

令和元年6月30日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07358

研究課題名(和文) リボソームRNA遺伝子領域におけるヘテロクロマチン構造の変換

研究課題名(英文) Controls of rDNA chromatin by two proteins encoded by the KDM2A gene

研究代表者

常岡 誠 (Tsuneoka, Makoto)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50197745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：rDNAのクロマチン構造変換機構及び生理的意味は良くわかっていない。今回KDM2A遺伝子がコードする2つの蛋白質について研究した。ヒストン脱メチル化酵素活性をもつKDM2AはrDNAプロモーターに結合しrRNA転写を抑制する。今回この作用にヘテロクロマチン結合タンパク質HP1が必要であることが明らかとなった。一方、KDM2A遺伝子から作られる脱メチル化酵素活性を持たないSF-KDM2Aは、rDNAプロモーター上のヘテロクロマチンマークH4K20me3を減らしrRNA転写を上昇した。H4K20me3にはHP1が結合することから、SF-KDM2AがKDM2A活性に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

rRNA転写は増殖の速い癌細胞で盛んに起こっており、rRNA転写の調節は癌抑制に応用されうる。今回rRNA転写に影響するrDNAクロマチン構造の変換に、KDM2A遺伝子産物及びHP1が関与するという結果を得た。これまでHP1発現の減少は癌の進行を促すと報告されてきたが、乳がん細胞ではHP1発現は維持されていた。以上はKDM2A遺伝子産物がrDNAクロマチン構造調節を介してrRNA転写を調節すること、およびKDM2A遺伝子活性を調節することによるがん治療の可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms and biological significance of the control of chromatin states in rDNA are not clear. In this project, we found that reduction of rRNA transcription by KDM2A required heterochromatin protein 1 (HP1). Because HP1 binds heterochromatin histone marks, our results suggest that heterochromatin may be involved in the regulation of rRNA transcription by KDM2A. The KDM2A gene produces another protein, SF-KDM2A. We found that SF-KDM2A reduces a heterochromatin histone mark H4K20me3 and elevates rRNA transcription. These results suggest that the activity of KDM2A may be regulated by SF-KDM2A, because HP1 binds H4K20me3. Our results suggest that two products of the KDM2A gene cooperatively regulates the activity of rDNA chromatin, possible through control of the chromatin structures.

研究分野：細胞生物学 分子生物学

キーワード：heterochromatin rRNA KDM2A nucleoli HP1 H4K20me3 histone methylation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム遺伝子にはヘテロクロマチンとユウクロマチンの領域があり、それぞれの領域には特徴的な構成要素が存在する。ヘテロクロマチン中には転写抑制のマークとしてよく知られているヒストン H3K9me3、H4K20me3 等があり、そこに Heterochromatin Protein 1 (HP1) が結合する。HP1 にはヘテロクロマチンマークを生じさせるメチル化酵素が結合し、ヘテロクロマチン構造の維持拡大にかかわっている。rRNA をコードする遺伝子 (rDNA) はヒトでは 1 細胞あたり約 400 コピー存在し、大量に必要とされる rRNA の発現に対応しているが、すべての rDNA が転写されるわけではなく、約半はヘテロクロマチン化されたコピーとして存在する。コピーごとの rDNA のクロマチンの状態は細胞分裂後も維持されるように見える。しかし発生やがん化の過程でヘテロクロマチンとユウクロマチンの割合は変動し、それに伴い rRNA 転写のキャパシティーが変化するとされている。しかしこの動的な変換の機構及びヘテロクロマチン構造の存在意義は良くわかっていない。

これまでに我々は、ヒストン H3K36me2 脱メチル化酵素 KDM2A について研究してきた。KDM2A は核小体 に集積しており、CxxC-zf を介して非メチル CpG rDNA に結合し、グルコース飢餓時に AMPK により KDM2A の脱メチル化活性が誘導され、rDNA 転写が抑制される (EMBO J (2010) Tanaka et al ; CSF (2013) Tanaka et al ; MCB (2015) Tanaka et al)。しかし、AMPK による KDM2A 活性化、及び KDM2A による rDNA 転写抑制の分子機構はまだ明らかになっていない。興味深いことに KDM2A は rDNA のユウクロマチン領域に検出されたが、ヘテロクロマチン領域にも同程度検出された。このことは KDM2A 活性とクロマチンの状態とに関連性があることを示唆している。

ところで KDM2A 遺伝子からはもう一つのタンパク質 SF-KDM2A がつくられる。このたんぱく質は KDM2A 遺伝子の途中から転写される短い mRNA から作られ、脱メチル化酵素の責任ドメインを持たない。KDM2A の半分ほどの大きさであるが、SF-KDM2A のアミノ酸配列はすべて KDM2A に含まれており、KDM2A 機能との関連性が推察される。しかし、SF-KDM2A の機能は全く分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では (1) KDM2A 作用機序の分子機構解明。(2) SF-KDM2A の生物活性を明らかとすることを目標とした。そして上記により rDNA クロマチンの構造調節と rRNA 転写調節に関して情報を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

主にヒト乳癌細胞を用いて研究した。培養細胞において、siRNA を用い SF-KDM2A KDM2A を KD する、或いは tet-on システム等を用いて SF-KDM2A KDM2A あるいはそれらの変異体を過剰発現することの影響を検討した。

KDM2A は核小体 に局在する。そこで KDM2A 作用機序解明のために、核小体局在に必要な KDM2A 分子内の領域を決定し、その領域に結合するタンパク質を探索し、KDM2A 核小体集積、そしておそらく KDM2A の核小体での機能を調節するであろうタンパク質の同定を試みた。

また、SF-KDM2A も核小体 に集積することが明らかとなった。そこで、SF-KDM2A が作用する対象として、rDNA クロマチンへの影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) KDM2A 活性調節機構について (KDM2A が核小体 に集積する機構からのアプローチ)。タンパク質の作用機構解明には直接結合する物質の同定が重要である。KDM2A は核小体 に集積することから、KDM2A と直接結合する核小体物質の存在が想定された。そこでまず KDM2A が核小体集積するのに必要な KDM2A タンパク質の領域を決定した。その結果 KDM2A の核小体集積には少なくとも 3 つの領域が関与することが明らかになった。

次に、上記領域に結合する因子を探索した。その結果、NoLS-2 と名付けた領域に heterochromatin protein 1 (HP1) が結合すること、さらにその結合は直接的なものであり、KDM2A の NoLS-2 に存在する LxVxL motif 中の Valine 801 を使うことが明らかとなった “図 1”。

興味深いことに、HP1 の KD は KDM2A の核小体付近への集積を減らした “次ページ図 2”。また HP1 の KD は KDM2A KD と同様にグ

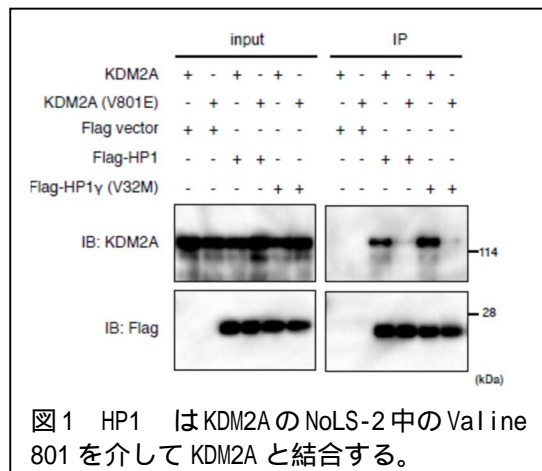


図 1 HP1 は KDM2A の NoLS-2 中の Valine 801 を介して KDM2A と結合する。

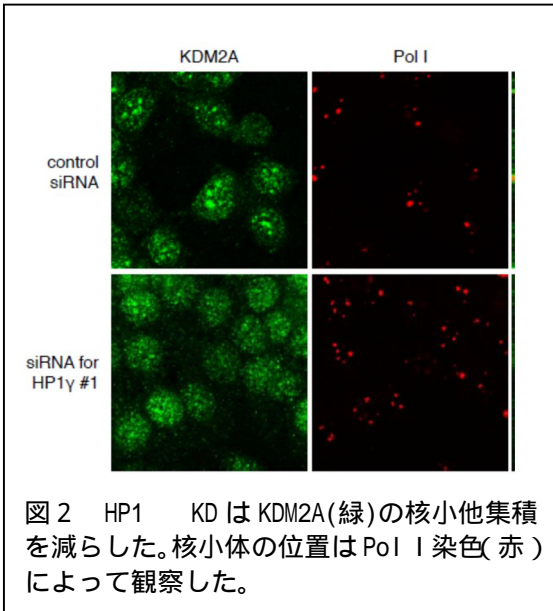


図2 HP1 KDはKDM2A(緑)の核小体集積を減らした。核小体の位置はPol I染色(赤)によって観察した。

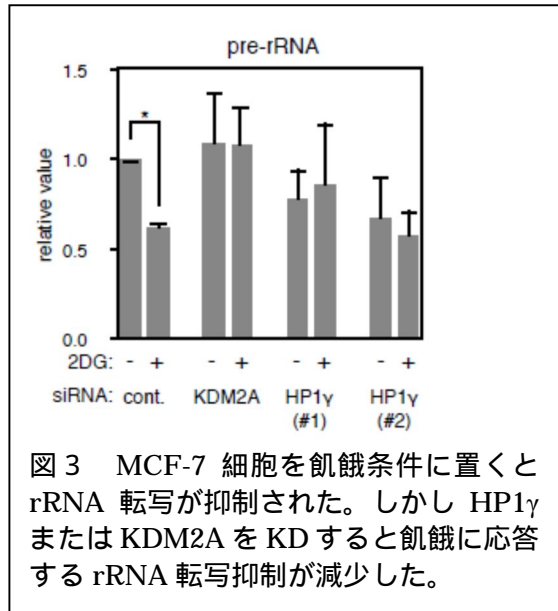


図3 MCF-7細胞を飢餓条件に置くとrRNA転写が抑制された。しかしHP1γまたはKDM2AをKDすると飢餓にตอบสนองするrRNA転写抑制が減少した。

### ルコース飢餓にตอบสนองする rRNA 転写抑制

“図3”及びグルコース飢餓による細胞増殖抑制を緩和した。

以上の研究はMCF-7という乳がん細胞株で行われたが、この現象の一般性を見るため、まず、乳がん組織と乳癌細胞株でのKDM2AとHP1の発現を調べた。その結果、ほとんどの乳癌細胞においてHP1とKDM2Aの発現が、MCF-7と同程度あることが明らかとなった。この結果はやや意外であった。すなわちHP1は染色体分離と関係しており、HP1発現減少が癌進行を促進するといわれていたからである。

そこで難治性乳癌株であるTNBCの細胞株について検討したところ、HP1・KDM2A依存的なグルコース飢餓誘導性のrRNA転写抑制・細胞増殖抑制が観察された。以上は、少なくとも乳がんでは癌化の後もKDM2A-HP1によるrRNA転写抑制機構が保持されていること、この機構の活性化が難治性乳癌であるTNBCの治療に応用できる可能性を示唆している。上記をまとめて、論文を作成した(Okamoto et al. Oncotarget 2019)。

(2) SF-KDM2Aの生物活性について：KDM2A遺伝子から作られるもう一つのタンパク質SF-KDM2Aについて研究した。SF-KDM2AもKDM2Aと同様に核小体に集積することが分かった。

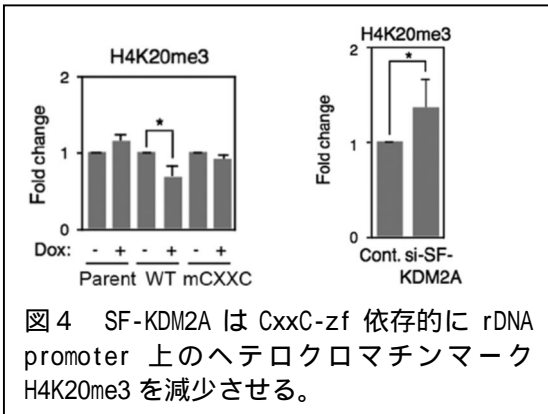


図4 SF-KDM2AはCxxC-zf依存的にrDNA promoter上のヘテロクロマチンマークH4K20me3を減少させる。

さらにSF-KDM2AはCxxC-zfドメインを介してrDNA promoterに結合し、rDNA promoter上の転写抑制のヘテロクロマチンマークであるH4K20me3を減少させ“図4”、rDNA転写を上昇することが明らかとなった“図5”。また、SF-KDM2Aは乳がんを高発現していること、SF-KDM2AのKDが乳がん細胞の増殖を抑制することから、SF-KDM2Aが癌の増殖と関連することが示唆された。以上の結果をまとめて論文とした(Okamoto et al. Int.J. Oncol. 2017)。

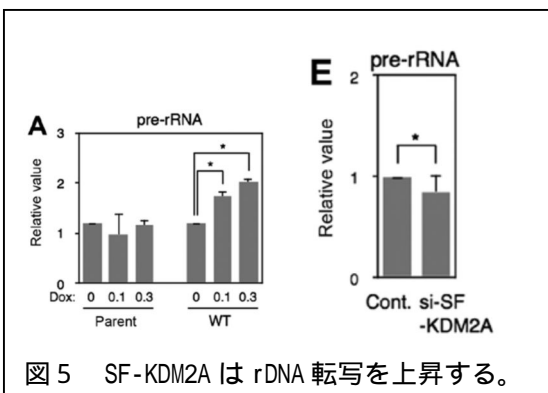


図5 SF-KDM2AはrDNA転写を上昇する。

今回の研究は2つのKDM2A遺伝子産物がrDNA遺伝子のクロマチン構造調節に関与していることを示している。両者とも核小体に集積し、rDNAに結合し、rDNAクロマチン構造に影響を与えた。KDM2AはH3K36me2を脱メチル化し、SF-KDM2AはH4K20me3を減らした。KDM2A・SF-KDM2Aともに、HP1との結合に必要なNoLS-2をもっており、HP1との結合は実験的にも確かめられた。また同様に非メチルCpGへの結合に必要なCxxC-zfも両方で保持されており、それぞれのrRNA転写調節機能に必要であった。このことはrDNAクロマチンの構造を2つのKDM2A遺伝子産物がヘテロクロマチンとユウクロマチン両方に結合しながら調節することを示唆する。

今回 KDM2A のグルコース飢餓による rRNA 転写抑制活性に HP1 が必要であることが分かった。HP1 はヘテロクロマチン結合タンパクなので、ユウクロマチン上での現象である rDNA 転写抑制にヘテロクロマチンが必要であるという可能性が考えられる。この可能性は大量に転写をしなければならぬ rDNA の半分が、なぜヘテロクロマチンとして存在するのかという疑問に答えることとなるかもしれない。すなわち rDNA のヘテロクロマチンは rDNA の転写調節に必要であるという可能性である。今後 HP1 が rDNA のヘテロクロマチン上に存在し、それが KDM2A 活性に必要かについて検討することにより、この点を明らかにしたい

SF-KDM2A は rDNA 上の H4K20me3 を減らした。H4K20me3 はヘテロクロマチンマークであり、HP1 が結合する。このことは SF-KDM2A が KDM2A 活性に影響する可能性を示唆する。飢餓応答前後で、KDM2A SF-KDM2A HP1 H4K20me3 マークが、ヘテロクロマチンまたはユウクロマチンのどちらの rDNA にどの程度存在するのかを ChIP assay により検討するなどにより、rDNA クロマチンの構造と転写について具体的なスキームが描けるようになると期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

( 1 ) Okamoto K., Tanaka Y., Ogasawara S., Obuse C, Nakayama J, Yano H., Tsuneoka M. KDM2A-dependent reduction of rRNA transcription on glucose starvation requires HP1 in cells, including triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget*. (2019) in press.

( 2 ) Okamoto K., Tanaka Y., Tsuneoka M. SF-KDM2A binds to ribosomal RNA gene promoter, reduces H4K20me3 level, and elevates ribosomal RNA transcription in breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* (2017)50:1372-82. doi: 10.3892/ijco.2017.3908.

〔学会発表〕(計 18 件)

( 1 ) 田中祐司, 小西昭充, 大日方英, 南雲美奈代, 常岡誠: メトホルミンによる KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制は TCA サイクル有機酸の影響を受ける. 第 36 回染色体ワークショップ: 第 17 回 核ダイナミクス研究会, 宝塚 2019 年 1 月 24 日

( 2 ) 常岡 誠, 岡本健吾, 田中祐司. HP1g はグルコース飢餓によるリボソーム RNA 転写抑制に必要である. 第 36 回染色体ワークショップ: 第 17 回 核ダイナミクス研究会, 宝塚 1/24, 2019

( 3 ) 田中祐司, 小西昭充, 大日方英, 南雲美奈代, 和泉桃佳, 岡本健吾, 常岡誠: メトホルミンは KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制及び細胞増殖抑制を引き起こす. 第 41 回日本分子生物学会, 横浜, 2018 年 11 月 29 日

( 4 ) 岡本 健吾, 田中 祐司, 常岡 誠. グルコース飢餓時の KDM2A によるリボソーム RNA 転写抑制には HP1 が必要である 第 41 回日本分子生物学会, 横浜 11/29, 2018

( 5 ) 田中祐司, 大日方英, 小西昭充, 南雲美奈代, 和泉桃佳, 岡本健吾, 常岡誠: メトホルミンは細胞内コハク酸量を減少させ、KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制を誘導する. 第 5 回リボソームミーティング, 新潟 (新潟大学), 2018 年 9 月 13 日 ~ 14 日

( 6 ) 岡本 健吾, 田中 祐司, 小笠原幸子, 矢野博久, 常岡 誠  
HP1 は KDM2A の核小体集積及びリボソーム RNA 転写抑制に関係する  
第 5 回 リボソームミーティング, 新潟 9/13, 2018

( 7 ) 岡本 健吾, 田中 祐司, 常岡 誠. KDM2A によるリボソーム RNA 転写抑制には HP1 の相互作用が必要である 2018 年度日本生化学会関東支部例会, さいたま 6/23, 2018

( 8 ) 田中祐司, 岡本健吾, 常岡誠 : 培養液のグルタミンは KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制を調節する. 第 35 回染色体ワークショップ: 第 16 回 核ダイナミクス研究会, 愛知 12/20, 2017

( 9 ) 田中祐司, 和泉桃佳, 南雲美奈代, 植竹愛美, 剣持榛名, 岡本健吾, 常岡誠 : メトホルミンによる KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制は栄養素により調節される. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 神戸 12/7, 2017

( 10 ) 岡本健吾, 田中祐司, 常岡 誠: SF-KDM2A(short form of KDM2A)は rRNA 遺伝子プロモーターの H4K20me3 レベルを低下させることで rRNA 転写を活性化する. 第 40 回生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸 12/6. 2017

(11) 田中祐司、剣持榛名、植竹愛美、常岡誠：メトホルミン、ビタミンCによるKDM2A依存的なrRNA転写抑制と乳がん細胞増殖抑制の解析。第39回日本分子生物学会年会 一般ポスター発表 横浜、11/30-12/2, 2017

(12) 田中祐司、剣持榛名、岡本健吾、常岡誠：メトホルミンによるKDM2A依存的な乳がん細胞増殖調節の解析。第89回日本生化学会大会 一般ポスター発表 宮城、9/25-27, 2017

(13) 田中祐司、矢野博久、小笠原幸子、吉岡勝一、岡本健吾、常岡誠：ヒストン脱メチル化酵素KDM2AによるリボソームRNA転写調節の解析。平成28年度 第56回生命科学夏の学校、一般ポスター発表 宮城、8/26-28, 2017

(14) 常岡誠、田中祐司、岡本健吾：リボソームRNA転写調節におけるHP1の役割について 第34回染色体ワークショップ、第15回核ダイナミクス研究会、一般演題、口頭発表、千葉、1/11-13, 2017

(15) 常岡誠、田中祐司、岡本健吾：Heterochromatin protein 1はKDM2Aと結合し、KDM2Aによる飢餓時のリボソームRNA発現抑制を調節する。第39回日本分子生物学会年会、一般演題、ポスター、横浜 11/30-12/2, 2016

(16) 常岡誠、田中祐司、岡本健吾：Heterochromatin protein 1 (HP1) はリボソームRNA遺伝子プロモーター上のKDM2A活性を調節する。第4回リボソームミーティング、一般演題、口頭発表、高槻、9/18, 2016

〔図書〕(計 2 件)

(1) 常岡誠、田中祐司：「核小体でのrRNA転写と飢餓」、月刊「細胞」特集「オルガネラから見た飢餓応答とエネルギー代謝制御」8月号掲載予定

(2) Chapter title: "Control of Ribosomal RNA Transcription by Nutrients" (Chapter 2)

Authors: Yuji Tanaka and Makoto Tsuneoka

Book title: "Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells - Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics" published by InTech - open science, ISBN: 978-953-51-3868-6

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。