

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840011

研究課題名(和文)細胞外環境の変化によって起こる核小体へのシグナル伝達機構の解析

研究課題名(英文)Environmental conditions control nucleolar signaling to regulate ribosomal RNA transcription by KDM2A (K-specific demethylase)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、飢餓時に起こるKDM2Aの調節機構を明らかにする目的で行った。その結果、グルコース飢餓、又はマイルドな2DG処理に応答し、AMPK活性を介してKDM2A依存的なrDNAプロモーターのH3K36me2脱メチル化、rRNA転写抑制が誘導される事が分かった。また、マイルドな2DG処理はKDM2A依存的な細胞増殖抑制を誘導する事、乳がんの悪性度に関わらず機構が存在している事が分かった。この結果は、細胞がマイルドな飢餓時から応答しrRNA転写、ひいては細胞増殖を調節しうる事、KDM2AによるrDNAクロマチン制御を通じて調節される事を示している。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found that serum and glucose starvation induces KDM2A activity to demethylate histone H3K36me2 on rDNA promoter and repress rRNA transcription. However, the molecular mechanism to control KDM2A is unclear.

In this study, we found the glucose starvation alone or 2-deoxyglucose (2DG), the inhibitor of glycolysis, could induce those KDM2A activities. Especially, low concentration of 2DG, that is mild starvation condition, induced those completely depended on KDM2A. The mild starvation could activate AMPK. The activity was required to induce the KDM2A activities. These KDM2A-dependent regulations existed in MCF-7 and MDA-MB-231 (TNBC) cells. In both cell-lines, mild starvation reduced cell proliferations dependent on KDM2A. In human breast cancer tissue, KDM2A were expressed in breast cancer cells independent on malignancy. These results suggested that mild starvation induced KDM2A-dependent demethylation and rRNA repression mediated by AMPK to control cell proliferation.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム rRNA転写 KDM2A ヒストン脱メチル化 グルコース飢餓 AMPK TNBC

1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾制御はクロマチン状態の決定や、遺伝子発現調節に重要である。申請者の以前の解析で、ヒストン脱メチル化酵素 KDM2A (K-specific demethylase 2A) は飢餓にตอบสนองして rDNA プロモーターのヒストン H3K36me2 脱メチル化を介して rRNA 転写抑制を誘導する事を明らかにした (EMBOJ p 1511-1520, 2010)。この結果は、細胞外環境の変化を核小体クロマチンに伝えるシグナル伝達の存在、及び KDM2A 脱メチル化活性調節機構の存在を示唆している。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではヒストン脱メチル化酵素 KDM2A の活性制御機構を明らかにし、細胞外環境の変化を核小体クロマチンへ伝えるシグナル伝達機構を明らかにする事を目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

以前の解析では、飢餓を血清・グルコース欠如により誘導していた。この事は除去成分の中に KDM2A の活性を調節する分子が存在する事を示していた。

まず KDM2A の活性を調節する因子をこの成分の中から、rRNA 転写抑制、及び rDNA プロモーターのヒストン脱メチル化を指標に同定した。次にこの応答がどのシグナル経路を介しているかを阻害剤・誘導剤、及び候補因子のノックダウンにより同定した。さらに、この応答が、がん細胞の増殖性に寄与するかをセルカウント法などにより検討した。最後に悪性度の異なるがん細胞で比較する事で、本制御の保存性と、がん制御への応用の可能性を検討した。

4. 研究成果

まず KDM2A が活性化する飢餓要因を詳細に解析した。その結果、グルコース飢餓、又はグルコース代謝阻害剤の2-デオキシグルコース(2DG)に KDM2A が応答する事が分かった(図1)。

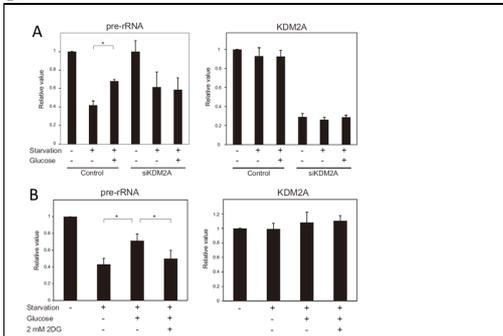


図1: グルコース処理によるrRNA転写抑制緩和はKDM2A依存的である。A. 飢餓時、及びグルコース添加細胞でのrRNA転写抑制をqRT-PCR法で検討した。B. グルコース処理による飢餓時のrRNA転写抑制緩和は2DG同時処理によって抑制された。

特に低濃度(マイルドな)2DG処理でrDNAプロモーターのH3K36me2脱メチル化、rRNA転写抑制がKDM2A依存的に誘導される事が分

った。また、グルコース飢餓でも同様の現象が誘導できる事が明らかとなった(図2)。

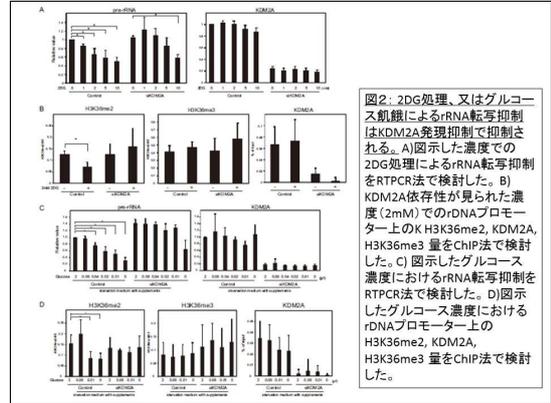


図2: 2DG処理、又はグルコース飢餓によるrRNA転写抑制はKDM2A発現抑制で抑制される。A) 図示した濃度での2DG処理によるrRNA転写抑制をRTPCR法で検討した。B) KDM2A依存性が見られた濃度(2mM)でのrDNAプロモーター上のH3K36me2, KDM2A, H3K36me3量をChIP法で検討した。C) 図示したグルコース濃度におけるrRNA転写抑制をRTPCR法で検討した。D) 図示したグルコース濃度におけるrDNAプロモーター上のH3K36me2, KDM2A, H3K36me3量をChIP法で検討した。

このKDM2Aが応答する処理濃度はグルコース飢餓にตอบสนองする他のrRNA転写因子(TIF-1A)より低濃度である事が分かった(図3)。

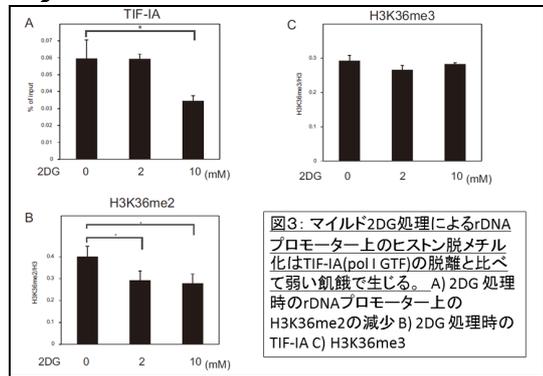


図3: マイルド2DG処理によるrDNAプロモーター上のヒストン脱メチル化はTIF-1A(polI GTF)の脱離と比べて弱い飢餓で生じる。A) 2DG処理時のrDNAプロモーター上のH3K36me2の減少 B) 2DG処理時のTIF-1A C) H3K36me3

この事は、マイルドな飢餓のrRNA制御では、転写因子制御よりもクロマチン制御が先に誘導される事を示唆している。

一方、先の2DG処理はマイルドな条件であっても細胞内ATPレベルを低下させ、AMPKを活性化させた(図4)。

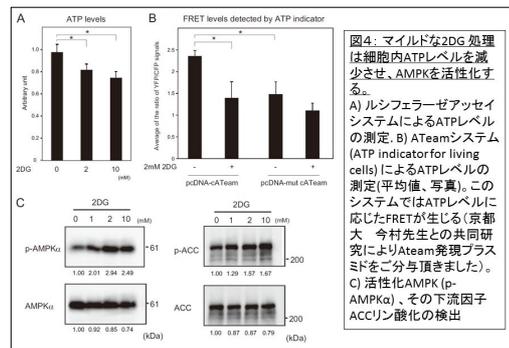


図4: マイルドな2DG処理は細胞内ATPレベルを低下させ、AMPKを活性化させる。A) ルシフェラーゼアッセイシステムによるATPレベルの測定。B) Ateamシステム(ATP indicator for living cells)によるATPレベルの測定(平均値、写真)。このシステムではATPレベルに応じたFRETが生じる(京都大 今村先生の共同研究によりAteam発現プラスミドをご分頂きました)。C) 活性化AMPK(p-AMPKα)、その下流因子ACCリン酸化の検出

そこで、AMPKによるKDM2Aを介したrRNA転写抑制が存在するかを検討した。まず、rRNA転写へのAMPKの寄与についてAMPKリン酸化活性阻害剤のcompound C、及びAMPKノックダウン法により検討した。その結果、マイルドな2DG処理時のrRNA転写抑制はAMPK活性を介する事が分かった(図5)。

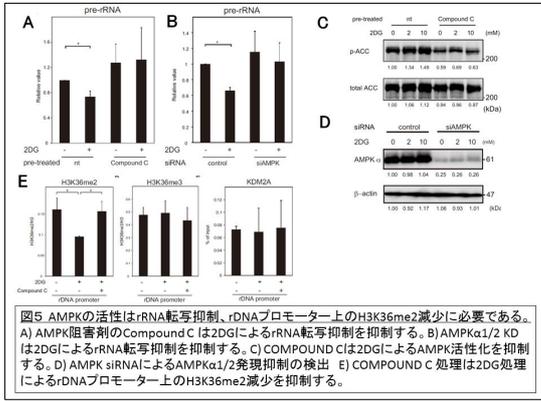


図5 AMPKの活性はrRNA転写抑制、rDNAプロモーター上のH3K36me2減少に必要である。A) AMPK阻害剤のCompound Cは2DGによるrRNA転写抑制を抑制する。B) AMPK1/2 KDは2DGによるrRNA転写抑制を抑制する。C) COMPOUND Cは2DGによるAMPK活性化を抑制する。D) AMPK siRNAによるAMPK1/2発現抑制の検出 E) COMPOUND C処理は2DG処理によるrDNAプロモーター上のH3K36me2減少を抑制する。

今回は AMPK 活性依存的 rRNA 転写抑制が KDM2A を介して起こるかを、AMPK 活性化剤の 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) 及び KDM2A ノックダウン法を用いて検討した。その結果、AMPK 活性化による rDNA プロモーターのヒストン脱メチル化、及び rRNA 転写抑制は KDM2A 依存的に起こる事が分かった (図6)。

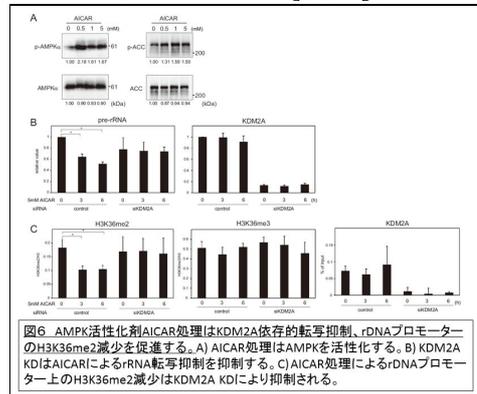


図6 AMPK活性化剤AICAR処理はKDM2A依存的転写抑制、rDNAプロモーターのH3K36me2減少を促進する。A) AICAR処理はAMPKを活性化する。B) KDM2A KDはAICARによるrRNA転写抑制を抑制する。C) AICAR処理によるrDNAプロモーター上のH3K36me2減少はKDM2A KDにより抑制される。

以上の事から、KDM2A による応答は AMPK シグナル経路を介する事が明らかとなった。

次に、KDM2A による応答が、乳がん細胞等の増殖に作用するかを検討した。先の実験では乳がん細胞の MCF-7 細胞を用いたが、異なる悪性度の MDA-MB-231 細胞 (TNBC) も含めて解析を行った。まず、MDA-MB-231 細胞で KDM2A 依存的な rRNA 転写調節の有無を検討した所、存在する事が分かった (図7)。

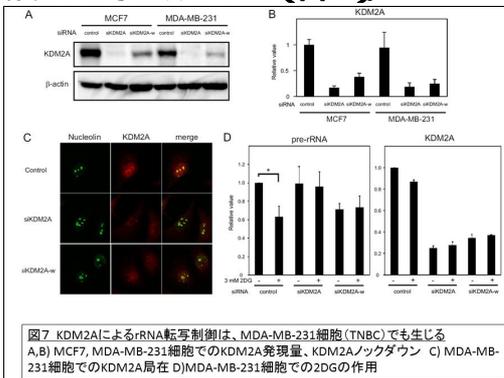


図7 KDM2AによるrRNA転写抑制は、MDA-MB-231細胞(TNBC)でも生じる。A,B) MCF7, MDA-MB-231細胞でのKDM2A発現量、KDM2Aノックダウン C) MDA-MB-231細胞でのKDM2A局在 D)MDA-MB-231細胞での2DGの作用

この事は、乳がん細胞の悪性度進行後であっても KDM2A による制御が消失していない事を示唆している。

そこで、ヒト乳がん組織の KDM2A 発現を

検討した所、腫瘍部・非腫瘍部双方に発現が見られた (図8)。

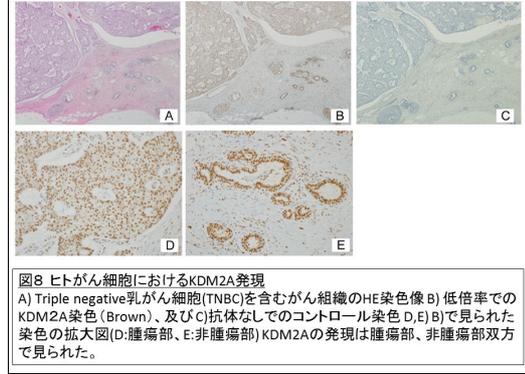


図8 ヒトがん細胞におけるKDM2A発現
A) Triple negative乳がん細胞(TNBC)を含むがん組織のHE染色像 B) 低倍率でのKDM2A染色 (Brown)、及び C)抗体なしでのコントロール染色 D,E) B)で見られた染色の拡大図(D:腫瘍部、E:非腫瘍部) KDM2Aの発現は腫瘍部、非腫瘍部双方で見られた。

また、多数のサンプル解析で、乳がん細胞の悪性度マーカーと共に KDM2A 発現を検出した結果、悪性度と関連なく KDM2A が発現している事が分かった。

次に rRNA 量低下が細胞増殖に作用するかを検討した。まず、マイルドな 2DG 処理時と同程度の rRNA 転写抑制を起こす PoI 1 阻害剤処理を行って MCF-7 と MDA-MB-231 細胞を用いて比較した所、両細胞共に 2DG 処理時と同程度の細胞増殖抑制を起こした。

次に、両細胞でマイルドな 2DG 処理による細胞増殖抑制を解析した所、両細胞で KDM2A 依存的に細胞増殖抑制が生じた (図9)。

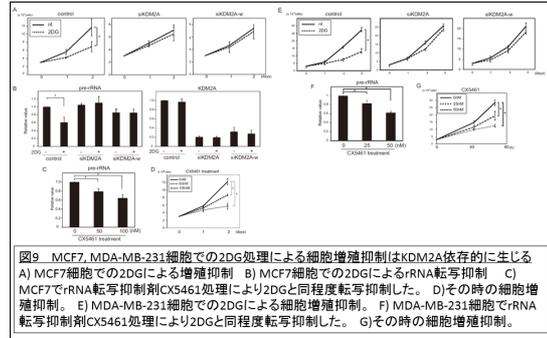


図9 MCF7, MDA-MB-231細胞での2DG処理による細胞増殖抑制はKDM2A依存的に生じる。A) MCF7細胞での2DGによる増殖抑制 B) MCF7細胞での2DGによるrRNA転写抑制 C) MCF7でrRNA転写抑制剤CX5461処理により2DGと同程度転写抑制した。D)その時の細胞増殖抑制。E) MDA-MB-231細胞での2DGによる細胞増殖抑制。F) MDA-MB-231細胞でrRNA転写抑制剤CX5461処理により2DGと同程度転写抑制した。G)その時の細胞増殖抑制。

以上の結果は、マイルドな飢餓時に AMPK シグナル経路を介して KDM2A は rDNA クロマチン制御・rRNA 転写抑制をする事、これが、乳がん細胞のマイルドな飢餓時の増殖制御に作用する事を示している。

これらの研究成果は国際科学雑誌の *Molecular and Cellular Biology* 誌に受理された。

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4件)

- 1, Mild glucose starvation induces KDM2A-mediated H3K36me2 demethylation

- through AMPK to reduce rRNA transcription and cell proliferation.
- Tanaka Y**, Yano H, Ogasawara S, Yoshioka S, Imamura H, Okamoto K, Tsuneoka M.
- Mol Cell Biol.* vol. 35. (24):p4170-84. 2015. Doi: 10.1128/MCB.00579-15.
- 2、非メチル CpG を認識する CxxC ドメインはヒストン脱メチル化酵素 KDM2A の rDNA 転写調節に必要である。
- 常岡 誠、**田中祐司**、岡本健吾
- YAKUGAKU ZASSHI (総説)* Vol. 135. p11-21. 2015. DOI:10.1248/yakushi.14-00202-2
- 3、CxxC-ZF domain is needed for KDM2A to demethylate histone in rDNA promoter in response to starvation.
- Tanaka Y**, Umata T, Okamoto K, Obuse C, Tsuneoka M
- DOI:http://doi.org/10.1247/csf.13022
- Cell Struct Funct.* 39(1):p79-92. 2014.
- 4、リボソーム RNA 遺伝子の転写調節 (control mechanisms of ribosomal RNA transcription)
- 田中祐司**、常岡 誠
- 生化学 (総説)* vol. 85, p 852-860, no10, 2013
- URL:http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/06/85-10-05.pdf

[学会発表](計8件)
(演者として発表したもののみを記載)

1. **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 活性を介して rRNA 転写と細胞増殖を抑制する。平成 27 年度 冬の若手ワークショップ@山中湖, 一般口頭: 山中湖畔荘ホテル清溪(山梨) 2/4-6, 2016
2. **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, 一般ポ

スター: 神戸ポートアイランド(兵庫)
12/1-4, 2015

3. **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, 一般口頭: ANA ホリデイインリゾート宮崎(宮崎) 3/17, 2015
4. **田中祐司**: AMPK シグナルにより誘導される KDM2A 依存的リボソーム RNA 転写抑制。第 4 回薬学部研究発表会(薬学 FD ワークショップ), 一般口頭: 高崎健康福祉大学(群馬) 3/10, 2015
5. **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, 一般ポスター: パシフィコ横浜(神奈川) 11/25, 2014
6. **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, 一般口頭: 磯部温泉(群馬) 1/30-2/1, 2014
7. **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。日本分子生物学会年会, 一般ポスター: 神戸ポートアイランド(兵庫) 12/3-6, 2013.
8. **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, 一般ポスター: グランディア法泉(福井) 9/2-5, 2013

[その他]
ホームページ等
高崎健康福祉大学 教員紹介ページ
http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku/15616
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