

References

- Forte G, Petrucci F, Bocca B (2008) Metal allergens of growing significance: epidemiology, immunotoxicology, strategies for testing and prevention. *Inflamm Allergy Drug Targets* 7: 145–162.
- Nosbaum A, Vocanson M, Rozières A, Hennino A, Nicolas JF (2009) Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 19: 325–332.
- Budinger L, Hertl M (2000) Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy* 55: 108–115.
- Martin SF, Jakob T (2008) From innate to adaptive immune responses in contact hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 289–293.
- Basketter DA, Briatico-Vangosa G, Kaestner W, Lally C, Bontinck WJ (1993) Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis* 28: 15–25.
- Aberer W, Holub H, Strohal R, Slavicek R (1993) Palladium in dental alloys—the dermatologists' responsibility to warn? *Contact Dermatitis* 28: 163–165.
- Rustemeyer T, von Blomberg BM, van Hoogstraten IM, Bruynzeel DP, Scheper RJ (2004) Analysis of effector and regulatory immune reactivity to nickel. *Clin Exp Allergy* 34: 1458–1466.
- Sinigaglia F, Scheidegger D, Garotta G, Scheper R, Pletscher M, et al. (1958) Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. *J Immunol* 135: 3929–3932.
- Kapsenberg ML, Wierenga EA, Stiekema FE, Tiggeleman AM, Bos JD (1992) Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4+T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J Invest Dermatol* 98: 59–63.
- Moed H, Boersma DM, Stoof TJ, von Blomberg BM, Bruynzeel DP, et al. (2004) Nickel-responding T cells are CD4+ CLA+ CD45RO+ and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. *Br J Dermatol* 151: 32–41.
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252.
- Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419–426.
- Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C, Andersen KE (2001) Prevalence of atopic dermatitis, asthma, allergic rhinitis, and hand and contact dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis. *Br J Dermatol* 144: 523–532.
- Thierse HJ, Gamberdinger K, Junkes C, Guerreiro N, Weltzien HU (2005) T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* 209: 101–107.
- Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, et al. (1995) Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 181: 2237–2247.
- Lore K, Sonnerborg A, Spetz A L, Andersson U, Andersson J (1998) Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 218: 173–187.
- Riedl E, Stockl J, Majdic O, Scheinecker C, Knapp W, et al. (2000) Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood* 96: 4276–4284.
- Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kyal S, et al. (2002) Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med* 196: 417–430.
- Villadangos JA, Cardoso M, Steptoe RJ, van Berkel D, Pooley J, et al. (2001) MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14: 739–749.
- Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haefliger-Cavaillon N, et al. (1997) Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol* 158: 2919–2925.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807–869.
- Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- α , and contact sensitizers. *J Immunol* 166: 3837–3845.
- Jorgl A, Platzer B, Taschner S, Heinz LX, Hocher B, et al. (2007) Human Langerhans-cell activation triggered in vitro by conditionally expressed MKK6 is counterregulated by the downstream effector RelB. *Blood* 109: 185–193.
- Nakae S, Naruse-Nakajima C, Sudo K, Horai R, Asano M, et al. (2001) IL-1 α , but not IL-1 β , is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. *Int Immunol* 13: 1471–1478.
- Artik S, von Vultee C, Gleichmann E, Schwarz T, Griem P (1999) Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *J Immunol* 163: 1143–1152.
- Black J (1999) Allergic foreign body response. In: *Biological performance of materials – Fundamentals of biocompatibility*, 3rd edition. New York and Basel Marcel Dekker. pp 215–232.
- Fields RC, Shimizu K, Mule JJ (1998) Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9482–9487.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecqec S, et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–811.
- Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M (2006) Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci* 42: 1–11.
- Toebak MJ, Gibbs S, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Rustemeyer T (2009) Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 60: 2–20.
- Bennett CL, Noordegraaf M, Martina CA, Clausen BE (2007) Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *J Immunol* 179: 6830–6835.
- Rincon M, Davis RJ (2009) Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev* 228: 212–224.
- Brown MD, Sacks DB (2009) Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal* 21: 462–469.
- Boisleve F, Kerdine-Romer S, Pallardy M (2005) Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF- α . *Toxicology* 206: 233–244.
- Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, et al. (2008) Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J Toxicol Sci* 33: 51–59.
- Trompezinski S, Migdal C, Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont P, et al. (2008) Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 230: 397–406.
- Schmidt M, Raghavan B, Muller V, Vogl T, Fejer G, et al. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 11: 814–819.
- Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, et al. (2003) CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 171: 2571–2580.
- Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27: 3031–3038.
- Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, et al. (2000) Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 114: 295–302.
- Van Waes C (2007) Nuclear factor- κ B in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res* 13: 1076–1082.
- Kaisho T, Tanaka T (2008) Turning NF- κ B and IRFs on and off in DC. *Trends Immunol* 29: 329–336.
- Ade N, Antonios D, Kerdine-Romer S, Boisleve F, Rousset F, et al. (2007) NF- κ B plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO₄ but not by DNCB. *Toxicol Sci* 99: 488–501.
- Antonios D, Ade N, Kerdine-Romer S, Assaf-Vandecasteele H, Lorange A, et al. (2009) Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. *Toxicol In Vitro* 23: 227–234.
- O'Neill D, Bhardwaj N (2005) Exploiting dendritic cells for active immunotherapy of cancer and chronic infection. *Methods Mol Med* 109: 1–18.
- Koski GK, Cohen PA, Roses RE, Xu S, Czerniecki BJ (2008) Reengineering dendritic cell-based anti-cancer vaccines. *Immunol Rev* 222: 256–276.
- Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, et al. (2008) Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. *Gene Ther* 15: 1126–1130.

特集I

免疫応答の制御と自己免疫疾患

RANKLとFasによる
免疫応答の制御*石丸 直 澄**
井 澤 俊**
林 良 夫**

Key Words : RANKL, Fas, dendritic cell, autoimmunity

はじめに

Fas分子の発見以来、アポトーシスという概念は急速に生命現象の一つとして受け入れられ、現在に至るまでアポトーシス研究は進展し続けている。特に、免疫担当細胞の維持機構、免疫疾患の発症機序におけるFas分子の重要性に関する多くの報告がなされてきた。一方、receptor activator of nuclear factor(NF)- κ B ligand (RANKL)は破骨細胞あるいは樹状細胞(dendritic cell ; DC)などの分化、成熟、活性化に大きく関与していることが知られている。本稿では、さまざまな血球系細胞におけるFas分子あるいはRANKLの役割を概説した上で、筆者らが見出したDCにおけるFasとRANKLシグナルのクロストークが免疫疾患にどのように関与しているのかを解説する。

Fasシグナルと自己免疫疾患

Fas分子を細胞表面に発現したさまざまな細胞はそのリガンドであるFas ligand(L)の結合により細胞死(アポトーシス)へと誘導されることがよく知られている¹⁾。特に、免疫システムにおいては、自己免疫疾患における標的臓器細胞での

Fas発現が活性化T細胞のFasLを介した細胞死による組織破壊に重要であり、病態の進展機序の一つとして理解されている²⁾。また、精巣、角膜などでは“immune privilege site”としてFasLが発現されることによって、免疫細胞からの攻撃を免れるシステムも存在している^{3,4)}。

Fas遺伝子の突然変異を有するMRL/*lpr*マウスは、末梢での異常T細胞の蓄積によるリンパ節腫脹や脾腫に加えて、多臓器での自己免疫病変を発症することが知られており、Fasを中心としたアポトーシスと免疫維持システムの分子機序を探索する上で、きわめて有用なモデル動物である。MRL/*lpr*の自己免疫性病変として、全身リンパ節腫脹、脾腫、関節リウマチ、ループス腎炎に加えて唾液腺、涙腺を標的とするシェーグレン症候群に類似する病変が観察される(図1)。

免疫担当細胞の中心的役割を果たすT細胞の末梢での維持機構には3つのシステムがあり⁵⁾、第一のシステムとしてactivation-induced cell death(AICD)が知られており、活性化しすぎた有害なT細胞は末梢において除去されてしまうシステムが備えられている。第二のシステムとして、有害な免疫細胞を抑制的に調節することができる制御性T細胞による維持機構が知られている。第三のシステムとして有害なT細胞自体が無反応(アナジー)となることによる維持機構が存在

* Regulation of immune response by RANKL and Fas.

** Naozumi ISHIMARU, D.D.S., Ph.D., Takashi IZAWA, D.D.S., Ph.D. & Yoshio HAYASHI, D.D.S., Ph.D.: 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野[〒770-8504 徳島市蔵本町3-18-15]; Department of Oral Molecular Pathology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8504, JAPAN

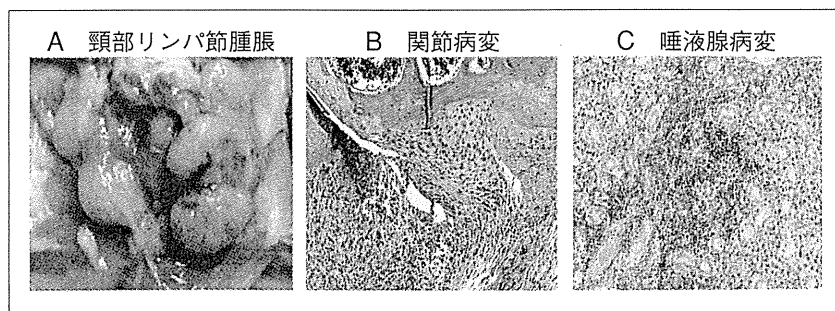


図1 MRL/lprマウス(雌, 20週齢)の自己免疫性病変

- A: 頸部リンパ節の著しい腫脹が認められる。
- B: 骨破壊を伴った関節における炎症性病変を示す(病理組織像)。
- C: 組織破壊を伴った唾液腺の炎症性病変を示す(病理組織像)。

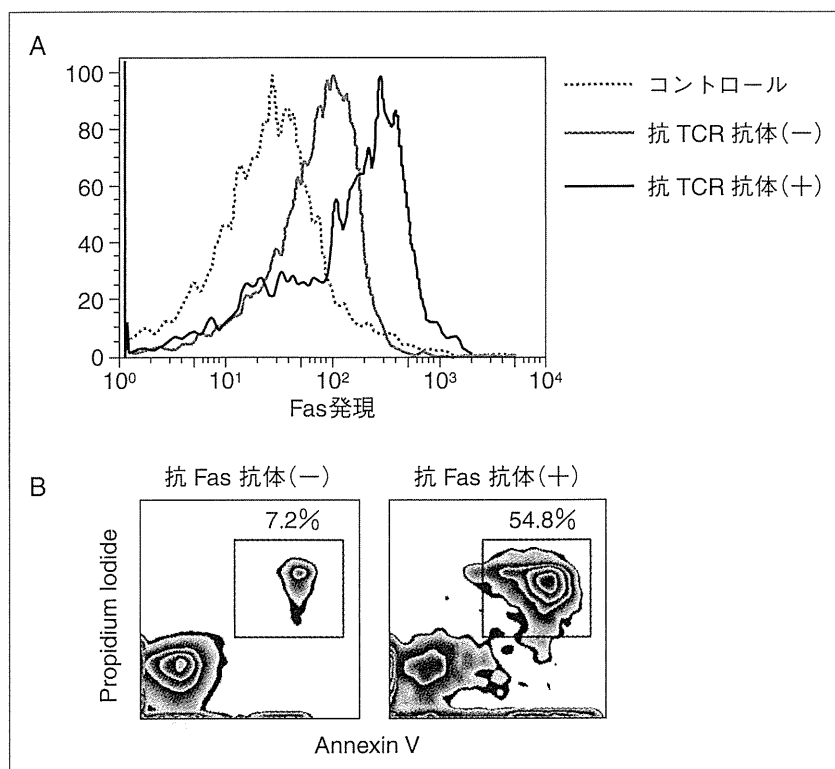


図2 T細胞のFasを介したアポトーシス

- A: 正常B6マウスの脾臓よりCD44^{low}CD4⁺ナイーブT細胞を調整し, プレートに固層化した抗TCR抗体(0.5μg/ml)で24時間培養後, フローサイトメータでFas抗原の発現を検討した. アイソタイプコントロール, 抗TCR抗体刺激の有無によるT細胞表面のFas発現をヒストグラムで示す.
- B: 抗TCR抗体で刺激後, 抗Fas抗体(500ng/ml)を添加し, 24時間後のアポトーシスに関してAnnexin-VとPIで評価した.

している. 第一のシステムとしてのAICDでは活性化T細胞自身あるいはT細胞同士でのFas/FasLによるアポトーシスの誘導が報告されている⁵⁾. 正常C57BL/6(B6)マウスの脾細胞から調整したCD44^{low}CD4⁺ナイーブT細胞をin vitroでプレートに固層化した抗T-cell receptor (TCR)抗体で刺

激すると, 細胞表面にわずかの発現であったFas分子は強く発現し(図2-A). さらに, 抗TCR抗体で刺激したT細胞に抗Fas抗体を添加すると, 容易にアポトーシスが観察できる(図2-B).

また, B細胞においてもFasを介したアポトーシスが末梢の液性免疫の調節機構に重要である

ことが知られているが、成熟した B 細胞は Fas 経路のアポトーシスに感受性が低いという報告もあり⁶⁾、B 細胞の分化段階によって Fas シグナルの機能は変化している可能性がある。MRL/*lpr* マウスでさまざまな自己抗体が検出されることから、抗体産生に Fas を介した B 細胞アポトーシスが影響しているようである。

MRL/*lpr* マウスでは Fas 遺伝子の変異により Fas を介したアポトーシスの異常によって、本来除去されるべき T 細胞が末梢に蓄積してしまうことが、自己免疫疾患の原因と考えられている。また、FasL 遺伝子の変異を有する *gld* マウスにおいても *lpr* マウスと同様に、自己免疫病変が発症することも知られている⁷⁾。一方、Fas 遺伝子の変異を伴う正常 B6 マウスバックグラウンドである B6/*lpr* マウスは軽度のリンパ節腫脹および脾腫は観察されるものの、自己免疫病変はほとんど確認されない。このことは Fas シグナル異常のみで自己免疫疾患が発症するのではなく、それ以外の複数の要因が複雑に相互作用をしながら病態形成に至るということを示唆している。

Fas 分子はそのリガンドの結合により、3 量体形成がアポトーシスシグナルの引き金になると考えられている。Fas 分子の細胞内ドメインは Fas-associated protein with death domain (FADD) あるいは FADD-like ICE (FLICE) などのシグナル分子群と作用することにより、カスパーゼの活性化による細胞死の誘導が知られている⁸⁾。アポトーシスシグナルは階層的な酵素活性によるカスパーゼの複雑な活性化機構によって制御されており、Fas 以降にさまざまなシグナル分子が関与していることもすでに報告されている⁹⁾¹⁰⁾。このように、細胞内での複雑なカスケードを経由してアポトーシスシグナルが伝達されている。

RANKL シグナルと免疫反応

RANKL は tumor necrosis factor (TNF) ファミリーに属するサイトカインであり、RANKL とそのレセプターを介したシグナルは破骨細胞の分化や活性化にきわめて重要であることが知られており、骨代謝や骨関節疾患との関連が注目されている¹⁰⁾。RANK/RANKL シグナルの重要性は関節リウマチの局所での病態機序の解明によっ

て、大きくクローズアップされた¹⁰⁾。つまり、自己免疫反応による種々のサイトカイン産生亢進により関節滑膜の線維芽細胞あるいは骨芽細胞に発現亢進した RANKL が、破骨細胞上の RANK と作用することによって、破骨細胞による骨破壊が亢進することが知られている。また、関節リウマチ病態では interleukin (IL)-17 を産生する CD4⁺ T 細胞 [T helper (Th) 17] によって RANKL が発現することで破骨細胞の RANK を介した骨破壊が亢進する¹¹⁾。近年、RANKL がキーマンとして骨代謝と免疫システムとを密接に結びつけられ、骨免疫学 “Osteoimmunology” という新たな学術分野が発展している¹²⁾¹³⁾。RANKL 遺伝子欠損マウスは破骨細胞の機能不全により重度の大理石骨病様の病変を呈し、歯牙萌出異常とともにリンパ節の欠損も報告されており、RANKL シグナルの免疫臓器の発生・分化における役割も重要視されている¹⁴⁾。また、DC の活性化にも RANK/RANKL シグナルが必須であり、マウス骨髄細胞から IL-4 と granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) によって未熟な DC を誘導後、リコンビナント RANKL で刺激することによる成熟 DC の誘導法は DC 研究に広く受け入れられている¹⁵⁾。さらに最近、胸腺細胞から産生される RANKL が髄質の胸腺上皮細胞表面に発現する RANK と結合することによって胸腺上皮細胞の機能維持を果たしていることも報告されている¹⁶⁾。このように、RANKL は骨代謝のみでなく種々の免疫担当細胞の機能維持に深く関連していることが明らかにされている。

RANK/RANKL シグナルは細胞種によっても異なっているが、DC、マクロファージあるいは破骨細胞では細胞表面の受容体である RANK が RANKL と結合すると TRAF6 などのアダプター分子を介して、IKK α 活性化、I κ B α のリン酸化およびユビキチン化によって、細胞質内の NF- κ B サブユニットが核内に移行することで NF- κ B の標的遺伝子群の転写が調節される¹⁷⁾。NF- κ B の標的遺伝子にはそれぞれの細胞の分化、成熟、活性化あるいは細胞死に関連するようなサイトカインや増殖因子などが知られている¹⁷⁾。NF- κ B の活性化機構は RANK/RANKL 経路のみでなく、Toll-like receptor など複数の経路あるいはそれらのシグナ

ルのクロストークなど複雑な経路によるものと想定される。また、破骨細胞ではRANKLシグナルがNF- κ B以外にERK, c-Junあるいはc-Fosなどを介してNFATc1による破骨細胞活性に至るルートも知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。

FasとRANKLシグナルのクロストーク

筆者らは以前にMRL/*lpr*マウスの関節炎がエストロジェンで抑制的に調節されていることを見出した²⁰⁾。卵巣摘出を施したMRL/*lpr*マウスの末梢T細胞ではRANKLの発現亢進が認められ、破骨細胞のRANKを介して骨破壊の亢進が観察された。Fas遺伝子変異を有するMRL/*lpr*マウスの末梢T細胞におけるRANKL発現亢進に関しては、FasシグナルがRANKLの発現を間接的あるいは直接的になんらかの機序によって調節していることが示されているが、T細胞におけるRANKLの発現機構はいまだ不明な点が多い。

一方で、筆者らはMRL/*lpr*マウスのリンパ節ではCD11b陽性CD11c陽性のミエロイド系のDCの細胞数が対照と比較して有意に増加していることに注目し、RANKLシグナルとFasとの関係を検討したところ、DCにおけるRANKLシグナルによってFas分子の細胞表面での発現が調節されていることが判明し、RANKLとFasのクロストークによってDCの維持機構が制御されていることが示された²¹⁾。対照マウスであるMRL+/+マウス由来の骨髄由来DCにRANKL刺激を加えて抗Fas抗体でアポトーシスを誘導すると、RANKLの濃度依存的にアポトーシス細胞の割合が増加することから(図3-A)、Fasを介したアポトーシスシグナルにRANKLシグナルがなんらかの相互作用をしていることが示唆された。また、RANKL刺激によりMRL/*lpr*マウス骨髄由来DCは対照マウス由来のDCと比較して、NF- κ Bの核内移行がより亢進していることが判明した(図3-B)。さらに、MRL/*lpr*マウスの骨髄由来DCにin vitroでコラーゲン抗原とRANKL刺激を加え、MRL/*lpr*マウスの皮下に細胞移入すると、MRL/*lpr*マウスの関節炎病変は著しく増悪することが観察され、Fas異常による自己免疫疾患の発症機序の一つにDCの活性化あるいはアポトーシス異常が大きく関係していることが示された²¹⁾。

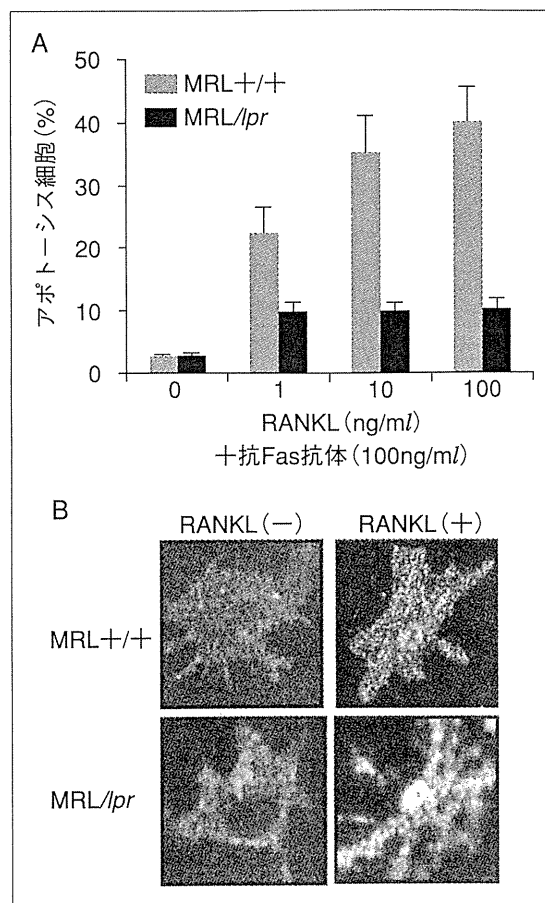


図3 DCにおけるFasとRANKLシグナルの関係
 A: MRL/*lpr*, MRL+/+マウスの骨髄細胞をGM-CSF (10ng/ml)とIL-4 (5 ng/ml)で7日間培養後、RANKL (0~100ng/ml)と抗Fas抗体(100ng/ml)で48時間刺激したときのアポトーシスをAnnexin-Vの発現で評価した。
 B: 骨髄由来DCにRANKLで刺激すると、NF- κ B (p50)の核内移行がMRL/*lpr* DCで亢進している。Alexa-488標識抗NF- κ B抗体を用いた蛍光染色法による。

DCにおけるFas/FasLによるアポトーシスとRANK/RANKLによる活性化という一見まったく関係のないシグナルカスケードが間接的あるいは直接的に相互作用することによって、DCの末梢での維持機構をうまく調節していることが明らかとなった。

おわりに

Fas分子の発見の恩恵は、従来、謎の多かった末梢免疫システムの維持機構をわかりやすく理解することが可能となったことであろう。MRL/*lpr*マウスを用いた研究を中心にFas分子を糸口にし

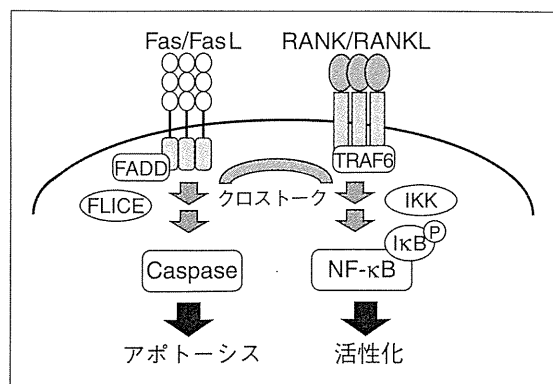


図4 DCにおけるFasとRANKLシグナルのクロストークを示す

て、さまざまな角度から自己免疫疾患の発症機序の解明を目指したアプローチがなされてきた。実際のヒトの免疫疾患である自己免疫性リンパ増殖症候群 (autoimmune lymphoproliferative syndrome ; ALPS) 患者では、Fas遺伝子の変異が高率に見出されており、Fasを介したアポトーシス異常が自己免疫疾患と大きく関連していることを示している²²⁾。しかし、MRL/*lpr*マウスにおける多彩な自己免疫疾患の病態の全容はまだまだ不明な部分が多く、今後の研究の進展が期待される。FasとRANKといういずれもTNFレセプターファミリーに属する受容体分子からの複雑なシグナルカスケード(図4)はそれぞれのシグナルが細胞の生死にきわめて重要な役割を果たしている一方で、まだ詳細な分子機序は明らかではないが、互いのシグナルがクロストークすることにより、シグナル伝達機構を調節している可能性が示された。今後、FasシグナルとRANKLシグナルとの分子相互作用の全容を解明することが、免疫システムの維持機構、免疫疾患の病態解明に結びつくものと考えられる。

文 献

- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995 ; 267 : 1449.
- Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 2000 ; 1 : 469.
- Niederhorn JY. See no evil, hear no evil, do no evil : the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 354.
- Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006 ; 213 : 66.
- Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003 ; 193 : 70.
- Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, et al. Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol* 1995 ; 59 : 279.
- Cohen PL, Eisenberg RA. The *lpr* and *gld* genes in systemic autoimmunity : life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 1992 ; 13 : 427.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995 ; 81 : 505.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologue ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996 ; 85 : 817.
- Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol* 2009 ; 5 : 667.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006 ; 203 : 2673.
- Lories RJ, Luyten FP. Osteoimmunology : Wnt antagonists : for better or worse? *Nat Rev Rheumatol* 2009 ; 5 : 420.
- Hansen KE. Osteoimmunology : prevalence of hypovitaminosis D and relationship to fracture. *Nat Rev Rheumatol* 2009 ; 5 : 417.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999 ; 397 : 315.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997 ; 186 : 2075.
- Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, et al. The cytokine

- RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* 2008 ; 29 : 438.
- 17) Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 837.
- 18) Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 2005 ; 208 : 126.
- 19) Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002 ; 3 : 889.
- 20) Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, et al. Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-mediated osteoclastogenesis. *Endocrinology* 2004 ; 145 : 2384.
- 21) Izawa T, Ishimaru N, Moriyama K, et al. Crosstalk between RANKL and Fas signaling in dendritic cells controls immune tolerance. *Blood* 2007 ; 110 : 242.
- 22) Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995 ; 81 : 935.

* * *

トピックス

II. 自己免疫疾患

5. Sjögren症候群

林 良夫 新垣理恵子 石丸 直澄

要 旨

Sjögren症候群はドライアイやドライマウスを臨床症状とする原因不明の自己免疫疾患である。病因的アプローチを加えるため疾患モデルを開発し、ヒトとも共通する自己抗原 120 kD α -フォドリンを同定した。局所に浸潤するCD4陽性T細胞の多くがFasLを発現し、標的細胞のFas抗原との間でアポトーシスが成立している。また、唾液腺にエストロゲン欠乏依存性にアポトーシスを誘導するRbAp48遺伝子を同定した。

〔日内会誌 100 : 1262~1268, 2011〕

Key words Sjögren症候群, 自己抗原, 疾患モデル

はじめに

Sjögren症候群は乾燥性角結膜炎によるドライアイや口腔乾燥症（ドライマウス）を臨床症状とすることの多い原因不明の自己免疫疾患であり、“乾燥症候群 (sicca syndrome)”とも呼ばれる¹⁾。自己免疫性唾液腺炎、自己免疫性涙腺炎の他に、気管支腺・汗腺・腺分泌腺など外分泌腺を標的臓器として発症し、その他の全身症状として、関節リウマチ (RA)・原発性胆汁性肝硬変 (PBC)・間質性肺炎・間質性腎炎などを腺外病変として随伴することが知られ、全身性自己免疫疾患であると同時に臓器特異的な表現型を強く発現する難治性疾患であると考えられる。また、稀にはあるがB細胞悪性リンパ腫へ移行することから自己免疫疾患と悪性腫瘍発生との

関連性の面からも重要な疾患である。Sjögren症候群の腎病変として最も頻度の高いのは間質性腎炎とされている他、メサンギウム増殖性腎炎、膜性腎炎、半月体形成性腎炎などが報告されている。

自己免疫疾患は一般に女性優位に発症するが、Sjögren症候群は中でも際立って女性の発症率が高い²⁾。臨床病態の特徴から唾液腺・涙腺などに限局して発症する原発性（一次性）Sjögren症候群と全身性エリテマトーゼス (SLE) やRAなど他の系統的自己免疫疾患に合併する二次性のものとに大別されているが、両者の境界については曖昧な点も多い。また、SLEやRAなどの膠原病患者に二次的ではあるが、唾液腺・涙腺がかなりの高頻度で標的臓器になりやすい理由についても不明であり、多くの疑問が残されたままである。

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野

Systemic diseases that cause chronic kidney disease: recent progress. Topics: II. Autoimmune disease: 5. Sjögren's syndrome. Yoshio Hayashi, Rieko Arakaki and Naozumi Ishimaru : Department of Oral Molecular Pathology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Japan.

1. 臨床病態と診断

Sjögren症候群患者はドライアイ(眼乾燥),ドライマウス(口腔乾燥症)という乾燥症状によって,眼が渇いて痛む,まばたきがしにくい,眼がコロコロする,口が乾いて息苦しい,ものが食べれない,うまく飲み込めない,といった摂食障害・嚥下障害などの症状で苦痛を訴える.さらに,口腔乾燥症が長期化することによって,舌乳頭の萎縮が進行し,口唇の萎縮や口角部のびらんも頻繁にみられる.また,口腔粘膜のびらんの進行により口腔内潰瘍が多発したり,潰瘍からの出血が持続し患者の苦痛はさらに激しくなる場合が多い.その他,唾液分泌の低下,唾液粘稠度の増加が進行し急激に多数の歯に齲蝕が発生する.一方,Sjögren症候群以外でドライアイ・ドライマウス症状をきたす要因としては,向神経薬などの薬剤性のもの,老人性腺萎縮の進行による加齢変化,ある種のウイルス感染,糖尿病などの代謝性疾患,各種のストレスによる心因性のものなどが考えられ,Sjögren症候群はドライアイ・ドライマウス症状を呈する患者のおよそ10%前後とされている.

Sjögren症候群は血清診断・眼科検査・口腔検査・病理検査などによって確定診断がなされる.臨床的な乾燥症状を裏付ける眼科検査(Schirmerテスト,ローズベンガルテスト)や口腔検査(ガムテストなど)や血清所見(SS-A,SS-B)から臨床的にSjögren症候群が疑われる場合,小唾液腺(口唇腺)生検が実施される.Sjögren症候群の確定診断にとって病理組織診断は極めて重要である.病理検査として一般に指標とされているのは口唇腺生検組織にみられる小葉内導管周囲のリンパ球浸潤である.Sjögren症候群の診断基準は各国で多少異なっているが,生検で導管周囲に50個以上の単核細胞浸潤が確認されれば病理学的陽性所見として1 focusとみなすことに

関しては共通している.欧米ではカリフォルニア基準(1986),ヨーロッパ基準(1993)とSjögren症候群の診断基準の改訂が進められ,我国でも1999年に厚生省新基準として改訂されている.さらに現在,NIH(National Institute of Health)を中心としてSjögren症候群の国際基準の策定作業が日米欧で実施されている.一方,臨床的に不定愁訴や鬱状態が先行し,内科や神経内科などで診断がつかないままSjögren症候群の確定診断が大幅に遅れる症例もかなりあることが指摘されている.

2. Sjögren症候群の腎病変

Sjögren症候群の腺外病変として,関節リウマチ(RA)・原発性胆汁性肝硬変(PBC)・間質性肺炎・間質性腎炎などが知られ,予後を左右する重要な因子である.Sjögren症候群患者の約30%に腎病変が出現し,中でも最も頻度の高いのは間質性腎炎とされている.その他,メサンギウム増殖性腎炎,膜性腎炎,半月体形成性腎炎などが報告されている.生検が施行された間質性腎炎組織の検索より,浸潤細胞の大半はCD4陽性T細胞であり,ごくわずかのB細胞の浸潤を伴っていた.この所見はSjögren症候群唾液腺組織の免疫染色所見と類似していた.さらに,腎生検を用いたT細胞レセプター(TCR)のレパトア解析から比較的限られたクローンの存在が確認されており,腎間質への浸潤T細胞の認識する抗原エピトープが限定されていることが示唆されている³⁾.また,尿細管上皮に正常ではみられない副刺激分子CD86分子の発現が認められており,間質性腎炎を呈する尿細管上皮細胞では局所で抗原提示能を示すことによって浸潤T細胞を活性化している可能性が推察されている.一般に,抗原特異的にT細胞が活性化されるためにはTCRを介した第1シグナルと副刺激分子を介した第2シグナルとが不可欠であることから,

トピックス

Sjögren症候群における間質性腎炎で組織破壊を担う浸潤T細胞は未知の自己抗原を認識していると考えられるが、この際、唾液腺と共通する認識抗原であるか否かは現在まで結論が得られていない。

3. 疾患モデルの確立

原因不明の自己免疫疾患に対し、病因的アプローチを加えるためには好適な疾患モデルの開発が不可欠である。非自己免疫系統マウスを用いて生後3日目に胸腺摘除を施すこと(3d-Tx)により様々な臓器に臓器特異的自己免疫疾患が誘導されるモデルは3d-Tx autoimmunityとしてよく知られていた。筆者らは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントNFS/sldマウスを用いて生後3日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより、唾液腺・涙腺のみに限局した自己免疫病変が発症することを見出し、原発性Sjögren症候群の疾患モデルとして報告した⁴⁾。本モデルマウスに認められる自己免疫病変は、4週目から唾液腺・涙腺の導管周囲への単核球浸潤として発症し、経時的に腺組織の破壊を伴って増強していく。発症はいずれの時期も雌優位に認められ、マウス血清中には唾液腺導管上皮に特異的に反応する自己抗体の出現を伴っていた。本モデルマウスを用いた病態解析により唾液腺・涙腺の組織破壊に関与する浸潤細胞はCD4陽性T細胞が主体であり、T細胞レセプター(TCR) V β 鎖レパトアはV β 8及びV β 6優位であることを明らかにした。また、唾液腺局所においてIL(interleukin)-1 β 、IFN- γ (interferon- γ)、IL-6、IL-10などのサイトカイン産生異常がみられた。以上の結果から、本モデルマウスにおける自己免疫病変は未知の自己抗原を特異的に認識する自己反応性T細胞が活性化されることによって発症している可能性が強く示唆され、臓器特異的自己抗原の解明が急がれた。筆者らは疾患モデル

の確立後、発症マウス血清中に認められた自己抗体に対応する唾液腺特異的自己抗原の精製を試み、モデルマウス唾液腺組織から120kD α -フォドリン蛋白を同定した⁵⁾。マウス全身諸臓器ホモジネートと発症マウス血清を用いたウエスタンブロット解析の結果、唾液腺組織のみに約120kDの位置に特異的の反応が認められ、ゲル濾過・イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることにより得られた120kDの部分精製標品のアミノ酸解析からヒト α -フォドリンのN末の20残基と判明した。マウス血清は特異的に α -フォドリンリコンビナント蛋白と反応し、脾細胞も病変の進行に伴って特異的な増殖反応を示した。従って、120kD α -フォドリンはモデルマウスにおける自己免疫病変の発症に密接に関連した臓器特異的自己抗原であることが示唆された。さらに、SLEやRAなど他の自己免疫疾患患者、及び健常者では反応性を認めなかったが、原発性Sjögren患者血清では極めて高率に精製抗原およびリコンビナント蛋白と反応することが判明した(図1)。また、患者末梢血から分離した単核細胞はリコンビナント蛋白に特異的に増殖反応を示すことも明らかとなった。従って、120kD α -フォドリンはモデルマウスのみならずヒトSjögren症候群とも共通する自己抗原であることが明らかになった。

4. 病因とアポトーシス

自己抗原 α -フォドリンが生体内でどのようなメカニズムで形成されるのかについて検討を加えた。 α -フォドリンはアポトーシスに伴って分断化を受けることは既に報告があり、Sjögren症候群の発症とアポトーシスとの関連性について解析を加えた。 α -フォドリンは分子量240kDの膜骨格蛋白としてユビキタスに存在し、カルモデュリン、アクチンなどとの結合部位を有していること、また、ある種のシステインプロテ

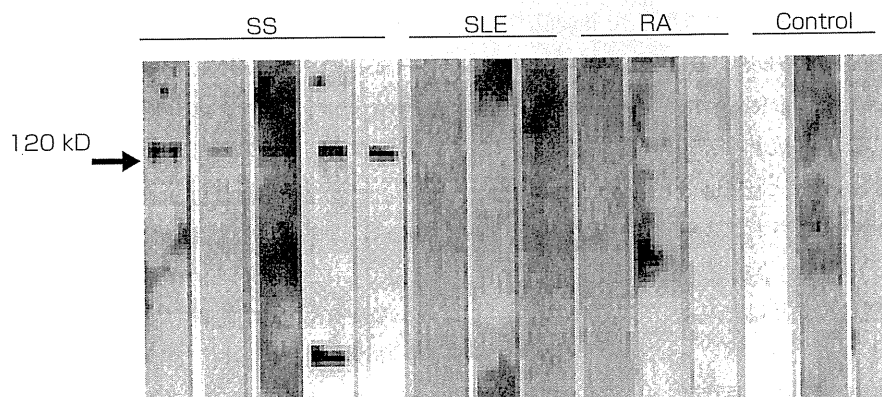


図1. Sjögren症候群 (SS) 患者血清では 120 kD α -フォドリン蛋白と反応するバンドが検出されるが, SLE患者, RA (関節リウマチ) 患者及び健常者血清ではバンドはみられない (ウエスタンブロット法).

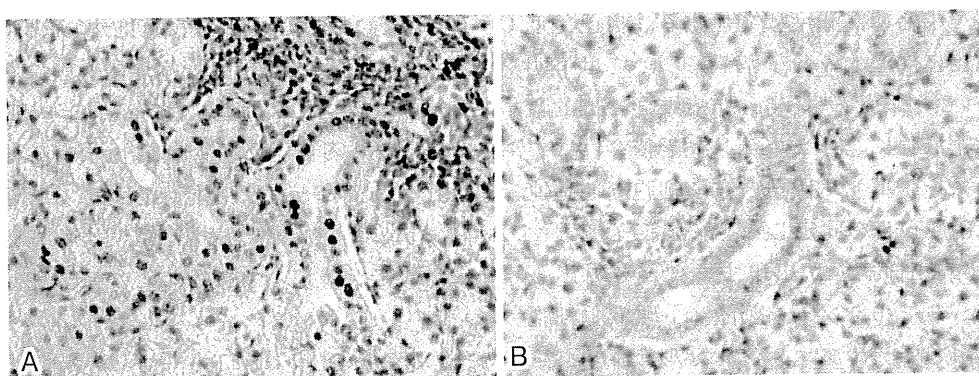


図2. Sjögren症候群疾患モデル唾液腺 (A) では対照マウス唾液腺 (B) と比較し, 導管上皮や浸潤細胞に多くのアポトーシスが認められる (TUNEL染色).

アーゼの基質蛋白の一種であることが知られている。局所の組織破壊に関与するCD4陽性T細胞の多くがFasLを発現し, 標的細胞のFas抗原との間でアポトーシスが成立している。マウス唾液腺局所ではTUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 陽性アポトーシス細胞が早期から検出された (図2)。初代培養唾液腺細胞をanti-Fas抗体で刺激すると経時的にアポトーシスが誘導され, 正常の240 kD α -フォドリンがアポトーシスの亢進に伴って120 kDに分断化される。さらに, *in vitro*で活性化されたCD4陽性T細胞が唾

液腺上皮細胞に対して細胞障害能を有していることが判明した。即ち, 自己抗原によって活性化されたCD4陽性T細胞が唾液腺上皮細胞に対してFas/FasL経路を介した組織障害活性を有している可能性が実験的に明らかにされた⁶⁾。アポトーシスが自己免疫疾患のみならず移植片対宿主病, Alzheimer病, 免疫不全症など主に免疫系を中心とした多様な疾患に関わっていることが明らかにされている。アポトーシスが関わる自己免疫疾患は, 特に免疫を司るT細胞とその周辺の細胞群との関連性で説明されている。一般に, 自己

トピックス

免疫疾患患者の血中には抗核抗体をはじめとする様々な自己抗体が出現することが知られている。SLEやRAにおけるRNAポリメラーゼなどの核蛋白に対する自己抗体、Sjögren症候群患者におけるSS-AやSS-Bなどの抗RNP抗体などが代表的な診断マーカーとされているが、疾患特異的な自己抗体は少なく、臓器固有の自己抗原蛋白が明らかにされたことは無い。

5. RbAp48 遺伝子の同定

一般に自己免疫疾患の発症には女性優位の性差がみられるが、Sjögren症候群は最も女性優位の自己免疫疾患であり(95%以上)²⁾、閉経期前後の女性を中心に高頻度に発症する。自己免疫疾患の性差に関連する分子基盤については不明な点が多いが、筆者らはSjögren症候群の標的臓器である唾液腺にエストロゲン欠乏依存性にアポトーシスを誘導する因子として細胞周期関連タンパクRbAp48を同定し⁷⁾、その遺伝子導入マウスにSjögren様病態が出現することを見出した⁸⁾。即ち、タモキシフェン刺激ヒト唾液腺細胞(HSG)を用いてディファレンシャルディスプレイ法によるサブトラクションを行い、得られた遺伝子の中からエストロゲン欠乏によって発現する因子の一つとしてRbAp48を見出した。ヒトおよびマウスの種々の培養細胞株にRbAp48遺伝子導入を行い検討した結果、ヒトおよびマウス唾液腺細胞のみでアポトーシスが確認された。さらに、細胞周期関連タンパクとしてリン酸化Rb, E2F, cyclin D3, p14ARF, アポトーシス関連蛋白としてBax, Bad, p53, cytochrome cなどの活性化が認められた。また、 α -フオドリンがアポトーシスに伴って120 kDに分断化されることも判明した。*in vivo*におけるRbAp48遺伝子の機能を明らかにするために、唾液腺特異的プロモーター遺伝子parotid secretory protein (PSP)を用いたベクターにRbAp48遺伝子を挿

入し、トランスジェニック(TG)マウスの作成を試みた。TGマウスでは唾液腺・涙腺におけるRbAp48タンパクの過剰発現とともにTUNEL陽性アポトーシス細胞は早期から検出された。リンパ球浸潤などの炎症性病変は24週以降50週齢にかけて唾液腺・涙腺に局限して出現した。TGマウスでは明らかな唾液・涙液分泌障害が認められ、マウス血清中にはSS-A, SS-B, α -フオドリンに対する自己抗体が認められた。本TGマウスの病態解析により組織破壊に関与する浸潤細胞の多くはCD4陽性T細胞であり、発症はいずれの時期も雌優位に認められた。TGマウスの脾臓T細胞を抗TCR抗体および抗CD28抗体で刺激するとTh1型サイトカイン(IL-2, IFN- γ)産生が誘導された。以上の所見からRbAp48-TGマウスにおける自己免疫病変は性差に関連したアポトーシスにより形成される自己抗原を特異的に認識する自己反応性T細胞が末梢において活性化されることにより発症していることが示され、Sjögren症候群の病因を解明するうえで有用な新規モデルになり得ることが確認された。

6. アリルハイドロカーボン受容体(AhR)とT_H17細胞

T_H17細胞は従来知られていたIFN- γ やIL-2などのサイトカインを分泌するT_H1細胞とIL-4やIL-10などを分泌するT_H2細胞とは異なるT細胞サブセットとして同定され、自己免疫疾患の病態発症に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。最近、ヘルパーT(T_H)細胞の中でT_H17細胞への分化をダイオキシンのレセプターであるaryl hydrocarbon receptor (AhR)を介したシグナルが調節することが判明した⁹⁾。ダイオキシンと結合して活性化したAhRはAhR nuclear translocator (ARNT)とヘテロダイマーを形成し、核内に移行した後、様々な遺伝子上に存在するdioxin responsive element (DRE)として知

られる xenobiotic response element (XRE) に結合することによりその遺伝子の転写が調節される。AhR複合体の標的遺伝子として cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) がよく知られている。CYP1A1 は増殖・アポトーシスなどの細胞の生死を中心に重要な役割を果たしている。ダイオキシンの刺激で活性化された AhR を介して調節性 T 細胞 (Treg) において最も重要とされる転写因子 Foxp3 の発現が亢進され、Treg 細胞の細胞数が増加することが判明した。さらに、EAE マウスにダイオキシンを投与することにより Treg 細胞の増加を介する病態の抑制効果があることを見出した。しかし、AhR の内因性リガンドの一つである 6-formylindolo [3,2-b] carbazole (FICZ) を EAE モデルマウスに投与すると病態は増悪した。FICZ は T 細胞の IL-22 および IL-17 の産生を上昇させることにより、EAE の病態形成に極めて重要な T_H17 細胞の分化を促進させていることが明らかとなった。筆者らの成績では新生児期に低濃度ダイオキシンを投与されたマウスで 2 カ月齢において胸腺の臓器重量が対照群に比較して有意に減少し、唾液腺には 2 カ月齢より Sjögren 様病変に類似した炎症性病変が観察された¹⁰⁾。新生仔期にダイオキシんに暴露されることにより胸腺内 T 細胞の分化や成熟に異常が発生し、自己、非自己を区別する中枢性免疫寛容システムが破綻することにより、自己免疫疾患が発症したものと想定される。このことはヒトの新生児期や若齢期にダイオキシスが仮に暴露されたとすると、将来的に自己免疫疾患の発症リスクが上昇してしまう可能性を示唆している。低濃度のダイオキシン暴露により晩発性の影響 (low dose late effect) が既に知られており、幼少期にダイオキシんに低濃度で暴露される環境にあれば、自己免疫疾患の好発年齢で発症するリスクは高くなるのかも知れない。

おわりに

生体内では健常人でも自己抗原を認識する抗体が産生され、自己に対するリンパ球も存在することが知られている。しかし、通常の状態においては生体防御機構により自己免疫疾患の発症に至ることは無い。自己免疫応答を抑制するメカニズムが機能していることが推測されているが、トレランスの維持とその破綻機構の解明は今後の大きな課題である。自己免疫疾患の多くは原因不明の難病とされ、疾患非特異的な診断・治療法で対処しているのが世界の現状である。自己免疫疾患のなかでも女性優位に発症する Sjögren 症候群について性差の分子機構に関する実験的アプローチが加えられ、Rb 関連タンパク RbAp48 の過剰発現が明らかにされた^{7,8)}。また、AhR を起点とした分子シグナルの複雑さを考慮すると、ダイオキシンによる自己免疫疾患の発症に及ぼす影響には、病態に関与する免疫細胞及び標的細胞などへの AhR を介した分子機序に内在性 AhR リガンド、さらにホルモンとの相互作用など様々な因子を考慮する必要がある。免疫系における内在性リガンドによる AhR シグナルの分子メカニズムの解明は自己免疫疾患の病因解明にとって重大な課題であると思われる。

著者の COI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) 林 良夫, 他: シェーグレン症候群発症の分子機構. 臨床免疫 40: 196-204, 2003.
- 2) Whitacre CC: Sex differences in autoimmune disease. Nat Immunol 2: 777-780, 2001.
- 3) Murata H, et al: Limited TCR receptor of infiltrating T cells in the kidneys of Sjögren's syndrome patients with interstitial nephritis. J Immunol 155: 4084-4089, 1995.
- 4) Haneji N, et al: A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS/sld mutant mice. J Immunol 153: 2769-2777, 1994.

トピックス

- 5) Haneji N, et al : Identification of α -fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* 276 : 604-607, 1997.
- 6) Saegusa K, et al : Prevention and induction of autoimmune exocrinopathy is dependent on pathogenic autoantigen cleavage in murine Sjögren's syndrome. *J Immunol* 169 : 1050-1057, 2002.
- 7) Ishimaru N, et al : Novel role of RbAp48 for tissue-specific estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands. *Mol Cell Biol* 26 : 2924-2935, 2006.
- 8) Ishimaru N, et al : Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Exp Med* 205 : 2915-2927, 2008.
- 9) Veldhoen M, et al : The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453 : 106-109, 2008.
- 10) Ishimaru N, et al : Neonatal exposure to low dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol* 182 : 6576-6586, 2009.

GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination

Ryoji Fujiki¹, Waka Hashiba¹, Hiroki Sekine¹, Atsushi Yokoyama¹, Toshihiro Chikanishi¹, Saya Ito¹, Yuuki Imai¹, Jaehoon Kim², Housheng Hansen He³, Katsuhide Igarashi⁴, Jun Kanno⁴, Fumiaki Ohtake¹, Hirochika Kitagawa¹, Robert G. Roeder², Myles Brown³ & Shigeaki Kato^{1,5}

Chromatin reorganization is governed by multiple post-translational modifications of chromosomal proteins and DNA^{1,2}. These histone modifications are reversible, dynamic events that can regulate DNA-driven cellular processes^{3,4}. However, the molecular mechanisms that coordinate histone modification patterns remain largely unknown. In metazoans, reversible protein modification by *O*-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) is catalysed by two enzymes, *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA)^{5,6}. However, the significance of GlcNAcylation in chromatin reorganization remains elusive. Here we report that histone H2B is GlcNAcylated at residue S112 by OGT *in vitro* and in living cells. Histone GlcNAcylation fluctuates in response to extracellular glucose through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP)^{5,6}. H2B S112 GlcNAcylation promotes K120 monoubiquitination, in which the GlcNAc moiety can serve as an anchor for a histone H2B ubiquitin ligase. H2B S112 GlcNAc was localized to euchromatic areas on fly polytene chromosomes. In a genome-wide analysis, H2B S112 GlcNAcylation sites were observed widely distributed over chromosomes including transcribed gene loci, with some sites co-localizing with H2B K120 monoubiquitination. These findings suggest that H2B S112 GlcNAcylation is a histone modification that facilitates H2BK120 monoubiquitination, presumably for transcriptional activation.

Some nuclear proteins have been shown to be GlcNAcylated by OGT, for example the enzymatic activity of histone H3K4 methyltransferase 5 (MLL5) is modulated by GlcNAcylation^{7–9}. To identify chromatin substrates for OGT further, we screened for unknown GlcNAcylated glycoproteins in HeLa cell chromatin. GlcNAcylated proteins were purified by WGA lectin column chromatography and anti-GlcNAc antibody (clone RL2). Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)/MS analysis of the fraction revealed 284 factors, including previously reported GlcNAcylated glycoproteins^{6,10} (Supplementary Table 1). Among the candidates, the enrichment of nucleosomes was confirmed by silver staining and western blotting (Supplementary Fig. 2), suggesting one or more histone(s) might have been GlcNAcylated. As OGT is the only known nuclear enzyme for protein GlcNAcylation⁵, we asked whether histones served as substrates for OGT *in vitro* (Supplementary Fig. 3). H2A and H2B, as well as H2A variants (H2A.X and H2A.Z), but not H3 and H4, appeared to be GlcNAcylated (Fig. 1a). With histone octamers, H2B, but not H2A, appeared to serve as a substrate (Fig. 1b). Likewise, H2B in *Drosophila* histone was also GlcNAcylated (Supplementary Fig. 4), implying that H2B GlcNAcylation is conserved in metazoans.

A quadrupole (Q)-time of flight (TOF) MS assessment of the *in vitro* GlcNAcylated H2B showed that OGT could transfer three GlcNAc moieties to H2B (Supplementary Fig. 5). Electro-transfer-dissociation (ETD)–MS/MS mapped the sites to S91, S112 and S123 (Fig. 1c and Supplementary Fig. 6). Unlike a recent report¹¹, we were unable to

detect the reported sites in H2B S36 and H4 S47. However, H2A T101 was detected as a GlcNAc site when H2A protein alone was used (data not shown). This discrepancy in identified GlcNAc sites might be due to differences in experimental approaches.

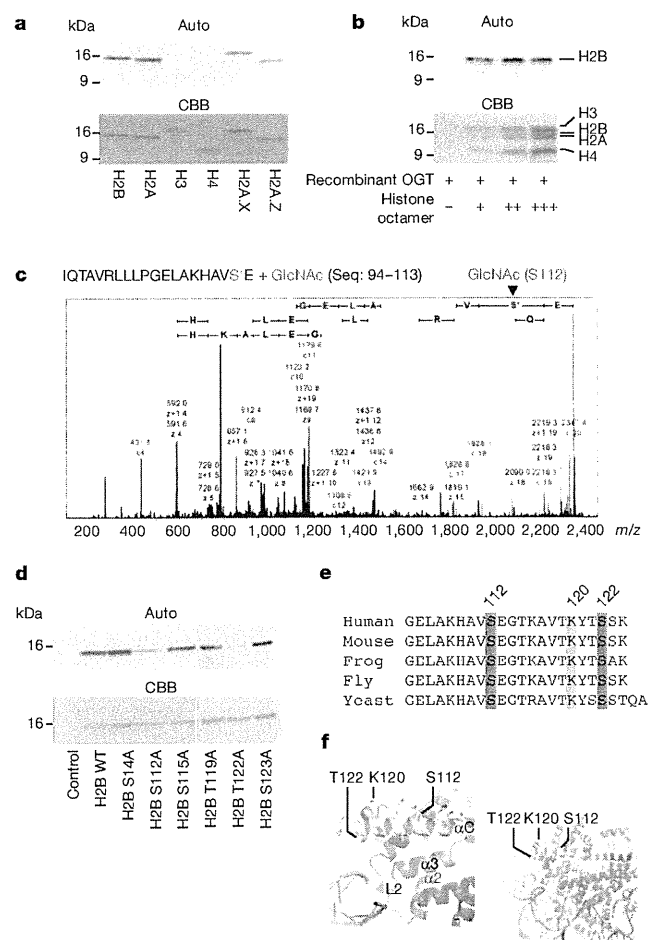


Figure 1 | H2B is GlcNAcylated at the C-terminal S112. **a, b**, *In vitro* OGT assay with recombinant histones (**a**) or the octamers reconstituted *in vitro* (**b**). Histones were GlcNAcylated by uridine diphosphate (UDP)-[³H]GlcNAc and OGT, and the radiolabelled histones were subjected to autoradiography (top) and CBB staining (bottom). **c**, ETD–MS/MS scanned the GlcNAcylated peptides (2349.43 *m/z*) in Supplementary Fig. 5b. **d**, A series of H2B mutants at the indicated S/T was assessed by *in vitro* OGT assays. **e**, Sequence alignment of αC. **f**, The locations of the GlcNAc sites and the ubiquitination site of H2B in a nucleosome. The αC helix is illustrated as a white ribbon.

¹Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan. ²Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, The Rockefeller University, New York, New York 10065, USA. ³Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁴Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. ⁵ERATO, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan.

Next, *in vitro* OGT assays using peptide arrays covering full-length H2B revealed peaks at 101–115 peptides in the carboxy (C)-terminal α -helix (α C)¹² (Supplementary Fig. 7). This peptide was found to bear only one moiety by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI-TOF)/MS (Supplementary Fig. 8). Indeed, substitutions of S112 and T122 to A significantly reduced *in vitro* GlcNAcylation by OGT (Fig. 1d), but not mutations in the amino (N)-terminal tail (Supplementary Fig. 9). On the basis of these data, we concluded that the conserved S112 was a GlcNAc site in H2B, whereas T122 might be needed for recognition by OGT (Fig. 1e, f).

With our newly developed antibody (Supplementary Fig. 10), H2B S112 GlcNAc was detected in histones of HeLa cells. Depletion of glucose from the media for 24 h induced deglycosylation with neither overt cell death (Fig. 2a and Supplementary Fig. 11) nor alteration in histone acetylation marks of cell state indicators (H3 K14, H3 K56, H4 K16)^{13,14} (Supplementary Fig. 12). H2B S112 GlcNAc could be restored by re-treatment with glucose at physiological concentrations (Supplementary Fig. 13).

Because many histone modifications are orchestrated, we tested if H2B S112 GlcNAc influenced H2B K120 monoubiquitination because

of their proximity. After glucose depletion, replenishment of glucose gradually increased global GlcNAcylation of proteins, followed by H2B S112 GlcNAc and H2B monoubiquitination (Fig. 2b, c). Their reciprocal modifications disappeared when OGT was knocked down (Fig. 2d and Supplementary Fig. 14). In addition, in the immunoprecipitates of H2B containing the S112A and T122A double mutations (H2B AA), no response of K120 monoubiquitination to extracellular glucose was detected (Fig. 2e and Supplementary Fig. 15). Conversely, GlcNAcylation of H2B S112 was observed, even when K120 was mutated to R (Fig. 2e). From these findings, we conclude that H2B K120 monoubiquitination is mediated, at least in part, through S112 GlcNAcylation.

As glucosamine, but not pyruvate, potentiated H2B S112 GlcNAc (Fig. 2f), it appeared that this GlcNAcylation step was dependent on the HBP. To clarify this point, two HBP inhibitors (DON and AZA) were tested (Supplementary Information). After glucose depletion from media, these inhibitors attenuated the effect of glucose in H2B S112 GlcNAcylation along with K120 monoubiquitination (Fig. 2f).

In yeast, it was previously shown that H2B K120 monoubiquitination was induced by carbohydrates by glycolysis¹⁵. To address this issue, inhibitors of both glycolysis and deGlcNAcylation were applied to assess the crosstalk between the two modifications. When the cells were treated with iodoacetate, which blocks glycolysis but not HBP¹⁵, the glucose effects on histone modifications were impaired, whereas the additional treatment of an OGA inhibitor (PUGNAc) restored both H2B S112 and K120 monoubiquitination (Supplementary Fig. 16). These data support the notion that H2B S112 GlcNAc senses decreases in glucose levels below normal levels and acts to promote H2B monoubiquitination, a modification that is associated with active transcription. Together with the fact that OGT is absent in yeast⁶, the present H2B S112 GlcNAc-dependent pathway appears to constitute a system capable of sensing nutritional states in metazoans.

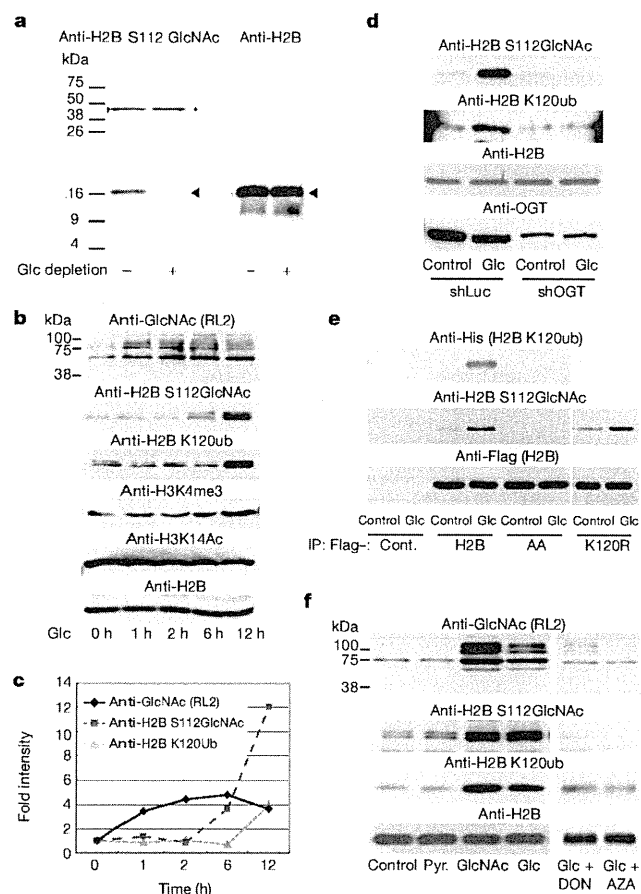


Figure 2 | H2B S112 GlcNAc is a glucose-responsive modification linked to K120 monoubiquitination (ub). a, Chromatin was prepared from HeLa cells cultured in media with or without 1 g l⁻¹ glucose (Glc) for 24 h, and subjected to western blotting. Arrowheads show the indicated proteins. Asterisks indicate non-specific bands. b, c, After 24 h Glc depletion, chromatin samples were prepared from HeLa cells treated with 4.5 g l⁻¹ Glc for the indicated time. The intensities of the western blotting bands (b) were quantified (c). d, e, The effects of OGT knockdown (d) or H2B mutations (e) on H2B modifications after Glc replenishment. f, Western blotting analysis of the H2B modifications in HeLa cells that were cultured in DMEM without Glc (Cont.), or supplemented with 1 mM pyruvate (Pyr.), 10 mM GlcNAc or 4.5 g l⁻¹ Glc with or without HBP inhibitors, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (100 μ M, DON) or azaserine (100 μ M, AZA).

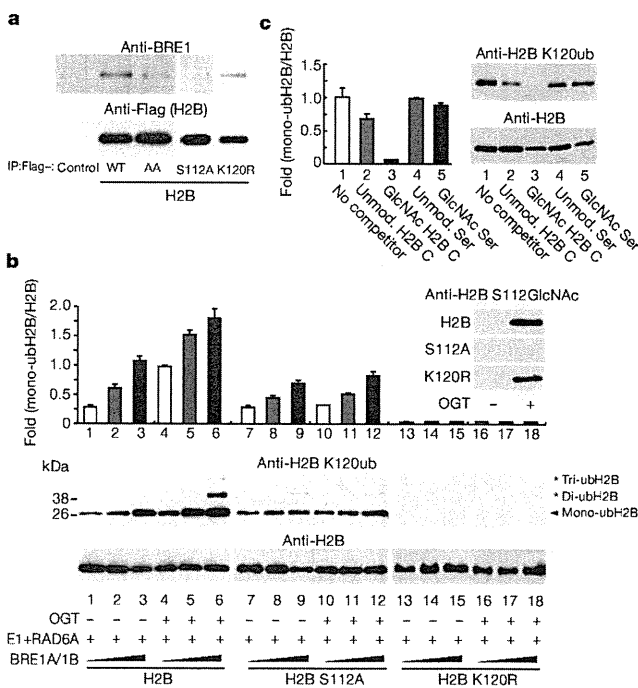


Figure 3 | GlcNAcylation at S112 facilitates ubiquitination at K120 in H2B. a, Western blotting analysis of the interaction of H2B mutants with BRE1A. b, c, *In vitro* monoubiquitination assay with GlcNAcylated H2B (b), or in the presence of competitor peptides (c). H2B was GlcNAcylated *in vitro* (b, top right), and the reactants were subsequently ubiquitinated by H2B monoubiquitination ligase. The reaction was performed with the indicated competitor peptides (0.25 μ g ml⁻¹) (c). H2B K120 monoubiquitination was detected by western blotting (b, bottom; c, right) and quantified (b, top; c, left). Error bars, means and s.d. (n = 3).

The terminal GlcNAc of polysaccharides reportedly serves as a recognition moiety for E3 monoubiquitination ligase¹⁶. Therefore, we proposed that H2B S112 GlcNAc affected K120 monoubiquitination by the BRE1A/1B complex¹⁷. Flag-tagged H2B, but not AA or S112A, was co-immunoprecipitated with BRE1A (Fig. 3a). This association was observed in the presence of physiological levels of glucose in the media, and BRE1A was bound to H2B S112 GlcNAc (Supplementary Fig. 17). We then assessed how the GlcNAcylation of H2B influenced its *in vitro* ubiquitination by E1, RAD6A (E2) and the BRE1A/1B complex (E3). Although H2B K120 could be substantially ubiquitinated only by the ligases (Supplementary Fig. 18), GlcNAcylation of H2B promoted subsequent H2B ubiquitination, but not its S112A mutant (Fig. 3b). Likewise, ubiquitination was significantly attenuated by the presence of an H2B-S112-GlcNAcylated peptide, but not by either the unmodified control peptide or by GlcNAcylated serine (Fig. 3c). On the basis of these results, we conclude that the GlcNAc moiety at H2B S112 may anchor H2B monoubiquitination ligase.

To illustrate the role of H2B S112 GlcNAc in chromatin regulation, its location was visualized on fly polytene chromosomes. H2B S112 GlcNAc was detected widely in euchromatin, and, as anticipated, its signal disappeared in an OGT-disrupted fly, *sxc¹/sxc⁷⁸* (Supplementary Fig. 19). H2B S112 GlcNAc overlapped with H3K4 me2 more than with H3K9 me2 or H3K27 me3 (Fig. 4a). Similarly, in immunostained HeLa cells, H2B S112 GlcNAc sites appeared exclusively in 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-poor areas (Supplementary Fig. 20).

Thus, H2B S112 GlcNAc probably accumulates in active chromatin rather than inactive chromatin.

To determine the precise loci of H2B S112 GlcNAc in HeLa cells, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) and high-throughput sequencing (ChIP-seq). We confirmed ChIP quality by enrichments of H2B GlcNAc as well as H3K4 me2 and H2B K120 monoubiquitination, but neither H3K9 me2 nor H3K27 me3 (Supplementary Fig. 21). A total of 47,375 peaks were found widely distributed over the genome (Supplementary Fig. 22). However, H2B S112 GlcNAc peaked near transcription start sites (TSS), whereas the distribution decreased at transcription termination sites (TTS) (Fig. 4b), suggesting that it correlated with transcriptional regulation. To test this assumption, the activities of genes harbouring H2B S112 GlcNAc near TSS were estimated by microarray analysis (Supplementary Table 2). The average profiles near TSS significantly correlated with gene activity (Fig. 4c). Moreover, the expression levels of the 1,299 genes were reliably measured, and 1,021 genes showed high expression (Supplementary Fig. 23a and Supplementary Table 3b). Moreover, gene ontology analysis revealed that there was an association of the genes harbouring H2B S112 GlcNAc to cellular metabolic processes (Supplementary Fig. 23b and Supplementary Table 3c).

Next, we analysed the genome-wide overlap of H2B S112 GlcNAc with K120 monoubiquitination. A total of 44,158 peaks of H2B K120 monoubiquitination were detected, and their average profiles near TSS were similar to those profiles of H2B S112 GlcNAc (Supplementary

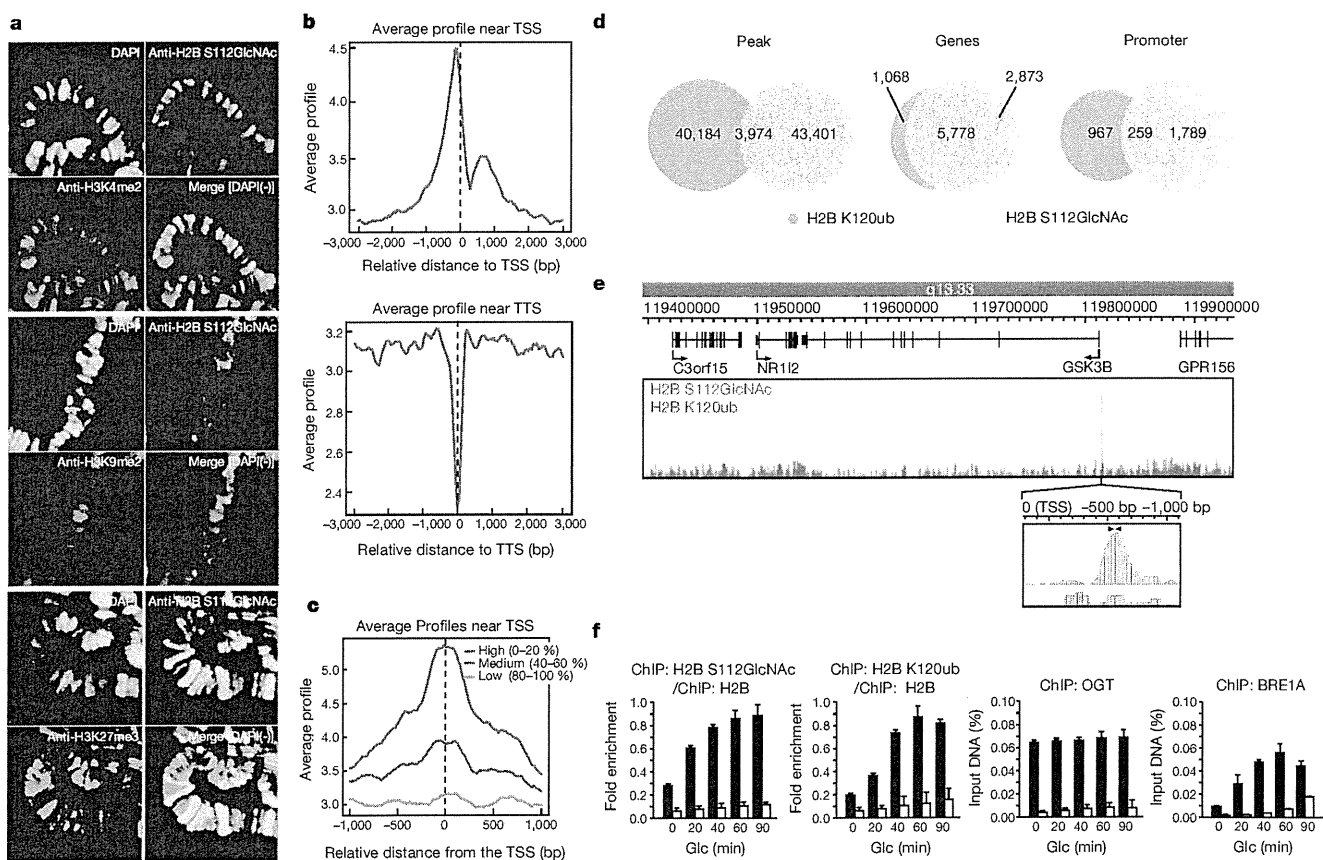


Figure 4 | GlcNAcylated H2B is associated with transcribed genes.

a, Polytene staining with α -H2B S112 GlcNAc (green) and DAPI (blue) along with α -H3K4me2 (red, top), α -H3K9me2 (red, middle) or α -H3K27me3 (red, bottom). b–e, ChIP-seq analysis of the H2B S112 GlcNAc and K120 monoubiquitination. The distributions of H2B S112 GlcNAc were averaged near TSS (top) and TTS (bottom) (b). The average profiles of H2B S112 GlcNAc near TSS were calculated based on the associated gene activities (c). Venn diagrams

showing overlap of the peaks (d, left), and the genes (d, middle) and the promoter (d, right) harbouring the modifications. The ChIP-seq profile surrounding the *GSK3B* gene (e). An arrowhead, position of qPCR primer. f, ChIP-qPCR validation in the *GSK3B* promoter. After Glc depletion, the control HeLa cells (black bar) and the OGT-knockdown cells (white bar) were replenished with Glc for 24 h. Then, the cells were subjected to ChIP with the indicated antibody and qPCR analysis. Error bars, means and s.d. ($n = 3$).

Fig. 24). Among the H2B K120 monoubiquitination peaks, nearly 10% (3,974 peaks) overlapped with H2B S112 GlcNAc peaks (Fig. 4d, left), and this evaluation was confirmed by a sequential ChIP–reChIP assay (Supplementary Fig. 25). Although 5,778 genes (66.8% of H2B S112 GlcNAc and 84.4% of K120 monoubiquitination) were found at the same loci (Fig. 4d, middle, and Supplementary Table 3d), 259 genes were identified when the two peaks were compared only within the promoters (Fig. 4d, right). The results of the ChIP–seq analysis were validated by ChIP–quantitative PCR (qPCR) assessment for the glycogen synthase kinase 3 β (*GSK3B*) gene (Fig. 4e, f). These findings suggest that at several H2B S112 GlcNAc sites, it aids H2B monoubiquitination ligase recruitment whereas at others additional or different factors may be operational.

Here we provide evidence that histone GlcNAcylation is a post-translational modification correlated with active transcriptional events, and is responsive to serum glucose levels and/or cellular energy states in certain cell types (Supplementary Fig. 1). Using an antibody that specifically recognizes the S112 GlcNAc moiety of endogenous H2B, H2B was shown to serve as an OGT substrate. We have focused on the role of H2B S112 GlcNAcylation in gene regulation (Supplementary Fig. 1). Genome-wide analysis revealed that H2B S112 GlcNAc was frequently located near transcribed genes, suggesting that histone GlcNAcylation facilitates transcription of the genes. This idea is supported by previous reports that transcriptional output driven by several transcription factors is co-activated by OGT^{9,18–20}. However, recent papers reported that *Drosophila* OGT is itself a polycomb group protein^{8,21}, and that many O-GlcNAcylated factors are involved in transcriptional repression and gene silencing^{7,8}. In this respect, it will be interesting to identify other histone glycosylation sites and investigate their roles in transcriptional repression as well as activation.

METHODS SUMMARY

Plasmids and cell culture. All plasmids were generated with standard protocols (see Methods). Retrovirus production, infection and sorting of the infected cells followed previously reported protocols⁵.

Purification of GlcNAc proteins from chromatin. Chromatin pellets were prepared from HeLa cells as previously described²². GlcNAc proteins were enriched with α -O-GlcNAc (RL2) antibody (Abcam) immobilized on Dynabeads (Invitrogen), and released with GlcNAc-O-serine.

Generation of monoclonal antibody. The synthetic H2B S112 GlcNAc peptide (CKHAV S(GlcNAc) EGTK) was used to immunize mice. The hybridomas were selected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blotting analysis.

In vitro OGT and monoubiquitination assays. Flag-OGT, Flag-E1, and Flag-BRE1A/BRE1B were purified by baculoviral systems, whereas histones and 6 \times His-RAD6A were prepared from bacteria as previously reported^{17,23}. H2B was incubated with OGT or H2B monoubiquitination ligases *in vitro*, and its modification was detected by western blotting as previously reported^{19,23}.

ChIP-seq and ChIP-qPCR. ChIP and ChIP-seq library construction was performed as previously described^{24,25}, and the libraries were sequenced to 50 base pairs (bp) with HiSeq2000 (Illumina). The fragments of interest in the libraries were quantified with specific promoter sets (Methods) by qPCR.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 16 July 2010; accepted 20 October 2011.

Published online 27 November 2011.

1. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).

2. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
3. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).
4. Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407–412 (2007).
5. Hart, G. W., Housley, M. P. & Slawson, C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446**, 1017–1022 (2007).
6. Love, D. C. & Hanover, J. A. The hexosamine signaling pathway: deciphering the 'O-GlcNAc code'. *Sci. STKE* **2005**, re13 (2005).
7. Yang, X., Zhang, F. & Kudlow, J. E. Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* **110**, 69–80 (2002).
8. Gambetta, M. C., Oktaba, K. & Muller, J. Essential role of the glycosyltransferase *sxc/Ogt* in polycomb repression. *Science* **325**, 93–96 (2009).
9. Fujiki, R. *et al.* GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* **459**, 455–459 (2009).
10. Wang, Z. *et al.* Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci. Signal.* **3**, ra2 (2010).
11. Sakabe, K., Wang, Z. & Hart, G. W. β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 19915–19920 (2010).
12. Luger, K. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
13. Das, C., Lucia, M. S., Hansen, K. C. & Tyler, J. K. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**, 113–117 (2009).
14. Dang, W. *et al.* Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* **459**, 802–807 (2009).
15. Dong, L. & Xu, C. W. Carbohydrates induce mono-ubiquitination of H2B in yeast. *J. Biol. Chem.* **279**, 1577–1580 (2004).
16. Yoshida, Y. *et al.* E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **418**, 438–442 (2002).
17. Kim, J. *et al.* RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* **137**, 459–471 (2009).
18. Dentin, R. *et al.* Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* **319**, 1402–1405 (2008).
19. Chikanishi, T. *et al.* Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires O-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 865–870 (2010).
20. Jackson, S. P. & Tjian, R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* **55**, 125–133 (1988).
21. Sinclair, D. A. *et al.* *Drosophila* O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (*sxc*). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 13427–13432 (2009).
22. Sawatsubashi, S. *et al.* A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.* **24**, 159–170 (2009).
23. Fujiki, R. *et al.* Ligand-induced transcription repression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J.* **24**, 3881–3894 (2005).
24. He, H. H. *et al.* Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nature Genet.* **42**, 343–347 (2010).
25. Minsky, N. *et al.* Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nature Cell Biol.* **10**, 483–488 (2008).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank A. Miyajima, S. Saito and N. Moriyama for experimental support, and M. Yamaki for manuscript preparation. We also thank Y. Maekawa, J. Seto and N. Iwasaki for support with MS. This work was supported in part by The Naito Foundation, the Astellas foundation (to R.F.), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) and the Japan Society for the Promotion of Science (to R.F. and S.K.).

Author Contributions S.K. planned the study with H.K.; R.G.R. and M.B. provided support and general guidance; R.F. designed the study and performed the experiments with H.S. (α -O-GlcNAc purification), A.Y. (LC–MS/MS), W.H. (O-GlcNAc site mapping), T.C. (*in vitro* OGT assay), S.I. (*Drosophila* analysis), Y.I., H.H.H. (ChIP-seq), F.O., J.K. (*in vitro* monoubiquitination assay), K.I. and J.K. (microarray).

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of this article at www.nature.com/nature. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.K. (uskato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp).

METHODS

Plasmids and retroviruses. Complementary DNAs (cDNAs) of N-terminally Flag-tagged H2B and its mutant were subcloned into pcDNA3 (Invitrogen). A series of H2B point mutants were subcloned into the pET3 vector (Novagen). shRNA sequences targeting hOGT (5'-GCACATAGCAATCTGGCTTCC-3') and *Renilla* luciferase (5'-TGCCTTGCTAGTACCAAC-3'), as a control) were inserted into the pSIREN-RetroQ-ZsGreen vector (Clontech). For retroviral production, the constructed shRNA vectors were transfected into PLAT-A cells. The virus contained in the medium was used for infection.

Generation of stable cell lines. To generate OGT-KD cells by retroviral infection, 10^6 cells were plated in 60 mm culture dishes, treated with 3 ml of retroviral cocktail (1 ml of the prepared retroviral solution plus 2 ml of DMEM with 10% FBS and $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ polybrene), then cultured for another 48 h. A FACSVantage (BD) sorter was used to isolate the retrovirally transduced, enhanced green fluorescent protein (eGFP)-positive cells, as previously described⁹. To generate the cells stably expressing Flag-tagged constructs, HeLa cells were transfected with the pcDNA vectors encoding the Flag-tagged H2B or the AA mutant. The cells containing the integrated vectors were selected by exposure to 0.5 mg ml^{-1} G418.

Generation of monoclonal antibody. H2B S112 GlcNAc peptide (CKHAV S(GlcNAc) EGTK) was synthesized (MBL Institute) and used as an antigen (Operon Biotechnologies). The hybridomas were briefly screened using ELISA with the GlcNAc peptide, and finally selected by immunoblot analysis with the *in vitro* GlcNAcylated H2B.

Antibodies. Antibodies were obtained as follows: α -Flag M2 agarose (Sigma), α -H2A, α -H2B, α -H3, α -H4 (Abcam), α -H2B K120 monoubiquitination (Upstate), α -GlcNAc (RL2 or CTD110.6) (Abcam), α -OGT (Sigma), α -Flag (Sigma) and α -RNF20/BRE1A (Bethyl).

Purification and identification of GlcNAc proteins. The α -O-GlcNAc-immobilized beads were prepared with $15 \mu\text{g}$ α -O-GlcNAc (RL2) antibody and 0.5 ml of Dynabeads M-280 sheep α -mouse IgG (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Chromatin extracts from HeLa cells (0.5 g protein) were prepared essentially as previously described²². In brief, the chromatin pellet, which consisted of residual material from the nuclear extract preparation with buffers supplemented with 1 mM streptozotocin (STZ), was re-suspended with micrococcal nuclease (MNase) buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0.1 M KCl, 0.1% (v/v) Triton-X, 0.3 M sucrose, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, 0.2 mM PMSF, 1 mM STZ, pH 7.9). After addition of 3 U ml^{-1} MNase, the samples were incubated for 30 min at room temperature with continuous homogenization and the reaction was stopped by adding 5 mM EGTA and 5 mM EDTA. After centrifugation at $2,000\text{g}$ for 30 min at 4°C , the supernatant (chromatin extract) was used for the following purification steps. The chromatin extracts were passed through a WGA agarose column (Vector). The flow-through fraction was further mixed with α -O-GlcNAc-immobilized beads and rotated for 8 h at 4°C . After three washes with buffer D (20 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 0.1 M KCl, 0.05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, 0.2 mM PMSF, 1 mM STZ, pH 7.9), glycoproteins were eluted twice with buffer D plus 0.4 mg ml^{-1} GlcNAc-O-serine (MBL) (elutions 1 and 2)

and finally with 0.1 M glycine-HCl (pH 2.0) (elution 3). Eluted proteins were desalted by methanol-chloroform precipitation, digested with trypsin (Promega) then loaded on the automated LC-MS/MS system, which was assembled with Zaplous nano-LC (AMR) plumbed with a reverse-phase C18 electrospray ionization (ESI) column (LC assist) and a Finnigan LTQ ion-trap mass spectrometer (Thermo). The LC-MS/MS data were processed using Thermo BioWorks (Thermo) and SEQUEST (Thermo) for protein identification. The list of the identified proteins was further analysed by using the 'gene functional classification tool' in DAVID bioinformatics resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

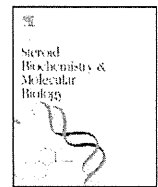
Recombinant proteins. Preparation of recombinant proteins was performed as previously reported²³. Recombinant Flag-OGT, Flag-E1, Flag-BRE1A/B complexes were isolated by baculovirus expression and immunoprecipitation-based purification with α -Flag M2 agarose (Sigma). Recombinant $6 \times$ His-RAD6A was expressed in bacteria and partly isolated with a HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma). The eluate was diluted 1:20 with BC0 (20 mM HEPES, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, pH 7.9), and fractionated with a Resource Q column (GE Healthcare) using a linear gradient (0 – 0.5 M KCl) method. Preparation of recombinant *Xenopus* histone H2B and its mutants was performed as previously described²³.

In vitro GlcNAcylation assay (autoradiographic analysis). Recombinant Flag-OGT protein ($0.5 \mu\text{g}$) was incubated with $0.5 \mu\text{g}$ of recombinant histone and 0.2 mM ($0.2 \mu\text{Ci}$) UDP- $[3\text{H}]$ GlcNAc (PerkinElmer) in a $25 \mu\text{l}$ reaction (50 mM Tris-HCl, 12.5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, pH 7.5) for 24 h at 37°C . The reaction was resolved with SDS-PAGE, blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, then subjected to autoradiography after spraying EN³HANCE (NEN Lifescience).

In vitro GlcNAcylation assay (MS analysis). Recombinant histones ($1 \mu\text{g}$) or recombinant histone octamers assembled *in vitro* ($1 \mu\text{g}$) were GlcNAcylated by recombinant Flag-OGT in $25 \mu\text{l}$ reactions (50 mM Tris-HCl, 2 mM UDP-GlcNAc, 12.5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, pH 7.5) for 24 h at 37°C . The reactions were directly subjected to a nano-LC ESI-TOF mass spectrometer system, which was assembled with a 1100 nanoLC (Agilent) plumbed with a ZORBAX 300SB-C18 column (Agilent) and microTOF (Bruker). Or, the reactions were digested with trypsin (Promega) and subjected to purification of glycopeptides with an MB-LAC WGA kit (Bruker). The enriched glycopeptides were loaded on the nano-LC ESI-ETD ion-trap mass-spectrometer system, which was assembled with the Agilent HP1200 Nano (Agilent) plumbed with ZORBAX 300SB-C18 (Agilent) and amaZon ETD (Bruker).

In vitro monoubiquitination assay. GlcNAcylated histones ($1 \mu\text{g}$) were ubiquitinated with the E1 ($0.1 \mu\text{g}$), RAD6 ($0.2 \mu\text{g}$), BRE1 complex ($0.5 \mu\text{g}$), ubiquitin ($3 \mu\text{g}$) in 50 mM Tris (pH 7.9), 5 mM MgCl_2 , 4 mM ATP at 37°C for 24 h.

ChIP-seq and ChIP-qPCR. ChIP and ChIP-seq libraries were constructed as previously described^{24,25}. For ChIP-seq analysis, the libraries were sequenced to 50 bp with Hiseq2000 (Illumina). For ChIP-qPCR analysis, the fragments of interest in the libraries were quantified with Thermal Cycler TP800 (TAKARA) and SYBR Premix Ex Taq II (Takara). The qPCR primer sets for the *GSK3B* gene were 5'-TGCAAGCTCTCAGACGCTAA-3' and 5'-CTCATTTCATGGGCGTTT-3'.



Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94: Involvement of estrogen receptors[☆]

Nariaki Fujimoto^{a,*}, Shigeyuki Kitamura^b, Jun Kanno^c

^a Department of Disease Model, Research Institute for Radiation Biology and Medicine (RIRBM), Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

^b Faculty of Pharmacology, Nihon Pharmaceutical University, 10281 Komuro, Inamachi, Kita-ashikaga-gun, Saitama 362-0806, Japan

^c Division of Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2011

Received in revised form 20 July 2011

Accepted 2 August 2011

Keywords:

PSP94

Androgen dependent transcription

ARE

Androgen receptor

Estrogen receptor

ABSTRACT

Prostatic secretory protein 94 (PSP94) is a prostatic protein found in both humans and rodents. As with other prostatic proteins, expression of this protein is regulated by androgens. In order to understand the androgen-responsive transcriptional regulation mechanisms involved, the present study aimed to identify and characterize the promoter activity of the gene. The 5'flanking (5'f) region of mouse PSP94 (mPSP94) gene was cloned and introduced into a vector upstream of the luciferase reporter gene. A Chinese hamster ovarian cell line, CHO, and a human prostate adenocarcinoma cell line, LNCaP, were transiently transfected with our reporter constructs along with an androgen receptor expression vector, and treated with dihydrotestosterone. Reporter gene assay revealed that the 5'f region of mPSP94 gene was indeed responsible for the androgen-dependent transcription. Subsequent deletion and mutation analysis indicated that the androgen responsive element (ARE)-like sequence at position −93 from the transcription start site was primarily responsible for androgen dependency. Interestingly, when estrogen receptor (ER) α was co-transfected, the androgen-dependent transcription was substantially increased. However, ER α -dependent enhancement of androgen responses was not observed when estrogen responsive element (ERE)-like motifs of the promoter region were deleted. Administration of estrogen did not influence the enhancement associated with ER α , although an anti-estrogen suppressed such effects. Collectively, these data suggest that the androgen-dependent transcription of the mPSP94 gene was co-regulated/modulated by the presence of ER α via ERE-like motifs.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostatic secretory protein 94 (PSP94), or β -microseminoprotein, is one of the major proteins along with PSA (prostate specific antigen) and PAP (prostatic acid phosphatase) that are secreted by the human prostate gland [1–3]. PSP94 is also secreted in abundance by the rodent prostate although the composition of prostatic proteins differ significantly between rodents and primates [4,5]. The rodent prostate consists of anatomically separate prostatic lobes including ventral, lateral, dorsal and anterior lobes. PSP94 is known to be highly expressed in dorsal and lateral regions of the rat prostate but localized to ventral and dorso-lateral prostatic lobes in mice. PSP94 may function as an immunoglobulin binding protein and is involved in the regulation of immune response in the female reproductive tract

[6]. In addition, PSP94 is known to inhibit motility of sperm and the acrosome reaction [7]. PSP94 homologues have been identified in several other mammals and non-mammalian species including ostrich and Japanese viper [8]. The PSP94 family of proteins share ten highly conserved cysteine residues.

The expression of PSP94 is regulated by androgens, in a manner similar to other prostatic proteins such as human PSA and rat probasin [9–11]. In the human PSA gene, an androgen-responsive element (ARE) motif capable of inducing transcription in response to androgens via androgen receptors (AR) was identified in the promoter region at position −156 upstream of the transcriptional starting site [12]. Another functional ARE was additionally identified at approximately −4 kbp [13]. In the rat probasin gene, two functional AREs were identified in the 5'flanking (5'f) region. Interestingly, these were androgen selective AREs rather than responsive to androgens and glucocorticoids [14,15]. In the case of PSP94, it was demonstrated that the 5'f region of the mouse PSP94 (mPSP94) gene exhibited promoter activity which conferred prostatic-specific expression in transgenic mice [16]. However, the androgen-responsive transcription mechanism responsible for such promoter activity has yet to be identified.

[☆] Grant support: Grant-in-Aid (H19-kagaku-Ippan-003) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan; Grant-in-Aid (#17510046) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

* Corresponding author. Tel.: +81 82 257 5820; fax: +81 82 256 7107.

E-mail address: nfjm@hiroshima-u.ac.jp (N. Fujimoto).