

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440090

研究課題名(和文)ヘテロクロマチン再考：リボソームDNAにおける転写と組換えを指標とした解析

研究課題名(英文)Regulation of a heterochromatin structure in rDNA promoter

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロクロマチン構造は必ずしも恒久的なものではなく、ユウクロマチンへの変換が起こることがある。しかし構造変換機構については不明な点が多い。本研究ではリボソームRNA遺伝子(rDNA)を題材にクロマチン構造調節について研究した。その結果、rDNA上ではH3K9me3結合蛋白質HP1はヘテロクロマチンマークとは言えないこと、ヘテロクロマチンマークH4K20me3がSF-KDM2Aにより減少すること、H4K20me3メチル化酵素Suv4-20h2がSF-KDM2Aによって正負両方向に調節されることが明らかとなった。以上はSF-KDM2AがrDNAクロマチン構造を調節する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：There are two types of chromatin structure, euchromatin and heterochromatin in eukaryotes. These structures are exchangeable, but the molecular mechanisms are not clear. In this study, we attempted to identify a molecule specific for heterochromatin and investigate the mechanism of controlling the molecule in ribosomal RNA gene (rDNA) promoter. First our data suggested that HP1, which bound to H3K9me3, was not a heterochromatin mark in rDNA promoter. Second, SF-KDM2A, which was expressed from the gene encoding histone demethylase KDM2A and did not possess the demethylase activity, reduced H4K20me3 in rDNA promoter. We found that SF-KDM2A controlled accumulation of Suv4-20h2, which resulted in elevation or reduction of Suv4-20h2, and the activities may be affected by cell culturing conditions. Our data suggest that SF-KDM2A can control the chromatin structure of rDNA in response to environmental conditions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リボソームRNA遺伝子 ヘテロクロマチン クロマチン ヒストン メチル化修飾 H4K20me3

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノム遺伝子は領域によって存在状態が異なる。テロメア やセントロメア一近傍の領域は常時ヘテロクロマチン化されており、構成的ヘテロクロマチンといわれる。一方、細胞の種類や発生の段階によって同じ遺伝子領域でもユウクロマチンとヘテロクロマチンの変換が起こる場合がある。しかし、クロマチン構造変換機構については不明な点が多い。ヘテロクロマチンの特徴として捉えられているものとして、DNA の CpG 配列のシトシンのメチル化、ヒストンの H3K9me3 とそのマークに結合する HP1 蛋白があるが、ヘテロクロマチンの分子実態は多様であり、構成分子についても完全には解明されていない。

哺乳類の細胞ではリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) のタンデムなりリピートがハプロイドあたり約 200 個あり、それが数個の染色体に分かれて存在している。大量の rDNA リピートが存在するのは、蛋白への翻訳という情報の増幅なしにそのまま機能するリボソーム RNA 分子を大量に作り出す必要があるからと考えられる。しかし rDNA は転写可能な遺伝子は半数で、残りはヘテロクロマチン化されている。これは無秩序な組み換えの回避等のためと考えられる。しかし、全く同じ配列を持つ rDNA リピートが一つの核内で異なる構造を保つ仕組みはよくわかっていない。

申請者らはヒト培養細胞を用いて rDNA 転写調節を研究してきた (Tanaka et al., 2010, EMBO. J)。その過程で以下の結果を得た。1) 同一細胞株内でも CpG のメチル化パターンが比較的容易に変化し、rDNA promoter のメチル化減少が必ずしも転写上昇に結びつかないこと、2) ヒストン脱メチル化酵素 KDM2A が rDNA promoter の非メチル CpG に結合すること、3) HP1 が rDNA promoter に存在し、HP1 の高発現が rDNA 転写を抑制すること、4) S phase

kinase-associated protein 1 (Skp1) 発現抑制により、rDNA promoter 中のメチル化 CpG 量が増加すること等を観察した。

2. 研究の目的

rDNA の場合、ヘテロクロマチン特異的マークの存在によるヘテロクロマチンの定義にあいまいさが生じている。そこで本研究では rDNA クロマチンでのヘテロクロマチンを特徴づける分子の特定、および調節機構を解析する。

(1) rDNA のヘテロクロマチン化の分子状態の特定。

(2) rDNA のヘテロクロマチンのコントロールメカニズムの解明。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞を用いて、クロマチン調節関連蛋白質の発現調節及びそれらの変異体の発現が与えるクロマチン状態の変化を ChIP 法により解析した。その際、クロマチン状態を反映する指標として rDNA 転写の程度を随時観察した。また、培養条件の変化によるクロマチン調節蛋白質の活性調節について検討した。

4. 研究成果

(1) rDNA promoter 上では H3K9me3 結合蛋白質 HP1 はヘテロクロマチンマークとは言えない。

HP1 は H3K9me3 と結合し、ヘテロクロマチン化に貢献する。rDNA promoter においても HP1

は存在し、高発現が rDNA 転写を抑制した。さらに、結合パートナーである H3K9me3 も rDNA promoter 上で ChIP 法により検出された。約 400 コピー存在するヒト rDNA の半数がヘテロクロマチン化されているとされているので、検出されたシグナルはヘテロクロマチン由来のものと考えられた。一方、KDM2A は rDNA promoter に結合しており、飢餓にตอบสนองして rRNA 転写を抑制する。この酵素は増殖

条件でも rDNA promoter に結合しているが、飢餓により活性化される (Tanaka et al., 2010, EMBO. J) ことから、KDM2A はユウクロマチン上で作用すると考えられる。実際 KDM2A はユウクロマチンのマークである非メチル CpG と結合し、細胞内の DNA メチル化を減らすと rDNA promoter への結合が増加した (図1 Tanaka et al., CSF 2014)。

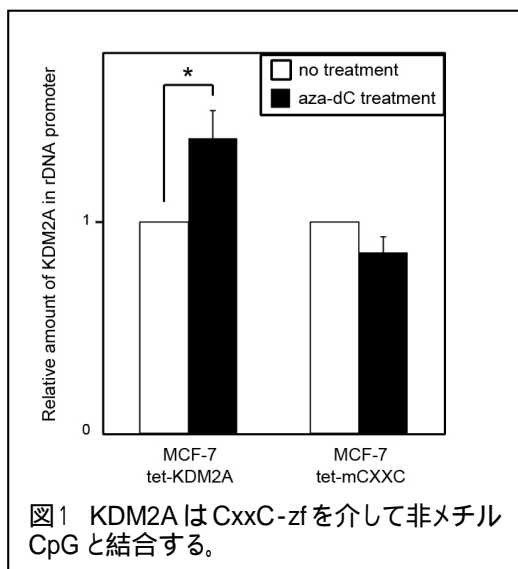


図1 KDM2A は CxxC-zf を介して非メチル CpG と結合する。

HP1 が存在する rDNA の状態に関して情報を得るため、rDNA promoter 上の HP1 と KDM2A の存在状態をシークエンシャルな ChIP 法により検討した所、両者が同一の rDNA promoter 上に共存することが明らかとなった。このことから endogenous レベルの HP1 は rDNA promoter 上ではヘテロクロマチンマークではないことが示唆された。

(2) SF-KDM2A は rDNA promoter 上でヘテロクロマチンマーク H4K20me3 を減少する。rDNA promoter 上に存在するエピゲノム調節酵素 KDM2A は H3K36me2/1 を特異的に脱メチル化するヒストン脱メチル化酵素として同定されたが、KDM2A 遺伝子は脱メチル化活性を持たない SF-KDM2A もコードしている。SF-KDM2A を発現誘導すると rDNA 転写が上昇した。そこで、SF-KDM2A の局在について検討したところ、SF-KDM2A が核小体に局在すること、rDNA に結合することが明らかとなった

(図2)。SF-KDM2A には KDM2A にも存在する非メチル CpG への結合性を持つ CxxC-ZF motif が存在する。そこで CpG 結合性を失った変異 CxxC-ZF motif を持つ SF-KDM2A について調べたところ、このたんぱく質 (SF-KDM2AmCxxC) は rDNA promoter に結合せず、rRNA 転写も上昇しなかった (図2) 以上の結果は SF-KDM2A が rDNA promoter に結合し、rDNA 転写を上昇する可能性を示している。

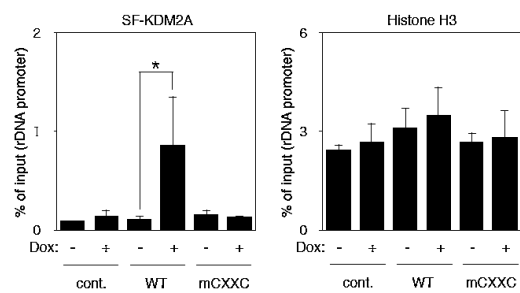


図2A SF-KDM2A の rDNA promoter への結合

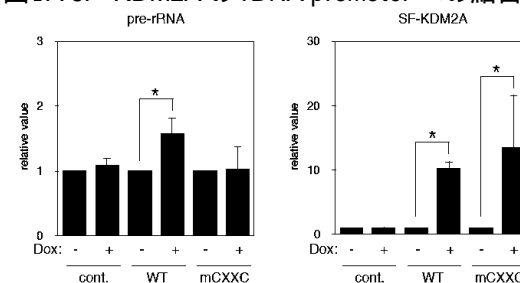


図2B SF-KDM2A による rRNA 転写促進

SF-KDM2A が rDNA promoter に結合することから、rDNA promoter 上のクロマチンの状態に SF-KDM2A が影響する可能性を検討した。rDNA promoter 上の複数のヒストンマークを検出した結果、H3K9me3 マークについては変化が見られなかったが、SF-KDM2A 発現上昇により H4K20me3 の減少が観察された。H4K20me3 の減少は SF-KDM2AmCxxC では見られず、また全長の KDM2A でも見られなかった。以上から SF-KDM2A がヘテロクロマチンマークである H4K20me3 を減少させることが明らかとなった。SF-KDM2A 自身は脱メチル化活性を持たないことから、SF-KDM2A は何らかのヒストン修飾酵素の活性を調節し、rDNA promoter の工

ピゲノム状態と rDNA 転写を調節している可能性が考えられた (岡本、分子生物学会発表, 2015)。

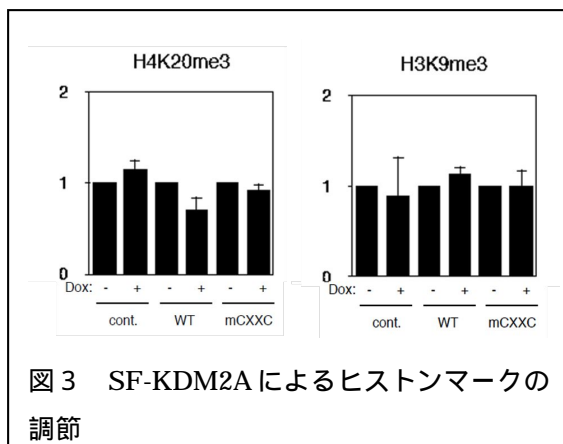


図3 SF-KDM2Aによるヒストンマークの調節

(3) PHF2 と Suv4-20h2 は rDNA promoter 上の H4K20me3 を調節する。

H4K20me3 量を調節する酵素として、メチル基を付与する Suv4-20h1 と Suv4-20h2 が、脱メチル化する酵素として PHF2 が知られている。これらのうち Suv4-20h2 と PHF2 は rDNA promoter 上に存在することが報告されている。そこでこれらの酵素と SF-KDM2A との関連性について検討した。

脱メチル化酵素 PHF2 の関与の検討。

PHF2 を KD すると rDNA promoter 上の H4K20me3 が上昇したことから、rDNA 上で H4K20me3 脱メチル化に関与することが確認された。さらに PHF2 によって SF-KDM2A の断片が回収され、両者の関連性が疑われた。しかし PHF2 KD 後も SF-KDM2A による H4K20me3 の減少は変化を受けなかった。以上から PHF2 及び SF-KDM2A は共に rDNA promoter 上の H4K20me3 を調節する点からみると関連性が疑われるが、両者の関係を明確に証明することはできなかった。

メチル化酵素 Suv4-20h2 の関与の検討。

rDNA promoter 上には H4K20 メチル化酵素 Suv4-20h2 が存在することが報告されている。Suv4-20h2 のノックダウンにより、rDNA promoter 上の H4K20me3 マークの低下を確認することができた。そこで SF-KDM2A 発現誘

導による rRNA 転写上昇への影響を観察したが、Suv4-20h2 ノックダウンは、実験ごとに SF-KDM2A の効果を抑制または増強するという両面を示し、SF-KDM2A と Suv4-20h2 の関連性が疑われたものの、両者の関係を明確に証明することはできなかった。

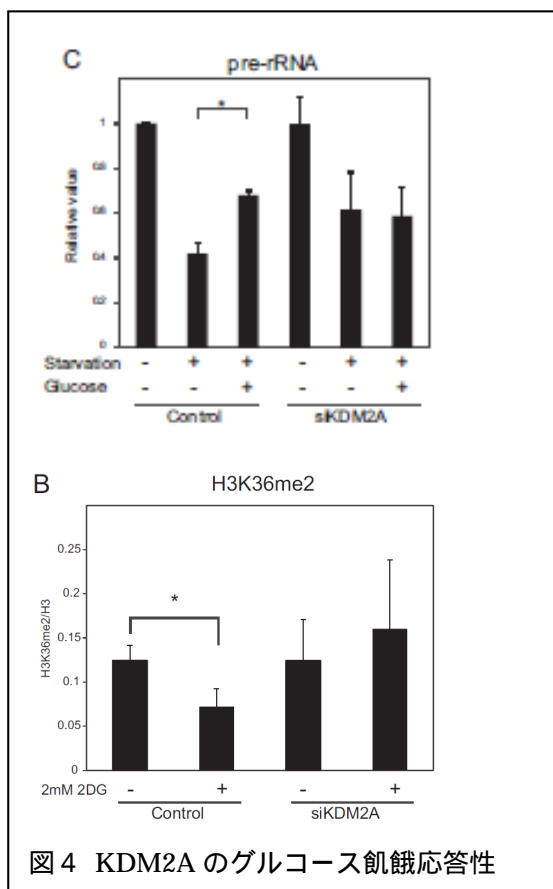
(4) SF-KDM2A は Suv4-20h2 の蓄積量に影響する。

SF-KDM2A が PHF2 あるいは Suv4-20h2 活性に影響を与えるかを、SF-KDM2A と Flag タグ付きの PHF2、あるいは SF-KDM2A と Flag タグ付きの Suv4-20h2、とを高発現することにより検討した。SF-KDM2A は PHF2 の蓄積量には殆ど影響を与えなかった。一方、SF-KDM2A 発現するベクターを Suv4-20h2 発現ベクターと co-transfection すると、Suv4-20h2 発現細胞における H4K20me3 シグナルが減少することが明らかとなった。しかし、Suv4-20h2 を SF-KDM2A と共発現させると、1細胞当たりの Suv4-20h2 シグナル強度は減少したが、Suv4-20h2 陽性を示す細胞数が増加するという矛盾する結果を得た。さらに、CxxC-zf ドメインの変異体 SF-KDM2A (SF-KDM2AmCxxC) は Suv4-20h2 発現を減少させず、PHD-zf を欠いた SF-KDM2A (SF-KDM2AdPHD) は Suv4-20h2 蓄積量を野生型よりも大きく減少させた。

以上の結果は、SF-KDM2A は Suv4-20h2 蛋白量を減少する活性と反対に増加する活性を持ち、さらにそれらの効果を引き起こすのに必要なドメインが異なることを示唆している。

(5) SF-KDM2A の活性は培養液のグルコース濃度により調節される可能性がある。前項の結果より、細胞の置かれた状況によって SF-KDM2A の機能が変化する可能性が考えられた。全長の KDM2A は SF-KDM2A の配列をすべて含んでおり、外界への応答性は両者で

類似性があると考えられる。KDM2A は飢餓に
 応答した H3K36me2 脱メチル化を示すこ
 とからこの分子の活性化状態は SF-KDM2A
 よりも追跡しやすい。そこで H3K36me2 レ
 ベルを指標に検討した所、グルコース飢餓が
 KDM2A の脱メチル化活性を調節しているこ
 とが明らかになった(図 4 Tanaka et al., MCB,
 2015)。



上記結果を報告するとともに、SF-KDM2A につ
 いても同様のグルコース飢餓への応答性を
 観察したところ、SF-KDM2A がグルコース飢餓
 時の rRNA 転写抑制をエンハンスすることが
 明らかとなった。これ等の結果から、
 SF-KDM2A 機能を調節する環境要因がグルコ
 ースであること、この調節機構を介して
 SF-KDM2A が rDNA のエピゲノムを制御するこ
 とが示唆された。

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 6 件)

Tanaka Y, Yano H, Ogasawara S, Yoshioka S, Imamura H, Okamoto K, Tsuneoka M. Mild Glucose Starvation Induces KDM2A-Mediated H3K36me2 Demethylation through AMPK To Reduce rRNA Transcription and Cell Proliferation. *Mol Cell Biol*. 2015; 35(24):4170-84. 査読有

Tsuneoka M, Tanaka Y, Okamoto K. A CxxC domain that binds to unmethylated CpG is required for KDM2A to control rDNA transcription. *Yakugaku Zasshi*. 2015;135(1):11-21. doi: 10.1248/yakushi.14-00202-2. Japanese. 査読無

Tanaka Y, Umata T, Okamoto K, Obuse C, Tsuneoka M. CxxC-ZF domain is needed for KDM2A to demethylate histone in rDNA promoter in response to starvation. *Cell Struct Funct*. 2014;39(1):79-92. 査読有

常岡 誠, 剣持直哉:「リボソームの機能調節と疾患」*生化学*(日本生化学会編生化学特集号企画) 2013 Vol. 85. 10月号 査読なし

田中祐司, 常岡 誠リボソーム RNA 遺伝子の転写調節[Control mechanisms of ribosomal RNA transcription]. *生化学*(日本生化学会編) 2013 Vol. 85. 10月号 (852-860) 査読無

Mori T, Okamoto K, Tanaka Y, Teye K, Umata T, Ohneda K, Tokuyama K, Okabe M, Tsuneoka M. Ablation of Mina53 in mice reduces allergic response in the airways. *Cell Struct Funct*. 2013, 38, 155-67. 査読有

[学会発表](計 17 件)

常岡 誠, 田中祐司, 岡本健吾: KDM2A による rRNA 転写抑制に HP1 が関与する. 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会 松島一の坊、宮城県宮城郡, 1/12-14, 2016

岡本健吾, 田中祐司, 常岡 誠: KDM2A 遺伝子がコードする脱メチル化活性を示さない SF-KDM2A (short form of KDM2A) はリボソーム RNA 転写を正に制御する. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、一般演題, ポスター, 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市, 12/3, 2015

田中祐司、矢野博久、小笠原幸子、吉岡勝一、岡本健吾、常岡誠：KDM2A はマイルドなグルコース飢餓時に AMPK シグナル経路を介して rRNA 転写と細胞増殖を調節する。第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、一般演題、ポスター、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市、12/1-4, 2015

常岡誠、田中祐司、矢野博久、小笠原幸子、吉岡勝一、岡本健吾：KDM2A はマイルドなグルコース飢餓で AMPK によって活性化され、リボソーム RNA 転写と細胞増殖を調節する。平成 27 年度日本生化学会関東支部例会、一般演題、ポスター、新潟日報メディアシップ 新潟県新潟市、6/20, 2015

常岡誠、南雲政彦、中村美由記、福島嵩、中村辰紀、田中祐司、岡本健吾：KDM2A が核小体に集積する機構について 第 3 回リボソームミーティング、ANA ホリデイ・イン リゾート宮崎 宮崎県宮崎市、3/17, 2015

田中祐司、吉岡勝一、山田志織、岡本健吾、常岡誠：AMPK シグナル経路は rDNA プロモーター上のヒストン脱メチル化酵素 KDM2A を活性化する。第 3 回リボソームミーティング、ANA ホリデイ・イン リゾート宮崎 宮崎県宮崎市、3/17, 2015

常岡 誠、田中祐司、岡本健吾：AMPK-KDM2A 経路はマイルドなグルコース飢餓で活性化され rRNA 転写を抑制する。第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会、安芸グランドホテル、広島県廿日市、12/15-17, 2014

田中祐司、吉岡勝一、岡本健吾、常岡 誠：AMPK シグナル経路は KDM2A 依存的ヒストン脱メチル化を活性化する。第 37 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、11/25, 2014

岡本健吾、田中祐司、常岡 誠：KDM2A 遺伝子がコードする脱メチル化活性を示さない SF-KDM2A (short form of KDM2A) による rRNA 転写調節、平成 26 年度日本生化学会関東支部例会、一般演題、ポスター、茨城大学理学部 K 棟インタビュースタジオ、茨城県水戸市、6/14, 2014

田中祐司、馬田敏幸、岡本健吾、常岡誠：ヒストン脱メチル化酵素 KDM2A による飢餓時のリボソーム RNA 転写抑制機構の解析。冬の若手ワークショップ 2014 (口頭発表)(転写研究会他主催): 舌切雀のお宿 磯部ガーデン、群馬県安中市、1/30-2/1 2014

田中祐司、馬田敏幸、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。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市、12/3-6, 2013.

森 哲哉、岡本健吾、田中祐司、Teye Kwesi, 馬田敏幸、大根田絹子、徳山研一、岡部 勝、常岡 誠：Mina53 ノックアウトは気道でのアレルギー応答を減弱する。第 36 回日本分子生物学会年会。神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市、12/3-6, 2013.

常岡 誠、田中祐司、岡本健吾：飢餓シグナルによる rDNA 転写調節について 第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会 ホテルおかだ、神奈川県足柄下郡、11/25-27, 2013

Tanaka Y, Umata T, Okamoto K, Teye K, and Tsuneoka M : JmjC enzyme KDM2A regulates rRNA transcription in response to starvation. 酵母エピジェネティクス国際会議：福井県グランディア芳泉、福井県あわら市 9/2-5, 2013

岡本健吾、田中祐司、常岡 誠：KDM2A 遺伝子がコードする脱メチル化活性を示さない SF-KDM2A (short form of KDM2A) はリボソーム RNA 転写を正に制御する、平成 25 年度日本生化学会関東支部例会、一般演題、口演、山梨大学甲府キャンパス、山梨県中央区、6/15, 2013

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・産業医学支援機構・准教授

研究者番号：330437754

岡本健吾 (OKAMOTO, Kengo)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：60437754