

機関番号：12102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21689009

研究課題名（和文） 細胞内エネルギー代謝破綻の個体への影響と疾患との関係の解明

研究課題名（英文） The nucleolar protein NML regulates the energy metabolism in vivo.

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（和文）：本研究では、eNoSC の解析を通じて細胞のエネルギー代謝の個体における役割を明らかにし、細胞エネルギー恒常性の破綻と疾患の関わりを解明することを目指した。eNoSC 複合体の構成タンパクである NML の遺伝子欠損マウスを作成したところ、NML 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ、体重が軽く、体脂肪率が低いことが明らかとなった。また、糖負荷テストを行ったところ、野生型に比べ早期に血糖値の減少が認められ、NML ノックアウトマウスの糖代謝に異常が認められることが明らかとなった。eNoSC が個体においてもエネルギーフローの調節に働くことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to investigate the physiological role of NML in vivo, we generated mice with a targeted deletion of the gene coding NML (NML-KO mice). The most of NML-KO mice (90%) were embryonic lethal. We generated mouse embryonic fibroblasts (MEF) from NML-KO embryos. We found that metabolites level of glycolysis and TCA cycle in NML-KO MEF have been different from those in WT MEF using the metabolome analysis by CE-MS. These result suggested that NML is related to the regulation of glucose metabolism. Next, we evaluated the glucose metabolism of the surviving NML-KO mice. The surviving NML-KO mice showed the increase of serum glucose levels and the decrease of serum insulin levels under the chow diet compared with WT mice. These results showed the suppression of insulin secretion from pancreatic beta cells in NML-KO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2010 年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
年度			
年度			
年度			
総計	21,600,000	6,480,000	28,080,000

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、エネルギー代謝、リボソームRNA

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、細胞外から糖を取り込み代謝することによって ATP を産生する。一方、細胞内の蛋白質群は、ATP をエネルギー源として細胞機能の維持を行って

いる。正常な細胞では「ATP 産生系」と「ATP 消費系」のバランスが保たれ、エネルギー収支が合った状態にあるものと考えられる。エネルギー収支を制御するためには、産生系と消費系を結び付けるメカ

ニズムが必要である。しかしながら、そのようなメカニズムについてはほとんど解析がなされてこなかった。

本研究者は、ATP代謝のバランスを制御する新たなタンパク質複合体 eNoSC (energy-dependent Nucleolar Silencing Complex) を見出した【Akiko Murayama et al., *Cell*, 2008】。eNoSC は、NAD 依存的ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1、ヒストンメチル化酵素 SUV39 を含み、新規蛋白質 Nucleomethylin (NML) を介して核小体の rDNA 領域のメチル化ヒストンに結合する。細胞外のグルコースが低下すると、細胞内の ATP 濃度が低下し、NAD<sup>+</sup>濃度が上昇する。その結果、eNoSC が周辺のヒストンのアセチル基をメチル基に変換し、それを足場として新たな eNoSC が結合する。このようなステップが繰り返されることによって rDNA 領域がエピジェネティックに抑制され、リボソーム合成が低下する。リボソーム合成の低下は、合成自体に要するエネルギーを減少させると同時に、新たな蛋白質合成を抑えることによってエネルギー消費を抑制する。このように、eNoSC は、細胞内のエネルギー状態を把握し、rDNA のエピジェネティックな制御を介して蛋白質合成を抑え、エネルギー消費を調節する複合体であることを明らかにした。さらに、申請者らは、eNoSC がエネルギー低下時の細胞の生存に必須であることも見出している。

細胞のエネルギー代謝系バランスの乱れは、癌で見られる Werburg effect のようにさまざまな疾患において見出されている。したがって、このようなエネルギー恒常性の破綻は多くの疾患の原因となる可能性が考えられるが、そのような研究はほとんど行われてきていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、eNoSC の解析を通じて細胞のエネルギー代謝の個体における役割を明らかにし、細胞エネルギー恒常性の破綻と疾患の関わりを解明することを目指す。さらに、NML が低分子結合ポケットを持つことから、NML に結合して eNoSC の活性を調節し、細胞のエネルギー代謝を制御する化学物質の探索を行う。本研究結果は、さまざまな疾患の新たな治療戦略開発の端緒となる可能性がある。

具体的には以下の 4 項目を予定している。

- (1) eNoSC の個体での役割の解析
- (2) eNoSC の破綻と疾患の関係の解析

eNoSC の主要構成要素である NML のトランスジェニックマウスとノックアウトマウスの表現系をもとに、eNoSC の個体での機能を明らかにする。さらに、eNoSC の制御破綻と疾患との関連を解析する。また、絶食や高脂肪食などの負荷による表現系についても検討し、現象から分子機能にせまる。NML トランスジェ

ニックマウス (NML-Tg) はすでに完成し解析を始めている。興味深いことに NML-Tg は大変攻撃性が高く、子育てにも異常が見られており、行動異常とエネルギー代謝の関係についても解析を進めたい。

- (3) エネルギー代謝の腫瘍形成における役割の解析

癌細胞では、エネルギー代謝系のバランスが正常細胞と異なることが報告されている。例えば、多くの癌は ATP 産生の解糖系依存度が高く、低酸素環境下でも増殖できる (Werberg Effect)。申請者は、癌とエネルギー代謝の関係を解析する目的で、NML 高発現癌細胞株と NML ノックダウン癌細胞株を作製した。これらの癌細胞株の増殖速度は接着条件下では変わらない。しかしながら、非接着条件下では NML の発現量依存的にコロニー形成が抑制された。そこで、本研究では eNoSC の腫瘍形成、転移における役割をマウスと in vitro 実験系を用いて解析し、その分子メカニズムの解明を試みる。

- (4) eNoSC を制御する低分子物質の探索と ATP 代謝に対する効果の検討

申請者らの X線結晶解析の結果、NML は C 末端側に アデノシルメチオニン (AdMet) の結合ドメインを有することが明らかとなっている。AdMet が結合できない変異型の NML を含む eNoSC は活性を示さないことから、AdMet の NML への結合によって eNoSC の活性が制御されているものと考えられる。そこで、NML に結合する合成化学物質を用いて eNoSC の活性を制御することを試みる。さらに、eNoSC を制御できる化学物質について、細胞と個体のエネルギー代謝に与える影響を検討する。

## 3. 研究の方法

eNoSC を用いて細胞の ATP 代謝異常と疾患との関係について明らかにするために、本研究では以下の 4 項目について実験を進める。

- (1) eNoSC の個体での役割の解析
- (2) eNoSC の破綻と疾患の関係の解析

細胞内エネルギー恒常性の個体での意義を明らかにし、その破綻と疾患との関係を解明するため、以下の研究を行う。

① NML トランスジェニックマウスの作製と解析

② NML 遺伝子欠損マウスの作製

- (3) エネルギー代謝の腫瘍形成における役割の解析

eNoSC のコロニー形成と腫瘍形成能に与

える影響の検討 eNoSC の癌浸潤能と癌転移に与える影響の検討 eNoSC の癌抑制メカニズムの解析

(4) eNoSC を制御する低分子物質の探索と ATP 代謝に対する効果の検討

NML に結合し、その活性を制御する低分子化合物を探索し、エネルギー代謝を人為的に制御できるか否かを検討するため、以下の研究を進める。

- ①NML に結合する化学物質のスクリーニング
- ②化学物質の eNoSC 活性に与える影響の検討

#### 4. 研究成果

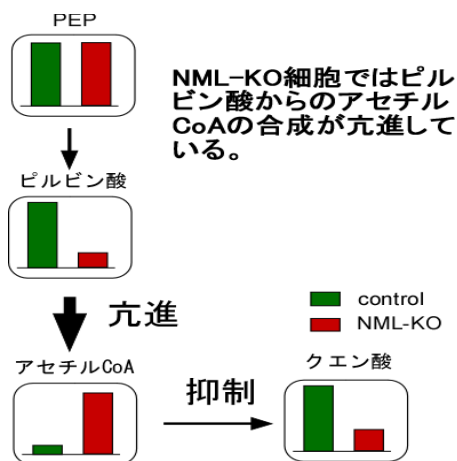
本研究では、細胞内の ATP 代謝を制御する核小体複合体 eNoSC の解析を通じて、細胞エネルギー恒常性の破綻と疾患の関わりを解明することを目指した。

(1) NML ノックアウトマウスの作製

全身で NML 遺伝子を欠損したマウスを作製した。NML ノックアウトマウスの出生率はメンデルの法則に従わず、多くのノックアウトマウスが胎生致死であることが判明した(野生型:ヘテロ:ホモ=1:2:0.1)。胎生致死の原因については現在検討中である。また、一部出生したマウスは野生型マウスに比べ、体重が軽く、体脂肪率が低いことが明らかとなった。

(2) NML ノックアウトマウスから得た胎児線維芽細胞 (MEF) の解析

NML ノックアウトマウスの多くが胎生致死であったため、まず、胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて解析を行った。NML 遺伝子欠損 MEF 細胞においても、培養細胞株と同様、低グルコース処理において rRNA 転写抑制が認められず、細胞死が早期に誘導されることが明らかになった。NML がエネルギー消費系だけでなく、エネルギー代謝全体に及ぼす影響について網羅的に解析するため、メタボローム解析を行った。



その結果、解糖系が亢進し、TCA 回路が抑制されていることが示唆された。特に、ピルビン酸からアセチル CoA を合成する経路の亢進、アセチル CoA からクエン酸を合成する経路の抑制が顕著に認められた。さらに詳細に検討したところ、NML ノックアウト MEF 細胞では、糖の取り込みの亢進や解糖系の最終産物である乳酸の産生亢進を認めた。一方、チトクローム C 活性は NML ノックアウト MEF 細胞で低下していることが明らかとなった。以上の結果から、NML の欠損によって、解糖系が亢進し、ミトコンドリア機能が抑制されていることが明らかとなった。

(3) 癌細胞増殖と NML の解析

このような解糖系優位な代謝は癌細胞や増殖の激しい細胞で認められることが知られており、特に癌細胞においては Werburg Effect と呼ばれている。そこで、軟寒天培地を用いて、癌特異的な足場非依存的増殖状態を検討したところ、NML ノックダウン癌細胞株ではコロニー形成が亢進し、一方、NML 高発現癌細胞株ではコロニー形成が抑制されていた。この結果は、NML の欠損によって、癌細胞様の増殖が亢進していることを示しているが、現在さらに詳細に検討を進めている。以上の結果から、eNoSC は ATP 消費系だけでなく ATP 合成系にも働き、細胞内のエネルギー代謝調節を制御していることが明らかとなった。

(4) NML ノックアウトマウスにおける糖代謝

MEF 細胞での解析によって、NML 遺伝子欠損によってエネルギー合成系制御に変化を認めたことから、出生した NML 遺伝子欠損マウスでの検討を行った。まず、各種血液パラメーターについて、野生型マウスと比較検討した。その結果、NML 遺伝子欠損マウスは野生型に比べ、明らかに血糖値が高い傾向を示した。次に糖負荷テストを行い、インスリンの分泌能について検討した。その結果、NML 遺伝子欠損マウスではインスリン分泌能が低いことが示唆された。

以上の結果から、NML が個体における糖代謝制御に関わり、NML 量の低下が糖尿病と関わることを示唆された。

(5) eNoSC を制御する低分子物質の探索

NML の構造解析の結果から、NML の活性を制御する低分子物質の存在が示唆された。そこで、化合物スクリーニングによって NML に結合し活性を制御する低分子を探索したいと考えた。しかしながら、NML の活性を評価する簡便な方法を見つけることができず、スクリーニングを行うことができなかった。

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2件)

① Kuroda T, Murayama A, Katagiri N, Ohta YM, Fujita E, Masumoto H, Ema M, Takahashi S, Kimura K, Yanagisawa J.

RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A.

*EMBO J*. 査読有 30(6):1054-1066 (2011)

② Mikogai A, Yanagisawa J, Yasuzawa-Tanaka K, Murayama A. The nucleolar protein NML regulates hepatic ATP levels during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 390(3):591-596 (2009)

[学会発表] (計5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 東京大学

② 村山明子、「The nucleolar protein NML regulates the storage of triglyceride in liver」

遺伝情報 DECODE・転写研究会共催冬のワークショップ 2010  
2010/1/19 越後湯沢ホテルオークラ

③ 御子貝綾、村山明子、安澤(田中)加代子、柳澤純

「マウス肝臓における核小体因子Nucleomethylinの機能解析」  
第32回日本分子生物学会年会  
2009/12/12 パシフィコ横浜

④ 村山明子、「核小体蛋白質NMLによるATP代謝制御ネットワークの解明」

C R E S T 「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム  
2009/10/16 東京・日本科学未来館

⑤ Aya Mikogai, Akiko Murayama, et al  
Functional analysis of a nucleolar protein, Nucleomethylin in mouse liver.

21-Willhelm Bernhard Workshop  
2009/9/4 Poland, Ustron, Spa Hotel Diament

[図書] (計1件)

村山明子、「代謝ストレス応答とrRNA転写制

御機構」

生化学第81巻第6号 p456-464

2009/6/1

[その他]

ホームページ等

<http://yanagisawalab.org/home/>

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