

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689902
 研究課題名（和文） 新規核小体 DNA メチル化酵素複合体の機能解析と新たながん治療法への
 応用
 研究課題名（英文） Functional analysis of a novel Nucleolar protein complex.

研究代表者
 村山 明子 (MURAYAMA AKIKO)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師
 研究者番号：50431656

研究成果の概要： Nucleomethylin (NML) という新規核小体蛋白質が細胞培養液中のグルコースを減らすと、ヒト培養細胞中のリボソーム合成やたんぱく質産生量が低下することを見出した。NML は核小体に存在し、NAD 依存的脱アセチル化酵素 SIRT1 やヒストン H3K9 メチル化酵素 SUV39H1 と複合体を形成する。NML 複合体は rDNA 領域をヘテロクロマチン化することによって栄養飢餓状態での rRNA 合成抑制に働くことを明らかにした。また、NML 複合体の機能破綻はエネルギーバランスの崩壊と、それに伴う細胞死を引き起こすことから、栄養飢餓による細胞死の回避に働いていることも判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,300,000	0	9,300,000
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
総計	22,300,000	3,900,000	26,200,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：核小体・がん治療・クロマチン・DNA メチル化酵素・rRNA

1. 研究開始当初の背景

癌細胞には複数の誤った情報が蓄積され、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が認められる。その結果、異常な細胞増殖が生じている。近年、このような癌細胞での遺伝子の発現異常は、変

異や染色体欠失などの塩基配列の異常によるだけでなく、「DNAのメチル化」を主とするエピジェネティックな情報の異常が関与することが知られてきた。申請者は癌を初めとする様々な疾患でのエピジェネティックな情報異常の分子メカニズ

ムを明らかにし、新たな治療法の開発を目標に研究を進めている。

今回、ヒストンH3のN末端ペプチドに結合する因子を哺乳類細胞から精製する過程で、新たなメチル基転移領域を持つ蛋白質を見出し、Nucleomethylin(NML)と名づけた。NMLは9番目のリジン残基がジメチル化されたヒストンH3に選択的に結合する。H3のリジン9のジメチル化は転写を抑制し、ヘテロクロマチン化を誘導することが知られている。したがって、NMLは核小体のメチル化ヒストンを認識し結合し転写抑制に関与することが推測されている。

2. 研究の目的

本研究では、(1)核小体におけるNMLの機能解析を行うこと、(2)NMLによるメチル化の標的分子の同定と機能との関係を明らかにすること、そして、(3)癌細胞の転移・増殖との関係を明らかにしがん治療への応用を試みることを、を目的とし研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 核小体におけるNMLの解析

Nucleomethylin(NML)は核小体に局在し、そのドメイン構造からメチル基転移酵素活性を有している可能性がある。そこで、以下の方法を用いて、NMLの核小体における機能解析を進める。

①NMLとヒストンH3 9番目リジンのジメチル修飾との結合 (In vivo)

NMLは9番目のリジン残基がジメチル化されたヒストンH3 (H3K9dimethyl) に選択的に結合する因子として取得された。しかし、ペプチドを用いた精製であるため、細胞内での結合を証明する必要がある。そこで、NMLが細胞内でH3K9dimethylと結合している

ことを免疫沈降法やクロマチン免疫沈降法を用いて明らかにする。

②NMLの生理学的機能の解析

NMLは核小体に局在し、9番目のリジン残基がジメチル化されたヒストンH3に選択的に結合する。H3のリジン9のジメチル化は転写を抑制し、ヘテロクロマチン化を誘導する。したがって、NMLはrRNA合成を抑制することが推察される。そこで、rRNA合成能について、NMLを過剰発現したHeLa細胞とRNAiで発現を抑制したHeLa細胞で比較する

③NML複合体のDNAメチル化能の解析

申請者はNMLがDNMT3a・DNMT3bと相互作用することを確認した。したがって、NMLによる転写抑制には、DNMT3a・3bによるDNAメチル化が関与する可能性がある。そこで、rDNAのプロモーター上のメチル化状態とNMLの発現との関係を検討する。

(2) NMLのメチル化標的因子の同定と解析

①in vitro methylation法によるメチル化標的因子のスクリーニング

NMLはS-アデノシルメチオニン (SAM) を基質としてメチル基を転移するドメインをもつ。NMLは核小体に局在していることから、核小体内に標的因子が存在する可能性が高い。そこで、核小体内の様々な基質を用いて、in vitro methylation法でメチル化標的因子をスクリーニングしていく。

②NML蛋白質複合体の単離と解析

Flag/HAタグのついたNMLをHeLa細胞に発現させ、抗Flag抗体および抗HA抗体を用いてNMLを含む蛋白質複合体を精製し、Mass fingerprint法によって構成因子の同定を行う。さらにそれらの構成因子とNMLの関係を検討するため、構成因子のDNAメチル化活性に与える影響について検討する。

③NMLの構造解析

NMLのメチル基転移活性を持つ領域は、従

来報告のあるメチル化酵素と2次アミノ酸配列からはまったく相同性を示さない。そこで、NMLの構造解析をX線結晶構造解析の手法を用いて横浜市立大学の研究グループと共同で行う。

(3) 癌細胞の転移・増殖との関係

①癌増殖へのNMLの影響

NMLの癌特異的増殖への影響を観察するために、NML発現抑制株とNML過剰発現株を用いて、軟寒天培地で培養する。

②NML遺伝子欠損マウスの作製とヌードマウスでの検討

NMLの個体での機能を探るため、NML遺伝子欠損マウスの作製に着手する。ターゲティングベクターの構築とES細胞の取得を目指す。遺伝子欠損マウスの作製と表現型の解析を行う。

一方、ヌードマウスにNML高発現している癌細胞と発現していない癌細胞を皮下移植し、癌の転移および増殖状態について比較検討する。

4. 研究成果

(1) 核小体におけるNMLの解析

①NMLとヒストンH3 9番目リジンのジメチル修飾との結合 (In vivo)

NMLはリボソームDNA領域のH3K9dimethylと特異的に結合していることが明らかとなった。

②NMLの生理学的機能の解析

NMLは過剰発現によりrRNA転写量を抑制し、ノックダウンによりrRNA転写量を上昇させることが明らかとなった。したがって、NMLはrRNA転写の抑制に働いていることが明らかとなった。また、rRNA転写抑制に伴って、細胞内タンパク合成量も抑制されていることが判明した。

③NML複合体のDNAメチル化能の解析

NMLの発現の変化によって、rDNAのプロモ

ーター上のメチル化状態に変化がないことが明らかとなった。

(2) NMLのメチル化標的因子の同定と解析

①in vitro methylation法によるメチル化標的因子のスクリーニング

細胞内タンパク質・DNAおよびRNAを標的として、in vitro methylation assayを行った。しかしながら、メチル化標的因子の同定には至らなかった。その原因としては、実験に用いた基質はNMLが存在する細胞から抽出したサンプルであるため、すでにメチル化が導入されている可能性が考えられた。今後、ノックアウトマウスからのサンプルで検討していく予定である。

②NML蛋白質複合体の単離と解析

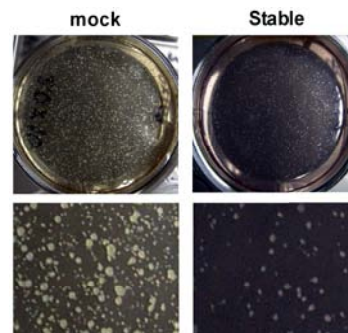
NML複合体を単離したところ、多くの核小体局在因子が取得された。また、ヒストン脱アセチル化酵素であるSIRT1とヒストンメチル化酵素であるSUV39H1と結合することが明らかとなった。

③NMLの構造解析

NMLのメチル基転移活性を持つ領域の構造解析をX線結晶構造解析の手法を用いて行った。その結果、NMLは他のメチル化酵素と同様の構造を持つことが明らかとなり、メチル化酵素として働くことが示唆された。

(3) 癌細胞の転移・増殖との関係

①癌増殖へのNMLの影響



右に示すように、NML過剰発現株では軟寒天培地での

NMLは足場非依的な細胞増殖を阻害する。コロニー形成が抑制された。一方、NML発現抑制株ではコロニー形成が促進した。

これらの結果から、NMLが癌特異的な増殖を抑制していることが示唆された。

②NML遺伝子欠損マウスの作製とヌードマウスでの検討

NML遺伝子欠損マウスは、約50%が胎生致死であることが判明した。その原因について、さらに解析を行っている。

一方、①の結果を踏まえ、ヌードマウスにNML高発現している癌細胞と発現していない癌細胞を皮下移植し、癌の転移および増殖状態について比較検討した。しかしながら、軟寒天培地で見られたような表現系を示さなかった。

本研究の中で、NMLとSIRT1との結合を見出したことで、細胞内エネルギー代謝との関係が明らかとなった。その結果、NMLは細胞培養液中のグルコースを減らすと、ヒト培養細胞中のリボソーム合成やたんぱく質産生量が低下することを見出した。NML複合体はrDNA領域をヘテロクロマチン化することによって栄養飢餓状態でのrRNA合成抑制に働くことを明らかにした。また、NML複合体の機能破綻はエネルギーバランスの崩壊と、それに伴う細胞死を引き起こすことから、栄養飢餓による細胞死の回避に働いていることも判明し、Cell誌に掲載され、国際的に大きな評価を得た。

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10件)

- ① 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 TGF- β signaling by promoting Smad2/3 degradation. *The Journal of biological chemistry*, 査読有 2010, In press
- ② Takemoto A, Maeshima K, Ikehara T, Yamaguchi K, Murayama A, Imamura S, Imamoto N, Yokoyama S, Hirano T, Watanabe Y, Hanaoka F, Yanagisawa J, Kimura K. The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A. *Nature Structural & Molecular Biology*, 査読有 Vol.16, No.12, 2009, pp.1302-1308
- ③ 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*, 査読有 Vol.390, No3, 2009, pp.591-596
- ④ Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, Kawasaki S, Oie S, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J. KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ER α . *Oncogene*, 査読有 Vol.28, No32, 2009, pp.2894-2902
- ⑤ Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y, Kawanowa K, So-ma K, Ito I, Yamaguchi Y, Ohie S, Kobayashi Y, Seino Y, Kawano M, Kawabe YI, Takei H, Hayashi S, Kurosumi M, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nature Cell Biol.* 査読有 Vol.11, No3, 2009, pp.312-319
- ⑥ Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Simizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*. 査読有 Vol.133, 2008, pp.627-639
- ⑦ Komatsu Y, Ito I, Wayama M, Fujimura A, Akaogi K, Machida H, Nakajima Y, Kuroda T, Ohmori K, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J. PPAR γ ligands suppress the feedback loop between E2F2 and cyclin-E1. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 Vol.370, No.1, 2008, pp.145-148
- ⑧ Takemoto A, Murayama A, Katano M, Urano T, Furukawa K, Yokoyama S, Yanagisawa J, Hanaoka F and Kimura K. Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensing I. *Nucleic Acids Res.* 査読有 Vol.35, 2007, pp.2403-2412
- ⑨ Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, Kato S, Kimura K, Yanagisawa J. Turning Off Estrogen Receptor β -Mediated Transcription Requires Estrogen-Dependent Receptor Proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* 査読有 Vol.26, 2006, pp.7966-7976
- ⑩ Murayama A, Sakura K, Nakama M, Yasuzawa-Tanaka K, Fujita E, Tateishi Y, Wang Y, Ushijima T, Shibuya K, Kawabe Y, Yanagisawa J. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2

gene promoter is an epigenetic memory.
EMBO J. 査読有 Vol.25, 2006,
pp.1081-1092

〔学会発表〕(計6件)

- ①村山明子 核小体因子Nucleomethylinによるリボソーム合成調節機構と細胞内エネルギー代謝 2010年度日本農芸化学会シンポジウム 2010/3/30 東京
- ②村山明子 エピジェネティック機構を介した細胞内エネルギー代謝制御 日本レチノイド研究会 第20回学術集会・ランチョンセミナー 2009/11/21 東京
- ③村山明子 核小体因子Nucleomethylinによる核内反応制御機構の解析 第82回日本生化学会大会 シンポジウム 2009/10/23 神戸
- ④村山明子 rDNA領域のエピジェネティックな制御による細胞内エネルギー調節機構第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会・シンポジウム 2008/12/11 神戸
- ⑤Akiko Murayama, Kazuji Ohmori, Akiko Fujimura, Kayoko Yasuzawa-Tanaka, Shohei Oie, Toshiyuki Shimizu, Junn Yanagisawa eNoSC, a novel protein complex, senses intracellular energy status and epigenetically controls the rDNA locus. 第21回内藤コンファレンス 2008/6/26 八ヶ岳
- ⑥Akiko Murayama, Kazuji Ohmori, Akiko Fujimura, Kayoko Yasuzawa-Tanaka, Takao Kuroda, Shohei Oie, Toshiyuki Shimizu and Junn Yanagisawa eNoSC, a novel protein complex, epigenetically controls the rDNA locus Metabolic Pathways of Longevity・Keystone Symposium 2008/4/1 Denver

〔その他〕

ホームページ等

<http://yanagisawalab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 明子 (MURAYAMA AKIKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：50431656