

## 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 27日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570203

研究課題名（和文）新規核タンパク質修飾アルグピリミジン化による神経分化制御

研究課題名（英文）Regulation of the neural differentiation by the formation of argpyrimidine in the nucleus.

## 研究代表者

立花 太郎 (TACHIBANA TARO)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80311752

研究成果の概要（和文）：近年、翻訳後修飾がタンパク質の機能を調節していることが明らかとなり注目されている。解糖系の副産物メチルグリオキサールは、タンパク質のアルギニン残基に結合してアルグピリミジンを形成するが、その生理的役割については全くわかっていない。本研究では神経細胞においてクロマチンリモデリング複合体の構成タンパク質のひとつがアルグピリミジン化されること、またそのタンパク質が神経分化に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Methylglyoxal (MG) is an endogenous metabolite in glycolysis and forms stable adducts, argpyrimidine, primarily with arginine residues of intracellular proteins. The biological role of this modification in cell function is not known. In the present study, we found that a subunit of chromatin remodeling complex forms the argpyrimidine and revealed that the subunit has a critical role of neural differentiation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：アルグピリミジン、神経分化

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、マウス大脳皮質の形成過程で重要な役割を担う分子の探索ならびに機能解析を行ってきた。具体的には、まずマウス胎児大脳抽出液を抗原としてラットに免疫し、モノクローナル抗体を作製する。そしてそれら抗体を用い、発生段階の大脳皮質において、時期あるいは部位特異的に発現する分子を同定する。その過程で、GLO1という蛋白質が、神経幹細胞が豊富に存在する脳室帯で非常に強く発現していることを見出した。GLO1は、解糖系の副産物メチルグ

リオキサールの代謝酵素のひとつである。GLO1はGLO2と協調してメチルグリオキサールを乳酸に変換する。メチルグリオキサールは反応性の高い $\alpha$ -ジカルボニル化合物であり、蛋白質のアルギニン、リジン、システイン残基に結合する。特にアルギニン残基への反応性が高く、アルギニン残基を修飾することで、アルグピリミジンやMG-H1、テトラヒドロピリミジンなどが形成することが知られている。

## 2. 研究の目的

上述したように、申請者は GLO1 の発現量が神経細胞の分化過程でダイナミックに変化することを見出した。次に、GLO1 の発現量の変化はその基質であるメチルグリオキサールの細胞内濃度に直接影響を及ぼすのではないかと考え、メチルグリオキサールが蛋白質に結合して形成される構造物のひとつアルグピリミジンの分布を調べた。抗アルグピリミジン抗体を用いてマウス胎児大脳皮質を染色したところ、アルグピリミジンの分布は一樣ではなく、分化した神経細胞に多く存在し、脳室帯ではわずかしか検出されなかった。つまり、GLO1 が強く発現する脳室帯ではメチルグリオキサール修飾のひとつアルグピリミジン形成（以後、アルグピリミジン化と呼ぶ）があまり起こっておらず、逆に GLO1 の発現量が低い神経細胞ではアルグピリミジンが多く形成していた。また、非常に興味深いことに、アルグピリミジンの局在は主に神経細胞の核に見られた。抗アルグピリミジン抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、神経細胞の 20 種類以上の核タンパク質がアルグピリミジン化を受けていることが明らかとなった。

以上の結果は次のことを示唆している。神経細胞核蛋白質のアルグピリミジン化はランダムに起こっているのではなく、核内の特定の蛋白質をターゲットにする何らかのシステムが存在していること。その修飾は細胞分化過程でダイナミックに変化することから、細胞の運命決定において何らかの役割を果たしている可能性が高いこと。では、その修飾の役割は何か？それを明らかにするのが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究では、アルグピリミジン化による SWI/SNF 複合体の活性制御と、それを介した神経細胞分化に関わる遺伝子の発現調節メカニズムについて詳細に調べる。様々な解析系の中で、本研究では神経細胞分化誘導系を用いて解析を行う。神経細胞分化に SWI/SNF 複合体のクロマチンリモデリング活性が必須であり、神経分化に重要な因子の転写に SWI/SNF 複合体が直接関わるということが明らかになっている。よって神経細胞分化誘導系は本研究の解析系としては非常に適している。

これまでに、SWI/SNF 複合体の少なくともひとつのサブユニットがアルグピリミジン化を受けることを明らかにしている。はじめに、神経細胞抽出液から SWI/SNF 複合体を精製し、質量解析などの手法を用いて、ア

ルグピリミジン化を受けるアルギニン部位を同定する。SWI/SNF 複合体の精製には、本研究者がすでに作製した SWI/SNF 複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いる。次に、同定した SWI/SNF 複合体上のアルグピリミジン化を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いて発生段階のマウス胎児脳や培養神経幹細胞およびそこから分化させたニューロンを免疫染色する。そして、神経細胞分化過程において SWI/SNF 複合体上のアルグピリミジン化がどのように変化するかを詳細に解析し、アルグピリミジン化がいつどのようなタイミングで行われるのか明らかにする。

## 4. 研究成果

まず、どのような蛋白質がアルグピリミジン化を受けているかを明らかにするため、最も強く修飾されているタンパク質を生化学的なアプローチにより同定したところ、それはクロマチンリモデリング因子 SWI/SNF 複合体構成タンパク質のひとつであることがわかった。SWI/SNF は ATP 依存的にクロマチン構造を変化させ、特定の遺伝子の転写を制御していることが知られている。特に筋細胞や神経細胞などの細胞分化にその活性が必須であることが報告された。

そこで次に神経分化を用いて解析を進めた。分化の際にその修飾が変動することから、まず、株化培養細胞の神経分化誘導系を用いて、クロマチンリモデリング因子 SWI/SNF 複合体の分化における役割を解析した。その結果、その構成因子をノックダウンさせると SWI/SNF 複合体が正常に形成されず、分化が阻害されることがわかった。つまり、アルグピリミジン化される SWI/SNF 複合体構成蛋白質は神経分化の際にクロマチン構造を変化させることで神経分化に必須の役割を果たすことを明らかにした。

## 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 24 件) すべて査読有

①Hasegawa M, Higashi K, Yokoyama C, Yamamoto F, Tachibana T, Matsushita T, Hamaguchi Y, Saito K, Fujimoto M, Takehara K. (2012) Altered expression of dermokine in skin disorders. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* in press.

②Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi

- K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y. (2012) Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *EMBO J.* in press.
- ③ Odawara J, Harada A, Yoshimi T, Maehara K, Tachibana T, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. (2011) The classification of mRNA expression levels by the phosphorylation state of RNAPII CTD based on a combined genome-wide approach. *BMC Genomics.* 12,516
- ④ Mehmood, R., Yasuhara, N., Fukumoto, M., Oe, S., Tachibana, T. and Yoneda, Y. (2011) Cross talk between distinct nuclear import pathways enables efficient nuclear import of E47 in conjunction with its partner transcription factors. *Mol.Biol.Cell*, 22, 3715-3724.
- ⑤ Kamitani, S., Ao, S., Toshima, H., Tachibana, T., Hashimoto, M., Kitadokoro, K., Fukui-Miyazaki, A., Abe, H., and Horiguchi, Y. (2011) Enzymatic actions of Pasteurella multocida toxin detected by monoclonal antibody recognizing the deamidated alpha subunit of the heterotrimeric GTPase Gq. *FEBS Journal*, 278, 2702-2712.
- ⑥ Lai PY, Wang CY, Chen WY, Kao YH, Tsai HM, Tachibana T, Chang WC, Chung BC. (2011) Steroidogenic Factor 1 (NR5A1) resides in centrosomes and maintains genomic stability by controlling centrosome homeostasis. *Cell Death Differ.* 18, 1836-1844.
- ⑦ Kakehashi A, Ishii N, Shibata T, Wei M, Okazaki E, Tachibana T, Fukushima S, Wanibuchi H. (2011) Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci.* 119, 61-72.
- ⑧ Mizuguchi C, Oka M, Moriyama T, Tachibana T, Yoneda Y. (2010) Specific Monoclonal Antibody Against the Nuclear Pore Complex Protein, Nup96. *Hybridoma*, 29, 551-553.
- ⑨ Iino H, Maeshima K, Nakatomi R, Kose S, Hashikawa T, Tachibana T, Imamoto N. (2010) Live imaging system for visualizing nuclear pore complex (NPC) formation during interphase in mammalian cells. *Genes Cells.* 15, 647-660.
- ⑩ Oka, M., Asally, M., Yasuda, Y., Ogawa, Y., Tachibana, T. and Yoneda, Y. (2010) The mobile FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export. *Mol.Biol.Cell*, 21, 1885-1896.
- ⑪ Kakehashi, A., Kato, A., Inoue, M., Ishii, N., Okazaki, E., Wei, M., Tachibana, T., and Wanibuchi, H. (2010) Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 47-55
- ⑫ Jeong, Y-H., Ishikawa, K., Someya, Y., Hosoda, A., Yoshimi, T., Yokoyama, C., Kiryu-Seo, S., Kang, M-J., Tachibana, T., Kiyama, H., Fukumura, T., Kim, D-H. and Saeki, S. (2010) Molecular characterization and expression of the low-density lipoprotein receptor-related protein-10, a new member of the LDLR gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1110-1115
- ⑬ Harada, A., Ohkawa, Y., Ao, S., Odawara, J., Okada, S., Azuma, M., Nishiyama, Y., Nakamura, M., and Tachibana, T. (2010) Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for MyoD. *Hybridoma*, 29, 255-258.
- ⑭ Kotani, M., Harada, A., Odawara, J., Azuma, M., Okada, S., Nishiyama, Y., Nakamura, M., Tachibana, T. and Ohkawa, Y. (2010) Production of a Rat Monoclonal Antibody Specific for Dhx9/NDHII/RHA. *Hybridoma*, 29, 259-261.
- ⑮ Yokoyama, C., Katoh-Fukui, Y., Morohashi, K., Konno, D., Azuma, M. and Tachibana, T. (2010) Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Mouse Germ Cells. *Hybridoma*, 29, 53-57.
- ⑯ Yoshimura, S., Harada, A., Odawara, J., Azuma, M., Okada, S., Nakamura, M., Ohkawa, Y. and Tachibana, T. (2010) Rat monoclonal antibody specific for the chromatin remodeling factor CHD1. *Hybridoma*, 29, 237-240.
- ⑰ Harada, A., Yoshimura, S., Odawara, J., Azuma, M., Okada, S., Nakamura, M., Tachibana, T. and Ohkawa, Y. (2010) Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for CHD2. *Hybridoma*, 29, 173-177.
- ⑱ Tachibana, T., Okazaki, E., Yoshimi, T., Azuma, M., Kakehashi A. and Wanibuchi, H. (2010) Rat Monoclonal Antibody Specific for Septin 9. *Hybridoma*, 29, 169-171.
- ⑲ Yoshimura, S., Yoshimi, T., Ohkawa, Y., Azuma, M. and Tachibana, T. (2010) A Rat Monoclonal Antibody against the Chromatin Remodeling Factor, CHD5. *Hybridoma*, 29, 63-66.
- ⑳ Nagoshi, E., Sugino, K., Kula, E., Okazaki, E., Tachibana, T. and Nelson, S. et al., (2010) Gene

expression dissection of the circadian neuronal circuit of *Drosophila* identifies novel circadian genes. *Nature Neuroscience*, 13, 60-68.

㉑ Nakadate, Y., Mizuguchi, C., Azuma, M. and Tachibana, T. (2009) Generation of a Rat Monoclonal Antibody Specific for Glyoxalase I. *Hybridoma*, 28, 447-450.

㉒ Ohkawa, Y., Harada, A., Nakamura, M., Yoshimura, S. and Tachibana, T. (2009) Production of a Rat Monoclonal Antibody against BRG1. *Hybridoma*, 28, 463-466.

㉓ Yokoyama, C., Komatsu, T., Ogawa, H., Morohashi, K., Azuma, M. and Tachibana, T. (2009) Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for Ad4BP/SF-1. *Hybridoma*, 28, 113-119.

㉔ Nakadate, Y., Uchida, K., Shikata, K., Yoshimura, S., Azuma, M., Hirata, T., Konishi, H., Kiyama, H. and Tachibana, T. (2009) The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 378, 209-212.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

立花 太郎 (TACHIBANA TARO)

大阪市立大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：80311752

##### (2) 分担研究者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし