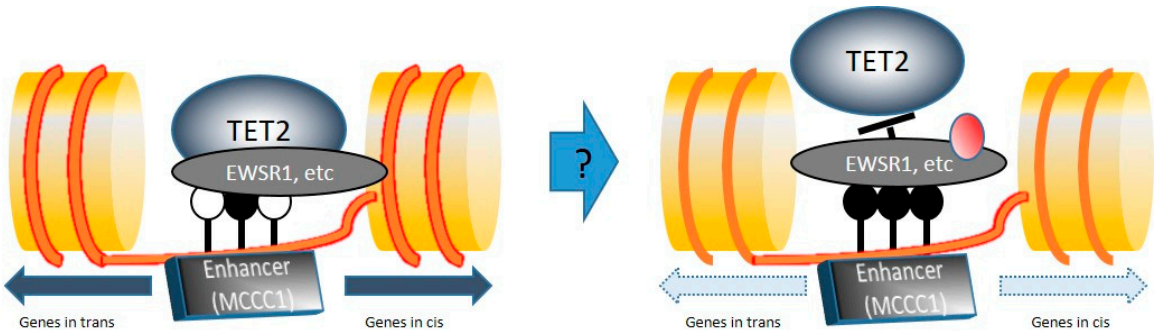
182　TET2が司るDNA脱メチル化メカニズムの解明	山崎　淳平

【目的】DNA メチル化は、近傍遺伝子発現の低下と相関し、生物学的に重要な機構である。DNA 脱メチル化を担う酵素として TET ファミリーが同定されたが、このうち TET2 がどのようにエンハンサー領域特異的に DNA メチル化の恒常性を維持しているかは不明である。そこで、TET2 をリクルートする因子による領域特異性の存在という仮説を立て、TET2 の影響が顕著であるエンハンサー領域特異的 TET2 結合因子の同定を突破口として DNA 脱メチル化の制御メカニズムを解明し、変異による腫瘍化メカニズムおよび真の TET2 の生物学的重要性を解明することを目的とした。
【方法】K562 への TET2 の発現導入にて TET2 結合因子群を得た。TET2 結合因子を含む沈降物を nanoLC-MS／MS 解析に供した。同定された *EWSR1*、*PAPBC1*、*PFPR36*、*ILF3* 遺伝子を K562 に発現導入した。発現導入後クロマチン免疫沈降を行い、2 つの tet2-DMCs 領域に対するエンリッチメントを解析した。*EWSR1* 遺伝子発現干渉を K562 用いて行い、細胞増殖能を検討した。
【結果】K562 への TET2 過剰発現により、約 200 KDa の TET2 タンパクが検出された。可溶性タンパク質液に対し、抗 FLAG 抗体にて免疫沈降を行い nanoLC-MS／MS 解析に供したところ、EWSR1、PAPBC1、PFPR36、ILF3 タンパクなどが同定された。これら候補タンパクに対するクロマチン免疫沈降を行い、tet2-DMCs 領域への結合を検討したところ、EWSR1 を過剰発現させた場合に、MTSS1 近傍の tet2-DMCs 領域における EWSR1 のエンリッチメントが認められ、EWSR1 がこの領域に存在することが示唆された。一方、MCCC1 領域における EWSR1 結合や GAPDH を用いたプロモーターへの EWSR1 の結合は認められなかった。またその他の候補タンパクを過剰発現させた場合には、MTSS1、MCCC1 領域への結合が認められなかった。EWSR1 の発現を siRNA により発現抑制を誘導したところ、本細胞の細胞増殖の増加に顕著な変化は認められなかった。

TET2 のエンハンサーにおける特異的 DNA 脱メチル化メカニズム



182. TET2 が司る DNA 脱メチル化メカニズムの解明

山崎　淳平

*北海道大学 大学院獣医学研究院 動物分子医学教室

Key words：エピジェネティクス，DNA メチル化，TET2，エンハンサー

緒　言

ゲノム配列における CpG 配列のシトシンへのメチル基転移の修飾である DNA メチル化は、近傍遺伝子発現の低下と相関し、生物学的に重要な機構である。DNA 脱メチル化を担う酵素として TET ファミリーが同定され［1］、5-メチルシトシン（5-mc）を 5-ヒドロキシシトシン（5-hmc）に変換させることにより脱メチル化機能に関わっていることが解明された。興味深いことに、このうち *TET2* 遺伝子は血液系腫瘍において高頻度に変異が認められるが［2］、*TET2* の異常による DNA メチル化への影響と腫瘍との関連は不明であった。我々はこれまで、*TET2* 遺伝子変異における DNA メチル化の影響とその白血病発生に関わる機序についての研究を行い、*TET2* 特異的メチル化 CpG サイト、tet2-DMCs を同定し、これらがエンハンサー部位に多く存在することを示した［3］。

ところが、どのように TET2 がエンハンサー領域特異的に DNA メチル化の恒常性を維持しているかは不明であるが、我々はさらに「*TET2* 遺伝子の変異の有無よりも、tet2-DMCs の DNA メチル化レベルが症例の予後に関連がある」ことを示し、「TET2 関連経路に関わる他の因子」が鍵である可能性が示唆された［4］。事実 TET2 は DNA 結合領域を持たないため、TET2 をリクルートする因子による領域特異性の存在という仮説を立て、TET2 の影響が顕著であるエンハンサー領域特異的 TET2 結合因子の同定を突破口として DNA 脱メチル化の制御メカニズムを解明し、難治性血液疾患における腫瘍化メカニズムおよび真の TET2 の生物学的重要性を解明することを目的とした。

方　法

1.　新規 TET2 結合因子の同定

CSII-CMV-EKS-FLAG ベクターを用いた TET2 の発現導入を In-Fusion HD Cloning kit （Clontech-Takara）、TET2 発現が確認されている血液系細胞株である K562 への感染を Retronectin （Takara）を用いて行った。この細胞由来タンパクを用いて FLAG 抗体によるプルダウンにて TET2 および結合因子群を得た。得られた沈降物を SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色を行った後、バンドを切り出して nanoLC-MS／MS 解析（富士フィルム和光純薬）に供した。同定された各タンパク質に対する抗体はコスモ・バイオより購入し、ウェスタンブロットに使用した。

2.　新規 TET2 結合因子の tet2-DMCs における存在

新規 TET2 結合因子（EWSR1、PAPBC1、PFPR36、ILF3）に特異的な ChIP 解析を行うため、pAM ベクター（Active Motif）を用いた。各遺伝子のこのベクターへのクローニングを Lipofectamine2000 （Invitrogen）を用いて K562 に発現導入した。発現導入後 48 時間の細胞をホルムアルデヒドを用いて固定、細胞溶解後に ChIP-IT Express Enzymatic（Active Motif）を用いてクロマチンを精製、抗 AM タグに対する抗体（Active Motif）およびマウス IgG 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降産物に対して、我々が以前報告した 5hmc の低下が認められた 2 つの tet2-DMCs 領域に対するリアルタイム PCR を行いエンリッチメントを解析した。

3.　エンハンサー領域特異的 TET2 結合因子の重要性の検討

EWSR1 に対する siRNA による遺伝子発現干渉を、K562 用いて行い、細胞増殖能を検討した。またこの細胞のゲノムワイドな DNA メチル化の変化を捉えるため、DREAM［5］を用いて検討を行った。

*現在の所属：北海道大学 大学院獣医学研究院 附属動物病院 トランスレーショナルリサーチ推進室

結　果

1. 新規 TET2 結合因子の同定

まず、TET2 タンパクの過剰発現を行うために、ヒト *TET2* 遺伝子完全長配列のクローニングを試みた。K562 細胞より mRNA を抽出、cDNA を合成後 *TET2* の全長をカバーするようなプライマーを用いて PCR にて増幅したところ期待されるサイズのバンドが得られ、これをクローニングに用いた。この増幅産物を CSII-CMV-EKS-FLAG プラスミドに挿入し、CSII-CMV-TET2-EKS-FLAG ベクターを作製した。次に、上記ベクターおよびレンチウイルス由来 VSVG および *pol* 遺伝子ベクターの HEK293T 細胞への共トランスフェクションを行い、*TET2* 遺伝子が挿入されたウイルスベクターを作製した後、このウイルス液を用いて TET2 発現が確認されている血液系細胞株である K562 に感染を行い、その後に感染細胞の薬剤による選択を行った。選択後の細胞から可溶性タンパク質を抽出し、FLAG および TET2 タンパクに対する抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、約 200 KDa と TET2 タンパクの分子量とほぼ一致する部分にバンドが検出され、*TET2* 遺伝子の過剰発現が成功していると考えられた。また本感染細胞の増殖は非感染細胞と比べ差はなかった。

次に、TET2 と相互作用するタンパク質を検討するために、TET2 過剰発現細胞からの可溶性タンパク質液に対し、抗 FLAG 抗体にて免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルを SDS-PAGE による電気泳動を行ったところ、抗体由来のバンドと思われるものの他、複数のバンドが検出された（図 1）。このうち、TET2 タンパクと相互作用すると報告されている OGT（110 KDa）、IDAX（21 KDa）、WT1（49 KDa）などのタンパクとは異なる分子量の領域（60～80 KDa）に検出されたバンドを複数切り出し、nanoLC-MS／MS 解析に供した。MASCOT 検索による候補タンパクを絞り込んだところ、EWSR1、PAPBC1、PFPR36、ILF3 タンパクなどがハイスコアにて同定された（表 1）。

次に、同定されたタンパクそれぞれの抗体を用いて K562 細胞および TET2 過剰発現細胞、FLAG による免疫沈降サンプルに対してウェスタンブロットを行ったところ、それぞれ予想されるサイズのバンドが得られまた免疫沈降サンプルにおいても同様のバンドが得られることがわかった。なお、陰性コントロールとして K562 細胞ではない細胞にてプロモーターにおける TET2 との結合が確認されている PSPC1 についても同様の検討を行ったところ、発現が確認されたものの TET2 との結合を示唆するバンドは得られなかった。

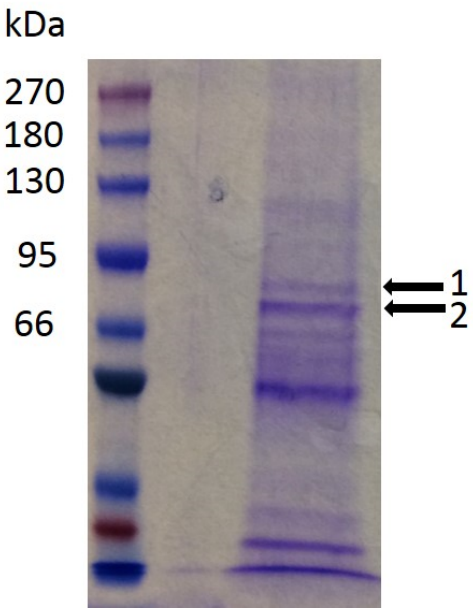


図 1. TET2 過剰発現細胞における FLAG 免疫沈降産物の SDS-PAGE 結果

TET2 過剰発現細胞の可溶性タンパク分画を抗 FLAG 抗体にて免疫沈降を行い、SDS-PAGE により分離、CBB 染色を行った。左は分子量マーカー（単位：KDa）。1 および 2 のバンドを切り出し後、nanoLC-MS／MS 解析に供した。

2. 新規 TET2 結合因子の tet2-DMCs における存在

次に TET2 と新規 TET2 結合因子の tet2-DMCs における存在を確認するために、これら新規 TET2 結合因子候補として浮かび上がった EWSR1、PAPBC1、PFPR36、ILF3 タンパク、ならびに TET2 との結合が K562 細胞において確認されなかった PSPC1 について ChIP 解析へと進めた。ChIP 解析においては、クロマチンの構造を保ったままの抗原性を認識できるような ChIP グレードの抗体の有無が重要である。今回の候補タンパクに対する ChIP グレードの抗体を入手することは可能ではなかったので、pAM ベクターを用いて AM タグをつけたタンパク質を発現させ、AM タグに対する抗体を用いることで問題を克服することとした。まず、pAM ベクターに目的の遺伝子（*EWSR1*、*PAPBC1*、*PFPR36*、*ILF3* および *PSPC1* と *TET2*）を挿入した。クローニング産物であるプラスミドを DNA 解析に供したところ目的の遺伝子の全長が AM タグの下流に挿入していることが確認された。*ILF3* はクローニングに成功しなかったため、残りの遺伝子について検討することとした。

K562 細胞に目的の遺伝子を挿入した pAM ベクターを K562 細胞へのトランスフェクションを行った。トランスフェクション後 48 時間にて細胞を回収、ホルムアルデヒド液によるクロスリンクを行った。細胞溶解後のクロマチンをミクロコッカスヌクレアーゼによってフラグメント化し、200 bp 毎の断片クロマチンを得た。このそれぞれのタンパクを過剰発現した細胞由来のクロマチンに対して、抗 AM タグ ChIP グレード抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。なおマウス IgG 抗体を非特異抗体として並行して用いた。エンハンサー領域へのこれら目的タンパクの結合を確認するために、我々による既報［3］で確認されている tet2-DMCs のうち、*MTSS1*、*MCCC1* 遺伝子近傍の tet2-DMCs 領域に対する特異的プライマーを設計、クロマチン免疫沈降後のサンプルをリアルタイム PCR による解析に供した。

その結果、EWSR1 を過剰発現させた場合に、*MTSS1* 近傍の tet2-DMCs 領域における EWSR1 のエンリッチメントが IgG コントロールに比べ約 1,000 倍認められ、EWSR1 がこの領域に存在することが示唆された（図 2）。なお、ネガティブコントロールとしての Mock トランスフェクション細胞においてはこの *MTSS1* 領域への EWSR1 の結合を示唆する結果は得られなかった。一方、*MCCC1* 領域における EWSR1 結合や GAPDH を用いたプロモーターへの EWSR1 の結合は認められなかった。またその他の候補タンパクを過剰発現させた場合には、*MTSS1*、*MCCC1* 領域への結合が認められなかった。

3. エンハンサー領域特異的 TET2 結合因子の重要性の検討

最後にエンハンサー領域特異的 TET2 結合因子の重要性の検討を行うため、EWSR1 の発現を siRNA（siEWSR1）を用いることで発現抑制を誘導し、細胞への影響と DNA でメチル化への影響を検討した。siEWSR1 によって、*EWSR1* の遺伝子発現量が約 50%に減少したものの、本細胞の細胞増殖の増加や細胞死の増加など顕著な変化は認められなかった。また、siEWSR1 による DNA メチル化への変化を検討するために、ゲノムワイドな DNA メチル化解析法である DREAM［5］を用いて検討を行ったところ、顕著な変化は認められなかった。

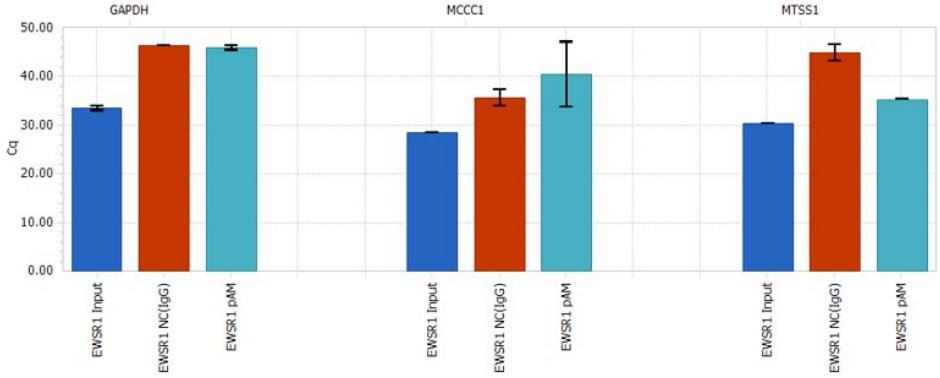


図 2. EWSR1 過剰発現後のクロマチン免疫沈降解析

pAM-EWSR1 を発現させて K562 細胞からクロマチンを精製、抗 AM 抗体にて免疫沈降を行った後、*GAPDH* プロモーター、*MCCC1* エンハンサー、*MTSS1* エンハンサー領域に対するエンリッチメントをリアルタイム PCR によって検討した。リアルタイム PCR による増幅の得られたサイクル (Cq) 値で示した。Input（青）を陽性対照、IgG（赤）を陰性対照に用いた。

Sample No.		Protein	gene	MW	Score	Peptide	Coverage
1	1	RNA-binding protein EWS	EWSR1 EWS	68,478	390	15	17
	2	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9 GRP75	73,680	192	12	21
	3	DnaJ homolog subfamily C member 10	DNAJC10 ERDJ5	86,136	151	12	18
	4	Protein transport protein Sec23B	SEC23B	86,479	114	6	10
	5	Pre-mRNA-processing factor 39	PRPF39	78,430	74	2	3
	6	X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5 G22P2	82,705	64	3	5
	7	ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1	82,432	63	5	8
	8	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1 HSP90B	83,264	59	4	7
	9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	HNRNPUL1 E1BAP5	95,739	54	5	9
	10	Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3 DRBF	95,338	44	4	4
2	1	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9 GRP75	73,680	805	47	52
	2	Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1 PAB1	70,671	120	9	15
	3	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8 HSC70	70,898	108	10	16

表 1. nanoLC-MS／MS 解析結果

TET2過剰発現細胞の可溶性タンパク分画を抗FLAG抗体にて免疫沈降を行い、SDS-PAGEにより分離、CBB染色を行った。図1における1および2のバンドそれぞれの結果を示す（Sample No.）。Protein、gene、MWはそれぞれ同定されたタンパク、遺伝子名および分子量を示す。Score、Peptide、CoverageはMASCOT Searchによる各タンパク質への適合性、ペプチド数、適合範囲の結果を示している。

考　察

今回行った一連の実験によって、これまで TET2 タンパクの相互作用因子として報告されていない EWSR1 がその候補としてあげることができた。EWSR1 はヒトのユーニング肉腫にて主にがん遺伝子として働くことがわかっており、また興味深いことに今回の対象疾患である白血病の一部のタイプにおいてもその変異による白血病化への関連が指摘されている。興味深いことに、EWSR1 以外にも RNA 関連タンパクである PAPBC1、PFPR36 などが同定された。最近では、enhancer RNA という、新たなノンコーディング RNA が存在することが報告され、TET タンパクのエンハンサーにおける機能に重要であることが示唆されている [6]。本研究では ChIP 解析による tet2-DMC への結合が認められなかったが、これは①細胞特異性、②他の tet2-DMC への結合、などが今後の検討課題として挙げられる。現在、HEK293 細胞など他の細胞における検討や、候補タンパク過剰発現の際の ChIP-seq 解析などを検討している。今後、本タンパク質に焦点をあて、TET2 との直接作用および腫瘍化への関与メカニズムを解明する予定である。

文　献

1) Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science. 2009 May 15;324(5929):930-5. doi: 10.1126/science.1170116. Epub 2009 Apr 16.

2) Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009 May 28;360(22):2289-301. doi: 10.1056/NEJMoa0810069.

3) Yamazaki J, Jelinek J, Lu Y, Cesaroni M, Madzo J, Neumann F, He R, Taby R, Vasanthakumar A, Macrae T, Ostler KR, Kantarjian HM, Liang S, Estecio MR, Godley LA, Issa JP. TET2 Mutations Affect Non-CpG Island DNA Methylation at Enhancers and Transcription Factor-Binding Sites in Chronic Myelomonocytic Leukemia. Cancer Res. 2015 Jul 15;75(14):2833-43. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0739. Epub 2015 May 13.

4) Yamazaki J, Taby R, Jelinek J, Raynal NJ, Cesaroni M, Pierce SA, Kornblau SM, Bueso-Ramos CE, Ravandi F, Kantarjian HM, Issa JP. Hypomethylation of TET2 Target Genes Identifies a Curable Subset of Acute Myeloid Leukemia. J Natl Cancer Inst. 2015 Nov 13;108(2). pii: djv323. doi: 10.1093/jnci/djv323.

5) Jelinek J, Lee JT, Cesaroni M, Madzo J, Liang S, Lu Y, Issa JJ. Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM). Methods Mol Biol. 2018;1708:247-265. doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8_13.

6) Pulakanti K, Pinello L, Stelloh C, Blinka S, Allred J, Milanovich S, Kiblawi S, Peterson J, Wang A, Yuan GC, Rao S. Enhancer transcribed RNAs arise from hypomethylated, Tet-occupied genomic regions. Epigenetics. 2013 Dec;8(12):1303-20. doi: 10.4161/epi.26597. Epub 2013 Oct 17.