

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：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がんの悪性化に関与するヒストン修飾変化とその解析ツールの開発

研究代表者：大阪大学大学院生命機能研究科 准教授 木村 宏

研究成果の概要：

がんの発症や悪性進展過程におけるヒストンのメチル化修飾状態の制御異常を解析するために、さまざま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行した。作製した特異的抗体を用いて、TGFβ処理で上皮・間葉転換 (EMT) が誘導されるがん細胞について、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンの翻訳後修飾の経時的な変化を調べた。その結果、特にヒストン H3K27 のトリメチル化 (me3) レベルの著しい上昇が観察された。現在、H3K27 メチル化修飾を担う酵素群 PRC2 複合体の細胞内動態 (複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など) に注目し、EMT の新しいエピジェネティックな制御メカニズムの解析を進めている。

研究分野：分子生物学

キーワード：がん, エピジェネティクス, ヒストン, 翻訳後修飾, 上皮・間葉転換

1. 研究開始当初の背景

がんは、正常な細胞の分化・維持機構の破綻が原因のひとつであり、ジェネティックな変異に加えて、エピジェネティックな制御機構の異常もまた、がんの発症・悪性進展を引き起こす要因と考えられている。そのような異常を同定するために、ヒトの発がんの様々な過程を再現する発がんモデルマウスの有用性は大きい。レトロウイルス感染発がんモデルマウスでは、ウイルスのゲノムへの挿入による遺伝子変異や周辺遺伝子の発現異常が原因でがんが発症するため、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。これまでに、ウイルス挿入変異の標的として、ヒストンのメチル化酵素・脱メチル化酵素の多くが、高頻度に同定されてきた。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の関与が既に解析されており、脱アセチル化酵素の阻害剤 (Trichostatin A, SAHA など) が抗がん剤として開発されている。これに対し、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行している注目される研究分野であり、次世代のエピジェネティック医薬の臨床開発への貢献が期待されている。

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、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の開発を進行する。開発した抗体を用いて、ChIP 法などによるエピゲノム解析と個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン翻訳後修飾の動態解析を行う。特に、上皮・間葉転換 (EMT) をはじめとするがん細胞の悪性進展過程における新しいエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

遺伝子の転写制御に最も重要なヒストン H3 のメチル化修飾部位である K4、K9、K27、K36、K79 等について、それぞれのメチル化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。作製した抗体を用いて、正常細胞とがん細胞、あるいは悪性度の異なるがん細胞を比較しながらヒストンのメチル化修飾のダイナミクスを解析する。特に、がんの悪性進展過程に重要な上皮・間葉転換 (EMT) のプロセスにおいて、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンのメチル化修飾の変化を調べ、その分子メカニズムを解析する。

4. 研究成果

ヒストン H3 の重要なメチル化修飾リジン

残基について、さまざまなメチル化修飾状態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認識する抗体についても、抗体作製を完了しつつある。これらの特異的修飾抗体を用いて、肺がん細胞 A549 が TGFβ 処理で EMT を誘導されるモデル実験系において、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンの翻訳後修飾の経時的な変化を調べた。その結果、特に H3K27 のトリメチル化 (me3) レベルの著しい上昇が観察された。この結果は、A549 細胞における H3K27 脱メチル化酵素 JMJD3 のノックダウンによる EMT 誘導という機能ゲノミクス分野が見いだした実験結果とも合致する。しかしながら、H3K27 メチル化修飾を担う酵素群 PRC2 複合体の各構成要素の発現そのものは、TGFβ によってほとんど変化しないことがわかった。そのため現在は、PRC2 複合体の細胞内動態（複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など）に注目し、EMT のエピジェネティックな制御メカニズムの解析を進めている。

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 8 件）

Yokoyama Y, Hieda M, Nishioka Y, Matsumoto A, Higashi S, Kimura H, Yamamoto H, Mori M, Matsuura S, and Matsuura N. (2013). Cancer associated up-regulation of H3K9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. *Cancer Sci* (E-pub ahead of print; doi: 10.1111/cas.12166)

Shang WH, Hori T, Martins NM, Toyoda A, Misu S, Monma N, Hiratani I, Maeshima K, Ikeo K, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, and Fukagawa T. (2013). Chromosome engineering allows the efficient isolation of vertebrate neocentromeres. *Dev Cell* 24, 635-648.

Nozawa RS, Nagao K, Igami K, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, Sado T, Kimura H, and Obuse C. (2013). Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. *Nat Struct Mol Biol* (E-pub ahead of print; doi: 10.1038/nsmb.2532).

Osakabe A, Tachiwana H, Takaku M, Hori T, Obuse C, Kimura H, Fukagawa T, and Kurumizaka H. (2013). Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription. *J Cell Sci* (in press;

doi: 10.1242/jcs.112623)

Tachiwana H, Yuta M, Shono N, Ohzeki J-i, Osakabe A, Otake K, Larionov V, Earnshaw WC, Kimura H, Masumoto H, and Kurumizaka H. (2013). Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes. *Nucleic Acids Res* (E-pub ahead of print; doi: 10.1242/jcs.112623)

Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, and Nifuji A. (2013). Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Pat* 13, 84-90.

Deguchi K, Nagamatsu G, Miyachi H, Kato Y, Morita S, Kimura H, Kitano S, Hatada I, Saga Y, Tachibana M, and Shinkai Y. (2013). Posttranscriptional regulation of histone lysine methyltransferase GLP in embryonic male germ cell. *Biol Reprod* 88,36.

Mishima Y, Watanabe M, Kawakami T, Jayasinghe CD, Otani J, Kikugawa Y, Shirakawa M, Kimura H, Nishimura O, Aimoto S, Tajima S, and Suetake I. (2013). Hinge and chromoshadow of HP1α participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J Mol Biol* 425, 54-70.

〔学会発表〕（計 1 件）

木村 宏. ヒストン修飾動態制御の単一細胞解析. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞核構造体によるエピゲノム制御機構」(2012 年 12 月 11-14 日、福岡)

〔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

大阪大学大学院生命機能研究科・准教授
木村 宏

(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