

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770163

研究課題名(和文) エピジェネティクスを用いた脳特異的O-マンノース糖鎖の発現機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of brain-specific O-mannose glycans

研究代表者

木塚 康彦 (Kizuka, Yasuhiko)

独立行政法人理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：20564743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経系に特異的に発現する分岐型O-マンノース糖鎖に着目し、組織特異的な糖鎖発現メカニズムの解明を目的とした。新たなアプローチとして、近年急速に発展しているエピジェネティクスの概念と手法を導入した。その結果、神経特異的なO-マンノース糖鎖の合成に必須な遺伝子であるGnT-IXが、遺伝子周辺のヒストンの翻訳後修飾によってエピジェネティックに制御されていることが分かった。さらに、GnT-IX遺伝子のヒストンを特異的に修飾する因子として、HDAC11とOGT-TET3複合体という2つの因子を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to unveil how glycans are expressed in tissue-specific manner. In detail, we focused on a brain-specific glycan, branched O-mannose glycan. As a novel approach, concept and technique of epigenetics were adopted. As a result, expression of GnT-IX that is essential for biosynthesis of O-brain-specific mannose glycans, is epigenetically regulated by post translational modifications of histone.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学 糖転移酵素 エピジェネティクス GnT-IX

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、哺乳動物における糖鎖の発現メカニズムに焦点を当てたものである。糖鎖付加は最も主要な翻訳後修飾であり、タンパク質の機能調節に重要である。糖鎖は様々な構造を有しているが、個々の糖鎖が固有の機能を持っており、その欠損や発現異常は様々な疾患の発症原因となる。糖鎖の発現機構を理解し、それを制御することによって、基礎科学の発展に加えてそれらの疾患治療に向けた有用な知見が得られると考えられる。

糖鎖発現の大きな特徴として、組織特異性がよく知られている。各組織には固有の糖鎖が発現し、組織特有の機能発揮に大きく寄与している。しかし、糖鎖の組織特異的な発現メカニズムはほとんど分かっていなかった。申請者は以前より、神経系における糖鎖発現に着目した研究を続けており、本研究では、神経系に特異的に発現する分岐型 O-マンノース糖鎖に着目した研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、組織特異的な糖鎖の発現メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。研究対象とする糖鎖は、ほぼ脳にしか発現しない分岐 O-マンノース型糖鎖に絞り、本糖鎖がなぜ脳にのみ発現するのか、その機構解明に取り組んだ。

これまでとは異なる新しいアプローチとして、近年進展の著しいエピジェネティクスの概念を導入した。エピジェネティクスは、DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾など、DNA 配列に依存しない遺伝子制御メカニズムであるが、これまで糖鎖関連遺伝子のエピジェネティックな制御に関する研究例はほとんど無く、研究が遅れていた。そこで本研究ではエピジェネティクスの手法を用い、糖鎖の組織特異性をもたらす新たなメカニズムの解明を目指した。

### 3. 研究の方法

分岐型 O-マンノース糖鎖は、GnT-IX と呼ばれる糖転移酵素により生合成される。この糖鎖が脳にしか発現していないのは、GnT-IX 遺伝子が脳にのみ発現することに起因する。そこで本研究では GnT-IX 遺伝子に着目し、その転写制御機構を探った。

GnT-IX 遺伝子を内在的に発現する神経由来の細胞やマウスの脳と、この遺伝子を発現しない線維芽細胞や肝・腎などとを比較し、GnT-IX 遺伝子周辺のエピジェネティックなクロマチン修飾のレベルを ChIP(クロマチン免疫沈降)法などによって解析した。

また、レポーターアッセイやゲルシフト法などによって、GnT-IX 遺伝子プロモーターの制御に必須な転写制御因子の同定を試みた。

さらに、GnT-IX 遺伝子のエピジェネティックな制御に関わるタンパク質因子を同定するため、ヒストンの翻訳後修飾に関わる因子群に着目し、これらをノックダウンすること

によって GnT-IX 遺伝子の制御に関わる分子の同定を試みた。

### 4. 研究成果

(1)GnT-IX 遺伝子はヒストンの修飾によるクロマチンの活性化により制御される(後述の雑誌論文)

GnT-IX 遺伝子を発現する細胞と発現しない細胞で、この遺伝子周辺のクロマチンを調べたところ、DNA のメチル化には差異が無かったが、アセチル化などのヒストンの修飾状態に大きな違いがあることが分かった。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤の添加によってヒストンのアセチル化を促進すると、GnT-IX 遺伝子の発現が大きく上昇したことから、このヒストンのアセチル化によるクロマチンの活性化が、GnT-IX 遺伝子の発現に必須であることが分かった。

一方、GnT-IX 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、レポーターアッセイを行うことによって、転写活性に必要な DNA 領域(エンハンサー)を特定した。データベース検索とゲルシフト法により、この領域に特異的に結合する2つの転写因子、CTCF と NeuroD1 を同定した。これらの転写因子のノックダウンによって GnT-IX 遺伝子の発現が40%程度に低下したことから、これらの転写因子が GnT-IX 遺伝子の転写に重要であることがわかった。

また、薬剤の添加によってヒストンのアセチル化を促進すると、これら転写因子の GnT-IX プロモーターへの結合が強くなることがわかった。これらの結果から、ヒストンのアセチル化を介したクロマチンの活性化が転写因子の結合を促し、GnT-IX の転写が活性化されると考えられた。

(2)GnT-IX 遺伝子クロマチンの調節因子の同定(後述の雑誌論文)

次に、クロマチンの活性化による遺伝子制御が、GnT-IX に特異的なものかを調べた。薬剤添加によってヒストンのアセチル化を促進したところ、GnT-IX 遺伝子の発現は上昇したが、類似する他の糖転移酵素遺伝子の発現レベルはほとんど変化が無かった。このことから、エピジェネティックな制御は糖鎖遺伝子一般ではなく、GnT-IX 遺伝子に特異的な現象であることが分かった。

次に、GnT-IX 遺伝子のクロマチンの活性化を制御する因子を探索するため、ヒストンの翻訳後修飾に関わる酵素群のノックダウンを行った。その結果、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)11 が、GnT-IX 遺伝子の発現を特異的に抑制することが分かった。また、OGT-TET3 と呼ばれる分子複合体が、GnT-IX 遺伝子の活性化に関わることが分かった。OGT-TET3 はヒストンや周辺分子に O-GlcNAc と呼ばれる翻訳後修飾をもたらす酵素である。この OGT-TET3 によって GnT-IX 遺伝子周

辺の O-GlcNAc 化が促進されると、転写因子 NeuroD1 のプロモーターへの結合が強くなることがわかった。このことから、HDAC11 は GnT-IX 遺伝子のクロマチンを負に、OGT-TET3 複合体は正に調節するエピジェネティックな因子であることが分かった。

(3)これらの結果から、GnT-IX 遺伝子の脳特異的な発現には階層的な制御があり、エピジェネティックなクロマチンの活性化が上流に位置していることが分かった。このクロマチンの活性化は OGT-TET3 複合体によって制御されている。しかし OGT や TET3 は脳だけでなくどの組織にも発現することから、このクロマチンの活性化がなぜ脳特異的に起こるのかはいまだに不明である。また本研究で明らかにしたメカニズムは GnT-IX 遺伝子に特異的で、他の関連する糖転移酵素遺伝子は異なる制御を受けていることも分かった。今後は本研究で得られた知見を応用し、どの糖鎖遺伝子がエピジェネティックに制御されているのか、またそうでないならばどのようなメカニズムで制御されているのか、それらの点を明らかにすることが重要であると考えられる。

#### 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 2 件)

Yasuhiko Kizuka, et al., Epigenetic regulation of a brain-specific glycosyltransferase N-acetylglucosaminyltransferase-IX (GnT-IX) by specific chromatin modifiers. The Journal of Biological Chemistry. 査読有, 2014, 11253-61, 10.1074/jbc.M114.554311

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Minoru Yoshida, Naoyuki Taniguchi. Brain-specific expression of N-acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX) is regulated by epigenetic histone modifications. The Journal of Biological Chemistry. 査読有, 2011, 31875-84, 0.1074/jbc.M111.251173.

主要なもの以外の件数を含めた総件数 : 4

[学会発表](計 13 件)

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Naoyuki Taniguchi. New epigenetic factors for brain-specific glycosyltransferase gene expression. 2013 Society for Glycobiology Annual Meeting. 2013年11月18日. Tampa(USA).

木塚康彦, 北爪しのぶ, 谷口直之. 新規エピゲノム因子による脳特異的糖転移酵素 GnT-IX の遺伝子発現制御. GlycoTOKYO2013

シンポジウム. 2013年10月19日. 成蹊大学(東京)

木塚康彦, 北爪しのぶ, 谷口直之. 脳特異的糖転移酵素 GnT-IX の遺伝子発現を制御する新規エピゲノム因子の探索. 第 32 回日本糖質学会年会. 2013年8月7日. 大阪.

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Naoyuki Taniguchi. New epigenetic factors for brain-specific glycosyltransferase gene expression. The 3<sup>rd</sup> Austria/Japan Seminar on Comparative and Developmental Glycobiology. 2013年7月2日. 理化学研究所(和光).

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Naoyuki Taniguchi. Epigenetic regulation of glycosyltransferase gene expression. XXII International Symposium on Glycobiology. 2013年6月24日. Dalian (China).

木塚康彦, 北爪しのぶ, 谷口直之. Gene expression of glycosyltransferase is regulated by selective epigenetic factors. RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, The second symposium. 2013年4月17日. 理化学研究所(和光).

Yasuhiko Kizuka, Kyohei Okahara, Shinobu Kitazume, Naoyuki Taniguchi. Gene expression of brain specific glycosyltransferases and their epigenetic regulation. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and American Society for Matrix Biology. 2012年11月11日-11月14日. San Diego(USA)

木塚康彦, 岡原京平, 北爪しのぶ, 谷口直之. エピジェネティクスによる脳特異的な糖転移酵素の発現制御メカニズム. 第 31 回日本糖質学会年会. 2012年9月17日-9月20日. 鹿児島

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Minoru Yoshida, Naoyuki Taniguchi. Brain specific regulation of GnT-IX expression by epigenetic mechanism. 2<sup>nd</sup> RIKEN-SNU symposium. 2012年5月17日-5月18日. Nami island (Korea).

木塚康彦, 北爪しのぶ, 谷口直之. 脳特異的糖転移酵素 GnT-IX 遺伝子のエピジェネティックな発現制御. GlycoTOKYO 2011 シンポジウム. 2011年12月9日. 理化学研究所(和光).

木塚康彦, 北爪しのぶ, 吉田稔, 谷口直之. ヒストンコードにより制御される GnT-IX 遺伝子の脳特異的発現機構. 第 84 回日本生化学会大会. 2011年9月22日. 国立京都国際会館(京都)

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Minoru Yoshida, Naoyuki Taniguchi.

Regulation of brain-specific GnT-IX (Vb) expression by neural histone-code. 第31回内藤コンファレンス. 2011年9月14日. シヤトレゼ・ガトーキングダムサッポロ(札幌)

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Minoru Yoshida, Naoyuki Taniguchi. Histone-code regulates brain specific expression of N-acetylglucosaminyltransferase-IX (GnT-IX). Glyco21, 21st international symposium on glycoconjugates. 2011年8月24日. ウィーン大学(Austria)

〔その他〕

理化学研究所のプレスリリース：2件

<http://www.riken.jp/pr/press/2011/20110725/>

[http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140312\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140312_1/)

理化学研究所の Research Highlights：2件

<http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/6760/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木塚 康彦 (KIZUKA, Yasuhiko)

理化学研究所・疾患糖鎖研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：20564743