

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591357

研究課題名(和文) 栄養情報を反映した新規グルココルチコイド作用切り換えメカニズムの解明

研究課題名(英文) Glucose regulates the function of glucocorticoid receptor via O-GlcNAc modification.

研究代表者

沢津橋 俊 (SAWATSUBASHI, Shun)

徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・特任講師

研究者番号：70535103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：グルココルチコイドは抗炎症作用などの非常に有用な薬理作用をもたらすが、副作用の問題を克服する上で、本来のホルモン作用が発揮する組織特異的な作用メカニズムの理解が望まれる。本研究はグルココルチコイドレセプター(GR)の翻訳後修飾の生化学的解析に焦点を当て、新たにO-結合型N-アセチルグルコサミン修飾の存在と、そのグルコース応答性を明らかにした。この修飾は特に肝臓や大脳で多く認められ、グルココルチコイド作用の組織特異的な細胞内機能の切り換えメカニズムの一端を見出した。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids are widely used as anti-inflammatory drugs, the molecular mechanisms involved in this anti-inflammatory effect and associated with serious side effects remain unknown. In this study, we performed the proteomic analysis of post-translational modification on glucocorticoid receptor (GR) and identified a novel O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) modified sites. Moreover, this O-GlcNAcylation was regulated under conditions of glucose concentration in culture medium and detected in nucleus of mouse liver and cerebrum. Based on these results, we propose that this O-GlcNAcylation regulates the tissue-specific transcriptional activity of GR.

研究分野：分子生物学

キーワード：グルココルチコイド 翻訳後修飾 O-GlcNAc 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、エネルギー代謝と炎症の細胞内制御の共通点が明らかとなりつつあり、特に生活習慣病などの観点からも、この両者を相互に制御するメカニズムの解明が望まれています。本研究で主な研究対象のひとつであるグルコシルコリドレセプター(GR)は、高等動物において糖代謝恒常性と炎症をコントロールする核内受容体型転写因子として働くことが知られています。このリガンドであるグルコシルコリドは臨床において、炎症性疾患やリンパ系腫瘍の治療薬として長年用いられていますが、長期投薬などによる副作用の問題は未解決のままです。加えて、細胞内のエネルギー代謝状態が副作用を含めたグルコシルコリド作用に起用するかについては全く分かっていません。

そこで、本研究では細胞内の栄養情報がどのように GR 分子に伝えられ、その機能をコントロールしうるかを検討することとしました。これまでに GR は様々なストレス刺激によってリン酸化を受け、その転写機能が正負に調節されることが知られています。しかしながら、エネルギー代謝状態を反映する翻訳後修飾の存在は明らかにされていませんでした。

2. 研究の目的

グルコシルコリドの副作用の問題を克服する上で課題となる組織特異的な作用メカニズムにはいまだ不明な点が多く残されたままです。本研究は GR の翻訳後修飾の生化学的解析に焦点を当て、グルコシルコリド作用の切り換えメカニズムの理解を目的としています。

最初に、エネルギー代謝状態を反映して GR の転写機能を調節する翻訳後修飾の探索を試みることにしました。これまでに GR タンパク質に対する翻訳後修飾としては、いくつかのキナーゼによるリン酸化修飾が知られていましたが、いまだ報告されていない翻訳後修飾の存在を明らかにするため、新たに翻訳後修飾解析のための実験系として、i) リン酸化修飾検出のための Phos-tag 電気泳動法と ii) LC-MS/MS 解析法と分析ソフト Progenesis LC-MS を組み合わせた比較定量解析による O-GlcNAc 修飾の同定系の導入を試みました。さらに、新規に同定した翻訳後修飾の生物学的意義を解明することを目的としました。

3. 研究の方法

最初に GR タンパク質に対する翻訳後修飾を解析する実験系として、i) リン酸化修飾検出のための Phos-tag 電気泳動法と ii) LC-MS/MS 解析法と分析ソフト Progenesis LC-MS を組み合わせた比較定量解析による O-GlcNAc 修飾の同定系の確立を試みました。Phos-tag 電気泳動解析はリン酸化による電

荷の差を検出する解析方法であり、これまで既知のリン酸化修飾部位に変異を導入した GR においても、CDK5 によりリン酸化を受けることが示されました。加えて LC-MS/MS 解析とソフトウェアによる比較定量解析を組み合わせることで、異なる条件下で培養した細胞より GR を単離精製し、この質量分析の差異を検討しました。

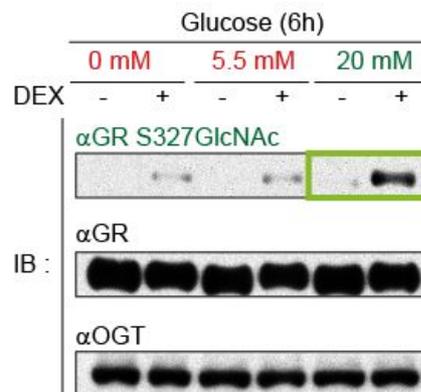
4. 研究成果

CDK5 による新規のリン酸化修飾について栄養状態に応じて変動する可能性を検討したところ、培養細胞においては明らかな変動を検出できませんでした。

一方で、LC-MS/MS 解析により、新たな修飾として O-結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 修飾の同定に成功しました。なかでも GR の O-GlcNAc 修飾の標的として複数のセリン/スレオニンのサイトを見出し、このうちの 1 つが細胞外のグルコース濃度に応答することを明らかにしました。

GR の新規 GlcNAc 修飾は 高グルコース条件下で増強する

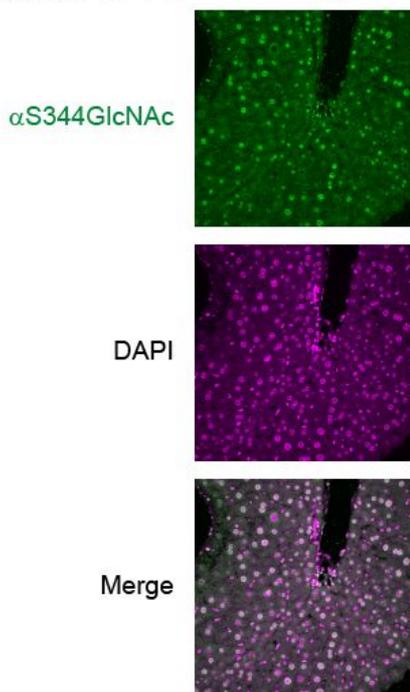
Western blot
(GR stable 293 cell)
Pulldown : Onestrep-GR



この O-GlcNAc 修飾サイトはいずれも組織特異的な転写機能を担うと考えられている Activation function 1 (AF-1) 領域内に存在し、グルコシルコリド作用の組織特異性に関与する可能性が予想されます。さらに興味深いことに、この O-GlcNAc 修飾の上流制御には修飾酵素 O-GlcNAc 転移酵素(OGT)に対するアセチル化修飾が必要であることを見出し、核内における O-GlcNAc 修飾に新たな経路の存在が示唆されました。その修飾サイトは進化的に非常に高く保存されたセリン残基であることが判明し、この修飾部位を特異的に認識する抗体を作成しました。この抗体を用い、マウスの 24 種類の組織切片に対して免疫蛍光染色を試みたところ、肝臓、膵臓、腎臓のほか大脳で非常に強いシグ

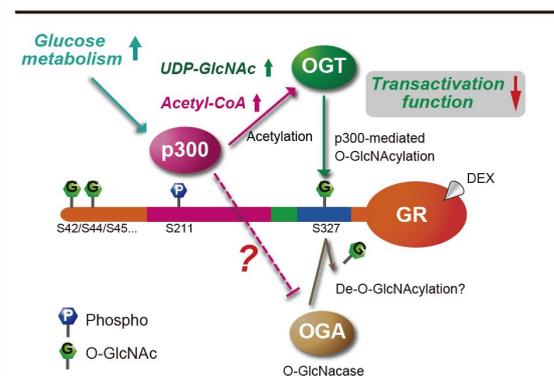
ナルが得られました。

肝臓組織における O-GlcNAc 修飾 GR の局在



また、この O-GlcNAc 修飾 GR はリガンド依存的に核に局在することが明らかとなり、転写機能に働くことが示唆されました。これらの結果はグルココルチコイド作用がホルモン濃度のみによらず、末梢組織の栄養状況に応じた GR 機能の増強・減弱が翻訳後修飾により規定される可能性を示しています。

グルコース代謝の亢進による GR の O-GlcNAc 修飾のメカニズム



さらに本研究で見出した GR の新規翻訳後修飾 O-GlcNAc サイトの変異体マウスを CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集技術により作出し、個体レベルでのより詳細な生物学的意義の探索へと進展しています。

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 1件)

Ito S., Fujiyama-Nakamura S., Kimura S., Lim J., Kamoshida Y., Shiozaki-Sato Y., Sawatsubashi S., Suzuki E., Tanabe M., Ueda T., Murata T., Kato H., Ohtake F., Fujiki R., Miki T., Kouzmenko A., Takeyama K., Kato S.

Epigenetic silencing of core histone genes by HERS in *Drosophila*. *Mol. Cell* 45, 494-504 (2012). 査読有

[学会発表](計 3件)

沢津橋俊、松本俊夫
O-GlcNAc 転移酵素(OGT)によるグルココルチコイドレセプター(GR)の転写制御機構の解析、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.15 - 18、国立京都国際会館(京都府京都市)

沢津橋俊、木下優美、齊田佳織、北川浩史

栄養情報が制御するグルココルチコイドレセプター機能切り換えの分子メカニズム解析、第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013.4.25 - 27、仙台国際センター(宮城県仙台市)

沢津橋俊

多系染色体から理解するクロマチン構造調節を介したゲノムデコード、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012.3.22 - 25、京都女子大学(京都府京都市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等
<http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/nuclearreceptor/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢津橋 俊 (SAWATSUBASHI, Shun)
徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・特任講師
研究者番号: 70535103

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

北川 浩史 (KITAGAWA, Hirochika)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：20345234

佐藤 隆史 (SATO, Takashi)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：70344934