

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 年～2012 年

課題番号：23770209

研究課題名（和文）ヒストン脱メチル化酵素 KDM2A による飢餓応答の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of repression of rDNA transcription by KDM2A in response to starvation.

研究代表者

田中 祐司 (TANAKA YUJI)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：90453422

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱メチル化酵素 KDM2A は飢餓時に rDNA プロモーターのヒストン H3K36me2 修飾の脱メチル化を介してリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) 転写を抑制し、その結果、タンパク質合成能を抑制する。本研究では KDM2A 機能発揮の機序を探った所、インスリン又はグルコースが飢餓時の KDM2A を介した rRNA 転写抑制、rDNA プロモーター部の脱メチル化を抑制できる事、そして KDM2A 中の CXXC ドメインは飢餓時に起こる rDNA プロモーター上の K36me2 脱メチル化、及び転写抑制に必要であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：In previous study, we found that histone demethylase KDM2A decreases histone H3K36me2 on rDNA promoter and represses rDNA transcription during starvation. Here, I had researched about molecular mechanisms of KDM2A to repress rDNA transcription. I showed that insulin or glucose treatment suppressed demethylation activity of KDM2A in rDNA promoter and repression of rDNA transcription in starved cells. Moreover, CXXC domain in KDM2A was required to demethylate H3K36me2 in rDNA promoter and to repress rDNA transcription during starvation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3500000	1050000	4550000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：転写、ヒストン修飾、リボソーム RNA、JmjC

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒストン修飾制御はクロマチン状態の決定や、遺伝子発現調節機構に重要である事が分かってきた。そして続々と、様々な生命現象にヒストン修飾酵素が関与する事が明らかにされてきている。最近申請者らは、

ヒストン脱メチル化酵素 KDM2A (JHDM1a/Fbxl11) が、飢餓状態の細胞でヒストン脱メチル化依存的にリボソーム DNA 遺伝子 (rDNA) 転写を抑制できることを発見した (EMBOj p 1511-1520, 2010)。KDM2A はヒストン H3 の 36 番目のリシンのジメチル/モノメチル化 (K36me1/2)

修飾を特異的に除去する酵素である。飢餓時におこる KDM2A によるヒストン脱メチル化は rRNA 転写を抑制し、最終的にタンパク質合成能を抑制しうる事が明らかとなった。

これまでの研究で KDM2A と飢餓との関連やヒストン脱メチル化を介した転写抑制能を明らかにしたが、飢餓時の KDM2A による rRNA 転写抑制の分子機構と、飢餓時におこる KDM2A の脱メチル化能を制御する因子・分子機構は分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者らの以前の研究で、KDM2A が飢餓時にヒストン脱メチル化を介して rRNA 転写を抑制する事を明らかにした。しかし、詳細な分子機構は分かっていない。

そこで以前までの研究成果を進展させ、①飢餓時に除去した成分のうち、どの培養成分が KDM2A の脱メチル化能を調節するのか。②KDM2A の脱メチル化がどのような分子機構で起こるのか。この2点を明らかにする目的で研究を開始した。

## 3. 研究の方法

(1) まず、どの培養成分が KDM2A の脱メチル化能を調節するのかを解析した。先行研究で KDM2A のヒストン脱メチル化活性を抑制する候補成分 (ヒポキサンチン、チミジン、インスリン、トランスフェリン、グルコース) が明らかになっていた為、これらをそれぞれ飢餓処理と同時に処理し、rRNA 転写の変化を定量的逆転写ポリメラーゼ反応法 (qRT-PCR) で、rDNA プロモーター部のヒストン H3K36me2 の脱メチル化状態をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) で解析した。

さらに、siRNA を用いた KDM2A 発現抑制により、これらの現象が KDM2A 依存性の反応であるかを qRT-PCR, ChIP 法により解析した。

(2) ChIP-reChIP 法による解析を行い、KDM2A が結合している rDNA プロモーター上でヒストン H3K36me2 修飾の脱メチル化が生じているかを検討した。

(3) KDM2A の脱メチル化制御機構を解析する目的で KDM2A の機能ドメイン変異体の解析を行った。KDM2A には JmjC, CXXC, PHD, F-box, LRR といった多様な機能ドメインが存在している。ものの、それぞれの機能や相互作用についてはあまりよく分かっ

ていない。そこで本研究ではこのうち、CXXC ドメインについての解析を行った。

飢餓時に起こる KDM2A 依存性の rRNA 転写抑制を qRT-PCR 法で、rDNA プロモーターへの結合、rDNA プロモーターでのヒストン H3K36me2 脱メチル化にどのように影響するかを特異的抗体を用いた ChIP 法により検討した。

## 4. 研究成果

(1) の結果、インスリンとグルコース処理は飢餓処理による rRNA 転写抑制を緩和できる事が分かった (Fig.1)。

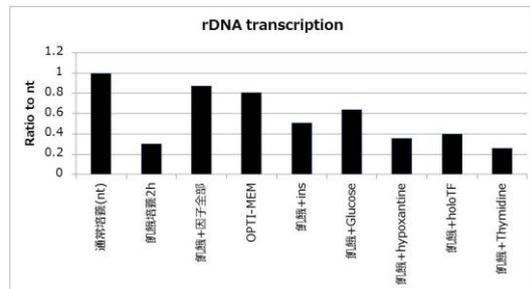


Fig.1 飢餓による rDNA 転写抑制を緩和できる通常培地の成分 OPTI-MEM で追加されている成分を飢餓培地に加えて培養した時の rDNA 転写量を RT-PCR 法で測定した。抑制が弱くなったものは「グルコース」と「インスリン」であった。処理条件は通常培養 (10% FCS, 4.5g/L glucose), 飢餓培養 (-Serum, -Glucose), インスリン (6.67ug/ml insulin), グルコース (4.5g/L glucose), ヒポキサンチン (0.1mM), ホロトランスフェリン (0.1mg/ml), チミジン (16uM), 因子全部: 下線の因子すべて

また、飢餓細胞におけるインスリン、グルコース処理は rDNA プロモーターでの H3K36me2 減少を緩和する事ができた。さらに、KDM2A 依存性を確認する為、KDM2A 発現抑制細胞での解析を行ったところ、KDM2A 発現抑制によりインスリン、グルコース処理による rRNA 転写抑制能、及び rDNA プロモーターでの H3K36me2 減少の緩和が弱くなったことから、この現象に KDM2A が関与する事が分かった (Fig.2,3)。

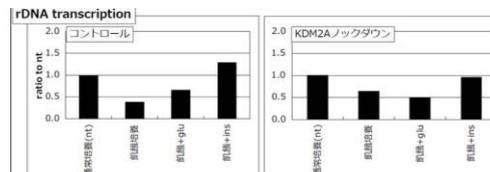


Fig.2 インスリン・グルコースによる rDNA 転写増大には KDM2A 依存性がある。KDM2A ノックダウン細胞で飢餓培養、およびグルコース・インスリン添加を行い、rDNA 転写量を RT-PCR 法で測定した。コントロールでは飢餓培地にインスリン、グルコースを添加すると rDNA 転写が増大したが、KDM2A ノックダウン細胞では増加率は少なくなった。

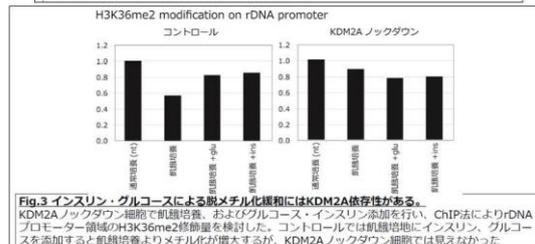


Fig.3 インスリン・グルコースによる脱メチル化緩和には KDM2A 依存性がある。KDM2A ノックダウン細胞で飢餓培養、およびグルコース・インスリン添加を行い、ChIP 法により rDNA プロモーター領域の H3K36me2 修飾量を検討した。コントロールでは飢餓培地にインスリン、グルコースを添加すると飢餓培養よりメチル化が増大するが、KDM2A ノックダウン細胞では見えなかった。

以上の結果から、培地からインスリンやグ

ルコースが欠如した時に KDM2A が活性化し rRNA 転写抑制が生じている可能性が考えられた。そして、インスリンやグルコースによる何らかの KDM2A 抑制機構が存在する事が分かった。

(2) の結果、KDM2A による脱メチル化反応は飢餓時に KDM2A が結合している rDNA プロモーターで起こるが、飢餓処理後、通常培地に置換すると元に戻る事が分かった (Fig.4)。

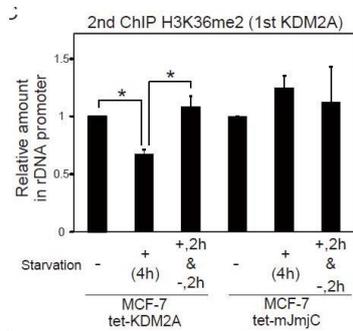


Fig.4 ChIP-reChIP法によりKDM2Aが結合しているrDNAプロモーター上でのH3K36me2修飾の変化を検討した。飢餓処理のみではメチル化の減少が見られ、飢餓処理後通常培地に置換するとメチル化の減少が見えなくなった。

この事は通常時、KDM2A は rDNA プロモーターに存在しているが、その脱メチル化活性は一部抑制された状態になっており、細胞が飢餓を認識すると KDM2A が活性化されて rDNA プロモーターの脱メチル化が生じる機構の存在が考えられた。

また、飢餓処理は rDNA プロモーター上の KDM2A の量をほとんど変化させなかった (Fig.5)。これらの事から飢餓シグナルは rDNA プロモーター上に存在している KDM2A まで伝達され、KDM2A の脱メチル化活性を変化させる可能性が推測された。この結果は、細胞外環境の栄養状態を核小体へと伝えるシグナル経路の存在を示唆している。

(3) KDM2A に存在する機能ドメインの一つ、CXXC ドメインの変異体を作成し、その機能解析を行った結果、CXXC ドメインは非メチル化 CpG 配列への親和性がある事 (データ非表示、リコンビナントタンパク質を利用した EMSA 解析を行い、明らかにした)、そして rDNA プロモーター上の蓄積に必要であることが分かった (Fig.5)。

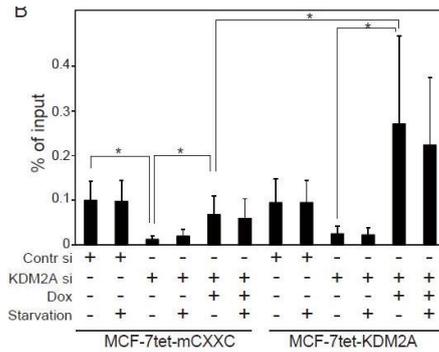


Fig.5 DoxによりKDM2A発現抑制耐性型の野生型 KDM2A、CXXC変異型KDM2Aが発現誘導される細胞株を作成し、ChIP法でrDNAプロモーターへの結合を検討した。CXXC変異型KDM2A では、野生型と比べて結合量が低下した。また、飢餓処理で結合量はあまり変化しなかった。

従って、KDM2A は DNA 結合能を介して rDNA プロモーターに結合する事が示唆された。

次に、CXXC ドメイン変異体の飢餓時における rRNA 転写抑制能、及び rDNA プロモーターでの H3K36me2 減少能を検討したところ、CXXC ドメイン変異体は飢餓時の KDM2A 依存的な rRNA 転写抑制や rDNA プロモーターのヒストン脱メチル化を起こさなかった (Fig.6)。

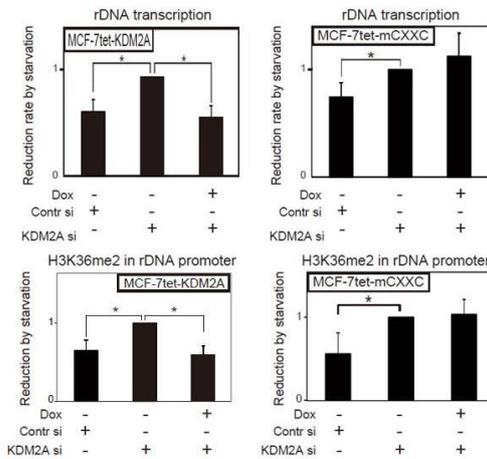


Fig.6 Fig.5と同じ細胞株を用い、飢餓時の転写抑制能をRTPCRで(a,b)、ChIP法で飢餓時のrDNAプロモーターのH3K36me2の減少率を検討した。CXXC変異は野生型で見られる転写抑制能、脱メチル化能が見られなくなった。

従って、CXXC ドメインによる DNA 結合性は KDM2A によるヒストン脱メチル化、及びそれによる rRNA 転写抑制に必要な事が明らかとなった。

これらの結果から、KDM2A はインスリン・グルコース飢餓時に活性化する事が示唆された。

この結果は、細胞が飢餓応答を行う際にインスリン・グルコースの欠如を感知して

rRNA 転写、ひいてはタンパク質合成を下げる機構が存在している事を示唆している。

そして KDM2A の CXXC ドメインによる非メチル化 DNA 結合を介した rDNA プロモーター結合性が、飢餓時に起こるヒストン脱メチル化、及び rRNA 転写抑制に必要と考えられた。

これは KDM2A による rRNA 転写抑制を起こす際には非メチル化 DNA 領域のヒストン H3K36me2 修飾を脱メチル化する事によって転写抑制を誘導する事を示唆している。

一般に rDNA はヒトなどでは細胞当たり、数百コピー存在しており、そのうちの約半分が実際に転写されるコピーとされている。そして、転写されるコピーがどの様に決定されるかは明らかにされていないが、クロマチンの修飾状態で決定されることが示唆されており、その特徴の一つは非メチル化 DNA が多い領域である事が報告されている。

よって、KDM2A のように非メチル化 DNA 領域を標的として転写抑制を誘導する事は、飢餓時に、転写されている領域を特異的に転写抑制状態へ誘導し、効率的にタンパク質合成能を落とす事で無駄を減らし、飢餓状態であっても生存できるよう、抵抗性を発揮する為の機構の可能性がある。

更なる解析で外環境の変化にตอบสนองして核小体クロマチン制御を行う仕組みを明らかにしていきたい。

## 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)

1, Tetsuya Mori, Kengo Okamoto, Yuji Tanaka, Kwesi Teye, Toshiyuki Umata, Kinuko Ohneda, Kenichi Tokuyama, Masaru Okabe, Makoto Tsuneoka  
“Ablation of Mina53 in mice reduces allergic response in the airways”  
Cell Structure and Function 査読あり、  
2013 Jun 8.,  
(DOI: <http://dx.doi.org/10.1247/csf.13006>)

[学会発表] (計 6 件)

1, 田中祐司、岡本健吾、常岡 誠  
”rRNA 転写抑制に関わる脱メチル化酵素 KDM2A と環境因子”  
2013 年 3 月 28 日、第 2 回リボソームミーティング (東京農工大)

2, 田中祐司、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 DNA のエピジェネティック調節”  
2012 年 10 月 13 日、第 56 回日本薬学会関東支部若手シンポジウム(昭和大学、招待講演)

3, 立川 かずみ, 田中 祐司, 岡本 健吾, 馬田敏幸, 常岡 誠  
”脱メチル化酵素 KDM2A (Lysine-specific demethylase 2A) によるリボソーム RNA 転写抑制機構の解析”  
2012 年 6 月 23 日 日本生化学会関東支部会 (群馬大)

4, 田中祐司、岡本健吾、常岡 誠  
”rRNA 転写調節酵素 KDM2A の活性をコントロールする環境因子”  
2012 年 3 月 15 日、第 1 回リボソームミーティング (広島大)

5, 田中祐司、岡本健吾、常岡 誠  
”脱メチル化酵素 KDM2A (Lysine-specific demethylase 2A) によるリボソーム RNA 転写抑制機構の解析”  
2011 年 12 月 16 日、第 34 回 日本分子生物・生化学会合同大会 (横浜)

6, 田中祐司、岡本健吾、常岡 誠  
”飢餓によるリボソーム RNA 転写抑制のエピゲノム解析”  
2011 年 10 月 12 日、第 2 回プロテオミクス研究会 (群馬大学、招待講演)

[図書] (計 1 件)

1, 常岡 誠、田中祐司、岡本健吾  
秀潤社 細胞工学 総説「核小体とリボソーム RNA 転写調節」 2012 年, p901-908

[その他]

ホームページ等  
研究室ホームページ (高崎健康福祉大学 薬学部 遺伝子機能制御学研究室) ;  
<http://www.takasaki-u.ac.jp/yaku2/identshi/kinouseigyoo/index.htm>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 祐司 (TANAKA YUJI)  
高崎健康福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号：90453422

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし