

---

がん関連遺伝子のエピジェネティックサイレンシングにおけるMBD蛋白の機能解析

---

(課題番号 18390117)

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金（基盤研究（B））研究成果報告書

平成20年5月

研究代表者 福重 真一  
(東北大学大学院医学系研究科准教授)

(1) 研究課題名および課題番号

がん関連遺伝子のエピジェネティックサイレンシングにおける MBD 蛋白の機能解析 (課題番号 18390117)

(2) 標題

平成 18 年度～19 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B))  
平成 20 年 5 月作成・提出

(3) 研究代表者

福重 真一 (東北大学 大学院医学系研究科 准教授)

(4) 研究分担者

なし

(5) 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	8,500	2,550	11,050
平成 19 年度	6,200	1,860	8,060
総計	14,700	4,410	19,110

(6) 研究発表

雑誌論文

- 1) Fukushige, S., Kondo, E., Gu, Z., Suzuki, H., and Horii, A. RET finger protein enhances MBD2- and MBD4-dependent transcriptional repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 351: 85-92, 2006.
- 2) Zhao, N., Zhu, F., Yuan, F., Haick, A. K., Fukushige, S., Gu, L., and Her, C. The interplay between hMLH1 and hMRE11: Role in MMR and the effect of *hMLH1* mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 370: 338-343, 2008.

## 学会発表

- 1) Fukushige, S., Gu, Z., Kondo, E. and Horii, A.: Ret finger protein mediates MBD2- and MBD4-dependent transcriptional repression. 97<sup>th</sup> American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 2, 2006, Washington DC.
- 2) 阿部忠義、砂村眞琴、江川新一、福山尚治、元井冬彦、福重真一、堀井明、海野倫明：PanIN 病変、膵癌の Whole Genome Amplification を用いたゲノム解析. 第 37 回日本膵臓学会大会、平成 18 年 6 月 29 日、横浜.
- 3) 阿部忠義、砂村眞琴、江川新一、福山尚治、元井冬彦、福重真一、堀井明、海野倫明：Whole Genome Amplification を利用した膵癌の遺伝子診断. 第 61 回日本消化器外科学会定期学術総会、平成 18 年 7 月 13 日、横浜.
- 4) 福重真一、近藤恵美子、堀井明：GSTP1 遺伝子の再発現におけるヒストン脱アセチル化酵素阻害の役割. 第 65 回日本癌学会学術総会、平成 18 年 9 月 28 日、横浜.
- 5) 近藤恵美子、Zhaodi Gu、堀井明、福重真一：メチル CpG 結合蛋白 MBD2、MBD4 を介した転写抑制における RET finger protein の役割. 第 65 回日本癌学会学術総会、平成 18 年 9 月 30 日、横浜.
- 6) Fukushige, S., Kondo, E. and Horii, A.: Changes in histone modifications reactivate the expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, October 4, 2007, Yokohama.
- 7) Fukushige, S., Kondo, E. and Horii, A.: Changes in histone modifications reactivate the expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes in cancer cells. The American Society of Human Genetics 57<sup>th</sup> Annual Meeting, October 26, 2007, San Diego.

- 8) 福重真一、近藤恵美子、堀井明：がん抑制遺伝子のエピジェネティックサイレンシングはヒストン修飾の改変によって再活性化される。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、平成19年12月13日、横浜。

## (7) 研究成果

### 研究目的

がん関連遺伝子はジェネティックな変化に加え、エピジェネティックな変化により機能を失い、がん化を引き起こす。がん関連遺伝子のエピジェネティックな転写抑制には、プロモーター領域に存在する CpG 配列の高度メチル化とそれに特異的に結合するメチル CpG 結合ドメイン (MBD) 蛋白を介したヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 複合体によるヒストンの脱アセチル化、ヒストンメチル基転移酵素によるヒストンのメチル化が大きく関与する。これまでがん関連遺伝子の転写抑制では、DNA メチル化とヒストン修飾に大きな関心が注がれてきた。しかしながら、これらを結ぶ MBD 蛋白も転写抑制機構において重要であり、MBD 蛋白の転写抑制における役割を解明することは大きな意義をもつ。MBD 蛋白は、MBD1、MBD2、MBD3、MBD4、MeCP2 の5種類が同定されている。我々は、この中で MBD2、MBD4 の二つががん抑制遺伝子 *CDKN2A*、DNA 修復遺伝子 *MLH1* の高度メチル化プロモーター領域に特異的に結合することを明らかにした (1)。また、MBD2、MBD4 の siRNA を用いてそれぞれの蛋白をノックダウンしても DNA メチル化により抑制された *CDKN2A*、*MLH1* 遺伝子の転写はまったく回復しないが、脱メチル化剤、HDAC 阻害剤と MBD2、MBD4 のノックダウンを併用することによって *MLH1* 遺伝子の転写レベルが著しく変化することを見出した。興味深いことに MBD2 のノックダウンでは *MLH1* 遺伝子の転写レベルは上昇し、MBD4 のノックダウンでは *MLH1* 遺伝子の転写レベルは減少する。これらの結果は、MBD2、MBD4 蛋白が *MLH1* 遺伝子の高度メチル化プロモーターに結合し、DNA メチル化を介した *MLH1* 遺伝子の転写制御に関わっていることを示唆する。プロモーターの高度メチル化による *MLH1* 遺伝子の転写抑制は、マイクロサテライト不安定性を示す孤発性の大腸がん、胃がん、子宮内膜がん、膵がんの DNA ミスマッチ修復欠損の主要な原因である。本研究では、MBD4 相互作用蛋白の解析から MBD2、

MBD4 の転写抑制メカニズムの理解を深めると共に、MBD を利用したメチル CpG 配列への転写活性化因子のリクルートによってエピジェネティックサイレンシングを受けるがん関連遺伝子の転写再活性化が可能かどうか検討することを目的とした。

## 方法、結果

我々は、まず、MBD4 の転写抑制メカニズムを理解するため、ヒト MBD4 の全長 cDNA を bait とし、マウス 9 日胚 cDNA ライブラリーを用いて酵母ツーハイブリッドスクリーニングをおこない、相互作用蛋白として RFP (Ret finger protein) を同定した (発表論文 1 参照)。免疫沈降法、GST プルダウンアッセイにより MBD4 と RFP が直接、相互作用することを確認した後、酵母ツーハイブリッドアッセイにより MBD4 および RFP の相互作用領域を決定した。MBD4 では DNA ミスマッチ修復蛋白 MLH1 との相互作用領域 (413 ~454 アミノ酸残基) およびグリコシラーゼ活性ドメイン (455~580 アミノ酸残基) からなる C 末の 413~580 アミノ酸残基が RFP との相互作用領域として同定された。また、この領域は、一部、MBD4 の転写抑制活性ドメインと重なる (重複領域は 413~454 アミノ酸残基)。一方、RFP の相互作用領域は、128 ~317 アミノ酸残基であり、蛋白-蛋白相互作用に關与する coiled-coil ドメインに相当する。

RFP が EPC1 (Enhancer of Polycomb 1) や Mi-2 $\beta$  と相互作用し、転写抑制に關与するという報告は、MBD4-RFP 相互作用の意味を探る重要な手がかりになると考えられる。MBD4 転写抑制過程における RFP の役割を明らかにするため、CHO-K1 (チャイニーズハムスター卵巣細胞株) を用い、RFP のメチル化プロモーター活性に及ぼす影響について解析した。その結果、RFP は *CDKN2A* および *MLH1* メチル化プロモーターどちらを用いた場合でも MBD4 依存性の転写抑制活性を増強することが明らかとなった。RFP が Mi-2/NuRD 複合体の成分である Mi-2 $\beta$  と相互作用するという事実は、MBD4 が RFP を介して MBD2、MBD3、HDAC1、HDAC2、MTA1、MTA2、MTA3、RBBP4、RBBP7 など他の Mi-2/NuRD 複合体構成成分と相互作用する可能性を示す。そのため、我々は、RFP と MBD2、MBD3 の相互作用を免疫沈降法によって解析した。FLAG タグを付加した MBD2、MBD3 は、V5 タグを付加した RFP と免疫沈降

することから、これらの蛋白が細胞内で複合体を形成することが明らかとなった。

MBD2、MBD3はMeCP1の構成成分であり、RFPと相互作用することから、RFPがMBD4と同様にMBD2依存性の転写抑制活性を増強する可能性が考えられた。これを確かめるため、RFPとMBD2を同時に発現させた時、*CDKN2A* および *MLH1* メチル化プロモーターからの転写にどのような変化が見られるのか検討した。その結果、MBD4の場合と同様、RFPがMBD2依存性の転写抑制活性をわずかではあるが、増強することが明らかとなった。

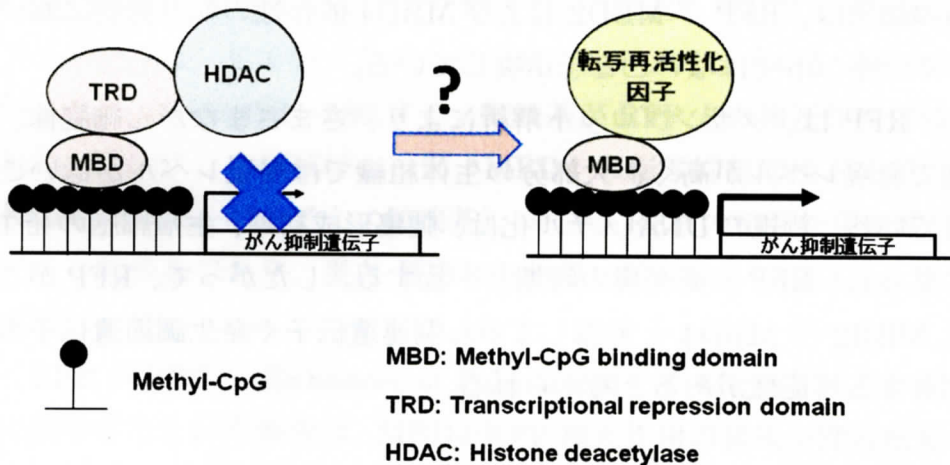
RFPが*CDKN2A*および*MLH1*メチル化プロモーターの転写抑制において必須なコンポーネントであるのかどうか検討するため、siRNAを用いてRFPのノックダウンをおこなった。RFP siRNA処理によりCHO-K1細胞のRFP蛋白レベルは約80%減少したが、*CDKN2A* および *MLH1* メチル化プロモーターの転写抑制活性はsiRNA処理の有無でほとんど変化が見られなかった。これらの結果は、RFPがMBD2およびMBD4依存性の転写抑制において必須なコンポーネントではないことを示唆している。

RFPは、ノザンブロット解析により、さまざまながん細胞株、精巢、胚細胞で発現レベルが高く、大部分の生体組織では発現レベルが低いことが報告されている。新規のDNAメチル化は、腫瘍形成初期、生殖細胞の発生、初期発生に見られ、RFPの高発現の時期と一致する。したがって、RFPがこれらの時期にMBD2やMBD4と協調してがん関連遺伝子や発生調節遺伝子の転写制御に関与する可能性があると考えられる。

がん関連遺伝子のエピジェネティックサイレンシングでは一般にプロモーター領域の高度DNAメチル化と特異的なヒストン修飾が観察される。DNA脱メチル化剤アザシチジン (Aza-C) やアザデオキシシチジン (Aza-CdR) は、DNMT (DNAメチル基転移酵素) 活性を阻害し、抑制されたがん関連遺伝子の転写再活性化を促進する。そのため、DNA脱メチル化剤は、米国では現在、様々ながんに対する治療薬として臨床試験が行われているばかりでなく、実際、悪性リンパ腫の治療薬として使用されている。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) は、単独ではエピジェネティックサイレンシングを受けるがん関連遺伝子の転写再活性化能を示さないが、Aza-CあるいはAza-CdRとの併用によって、Aza-CあるいはAza-CdR単独で使用した場合に

比べ、転写再活性化を促進することが知られている。このことは、がん関連遺伝子のエピジェネティックサイレンシングでは DNA メチル化が大きな影響力をもつが、ヒストンのアセチル化などヒストン修飾もある程度、関与することを示している。

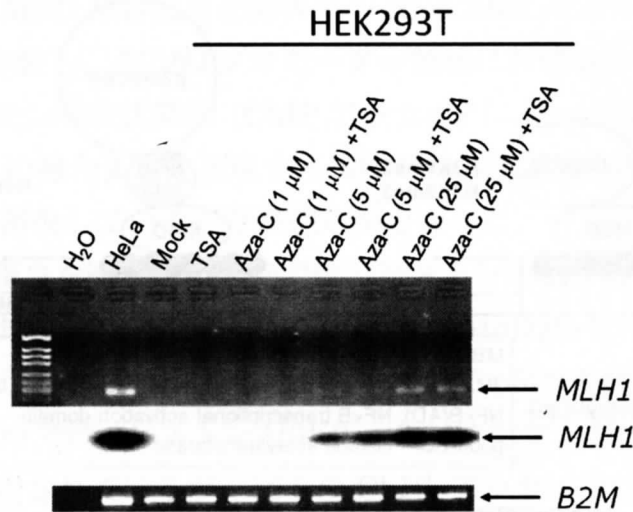
MBD 蛋白ファミリーには MBD (メチル CpG 結合ドメイン) と呼ばれる進化的に保存された塩基性残基に富む約 70 アミノ酸残基のドメインがある (2)。MBD3 以外の MBD 蛋白は、MBD 単独でメチル CpG 配列に特異的に結合する活性を有する。我々は、MBD2 の MBD と転写活性化因子の融合遺伝子を作製し、がん細胞へ導入することによりエピジェネティックサイレンシングを受けるがん関連遺伝子の転写再活性化を試みた。これは、メチル CpG 配列にリクルートされた転写活性化因子がメチル CpG 配列近傍のクロマチンリモデリングやヒストン修飾変化を引き起こし、結果として、がん関連遺伝子の転写再活性化を引き起こす可能性があると考えたからである (図 1)。



**図 1. メチルCpG配列を標的とするがん抑制遺伝子の転写再活性化**

メチルCpG結合ドメイン(MBD)蛋白にはTRD(転写抑制ドメイン)が存在し、HDAC(ヒストン脱アセチル化酵素)をリクルートすることによってがん抑制遺伝子の転写を抑制する。MBDに転写活性化因子を結合させることによってがん抑制遺伝子の転写を再活性化することが可能か？

まず、はじめに、エピジェネティックサイレンシングにより転写抑制された DNA 修復遺伝子 *MLH1* をもつヒト胎児腎細胞株 HEK293T において Aza-C と TSA がどのような効果をもつか検討した (図 2)。その結果、5 $\mu$ M の Aza-C を添加することによって *MLH1* の転写が再活性化し、25 $\mu$ M ではさらに転写再活性化能の増強が見られた。しかしながら、一般に言われるように、HEK293T 細胞での *MLH1* 転写再活性化に関し、HDAC 阻害剤である TSA の Aza-C との相乗効果は観察されなかった。



**図2. アザシチジン(Aza-C)によるMLH1遺伝子の転写再活性化**

ヒト胎児腎細胞株HEK293Tでは、エピジェネティックサイレンシングによりDNA修復遺伝子 *MLH1* の転写が抑制されている。Aza-Cの濃度を5 $\mu$ M に上げると*MLH1*の転写再活性化が観察される。トリコスタチンA(TSA、300nM)の効果はあまり大きくない。*MLH1*の発現はRT-PCR産物のアガロースゲル電気泳動とインターナルオリゴによるサザンハイブリダイゼーションによって解析された。コントロールとして $\beta$ 2ミクログロブリン(B2M)のRT-PCRの結果を示す。

McGarvey らは、大腸がん細胞株 RKO を用い、Aza-CdR 処理によって *MLH1* 遺伝子が転写再活性化した時のヒストン修飾変化について報告している(3)。RKO 細胞では、Aza-CdR 処理により *MLH1* プロモーター領域における DNA メチル化の消失に加え、ネガティブマーカーであるヒストン H3K9me1、H3K9me2 が消失し、ポジティブマーカーであるヒストン H3K4me2、H3K9ac、H3K14ac が増加する。しかしながら、ネガティブマーカーであるヒストン H3K9me3、H3K27me2、H3K27me3 は消失しないため、Aza-CdR 処理による転写再活性化では正常と比べ転写レベルが低い可能性を指摘している。本研究では、ネガティブマーカーであるヒストン H3K9me2、H3K9me3 を特異的に除去すると考えられるヒストン脱メチル化酵素 JMJD2D およびポジティブマーカーであるヒストンアセチル化を促進すると考えられる NF $\kappa$ B 転写活性化ドメイン(NF $\kappa$ B(AD))を MBD に繋ぎ、その効果を観察することにした(図3)。

我々は、まず、FLAG タグに NF $\kappa$ B(AD)、JMJD2D、JMJD2D-NF $\kappa$ B(AD)を繋いだ DNA コンストラクトとこれらにさらに MBD を繋いだ DNA コンストラクト、計7つを作製し、HEK293T 細胞に導入した(図4A)。ウエスタン法により各融合蛋白のサイズを確認した(図4B)後、それぞれのトランスフェクション細胞から RNA を抽出し、*MLH1* 遺伝子の RT-PCR 法による発現解析をおこなった(図4C)。興味深いことに、MBD を含まない DNA



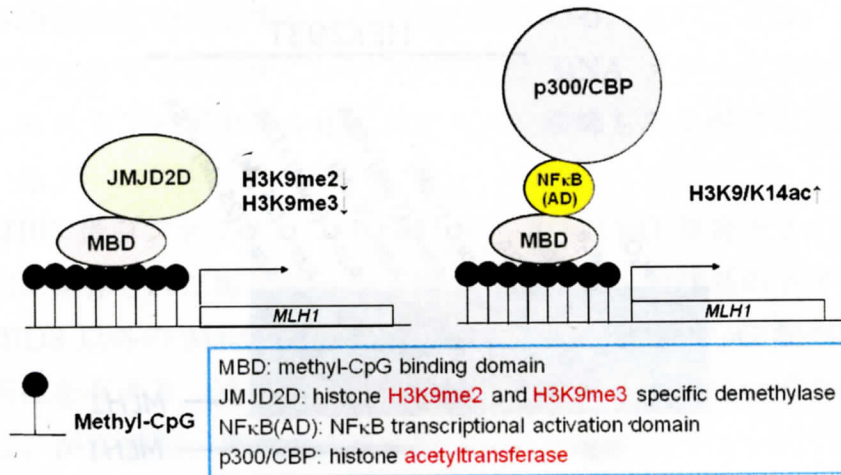


図3. メチルCpG配列を標的とするヒストン修飾因子のリクルート

MBDにヒストンH3K9me2、H3K9me3に特異的な脱メチル化酵素、JMJD2Dあるいは、ヒストンアセチル基転移酵素p300/CBPをリクルートすると考えられるNFκB(AD)を繋ぎ、*MLH1*の転写再活性化を検討した。

コンストラクトをトランスフェクションした場合、*MLH1* 遺伝子の再活性化はまったく観察されなかった。しかしながら、NFκB(AD)-MBD および MBD-JMJD2D-NFκB(AD)をトランスフェクションした HEK293T 細胞では、*MLH1* 遺伝子の転写再活性化が見られた。尚、MBD を NFκB(AD)の N 末に結合した DNA コンストラクトも作製し、同様の実験をおこなったが、HEK293T 細胞内で MBD と NFκB(AD)の結合領域付近で融合蛋白が切断されるため、NFκB(AD)の効果を見る事ができなかった。したがって、本コンストラクトのみ MBD を NFκB(AD)の C 末側に結合させた。

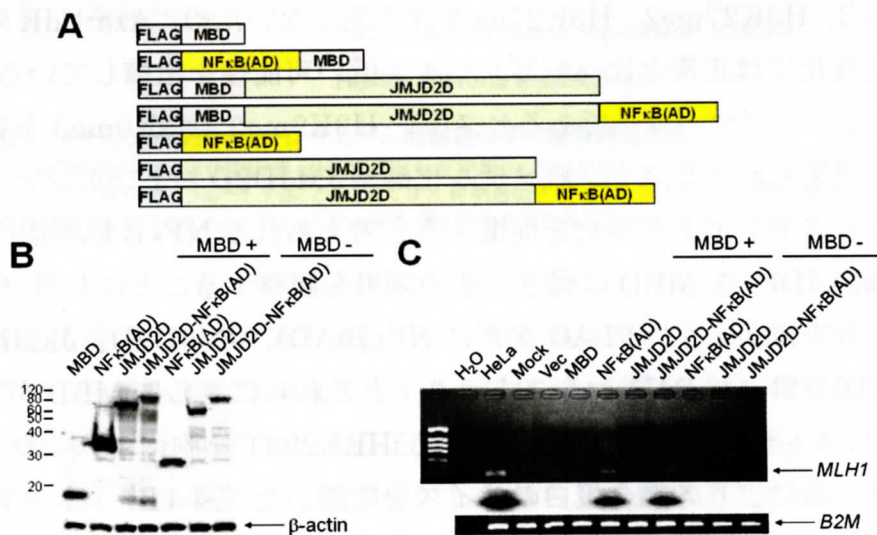


図4. NFκB(AD)によるMBD依存的な*MLH1*の転写再活性化

AはHEK293Tに導入したDNAコンストラクトの模式図を示す。Bはそれぞれの融合蛋白のウェスタン法による解析結果、Cは各トランスフェクションサンプルのRT-PCRの結果を示す。

次に、各 MBD 融合蛋白を発現する HEK293T のステーブル細胞株を G418 選択により作製し、*MLH1* プロモーター領域におけるヒストン修飾の変化についてクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) によって解析した (図 5)。MBD と JMJD2D の融合蛋白を発現する細胞では、JMJD2D の活性によりヒストン H3K9me3 が消失していることが明らかとなった。一方、MBD と NFκB(AD) の融合蛋白を発現する細胞では、ヒストン H3K9/K14 アセチル化の増加が見られる。また、NFκB(AD)-MBD、MBD-JMJD2D-NFκB(AD) を発現する細胞では、NFκB(AD) に相互作用すると考えられる p300 の結合も観察された。JMJD2D は *in vitro* では、ヒストン H3K9me3 だけでなく H3K9me2 も除去する活性があると報告されているが、図 5 の ChIP アッセイでは H3K9me2 の除去は見られないことから、*in vivo* では、活性があるとしてもかなり弱いことが示唆された。

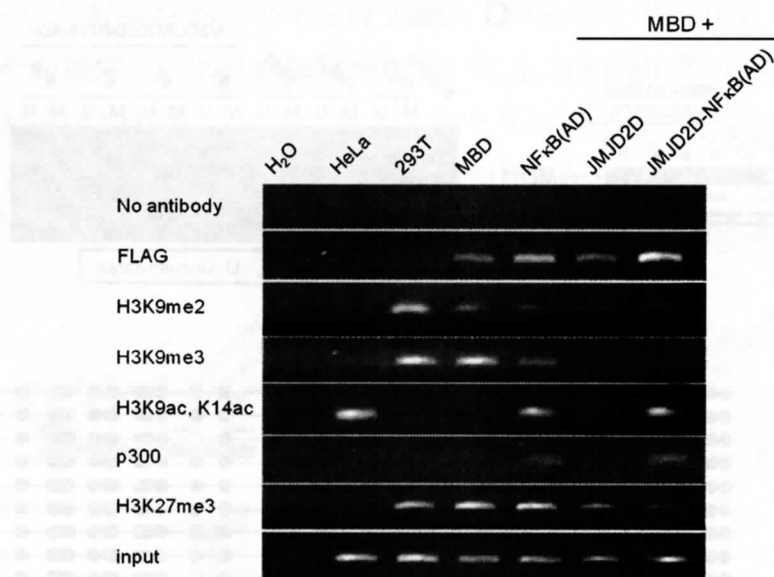
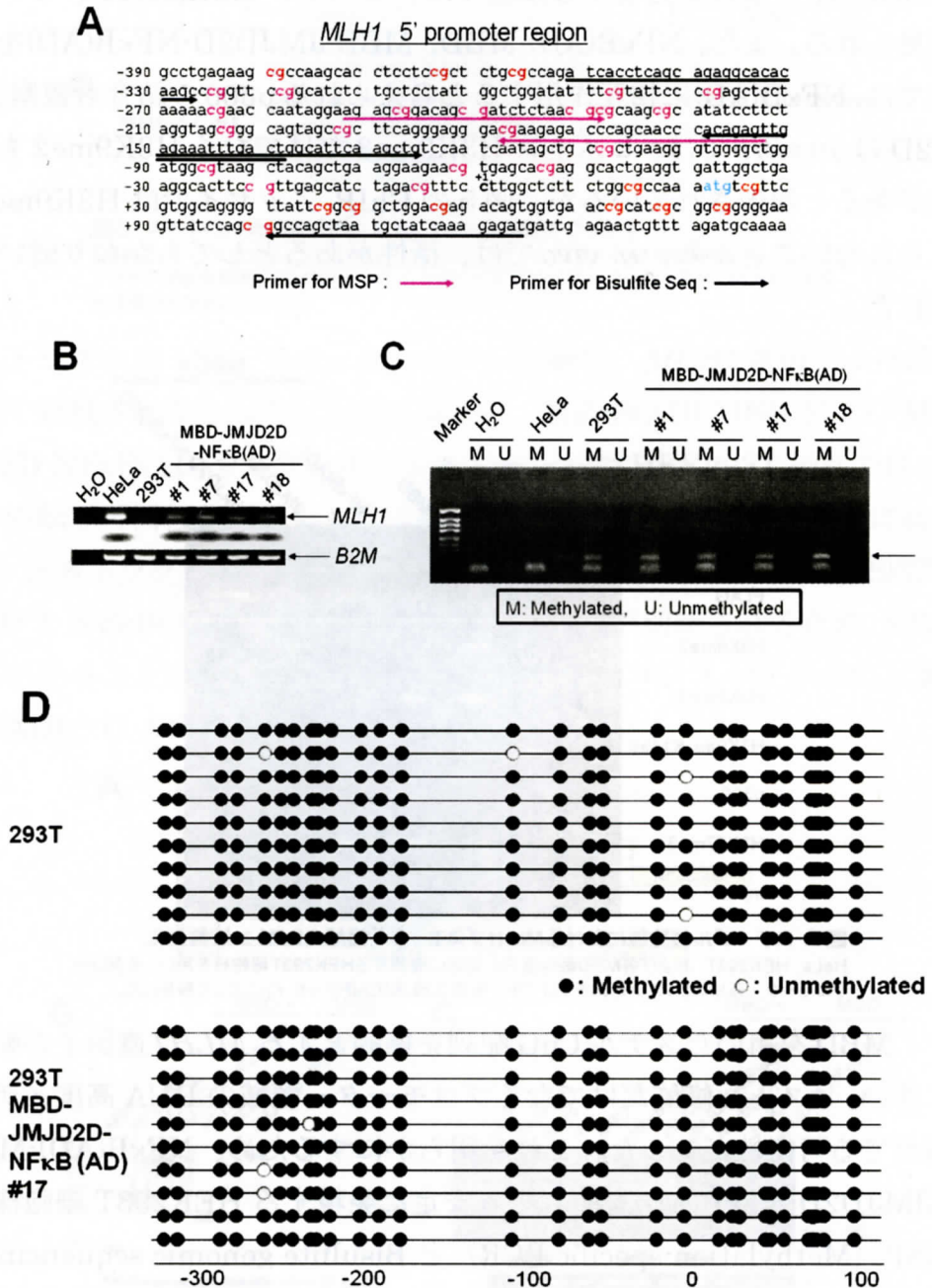


図5. ステーブル細胞株における*MLH1*プロモーター領域のヒストン修飾変化  
HeLa, HEK293T, および各MBD融合蛋白を安定に発現するHEK293T細胞株を用い、各*MLH1*プロモーター領域のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法(ChIPアッセイ)によって解析した。

MBD を用いたメチル CpG 配列を標的とする *MLH1* 遺伝子の転写再活性化に伴い、ヒストン修飾だけでなくプロモーター領域の DNA 高度メチル化にも影響がでる可能性があった。これを明らかにするため、NFκB(AD)-MBD と MBD-JMJD2D-NFκB(AD) をそれぞれ安定に発現する HEK293T 細胞株を作製し、MSP (Methylation-specific PCR) と Bisulfite genomic sequencing によって *MLH1* プロモーター領域の解析をおこなった (図 6)。まず、G418 選択により、MBD-JMJD2D-NFκB(AD) ステーブル細胞株を作製し、その中の 4 つ (#1、

#7、#17、#18) について *MLH1* の RT-PCR (図 6 B) と MSP (図 6 C) をおこなった。その結果、4つの細胞株すべてで *MLH1* の転写再活性化とプロモーター領域のメチル化が確認された。さらに、MBD-JMJD2D-NFκB(AD)#17については、Bisulfite genomic sequencing (図 6 D) により詳細なプロモーター領域のメチル化解析をおこなったが、親株の HEK293T 細胞と同様、ほとんどす



**図6. メチルCpG配列を標的とする転写再活性化におけるDNAメチル化への影響**  
 Aは*MLH1*プロモーター領域の塩基配列を示す。MBD-JMJD2D-NFκB(AD)の4つのステーブル細胞株についてRT-PCR解析(B)とMSP解析(C)をおこなった。また、Dでは親株のHEK293TとMBD-JMJD2D-NFκB(AD)のステーブル細胞株#17についてbisulfite genomic sequencingによる解析もおこなった。

すべての CpG 配列でメチル化されていることが明らかとなった。また、図6では MBD-JMJ2D-NFκB(AD) スターブル細胞株の結果を示すが、NFκB(AD)-MBD スターブル細胞株でも同様に、*MLH1* プロモーター領域は、高度にメチル化されたままであった。

HEK293T 細胞に NFκB(AD) を MBD に繋いだ形で DNA トランスフェクションすると、*MLH1* 遺伝子の転写が再活性化するが、これが HEK293T 細胞あるいは、*MLH1* 遺伝子に特異的な現象なのか、それとも一般的な現象なのか明らかにするため、さらなる解析をおこなった。AN3CA 子宮内膜癌細胞株は、HEK293T 細胞と同様に、エピジェネティックサイレンシングにより *MLH1* 遺伝子の転写抑制が見られる。また、前立腺癌細胞株 LNCaP では、解毒作用に関係する *GSTP1* 遺伝子のエピジェネティックサイレンシングが見られる。我々は、AN3CA および LNCaP 細胞に MBD を含む DNA コンストラクトをトランスフェクションし、*MLH1* および *GSTP1* 遺伝子の発現を RT-PCR により確認した (図7)。その結果、いずれの細胞株においても HEK293T 細胞の場合と同様に NFκB(AD) を含む DNA コンストラクトをトランスフェクションした場合のみ、*MLH1*、*GSTP1* 遺伝子の転写が再活性化することを見出した。

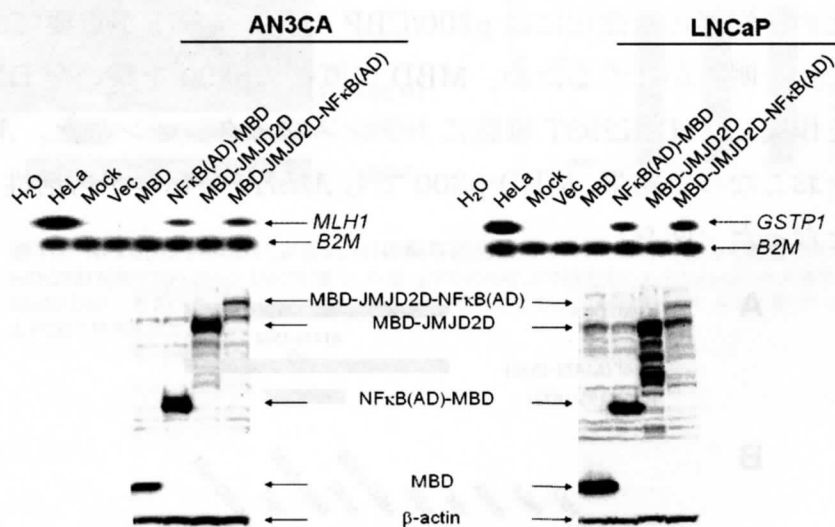


図7. *MLH1*、*GSTP1* 遺伝子のメチルCpG配列を標的とする転写再活性化  
AN3CAおよびLNCaP細胞にMBDを含むDNAコンストラクトを導入し、RT-PCRにより*MLH1*および  
*GSTP1*遺伝子の転写再活性化を解析した。下図はウエスタン法で融合蛋白を確認した結果を示す。

我々は、さらに、Lu65 肺癌細胞株に NFκB(AD)-MBD をトランスフェクションし、8種のがん関連遺伝子 (*GATA4*, *RASSF1A*, *DAPK1*, *TIMP3*, *CDH1*, *MGMT*, *RARβ2*, *CRBP1*) についてそれらの転写再活性化の有無を RT-PCR で解析した (図8)。発現の程度に差はあるものの、8種類すべての遺



伝子で転写再活性化が観察された。図7および図8の結果は、NFκB(AD)-MBDによるがん関連遺伝子の転写再活性化は一般的な現象であることを示唆する。

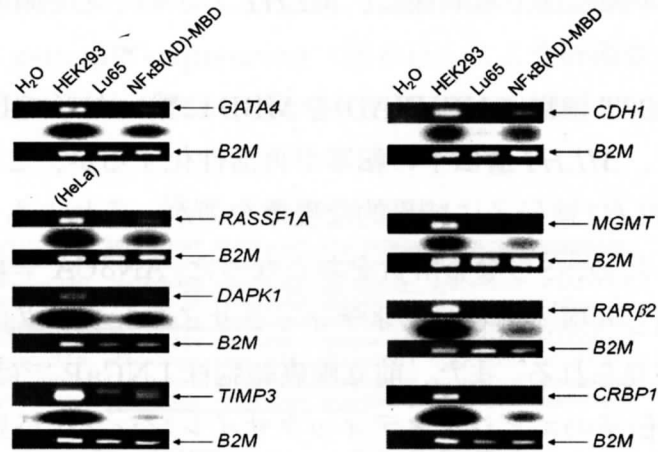


図8. Lu65肺癌細胞におけるメチルCpG配列を標的とするがん関連遺伝子の転写再活性化  
Lu65細胞にNFκB(AD)-MBDを導入し、RT-PCR法により8種のがん関連遺伝子の転写再活性化を解析した。

我々は、次に、NFκB(AD)がどのようにしてエピジェネティックサイレンシングを受けるがん関連遺伝子の転写を再活性化するのかについて解析をおこなった。図3に示すように、NFκB(AD)は、p300/CBPと相互作用することが知られるため、転写再活性化にはp300/CBPのリクルートが重要であると考えられた。これを明らかにするため、MBDに直接、p300を繋いだDNAコンストラクトを作製し、HEK293T細胞にトランスフェクションした。*MLH1*のRT-PCRをおこなった結果、MBD-p300でも*MLH1*の転写が再活性化することが明らかとなった(図9)。

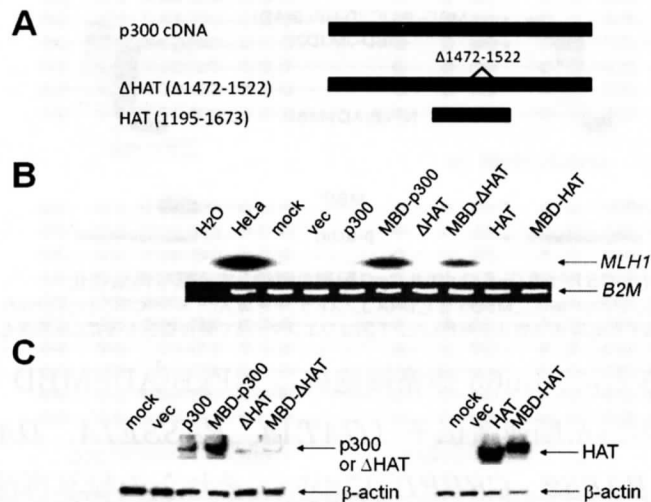


図9. *MLH1*の転写再活性化にp300のHAT活性は必要ない

HEK293T細胞にp300全長cDNA、HAT domain(1195-1673)、 $\Delta$ HAT( $\Delta$ 1472-1522)をMBDの有無と共に導入し、RT-PCR法によって*MLH1*遺伝子の転写再活性化を解析した(B)。Cはウエスタン法によって解析された各生成蛋白を示す。

さらに、p300 の HAT 活性が *MLH1* 遺伝子の転写再活性化に必須かどうかを明らかにするため、HAT 活性を欠く変異体  $\Delta$ HAT (p300 の 1472~1522 番目のアミノ酸残基を欠失させた変異体) と HAT ドメイン (p300 の 1195~1673 番目のアミノ酸残基) を MBD に繋ぎ、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。RT-PCR 法による解析の結果、 $\Delta$ HAT には *MLH1* を転写再活性化する能力があるが、HAT ドメインにはこの能力がないことが明らかとなった。また、この結果は、p300/CBP の HAT 活性に特異的に作用する阻害剤、Curcumin を用いた実験でも支持された (図 10)。HEK293T 細胞に MBD-p300、あるいは、NF $\kappa$ B(AD)-MBD をトランスフェクションした後、Curcumin を終濃度 50 $\mu$ M あるいは 100 $\mu$ M になるように投与しても *MLH1* の転写再活性化にはほとんど影響が見られなかった。これらの結果から、p300 の *MLH1* 転写再活性化に関与するドメインは、HAT ドメイン以外の領域に存在することが強く示唆された。

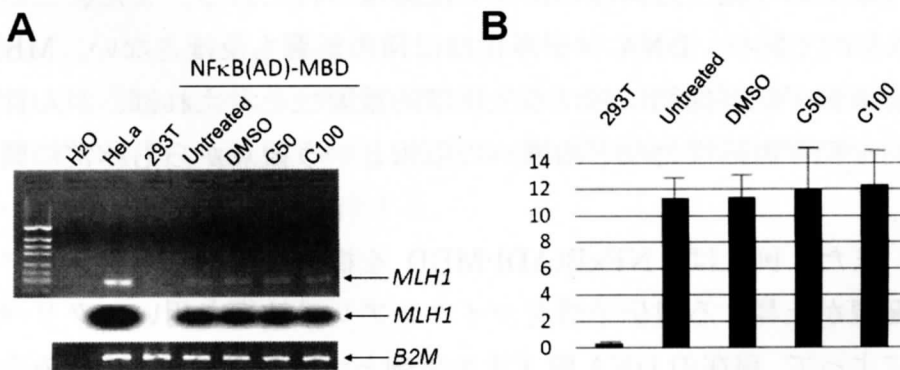


図10. NF $\kappa$ B(AD)-MBDによる*MLH1*の転写再活性化はCurcuminによって阻害されない  
HEK293T細胞にNF $\kappa$ B(AD)-MBDを導入した後、p300のHAT活性阻害剤であるCurcuminを終濃度  
50 $\mu$ M(C50)、あるいは、100 $\mu$ M(C100)になるように培地に添加した。AはRT-PCR、Bは定量リアルタイム  
PCRの結果を示す。

## 考察

本研究では、メチル CpG 結合ドメイン (MBD) 蛋白 MBD2、MBD4 の転写抑制に新たな因子、RFP が関与することを見出した。MBD2、MBD4 は、MBD 蛋白の中でも高度メチル化 CpG 配列に結合することが明らかとなっている。また、HDAC1、Sin3A などのコリプレッサーをリクルートすることによって、ヒストンの脱アセチル化を促し、転写を抑制する。がん関連遺伝子 *CDKN2A*、*MLH1* のメチル化プロモーターに MBD2、MBD4 が特異的に結合するという事

実は、MBD2、MBD4 がこれらの遺伝子の転写抑制になんらかの形で関与していることを強く示唆する。また、MBD4 とその相互作用蛋白 RFP の結合は、転写抑制活性を増強することから、RFP が高レベルで発現する精子形成、胚発生、腫瘍形成などの時期でメチル CpG 配列を介した転写抑制において重要な働きをしている可能性が示唆される。

MBD 蛋白の中でメチル CpG 配列への特異的な結合に関与する MBD に転写活性化因子を結合させることによってプロモーター領域の高度メチル化により転写抑制されたがん関連遺伝子を再活性化できる。転写活性化因子として本研究では p300 にその活性があること、また、HAT 活性は必要ないことを見出したが、MLH1 の転写再活性化に必要な領域を特定するまでには至らなかった。p300 には N 末と C 末の 2 箇所転写活性化ドメインがあり、多くの転写因子が結合する。どちらの領域が転写再活性化に重要なのか、転写再活性化に必要な最終的な因子は何なのか大いに興味を持たれる。また、この反応は、MBD 依存的であり、DNA メチル化には何の影響も及ぼさない。MBD 蛋白のがん関連遺伝子転写抑制における生物学的重要性を考えれば、がん抑制遺伝子に特異的な転写再活性化など治療への応用という観点からも非常に興味を持たれる。

また、例えば、NFκB(AD)-MBD を様々な細胞にトランスフェクションし、発現が上昇する遺伝子群をマイクロアレイ技術を用いスクリーニングすることによって、現在の DNA 脱メチル化剤とマイクロアレイの組み合わせによるスクリーニングに比べ、高率に高度メチル化 CpG 配列をもつ転写抑制遺伝子群の探索が可能となる可能性が高い。また、これらスクリーニングされた遺伝子群は実際、MBD 蛋白によって制御されている可能性が高いことから、MBD 蛋白の機能を知る上でも重要である。本研究では、MBD2 の MBD を用いているが、他の MBD 蛋白の MBD を用いることによって、各がん関連遺伝子の転写再活性化がどのように変化するのか興味を持たれる。がん細胞、ES 細胞などへ本方法を適用し、これまでの DNA 脱メチル化剤での解析結果と比較することによって新たな知見が期待される。

さらに、重要なのは、MBD によってメチル CpG 配列周辺のヒストン修飾に変化を引き起こすことが可能な点である。ヒストン H3K9me3 に特異的な脱メチル化酵素 JMJD2D によって、図 5 の ChIP アッセイに見られるように MLH1 遺伝子のプロモーター領域において H3K9me3 の脱メチル化が観察され

る。これらのヒストン修飾の変化がそれぞれの遺伝子の転写にどのように作用するのか、ロックダウン技術などとも組み合わせながら解析していくことが今後、益々重要となってくるであろう。

## まとめ

本研究では MBD 蛋白の機能を探るため、2つの方法を使用した。1つは、MBD 蛋白の相互作用蛋白の解析から転写抑制に関わる MBD 蛋白ネットワークを探っていく方法であり、2つ目は、MBD 蛋白中のメチル CpG 配列に結合するドメインを利用し、ゲノム中の結合部位を転写活性を指標にして解析していくという方法である。相互作用蛋白の解析から、MBD 蛋白どうしの相互作用や転写抑制における複雑な蛋白-蛋白ネットワークの存在が明らかになってきた。また、MBD を用いたがん関連遺伝子の転写再活性化が可能になったことから、MBD によって制御される遺伝子群の網羅的な解析が可能になると考えられる。これらの解析を通じて MBD 蛋白によるがん関連遺伝子の転写抑制機構がさらに詳細に解析され、将来的に特定のがん関連遺伝子を標的とする転写再活性化への道が開けることを期待する。

## 参考文献

1. Kondo, E., Gu, Z., Horii, A., and Fukushige, S. The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated *p16<sup>INK4a</sup>* and *hMLH1* genes. *Mol. Cell. Biol.* 25:4388-4396, 2005.
2. Ballestar, E., and Wolffe A. P. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem.* 268:1-6, 2001.
3. McGarvey, K. M., Fahrner, J. A., Greene, E., Martens, J., Jenewein, T., and Baylin, S. B. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res.* 66: 3542-3549, 2006.



本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。