

核内糖修飾による血球細胞分化制御の応用

東京大学 分子細胞生物学研究所

藤木 亮次

1. はじめに

細胞にとって「糖」は、単にエネルギー源として利用されるだけでなく、糖修飾のドナー基質に代謝されてタンパク質の機能調節にも関与している。古くから、タンパク質の糖修飾は細胞膜上や細胞外において重要とされてきた。しかし、申請者は最近、核内 O 結合 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 転移酵素の OGT がヒストンメチル化酵素である MLL5 を修飾し、その酵素活性を増強することを見出した ([Fujiki et al., Nature, 2009](#))。また、この O-GlcNAc 修飾によるヒストンメチル化制御は、血球細胞分化に伴うダイナミックなクロマチン制御に非常に重要な役割を果たしていた。本研究では、新たな O-GlcNAc 修飾を受けるクロマチン因子群の生化学的な探索を試みた。具体的に、クロマチンタンパク質の抽出液から抗 O-GlcNAc 修飾認識抗体を用いた網羅的な精製 (O-GlcNAc-ome 解析) を行った。

2. 方法

1) 細胞マテリアル(クロマチン抽出液)の調製

本研究では HeLa 細胞のクロマチン抽出液を用いた。15 L スケールで HeLa 細胞を培養し、ここからクロマチン結合因子群の抽出を行なった。具体的に、サイトゾルタンパク質、核タンパク質を抽出した後、その沈殿をマイクロコッカルヌクレアーゼで処理した。その可溶化画分をクロマチンタンパク質の抽出液として用いた。タンパク質収量は約 0.5 g 程度となった。

2) O-GlcNAc 修飾因子の精製

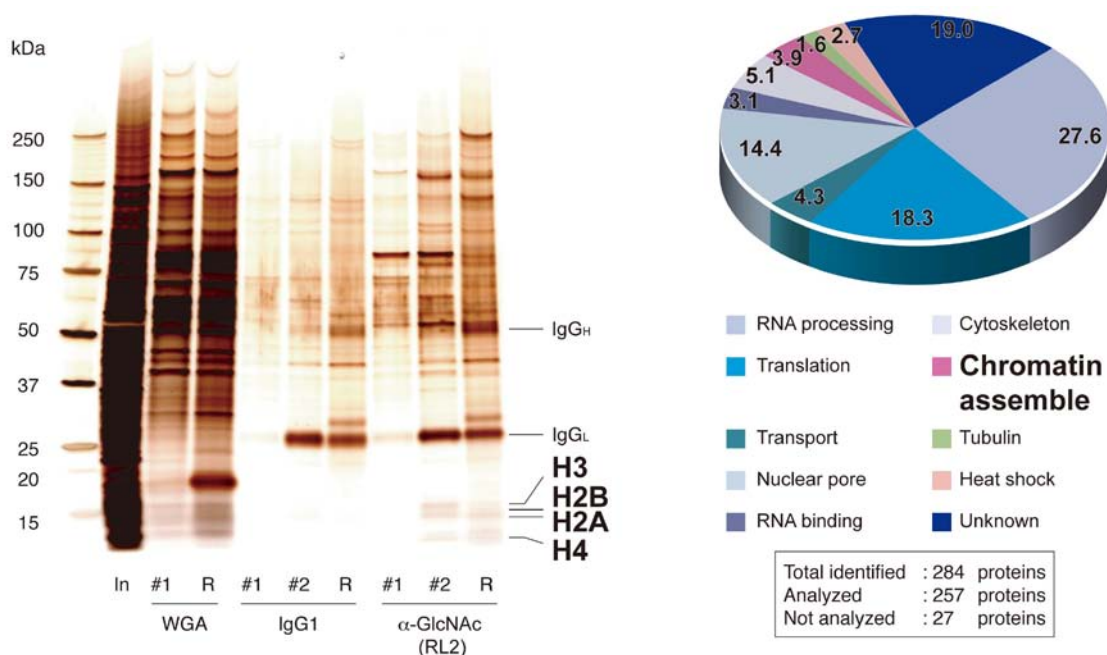
精製の分離抗体として、Abcam 社より市販の抗 O-GlcNAc 修飾認識モノクローナル抗体 (RL2 クローン) を選択した。この抗体を磁気ビーズに結合、架橋剤によって固定化した。このビーズに上述のクロマチン抽出液を混和させ、濃縮されたタンパク質を N-アセチルグルコサミンによって溶出した。

3) 質量分析機による精製産物の網羅的な同定

常法に従って、上述の濃縮タンパク質は電気泳動と銀染色によって確認したのち、液体クロマトグラフィー (LC) - 質量分析スペクトル (MS) / MS 法によって同定を行なった。簡単に、濃縮タンパク質をトリプシンで消化した。これを LC の逆相カラムによって分離させ、溶出してきたペプチドを順次質量分析計で MS/MS 解析を行なった。得られたスペクトルはデータベース (マススコット) に参照させ、同定を行なった。

3. 結果

HeLa 細胞のクロマチンタンパク質抽出液を材料に O-GlcNAc-ome 解析を行なった。濃縮されたタンパク質を電気泳動によって展開させ、銀染色を行なった（下図左）。得られたサンプルを LC-MS/MS 解析に供した。その結果、全 284 因子の同定に成功した。これら同定された因子群を David データベースによってオントロジー解析し、その機能分類を行なった（下図右）。このうちの 257 因子は RNA プロセッシング (27.6 %), 翻訳 (18.3 %), 輸送 (4.3 %), 核膜孔タンパク質 (14.4 %), RNA 結合 (3.1 %), 細胞骨格 (5.1 %), クロマチン構造 (3.9 %), チューブリン (1.6 %), 熱ショックタンパク質 (2.7 %) などに分類され、残りの 27 因子は機能未知であった。



4. 考察

タンパク質の GlcNAc 修飾は細胞外グルコース濃度によってダイナミックな調節を受けている。すなわち、細胞外のグルコース濃度が高くなると糖転移反応のドナー基質となる UDP-GlcNAc の生合成が盛んになり、細胞内の GlcNAc 修飾が蓄積していく。一方、グルコース枯渇状態ではこれと逆の細胞応答が起こり、全細胞レベルでの GlcNAc 化タンパク質の減少が観察される。現在ではこの糖修飾がある種の「栄養センサー」となっており、栄養代謝などに不可欠であることが明らかとなりつつある。

申請者はこれまでに、タンパク質 GlcNAc 修飾が遺伝子発現の場であるクロマチン上においても重要な役割を担っていることを見つけてきた。しかし、この修飾がクロマチンを構成するどの分子上で起こっているのかは不明であった。本研究では、この GlcNAc 修飾基質を網羅的に精製・同定することにより、クロマチン上での核内糖修飾シグナルの作用点を一部明確にすることができた。

申請者は、これら同定された因子の中でクロマチン構造を構成するコア要素であるヒストンタンパク質に着目し、その後の研究を展開している。最近、ヒストンの翻訳後修飾は近傍遺伝子の転写などを調節することが分かっている。すなわち、遺伝子 DNA がタンパク質のアミノ酸配列を記憶すコードとなるのに対し、ヒストン修飾はそこからの転写反応を規定する第二の遺伝暗号（ヒストンコード）と考えられている。申請者は既に、ヒストンタンパク質内の GlcNAc 修飾サイトを同定し、その修飾

を特異的に認識するモノクローナル抗体を開発している。また、この新規ツールによってこの修飾が新たなヒストンコードとなる可能性について検証している。最新の知見として、この新しいヒストン修飾が 1) 細胞外グルコースに応答する特徴を有する点、2) 転写の活性化に関係する点を証明しつつある。今後、様々な視点からヒストン GlcNAc 修飾がヒストンコードとして機能する点について解析を進めていきたい。

また、この新たなヒストン修飾は上述のような性質上、さまざまな代謝性疾患の発症に深く関わっていることが予想される。実際、この修飾のサイトをクロマチン免疫沈降—シークエンシング (ChIP-Seq) 法によりゲノムワイドに同定すると、その多くは糖尿病原因遺伝子であり HNF4 の結合モチーフ近傍に多く存在することが分かっている。今後、この修飾の作用点を詳しく解析していくことにより、その治療に役立てることが期待できる。

5. 参考文献

Fujiki R., Hashiba W., Sekine H., Yokoyama A., Chikanishi T., Ito S., Imai I., Ohtake F., Kitagawa H., Kim J., Roeder RG., He HH., Brown M., Kato S.: O-GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitinylation. 2010 in revision.

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(4):865-70. 2010

Fujiki R., Chikanishi T., Hashiba W., Ito H., Takada I., Roeder RG., Kitagawa H., Kato S.: Nuclear protein GlcNAcylation facilitates retinoic acid-induced granulopoiesis through histone activating methylation. *Nature*, 459(7245):455-9. 2009