

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 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22780086

研究課題名（和文） 核内脂質付加修飾による遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of nuclear lipidation in gene regulation

研究代表者

横山 敦（Atsushi Yokoyama）

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助教

研究者番号：20572332

研究成果の概要（和文）：本年度は、前年度に確立した内在性のHNF4の精製・同定系を用いて細胞内のHNF4が実際脂質付加修飾を受けていることを検証・確認することを目的として研究を行った。

まず内在性のHNF4タンパク質を抗体精製により精製・濃縮し、LC-MS/MSにて測定を行い、得られたスペクトルをコンピューター解析にかけ翻訳後修飾を検討したところ、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化を含む14か所の翻訳後修飾サイトの同定に成功した。この結果は、今年度に原著論文として発表を行った。（Yokoyama et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(4):749-5）しかしながら、この中に脂質修飾は含まれていなかった。この原因として、内在性HNF4のうち脂質付加修飾を受けているものの割合が検出限界以下である可能性も挙げられる。そこで、現在はより感度の高いRI化合物によるラベルによる検出を試みている。

また、内在性 HNF4 の脂質付加修飾をさらに検討するために、脂質付加修飾を受けたタンパク質を click-it 反応を用いた新たな手法により標識する方法を採用した。標識されたタンパク質をアビジンビーズにより濃縮し、LC-MS/MS を用いたプロテオミクにより網羅的に同定する手法を用いて検討を行った。その結果、核抽出液画分より HNF4 をはじめ、ヒストンタンパク質といった興味深い因子群が脂質付加タンパク質として同定された。この結果は、本研究課題の当初の想定よりも核内脂質付加修飾がグローバルな修飾であることを示唆している可能性があり、現在これらの結果を発表すべく準備を行っている。

研究成果の概要（英文）：This year we performed proteomic analysis of purified endogenous HNF4 protein using the scheme established last year.

First of all, we purified endogenous HNF4 protein by affinity purification, then samples were subjected to LC-MS/MS analysis. From this experiment, we identified 14 PTM sites in HNF4 protein such as phosphorylation, acetylation, methylation and ubiquitination. This result was reported to the scientific journal as an original paper (Yokoyama et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(4):749-5). However, we could not identify the lipidation of HNF4 in this experiment.

Furthermore, we adopted the novel method “click-it reaction” for the proteomic analysis of nuclear lipidation. In this method, labeled proteins were purified by avidin beads, and then subjected to the LC-MS/MS analysis. As a result, we identified various proteins including HNF4 and histone protein. We think this result implies that nuclear lipidation has more global role than we expected before, and now we are preparing the manuscript for the paper concerning this results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：遺伝子発現、翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾等の DNA の塩基配列変化を伴わないゲノムの変化であるエピゲノムは、真核生物の遺伝子発現制御を理解する鍵として注目されている。近年、エピゲノムはエネルギー代謝産物や増殖因子等の細胞内外の刺激に対して動的に応答することが明らかになりつつある。また、このメカニズムの破綻は、一般的な病気の発症や病態に関わることが示唆されている。

これら遺伝子発現制御において、脂質の転写制御因子への直接付加修飾反応による転写制御の例は全く知られていない。申請者は、核内において転写制御を行う HNF4 タンパクが、脂質付加修飾を受けることを既に見出しており (Yokoyama et al., in preparation)、この脂質修飾と転写制御との関連を分子生物学的に解析することにより、エネルギー代謝における遺伝子発現制御の新たな分子メカニズムが明らかになると考えた。

2. 研究の目的

転写制御において、ヒストンの翻訳後修飾とその転写制御での役割についての解析は広く進展してきた一方、転写制御因子をはじめとする非ヒストンタンパク質の翻訳後修飾とその役割に関しては不明な点が多い。本研究では、エネルギー代謝における転写制御系をモデル系とし、転写制御因子の機能制御に関わる新規翻訳後修飾の同定と作用点の解明により、翻訳後修飾を介した新しい転写制御機構の分子基盤を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. HNF4 の脂質付加修飾の検討

実際に HNF4 がミリスチル化されることを *in vitro* 実験で確認する。

2. 核内脂質付加修飾による HNF4 の新規転写制御メカニズムの解析

被修飾因子の点変異体を用い転写活性について評価することで、脂質付加修飾のエピゲノム変化を介した転写制御への関与を解析する。また、同時に細胞内局在や、転写共役因子との物理的相互作用への影響についても評価を行う。

3. プロテオミクス的手法を用いた核内因子の新規翻訳後修飾の同定

今回着目した核内受容体 HNF4、LXR、FXR について、生化学的手法とプロテオミクスの手法を組み合わせ、さらなる核内脂質付加修飾を探索・同定する。

4. 研究成果

本研究課題により得られた結果により、計 5 回の学会発表 (うち海外学会 2 回)、原著論文 1 報を発表することができた。また、本研究課題の結果により、細胞核内において、一般的に考えられている以上に未知の翻訳後修飾が存在し、転写制御などの生命現象において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。そこで、今後の推進方針としては、脂質付加修飾以外の新規修飾を多く同定し、核内の翻訳後修飾による転写制御メカニズムの解明を目指したいと考えている。

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 4 件) ① JMJD5, a MjC-domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis through facilitating NFATc1 protein degradation

Youn MY, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Ohtake F, Minehata KI, Yasuda H, Suzuki T, Kato S, Imai Y.

J Biol Chem, (査読有), *in press*

② *O*-GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, **Yokoyama A**, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Ohtake F, Kitagawa H, Kim J, Roeder RG, He HH, Brown M and Kato S. *Nature*, (査読有), vol.480, No.7378, 557-560, (2011)

③ Regulated histone methyltransferase and demethylase complexes in gene regulation by nuclear receptor

Yokoyama A, Fujiki R, Ohtake F and Kato S *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, (査読無) vol.76, (2011)

④ Multiple post-translational modifications in Hepatocyte nuclear factor 4 α

Yokoyama A, Katsura S, Ito R, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R and Kato S *Biochem Biophys Res Commun*, (査読有) vol.410, No.4, 749-753, (2011)

[学会発表] (計 5 件)

① **横山敦**、橋場和華、関根弘樹、藤木亮次、加藤茂明 オープン核内受容体 HNF4 の翻訳後修飾の網羅的解析
第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会
2011 年 5 月 20 日 KKR ホテル熊本

② **Yokoyama A**, Katsura S, Ito R, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R and Kato S Comprehensive analysis of post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4 alpha

Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 2011 年 6 月 5 日
コールドスプリングハーバー研究所、米国

③ **Yokoyama A**, Katsura S, Ito R, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R and Kato S Multiple post-translational modifications in Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
EMBO conference nuclear receptors From molecular mechanism to health & disease 2011 年 9 月 19 日 シッチェス、バルセロナ、スペイン

④ **Yokoyama A**, Katsura S, Ito R, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R and Kato S Multiple post-translational modifications in Hepatocyte nuclear factor 4 alpha

第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 パシフィコ横浜

⑤ **横山敦**、桂彰吾、伊藤亮、橋場和華、関根弘樹、藤木亮次、加藤茂明 核内受容体 HNF4 α の翻訳後修飾の網羅的同定
日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 24 日 京都女子大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
横山敦 (Atsushi Yokoyama)
東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助教
研究者番号：20572332

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：