

研 究 報 告 書

「新規蛋白質 NML による ATP 代謝制御ネットワークの解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研 究 者：村山 明子

1. 研究のねらい

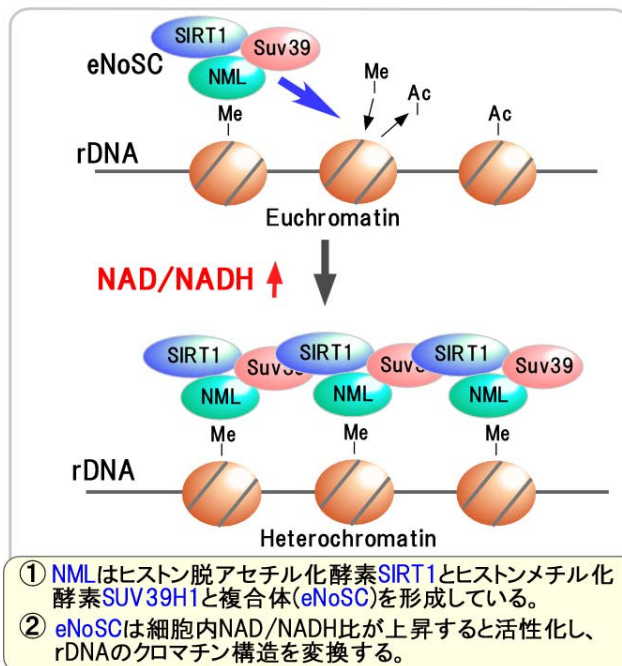
正常な細胞機能を維持するためには、解糖系やTCAサイクルなどの「ATP 産生系」と蛋白質の機能による「ATP 消費系」のバランスが保たれていなくてはならない。両者のバランスが崩れ、ATP を中心としたエネルギー産生系が消費系に対して優位になれば、その生物個体は生活習慣病などの種々の疾患を発症する。一方、消費系が産生系に対して有意に働けば細胞のエネルギーは枯渇し、死を招く。このように、ATP の生産と消費のバランスを維持することは、細胞にとって極めて重要であるが、その分子メカニズムについては不明である。ATP 代謝を制御する分子メカニズムが明らかになれば、そのネットワークを人為的に制御することによって、癌・生活習慣病・老化などの新たな治療戦略の開拓が期待できる。

私は、エネルギー制御システム的一端を明らかにするため、核内小器官である核小体に注目した。核小体には、多数のリボソーム DNA (rDNA)が存在し、そこからリボソーム RNA (rRNA)が転写される。転写されたrRNAは、リボソームタンパク質と核小体内で複合体を形成し、細胞質に輸送され、タンパク質合成工場として機能する。細胞内のエネルギーの大部分は核小体でのリボソーム合成およびリボソームでのタンパク質合成によって消費されることから、エネルギー消費をコントロールするためには、核小体でのリボソーム合成を制御することが最も理にかなっている。本研究者はこのような着想に基づき研究を進め、エネルギー生産系とリボソーム合成系が連動していることを見出し、さらに、両者の連動に必要な新規タンパク質複合体 NML/SIRT1 複合体を同定して eNoSC (energy-dependent Nucleolar Silencing Complex) と名付けた。本研究では eNoSC を中心とする ATP 代謝制御ネットワークの解明とその個体における役割、さらに、ネットワークの破綻と疾患との関係を明らかにすることを目標とした。

2. 研究成果

2-1 NML/SIRT1 複合体の rRNA 転写制御機構の解明

NML/SIRT1 複合体 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。糖などの栄養分が少なくなり細胞内の ATP 濃度が低下すると、NAD⁺濃度が上昇し、その結果、SIRT1 が活性化される。SIRT1 の活性化は周辺のヒストンを脱アセチル化し、さらに、SUV39 によるヒストンメチル化が誘導される。メチル化されたヒストンには、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、active 状態だった rDNA ユニットがエピジェネティックに不活性化され、rRNA の転写量が減少する【右図】。その結果、リボソーム合成量が下がり、タンパク質

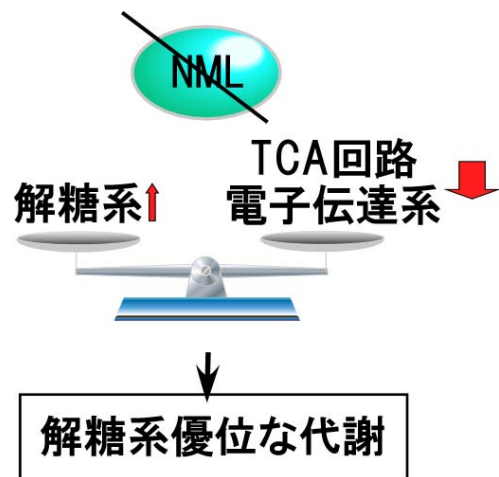


合成が抑制されるためエネルギー消費が低下する。

このように、eNoSC は、細胞内のエネルギー状態を感知し、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。

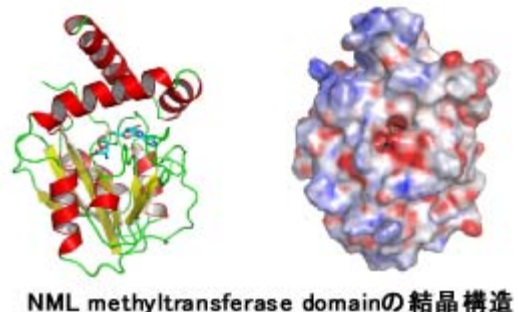
2-2 NML/SIRT1 複合体の rRNA 転写制御機構の解明

NML の 80% は核小体に局在するものの、20% 程度が核質にも存在することから、rDNA 以外の遺伝子上のジメチル化ヒストンにも結合し、その転写を制御している可能性が考えられた。そこで、NML がゲノム上のどの部分に結合しているかをクロマチン免疫沈降(ChIP)-シーケンスを用いて解析した。さらに、NML が結合するゲノムのクロマチン化学修飾状態についても同様の方法で検討した。その結果、NML が rDNA 以外の領域でもヒストン H3K9me2 に結合することを示唆するデータを得た。さらに、DNA マイクロアレイ解析から、NML が結合する遺伝子の転写量が NML ノックダウンによって変化することも確認した。これらの結果から、NML が核小体外の核においても、遺伝子制御に直接的に働くことが示唆された。そこで、ATP 合成系への影響について検討したところ、NML ノックアウト細胞では解糖系の軽度亢進と、ミトコンドリア機能の低下による TCA 回路および電子伝達系の抑制が認められた。つまり、NML ノックアウト細胞では解糖系優位な代謝に変化していることが明らかとなった。詳細な分子メカニズムについては解析中であるが、NML を介した核小体-ミトコンドリアクロストークが示唆された。



2-3 eNoSC を中心としたエピジェネティクスによる細胞内エネルギー制御システムの解明

eNoSC の鍵構成タンパク質 NML の X 線結晶構造を解析した結果、NML は C 末端領域に S-adenosylmethionine (SAM) 依存的 methyltransferase domain を持つことが明らかとなった。この領域中にアミノ酸置換を導入し、SAM を結合できない変異体を作製したところ、同変異体は rRNA 転写を抑制することが出来なかった。したがって、NML は何らかの標的分子をメチル化し、SIRT1 と協調して rDNA のクロマチン状態を変換しているものと考えられる。NML の標的分子の探索と解析から、エネルギー代謝制御の新たな側面が明らかになるものと考えられる。また、SIRT1 が NAD を、NML が SAM を受容することから、NML/SIRT1 複合体は両代謝系を結びつけ、細胞内の機能を制御している可能性も考えられる。構造解析から予想されるメチル化標的分子は低分子であることが示唆されており、これを参考に低分子 RNA を標的分子として視野に入れ解析を進めてきたが、本研究期間内に NML のメチル化標的分子を同定することができなかった。方法を変えて、今後も探索を続けていく。また、NML の SAM 結合ポケットに結合する化合物は NML の活性を制御することが可能であると考えられ、このポケットに結合する新たな化合物の探索も進めたい。一方、NML は、N 末端側でヒストン H3K9me2 と特異的に結合することが明らかとなった。N 末端側は結晶構造をとらないことから、天然変性タンパク質であることが予想された。



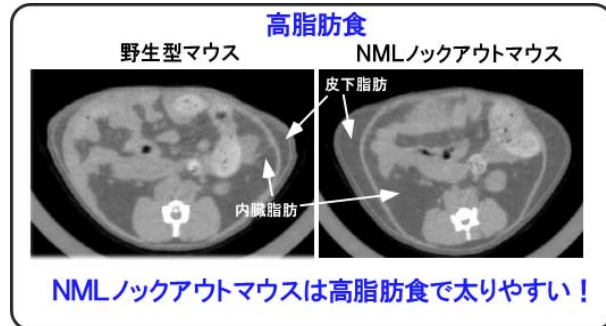
NML methyltransferase domain の結晶構造

2-4 eNoSC を中心とした細胞内エネルギー制御システムの破綻と疾患との関係の解明

A) eNoSC を中心としたエネルギー制御システムと代謝リック症候群との関係

NML 遺伝子欠損マウスはその多く(80-90%)が胎生致死であることが明らかになった。胎生致死の原因については検討中であるが、ある特定の時期に致死が認められるわけではない。したがって、NML は特異的な発生段階に作用しているわけではなく、発生段階での胎児の栄養状態などの環境応答に関与しているのではないかと考え、さらに検討を続けている。

出生後の NML の機能を解析するため、出生した一部の NML 遺伝子欠損マウスを解析したところ、野生型マウスに比べ、通常食で体重が軽い、高脂肪食ではより太りやすく、高コレステロール血症および高血糖を呈し、糖尿病や高脂血症などのメタボリック症候群になりやすいことが示唆された。さらに、出生した NML 遺伝子欠損マウスの 10-20%に、水頭症や骨格系の異常を認めることも明らかとなった。これらの結果は、NML が個体においてのエネルギーフローに影響することを示唆するものであると考えられた。



B) eNoSC を中心としたエネルギー制御システムと癌との関係

癌では TCA 回路の働きが鈍く、ATP 産生の多くの部分を解糖系に依存している(Werburg effect)。また、細胞内の SAM 濃度が低く、rRNA 合成が盛んである。これらの知見から、NML が rRNA 合成の制御を介して、癌細胞のエネルギー代謝をコントロールすることによって、細胞増殖を制御することが予想された。解析の結果、癌細胞に NML を過剰発現させると、軟寒天培地上のコロニー形成が強く抑制されることを見出した。また、NML をノックダウンした株では、コロニー形成の著しい増加を認めた。軟寒天培地は癌特異的な足場非依存的な増殖を観察するための培地である。通常の培養環境では、細胞増殖に差はなかったことから、NML が癌特異的な細胞増殖に関与していることが示唆された。NML ノックアウトから得たマウス胎児線維芽細胞を用いた解析においても、不死化処理を行うことによって、癌細胞様の代謝に変化することが明らかとなった。特に興味深いのは、解糖系酵素であるピルビン酸キナーゼの M2 型が発現されるようになることである。M2 型のピルビン酸キナーゼは癌細胞で発現が認められるようになることが報告されている。これらの結果から、癌細胞特異的なエネルギー代謝への移行に NML が関わることを示唆された。

3. 今後の展開

本研究では、核小体タンパクである NML を鍵因子とする複合体 eNoSC を中心とした細胞内エネルギーの動的平衡制御システムについて明らかにすることを目指した。NML 遺伝子欠損マウスは、高脂肪食の摂取によって野生型マウスよりも脂肪を蓄積しやすく、高コレステロール血症および高血糖を呈し、糖尿病や高脂血症などのメタボリック症候群になりやすいことが示唆された。同時に、癌細胞に NML を発現させるとコロニー形成を強く抑制することも見出した。これらの結果は、eNoSC を中心とした細胞内エネルギーの動的平衡制御システムが、細胞とともにからだのエネルギーフローをも調節していること、さらに、細胞内エネルギー制御システムの破綻がさまざまな疾患の原因となり得ることを示している。一方で、X 線結晶解析の結果から、NML は S-アデノシルメチオニン (SAM) 結合ポケットを持ち、SAM の結合が活性に必須であることが明らかとなった。このことは、SAM 結合ポケットに結合し、NML の活性を制御する低分子化合物の探索が可能であることを意味している。eNoSC を制御する化合物は、細胞内エネルギー制御システム異常に起因する疾患の治療に応用できるものと期待できる。以上の結果を踏まえ、今後も eNoSC を中心としたエネルギー制御システムの解明をさらに進め、メタボリック症候群、癌などを含む疾患の理解や革新的治療戦略の確立につなげることを目指したい。

4. 自己評価

核小体因子 NML の機能解析を通して、ATP 消費系の新たな制御機構を明らかにすることができた。さらに、細胞内エネルギー代謝ネットワークに、核小体—ミトコンドリアの存在を示唆することができた。この 2 点については、エネルギー代謝分野に大きく貢献できた点だと考えられる。しかしながら、ノックアウトマウス作製に時間がかかってしまったことにより、個体のエネルギー代謝制御への関与の詳細まで進めることができなかった。また、構造解析の結果から予想された NML 制御分子の同定を行う予定であったが、ここまで進めることができなかった。この 2 点については、今後も解析を続け、成果に結び付けたいと考えている。

5. 研究総括の見解

核小体での rRNA 転写を制御する NML の機能に関し、NML/SIRT1 複合体 (eNoSC:energy-dependent Nucleolar Silencing Complex)を同定し、この複合体が細胞内のエネルギー状態を感知し、エピジェネティック機構によるタンパク質合成の抑制を行い、エネルギー消費を制御することを明らかにした。また、NML のノックアウトマウスがメタボリック症候群になりやすいこと、がん細胞に NML を過剰発現させると軟寒天でのコロニー形成が強く抑制されることを明らかにした。これらの研究は、NML による ATP 消費系の新たな制御機構、並びに細胞内代謝ネットワークに核小体—ミトコンドリアが存在することを示すものであり、独創性が高い成果である。今後は、NML の構造解析から予想される NML 制御分子の同定やメタボローム解析などにより、メタボリック症候群やがんなどの治療薬開発も目指して欲しい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Mikogai A, Yanagisawa J, Yasuzawa-Tanaka K, Murayama A . The nucleolar protein NML regulates hepatic ATP levels during liver regeneration after partial hepatectomy. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 390(3), 591-596 (2009).
2. 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, Shimizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. <i>Cell</i> 133, 627-639 (2008).
3. Kajiro M, Hirota R, Nakajima Y, Kawanowa K, So-Ma K, Ito I, Yamaguchi Y, Ohie SH, Kobayashi Y, Seino Y, Kawano M, Kawabe YI, Takei H, Hayashi SI, Kurosumi M, Murayama A , Kimura K, Yanagisawa J. The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. <i>Nat Cell Biol</i> 11, 312-319(2009).

(2)特許出願

なし

(3)その他

招待講演

1. 村山明子、「新規核小体たんぱく複合体 eNoSC による細胞内エネルギー代謝調節機構」、第 2 回 FANTASY、東京、2009 年 2 月 7 日
2. 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、神戸、2009 年 10 月 23 日
3. 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、東京、2009 年 11 月 21 日
4. 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

エネルギー代謝」、2010 年度 日本農芸化学会シンポジウム、東京、2010 年 3 月 30 日
受賞

1. 平成 21 年度文部科学大臣表彰 若手科学者賞 「細胞内エネルギー代謝調節機構の研究」(2009 年 4 月 14 日)

総説

1. 村山明子:代謝ストレス応答とrRNA転写制御機構 生化学 Vol. 81, No. 6, 456-464 (2009)
2. 村山明子・大森一二・柳澤純:新規核小体複合体eNoSCによるエピジェネティックなrRNA転写制御機構実験医学 Vol. 26, No. 16, 2610-2614 (2009)
3. 大森一二・村山明子・柳澤純:エネルギー代謝とrRNA転写制御 蛋白質核酸酵素 Vol.54, No.3, 230-236 (2009)