

自己評価報告書

平成23年4月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012

課題番号：20221010

研究課題名（和文） 転写マシナリーと核内微細構造のダイナミックプロテオミクス

研究課題名（英文） Dynamic Proteomics of Transcriptional and Nuclear Architecture

研究代表者

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO TAKAO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：90198797

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロテオミクス、複合体解析、転写調節、スプライシング、細胞周期

1. 研究計画の概要

核内受容体はクロマチンのリモデリングや修飾などを行うタンパク質複合体と相互作用して、様々な遺伝子の転写を活性化する。さらにスプライシングや分解などのRNAプロセッシングも同時に制御され、核内微細構造と転写が密接な関係を持って制御されている可能性が示唆されている。

このような多数のタンパク質によって形成される転写調節のマシナリー複合体の時間的空間的な変化を解明するための新たな解析手法を開発することを目的とする。

パキウウイルス免疫法等により作製した高親和性モノクローナル抗体を低ノイズ磁気ビーズに付加し、複合体を免疫精製してショットガンプロテオミクスにより同定する。内在性の複合体を高感度に検出する手法を開発する。複合体構成タンパク質の定量的測定による時系列変化の解析を目指す。また抗体金属ナノパーティクルプローブによる軟X線顕微鏡の開発を行い、核微細構造と転写マシナリーの空間的変化を解析する技術を開発する。

2. 研究の進捗状況

1) 抗体磁気ビーズプロテオミクス法について

核内受容体HNF4 α およびLXR α 、またRNAプロセッシングにより細胞周期を調節するタンパク質として同定したWTAPについて、得られている抗体についてプロテオミクス解析（抗体磁気ビーズを用いたショットガン解析）により、データを取得する方法を確立した。データの信頼性を上げるため、簡易ロボットシステムを導入してn数を増やし、インフォーマティクスによる定量的

評価法を開発した (Daigo et al, JBC 2011)。また、LXR α の抗体を用いて、HepG2細胞で核小体のdense fibrillar componentに局在し、リボゾームRNAの転写調節を行っている可能性を見出した（論文投稿準備中）。

2) WTAPとスプライシングマシナリー解析について

プロテオミクスによりWTAPと複合体を形成することを見出した5種類のタンパク質に対して特異抗体を作製した。また、PAR-CLIP法を改良し、WTAPと相互作用するRNAを同定する手法を開発した。同定したRNAのうちnon-coding RNAについて、複合体タンパク質との関係により核スペckルへの局在に関与することを見出し分子生物学会にて発表した（堀内ほか；2010年神戸）。

3) 軟X線顕微鏡の開発について

軟X線CT装置による細胞観察のため、細胞の観察装置を開発した。核膜に存在する膜タンパク質エメリンに対するモノクローナル抗体を作製し、軟X線に適したサンプルホルダーの選定や細胞の固定法および金ナノパーティクルによる免疫染色の条件をほぼ確立し、平成23年にはいり、簡易型X線顕微鏡としては世界で始めて細胞の撮像に成功した。

3. 現在までの達成度

当所の目標に対して研究が遅れているが、今後の努力により成果が見込まれる

（理由）研究は順調に進展しているが、論文発表等の成果の発信が遅れている。上記3つのテーマはどれも新規性が高いため、確認実験を慎重に行っている。これらの成果をまとめて論文発表することにより予定どおりの成果が見込まれる。

4. 今後の研究の推進方策

① WTAPとスプライシング機構の解析

WTAPは我々が、RNAのプロセッシングを通して細胞周期を調節しているタンパク質として同定した(PNAS, 2006)核タンパク質である。プロテオミクス解析により構成タンパク質を同定しWTAPの核スペックル構造への局在と関係しており、RNAスプライシングや安定性の調節により細胞周期の調節に関与することが示唆された。得られた結果より、WTAP複合体はco-transcriptionalなsplicingに関与していると考えられ、ミニジーンにより解析する。また細胞シグナリングのFRETプローブによるイメージングについてモデリング法を確立しており、スプライシングの機構についてもプローブ設計し評価系を構築する。

② HNF4 α , LXR α ; HepG2細胞においてHNF4 α のアイソフォーム解析、りん酸化等修飾解析および複合体解析を行い、IGF-1シグナリングに関与するPerQ2を相互作用タンパク質として同定した(JBC, 2011)。これらの分子が転写調節に関与する可能性および複合体構成タンパク質の動的変化について解析するダイナミックプロテオミクスの技術を開発する。LXR α についてプロテオミクスやChIP-seq等の網羅的解析を行い、核小体における調節機構を明らかにする。

③ イメージング技術の開発; 本研究で用いている軟X線装置はCT撮像が可能であるため、現在のサンプルホルダーを改良して、3次元像でさらに解像度の高いものの取得を目指す。また、微細構造の撮像を目指して、コヒーレントな軟X線装置を開発しているグループとの共同研究も開始し、解像度をさらに上げることを目指す。

5. 代表的な研究成果

(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23件)

1. Soft X-ray Laser Microscopy of Lipid Rafts towards GPCR-Based Drug Discover Using Time-Resolved FRET Spectroscopy] Baba M, Kozasa T, Hamakubo T, Kuroda H, Masuda K, Yoneya S and Kodama T, *Pharmaceuticals* 2011, 4, 524-550 査読有
2. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium specific *endomucin* expression Kanki Y, Kohro T, Jiang S, Tsutsumi S, Mimura I, Suehiro J, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Iwanari H, Naito M, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T and Minami T. *The EMBO Journal* 2011(in press)査読有
3. Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4a (HNF4a) isoforms, phosphorylation status, and interactive

cofactors. Daigo K, Kawamura T, Ohta Y, Ohashi R, Katayose S, Tanaka T, Aburatani H, Naito M, Kodama T, Ihara S, Hamakubo T. *J Biol Chem*. 2011 Jan 7;286(1):674-86. 査読有

4. A wave of nascent transcription on activated human genes. Wada Y, Ohta Y, Xu M, Tsutsumi S, Minami T, Inoue K, Komura D, Kitakami J, Oshida N, Papantonis A, Izumi A, Kobayashi M, Meguro H, Kanki Y, Mimura I, Yamamoto K, Mataka C, Hamakubo T, Shirahige K, Aburatani H, Kimura H, Kodama T, Cook PR, Ihara S. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Oct 27;106(43):18357-61. 査読有
5. Functional reconstitution of G-protein-coupled receptor-mediated adenylyl cyclase activation by a baculoviral co-display system. Sakihama T, Masuda K, Sato T, Doi T, Kodama T, Hamakubo T. *J Biotechnol*. 2008 May 20;135(1):28-33. 査読有

[学会発表] (計27件)

1. プロセッシングおよび細胞周期を制御する新規複合体の機能解析: 堀内恵子, 川村猛, 浜窪隆雄 BMB2010 2010/12/7~10 神戸
2. 敗血症患者血中ペントラキシン3 (PTX3) 複合体のプロテオミクス解析: 太期健二, 山口尚敬, 川村猛, 児玉龍彦, 井上健司, 浜窪隆雄 BMB2010 2010/12/7~10 神戸
3. 三量体Gタンパク質活性化とRGS相互作用のFRETによる生細胞イメージング: 増田一之, 北上純一, 井原茂男, 小笹徹, 児玉龍彦, 浜窪隆雄 BMB2010 2010/12/7~10 神戸
4. 高親和性抗体結合磁性ビーズを用いた内在性HNF4 α 複合体の高効率精製とプロテオミクス解析、およびHNF4 α -HNF4 γ ヘテロ2量体による転写制御解析: 太期健二, 川村猛, 片寄聡, 田中十志也, 児玉龍彦, 浜窪隆雄 BMB2008 2008/12/9~12 神戸ポートアイランド
5. Development of the compact low-energy soft x-ray CT instrument for the soft material structural analysis: M. Miyoshi, T. Hamakubo, T. Kodama, A. Koishikawa, M. Tsuchiya, N. Aoki The 52nd International Conference on Electron, Ion, Photon Beam and Nanofabrication Technology 2008/5/27 Portland OR, USA

[図書] (計0件)

なし。

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし。

[その他]

ホームページ

<http://www.lsbm.org/staff/hamakubo.html>