

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 4 年 6 月 2 3 日現在

機関番号：3 2 3 0 5

研究種目：基盤（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：2 1 5 7 0 2 0 4

研究課題名（和文）

核小体 J m j C 蛋白 M i n a 5 3 およびコハク酸によるリボソーム形成過程の調節

研究課題名（英文）

Ablation of Mina53 in mice reduces allergic response in the airways

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

研究成果の概要（和文）：

mina53 ノックアウトマウスを用いて、*mina53* の機能解析を行なった。その結果 *mina53* ノックアウトマウスは正常に発生し、オスメスともに不妊にならなかった。しかし、Mina53 は IL-4 の発現を誘導し、アレルギー応答に正に関係していることが示唆された。今後、Mina53 ノックアウトの影響が最も強くでる細胞種を特定し、その細胞中でのリボソーム合成過程を観察する予定である。一方、コハク酸のリボソーム合成への影響を検討したところ、コハク酸は Mina53 ではなく別の JmjC 蛋白質の活性をおさえて、リボソーム RNA の転写を調節することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Asthma is a highly prevalent chronic respiratory disease affecting 300 million people world-wide. Allergic asthma is the most common form of asthma, a Th2-biased disease, and triggered by inhaling allergens such as house dust mites (HDM). In addition to the environmental factors, genetic factors are also involved in asthma. However, the interaction of these factors is complex and not fully understood. It was recently reported that Mina53 was a necessary and sufficient dose-dependent IL-4-specific repressor in naïve helper T cells, using an *ex vivo* system of Th2-differentiation from naïve helper T cells (Nat Immunol. 2009;10:872-9). However, there have been no experiments investigating the role of Mina53 in the Th2-bias *in vivo* in animals. While it had been reported that Mina53 (myc-induced nuclear antigen with a 53 kDa molecular mass; also known as *mina*) is associated with tumorigenesis, it was not clear what role Mina53 plays in non-neoplastic tissues. To directly address the functions of Mina53 in a normal body, we created *mina53*-deficient mice. While both male and female *mina53*-deficient mice grew to adulthood and were fertile, we found that Mina53 functions as an activator in the allergic response, in asthma, possibly through controlling IL-4 production. We also analyzed the effect of succinate on ribosome biogenesis, and found that succinate inhibited another JmjC protein KDM2A to increase the rDNA transcription.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Mina53、アレルギー、リボソーム

1. 研究開始当初の背景

リボソームはリボソームRNA(rRNA)と約60種のリボソーム蛋白が核小体で集合し形成される。その過程は様々な要因により調節されると考えられるが、現在のところ、特に哺乳類細胞においてはリボソーム形成の調節機構について十分な理解は得られていない。機構解明が進まない一つの理由はリボソーム形成の大変な複雑さにある。

2. 研究の目的

本研究では新たな2つの調節分子に注目し、新しい切り口でこの問題にアプローチする。第1の分子はMina53蛋白質である。この分子は申請者が同定したJmjCドメインをもつ核小体蛋白質であり、リボソーム形成を調節する可能性が最近の申請者の研究により明らかとなってきた。第2の分子はコハク酸である。この分子はクエン酸回路を構成する有機酸であるが、リボソーム形成過程を促進することが最近観察された。興味深いことに両因子は作用する点が重なる場合があることが予想される。本研究は上記分子をツールとしてリボソーム形成を調節する分子機構の新しい側面を明らかにする。

3. 研究の方法

Mina53をノックダウンするあるいはノックアウトすることにより、リボソーム形成への影響を観察する。また細胞内コハク酸量を増加し、リボソーム形成への影響を観察する。

4. 研究成果

(1) Mina53の機能解析

ヒト細胞でMina53をノックダウンしリボソーム形成に関して解析したが、変化があまり小さくなく、安定した結果を得ることが出来なかった。そこで以前より作製していた*mina53*ノックアウトマウスを利用することとした。まず*mina53*ノックアウトマウスの胎児繊維芽細胞を分離し、リボソーム合成への関与を検討した。しかし個体差が大きく正確な解析ができなかった。このことは胎児繊維芽細胞が雑多な細胞の寄り集まりであるためと考えられた。次に、均一な実質細胞が多くとれる肝臓からRNAを分離し比較検討したが、*mina53*ノックアウトによる再現性のある明確な影響は観察されなかった。そこでまずMina53が細胞機能に明確に影響する細胞種を明らかにすることとした。

12回以上バッククロスして純系度を上げたマウスを用いて、*mina53*ノックアウトの

影響を詳細に解析した。その結果 (1)ヘテロ同士のかけあわせで、ほぼメンデルの法則にしたがって*mina53*ノックアウトマウスが出生し、(2)*mina53*ノックアウトマウスは体重に有意な差が認められず大人になり、(3)ノックアウトマウスのオス・メス共に子供を作ることが出来た。Mina53は精巣に非常に多く発現していたが、オスも不稔にならなかった。このことからMina53は個体発生、生殖能に必須な因子ではないことが明らかとなった。

マウスの様々な組織での発現を検討したところ、精巣の次に胸腺・脾臓で高い発現が観察された。加えて、この研究中にMina53が液性免疫を抑制する可能性がNature Immunology誌に報告された。そこでアレルギー応答の一つである喘息に注目することとした。アレルゲンとしてエイダニ抽出液(HDM)を用い、マウスの気道に複数回吸引させ、ダニアレルギーモデルとした。まず気道刺激物質として気道にメタコリンを吸引させ、過敏性を検討した。その結果、気管でのアレルギー応答性(気道過敏性)がMina53ノックアウトにより減弱する事が明らかになった(下図)。

次に気道への炎症細胞の浸潤程度を調

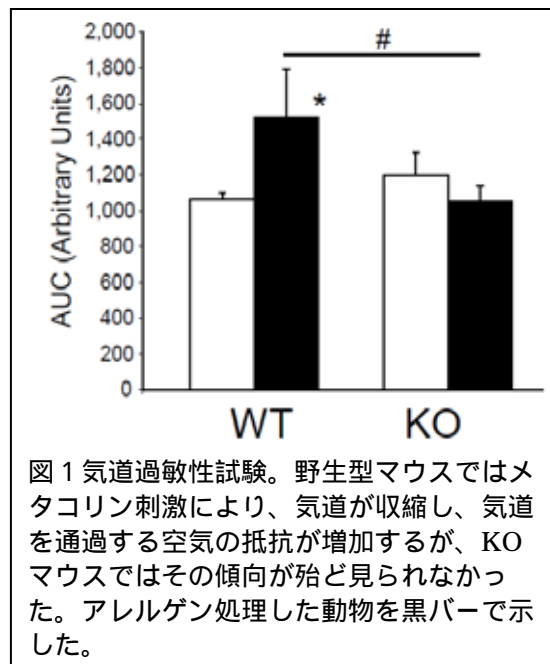


図1 気道過敏性試験。野生型マウスではメタコリン刺激により、気道が収縮し、気道を通する空気の抵抗が増加するが、KOマウスではその傾向が殆ど見られなかった。アレルゲン処理した動物を黒バーで示した。

べるため、気道の組織切片を作成し炎症細胞の数をカウントした。また、気道内に浸潤してくる細胞数を数えるため、気道洗浄液中の細胞数をカウントした。その結果、HDM 処理

により好酸球を含めて炎症細胞数が気道内に誘導されていたが、Mina53 ノックアウトマウスではその程度が減弱していた(図2、図3)

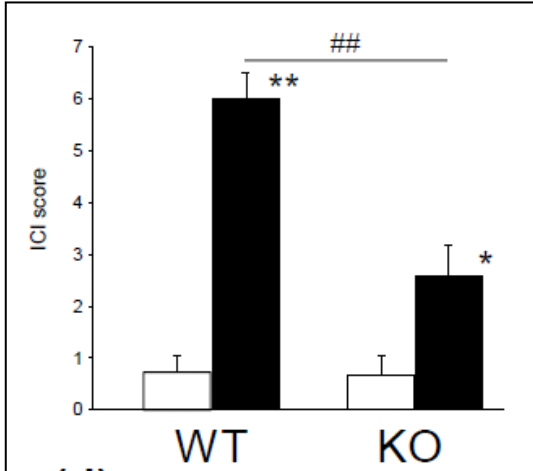


図2 炎症性細胞の気管組織への浸潤
アレルギー処理した動物の気道組織への炎症性細胞の浸潤を組織を固定、染色後、顕微鏡下でカウントした。その結果 Mina53KO マウスでは炎症性細胞の浸潤が減ることが明らかになった。アレルギー処理した動物を黒バーで示した

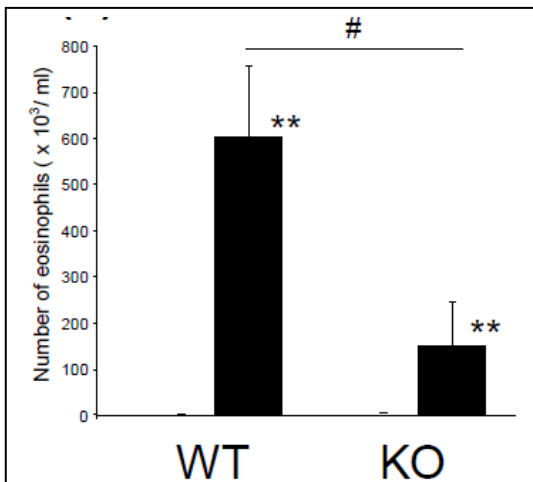


図3 気道洗浄液(BALF)に回収された好酸球の数。
アレルギー処理した動物の BALF へ好酸球の移行を顕微鏡下でカウントした。Mina53KO マウスでは細胞の移行が減っていた。アレルギー処理した動物を黒バーで示した。

アレルギー反応は Th2 偏向性によって強化される。Th2 偏向性には Th2 サイトカインと呼ばれる IL-4 や IL-5 などのサイトカインが深く関わっている。そこでこれらのサイトカインの BALF 中での存在量を定量した。IL-4 についての結果を図 4 に示した。図にあ

るように、HDM により BALF 中の IL-4 の量が明らかに増加しているが、*mina53* ノックアウトマウスでは HDM 刺激による気管中での IL-4 量増加が殆ど起こらなかった(図 4)。IL-5 の BALF での存在量の変化も IL-4 の場合と同様に Mina53 ノックアウトマウスでは減少していた。

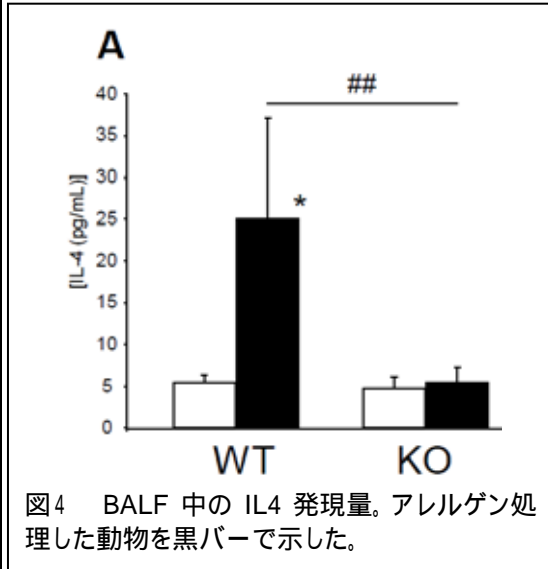


図4 BALF 中の IL4 発現量。アレルギー処理した動物を黒バーで示した。

IL-4 は Th2 サイトカインの中で中心的な働きを持っている。従って最もシンプルな機序として考えられることは、Mina53 が IL-4 の発現を何らかの方法で誘導し、Th2 偏向性を起こし、アレルギーを正に調節しているというものである。この結果をまとめ、現在雑誌に投稿中である。

この研究の結果、がん細胞以外で初めて Mina53 の生理機能を観察することができた。今後この実験系で研究を進め Mina53 ノックアウトの影響がでる細胞種を特定し、その細胞中でのリボソーム合成過程を観察することを計画している。また今回の結果から、Mina53 を喘息などのアレルギー症状の診断・治療に応用できる可能性が出てきた。

(2) コハク酸のリボソーム合成への影響。

ヒト培養細胞でコハク酸の細胞への影響を検討した。そのため細胞透過性のコハク酸である dimethylsuccinate(DMS)を利用した。検討の結果、コハク酸が飢餓時にリボソーム蓄積量を増加すること、さらに DMS の効果はリボソーム RNA の転写に影響するためであることが明らかとなった(次ページ図 5)。

核小体には Mina53 のほかに 4 つの JmjC 型の蛋白質が存在することがプロテオーム解析の結果示されていた。その中の一つである KDM2A は JmjC 依存的にヒストン脱メチル化する酵素であることが証明されていたが、細胞内での機能については報告がなかった。KDM2A は 36 番目のリジンに 2 つメチル基をもつヒストン

H3(H3K36me2)を脱メチル化する。DMSを培養液に加えたところ、KDM2Aによる脱メチル化活性がおさえられた(図6)ことから、DMSの効果がKDM2Aを介していることが予想された。

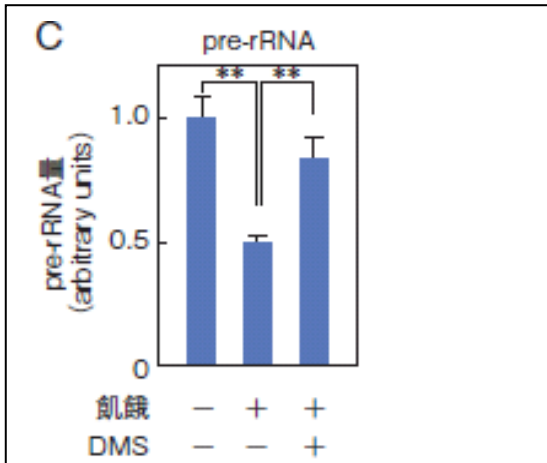


図5 リボソーム転写に与えるDMSの効果。細胞を飢餓条件で9時間培養した。

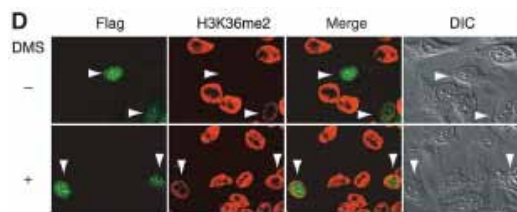


図6 KDM2Aの高発現はH3K36me2の脱メチル化を起こすが、細胞透過型コハク酸(DMS)の添加はそれを抑制した。

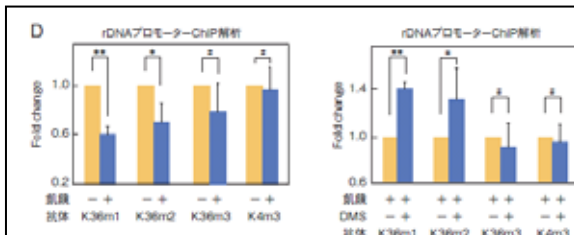


図7 リボソームRNA遺伝子プロモーター上のヒストンメチル化修飾に与える飢餓及びDMSの効果。細胞を飢餓条件で培養(左図)あるいはDMS存在下で飢餓条件で培養(右図)した後、リボソームRNA遺伝子プロモーター上のH3K36me1, H3K36me2(この2つはKDM2Aの基質となる)とH3K36me3, H3K4me3(この2つはKDM2Aの基質とならない)の量をChIP法により定量した。

そこで飢餓およびDMSが与えるrDNAプロモーター上のヒストンメチル化の様子を観察した。図7に示すようにrDNAプロモーター上でのH3K36me1/2マークの量が特異的に減少したが、DMS処理はそれを阻止した。

さらに、KDM2Aのノックダウン実験等によりKDM2Aが飢餓時にH3K36me1/2レベルを減らしrDNA転写を抑制し、蛋白合成能を調節していることが証明された。今回検討した飢餓条件では、転写活性化型のエピジェネティックマークのH3K4me3、ヘテロクロマチンマークのH3K9me2やDNAのメチル化に変化は見られなかった。以上から、KDM2AとH3K36me1/2は細胞外から伝達されるシグナルをrDNAに伝えるシグナル伝達系の構成要素であることが明らかとなった(図7)。

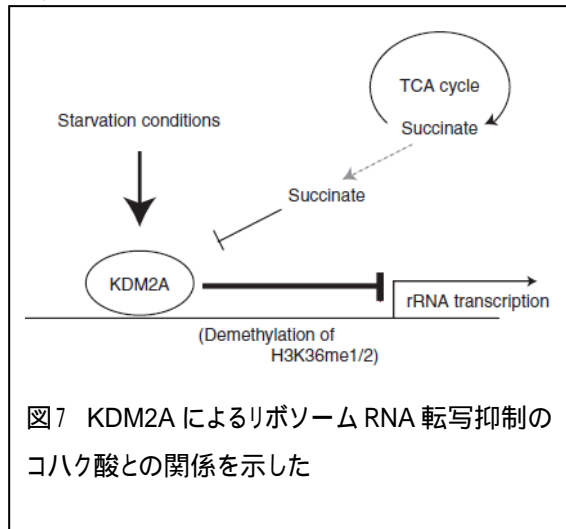


図7 KDM2AによるリボソームRNA転写抑制のコハク酸との関係を示した

この結果はまとめて雑誌に報告した(主な発表論文等に示した)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Tanaka Y., Tanaka Y., Okamoto K., Teye K., Umata T., Yamagiwa N., Suto Y., Zhang Y., Tsuneoka M. JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response to starvation. EMBO J. 2010 May 5;29(9):1510-22.

〔学会発表〕(計4件)

常岡 誠、田中祐司、岡本健吾：ヒストン修飾酵素KDM2AによるリボソームRNA転写調節

第1回リボソームミーティングで2012年3月15日(広島)

常岡 誠、田中祐司、岡本健吾：Histone

demethylase KDM2A reduces rRNA
transcription in response to starvation
第 32 回分子生物学学会ワークショップ 2011
年 12 月 16 日 (横浜)

常岡 誠 ヒストン脱メチル化酵素
KDM2A によるクロマチン構造調節とリボソ
ーム RNA 転写 遺伝研研究会 2011 年 10
月 20 日 (三島)

常岡 誠 ヒストン脱メチル化酵素に
よるリボソーム RNA 転写制御 日本生化学会
関東支部例会 2011 年 6 月 25 日 (東京新宿)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.takasaki-u.ac.jp/yaku2/idenshikinouseigyoto/ppage.htm>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

馬田敏幸 (UMATA TOSHIYUKI)
産業医科大学・産業医学研究支援施設・准
教授
研究者番号：30213482