

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07798

研究課題名(和文) rDNAエピゲノムを調節する新たな栄養素同定とそれによるリボソーム制御の解析

研究課題名(英文) Identification of nutrients to control rRNA transcription through epigenetic regulation by KDM2A in rDNA promoter.

研究代表者

田中 祐司 (Yuji, Tanaka)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：90453422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：KDM2AはヒストンH3K36me1/2を特異的に除去するヒストン脱メチル化酵素で、rDNAプロモーターでの活性発揮はrRNA転写抑制に関わる事が知られている。本研究はKDM2A活性を誘導できる化合物を新たに探索した所、メトホルミンと没食子酸を同定したものである。両者にはKDM2A活性誘導要因に違いがあり、メトホルミンでは処理で誘導されるAMPK活性化とコハク酸減少が、没食子酸では処理で誘導されるAMPK活性化とROS産生誘導がKDM2A活性誘導に関わると考えられた。以上の結果は細胞内代謝変動や栄養関連化合物処理で誘導される細胞内環境変動で生じるrDNAエピゲノムが制御される事を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本結果は糖尿病治療薬であるメトホルミンにKDM2Aを通じた抗がん的作用発揮の可能性を示すもので、既存薬の新しい作用側面を示唆するものである。また、細胞内代謝変動によってrRNA転写が制御される際、代謝中間体そのものがエピゲノムに作用できる事を示唆している。この点は代謝異常応答で中間体分子そのものが伝達物質として働く局面を示唆している。また、没食子酸によるエピゲノム制御はあまり解析されていないが、本結果は特定の食品添加物や栄養素がエピゲノム制御に関わる事を示しており、こうした作用が発揮できる化合物が他にも存在する事を想起させる。

研究成果の概要(英文)：K-demethylase 2A (KDM2A) is a specific demethylase for histone H3K36me1/2.

We previously demonstrated that KDM2A demethylases H3K36me2 in ribosomal DNA (rDNA) promoter to reduce ribosomal RNA (rRNA) transcription in response to starvation. In this study, we screened chemical-mini library to identify compound to control KDM2A activity. We found that KDM2A activity was induced by metformin, a drug for type 2 diabetes, in MCF-7 cells. The activation of AMPK and reduction of intracellular succinate by 2.5 mM metformin treatments were required in KDM2A activation.

Gallic acid was also identified as KDM2A activator from that screening. The activation of AMPK and the production of reactive oxygen species by 50 μM gallic acid treatments in MCF-7 cells. These observations suggest that the cellular condition such as energy, metabolic, and redox status, which were supplied by nutrients, converge in KDM2A to control rRNA transcription mediated by histone demethylation in the rDNA promoter.

研究分野：分子生物学

キーワード：KDM2A リボソームRNA メトホルミン 没食子酸 AMPK コハク酸 ROS 転写

## 1. 研究開始当初の背景

近年の解析から、栄養素や代謝産物が生命現象の調節因子に直接的に作用する事が明らかになってきた。この事実は、栄養素量の変化に応答した調節が存在し、それによって生物の環境適応・生命維持を行っている可能性を想起させる。

タンパク合成はリボソームで行われ生命現象の根幹であるが、リボソーム量や活性はアミノ酸や種々の栄養素で誘導されるシグナル伝達系による翻訳制御の一環で、厳密に調節される事が知られていた。この点は、タンパク合成が多種多量の材料・エネルギーを使用する為に、様々な栄養素量の変化に応答する必要がある事を示している。リボソームはリボソーム RNA (rRNA) 転写を起点に作られる事から、必要十分なリボソームの合成制御に rRNA 転写制御が重要と考えられるが、その制御機構は十分に解明されていない。また、rRNA 転写制御におけるエピジェネティックな制御についても不明な点が多く、特に栄養状態や特定の栄養素による制御誘導については、未知の部分が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

申請者らが以前より注目している *K (lysine)-demethylase 2A (KDM2A)* はヒストン H3 の K36 モノ・ジメチル (K36me2/1) 修飾を特異的に除去するヒストン脱メチル化酵素である。KDM2A などの JmjC 型ヒストン脱メチル化酵素は、副反応で KG からコハク酸への反応を行う事が生化学的に明らかにされている。実際、申請者らは以前に細胞透過性コハク酸 (DMS) が KDM2A 脱メチル化活性を抑制できる事を示した (*EMBOj 2010 p1510-*) また、ヒストンメチル化酵素はメチル基供与体に SAM を利用する事が知られている。これらの事実はヒストンメチル化制御が栄養素や代謝産物量の影響を受ける事を示している。

また、申請者はこれまでに KDM2A が飢餓時にヒストン脱メチル化依存的に rRNA 転写を抑制し、タンパク合成を調節する事を示した (*EMBOj 2010 p1510-*, *CSF 2014 p79-*)。加えて、グルコース欠乏に短時間で応答する事、応答は AMPK 活性を介する事、これが乳がん細胞増殖抑制に関わる事を示した (*MCB 2015 p4170-*)。よって、KDM2A は KG、こはく酸、AMP (グルコース・エネルギー) SAM 等の栄養量変化の影響を受けるエピゲノム制御因子と考えられる。

こうした事実は、KDM2A を介してリボソームを制御する未知の栄養素が存在する事を想像させる。そこで本研究では KDM2A を調節する新たな栄養素を探索・同定する事を目的とし、新たなニュートリエピゲノム制御機構と、それによる新しいタンパク質合成能・乳がん細胞増殖制御を明らかにすることを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) KDM2A を調節する新たな栄養素の探索

まず、栄養素の中から MCF-7 細胞の rRNA 転写を抑制する、又は細胞増殖を低下させる物質を同定する為、栄養素ミニライブラリとアッセイ系の構築を行った。栄養素ミニライブラリは、市販の食品添加物ライブラリ (Sigma #S990043-FDS1) をベースに、アミノ酸類、エピジェネティックな調節誘導が示唆される栄養素、KDM2A の調節が示唆される栄養素・化合物を追加し、約 100 種類の化合物を含むミニライブラリを作成した。このライブラリに対し、細胞増殖低下を指標にスクリーニングしたのち、KDM2A 依存的制御に関わるかをロックダウン法でス

クリーニングした。

## (2) メトホルミンによる KDM2A 依存的制御の誘導

(1)の解析結果で、KDM2A の調節が示唆される化合物に、糖尿病治療薬として知られるメトホルミンが同定されたことから、メトホルミンによる KDM2A を介した rRNA 転写抑制機構の解析を行った。メトホルミンは、AMPK を活性化する事とミトコンドリア機能への関与が報告されていたことから、KDM2A 制御における AMPK 活性化の必要性和ミトコンドリア代謝産物変動、及びその KDM2A 制御への重要性を解析した。

## (3) 没食子酸による KDM2A 依存的制御の誘導

(1)の解析で、食品添加物ライブラリの中から抗酸化を目的として使用される没食子酸が、KDM2A 依存的な細胞増殖抑制を誘導する物質として同定された事から、没食子酸による KDM2A を介した rRNA 転写抑制機構の解析を行った。没食子酸は、エピジェネティックな制御に関する報告が殆どなかったため、これまでに申請者らが同定した KDM2A 依存的制御の誘導に必要な要因である、AMPK の活性化、KG 又はコハク酸の量変動が、没食子酸により誘導されるかを解析した。これに加え、没食子酸は抗酸化を目的として使用されるが、がん細胞への処理では逆に活性酸素種の発生を促進するとの報告があったことから、MCF-7 細胞での活性酸素種発生とその KDM2A 制御への影響についても解析を行った。

## 4 . 研究成果

### (1) KDM2A を調節する新たな栄養素の探索

まず、栄養素ミニライブラリは、市販の食品添加物ライブラリ (Sigma #S990043-FDS1) 、アミノ酸 20 種、クエン酸回路中間体有機酸及びその細胞透過性誘導體、以前の解析で KDM2A の調節が示唆されていた栄養素・化合物を購入し構築した。次にこのライブラリの化合物が乳がん細胞の MCF-7 細胞の増殖を低下させるかどうかを、培養した細胞の写真撮影、及び生細胞 DNA 量から細胞数を測定するキット (CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay; Thermo 社) で解析した。その結果、約 10 の化合物に MCF-7 細胞の増殖を低下させる活性を見出したことから、次に KDM2A を siRNA 処理でノックダウンした MCF-7 細胞で解析したところ、KDM2A を発現抑制すると増殖抑制が緩和されたものとして、メトホルミンと没食子酸を同定した。

### (2) メトホルミンによる KDM2A 依存的制御の誘導

メトホルミンによる MCF-7 の細胞増殖抑制効果を変化させる化合物の探索

(1)で利用したライブラリと増殖解析系を利用し、メトホルミンによる MCF-7 の細胞増殖抑制を変える化合物を探索した所、細胞透過性コハク酸が候補として同定された。このことから、メトホルミンが KDM2A の脱メチル化活性を誘導する事で細胞増殖を低下させる可能性が考えられた。

メトホルミンによる KDM2A 依存的制御誘導機序の解析

以前の解析で、KDM2A はグルコース飢餓にตอบสนองし、AMPK 活性化を必要として rRNA 転写抑制を誘導し、細胞増殖に寄与することが分かっていた (MCB 2015 p4170-)。そこで、メトホルミン処理でも同様かを解析した所、MCF-7 細胞への 2.5 mM メトホルミン処理は、KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制を rDNA プロモーターのヒストン H3K36me2 ヒストン脱メチル化を伴って誘

導する事が明らかとなった。次に AMPK の活性化を確認した所、2.5 mM メトホルミン処理により AMPK 活性化が誘導された。AMPK 活性阻害剤処理や AMPK をロックダウンすると 2.5 mM メトホルミン処理による rRNA 転写抑制が起こりにくくなったことから、メトホルミンによる誘導でも AMPK 活性が必要であることが分かった。

メトホルミンによる MCF-7 細胞増殖抑制は、クエン酸回路有機酸の導入によって緩和されたことから、メトホルミンが細胞内有機酸量の変動を通じて、KDM2A 制御を誘導する可能性を検討した所、MCF-7 細胞に 2.5 mM メトホルミン処理を 4 時間行くと、細胞内コハク酸量が低下する事が分かった。KDM2A などの jmjC 型ヒストン脱メチル化酵素は脱メチル化反応の際、

KG からコハク酸への副反応が必要であることから、コハク酸の減少によって脱メチル化が亢進した可能性があった。そこで、コハク酸の減少による KDM2A 活性への影響を検討する為、メトホルミン処理で減少したコハク酸を細胞透過性コハク酸処理で補充した。その結果、2.5 mM メトホルミン処理で生じる rDNA プロモーターの脱メチル化、rRNA 転写抑制、細胞増殖抑制が緩和されることが分かった。

以上の結果から、MCF-7 細胞へのメトホルミンでは AMPK 活性化とコハク酸の減少を通じて KDM2A 活性を誘導し、rDNA エピゲノムを変化させ rRNA 転写抑制、及び細胞増殖抑制を誘導する事が考えられた (*Tanaka et. al., Sci Rep. 2019 Dec 10;9(1):18694*)。この結果は、メトホルミンによる調節ではコハク酸の量変動が rDNA エピゲノム調節に関わる機序の一端である事を示唆しており、栄養素による直接的なエピゲノム制御の一端出る可能性を考えている。また、AMPK の活性やコハク酸量を変動させるような化合物に同様の活性が期待できる事や、他のがん細胞制御への応用可能性を見出したと考えている。

### (3) 没食子酸による KDM2A 依存的制御の誘導

#### 没食子酸による既知 KDM2A 調節因子への作用

没食子酸によるがん細胞増殖抑制作用の機序は、あまりよく分かっていなかったため、これまでの解析で明らかにした、KDM2A 調節要因である、AMPK 活性化やコハク酸量減少が没食子酸で誘導されるかを中心に検討した。その結果、まず、MCF-7 細胞への 50  $\mu$ M 没食子酸処理は rDNA プロモーターのヒストン H3K36me2 の減少、rRNA 転写抑制を KDM2A 依存的に誘導する事が分かった。また、この没食子酸処理は MCF-7 細胞において AMPK を活性化したが、コハク酸量の減少はほとんど生じていない事が分かった。没食子酸処理時に AMPK 活性阻害剤を処理すると、没食子酸による rRNA 転写抑制が減弱したことから、没食子酸による KDM2A を介した調節においても AMPK 活性が関わることが分かった。

#### 没食子酸により生じる活性酸素種と KDM2A 調節との関連

没食子酸は食品添加物としては抗酸化を目的として使用され、抗酸化作用を発揮するが、がん細胞への処理では、逆に活性酸素種が生じるとの報告があったことから、KDM2A 制御が生じる条件でどのようになるかを検討した所、MCF-7 細胞への 50  $\mu$ M 没食子酸処理は微弱ながら活性酸素種を生じさせることが分かった。次に活性酸素種と KDM2A 調節の関連を解析した所、抗酸化物質のグルタチオンや N アセチルシステインを没食子酸と共処理すると、没食子酸による活性酸素種産生亢進は見えなくなり、没食子酸により誘導される rDNA プロモーターの脱メチル化、rRNA 転写抑制は減弱した。この事から KDM2A の活性を誘導する要因として新たに活性酸素種が関わることが明らかとなった。一方、別の科研費テーマ (20K05942) での解析から、50  $\mu$ M 没食子酸による AMPK 活性化や活性酸素種生成は正常乳腺由来の細胞株 MCF10A で

はあまり生じず、KDM2A 活性の誘導もほとんど起こらない事が分かった。以上のことから、KDM2A の活性を誘導できる新しい食品関連化合物として没食子酸が明らかになり、没食子酸によって誘導される弱い活性酸素種生成が、KDM2A 活性の誘導に関わる事が分かった (*Cells* 9(10) 2266 (2020) )。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka Yuji, Konishi Akimitsu, Obinata Hideru, Tsuneoka Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Metformin activates KDM2A to reduce rRNA transcription and cell proliferation by dual regulation of AMPK activity and intracellular succinate level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55075-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Kengo, Tanaka Yuji, Ogasawara Sachiko, Obuse Chikashi, Nakayama Jun-ichi, Yano Hirohisa, Tsuneoka Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 KDM2A-dependent reduction of rRNA transcription on glucose starvation requires HP1 in cells, including triple-negative breast cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 4743 ~ 4760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yuji, Obinata Hideru, Konishi Akimitsu, Yamagiwa Noriyuki, Tsuneoka Makoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Production of ROS by Gallic Acid Activates KDM2A to Reduce rRNA Transcription	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2266 ~ 2266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9102266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 祐司, 小西 昭充, 大日方 英, 南雲 美奈代, 岡本 健吾, 常岡 誠
2. 発表標題 メトホルミンによる細胞内コハク酸量減少と AMPK 活性化は KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制に必要である
3. 学会等名 2019年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第5回リボソームミーティング(新潟大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会(パシフィコ横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中祐司、小西昭充、大日方英、南雲美奈代、常岡誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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(Metformin represses rRNA transcription dependent on KDM2A modulated by nutrients.)
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中祐司、大日方英、伊東千華、小西昭充、常岡誠
2. 発表標題 KDM2A依存的なrRNA転写抑制はメトホルミン、及び没食子酸により誘導される。
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中祐司、大日方英、伊東千華、小西昭充、常岡誠
2. 発表標題 KDM2A依存的なヒストン脱メチル化を伴うrRNA転写抑制は没食子酸で誘導される。
3. 学会等名 第38回 染色体ワークショップ、第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 常岡誠 田中祐司	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス 月刊細胞 (細胞)	5. 総ページ数 4
3. 書名 オルガネラから見た飢餓応答とエネルギー代謝制御【核小体でのrRNA転写と飢餓】	

1. 著者名 Yuji Tanaka and Makoto Tsuneoka	4. 発行年 2017年
2. 出版社 InTechopen	5. 総ページ数 27
3. 書名 Control of Ribosomal RNA Transcription by Nutrients (Chapter of "Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells")	

〔産業財産権〕



〔その他〕

高崎健康福祉大学 研究者情報データベース  
<https://research.takasaki-u.ac.jp/Main.php?action=profile&type=detail&tchCd=0000001120>  
高崎健康福祉大学 薬学部 教員紹介ページ  
[http://www.takasaki-u.ac.jp/p\\_yaku/1561/Research map](http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku/1561/Research_map)  
[https://researchmap.jp/yuji\\_tanaka](https://researchmap.jp/yuji_tanaka)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------