

201313058A

厚生労働科学研究費補助金  
第3次対がん総合戦略 研究事業  
平成25年度 総括研究報告書

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的  
糖鎖構造変動解析システムの構築

研究代表者 植田 幸嗣

平成26年(2014)年5月

# 厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略 研究事業

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的糖鎖構造変動解析システムの構築

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 植田 幸嗣

## 目 次

### I. 総括研究報告

肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的糖鎖構造変動解析システムの構築

植田 幸嗣 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 10

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

平成25年度総括研究報告書

## 肺癌糖鎖標的マーカーの実用化に向けた定量的 糖鎖構造変動解析システムの構築

研究代表者 植田幸嗣

独立行政法人理化学研究所 上級研究員

**研究要旨:** 本研究は肺癌の早期診断を可能とする血清腫瘍マーカーを同定し、著しい増加を続ける肺癌死亡数を有意に減少させることを最終目標とする。同目標に対して、細胞の癌化や環境の変化に鋭敏に反応して構造が変化することが知られる糖鎖修飾に着目した「糖鎖標的バイオマーカー」候補は多数同定されるに至っているが、特定の糖鎖付加部位における糖鎖構造の変化を定量的に、かつ多検体を用いてバリデーションできる技術が存在しないため、糖鎖バイオマーカーの臨床、診断応用は長らく停滞していた。この状況を打破するため、質量分析技術を応用して血清タンパク質上の各糖鎖付加部位について、個々に糖鎖構造変化を定量的にモニターできる Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim)法を開発した。

研究計画の三年目である平成25年度では、これまでに同定した肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子に対して Erexim 法を用いた多検体検証試験を実施した。本解析により、血中の CD163 タンパク質に付加された3箇所のN型糖鎖が肺腺癌の病期依存的なフコシル化変動を示すことが証明された。さらに、この癌性糖鎖変動は肺腺癌ステージ II の段階から有意に観測され、早期肺癌の存在を示唆する有用なスクリーニングバイオマーカーとなり得ることが期待できる。

## A. 研究目的

本邦において肺癌は部位別がん死亡率で第一位を占めており、肺癌の罹患数、死亡者数を減少させることが急務となっている。そのためには喫煙対策などに加え、根治可能なより早い段階で肺癌、またはその前癌病変を発見できる診断技術の開発は重要な位置を占める。現状において肺癌の早期発見には胸部 X 線診断、CT 診断など画像診断技術が主軸となっているが、これらよりも早期に、かつ検査技師の技量にかかわらず腫瘍を発見する技術は現時点では存在せず、本研究で開発する非侵襲的で安価に行える血清質量分析診断法にて初期肺癌の検出やリスク診断までもが可能になれば、それに伴って治療成績は劇的に改善されると期待できる。

研究代表者はこれまで、血清による肺癌の早期診断を目指して様々なグライコプロテオーム解析技術を用い、早期肺癌において糖鎖構造に変化が認められる多数の糖鎖標的マーカー候補の同定を行ってきた。そこで本研究ではそれら全てのマーカー候補糖タンパク質上に付加されている糖鎖の癌性変化を高感度に定量化、統合することによって肺癌を「治療可能な段階で早期に発見すること」、さらには「症状が出る前でのリスクの把握を可能にすること」を目標とする。

本年度は、平成 24 年度に開発した Energy resolved oxonium ion monitoring technology (Erexim)法を使用して、上記既同定の肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子に対してバイオマーカー検証試験を行い、以後の臨床試験に繋がる診断薬シーズを確

定することを目的とする。

## B. 研究方法

### a. 血清サンプルの分析前処理

87 症例（健常者 14 例、肺腺癌 I 期 10 例、II 期 15 例、III 期 28 例、IV 期 20 例）の血清サンプル各 5  $\mu$ l に [10M Urea, 200 mM ammonium bicarbonate] 20  $\mu$ l を添加して変性させた後、Dithiothreitol 終濃度 10 mM を追加して 37°C、30 分間還元反応を行った。さらに Iodoacetamide 終濃度 25 mM を添加し、室温、暗所で 45 分間システイン残基のアルキル化を行った。アルキル化反応を Dithiothreitol 終濃度 10 mM 添加でクエンチし、[50 mM ammonium bicarbonate] 175  $\mu$ l、平衡化後の Immobilized Trypsin (Thermo Scientific 社) 10  $\mu$ l を順に加えて消化反応を恒温シェイカー内で 37°C、6 時間行った。消化後のペプチドサンプルを C18 固相抽出カートリッジ(スリーエム社)で脱塩精製し、次の質量分析に供した。

### b. 質量分析 (Erexim 法)

Erexim 法を用いた血清消化物の質量分析には 4000QTRAP トリプル四重極型質量分析計(AB Sciex 社)に Ultimate 3000 RSLC nano flow HPLC (Dionex 社)を接続した LC/MS/MS システムを使用した。ペプチド分離用のカラムには 75  $\mu$ m x 150 mm ESI sprayer tip packed with 3  $\mu$ m C18 resin (Nikkyo Technos, Tokyo, Japan)を用い、溶媒 A [0.1% ギ酸]、溶媒 B [70% acetonitrile, 0.1% ギ酸]、流速 250 nl/min の条件で分離を行った。

4000QTRAP 質量分析計の設定は以下の通りである。2200 V ionization spray voltage; 12 psi curtain gas (N<sub>2</sub>); CAD = 4; 70 V declustering potential; 10 V entrance potential; Q1 resolution, HIGH; Q3 resolution, LOW; 2 ms pause in between.

第一四重極 Q1 チャンネルには各種バイオマーカー標的糖鎖付加サイトを含んだ糖ペプチドの質量電荷比(m/z)を設定した。ここで、2 分岐糖鎖までの考えられうる全ての糖鎖構造パターンについてチャンネルを設定し、報告のあるヒト N 型糖鎖構造全種類を定量的にモニターできるようにした。第三四重極 Q3 チャンネルには、N-アセチルグルコサミンフラグメントイオン m/z = 138、N-アセチルグルコサミンイオン m/z = 204、マンノース、またはガラクトースイオン m/z = 163、N-アセチルノイラミン酸イオン m/z = 292、N-アセチルノイラミン酸から水分子が脱離したイオン m/z = 274、ガラクトース+N-アセチルグルコサミンイオン m/z = 366 を設定し、各オキシニウムイオンの Exetim 曲線を描出した。

#### e. データ解析

前項の質量分析によって得られたデータは MultiQuant version 2.02 (AB Sciex 社)ソフトウェアを用いてプロセッシング、各 MS クロマトグラムの面積値を求める定量解析を行った。昨年度に報告した原著論文 (Anal Chem. 2012; 84 (22): 9655) に記載した手法通り、m/z = 138 のオキシニウムイオンを使用して各糖鎖コンポーネントの定量を、その他のオキシニウムイオンの Exetim 曲線パターン解析から糖鎖構造

の同定を実施した。

今年度の研究で対象としたコアフコースの付加頻度解析については、検出された全糖ペプチドの MS クロマトグラム面積値合計のうち、コアフコシル化糖鎖が付加されたペプチドの面積値合計が占める割合を算出した。Box plot など解析結果の集計には R ソフトウェア (Version 2.15.1) を使用した。

### C. 研究結果

糖鎖構造バリエーション定量化法を開発するにあたって、我々が着目したのが図 1 に示すオキシニウムイオンである。オキシニウムイオンはあらゆる糖ペプチドの衝突誘起解離 (CID) によって質量分析機内で生じることが知られ、元の糖鎖構造に依存した種類のイオンが観測される。(図 2) これらのオキシニウムイオンパターンを定量的にモニターし、かつ衝突エネルギーによる連続的なスキャンを行うことで、ある糖鎖付加部位に結合していた糖鎖構造を構造異性体の区別まで含めて定量化できるようにしたのが Energy Resolved Oxonium Ion Monitoring Technology (Exetim 法) である。

Exetim 法の測定機序を図 3 に示した。トリプル四重極型質量分析計を用い、第一四重極 (Q1) で目的とする糖ペプチド全体の質量を指定し、特異的に通過させる。第二四重極 (Q2) で CID を行い、糖ペプチドを物理的に開裂させる。続いて第三四重極 (Q3) では、CID で生成したオキシニウムイオンを全て定量的に検出する。

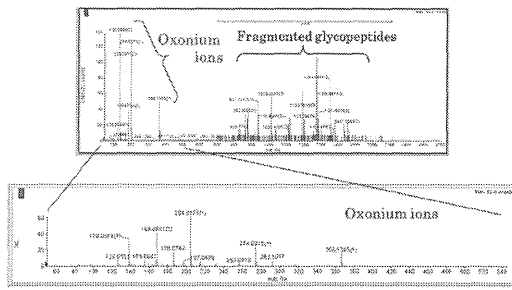
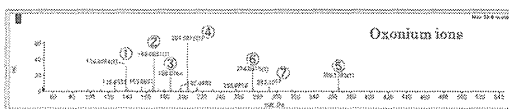


図1 (上段)代表的な糖ペプチドの LC/MS/MS スペクトル。高分子領域にペプチド鎖のフラグメントイオンが、低分子領域には糖鎖由来のフラグメントイオン(オキシニウムイオン)が観測される。(下段)m/z = 60 - 540 の拡大図。

ここで、質量が全く同じ糖鎖の構造異性体を区別するため、Q2 での衝突エネルギーを連続的に変化させ、オキシニウムイオンの生成量をモニターする。すなわち、立体構造の違いによるある分岐鎖の「壊れやすさ」を調べることによって、例えば  $\alpha$ -1,3 グリコシル結合のガラクトースと  $\alpha$ -1,6 グリコシル結合のガラクトースが区別できる。



- |  |   |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 138.06 = [HexNAc · CH<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup></li> <li>2. 168.07 = [HexNAc · 2H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup></li> <li>3. 186.08 = [HexNAc · H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup></li> <li>4. 204.09 = [HexNAc + H]<sup>+</sup></li> <li>5. 366.13 = [HexNAc + Hex + H]<sup>+</sup></li> <li>6. 274.09 = [Neu5Ac · H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup></li> <li>7. 292.09 = [Neu5Ac + H]<sup>+</sup></li> </ol> | $\left\{ \begin{array}{l} \text{HexNAc : GlcNAc or GalNAc} \\ \text{Hex : Man or Gal} \\ \text{Neu5Ac : N-acetyl neuraminic acid} \end{array} \right\}$ |
|--|---|

図2 N型糖鎖付加ペプチドの質量分析にて観測される代表的なオキシニウムイオン。GlcNAc: N-アセチルグルコサミン、GalNAc: N-アセチルガラクトサミン、Man: マンノース、Gal: ガラクトース。

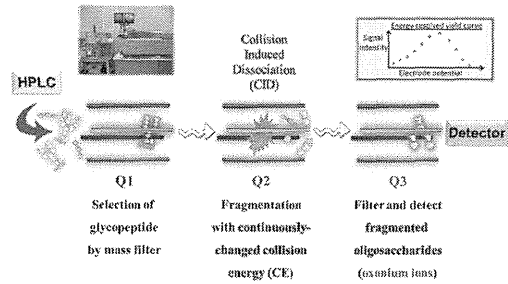


図3 Exetim法の分析機序。語句詳細は本文参照。

この Exetim 法を駆使して、肺癌患者血清中にてコアフコースの付加頻度が有意に亢進している糖タンパク質として過去に同定した Haptoglobin、Orosomucoid-1、CD163 について、87 症例から成る検証試験セットを用いて糖鎖構造変化を定量化した。

実際にヒト血清タンパク質の消化物から肺癌糖鎖標的マーカー候補分子である CD163 上の糖鎖構造存在比を定量化したものが図 4 である。1 箇所糖鎖付加部位に 43 種類もの糖鎖構造が確認され、最も付加頻度が少ない糖鎖構造では存在率 0.00978% まで検出が可能であったことから、定量ダイナミックレンジは 4 桁以上であると言える。

ここで検出された 43 種類の糖鎖構造のうち、コアフコースが付加された糖鎖構造の割合を求め、87 症例間で比較試験を行った。その結果、図 5 に示すような病理群間の糖鎖付加変動が検出された。Haptoglobin については付加された 2 本の糖鎖ともに III 期以上の進行肺腺癌群で有意なタンパク質上フコシル化の亢進が検出された。

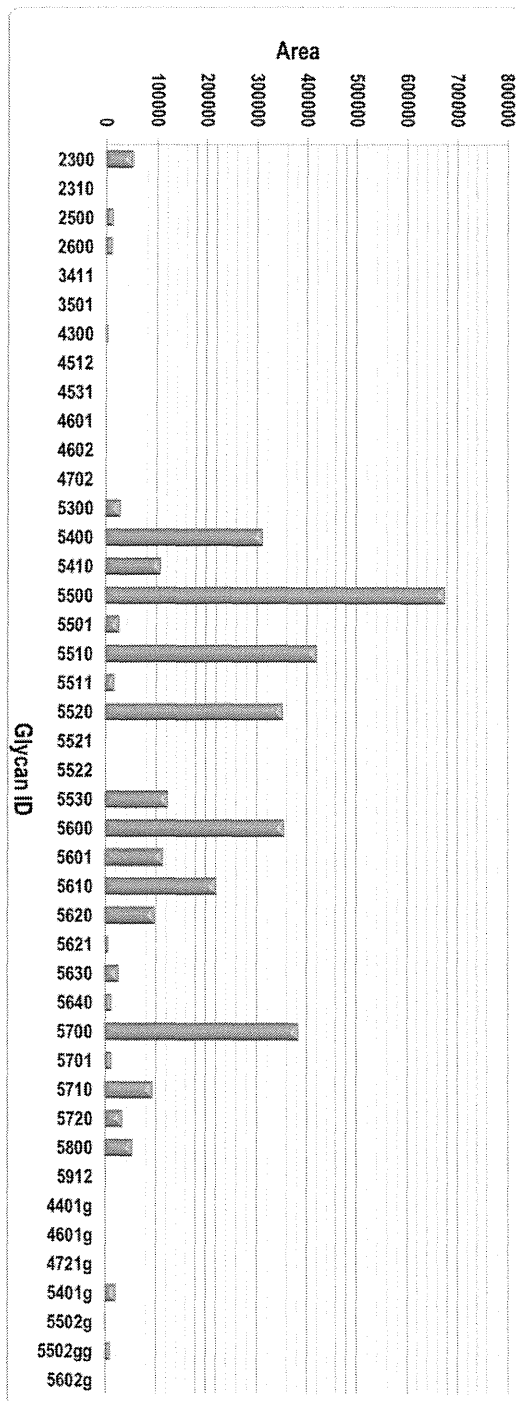


図5 m/z = 138 オキシニウムイオンによる糖鎖構造非依存的定量。4桁のGlycan IDは1桁目からそれぞれ [N-アセチルグルコサミン]、[マンノース] または[ガラクトース]、[フコース]、[シアル酸] の付加個数を表す。

Orosomuroid-1 に関しては 5 箇所の糖鎖付加部位について糖鎖構造の定量データが得られたものの、肺腺癌の早期診断に有効と考えられるフコシル化変動は確認できなかった。CD163-Asn105、Asn140、Asn1027 上糖鎖については、II 期以上の肺腺癌患者でコアフコース付加頻度の有意な亢進が観察され、かつ病期依存的な付加頻度上昇が認められた。

#### D. 考察

従来の糖鎖解析技術では血清から目的の糖タンパク質を単離し、さらに糖鎖を酵素的に切断、最終的に多段階 HPLC か MALDI-TOF 型質量分析装置にて糖鎖構造の検証を行うしかなく、多症例の分析は到底不可能であったが、本開発技術で初めて糖鎖マーカーの多検体検証試験が可能となった。また、従来法の MALDI-TOF 型質量分析装置を用いた手法ではダイナミックレンジが 2 桁未満であったため、同レンジが 4 桁を超える Erexim 法は劇的な検出感度、定量性の向上を達成したと言える。

3 年計画の最終年度である本年度までに、本研究開始時に予定していた (1) 新規糖鎖構造変動高速定量技術の開発、および (2) それを使用した既同定の肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子の多検体検証試験、の双方を完了することができた。さらに、本研究計画終了後に予定していた体外診断機器開発に向けたソフトウェア開発、質量分析計開発も民間企業と連携してすでに開始しており、Erexim 法自体は抗体医薬品をはじめとするあらゆるバイオ医薬品の



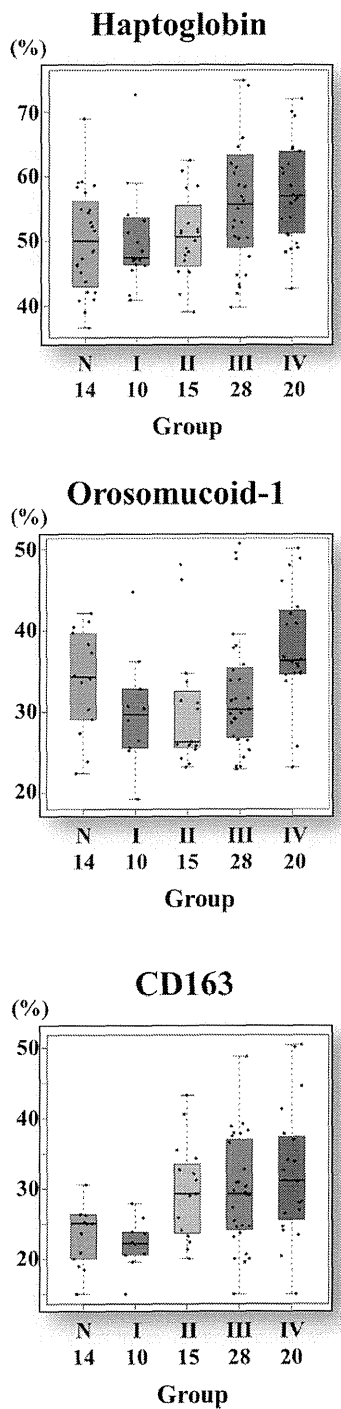


図 6 87 症例を使用した肺癌糖鎖標的腫瘍マーカー候補分子 3 種に対する検証試験。縦軸：コアフコシル化頻度。横軸：病理群と症例数。N: 健常者、I~IV: 肺腺癌ステージ I~IV。

品質評価試験、開発支援受託事業として実用化と普及が進んでいる。以上の進捗状況から鑑みて、当初想定された成果以上の診断薬化研究としての進展と幅広い医薬分野への波及効果が得られたと言える。

### E. 結論

今後は本年度の検証試験で新規肺腺癌早期診断マーカーとして決定した CD163 タンパク質について、Erexim 法を応用した質量分析診断技術による体外診断薬化を目指す。質量分析技術の診断応用は、2013 年 8 月に病原微生物の一斉診断法として FDA の認可を受けた VITEK MS をはじめ、今後急速に進展していくことが予想される。これは 200 種類以上の菌種を 1 分析で検出できる VITEK MS 法に代表されるように、最新の質量分析装置では数十~数百の生体物質を短時間で同時定量することが可能になったことによる。

Erexim 法は世界初のマルチサイト（複数の糖鎖付加部位）糖鎖構造一斉定量技術であるので、CD163 以外にも検証試験を進める肺癌早期診断バイオマーカー候補から診断能の高いターゲットをできるだけ多く選出し、より高精度で多角的な肺癌の診断が可能な診断機器製造を目指す。検査項目が増えても質量分析に要する時間は 20 分程度であり、かつ抗体など高価な検査試薬は必要としないので大変安価でもある。最終的に非侵襲的で安価に行える血清診断にて初期肺癌の検出やリスク診断までもが可能になれば、肺癌による死亡率は劇的に改

善されると期待できる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperonin complex formation.

G. Toyokawa, M. Yoshimatsu, M. Nakakido, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, H. S. Cho, **K. Ueda**, Y. Maehara, Y. Nakamura, and R. Hamamoto

**Cancer letters**

2014, in press.

2. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.

T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, **K. Ueda**, and Y. Nakamura

**International journal of oncology**

2014; 45 (1); 147-56.

3. Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6).

M. Unoki, A. Masuda, N. Dohmae, K. Arita, M. Yoshimatsu, Y. Iwai, Y. Fukui, **K. Ueda**, R. Hamamoto, M. Shirakawa, H. Sasaki, and Y. Nakamura

**The Journal of biological chemistry**

2013; 288 (9); 6053-62.

4. Plasma Low-Molecular-Weight Proteome Profiling Identified Neuropeptide-Y as a Prostate Cancer Biomarker Polypeptide.

**K. Ueda**, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Toyama, K. Tamura, M. Furihata, R. Takata, S. Akamatsu, M. Igarashi, M. Nakayama, T. A. Sato, O. Ogawa, T. Fujioka, T. Shuin, Y. Nakamura, and H. Nakagawa

**Journal of proteome research**

2013; 12 (10); 4497-4506.

5. Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.

**K. Ueda**

**Proteomics Clin Appl**

2013; 7 (9-10); 607-617.

6. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia.

M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Utsunomiya, Y. Nakamura, H. Nakagawa, Y. Yamano, and **K. Ueda**

**Blood**

2013; 121 (21); 4340-7.

7. The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates

lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination.

M. Kogure, M. Takawa, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, **K. Ueda**, R. Ibrahim, T. Tsunoda, M. Sugiyama, Y. Atomi, Y. Nakamura, and R. Hamamoto

#### **Neoplasia**

2013; 15 (11); 1251-61.

## 2. 学会発表

### 国際会議

1. Proteome-wide Profiling of Serum Exosomes Identified CD91 as an Exosomal Biomarker For Lung Adenocarcinoma.

**K. Ueda**

#### **ISEV Workshop On EV Proteomics and Lipidomics**

2014; Feb. 3 (Melbourne, Australia)

2. Current State of Early Detection Biomarker Development for Cancer in Japan.

**K. Ueda**

#### **US-Japan Joint Meeting on Biomarkers for Early Cancer Detection**

2014; Feb. 10 (NIH, Bethesda, MD)

### 国内会議

1. がんの早期発見に挑む質量分析計.

**K. Ueda**

## **よこはまサイエンスカフェ 2014**

2014; Jan. 19 (横浜市立中央図書館)

2. 癌化に伴う血中エクソソームタンパク質の質的量的変化.

**K. Ueda**

#### **第36回日本分子生物学会**

2013; Dec. 5 (Yokohama, Japan)

3. 質量分析が明らかにする癌特異的エクソソーム表面抗原.

**K. Ueda**

#### **Exosomes as Diagnostic Markers in Cancer (株式会社ダイアログセミナー)**

2013; Nov. 25 (品川)

4. Development of glycoproteomic technologies and identification of glycan-targeting tumor markers.

**K. Ueda**

#### **HUPO 2013, 12th World Congress**

2013; Sep. 18 (Yokohama)

5. Erexim法を用いた抗体医薬品糖鎖構造の高速定量評価.

**K. Ueda**

#### **BioJapan 2013**

2013; Oct. 11 (Yokohama, Japan)

6. 大規模サンプル解析のための最先端ブ

ロテオーム情報処理基盤.

K. Ueda

第 86 回日本生化学会

2013; Sep. 13 (Yokohama, Japan)

7. Proteomic Identification of  
Tumor-derived Exosome Biomarkers.

K. Ueda

第 72 回日本癌学会学術総会

2013; Oct. 3 (Yokohama, Japan)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、および検査キット

発明者：植田幸嗣

出願番号：特願 2013-061094

出願日：2013/3/22

登録日：2013/12/13

特許第 5429725 号

出願国：日本

##### 2. 肺癌の検出方法および検出キット

発明者：植田幸嗣

出願番号：特願 2013-251548

出願日：2013/12/04

出願国：日本

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
G. Toyokawa, M. Yoshimatsu, M. Nakakido, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, H. S. Cho, <u>K. Ueda</u> , Y. Maehara, Y. Nakamura, and R. Hamamoto	SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperonin complex formation.	<b>Cancer letters</b>	In press	In press	2014
T. Fujitomo, Y. Daigo, K. Matsuda, <u>K. Ueda</u> , and Y. Nakamura	Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.	<b>International journal of oncology</b>	45 (1)	147-56	2014

M. Unoki, A. Masuda, Dohmae, K. Arita, M. Yoshimatsu, Y. Iwai, Y. Fukui, <b>K. Ueda</b> , R. Hamamoto, M. Shirakawa, H. Sasaki, and Y. Nakamura	Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6).	<b>The Journal of biological chemistry</b>	288 (9)	6053-62	2013
<b>K. Ueda</b> , A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Toyama, K. Tamura, M. Furihata, R. Takata, S. Akamatsu, M. Igarashi, M. Nakayama, T. A. Sato, O. Ogawa, T. Fujioka, T. Shuin, Y. Nakamura, and H. Nakagawa	Plasma Low-Molecular-Weight Proteome Profiling Identified Neuropeptide-Y as a Prostate Cancer Biomarker Polypeptide.	<b>Journal of proteome research</b>	12 (10)	4497-506	2013
<b>K. Ueda</b>	Glycoproteomic strategies: from discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.	<b>Proteomics Clin Appl</b>	7 (9-10)	607-17	2013

<p>M. Ishihara, N. Araya, T. Sato, A. Tatsuguchi, N. Saichi, A. Utsunomiya, Y. Nakamura, H. Nakagawa, Y. Yamano, and <u>K. Ueda</u></p>	<p>Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia.</p>	<p><b>Blood</b></p>	<p>121 (21)</p>	<p>4340-7</p>	<p>2013</p>
<p>M. Kogure, M. Takawa, V. Saloura, K. Sone, L. Piao, <u>K. Ueda</u>, R. Ibrahim, T. Tsunoda, M. Sugiyama, Y. Atomi, Y. Nakamura, and R. Hamamoto</p>	<p>The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination.</p>	<p><b>Neoplasia</b></p>	<p>15(11)</p>	<p>1251-61</p>	<p>2013</p>

Enzymology:  
**Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone  
Modification, by Jumonji Domain  
Containing 6 (JMJD6)**

Motoko Unoki, Akiko Masuda, Naoshi  
Dohmae, Kyohei Arita, Masanori Yoshimatsu,  
Yukiko Iwai, Yoshinori Fukui, Koji Ueda,  
Ryuji Hamamoto, Masahiro Shirakawa,  
Hiroyuki Sasaki and Yusuke Nakamura  
*J. Biol. Chem.* 2013, 288:6053-6062.

doi: 10.1074/jbc.M112.433284 originally published online January 9, 2013

ENZYMOLOGY

CELL BIOLOGY

Access the most updated version of this article at doi: 10.1074/jbc.M112.433284

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the JBC Affinity Sites.

Alerts:

- When this article is cited
- When a correction for this article is posted

Click here to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 17 references, 5 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/288/9/6053.full.html#ref-list-1>



# Lysyl 5-Hydroxylation, a Novel Histone Modification, by Jumonji Domain Containing 6 (JMJD6)\*

Received for publication, November 3, 2012, and in revised form, January 8, 2013. Published, JBC Papers in Press, January 9, 2013, DOI 10.1074/jbc.M112.433284

Motoko Unoki<sup>†§1</sup>, Akiko Masuda<sup>¶</sup>, Naoshi Dohmae<sup>¶</sup>, Kyohei Arita<sup>||</sup>, Masanori Yoshimatsu<sup>\*\*</sup>, Yukiko Iwai<sup>††</sup>, Yoshinori Fukui<sup>††</sup>, Koji Ueda<sup>§</sup>, Ryuji Hamamoto<sup>\*\*§§</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>\*\*</sup>, Hiroyuki Sasaki<sup>‡</sup>, and Yusuke Nakamura<sup>\*\*§§</sup>

From the <sup>†</sup>Division of Epigenetics, Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan, the <sup>§</sup>Laboratory for Biomarker Development, The Institute of Physical and Chemical Research, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Tokyo 108-8639, Japan, the <sup>¶</sup>Biomolecular Characterization Team, RIKEN, Saitama 351-0198, Japan, the <sup>||</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 615-8510, Japan, the <sup>\*\*</sup>Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan, the <sup>††</sup>Division of Immunogenetics, Department of Immunobiology and Neuroscience, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan, and the <sup>§§</sup>Section of Hematology/Oncology, Center for Personalized Therapeutics, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637

**Background:** JMJD6 hydroxylates U2AF65, but its role in histone modification has been obscure.

**Results:** Our analysis of histones purified from JMJD6 knock-out mouse embryos reveals that JMJD6 hydroxylates histone lysyl residues.

**Conclusion:** JMJD6 mediates histone lysyl 5-hydroxylation, which is a novel histone modification.

**Significance:** Our study identifies a new function for Jumonji family proteins in epigenetic modification of histones.

JMJD6 is reported to hydroxylate lysyl residues of a splicing factor, U2AF65. In this study, we found that JMJD6 hydroxylates histone lysyl residues. *In vitro* experiments showed that JMJD6 has a binding affinity to histone proteins and hydroxylates multiple lysyl residues of histone H3 and H4 tails. Using JMJD6 knock-out mouse embryos, we revealed that JMJD6 hydroxylates lysyl residues of histones H2A/H2B and H3/H4 *in vivo* by amino acid composition analysis. 5-Hydroxylysine was detected at the highest level in histones purified from murine testis, which expressed JMJD6 at a significantly high level among various tissues examined, and JMJD6 overexpression increased the amount of 5-hydroxylysine in histones in human embryonic kidney 293 cells. These results indicate that histones are additional substrates of JMJD6 *in vivo*. Because 5-hydroxylation of lysyl residues inhibited *N*-acetylation and *N*-methylation by an acetyltransferase and a methyltransferase, respectively, *in vitro*, histone 5-hydroxylation may have important roles in epigenetic regulation of gene transcription or chromosomal rearrangement.

Jumonji domain containing 6 (JMJD6),<sup>2</sup> which possesses high binding affinity to single-stranded RNA, is reported to hydroxylate lysyl residues of an RNA splicing factor, U2AF65

(1, 2). JMJD6 contains a JmjC domain that catalyzes lysyl hydroxylation of proteins in the presence of 2-oxoglutarate, Fe(II), and ascorbate. Proteins belonging to the JmjC family are classified into 2-oxoglutarate oxygenases (3). Among the known 2-oxoglutarate oxygenases, PLOD3 (procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3) mediates hydroxylation of unmodified lysyl residues, yielding 5-hydroxylysine (4). Most JmjC family members catalyze hydroxylation of *N*-methyl groups at the  $\epsilon$ -amino group of lysyl residues and generate hydroxymethyl groups, which are immediately processed to formaldehyde molecules, resulting in demethylation of methylated lysyl residues (5). However, JMJD6 does not add a hydroxyl group to the *N*-methyl group but adds it to one of the backbone carbons in a lysyl side chain and generates a stable 5-hydroxylysine (1). JMJD6 knock-out mice exhibited severe anemia, growth retardation, and a delay in terminal differentiation of the kidney, intestine, liver, and lung during embryogenesis, resulting in perinatal lethality (6, 7).

In this study, we first identified JMJD6 as a novel UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1) interacting protein. UHRF1 has important roles in transferring DNA methylation status and recognizes histone modification status (8). Therefore, we thought that JMJD6 might hydroxylate histone molecules through interaction with UHRF1. Using JMJD6 knock-out mice, we revealed that JMJD6 hydroxylates histone lysyl residues and generates 5-hydroxylysine *in vivo*. 5-Hydroxylation is a novel histone lysyl modification. Because it interfered with *N*-acetylation and *N*-methylation by an acetyltransferase and a methyltransferase, respectively, the modification may regulate transcription through these interactions with other histone modifications.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*JMJD6 Wild-type and Knock-out Mice*—Details of the JMJD6 knock-out mice were described elsewhere (6). C57BL/6 mice

\* This work was supported by JSPS KAKENHI Grant 22700867 and Kyushu University interdisciplinary programs in education and projects in research development.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Div. of Epigenetics, Dept. of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel.: 81-92-642-6760; Fax: 81-92-642-6799; E-mail: unokim@bioreg.kyushu-u.ac.jp.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: JMJD6, Jumonji domain containing 6; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; HAT, histone acetyltransferase; E14.5, embryonic day 14.5; AdoMet, S-adenosyl-L-methionine.

## JMJD6 Hydroxylates Histone Lysyl Residues

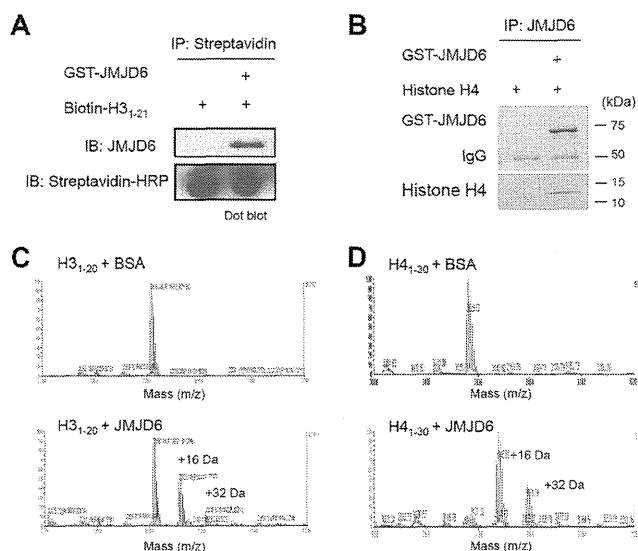
were used as wild-type control mice. JMJD6 knock-out embryonic day 14.5 (E14.5) embryos were obtained by crossing heterozygous JMJD6 mutant mice.

**Antibodies, Plasmids, and Cell Lines**—The following antibodies were used: anti-JMJD6 rabbit polyclonal antibody (ab10526, Abcam), and anti- $\beta$ -actin mouse monoclonal antibody (GTX26276, GeneTex). Human JMJD6 cDNA was cloned into pGEX-6p-1 (GE Healthcare) and pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen). Doxycycline (Dox)-inducible JMJD6 stable cells were generated using the Flp-In T-REX system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. JMJD6 expression was induced by Dox (final concentration, 0.5  $\mu$ g/ml; TaKaRa, Tokyo, Japan). J1 mouse ES cells were obtained from ATCC (Manassas, VA) and maintained in DMEM with 15% fetal bovine serum (FBS), nonessential amino acids, 2-mercaptoethanol, and leukemia inhibitory factor. Flp-In T-Rex 293 cells were obtained from Invitrogen and the Dox-inducible JMJD6 stable 293 cells were maintained in DMEM with 10% FBS, 10% tetracycline-free FBS, hygromycin B (100  $\mu$ g/ml), and blasticidin S (15  $\mu$ g/ml).

**Quantitative RT-PCR**—For qRT-PCR reactions, specific primers and probes for mouse JMJD6 (forward, 5'-GACCCG-GCACAACACTACTACG-3'; reverse, 5'-CTCTTGTGCATTG-AGCAGAAC-3') and mouse GAPDH (forward, 5'-CCATGT-TTGTGATGGGTGTG-3' and reverse, 5'-ACTGTGGTC-ATGAGCCCTTC-3') were used. PCR reactions were performed using the TaKaRa Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System Single following the manufacturer's instructions. Amplification conditions were 30 s at 95 °C and then 40 cycles each consisting of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C.

**Purification of GST-JMJD6 and *In Vitro* Binding Assay**—Recombinant GST-JMJD6 was expressed in BL21-CodonPlus DE3-RIL cells. The transformed bacteria were incubated in L-Broth media with 0.1 mM isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside at 16 °C overnight. Following this, the bacteria were lysed in sonication buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X, and 0.8 mg/ml lysozyme) by sonication. GST-JMJD6 was purified using glutathione-Sepharose 4FF (GE Healthcare) and eluted by glutathione. The purified proteins were incubated with biotin-labeled histone H3<sub>1-21</sub> peptides (12–405, Millipore, Billerica, MA) or recombinant full-length histone H4 (14–697, Millipore) in 0.1% Nonidet P-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, and 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) for 1 h at 4 °C. The biotin-labeled histone H3<sub>1-21</sub> peptides were pulled down with interacting proteins by streptavidin Sepharose (S951, Invitrogen). Full-length histone H4 was immunoprecipitated with anti-JMJD6 rabbit polyclonal antibody (ab10526, Abcam), which was also used for Western blotting.

***In Vitro* Hydroxylation Assay**—To perform the enzyme assay, GST-JMJD6 was prepared as described above. Extracted GST-JMJD6 was concentrated using a 50 K column (Millipore), and its buffer was replaced with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) by dialysis using EasySep (TOMY, Tokyo, JAPAN). Purity of GST-JMJD6 was assessed by Coomassie Brilliant Blue staining. The enzyme assay was performed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 500  $\mu$ M  $\alpha$ -ketoglutarate, 100  $\mu$ M 1-ascorbate, 100  $\mu$ M Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ M GST-JMJD6, and 20  $\mu$ M histone peptides.



**FIGURE 1. JMJD6 interacts with and hydroxylates histone H3 and H4 *in vitro*.** *A* and *B*, *in vitro* pull-down assay. Biotin-labeled histone H3<sub>1-21</sub> peptides (*A*) or recombinant histone H4 (*B*) were incubated with or without GST-JMJD6, pulled down by streptavidin-Sepharose, and detected by dot blot using streptavidin-HRP (*A*) or Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining (*B*). Pulled down GST-JMJD6 was detected by Western blotting using anti-JMJD6 antibody (*A*) or Coomassie Brilliant Blue staining (*B*). *C* and *D*, enzymatic activity of GST-JMJD6 was measured by MS analysis. Histone H3<sub>1-20</sub> (*C*) and H4<sub>1-30</sub> (*D*) peptides were served as substrates. BSA was used as a negative control. *IB*, immunoblot.

Protein purification and the enzyme assay were performed on the same day to avoid reduction of enzymatic activity of JMJD6.

**MS Analysis**—Peptides treated with JMJD6 were acidified with trifluoroacetic acid (TFA; final concentration, 0.5%) and absorbed with ZipTipC18. The captured peptides were washed with 0.1% TFA with 2% acetonitrile once and eluted with 0.5  $\mu$ l of the matrix solution (4 mg/ml cyano-4-hydroxycinnamic acid, 0.1% TFA, 70% acetonitrile) onto the MALDI target plate (AB Sciex, Foster City, CA). The spotted samples were analyzed with the reflectron mode of 4800 plus MALDI-TOF-TOF mass spectrometer (AB Sciex).

**Purification of Histones and Detection of 5-Hydroxylysine by Amino Acid Composition Analysis**—Histones H2A/H2B and H3/H4 were separately purified from tissues or culturing cells using a histone purification kit (Active Motif, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The extracted histones were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane (Immobilon-P<sup>®</sup>, Millipore), and stained by Coomassie Brilliant Blue. The transferred histones were used for amino acid composition analysis to detect 5-hydroxylysine.

The JMJD6-treated peptides or the purified histones were hydrolyzed in 6 N HCl vapor at 110 °C for 20 h. The acid hydrolysates of the peptides were derivatized with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, and 6-aminoquinolylcarbamyl amino acid thus obtained was quantified by ion-pair chromatography using tetramethylammonium bromide on a C18-reversed phase column (L-column 2, 3.0 mm, inner diameter  $\times$  250 mm, 3  $\mu$ m, CERI, Tokyo, Japan) (9). Each amino acid was separated by HPLC. The acid hydrolysates of the histones were purified on a graphitic carbon column (Hypercarb, 2.1 mm, inner diameter  $\times$  100 mm, 3  $\mu$ m, Thermo Fisher Scien-

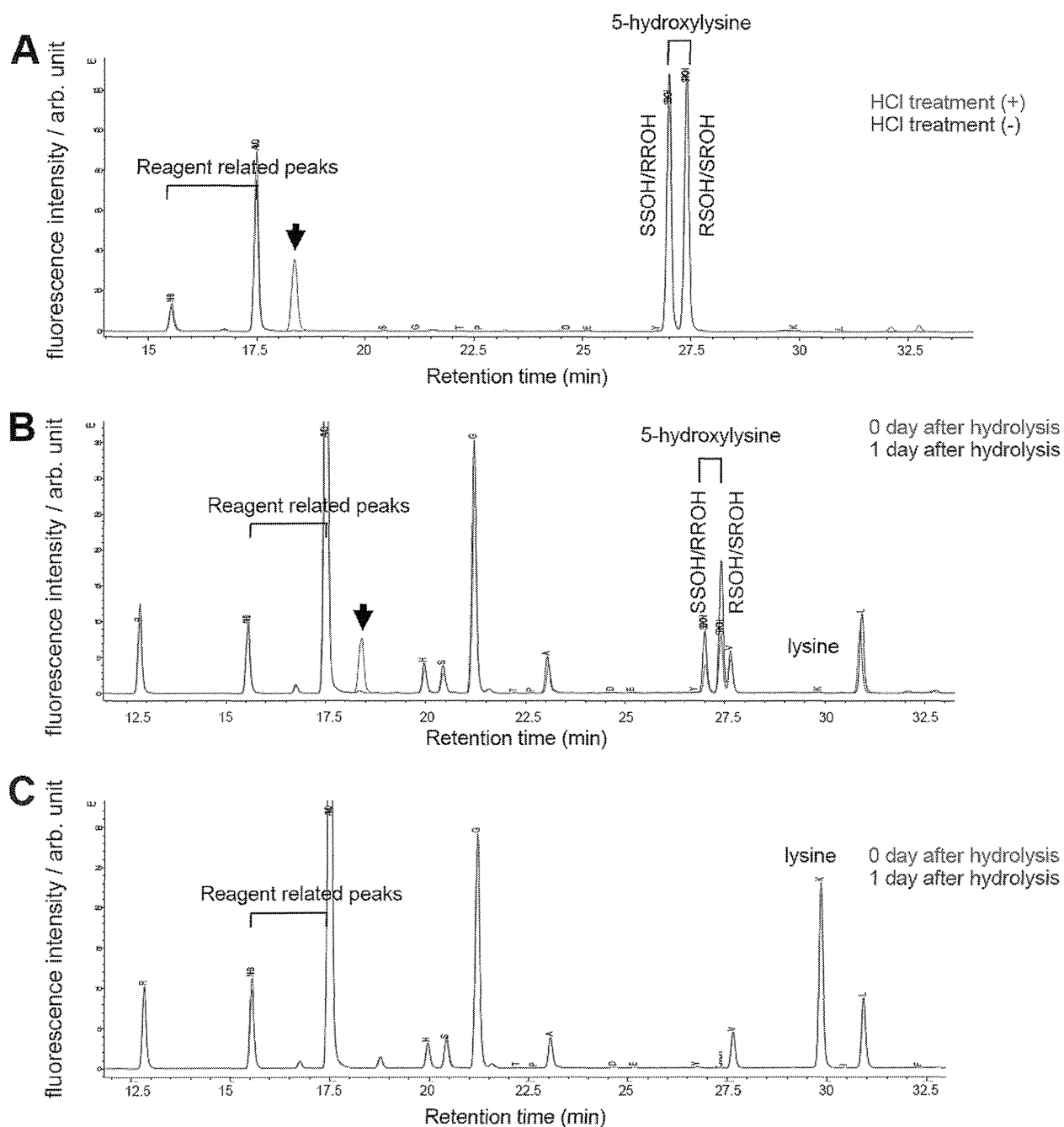


FIGURE 2. Establishment of amino acid composition analysis for detecting 5-hydroxylysine. A, analysis of simplicial synthetic SR-hydroxylysine and synthetic racemic mixture (SS/RR/RS/SR) of 5-hydroxylysine either treated with (red) or without (blue) HCl. B and C, analysis of H4<sub>1-20</sub> peptides including synthetic 5-hydroxylysine (B) and unmodified H4<sub>1-20</sub> peptides (C). The peptides were analyzed in the same day of hydrolysis (red) or next day of hydrolysis (blue). The arrow indicates a 5-hydroxylysine derived peak, which possibly corresponds to a lactone derivative, 3-amino-6-(aminomethyl)oxan-2-one. SSOH/RROH, 2S,5S-/2R,5R-hydroxylysine; RSOH/SROH, 2R,5S-/2S5R-hydroxylysine; arb. unit, arbitrary units.

tific, Inc., Waltham, USA), and a fraction including 5-hydroxylysine was derivatized with 6-aminoquinolylcarbamyl. The 6-aminoquinolylcarbamyl amino acids were separated on a C18-reversed phase column (Inertsustain C18HP, 3.0 mm, inner diameter  $\times$  250 mm, 3  $\mu$ m, GL Sciences, Tokyo, Japan) and quantified. Synthetic racemic mixture of DL-5-hydroxylysine (catalog no. H0377, Sigma-Aldrich), and 2S,5R-hydroxylysine (catalog no. 55501, Sigma-Aldrich) were used as standards.

*In Vitro Histone Acetyltransferase (HAT) Assay*—The *in vitro* p300 colorimetric HAT assay was performed according to a protocol from BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). In brief, the catalytic domain of human p300 (catalog no. SE-451, BIOMOL) and the indicated amount of control histone H4<sub>1-23</sub> peptides or 5-hydroxylysine containing histone H4<sub>1-23</sub> peptides, in which all lysines were substituted to 5-hydroxylysine (Sigma-Genosys, Hokkaido, Japan), were incubated in 50  $\mu$ l of assay buffer (50 mM HEPES/NaOH (pH 7.9), 0.1 mM EDTA, 50  $\mu$ g/ml BSA) in

## JMJD6 Hydroxylates Histone Lysyl Residues

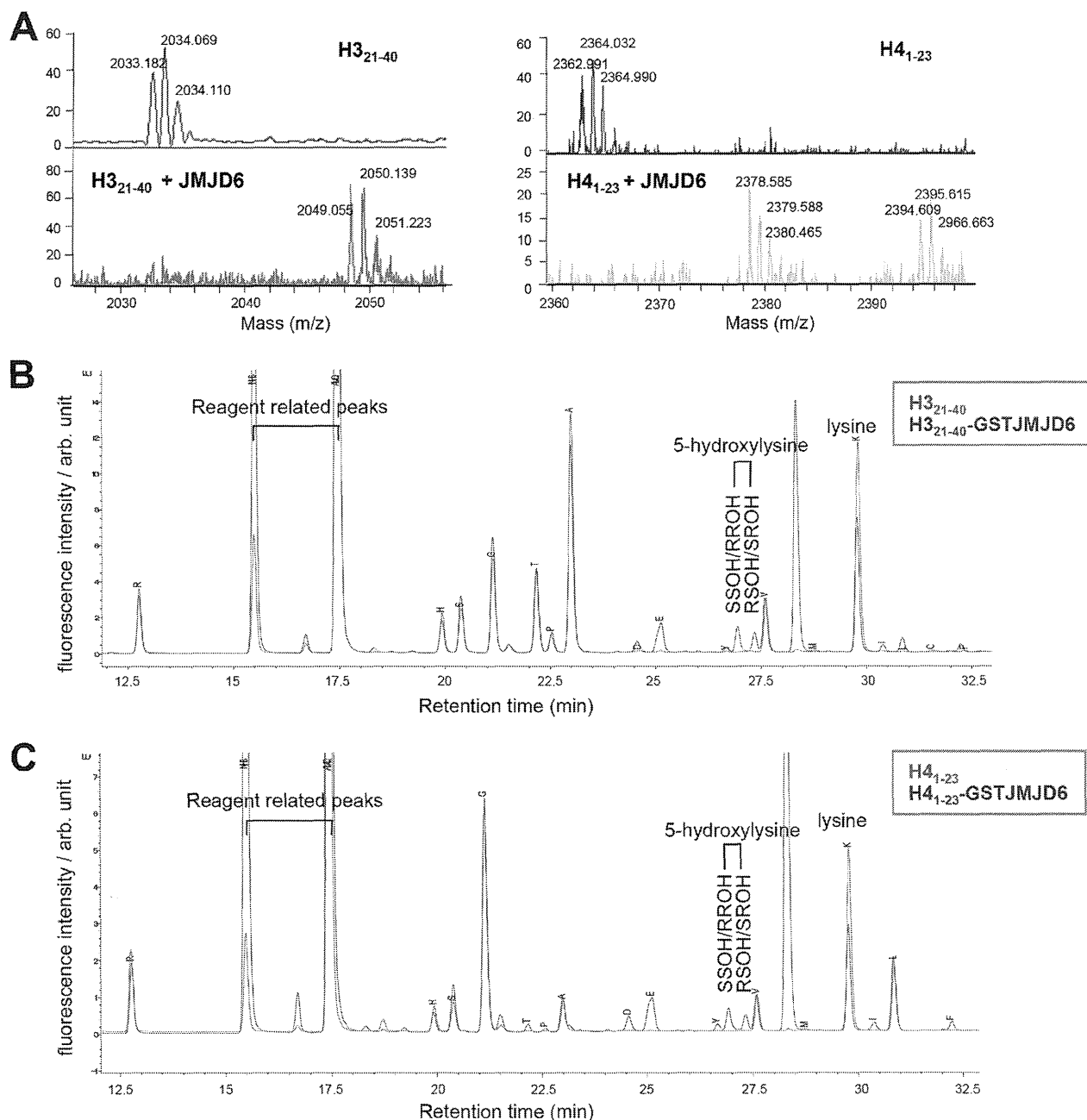


FIGURE 3. JMJD6 hydroxylates histone H3 and H4 peptides detected by amino acid composition analysis. A, hydroxylation of H3<sub>21-40</sub> and H4<sub>1-23</sub> peptides by GST-JMJD6 was confirmed by MS analysis. B and C, results of amino acid composition analysis of H3<sub>21-40</sub> (B) and H4<sub>1-23</sub> (C) peptides treated with (blue) or without (red) GST-JMJD6. SSOH/RRHO, 2S,5S/2R,5R-hydroxylysine; RSOH/SROH, 2R,5S-/2S,5R-hydroxylysine; arb. unit, arbitrary units.

the presence of acetyl-coenzyme A (CoA, Sigma-Aldrich) at 37 °C. The reaction was stopped by adding 100  $\mu$ l of quenching buffer (3.2 M guanidinium HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8)) at the indicated times. Following this, 50  $\mu$ l of 2 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich) in 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.8) was added, and absorbance at 405 nm was read by a spectrophotometer (ARVO MX/Light 1420 Multilabel/Luminescence Counter, PerkinElmer Life Sciences). The transfer of an acetyl group from an acetyl-CoA to the  $\epsilon$ -amino group of lysine residues was quantified by measurement of the thiol group of CoA. A standard curve was generated using  $\beta$ 2-mercaptoethanol.

*In Vitro Histone Methyltransferase Assay*—The *in vitro* histone methyltransferase assay was performed as described previously (10), except for slight modifications. In brief, a fixed amount of purified baculovirus-produced recombinant SMYD3 (1  $\mu$ M) was incubated with indicated histone peptides, which were also used for the *in vitro* HAT assay, and 1  $\mu$ Ci of S-adenosyl-L-methionine (AdoMet; GE Healthcare) as the methyl donor in a mixture of 60  $\mu$ l of methylase activity buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 100 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol) at 30 °C. The incorporated <sup>3</sup>H-labeled methyl groups in the substrates were measured by a scintillation counter after filter binding (units, cpm). The concentration