

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701038

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素 PHF2 の発現量変化と癌の悪性化との関連についての解析

研究課題名(英文) Implications for the function of histone demethylase PHF2 in malignant cancer cell

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：リボソームRNA(rRNA)転写は細胞外シグナルに応答して緻密に制御されており、細胞の成長・増殖の制御に重要な役割を果たしている。またrRNA転写量の異常は発癌に強く関係しており、癌化した細胞では異常なrRNA合成がみられ、無秩序な増殖が可能となる。ヒストンのメチル化修飾はクロマチン状態を決定する主要なヒストン修飾の一つであり、JmjCドメインを有するタンパク質はヒストン脱メチル化酵素として働く。本研究では、核小体に局在するJmjCドメインタンパクであるPHF2がrRNA転写を正に制御する因子であり、細胞増殖に必須な因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The rate-limiting step in ribosome biogenesis is the transcription of ribosomal RNA, which is controlled by environmental conditions. Regulation of cell growth ultimately depends on the control of ribosome synthesis. One key component of chromatin structures in biological regulation is the methylation of lysine residues in histone proteins, the JmjC domain-containing enzymes can catalyze histone demethylation. The JmjC enzyme PHF2 is localized in nucleoli, but its function is unclear. Here, I demonstrate that PHF2 bound to the rDNA promoter, and PHF2 contribute to pre-rRNA synthesis. Moreover, microarray analyses revealed that more than 2000 genes had altered expression in PHF2 knockdown cells. These results suggest that PHF2 functions as a positive regulator of ribosome biogenesis, and is essential for cell proliferation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学 発がん

キーワード：PHF2 JmjC エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) リボソーム RNA 転写と核小体

核内最大の構造体である核小体で転写される遺伝子は rRNA 遺伝子 (rDNA) のみであり、核小体はリボソーム合成の場となる。リボソームは細胞内でタンパク質合成を行う唯一の装置であり、細胞にとって十分なタンパク質を合成するために多量のリボソームが合成される。この際に細胞が消費するエネルギーは全エネルギーの 50~80%とも言われており、リボソーム合成こそが細胞が最もコストをかけている現象である。リボソーム合成のために、核小体ではリボソーム RNA (rRNA) が転写され、そして rRNA にリボソームタンパク質が会合する (MOSS T, et al., *Cell Mol. Life Sci.*, 64: 29-49, 2007)。ほ乳類細胞では転写産物の約半分が rRNA に、残りの約半分がリボソーム関連タンパク質の mRNA 転写に使われている。

タンパク質の合成は多くの場合において細胞分裂と同調しており、分裂増殖の盛んな細胞ではさかんに rRNA 転写が見られる。ゆえに rRNA 転写量の調節は、細胞が正常に増殖するために必須である。また、rRNA 転写量の異常は発癌に強く関係している。多くの癌遺伝子産物が rRNA の転写を活性化し、癌抑制遺伝子産物は rRNA の転写を抑制する。つまり癌化した細胞では異常な rRNA 合成がみられ、無秩序な増殖が可能となる (Grummt, *Genes Dev*, 17: 1691-1702, 2003)。

(2) リボソーム合成異常による疾患

近年、癌のみならず様々なヒト疾患の原因として、リボソーム合成の調節異常が見られることが明らかになってきた。その例としては、リボソームタンパク質の遺伝子に変異を持つ Diamond-Blackfan 貧血や 5Q-syndrome などの遺伝性貧血症や、rRNA 転写異常が原因で起こる、顎顔面形態の不調和が特徴的な症状である Treacher-Collins 症などが挙げられる。さらに rDNA のエピジェネティックな変化がアルツハイマー病の発症と関連することも報告された。これらリボソーム生合成の異常で見られる疾患を ribosomopathy (リボソーム病) と総称することが提唱されている (Narla A, et al., *Blood*, 115: 3196-3205, 2010)) が、それぞれの発病メカニズムは不明なものが多い。癌をはじめとしたこれらの病因の解明にもリボソーム生合成の調節機構の詳細な解明は重要な課題である。

2. 研究の目的

リボソーム合成の第 1 段階は rRNA 転写であり、これがリボソーム合成量決定の大きな要因となっている。様々なシグナル伝達系により基本転写因子群が化学修飾を受けることで rRNA 転写が調節されることがこれまでに示されてきた。その過程において rDNA のクロマチン構造の変換による遺伝子発現制御機構の存在も明らかになった。

クロマチン構造の変換の際には DNA のメチル化やヒストン修飾の変化などのエピジェネティックな変化が見られる。これらの化学修飾の付加は遺伝子の活性化 / 不活性化に密接に関わっている。なかでもヒストンのメチル化修飾はクロマチン状態を決定する主要なヒストン修飾の一つである。現在まで多数のヒストンメチル化修飾酵素が発見されている。ヒストンへのメチル化修飾の付加は SET ドメインを持つヒストンメチル基転移酵素が、メチル化修飾の除去には JmJc ドメインを持つヒストン脱メチル化酵素が主に作用する。これらヒストン修飾酵素によるメチル化修飾の役割や修飾調節のネットワークは非常に複雑であり、未知の部分が多々ある (Berger, *Nature*, 447: 407-412, 2007)。

rDNA 転写におけるエピジェネティックな制御機構についても、近年解析が進んでいる。ほ乳類細胞では rDNA プロモーター部位の DNA のシトシンがメチル化されることでその領域はサイレンシング化し、その結果 rRNA 転写が抑制される。また、マウスでは NoRC (Nucleolar repressor complex) と呼ばれる転写を抑制する巨大な複合体が存在する。NoRC は TTF-1 や Tip5、SNF2h などで構成されており、転写抑制型のヒストンメチル基転移酵素などを rDNA のプロモーター部位にリクルートすることでプロモーター部位をヘテロクロマチン化し、rDNA 転写を抑制している (Santoro, et al., *EMBO Rep.*, 11: 52-58, 2010)。我々は、rDNA 転写においてまだ十分な理解が得られていなかったヒストンのメチル化修飾に注目し、核小体に局在するヒストン修飾酵素の同定を行った。その結果ヒストン脱メチル化酵素である KDM2A (Fbx111, JHDM1A) が核小体に存在することを見いだした。さらに KDM2A が細胞の飢餓状態にตอบสนองし、ヒストン H3 の K36me1 および me2 を脱メチル化することで rRNA 転写を抑制する事を明らかにした (Tanaka, et. al., *EMBO J.*, 29: 1510-1522, 2010) (共著)。

またその研究過程において、KDM2A と同様の JmJc ドメインタンパクである PHF2 も核小体に局在することを見いだした。核小体

がリボソーム合成の場であることから、PHF2もKDM2Aと同様にrRNA転写の調節に関与する因子として機能することが示唆されたが、PHF2の生理機能については未知な部分が多々ある。そこで本研究では、PHF2によるrRNA転写調節機構の詳細な分子メカニズムを解明することで、リボソーム生合成と癌の悪性化(発癌)との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)rRNA転写におけるPHF2の機能

rRNA転写は細胞外シグナルに応答して緻密に制御されており、細胞の成長・増殖の制御に重要な役割を果たす。我々は核小体プロテオームデータベース検索(www.lamondlab.com/NOPdb/)からPHF2が核小体に局在することを見いだした。核小体はリボソーム生合成の場であることから、ヒストン脱メチル化酵素であるPHF2がその酵素活性依存的にrRNA転写を調節していることが示唆された。そこで我々は初めに乳癌細胞由来のMCF7培養細胞株を用いてPHF2の生理機能を明らかにすることを試みた。MCF7細胞は飢餓条件に応答してrRNA転写が変化し、その調整にはKDM2Aが関与している(Tanaka, *et. al.*, *EMBO J.*, 29: 1510-1522, 2010)ことを我々の研究室で明らかにした。このようにMCF7細胞はrRNA転写調節をモニターするのに適した細胞である。また予備の実験において、MCF7細胞においてもPHF2が発現していることを確認した。そこで、PHF2の発現を抑制するRNA干渉(RNAi)の実験、およびPHF2発現細胞株によるPHF2過剰発現の実験を行うことで、PHF2発現量の変化がrRNA転写調節にどのように影響を及ぼすのかを解析した。なお、PHF2発現細胞株の樹立にはtet-on systemを用いた。この細胞株ではDox添加に応答してPHF2の発現が誘導されることが確認された。

(2)PHF2相互作用因子の探索

転写調節に関わる因子の多くは、様々な因子と相互作用することで緻密に目的遺伝子の発現調節を行う。それゆえPHF2も同様にrRNA遺伝子上において複数の因子と何らかの相互作用をすることでrRNA転写を調節していると考えた。そこでPHF2高発現細胞株を用いてPHF2を細胞内に過剰発現させ、PHF2を免疫沈降法で回収することでPHF2と共沈降したタンパク質を分離精製し、質量分析計(マスマスペクトロメトリー)を用いて

共沈降タンパク質(PHF2相互作用候補因子)の同定を目指した。

(3)PHF2の癌悪性化への関与

肝臓はアルブミンなど様々な血漿タンパクを合成している。血漿タンパク合成量の変調は疾病と関連しており、例えば血液中のアルブミン量の低下は肝硬変の診断マーカーとなる。細胞におけるタンパク合成量のリミットは、翻訳装置であるリボソームの生合成量によりほぼ決定される。従って肝臓のリボソームRNA転写量はアルブミン等の血漿タンパク合成量をコントロールする一因となる。そこでステージの異なる癌細胞由来培養細胞株を用いて定量RT-PCR法(qRT-PCR)を行うことで、PHF2発現量およびrRNA転写量(リボソーム生合成量)を定量し、癌の悪性化とPHF2発現量とrRNA転写量に何らかの関連があるのかを解析した。

4. 研究成果

(1)PHF2の細胞内局在

まず初めに抗PHF2抗体を作製し、免疫染色法でPHF2の細胞内局在を調べた。その結果、PHF2は核タンパク質であることが分かった。さらに核小体タンパク質であるNucleolinとの二重染色の結果、PHF2は核小体に強く局在していることが明らかになった。

PHF2はJmjCドメインを有することより、脱メチル化酵素として働くことが期待される。核小体に存在することからrDNA上にPHF2がアクセスすることでrRNA転写を調節することが考えられたので、詳細な理解を得べくクロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation assay: ChIP)を用いてrDNA上のPHF2の挙動を調べた。その結果、PHF2はrDNAのプロモーター上に存在することが明らかになった。

(2)PHF2のrRNA転写調節への関与

PHF2がrDNAプロモーター上に存在することから、PHF2はrRNA転写を調節する因子である可能性が考えられた。そこでMCF7細胞にsiRNAを用いてPHF2発現を抑制することでのrRNA転写量の変化をqRT-PCRで解析した。その結果、PHF2発現抑制細胞では、rRNA転写量の減少が見られた。また、同様の実験系で細胞の増殖能を比較した結果、PHF2発現抑制細胞では、細胞の増殖が抑制された。このことからPHF2はrRNA転写を正に制御する、細胞の増殖に必須な因子

であることが明らかになった。

(3)マイクロアレイ解析による PHF2 による遺伝子発現調節機構の解明

PHF2 発現の抑制で細胞増殖能の低下が見られたことは、rRNA 転写量の減少のみによる結果だけではなく、他の遺伝子群の発現量変化による複合的な影響であることが考えられた。ゆえに PHF2 発現抑制によって発現量が変化する遺伝子群の網羅的な同定をめざし、マイクロアレイ解析を行った。その結果、約 2100 種類の遺伝子群の発現に変化が見られた。このことから、PHF2 は様々な因子の発現調節に関与している可能性が示唆された。これからの課題として、PHF2 によって直接的に転写の活性化（あるいは不活性化）が促される遺伝子の単離を目指す。

(4)PHF2 相互作用因子の同定

細胞内に過剰発現させた PHF2 の免疫沈降物と共沈降したタンパク質サンプルを質量分析計(LC/MS/MS)にかけることで PHF2 と相互作用する因子の同定を試みた。共沈降サンプルを SDS-PAGE で一次的に分離したところ、コントロール (MCF7 tet-on parent) 細胞と比較してバンドパターンに変化は見られなかった。また質量分析系にかけても、PHF2 に特異的に結合するタンパク質の同定にはいたらなかった。PHF2 相互作用因子は rRNA 遺伝子上で間接的に PHF2 に作用する (タンパク間の直接的な結合が見られない) あるいは結合が微弱であったためにこのシステムでは単離できなかつた可能性が考えられた。

(5)PHF2 の癌悪性化への関与

ステージの異なる肝臓癌由来の培養細胞株における PHF2 発現量、および rRNA 転写量を比較した。その結果、ステージが進行した肝臓癌由来の培養細胞株特異的に PHF2 発現量の低下がみられ、かつ rRNA 転写量も同様に低下していることが分かった。rRNA 転写の変調は細胞の癌化に強く関係しており、かつ進行癌由来の培養細胞では PHF2 の発現量の低下がみられることから、PHF2 による rRNA 転写調節の変調が癌の悪性化に関与する可能性が示唆された。つまり PHF2 の発現量低下が引き金となって rRNA 転写量の低下とタンパク合成能の低下が起こり、その結果として癌が悪性化すると考えられた。

今後の展開としては、実際の肝疾患の患者について、肝組織での PHF2 発現量および rRNA 転写量の変化について RT-PCR 法を用

いて解析し、それらのデータと検体サンプルの組織学的解析とを比較することで、癌のステージ進行と PHF2 発現量の増減に相関関係がみられるかを調べる必要がある。

rRNA 転写は細胞外シグナルにตอบสนองして緻密に制御されており、細胞の成長・増殖の制御に重要な役割を果たす。我々の研究によってヒストン脱メチル化酵素である PHF2 が rRNA 遺伝子上に存在し、rRNA 転写を正に制御する因子として機能することが示された。

5. 主な発表論文等

〔図書〕(計 1 件)

(1)常岡誠、田中祐司、岡本健吾 核小体とリボソーム RNA 転写調節 細胞工学(31: 901-908, 2012)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.takasaki-](http://www.takasaki-u.ac.jp/yaku2/idenshikinouseigy/toppage.htm)

[u.ac.jp/yaku2/idenshikinouseigy/toppage.htm](http://www.takasaki-u.ac.jp/yaku2/idenshikinouseigy/toppage.htm)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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