

## 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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21247016

研究課題名（和文）

低分子と高分子のクロスネットワークによるエピジェネティクス制御機構の解析と応用

研究課題名（英文）

Study for epigenetic control through cross-talk among biomolecules

研究代表者

柳澤 純 (YANAGISAWA JUNN)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50301114

研究成果の概要（和文）：

生体内の低分子、たとえばホルモンなどの一部は、DNA 上のエピジェネティックな状態を変換することによって遺伝子の転写環境を制御し、さまざまな生理機能を発揮する。本研究では、その分子メカニズムの一端を明らかにし、最終的には合成低分子化合物を用いて、人為的にエピジェネティック状態をコントロールすることに成功した。これらの合成低分子化合物は、エピジェネティック状態を制御することにより、癌、線維化疾患、肥満などの疾患を軽減する。

研究成果の概要（英文）：

Some bio-molecules, such as hormones, regulate transcription through epigenetic control of genes. In this study, we have focused on such bio-molecules, and investigated the mechanisms of bio-molecule-dependent epigenetic control. From our study, we have successfully developed chemical compounds which are able to control epigenetic status and cure some diseases, such as cancers and fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|---------|------------|------------|------------|
| 2009 年度 | 12,100,000 | 3,630,000  | 15,730,000 |
| 2010 年度 | 11,600,000 | 3,480,000  | 15,080,000 |
| 2011 年度 | 11,600,000 | 3,480,000  | 15,080,000 |
| 年度      |            |            |            |
| 総計      | 35,300,000 | 10,590,000 | 45,890,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物化学・機能生物化学

キーワード：①エピジェネティクス②転写③エネルギー代謝④核内レセプター⑤ネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

生体内の低分子、たとえばホルモンなどの一部は、DNA 上のエピジェネティックな状態を変換することによって遺伝子の転写環境を制御し、さまざまな生理機能を発揮する。このようなメカニズムを解明することにより、ホルモンなどの生体内低分子物質をミミックした低分子化合物を合成し、生体の生理機能を人為的にコントロールすることが可能になると期待される。

そこで、本研究では、ホルモンを受容し、エピジェネティックな制御を行う核内受容体と、われわれが新規に見出した S-アデノシルメチオニン結合タンパク質であるヌクレオメチリンを中心に、エピジェネティクス制御メカニズムの解明とそれらの情報伝達経路を制御する選択的化合物の創生を目指した。

## 2. 研究の目的

核内受容体は、脂溶性ホルモンなどの低分子脂溶性物質をリガンドとし、エピジェネティクスを介して標的遺伝子の転写を制御する。また、われわれの見出したヌクレオメチリンは、S-アデノシルメチオニンと結合することにより、リボソーム DNA のエピジェネティクスを変化させ、リボソーム RNA の転写を制御することができる。核内受容体やヌクレオメチリンなどの低分子受容型エピジェネティック制御因子群は、転写制御を介して様々な生理機能を発揮し、その機能破綻は、癌や生活習慣病などの疾患の発症に深く結びついている。

本研究では、生体内低分子と遺伝子のエピジェネティック制御の接点となっている核内受容体とヌクレオメチリンに焦点を当て、その制御メカニズムを詳細に解析する。また、それらの結果を利用してエピジェネティック状態をコントロールし、生体の機能を選択的に制御出来るような新たな低分子化合物の創生へとつなげることを目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1)核内受容体を介した、低分子物質によるエピジェネティック制御

核内受容体は、脂溶性ホルモンなどの低分子脂溶性物質をリガンドとし、エピジェネティクスを介して標的遺伝子の転写を制御する、リガンド誘導性転写因子である。通常、核内受容体は、ホルモンなどを受容すると構造が変化し、標的遺伝子近傍の DNA 上に直

接結合することにより、クロマチン状態を変化させ標的遺伝子の転写を制御する。

われわれは、エストロゲンレセプターやアンドロゲンレセプター、ビタミン D レセプター、LXR といった一部の核内受容体が、DNA に直接結合して転写因子として働くだけでなく、様々な転写因子に結合し、結合した転写因子の活性を、リガンド依存的に制御することによって、結合した転写因子依存的な転写を制御することを見出した。この結果は、核内受容体とリガンドが、複雑な転写因子ネットワークを制御することにより、生体の恒常性制御を行っていることを示している。私たちはさらに解析を進め、選択的に転写因子を制御できる核内受容体リガンドの創生に成功した。例えば、ビタミン D 受容体は、ビタミン D を受容すると DNA に結合して、標的遺伝子の転写を制御することが知られている。私たちはビタミン D 受容体が DNA に直接結合することなく、KLF や AP1、Smad といった転写因子と結合し、ビタミン D 依存的にこれらの因子の活性を制御することを見出した。さらに、製薬企業の化合物ライブラリー（ビタミン D 受容体に結合する 2000 化合物のライブラリー）を用いて各化合物がそれぞれの転写活性に与える影響を検討した。その結果、KLF や AP1 などの活性を選択的に制御できる一群のリガンドが存在することが明らかとなった。核内受容体は種々の生体機能調節にかかわっており、その破綻は様々な疾患の原因となる。現在使用されている医薬品の 13%ほどが核内受容体を標的としているが、それらの医薬品は核内受容体ネットワークについては考慮されていない。もし、特定の転写因子のみを制御できる核内受容体リガンドが開発できれば、さまざまな副作用を軽減した医薬品を開発することが可能となる。

### (2)ヌクレオメチリンを介した低分子物質とリボソーム RNA 転写のクロストーク

S-アデノシルメチオニン (SAM) と結合することにより、リボソーム DNA のエピジェネティクスを変化させ、リボソーム RNA の転写を制御するタンパク質である。ヌクレオメチリンは核小体に局在し、SAM 結合によりリボソーム RNA 転写を抑制する。リボソーム RNA 合成は細胞内のエネルギーの 4 割を使用するエネルギー消費の激しいステップであることから、ヌクレオメチリンはエネルギー恒常性に関与しているものと考えられた。

さらに、近年の研究から、核小体にはリボソーム合成を司るタンパク質以外に、さまざまな細胞機能調節タンパク質が存在し、その局在の制御によって細胞運命の決定を担っ

ていることも明らかになって来ている。

核小体は膜を持たない核内小器官であり、リボソーム RNA の周囲にさまざまなタンパク質が結合して構造体を形成している。したがって、リボソーム RNA の転写が低下すると、核小体サイズが縮小し、核小体タンパク質が核質へと拡散する。

われわれは核小体中に MYBBP1A と呼ばれるタンパク質が存在すること、リボソーム RNA 転写がヌクレオメチリンによって低下すると、MYBBP1A が核質へと拡散し、p53 のアセチル化を介してその転写活性を制御することを見出した(EMBO

J.)。これらの結果はヌクレオメチリンがリボソーム RNA 転写を介して、核小体サイズを変化させ、核小体タンパク質の局在を変化させることによって p53 を制御していること、さらにヌクレオメチリンのコントロールによって p53 の活性を制御できることを意味している。そこで本研究者らは、ヌクレオメチリンの構造を決定し、フラグメントエポリメーション法によってヌクレオメチリンに特異的に結合する化合物を合成した。

#### 4. 研究成果

##### (1)核内受容体を介した、低分子物質によるエピジェネティック制御

本プロジェクトでは、上述したように、核内受容体を中心とした転写因子の活性制御ネットワークの存在を明らかにし、さらに、それらを個別に制御できるリガンドが存在することを示した。そこで、さらにエストロゲン受容体と KLF、LXR とエストロゲン受容体、ビタミン D 受容体と Smad に着目し、それぞれの核内受容体の転写活性を促進せずに KLF、ER、Smad の活性を選択的に制御できる化合物を設計した。

ER を介して KLF の転写を制御できる化合物、GS1405 は、ER に結合し、その転写活性を促進することなく KLF の転写活性を促進することが出来る。さらにその作用により、前立腺癌の腫瘍中の血管新生を抑制して腫瘍を退縮できることが明らかになった (Science signaling)。

また、ER に結合し LXR の活性を抑制する天然物フロレンチンは、ER の活性に影響を与えることなく肝臓への脂肪の蓄積を優位に抑制することを明らかにした (Hepatology revision)

さらに、VDR に結合する新規リガンドは、VDR の転写活性を促進することなく、Smad の転写活性を選択的に抑制することが出来る。Smad は、組織の線維化の原因となるため、本化合物の投与により、VDR の発現している腎

臓のような組織では、炎症に起因する線維化を抑制することが可能である (J. Clin. Invest. revision)。

以上のように、核内受容体を利用することで、遺伝子のエピジェネティック状態を選択的に制御し、新たな医薬品などの開発へとつなげる道を切り開いた。

##### (2)ヌクレオメチリンを介した低分子物質とリボソーム RNA 転写のクロストーク

ヌクレオメチリンは細胞内でリボソーム RNA の転写を抑制し、エネルギー消費を抑えるとともに、p53 を活性化する方向に働く。われわれは、個体におけるヌクレオメチリンの機能を明らかにするため、ヌクレオメチリン遺伝子欠損マウスを作製した。ヌクレオメチリン遺伝子欠損マウスは、リボソーム RNA 転写が亢進しており、エネルギー消費が激しいため、高脂肪食を食べさせてもまったく太らない。この結果は、細胞内のリボソーム合成を促進しエネルギー消費を高めることによって、肥満を抑えられる可能性を示している。そこで、われわれはフラグメントエポリメーション法をもちいへ、ヌクレオメチリンに結合する化合物の設計を行い、合成を試みた。3種類の化合物を合成したところ、2種類の化合物でリボソーム RNA 合成の促進が認められた。今後は、これらの化合物をマウスに投与し、肥満に対する影響を検討する。

#### 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 10 件)

① Fujimura A, Kishimoto H, Yanagisawa J, Kimura K.

Enhancer of rudimentary homolog (ERH) plays an essential role in the progression of mitosis by promoting mitotic chromosome alignment.

*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423:588-92, (2012) 査読あり

② Komatsu Y, Waku T, Iwasaki N, Ono W, Yamaguchi C, Yanagisawa J.

Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis.

*BMC Medical Genomics*. 5:5 (2012) 査読あり

③ Kajiro M, Tsuchiya M, Kawabe Y, Furumai R, Iwasaki N, Hayashi Y, Katano M, Nakajima Y, Goto N, Watanabe T, Murayama A, Oishi H,

Ema M, Takahashi S, Kishimoto H, **Yanagisawa J.**  
The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis.  
*PLoS One.* 6(10):e25871. (2011) 査読あり

④ Goto N, Hiyoshi H, Ito I, Tsuchiya M, Nakajima Y, **Yanagisawa J.**  
Estrogen and antiestrogens alter breast cancer invasiveness by modulating TGF- $\beta$  signaling pathway  
*Cancer Science*, 102(8):1501-8, (2011) 査読あり

⑤ Kumazawa T, Nishimura K, Kuroda T, Ono W, Yamaguchi C, Katagiri N, Tsuchiya M, Masumoto H, Nakajima Y, Murayama A, Kimura K, **Yanagisawa J.**  
Novel nucleolar pathway connecting intracellular energy status with p53 activation  
*J. Biol. Chem.*, 286(23):20861-9, (2011) 査読あり

⑥ Nakajima Y, Akaogi K, Suzuki T, Osakabe A, Yamaguchi C, Sunahara N, Ishida J, Kako K, Ogawa S, Fujimura T, Homma Y, Fukamizu A, Murayama A, Kimura K, Inoue S, **Yanagisawa J.**  
Estrogen regulates tumor growth through a nonclassical pathway that includes the transcription factors ER $\beta$  and KLF5.  
*Science Signaling*, 4(168): ra22, (2011) 査読あり

⑦ Tsuchiya M, Katagiri N, Kuroda T, Kishimoto H, Nishimura K, Kumazawa T, Iwasaki N, Kimura K, **Yanagisawa J.**  
Critical role of the nucleolus in activation of the p53-dependent postmitotic checkpoint  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(2):378-82, (2011) 査読あり

⑧ Kuroda T, Murayama A, Katagiri N, Ohta Y, Fujita E, Masumoto H, Ema M, Takahashi S, Kimura K, **Yanagisawa J.**  
RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A  
*EMBO J.*, 30(6):1054-1066, (2011) 査読あり

⑨ Ito I, Hanyu A, Wayama M, Goto N,

Katsuno Y, Kawasaki S, Nakajima Y, Kajiro M, Komatsu Y, Fujimura A, Hirota R, Murayama A, Kimura K, Imamura T, **Yanagisawa J.**

Estrogen inhibits transforming growth factor  $\beta$  signaling by promoting Smad2/3 degradation.  
*J. Biol. Chem.*, 285(19), 14747-14755 (2010) 査読あり

⑩ Mikogai A, **Yanagisawa J.**, Yasuzawa-Tanaka K, Murayama A.  
The nucleolar protein NML regulates hepatic ATP levels during liver regeneration after partial hepatectomy  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2009) 390(3):591-596 査読あり

[学会発表] (計 5 件)  
①核小体ダイナミクス. 柳澤 純. 第 63 回日本細胞生物学会大会 2011. 6. 27. (北海道大学 札幌)

②核小体の新規機能と分子修飾. 柳澤 純. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 82 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ 2010. 12. 7-10. (神戸ポートアイランド 神戸)

③核内受容体の新しいネットワークと化学物質による制御. 柳澤 純. 日本薬学会第 130 年会 2010. 3. 28-30. (就実大学 岡山)

④ Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. 柳澤 純. 第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2009. 12. 9-12. (パシフィコ横浜 横浜)

⑤核内受容体によるエピゲノム制御. 柳澤 純. 第 82 回日本生化学会大会 2009. 10. 21-24. (神戸ポートアイランド 神戸)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)

名称: 標的遺伝子の発現制御方法  
発明者: 柳澤 純  
権利者: 国立大学法人筑波大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-187212  
出願年月日: 平成 24 年 8 月 28 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 純 (YANAGISAWA JUNN)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：50301114

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし