

転写マシナリーと核内微細構造の ダイナミックプロテオミクス

Dynamic Proteomics of Transcriptional Machinery and Nuclear Architecture

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO TAKAO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授



研究の概要

HNF4 α や LXR α などの核内受容体あるいは WTAP に対する特異抗体を用いて、転写調節や RNA プロセッシングにかかわるタンパク質複合体を抗体磁気ビーズによる高感度プロテオミクスにより解析する。また、共焦点顕微鏡や新たに抗体プローブを用いた軟 X 線顕微鏡による撮像法を開発し、核内微細構造と転写マシナリーおよび細胞周期との関連を見出す。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロテオミクス、複合体解析、転写調節、スプライシング、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモン受容体に代表される核内受容体はクロマチンのリモデリングや修飾などを行うタンパク質複合体と相互作用して、様々な遺伝子の転写を活性化することが知られている。さらにスプライシングや輸送あるいは分解などの RNA プロセッシングも同時に制御され、スペックルなどの核内の微細構造と転写が密接な関係を持って制御されている可能性が示唆されていたが、詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

転写を調節するマシナリーは多数のタンパク質によって形成される複合体よりなり時系列をもったシークエンシャルな相互作用を形成する。このような多数のタンパク質による調節機構の時間的空間的な変化を解明するための新たな解析手法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

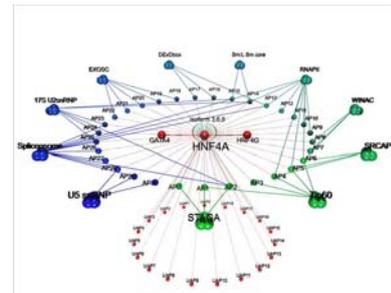
バキュロウイルス免疫法等により作製した高親和性モノクローナル抗体を低ノイズ磁気ビーズに付加し、複合体を免疫精製してショットガンプロテオミクスにより同定する。内在性の複合体を高感度に検出する手法を開発する。複合体構成タンパク質の定量的測定による時系列変化の解析を目指す。抗体金属ナノパーティクルプローブによる軟 X 線顕微鏡の開発を行い、核微細構造と転写マシナリーの空間的な変化を解析する技術を開発する。

4. これまでの成果

HNF4 α は MODY1 (若年発症成人型糖尿病) の原因遺伝子として同定された核内受容体で、肝臓・すい臓・小腸の器官形成や糖脂質代謝に重要な役割を果たしている転写因子である。高親和性の抗体を作製し低ノイズの磁気ビーズに付加した抗体磁気ビーズを用いて、遠沈せずに少量のサンプルから効率よく目的タンパク質の複合体を精製・ショットガンプロテオミクスにより同定する技術を確立した。培養ヒト肝芽腫細胞 (HepG2 細胞) 10 cm ディッシュ 1 枚からの細胞サンプルで HNF4 α 複合体を精製し、複合体タンパク質を数百種類同定した。

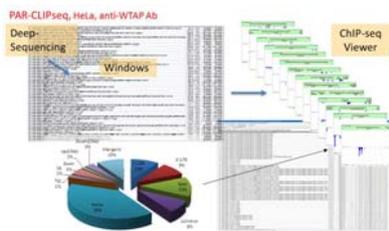
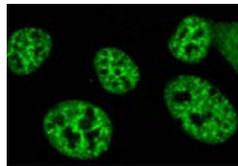
内在性の HNF4 α は 6 種類のスプライシングアイソフォームの間でヘテロあるいはホモ 2 量体を形成しており、また一部は HNF4 γ とヘテロ 2 量体を形成して糖代謝に重要な CIDE-B 遺伝子を転写調節していることがわかった。また新たなリン酸化部位やユビキチン化部位等の修飾箇所を同定した。転写マシナリーの複合体として、

クロマチンリモデリングに関わる WINAC コンプレックス、HAT

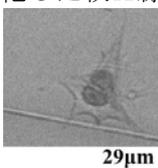
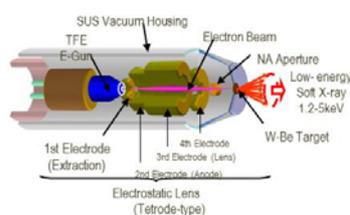


複合体の STAGA コンプレックスおよび NuA4 コンプレックス等、NurD コンプレックス (HDAC) を同定した。スプライシングコンプレックスも見出され、核局在解析や全ゲノム解析からもスプライシングへの関与が示唆された。これらの複合体の関係をプロットすると、図のように同一のタンパク質が複数の機能の異なる複合体に含まれて作用をしている像が明らかになる。また、転写調節のコアクターとして、NCoA62/SKIP、PELP1、CREBBP と新規に PerQ2/GIGYF2 等を候補として同定した。同様に糖・脂質代謝に関与する核内受容体 LXR α について共焦点顕微鏡を用いた局在解析により、核小体の dense fibrillar component に局在し、リボゾーム RNA の転写調節に関与している可能性が示唆された。

WTAP はショウジョウバエの性決定におけるオルタナティブスプライシングに関わる fl(2)d 遺伝子のヒトホモログである。転写因子 GATA2 と相互作用する遺伝子として同定した。WTAP は、血管内皮細胞や HeLa 細胞の細胞周期にかかわる遺伝子の RNA の安定性を制御している。核内ではスペckル構造 (図) に多く存在し、スプライシングなど RNA プロセッシングの機構に関与すると考えられる。抗体磁気ビーズによるプロテオミクスによりタンパク質複合体を調べ、siRNA によりスペckル構造への局在に関するタンパク質を同定した。また、相互作用する RNA を網羅的に調べる手法 (図) を開発し、候補 RNA を同定した。



さらに詳細な局在を調べる方法として、軟 X 線顕微鏡による観察法を開発を行った。軽元素で構成された細胞の内部構造を十分なコントラストで得られるような低エネルギー軟 X 線の発生に最適化した軟 X 線管を開発した (図)。核膜タンパク質 emerin の抗体を作製し、金ナノコロイドを用いて簡易型軟 X 線顕微鏡としては世界初の哺乳類細胞 (図; HeLa 細胞) の撮像に成功した。



5. 今後の計画

HNF4 α の新規コアクターの候補を同定しており、シグナルによる複合体およびリン酸化等の修飾の時系列と局在変化、相互作用の形式等のダイナミックな過程を解析する手法を開発する。

スプライシングや輸送などの RNA プロセッシングに関与するタンパク質と RNA を同定し、抗体やイメージング技術を用いて、空間的時間的变化を解析し、RNA プロセッシングと細胞周期との関連を解明する。

軟 X 線顕微鏡による観察技術を高めるため、さらにコントラスト解像度を上げ、CT 画像を取得する。また、数 10 ナノメートルの低波長域の撮像にチャレンジする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. Daigo K, Kawamura T, Ohta Y, Ohashi R, Katayose S, Tanaka T, Aburatani H, Naito M, Kodama T, Ihara S, Hamakubo T. *J Biol Chem*. 2011; 286 (1):674-86.
 2. Soft X-ray Laser Microscopy of Lipid Rafts towards GPCR-Based Drug Discover Using Time-Resolved FRET Spectroscopy. Baba M, Kozasa T, Hamakubo T, Kuroda H, Masuda K, Yoneya S and Kodama T, *Pharmaceuticals* 2011,4,524-550
 3. A wave of nascent transcription on activated human genes. Wada Y, Ohta Y, Xu M, Tsutsumi S, Minami T, Inoue K, Komura D, Kitakami J, Oshida N, Papantonis A, Izumi A, Kobayashi M, Meguro H, Kanki Y, Mimura I, Yamamoto K, Mataka C, Hamakubo T, Shirahige K, Aburatani H, Kimura H, Kodama T, Cook PR, Ihara S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 27;106(43):18357-61.
 4. A simple detection method for low-affinity membrane protein interactions by baculoviral display. Sakihama T, Sato T, Iwanari H, Kitamura T, Sakaguchi S, Kodama T, Hamakubo T. *PLoS One*. 2008; 3(12): e4024.
 5. Protein expression of nuclear receptors in human and murine tissues. Takegoshi S, Jiang S, Ohashi R, Savchenko AS, Iwanari H, Tanaka T, Hasegawa G, Hamakubo T, Kodama T, Naito M. *Pathol Int*. 2009, 59(2):61-72.
- ホームページ等
<http://www.lsbm.org/staff/hamakubo.html>