

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15216

研究課題名(和文) ヒストンアセチル化とメチル化のクロストークを担う転写コレギュレーターの研究

研究課題名(英文) Investigation of the transcriptional coregulator involved in crosstalk between histone acetylation and methylation

研究代表者

西 英一郎 (Nishi, Eiichiro)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30362528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナルディライジン(NRDC)はM16ファミリーに属するメタロエンドペプチダーゼで、細胞表面では膜タンパク質の細胞外ドメイン切断を活性化する。一方核内でNRDCはH3K4me2と特異的に結合し転写を制御する。遺伝子改変マウスの解析から、NRDCががん、炎症性疾患、エネルギー代謝に重要な役割を果たすことが明らかになった。本研究では不死化したマウス線維芽細胞を用い、クロマチン免疫沈降シーケンスとRNAシーケンスを組み合わせてゲノムワイドな網羅的解析を行い、NRDCがエピジェネティックなヒストン修飾と転写制御を介して細胞周期を調節していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Nardilysin (NRDC) is a metalloendopeptidase of the M16 family and activates ectodomain cleavage of membrane proteins on the cell surface. On the other hand, nuclear NRDC specifically binds to H3K4me2 and controls transcriptional regulation. Analysis of genetically-modified mice revealed that NRDC play important roles in cancer, inflammation and energy metabolism. In the present study, we combined high-throughput chromatin immunoprecipitation-sequencing and RNA-sequencing analyses to achieve the first genome-wide identification of NRDC target genes in immortalized mouse embryo fibroblasts. We found that global H3K9ac and H3K4me2 levels at NRDC-binding promoters were controlled and that a set of genes integral to cell cycle maintenance was directly activated by NRDC. Collectively, these results suggest that the NRDC-mediated epigenetic regulation of cell cycle-associated genes is a fundamental component of the biological functions of NRDC.

研究分野：薬理学、分子病態医化学

キーワード：転写コレギュレーター ヒストン修飾 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

転写コレギュレーターとは、核内受容体や転写因子に結合して転写を制御する分子の総称である。これまでに同定された400を越える転写コレギュレーターには、アセチル化、メチル化、ユビキチン化酵素など様々な酵素が含まれており、ヒストン、DNA、転写因子などの翻訳後修飾を介して転写制御を担うという複雑な様相が明らかになってきた。中でもヒストンのアセチル化、メチル化修飾の重要性は、転写調節から疾患における意義まで様々な形で検証され、現在では主要な創薬標的のひとつとなっている。

我々はこれまでメタロペプチダーゼ nardilysin (NRDC) の細胞外機能に焦点をあてて研究してきた (EMBO2001, JBC2006, Nat Neurosci 2009, EMBO Mol Med 2012 など) が、最近 NRDC が核に存在し H3K4me2 に修飾特異的に結合すること、NCoR/SMRT/HDAC3 コリプレッサー複合体と結合することを明らかにした (JBC2012)。さらに野生型および NRDC 欠損細胞で発現レベルに差がある遺伝子のうち、複数遺伝子のプロモーター上に NRDC が存在し、H3 アセチル化を制御していることを示した (JBC 2012)。一方 NRDC 欠損マウスの解析から、NRDC が適応熱産生を負に制御していること、その機序として NRDC がその酵素活性依存的に PGC1- $\alpha$  の転写コアクチベーター機能を抑制し、脱共役タンパク質 UCP1 発現を抑制していることを報告した (Nat Commun. 2014)。以上の結果は、NRDC が新たなヒストンコードリーダー、そしてペプチダーゼ活性依存性転写コレギュレーターであることを示唆した。さらにその後の研究から、NRDC が HDAC3 だけではなく HDAC1 とも複合体を形成し、p53 など非ヒストン基質タンパク質のアセチル化調節にも寄与していることを明らかにした (JCI Insight 2018)。以上の結果は、NRDC が chromo あるいは PHD ドメインなど既知のメチル化認識ドメインを持たないユニークな新規ヒストンコードリーダーであり、ヒストンのメチル化、アセチル化のクロストークを制御している可能性を示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノムワイドな解析を用いて NRDC 標的遺伝子を同定し、それらの転写開始点付近におけるヒストンアセチル化、メチル化、そしてそれらのクロストークにおける NRDC の役割を検証する。さらに不活性型 NRDC 再導入細胞を用いて、ヒストン修飾における NRDC のペプチダーゼ活性の意義を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究ではヒストンアセチル化・メチル化制御における NRDC の役割、さらにその酵素活性の役割を明らかにすることを目的とし、

以下の研究を遂行する。①NRDC 欠損不死化 MEF 細胞 (iMEF) に野生型、不活性型 NRDC を再導入した細胞で ChIP-seq、RNA-seq を行い、転写開始点周辺に NRDC が結合し、NRDC 欠損で発現変動する遺伝子を同定、②同定した NRDC 標的遺伝子におけるヒストンアセチル化およびメチル化変動の解析、および NRDC の酵素活性がそれらに及ぼす影響の検討。③ NRDC 標的遺伝子のジーンオンロジー解析、およびその結果の検証。

## 4. 研究成果

野生型 iMEF で抗 NRDC 抗体による ChIP-seq を行った結果、4053 の NRDC 結合領域と 2587 の NRDC 結合プロモーター (遺伝子転写開始地点 $\pm$ 5kb に NRDC 結合領域が存在) を同定した。その特徴を検討すると、NRDC 結合プロモーターの大部分に H3K4me2 の有意な集積を認め、プロモーター周辺の集積強度にも正の相関を認めた。また野生型 iMEF で行った RNA-seq による遺伝子発現レベルと、遺伝子プロモーターの NRDC 結合シグナルにも正の相関を認めたことから、NRDC 結合領域は転写アクティブなプロモーター領域に局在することが分かった。

次にゲノムワイドなヒストン修飾や転写制御における NRDC の役割を検討するため、野生型、NRDC 欠損 (NRDC $^{-/-}$ )、NRDC 再導入 (NRDC $^{-/-}$ WT) iMEF を用い、ヒストン修飾 (H3K4me2、H3K9ac) の ChIP-seq 解析を行った。その結果、NRDC 結合プロモーター (NRDC-binding) におけるゲノムワイドな H3K4me2 レベルは NRDC 欠損細胞で上昇していた (図1)。逆に、NRDC 結合プロモーターにおける H3K9ac レベルは NRDC 欠損細胞で低下していた (図2)。一方 NRDC 非結合プロモーター (not binding) においては、NRDC 欠損による H3K4me2、H3K9ac レベルの変化は乏しかった (図1、2)。

さらに、これらの細胞で RNA-seq 及び ChIP-seq との統合的な解析を行ったところ、448 の NRDC 直接標的遺伝子 (NRDC がプロモーターに結合し、かつ NRDC 依存性に有意に発現変動) を同定した。448 の NRDC 直接標的遺伝子のジーンオンロジー解析の結果、細胞周期に関連する遺伝子が有意に多く含まれ、かつ NRDC 非存在下で H3K9ac レベルと一致して転写レベルが低下することが分かった。また ChIP-qPCR と RT-PCR でもその変化を確認することができた。興味深いことに、NRDC $^{-/-}$ WT 細胞とプロテアーゼ活性を消失した NRDC 変異体の再導入細胞 (NRDC $^{-/-}$ EA) の両方で細胞周期関連遺伝子の転写レベルはレスキューされたが、NRDC $^{-/-}$ EA 細胞では H3K9ac レベルはレスキューされなかった (図3)。

図 1

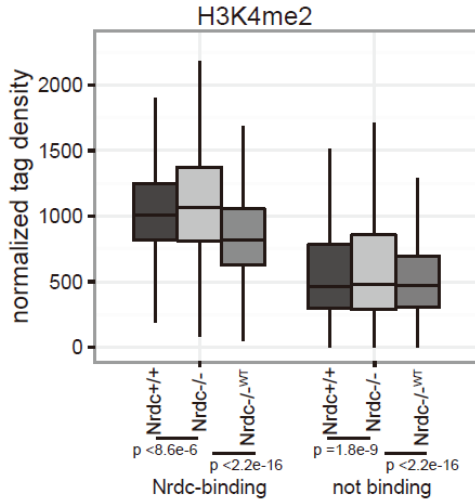


図 2

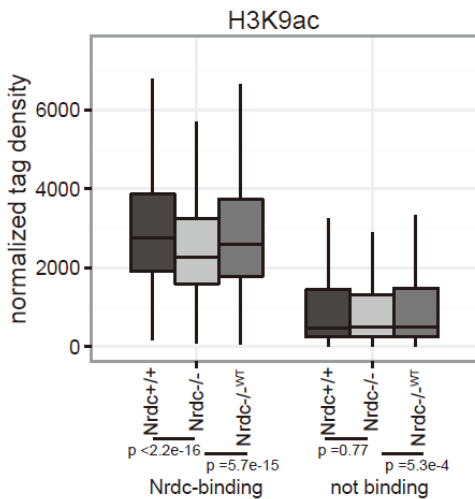
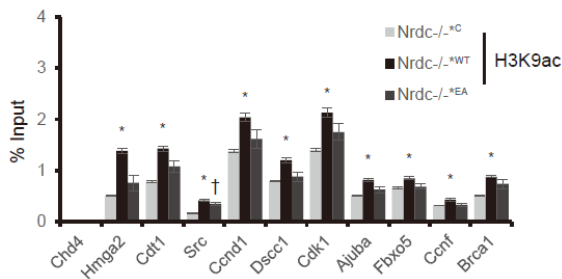


図 3



最後に、これらの細胞を用いた細胞増殖・細胞周期評価実験 (WST-8 アッセイ、BrdU パルスチェイスアッセイ、細胞飢餓/血清添加アッセイ) を行った結果、NRDC 非存在下で細胞増殖が抑制され、かつ複数 (G1/S 期、G2/M 期) の細胞周期進行が遅延することがわかった。

以上のことから、NRDC はエピジェネティックなヒストン修飾と転写制御を介して、細胞増殖や細胞周期を調節していることが明らかになった。

## 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 15 件のうち 9 件記載)

Ikuta K, \*Fukuda A, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Tsuda M, Kimura Y, Matsumoto Y, Kimura Y, Maruno T, Kanda K, Nishi K, Takaori K, Uemoto S, Takaishi S, Chiba T, Nishi E and Seno H

Nardilysin inhibits pancreatitis and suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma initiation in mice

*GUT in press*

doi: 10.1136/gutjnl-2017-315425

Kanda K, Sakamoto J, Matsumoto Y, Ikuta K, Goto N, Morita Y, Ohno M, Nishi K, Eto K, Kimura Y, Nakanishi Y, Ikegami K, Yoshikawa T, Fukuda A, Kawada K, Sakai Y, Ito A, Yoshida M, Kimura T, Chiba T, \*Nishi E and \*Seno H

Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation

*JCI Insight* 2018; 3(8): e91316

doi: 10.1172/jci.insight.91316

Morita Y, Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Saijo S, Matsuda S, Kita T, Kimura T and \*Nishi E Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression

*Sci Rep.* 7: 14801, 2017

DOI: 10.1038/s41598-017-14942-4

Fujii T, \*Nishi E, \*Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Okabe N, Ohno M, Nishi K, Morita Yus, Morita Y, Azukizawa M, Okahata A, Tomizawa T, Kimura T, and Matsuda S

Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of TNF- $\alpha$  secretion

*RMD Open* 3: e000436, 2017

doi: 10.1136/rmdopen-2017-000436

Chen PM, Ohno M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Matsuda S, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Inada T, Tanaka M, Kita T, Kimura T and \*Nishi E

Nardilysin is a promising biomarker for the early diagnosis of Acute Coronary Syndrome

*Int J Cardiol.* 243: 1-8, 2017

DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.04.047

Kasai Y, Toriguchi K, \*Hatano E, Nishi K, Ohno M, Yoh T, Fukuyama K, Nishio T, Okuno M, Iwaisako K, Seo S, Taura K, Kurokawa M,

Kunichika M, Uemoto S, \*Nishi E  
Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3

*Cancer Sci.* 108: 910-917, 2017  
doi.org/10.1111/cas.13204

Kimura Y, Ikuta K, Kimura T, Chiba T, Oshima H, Oshima M, \*Nishi E, \*Seno H  
Nardilysin regulates inflammation, metaplasia, and tumors in murine stomach  
*Sci Rep.* 7: 43052, 2017  
doi: 10.1038/srep43052.

Yoon WH, Sandoval H, Nagarkar-Jaiswal S, Jaiswal M, Yamamoto S, Haelterman NA, Putluri N, Putluri V, Sreekumar A, Tos T, Aksoy A, Donti T, Graham BH, Ohno M, Nishi E, Hunter J, Muzny DM, Carmichael J, Shen J, Arboleda VA, Nelson SF, Michael F, Wangler MF, Karaca E, Lupski JR, and Bellen HJ

Loss of Nardilysin, a mitochondrial co-chaperone for  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase, promotes mTORC1 activation and neurodegeneration  
*Neuron* 93: 115-131, 2017  
doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.038

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T and \*Nishi E  
Nardilysin is Required for maintaining Pancreatic  $\beta$ -Cell Function  
*Diabetes* 65: 3015-27, 2016  
DOI: 10.2337/db16-0178

[学会発表] (計 31 件のうち 27 件記載)

大野美紀子, 西 清人, 平岡 義範, 新妻 晋一郎, 西城 さやか, 坂本 二郎, 陳 博俊, 森田 雄介, 松田 真太郎, 椋本 淑子, 清成 寛, 松浦 博, 北 徹, 木村 剛, 西 英一郎.

ナルディライジンは神経栄養因子受容体 (p75NTR) のシェディングを介して心臓交感神経の分布を制御する(ポスター)

生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 6~9 日 神戸

森田雄介, 大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 松田真太郎, 木村剛, 西英一郎

Nardilysin-mediated epigenetic regulation contributes to the cell cycle progression and proliferation in mouse embryonic fibroblasts (ポスター・オーラル)

生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分

子生物学会年会) 2017 年 12 月 6~9 日 神戸

松田真太郎, 森田雄介, 岩崎広高, 大野美紀子, 木村剛, 西英一郎

脂肪細胞のナルディライジンはインスリン感受性および脂肪組織の慢性炎症を制御する(ポスター)

生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 6~9 日 神戸

岩崎広高, 今村武史, 森野勝太郎, 櫻井英俊, 大野美紀子, 前川聡, 西英一郎.

MicroRNA-494 は転写共役因子 p300 を介して筋線維型特異的ヒト骨格筋細胞分化を制御する (ポスター・オーラル)

生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 6~9 日 神戸

平岡義範, 吉種光, 大野美紀子, 森田雄介, 布川莉奈, 西清人, 久米典昭, 木村剛, 深田吉孝, 西英一郎

ナルディライジンによる PER2 の機能調節を介した概日リズム制御機構

Nardilysin regulates the mammalian circadian clock via modulating PER2 function (ポスター・オーラル)

生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会) 2017 年 12 月 6~9 日 神戸

大野美紀子, 陳博俊, 日和佐隆樹, 西清人, 西城さやか, 森田雄介, 松田真太郎, 木村剛, 西英一郎.

急性冠症候群における新規バイオマーカー「ナルディライジン」の有用性についての検討

第 22 回日本病態プロテアーゼ学会 (平成 29 年 8 月 11 日~12 日 大阪)

森田雄介, 大野美紀子, 西清人, 西城さやか, 松田真太郎, 木村剛, 西英一郎

ゲノムワイド統合解析によるナルディライジンの細胞周期制御機構の解明

第 22 回日本病態プロテアーゼ学会 (平成 29 年 8 月 11 日~12 日 大阪)

西 英一郎, 大野美紀子: ナルディライジンによる p75NTR シェディングを介する心臓交感神経分布パターンの決定

教育シンポジウム「神経系におけるタンパク切断を介した生理機能制御とその破綻による疾病発症機構」

第 40 回日本神経科学大会 NEUROSCIENCE2017(2017 年 7 月 22 日, 千葉)

西 英一郎: 多機能ペプチダーゼによる心臓

交感神経分布と循環動態の制御  
シンポジウム3「交感神経と循環制御」  
第38回日本循環制御医学会総会・学術総会  
(2017年6月17日、大阪)

Nishi K, Ohno M, Saijo S, Morita Y, Matsuda S, Sakamoto J, Chen P, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin Critically Regulates Insulin Secretion and Glucose Metabolism  
第81回日本循環器学会学術集会 (2017年3月17-19日、金沢)

Matsuda S., Nishi K., Morita Y., Saijo S., Ohno M., Kimura T., Nishi E.

Nardilysin in adipose tissue regulates insulin sensitivity  
第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17日~19日 金沢

Ohno M, Chen P-M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Kita T, Kimura T, and Nishi E.

Nardilysin is a Promising Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Coronary Syndrome.  
第81回日本循環器学会総会 2017年3月17-19日 金沢 ポスター発表

西清人、佐藤雄一、大野美紀子、平岡義範、西城さやか、坂本二郎、陳博敏、森田雄介、松田真太郎、北徹、稲垣暢也、木村剛、西英一郎.

Nardilysin Regulates Glucose Homeostasis via the Maintenance of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function and Identity.  
第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、横浜

Ohno M, Chen P-M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Kita T, Kimura T, and Nishi E.

Nardilysin is a Promising Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Coronary Syndrome.  
第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、横浜

西城さやか、平岡義範、大野美紀子、西清人、森田雄介、松田真太郎、北徹、木村剛、西英一郎

褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す  
第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日~12月2日、横浜

平岡義範、吉種光、大野美紀子、布川莉奈、

西清人、森田雄介、久米典昭、木村剛、深田吉孝、西英一郎

ナルディライジンによる概日リズム制御機構の解明  
第23回日本時間生物学会、2016年11月12-13日、名古屋

藤井貴之 西英一郎 伊藤宣 吉富啓之 大野美紀子 西清人 布留守敏 岡部奈美子 森田侑吾 小豆澤勝幸 岡島章憲 マクロファージ特異的ナルディライジン欠損マウスでは自己抗体誘導性関節炎が抑制される

第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13日-14日、福岡市

西清人、大野美紀子、西城さやか、森田雄介、松田真太郎、稲垣暢也、西英一郎.

ナルディライジンによる膵 $\beta$ 細胞機能・分化制御機構の解明  
第37日本肥満学会、2016年10月7日~8日、東京

西城さやか、松田真太郎、森田雄介、西清人、大野美紀子、西英一郎

褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す  
第37日本肥満学会、2016年10月7日~8日、東京

Sakamoto J, Seno H, Nishi E.

Nardilysin regulates intestinal tumor progression by modulating p53.  
第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月6-8日、横浜)

西清人、稲垣暢也、西英一郎.

Nardilysin regulates glucose metabolism through insulin secretion  
第21回アディポサイエンス・シンポジウム、2016年8月20日、大阪

森田雄介、大野美紀子、西清人、西条さやか、松田真太郎、西英一郎

ナルディライジンのゲノムワイドな転写制御機構の解明  
第21回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2016年8月5日、大阪

西城さやか、西英一郎

褐色脂肪組織に発現するナルディライジンは体温恒常性維持機構において重要な役割を示す  
第21回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2016年8月5日、大阪

Fujii T., Nishi E., Ito H., Yoshitomi H., Ohno M., Nishi K., Okabe N., Furu M., Morita Y., Azukizawa M., Okahata

A. Nardilysin is involved in the pathogenesis of autoimmune arthritis via antibody production.

第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、  
2016 年 4 月 21 日・23 日、横浜市

Kasai Y, Hatano E, Nishi E, Toriguchi K, Yoh T, Nishio T, Okuno M, Seo S, Taura K, Yasuchika K, Okajima H, Kaido T, Uemoto S

Nardilysin, a novel biomarker for hepatocellular carcinoma, enhances diethylnitrosamine-induced mice carcinogenesis and cancer cell proliferation via activation of STAT3 signaling pathway  
**International Liver Cancer Association 2016**, Sept 9-11, 2016, Vancouver

Ohno M, Chen P-M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Kita T, Kimura T, and Nishi E.

Nardilysin is a Promising Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Coronary Syndrome.

**American Heart Association Scientific Session**, 2016 Nov.12-16, New Orleans, LA, USA

Morita Y, Nishi E.

Nardilysin-mediated epigenetic regulation contributes to the cell cycle progression and proliferation in mouse embryonic fibroblasts.

**Keystone Symposia** (Epigenetics and Human Disease: Progress from Mechanisms to Therapeutics), January 29 – Feb 2, 2017, Seattle, WA, USA

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：検査方法及び肝内胆管がん用検査試薬  
発明者：西 英一郎、大野 美紀子、黒川 祐人、山口 里奈

権利者：京都大学 (50%)、三洋化成工業株式会社 (50%)

種類：

番号：特願 2017-022201

出願年月日：平成 29 年 2 月 9 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

滋賀医科大学薬理学講座ホームページ

<http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 英一郎 (Nishi Eiichiro)

滋賀医科大学・医学部医学科・教授

研究者番号：30362528

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )