

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 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

研究成果の概要（和文）：核内受容体 HNF4 α や RNA プロセッシングに関与する WTAP に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体磁気ビーズによる高感度プロテオミクス法を確立して、糖代謝に関与する遺伝子の転写調節や細胞周期調節に関わるタンパク質複合体を同定した。また、WTAP の核スペckルへの局在やオルタナティブスプライシング機構、核内受容体 LXR α の核小体でのリボゾーマル RNA 転写調節機構など核微細構造への分布とのかかわりを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a highly sensitive quantitative proteomics analysis technique by using magnetic beads with immobilized specific antibodies. By generating highly specific monoclonal antibodies against HNF4-alpha, LXR-alpha, or WTAP, we have identified protein complexes for the transcriptional control of glucose metabolism related genes or RNA-processing machinery for the cell cycle control through distribution to nuclear speckles or nucleoli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	30,000,000	9,000,000	39,000,000
2009 年度	30,400,000	9,120,000	39,520,000
2010 年度	30,400,000	9,120,000	39,520,000
2011 年度	30,400,000	9,120,000	39,520,000
2012 年度	30,400,000	9,120,000	39,520,000
総計	151,600,000	45,480,000	197,080,000

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、スプライシング、転写調節、細胞周期、核スペckル、核小体、クロマチン修飾

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモン受容体に代表される核内受容体は、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やコアアクチベーターやコレプレッサー複合体と相互作用して、様々な遺伝子の転写を調節することが知られている。さらにスプライシングや輸送あるいは分解などの RNA プロセッシングも同時に制御され、スペckルなどの核内の

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が、詳細なメカニズムは不明である。相互作用する複合体タンパク質を同定することにより、細胞特異的あるいは遺伝子特異的な制御因子を明らかにし、副作用の少ない効果的な治療薬につながるかと期待される。しかしながら、相互作用タンパク質の同定は、タグを付けた目的タンパク質を強制発現し、免疫沈降の際に

混在してくるタンパク質を除去するための強い洗浄操作により回収効率が極端に下がり、培養ディッシュ数百枚からの調整を必要とすることなど困難が伴い、解析できる細胞や組織に限界がある。また、強制的に発現したタンパク質は細胞内での量比のバランスがくずれることや、翻訳後修飾が異なることなど、内在性のタンパク質の真のパートナーを必ずしも代表していない可能性が考えられた。さらに定量的な評価ができないことから時系列による複合体の変化や修飾の変化などを捉えることが困難である。このような困難を克服するため、内在性タンパク質を高感度に認識する抗体を用いて、効率よく目的タンパク質を精製し、高感度マスペクトロメトリー（MS）解析とバイオインフォマティクスにより、定量解析する手法の開発が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

転写を調節するマシナリーは、多数のタンパク質によって形成される複合体よりなり、時系列をもったシークエンシャルな相互作用を形成する。このような多数のタンパク質による調節機構の、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。核内受容体などの転写因子は微量であるため、生化学的解析に大量のサンプルを必要とする。そこで、本研究では、開発したバキュロウイルス免疫法によって高感度抗体を取得し、低ノイズ磁気ビーズと組み合わせることにより、微量サンプルからの免疫精製を可能とし、高感度MS解析により複合体タンパク質の定量的解析技術を開発する。また、核内の微小構造との関係を解析するため、高解像度のライブセルイメージングが期待できる軟X線顕微鏡の開発を試みる。

3. 研究の方法

バキュロ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内在性の複合体を高感度に検出する手法を開発する。タグを用いる方法に比べ内在性の複合体をリアルタイムに検出できる利点があるが、抗体の認識する部位が相互作用部位であると反応しないか相互作用を阻害する可能性が考えられる。そこで、N端を認識する抗体やC端を認識する抗体など複数の異なる部位を認識する抗体を使用して総合的に判断する。また、時系列変化の解析のため、複合体構成タンパク質のノンラベル定量測定法の確立を目指す。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。

4. 研究成果

HNF4 α はMODY1（若年発症成人型糖尿病）の原因遺伝子として同定された核内受容体で、肝臓・すい臓・小腸の器官形成や糖脂質代謝に重要な役割を果たしている転写因子である。N端A/BドメインとC端Fドメインをそれぞれ認識する高親和性の抗体2種類を作製して、非特異的吸着の少ない低ノイズの磁気ビーズに固定化した抗体磁気ビーズを用いて、遠沈せずに少量のサンプルから効率よく目的タンパク質の複合体を精製する手法を開発した。ショットガンプロテオミクスにより、培養ヒト肝芽腫細胞（HepG2細胞）10cmディッシュ1枚からの細胞核抽出サンプルでHNF4 α 複合体を精製し、複合体タンパク質を数百種類同定することができた。さらに、免疫精製過程をロボット化することによりサンプル間のばらつきを抑え、複数回の抽出データと決定されたペプチド断片の数値データより、複合体構成蛋白質を定量的に評価する手法を確立した。

それぞれの抗体から同定されたペプチド断片の解析により、内在性のHNF4 α は6種類のスプライシングアイソフォームの間でヘテロあるいはホモ2量体を形成しており、また一部は異なる遺伝子であるHNF4 γ とヘテロ2量体を形成していることを明らかにした。RNAi法による発現アレキ解析や、抗体をもちいたChip-seq解析などにより、HNF4 α と γ のヘテロ2量体は、糖代謝に重要なCIDE-B遺伝子を転写調節していることをつきとめた。さらにHNF4 α の新たなリン酸化部位やユビキチン化部位等の修飾箇所を同定した。転写マシナリーの複合体として、クロマチンリモデリングに関わるWINACコンプレックス、HAT複合体のSTAGAコンプレックスおよびNuA4コンプレックス等、NurDコンプレックス(HDAC)を同定した。スプライシングコンプレックスも見出され、核局在解析や全ゲノム解析からもスプライシングへの関与が示唆された。また、転写調節のコアクチベーターとしては、NCoA62/SKIP、PELP1、CREBBPと新規にPerQ2/GIGYF2等を候補として同定した。

同様に糖・脂質代謝に関与する核内受容体LXR α について共焦点顕微鏡を用いた局在解析により、核小体のdense fibrillar componentに局在し、リボゾームRNAの転写調節に関与している可能性が示唆された。LXR α はRXR α とヘテロ2量体を形成し、脂質代謝遺伝子の転写調節をしていることが知られているが、核小体ではホモ2量体で作用していると思われ、核内受容体の新たな転写調節様式と考えられる。

このターゲットドプロテオミクス法はノイ

ズが低い場合、これまで困難であった血液中の微量成分の同定にも使用できる。急性期炎症タンパク質のPTX3について、敗血症の患者血液（PTX3濃度：数十ng/ml）を用いて抗体磁気ビーズによる複合体解析を行い、敗血症時白血球から放出されるDNAやヒストン等からなるNETs（Neutrophil extracellular traps）タンパク質群と結合していることを見出した。これはPTX3が多数の抗菌タンパク質と相互作用し、防御反応として重要な役割を担っていることを示唆する。敗血症の新規マーカーの候補となるとともに新規治療法を示唆する成果となった。

WTAP（Wilms' tumor 1-associating protein）はショウジョウバエの性決定におけるオルタナティブスプライシングに関わるf1(2)d遺伝子のヒトホモログである。我々は転写因子GATA2と相互作用する遺伝子として同定した。WTAPは、血管内皮細胞やHeLa細胞の細胞周期にかかわるサイクリンA2のRNAの安定性を制御している。核内ではスペックル構造に多く存在し、スプライシングなどRNAプロセッシングの機構に関与すると考えられる。

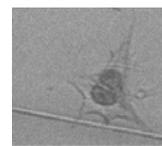
WTAPのN端とC端を認識する抗体を作製し、磁気ビーズによるプロテオミクスによりタンパク質複合体を調べ、複合体として機能している主要なタンパク質群（VIRILIZER, CBLL1, KIAA0853, RBM15, BCLAF1, THRAP3）を同定した（図）。

これらの複合体タンパク質のうち、siRNAによりスペックル構造への局在に関与するタンパク質（BCLAF1/THRAP3）およびnon-coding RNAのMALAT1を同定した（図）。

また、相互作用するRNAを網羅的に調べる手法を開発し、ヒストン修飾酵素がオルタナティブスプライシングの調節をする候補RNAとして同定した。オルタナティブスプライシングにより酵素活性を調節し、細胞周期の調節を行っている可能性が示唆された。WTAPの複合体を構成するVIRILIZER, CBLL1, KIAA0853, RBM15は複合体としてRNAプロセッシングや細胞周期調節に関与していると考えられた。これらは、今後細胞増殖を制御する治療薬の開発に重要な知見であると考えられる。

さらに詳細な局在を調べる方法として、軟X線顕微鏡による観察法を開発を行った。軽元素で構成された細胞の内部構造を十分なコントラストで得られるような低エネルギー

軟X線の発生に最適化した軟X線管を開発した。核膜タンパク質emerinの抗体を作製し、金ナノコロイドを用いて哺乳類細胞の撮像に成功した（図）。本成果を基に、さらに水の窓領域の軟X線顕微鏡の産学連携による開発を開始した。

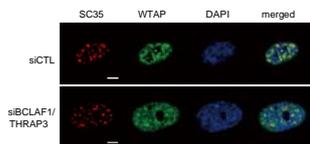
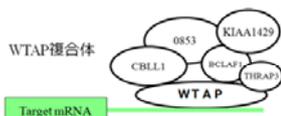


29μm

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 48 件)

- (1) Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps. Daigo K, Hamakubo T. *Front Immunol.* 2012;3:378. doi: 10.3389/fimmu.2012.00378. 査読有
- (2) G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. Hino T, Arakawa T, Iwanari H, Yurugi-Kobayashi T, Ikeda-Suno C, Nakada-Nakura Y, Kusano-Arai O, Weyand S, Shimamura T, Nomura N, Cameron AD, Kobayashi T, Hamakubo T, Iwata S, Murata T. *Nature.* 2012 Jan 29;482(7384): 237-240. doi: 10.1038/nature10750. p237-240 査読有
- (3) The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Jun;11(6): M111.015073. doi: 10.1074/mcp.M111.015073. 査読有
- (4) 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, doi:10.3390/ph4030524. 査読有
- (5) 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, Minami T. *EMBO J*. 2011 Jun 10;30(13):2582-2595. doi: 10.1038/emboj.2011.173. 査読有
- (6) Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) 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):674-686. doi: 10.1074/jbc.M110.154732. 査読有
- (7) 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, Matakai C, Hamakubo T, Shirahige K, Aburatani H, Kimura H, Kodama T, Cook PR, Ihara S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 27;106(43):18357-18361. doi: 10.1073/pnas.0902573106. 査読有
- (8) The Down syndrome critical region gene 1 short variant promoters direct vascular bed-specific gene expression during inflammation in mice. Minami T, Yano K, Miura M, Kobayashi M, Suehiro J, Reid PC, Hamakubo T, Ryeom S, Aird WC, Kodama T. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(8):2257-2270. doi: 10.1172/JCI35738. 査読有
- (9) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. *Mol Cell Biol*. 2009 Jul;29(13):3544-3555. doi: 10.1128/MCB.01856-08. 査読有
- (10) Development of the compact low-energy soft x-ray CT instrument for the soft material structural analysis M. Miyoshi, T. Hamakubo, T. Kodama, A. Koi shikawa, M. Tsuchiya, N. Aoki. *J. Vac. Sci. Technol. B* Nov/Dec Vol. 26, No. 6, 2008, 2356-2361. <http://dx.doi.org/10.1116/1.2978397>. 査読有
- [学会発表] (計 74 件)
- (1) The WTAP complex is a novel RNA processing factor required for cell cycle progression Keiko Horiuchi, Gordon conference, The biology of post-transcriptional gene regulation 2012/7/17/ アメリカ
- (2) Proteomic analysis of circulating pentraxin3 (PTX3) complexes in sepsis revealed the PTX3-NETs complex formation: Implication of new protective roles against sepsis Kenji Daigo, Naotaka Yamaguchi, Takeshi Kawamura, Koichi Matsubara, Shuying Jiang, Riuko Ohashi, Yukio Sudou, Makoto Naito, Kenji Inoue, and Takao Hamakubo 9th International Conference on Innate Immunity 2012/6/23 ギリシャ
- (3) Proteomic analysis of pentraxin3 (PTX3) complexes in serum and plasma from septic patients reveals that the neutrophil extracellular traps components are the new PTX3 ligands. Kenji Daigo, N. Yamaguchi, T. Kawamura, Y. Sudou, K. Inoue, T. Hamakubo Eleventh International Symposium on Mass Spectrometry in the Health & Life Sciences: Molecular & Cellular Proteomics 2011/8/23 アメリカ
- (4) 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 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010/12/9/神戸
- (5) 核内因子 WTAP は cyclin A2 mRNA を安定化し G2/M 期移行を制御する 堀内 恵子 第 21 回高遠シンポジウム 2009/8/27 長野
- (6) バキュロウイルス gp64 ディスプレキシシステムを用いた転写共役因子に対するモノクローナル抗体の作製 秋山 恵麻、橋 敬祐、谷本 恵一、山崎 大典、石本 憲司、岩成 宏子、田中十志也、望月 康弘

、酒井 寿郎、浜窪 隆雄、児玉 龍彦、土井 健史 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 2008/12/9～12 神戸

- (7) 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 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 2008/12/9 神戸
- (8) 核内受容体の組織内、細胞内局在の検討 内藤 眞 日本レチノイド研究会 2008/11/22 東京
- (9) 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, アメリカ

〔図書〕(計5件)

- (1) 新機能抗体開発ハンドブック 浜窪 隆雄(監修), 津本 浩平, 巖倉 正寛, 岡部 尚文, 柘植 郁哉, 野村 文夫 エヌ・ティール・エス 2012 年 ISBN:9784864690041 総 603 ページ
- (2) タンパク質の事典 猪飼篤, 伏見譲, 卜部格, 上野川修一, 中村春木, 浜窪隆雄 朝倉書店 2008 年 ISBN:4254171285 総 864 ページ

〔産業財産権名称〕(計1件)

- (1) 発明者：浜窪 隆雄、津本 浩平、太期 健二、井上 健二、山口 尚敬、水内 素晶 権利者：左同
種類：全身性炎症反応症候群の治療又は予防剤
番号：特願 2012-141380
出願年月日：2012/06/22
国内外の別：国内

〔その他〕

- (1) Web 研究室紹介
<http://www.qbm.rcast.u-tokyo.ac.jp/>
バイオマーカートピックス
<http://www.sciric.com/bio-marker/30a430aa30de30fc30ab30fc30fb30c830c33>

0af30b9-16

ターゲットドプロテオミクスー高親和性抗体を用いたタンパク質複合体解析法

- (2) 新聞発表 日刊工業新聞「軟 X 線顕微鏡開発」2009 年 2 月 18 日
- (3) アウトリーチ活動情報
① 第 11 回プロテイン・モール関西情報交流セミナー「機能性抗体と医薬への応用」浜窪 隆雄 2012/7/31 大阪
- ② 高校生見学、講演「コンピュータでがんの薬を作るー抗体医薬の話」浜窪 隆雄 群馬県立高崎高校 61 名、2012/9/5、東京大学先端科学技術研究センター
- ③ 田中プロジェクト日米がん研究公開セミナー「がんや難治性疾患の治療と診断に向けた抗体作製」浜窪 隆雄 2011/12/12 京都
- ④ 第 7 回ナノバイオ国際シンポジウム「次世代バイオマーカー医薬を目指した抗体作製について」浜窪 隆雄 2011/2/16 東京
- ⑤ 高校生見学、講演 浜窪 隆雄 徳島市立高校数理科 1 年生 2010/8/4 東京大学
- ⑥ 第 115 回日本解剖学会シンポジウム「核内受容体の組織発言と細胞内局在」内藤 眞 2010/3/28 盛岡

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

内藤 眞 (Naito Makoto) 新潟大学医歯学系・教授
研究者番号：30045786

三好 元介 (Miyoshi Motosuke) 東京大学先端科学技術研究センター・特任教授
研究者番号：40345137

井原 茂男 (Ihara Shigeo) 東京大学先端科学技術研究センター・特任教授
研究者番号：30345136

望月 康弘 (Mochizuki Yasuhiro) 東京大学先端科学技術研究センター・特任准教授
研究者番号：80282523

岩成 宏子 (Iwanari Hiroko) 東京大学先端
科学技術研究センター・特任助教
研究者番号：20176556

川村 猛 (Kawamura Takeshi) 東京大学先端
科学技術研究センター・特任助教
研究者番号：70306835

(3)連携研究者

先浜 俊子 (Sakihama Toshiko) 東京大学先
端科学技術研究センター・特任准教授
研究者番号：70187061

太期 健二 (Daigo Kenji) 東京大学先端科
学技術研究センター・特任助教
研究者番号：20466866

堀内 恵子 (Horiuchi Keiko) 東京大学先端
科学技術研究センター・特任助教
研究者番号：00456203

大田 佳宏 (Ohta Yoshihiro) 東京大学先端
科学技術研究センター・特任助教
研究者番号：80436592

大橋 瑠子 (Ohashi Riuko) 新潟大学医歯
学系・助教
研究者番号：20447600