono-, di-, tri-)

を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を進行し、多くの場合において、特異性の高い抗体の作製に成功した。また、他の翻訳後修飾（アセチル化、リン酸化など）とメチル化修飾が併存する状態を特異的に認識する抗体に関しても、重要な組み合わせについて抗体作製を完了しつつある。

本共同研究においては、乳がんや前立腺がんで高発現が見られるがん遺伝子 PLU1 脱メチル化酵素が、がんの発症だけでなく、がん細胞の細胞浸潤能を亢進する活性をもつことを示し、がんの悪性化における酵素の新たな役割を見つけた。さらに、デジタル発現プロファイルを用いて PLU1 酵素によるがん細胞の浸潤の重要な標的 KAT5/Tip60 ヒストンアセチル化酵素とその下流の標的である CD82/ KAI1 遺伝子を同定した。作製した抗体を用いた ChIP 解析等から、PLU1 が KAT5 の発現をエピジェネティックに制御することを見だし、PLU1 の制御する遺伝子発現カスケードが、がんの悪性進展過程に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

現在、発がんに関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素自身 (JMJD3, LSD1, PLU1, Suv39h1, etc.) に対する抗体についても、ハイブリドーマのスクリーニングを順調に進行している。

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)

Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Enkhbaatar Z, Nozaki N, Satou K and Suzuki T. PLU1 histone demethylase decreases the expression of KAT5 and enhances the invasive activity of the cells. *Biochemical J.*, 437, 555-564, 2011.

Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Res.*, 39, 6475-88, 2011.

Ishikawa K, Ohsumi T, Tada S, Natsume R, Kundu LR, Nozaki N, Senda T, Enomoto T, Horikoshi M, Seki M. Roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication. *Genes Cells.*, 16, 1050-62. 2011.

Sugiyama T, Chino M, Tsurimoto T, Nozaki N, Ishimi Y. Interaction of heliquinomycin with

single-stranded DNA inhibits MCM4/6/7 helicase. *J Biochem.*, 151, 129-37, 2011.

Kokabu Y, Murayama Y, Kuwabara N, Oroguchi T, Hashimoto H, Tsutsui Y, Nozaki N, Akashi S, Unzai S, Shimizu T, Iwasaki H, Sato M, Ikeguchi M. Fission yeast Swi5-Sfr1 protein complex, an activator of Rad51 recombinase, forms an extremely elongated dogleg-shaped structure. *J Biol Chem.*, 286, 43569-76. 2011.

Brookes E, de Santiago I, Hebenstreit D, Morris KJ, Carroll T, Xie SQ, Stock JK, Heidemann M, Eick D, Nozaki N, Kimura H, Ragoussis J, Teichmann SA, Pombo A. Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell.*, 10, 157-70, 2012.

〔学会発表〕(計3件)

木村 宏、林 陽子、山縣 一夫、若山 照彦、海沼 嵩、胡桃坂 仁志、野崎 直仁 FabLEM を用いたヒストン H3 のメチル化とアセチル化の生細胞ダイナミクス. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011.5. 熊本

Bando M, Saito K, Minamino M, Itoh T, Hirota T, Nozaki N, Deardorff M, Krantz I, Shirahige K. HDAC8, and SMC3 deacetylase, is required for the recycling of cohesion complex. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12. 横浜

Sugiyama T, Chino M, Tsurimoto T, Nozaki N, Ishimi Y. Interaction of heliquinomycin with single-strand DNA inhibits MCM4/6/7 helicase. 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12. 横浜

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京工業大学バイオフィロンティアセンター・特任准教授 野崎直仁

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

機能ゲノミクス・教授 鈴木健之