

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 6 月 10 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：22770165

研究課題名（和文）核内糖転移酵素複合体の同定とその分子機構の解明

研究課題名（英文）The identification and molecular function of nuclear glycosyl transferase complex

研究代表者 藤木 亮次 (FUJIKI RYOJI)
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
 研究者番号： 40534516

研究成果の概要（和文）：

本研究では、われわれが新規核内受容体転写共役因子として同定した *O* 結合型 *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)転移酵素について、その核内複合体の同定と分子機能の解明を行なった。その結果、この酵素がヒストンメチル化酵素などを含む多くの会合因子とともにクロマチン上に存在し、特にヒストンタンパク質をその基質としてクロマチン構造変換と遺伝子発現制御に機能することを見出した。近年、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾はエピゲノムとよばれる新たな遺伝暗号として注目をあつめている。以上の成果はヒストンの GlcNAc 修飾が新たなエピゲノムとなる可能性を示しており、高等真核生物の基本的な転写制御機構の解明につながる新たな知見となった。

研究成果の概要（英文）：

In this research, we focused on the molecular function of *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (OGT), which was identified as a co-activator of nuclear receptor (NR)-mediated transcription in our previous study. To understand the molecular basis for OGT to activate transcription from chromatin, we purified its interacting partners by affinity purification, and identified several chromatin regulatory factors including histone methyltransferases. In addition, we found that histone was a novel substrate for OGT. Together, this modification might be a substantial epigenetic code for the regulation of eukaryotic gene expression network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：転写制御, クロマチン, 糖修飾

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体構造は、DNA とヒストン八量体からなるヌクレオソームを基本単位とし、クロマチン高次構造を形成している。遺伝子発現の要である転写反応の律速は、これらクロマチン構造の変換因子によるクロマチン構造の弛緩であると考えられている。従って、これらクロマチン制御を担う因子群を同定し、その分子機能を明らかにすることは、時期・組織特異的な遺伝子発現の多様性を規定する機構を解明するうえで極めて重要な知見と言える。

これまで申請者は、核内受容体を介する転写制御機構をモデルとして、主に生化学的なアプローチから新規クロマチン制御因子群の探索に注力してきた。その過程で、それまで糖転移酵素として知られていた O 結合型 N-アセチルグルコサミン転移酵素(OGT)が転写共役因子として機能し、核内受容体を介する転写反応とクロマチン構造変換を促進することを見出してきた。しかしながら、それまでに核内の糖転移酵素に関する報告は少なく、その分子機能については依然として多くの不明な点が残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、核内糖転移酵素 OGT の転写の場での役割を明らかにする目的で、その核内複合体の同定と新たな OGT 基質の探索を目的とした。

3. 研究の方法

核内に存在する OGT 複合体の構成を明らかにするため、まず、FLAG タグ融合 OGT タンパク質を安定的に発現させた THP-1 細胞を取得した。この細胞から核タンパク質抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体アフィニティー精製を行なった。得られた結合因子群については、SDS-PAGE にて展開したのち、銀染色法による視覚化と各々バンドの切り出し操作によって純化させた。さらに、トリプシン処理によってペプチドレベルまで消化し、このペプチドプールをマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF-MS) に供した。得られたペプチドフィンガープリントはデータベースに紹介し、各々タンパク質の同定を行なった。

また、クロマチン制御に関わる OGT 基質の探索は、レクチンと特異的認識抗体を用い

た GlcNAc 化修飾タンパク質群の網羅的な探索 (GlcNAc-ome 解析) から試みた。まず、HeLa-S3 細胞のクロマチン結合タンパク質抽出液を調製し、ここから小麦胚芽アグルチニン (WGA) レクチンによる糖化タンパク質粗画分を調製した。さらに、得られた画分から抗 GlcNAc 化セリン/トレオニン-パン抗体を用いたアフィニティー精製から、目的の GlcNAc 修飾のみを含むタンパク質の精製画分を得た。これら GlcNAc 化タンパク質群の同定は、精製画分をナノ高速液体クロマトグラフィー (nano-LC) タンデム質量分析 (MS/MS) に供して行なった。

4. 研究成果

THP-1 細胞から OGT 複合体構成因子群を解析した結果、機能未知の因子を含む全 48 因子を同定した。これらの中には、ヒストン H3 リジン 4 番目 (K4) メチル化酵素である MLL ファミリー分子や、以前われわれが同定した MLL5 複合体構成因子である HCF-1、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子などが含まれていた。

一方、GlcNAc-ome 解析では、レクチンカラムと GlcNAc 修飾パン抗体によるアフィニティー精製からヒストンタンパク質の濃縮が観察された。次に、リコンビナントタンパク質を用いた試験管内解析から、ヒストン八量体の中でもヒストン H2B が OGT の主要な基質となる可能性を見出すことに成功した。さらに、質量分析によるアミノ酸レベルでのマッピングから、その主な部位がセリン 112 番目であることを同定した。

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 12 件)

- (1) Fujiki R., Hashiba W., Sekine H., Yokoyama A., Chikanishi T., Ito S., Imai Y., Kim J., He HH., Igarashi K., Kanno J., Ohtake F., Kitagawa H., Roeder RG., Brown M., Kato S.: GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*, 480, 557-560, 2011. 査読有
- (2) Yokoyama A., Fujiki R., Ohtake F., Kato S.: Regulated histone methyltransferase and demethylase complexes in the control of genes

- by nuclear receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011. 査読有
- (3) Yokoyama A., Katsura S., Ito R., Hashiba W., Sekine H., Fujiki R., Kato S.: Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 410:749-753, 2011. 査読有
- (4) Kato S., Fujiki R.: Transcriptional controls by nuclear fat-soluble vitamin receptors through chromatin reorganization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75:410-413, 2011. 査読有
- (5) Kato S., Yokoyama A., Fujiki R.: Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. *Trends Biochem Sci.* 36:272-281, 2011. 査読有
- (6) Kitagawa H., Fujiki R., Yoshimura K., Oya H., Kato S.: Williams syndrome is an epigenome-regulator disease. *Endocr J.* 58:77-85, 2011. 査読有
- (7) Yokoyama A., Okuno Y., Chikanishi T., Hashiba W., Sekine H. Fujiki R. Kato S.: KI AA1718 is a histone demethylase that erases repressive histone methyl marks. *Genes Cells* 15:867-873, 2010. 査読有
- (8) Matsuyama R., Takada I., Yokoyama A., Fujiyama-Nakamura S, Tsuji N, Kitagawa H, Fujiki R., Kim M, Kouzu-Fujita M, Yano T, Kato S.: Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppress the function of estrogen-related receptor alpha through histone deacetylase 1. *J Biol Chem.* 285:18166-18176, 2010. 査読有
- (9) Chikanishi T., Fujiki R., Hashiba W., Sekine H., Yokoyama A., Kato S.: Glucose-induced expression of MIP1-genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 394:865-870, 2010. 査読有
- (10) Kouzmenko A., Ohtake F., Fujiki R., Kato S.: Hormonal gene regulation through DNA methylation and demethylation. *Epigenomics*, 2, 765-774, 2010. 査読有
- (11) Fujiki R., Chikanishi T., Hashiba W., Kato S.: Role of nuclear O-Glycosylation in epigenetic regulation. *Tanpakushitsu Kakusan Koso (Japanese)*. 55:61-68, 2010. 査読無
- (12) Sawatsubashi S., Murata T., Lim J., Fujiki R., Ito S., Suzuki E., Tanabe M., Zhao Y., Kimura S., Fujiyama S., Ueda T., Umetsu D., Ito T., Takeyama K., Kato S.: A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.* 24:159-170, 2010. 査読有
- [学会発表] (計 3 件)
- (1) 藤木亮次, 近西俊洋, 橋場和華, 関根弘樹, 横山敦, 加藤茂明, 核内 O-GlcNAc 修飾を介するエピゲノム制御機構の新たな作用点の探索. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会合同大会. (神戸, 2010 年 12 月 7 日~10 日)
- (2) Ryoji Fujiki, Toshihiro Chikanishi, Waka Hashiba, Robert G. Roeder, Shigeaki Kato, GlcNAcylation of a histone methyltransferase in regtinoic acid-induced granulopoiesis. Keystone Symposia: Histone Code: Fact or Fiction? (Utah, USA, January 10-15, 2011)
- (3) 藤木亮次, 加藤茂明, 核内糖修飾を介するエピジェネティクスの制御機構. 第 84 回日本生化学会大会. (京都, 2010 年 9 月 21 日~24 日)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)
- 名称: ヒストンタンパク質のグリコシル化を検出するための方法、並びに当該方法に用いられる抗体
発明者: 加藤茂明、藤木亮次
権利者: 東京大学
番号: 特願 2010-229477
出願年月日: 平成 22 年 10 月 12 日

○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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤木 亮次 (FUJIKI RYOJI)
東京大学・分子細胞生物学研究所
研究者番号： **40534516**

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし