

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15258

研究課題名（和文）ヒストン修飾酵素の翻訳調節を介したポリアミンによる遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of gene expression through translational stimulation of histone modifying enzymes by polyamines

研究代表者

坂本 明彦（Sakamoto, Akihiko）

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10737290

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストン修飾は真核生物の遺伝子発現制御において重要な役割を果たす。我々は、細胞増殖因子ポリアミンがヒストンアセチル化酵素の翻訳を促進することで、遺伝子発現を制御することを報告した。本研究では、ヒストンメチル化におけるポリアミンの役割を解析した。その結果、ポリアミンは、ヒストン脱メチル化酵素であるJMJD2A、JARID1C及びUTXを翻訳レベルで発現促進し、ヒストンメチル化を抑制することを見出した。また、ポリアミンによるヒストン脱メチル化酵素の翻訳制御機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティックな遺伝子発現制御の一つであるヒストン修飾は、異常が起ると、がんなどの疾患の発症に寄与することが知られている。しかし、ヒストン修飾を担う修飾酵素の明確な制御因子は同定されていない。研究代表者は、これまでに細胞増殖因子ポリアミンがヒストンアセチル化酵素の翻訳制御因子であることを明らかにした。本研究では、ポリアミンがヒストン脱メチル化酵素の翻訳を制御することを見出した。したがって、ヒストン修飾異常に起因する病因・病態解明や新薬開発（創薬ターゲット）の基盤となる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Histone modifications are important for gene expression in eukaryotes. We previously demonstrated that polyamines regulate gene expression through translational stimulation of histone acetyltransferase mRNAs. In this study, we tried to clarify the role of polyamines on the histone methylation. We found that the levels of methylation of lysine residues on histones increased in polyamine-reduced cells. Although protein level of histone lysine methyltransferases did not alter in control and polyamine-reduced cells, that of JMJD2A, JARID1C and UTX among histone lysine demethylases decreased greatly in polyamine-reduced cells. These proteins were enhanced by polyamines at the level of translation. The mechanism of polyamine stimulation of histone demethylases were investigated.

研究分野：生物系薬学

キーワード：ヒストン修飾 ヒストンメ脱メチル化酵素 ポリアミン 翻訳 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒストンメチル化と疾患

ヒストンメチル化は、遺伝子発現（促進または抑制）を介し、細胞周期、ゲノムの安定化などを制御するエピゲノム修飾の一つであり、ヒストンメチル化酵素（KMTs）及び脱メチル化酵素（KDMs）によって可逆的に制御される。KMTs 及び KDMs の不均衡によるヒストンメチル化異常は、がん、生活習慣病、自己免疫疾患などの疾患発症との関係が報告されており、特に KDMs を標的とした新薬の開発が進んでいる（Linhares BM. *et al. Future Med Chem.* 2020;12(14):1305-1326., Li J. *et al. Cell Mol Life Sci.* 2019;76(15):2899-2916.）。しかし、KDMs の制御機構が明確となっていないため、ヒストンメチル化異常の分子メカニズム解明には至っていない。

### (2) 細胞増殖促進因子ポリアミンと遺伝子発現

ポリアミンは生物に普遍的に分布し、全身の細胞内に比較的高濃度（mM オーダー）で存在する生理活性アミンである。細胞内で種々の酸性物質、主として RNA と相互作用し、蛋白質合成を促進する。特に翻訳効率の悪い mRNA の蛋白質合成を円滑にし、細胞増殖・分化・生存率を促進する。このようにポリアミンにより翻訳促進をうける蛋白質をコードする遺伝子群は“ポリアミンモジュロン”と命名されている（Igarashi K. and Kashiwagi K. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;107:104-115.）。研究代表者らは大腸菌において、ポリアミンモジュロンを 20 種同定し、そのうち 15 種が転写因子であることから下流の遺伝子群の発現を制御することで、細胞増殖・生存率維持・バイオフィーム形成及び酸化ストレス抵抗性を上昇させることを明らかにした（Sakamoto A. *et al. PLoS One.* 2015;10(4):e0124883）。一方、真核生物の遺伝子発現において、ポリアミンがヒストンアセチル化酵素 Gcn5 及び Hat1 の翻訳を促進（ポリアミンモジュロンと同定）し、アストンアセチル化を介して細胞増殖関連遺伝子の発現を促進することを明らかにした（Sakamoto A. *et al. J Biol Chem.* 2020;295(26):8736-8745.）。しかし、遺伝子発現に果たすポリアミンの役割は完全な解明に至っておらず、ポリアミンの生理機能は未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、ヒストンメチル化レベルをポリアミン減少細胞とコントロール細胞で比較した結果、ポリアミン減少によりヒストンメチル化の顕著な増加が認められた（図 1）。そこで、ヒストン脱メチル化酵素の発現量を比較した結果、JMJD2A, JARID1C 及び UTX の発現量がポリアミンにより翻訳レベルで上昇することを見出した（図 2）。本研究では、ポリアミンによるヒストン脱メチル化酵素発現制御機構を解析し、遺伝子発現やヒストン修飾動態に果たすポリアミンの役割を明らかにすることを目的とした。

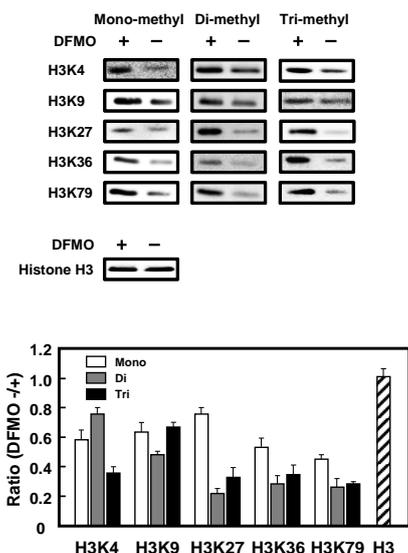


図 1 ヒストンメチル化におけるポリアミンの効果

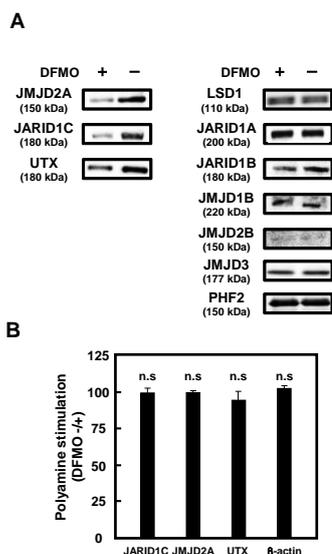


図 2 ポリアミンによるヒストン脱メチル化酵素の翻訳促進

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒストンメチル化酵素の発現に対するポリアミンの効果

ヒストンメチル化酵素の発現量をポリアミン減少細胞とコントロール細胞を用いて、Western blotting により比較した。ポリアミンの有無で発現に差が認められた場合、リアルタイム PCR により mRNA 量を比較する。尚、ポリアミンを減少させる際は、ポリアミン生合成酵素阻害剤である  $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO) を使用した。

#### (2) ポリアミンによるヒストン脱メチル化酵素翻訳制御機構の解析

JMJD2A, JARID1C 及び UTX mRNA におけるポリアミン作用部位を同定するため、5'-非翻訳領域 (5'-UTR) とコード領域の N 末端の一部を EGFP レポーター遺伝子に繋げ、部位特異的変異導入法により変異させたプラスミドを数種類作製した。これらのプラスミドを NIH3T3 細胞に形質導入し、ポリアミンの有無による EGFP の発現量の変化を Western blotting により比較することで、ポリアミン結合部位を決定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒストンメチル化酵素の発現に対するポリアミンの効果

ポリアミン減少によりヒストンメチル化の増加が認められた (図 1) ことから、ヒストンメチル化酵素 10 種の発現量をポリアミン減少細胞とコントロール細胞を用いて、Western blotting により比較した。その結果、ポリアミンの有無によるヒストンメチル化酵素の発現量に差は認められなかった (図 3)。したがって、ポリアミン減少によるヒストンメチル化レベルの増加は、ポリアミンがヒストン脱メチル化酵素を発現促進することによるものであることが明らかとなった。

#### (2) ポリアミンによるヒストン脱メチル化酵素翻訳制御機構の解析

ポリアミンは、mRNA の 5'-UTR に作用し、翻訳効率を上昇させることが明らかとなっている (Igarashi K. and Kashiwagi K. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;107:104-115.)。JMJD2A, JARID1C 及び UTX mRNA の一部を EGFP に繋げたプラスミド (wild type) と 5'-UTR の構造を欠損させた複数の変異体を作製し、ポリアミンの作用部位を探索した (図 4A, 5A and 6A)。JMJD2A では、wild type、開始コドンより上流 135~78 塩基を欠損させた変異体及び開始コドンより上流 77~6 塩基を欠損させた変異体においてポリアミンの EGFP 蛋白質合成促進効果が認められた (図 4B)。一方、開始コドンより上流 195~136 塩基を欠損させた変異体においては、ポリアミンによる蛋白質合成促進効果が消失し、ポリアミン減少細胞 (DFMO 添加) において basal な蛋白質合成が増加した。したがって、JMJD2A mRNA においてポリアミンは、開始コドンより上流 195~136 領域に作用することが示唆された。そこで、この部位の塩基配列を詳細に解析した結果、2 か所 G-quadruplex 構造を形成する可能性が示唆された (図 4C)。これまでの研究で、ポリアミンは G-quadruplex 構造の形成を阻害することで、翻訳を促進することが報告されている (Yamaguchi K. *et al. Biochem J.* 2018;475(23):3797-3812.)。そこで、G-quadruplex 構造の構造が形成できない変異体を作製し、ポリアミンの効果を検討した結果、2 つ目の G-quadruplex 構造においてポリアミンの効果が消失したことから、ポリアミンは G-quadruplex 構造の形成を阻害することで翻訳を促進することが明らかとなった (図 4D, E)。次に、JARID1C mRNA においてポリアミンは、開始コドンより上流 334~209 領域に作用することが示唆された (図 5B)。この領域の 2 次構造を確認したところ、ヘアピン構造が 2 つ存在した (図 5C)。これら 2 つのヘアピン構造をそれぞれ欠損させた変異体を作製したところ、ポリアミンはヘアピン 1 に作用し、構造を変化させることで翻訳を促進することが示唆された。最後に、UTX mRNA においてポリアミンは、開始コドンより上流 326~112 領域に作用することが示唆された (図 6B)。ポリアミン作用部位が大きいので、短い領域を欠損した変異体を作製し、詳細な解析を行う予定である。

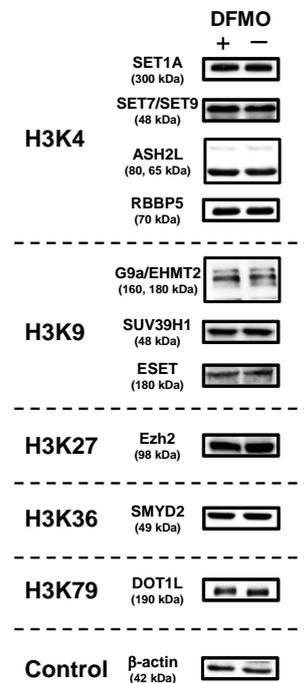


図 3 ヒストンメチル化酵素の発現に対するポリアミンの効果

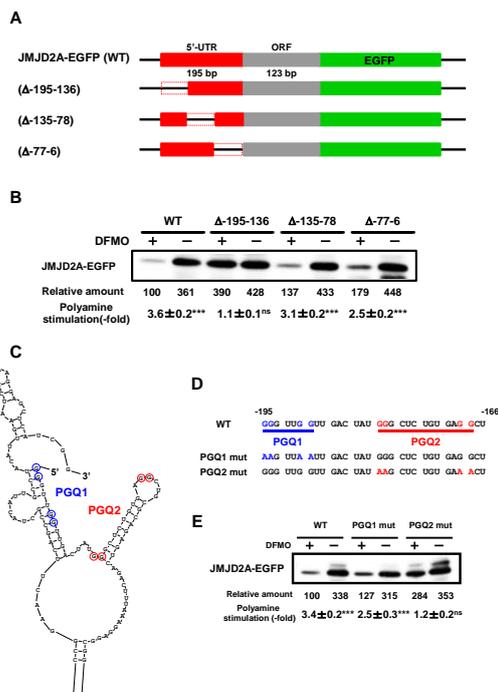


図4 ポリアミンによる JMJD2A 翻訳促進機構の解析

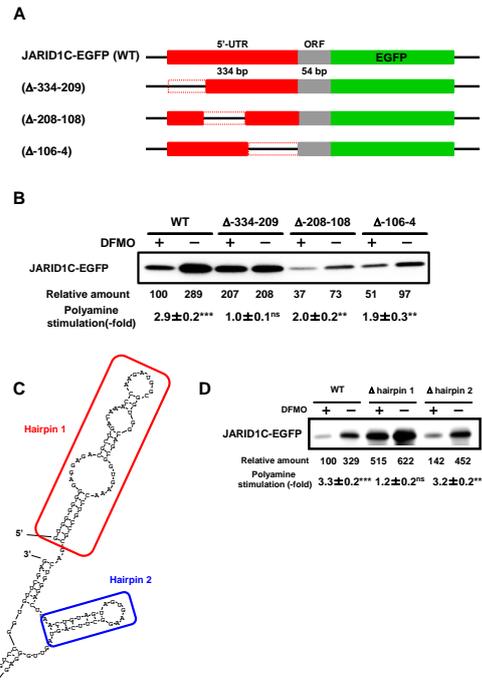


図5 ポリアミンによる JARID1C 翻訳促進機構の解析

### (3) 今後の展望

本研究では、細胞増殖因子ポリアミンがヒストン脱メチル化酵素の翻訳を促進することを明らかにし、JMJD2A、JARID1C 及び UTX を新たにポリアミンモジュロンとして同定した。また、ポリアミンの RNA との相互作用に基づいて新規ポリアミンモジュロン3種の蛋白質合成促進機構を解析した。

ポリアミンはヒストンアセチル化酵素だけではなく、ヒストン脱メチル化酵素の発現を翻訳レベルで制御することで、ヒストンアセチル化、メチル化などのヒストン修飾制御を介して、遺伝子発現に寄与することが示唆された。

今後は、ポリアミンによる JARID1C 及び UTX の翻訳促進機構の詳細な解析、ヒストン修飾におけるポリアミンの影響を調べ、ポリアミンの分子基盤及びエピジェネティクスに関わる新たな制御因子として確立すべく研究を進めていく。

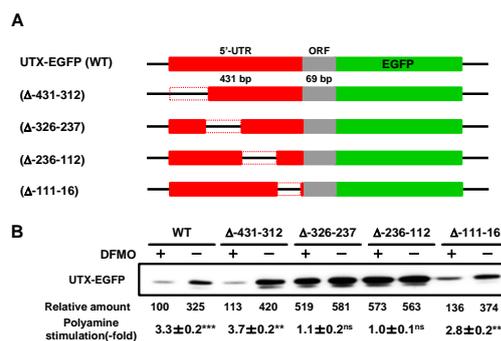


図6 ポリアミンによる UTX 翻訳促進機構の解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Kobayashi Teruyuki, Sakamoto Akihiko, Kashiwagi Keiko, Igarashi Kazuei, Moriya Toshiyuki, Oshima Tairo, Terui Yusuke  | 4. 巻<br>23                  |
| 2. 論文標題<br>Alkaline Stress Causes Changes in Polyamine Biosynthesis in <i>Thermus thermophilus</i>  | 5. 発行年<br>2022年             |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>13523 ~ 13523 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms232113523   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Yoshida Madoka, Uemura Takeshi, Mizoi Mutsumi, Waragai Masaaki, Sakamoto Akihiko, Terui Yusuke, Kashiwagi Keiko, Igarashi Kazuei  | 4. 巻<br>92                  |
| 2. 論文標題<br>Urinary Amino Acid-Conjugated Acrolein and Taurine as New Biomarkers for Detection of Dementia   | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Alzheimer's Disease  | 6. 最初と最後の頁<br>361 ~ 369     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3233/JAD-220912  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Sakamoto Akihiko, Tamakoshi Masatada, Moriya Toshiyuki, Oshima Tairo, Takao Koichi, Sugita Yoshiaki, Furuchi Takemitsu, Niitsu Masaru, Uemura Takeshi, Igarashi Kazuei, Kashiwagi Keiko, Terui Yusuke | 4. 巻<br>172                 |
| 2. 論文標題<br>Polyamines produced by an extreme thermophile are essential for cell growth at high temperature  | 5. 発行年<br>2022年             |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>109 ~ 115     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jb/mvac048  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Uemura Takeshi, Uchida Masashi, Nakamura Mizuho, Shimekake Momo, Sakamoto Akihiko, Terui Yusuke, Higashi Kyohei, Ishii Itsuko, Kashiwagi Keiko, Igarashi Kazuei                                       | 4. 巻<br>-                   |
| 2. 論文標題<br>A search for acrolein scavengers among food components   | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Amino Acids   | 6. 最初と最後の頁<br>-             |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00726-023-03248-7  | 査読の有無<br>無                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                   |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto A, Terui Y, Uemura T, Igarashi K, Kashiwagi K.                   | 4. 巻<br>22         |
| 2. 論文標題<br>Translational Regulation of Clock Genes BMAL1 and REV-ERB by Polyamines. | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Int J Mol Sci.  | 6. 最初と最後の頁<br>1307 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms22031307.                                   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kashiwagi, K., Sakamoto, A., Terui, Y., Igarashi, K.   |
| 2. 発表標題<br>Regulation of gene expression through translational stimulation of histone modifying enzymes by polyamines.    |
| 3. 学会等名<br>6th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Igarashi, K., Uemura, T., Sakamoto, A., Terui, Y., Kashiwagi, K.   |
| 2. 発表標題<br>Molecular mechanisms of cell and tissue toxicity caused by acrolein  |
| 3. 学会等名<br>6th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>坂本明彦, 照井祐介, 五十嵐一衛, 柏木敬子  |
| 2. 発表標題<br>ポリアミンによるヒストン脱メチル化酵素の合成促進 |
| 3. 学会等名<br>日本ポリアミン学会第13年会           |
| 4. 発表年<br>2023年                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小林照幸, 坂本明彦, 柏木敬子, 五十嵐一衛, 高尾浩一, 植村武史, 森屋利率, 大島泰郎, 照井祐介 |
| 2. 発表標題<br>Thermus thermophilusのプトレッシン生合成経路                      |
| 3. 学会等名<br>日本ポリアミン学会第13年会  |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田円, 植村武史, 溝井睦美, 藁谷正明, 坂本明彦, 照井祐介, 柏木敬子, 五十嵐一衛 |
| 2. 発表標題<br>認知症疾患における尿中アミノ酸抱合アクロレインとタウリン量の低下               |
| 3. 学会等名<br>日本ポリアミン学会第13年会                                 |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>柏木 敬子, 坂本 明彦, 照井 祐介, 植村 武史, 五十嵐 一衛 |
| 2. 発表標題<br>ポリアミンによる翻訳促進に基づく遺伝子発現調節            |
| 3. 学会等名<br>第94回年会日本生化学会大会                     |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 千葉科学大学 薬学部 病態生化学研究室<br><a href="http://www.cis.ac.jp/~kkashiwagi/">http://www.cis.ac.jp/~kkashiwagi/</a><br>千葉科学大学ホーム_教員検索_坂本 明彦<br><a href="https://www.cis.ac.jp/teacher/detail/49">https://www.cis.ac.jp/teacher/detail/49</a> |
|---|

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|