

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度

課題番号：21770134

研究課題名（和文）

脂溶性生理活性物質による翻訳後修飾の制御機構の解明

研究課題名（英文）

Regulation of post-translational modifications through fat-soluble ligands

研究代表者

大竹 史明 (OHTAKE FUMIAKI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：60447373

研究成果の概要（和文）：ダイオキシン受容体（AhR）のユビキチン化修飾による蛋白分解が、ヒストンアセチル化酵素 CBP によって調節されていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The data shows that ubiquitination and degradation of the dioxin receptor (AhR) are regulated by the histone acetyltransferase CBP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能制御科学

キーワード：ユビキチン、転写制御、環境

## 1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモンや脂質、環境化学物質などを含む脂溶性低分子生理活性物質の作用は、主に膜受容体を介するシグナル伝達や、リガンド依存性転写因子を介する標的遺伝子発現制御によって発揮されることが知られている。しかしながら、脂溶性生理活性物質のシグナル伝達を担う細胞内システムの全貌については十分に解明されていない。リガンド依存性転写因子と呼ばれる一群の転写因子は、その活性が脂溶性低分子リガンドの結合によって制御されることが知られている。しかし、ユビキチン・プロテアソーム系におけるユビキチンリガーゼ (E3) に関しては、脂溶性低分子リガンドによる直接制御の報告はこれまでほとんどなされていない。一方、脂溶性低分子リガンド群に対するシグナル応答機構として、核内受容体などのリガンド依存性転写因子群を介した標的遺伝子

群の発現制御が研究されてきた。しかしこれらの研究から、転写制御系では説明のつかない、未知の脂溶性リガンド作用経路の存在も示唆されている。

## 2. 研究の目的

これまでに、リガンド依存性転写因子として知られているダイオキシン受容体 (AhR) の機能解析する過程 (Ohtake F et al, Nature, 2003)、AhR が複合体を形成してリガンド依存性ユビキチンリガーゼ (E3) として機能することを見出した (Ohtake F et al., Nature, 2007)。従って、AhR は転写因子でありながら、「翻訳後ユビキチン化修飾」酵素活性を併せ持つ、新たなタイプの脂溶性リガンド受容体であると考えられた。そこで本研究は、転写因子が形成する脂溶性リガンド依存性ユビキチンリガーゼの酵素活性制御機構の

解明を目的として研究を行った。

AhR の転写因子としての機能と翻訳後ユビキチン化修飾機能とが選択制御される活性調節機構の解析、および AhR によってユビキチン化される基質同定による生理的意義の解析を、以下の通り行うことを目的とした。

(1) 脂溶性リガンド依存的なユビキチンリガーゼ AhR の活性調節機構、特に転写因子機能とユビキチン化修飾酵素機能との使い分けの機構は不明である。そこで、ダイオキシン受容体 (AhR) が基質 ER をユビキチン化して蛋白質分解に導く機能と転写制御機能について、その分子機構解明を行った。

(2) また、AhR によってユビキチン化制御を受ける標的蛋白およびそれを介した生理的役割には不明な点が多い。そこで、AhR をモデルとして、転写因子が脂溶性リガンド依存的にユビキチンリガーゼとして機能する活性制御機構を解明し、脂溶性リガンド作用機序と生物学的意義の一端を明確化することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 蛋白質精製系を用いて、ユビキチン化基質の精製同定を行った。具体的には、E3 活性責任領域を欠失した AhR をベイトとすることで本来ユビキチン化を受け解離する基質が安定に結合すると考えられるため、リガンドの添加・非添加条件を比較し、結合因子の精製同定を行う。

(2) 同定因子の解析により、AhR のユビキチンリガーゼ活性の細胞内役割を明確化する。また、抗ユビキチン抗体アフィニティークラムを用いた AhR リガンド依存的なユビキチン化タンパク同定手法も確立している。同定された AhR のユビキチン化基質蛋白質に関しては、AhR による認識機構、蛋白質分解促進の有無や、機能抑制による細胞内機能変化の解析を進めた。

(3) AhR の転写活性とユビキチン化活性が使い分けられるシグナル伝達を解明する。典型的リガンド 3MC は両者活性を活性化するが、リガンド種類によって、AhR のユビキチン化修飾酵素活性のみを選択的に活性化する可能性を検討した。AhR の相互作用因子を LC-MS/MS で同定し、ユビキチン化酵素活性への関与を明確化する。部位変異体が AhR のユビキチン化修飾酵素複体の会合、基質認識、および酵素活性化に及ぼす影響を明確化する。

(4) AhR は細胞の分化増殖への関与が報告されている。そこで、AhR の活性には細胞周期による調節の可能性が考えられた。薬剤による同調法を用いて、細胞周期を同調する。転写活性は標的遺伝子およびエストロゲン標的遺伝子の発現解析によって検討する。ユビキチンリガーゼ活性は細胞および *in vitro* 系によって評価を行う。これによって、両者活性の変動とその機構を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) AhR のユビキチン化制御因子の同定

AhR に相互作用する翻訳後修飾因子として、CBP/p300 をこれまでに同定している。また、CUL4B は AhR に相互作用してユビキチン化翻訳後修飾を行う。AhR がリガンドによって活性化された際、蛋白質分解に関与する K48-link ユビキチン化を促進することが明らかとなった。一方、転写を活性化しないアンタゴニストにおいても、AhR の K48-link ユビキチン化を促進するものと、抑制するものが存在することが明らかとなった。その分子機構として、K48-link ユビキチン化および蛋白質分解と、CBP のリクルートメントが関連することを見出した。すなわち、CBP は異なるリガンドによって AhR へのリクルートが促進あるいは抑制される。すなわち、アセチル化とユビキチン化という異なる翻訳後修飾が AhR 上でクロストークすることが明らかとなった。

#### (2) AhR のユビキチン化を制御する低分子リガンドの解析

AhR において様々な種類のリガンドが知られている。CBP をリクルートしないリガンド (部分アンタゴニスト) の一つである RSV は、AhR の K48-link ユビキチン化を抑制し、逆に K63-link ユビキチン化を促進した。以上より、転写因子 AhR が異なる翻訳後修飾によって機能制御を受ける分子機構の一端を明らかにした。

さらに、転写アンタゴニストとして知られている DIM は、AhR のユビキチン化においてはアゴニストとして機能することを見出した。したがって、転写活性と分解活性は、リガンド種によって分離可能であることが明らかとなった。

#### (3) 細胞周期依存的な AhR のユビキチンリガーゼ活性の調節

細胞周期依存的な AhR のユビキチンリガー

ゼ活性を検討した。その結果、AhR による ER の分解促進活性は、S 期において増強し、逆に M 期において減弱することが明らかとなった。そこで細胞内のユビキチン化を検討したところ、AhR リガンド依存的な ER のユビキチン化は S 期において増強することを見出した。さらに ER の転写活性に対する AhR 依存的な抑制効果について検討したところ、この抑制効果は S 期において増強することを見出した。以上の結果から、AhR のリガンド依存性ユビキチンリガーゼ活性は細胞周期依存的に調節されていることを見出した。

#### 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 6 件)

①PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S.

**Nat Cell Biol.** 2011 (published on line)  
査読有り

② Cross-talk of dioxin and estrogen receptor signals through the ubiquitin system.

Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K, Kato S.

**J Steroid Biochem Mol Biol.** 2011 (published on line)  
査読有り

③Hormonal gene regulation through DNA methylation and demethylation

Kouzmenko, A; Ohtake, F; Fujiki, R, Kato S

**EPIGENOMICS** 2010, 2(6):765-774  
査読有り

④DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression.

Kim MS, Kondo T, Takada I, Youn MY, Yamamoto Y, Takahashi S, Matsumoto T, Fujiyama S, Shirode Y, Yamaoka I, Kitagawa H, Takeyama K, Shibuya H, Ohtake F, Kato S.

**Nature.** 2009 Oct 15;461(7266):1007-12.  
査読有り

⑤Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice

with natural ligands.

Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtake F, Ikuta T, Matsushima Y, Mimura J, Pettersson S, Pollenz RS, Sakaki T, Hirokawa T, Akiyama T, Kurosumi M, Poellinger L, Kato S, Fujii-Kuriyama Y.

**Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009 Aug 11;106(32):13481-6.

査読有り

⑥AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions.

Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kato S.

**Biochem Pharmacol.** 2009 Feb 15;77(4):474-84

査読有り

[学会発表] (計 7 件)

①日本分子生物学会 (2010 年 12 月、神戸)  
大竹史明、加藤茂明

Ligand-selective poly-ubiquitylation of AhR involves a transcriptional co-regulator CBP

②第 69 回日本癌学会学術総会 (2010 年 9 月、大阪) シンポジウム

Fumiaki Ohtake, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, and Shigeaki Kato

Ligand-selective poly-ubiquitin chain formation of AhR, a component of E3 complex

③Korea-Japan chromatin meeting (2010 年 1 月、韓国) 国際シンポジウム

Fumiaki Ohtake, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Shigeaki Kato

A transcription factor, AhR, acts as a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase

④日本分子生物学会 (2009 年 12 月、横浜) シンポジウム

大竹史明、藤井義明、加藤茂明

PHF2/ARID5B is a signal-dependent histone demethylase

⑤堀場・CDBI シンポジウム (2009 年、10 月、東京) 国際シンポジウム

Ah receptor acts as a ligand-dependent ubiquitin ligase

Fumiaki Ohtake, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Shigeaki Kato

⑥日本生化学会 (2009 年 10 月、大阪) シンポジウム

大竹史明、藤井義明、加藤茂明

AhR acts as a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase

⑦日本環境ホルモン学会（2009年6月、東京）

**大竹史明**、藤井義明、加藤茂明

Association of AhR with ER exerts adverse estrogen-related effects

〔図書〕（計2件）

①現代栄養学を理解するための分子生物学入門 加藤茂明・編（光生館、2010年）

5章 シグナル伝達 大竹史明

②転写制御とエピジェネティクス 加藤茂明・編（南山堂、2008年）

第15章 核内受容体によるクロマチン転写の分子機構

加藤茂明、藤木亮次、大竹史明

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/bnsikato/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大竹 史明 (OHTAKE FUMIAKI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：60447373

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：