

염기 방향성 글리코실화가 염색질 인자에 작용하여 후 성전자 요소의 프로모터를 억제한다

*Mathieu Bouiard1, Sofia Rucib2, John R. Edwards1, and Timothy H. Bestor d,1**

장기간 해결되지 않은 문제 중 하나는, 모든 발현에 필 요한 인자가 존재하는 경우에도 메틸화된 포유류 프로 모터가 전사적으로 억제되는 메커니즘이다. 억제는 TRIM28 단백질(또는 KAP1 및 TIF1β로도 알려짐)을 포함하는 메틸화에 의존하는 억제 복합체의 조립을 필요 한다. 이 단백질은 본래 억제 또는 DNA 결합 특 성을 가지지 않는 구조 단백질이다. 이 복합체 내에서 전사를 억제하는 주요 효소의 정체는 여전히 알려져 있지 않다. 우리는 메틸화에 민감한 상호작용 스크린 을 개발하여 TRIM28이 정상적인 유전체 메틸화 패턴 을 가진 세포에서 O-연결 β-N-아세틸글루코사민 전 달효소(OGT)와 복합체를 형성한다는 것을 발견했다.

OGT는 세포질과 핵 단백질에 N-아세틸글루코사민 (O-GlcNAc)을 세린과 티로신 수산화기로 전달하여 단백질을 수정하는 유일한 글리코실전달효소이다. 전 유전체 분석 결과, O-글리코실화된 단백질과 TRIM28 은 활성화된 후성전자 요소의 프로모터와 인프린팅 제어 영역에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다. 인 프린팅 제어 영역은 DNA 메틸화에 의해 조절되는 주 요 규제 시퀀스 중 하나이다. 게다가, 전유전체에서 DNA 메틸화의 상실은 TRIM28과 관련된 여러 전사 억제 단백질에서 O-GlcNAc의 상실을 초래했다. 새로 운 Cas9 기반 편집 방법을 이용한 O-GlcNAc의 선택 적 제거는 후성전자 요소 프로모터에 대해 수행되었으 며, 국소 도메인의 재-GlcNAcylation은 DNA 메틸화 의 상실 없이 표적 후성전자 요소 가족의 발현을 재할 성화했다. 이러한 데이터는 염색질 인자의 O-연결 글 리코실화가 메틸화된 후성전자 요소의 전사 억제에 필 수적임을 보여준다.

DNA 메틸화 | 단백질 O-글리코실화 | 유전자 양성화

오랜 시간 동안 알려져 왔듯이, 포유류 프로모터의 메 킬화는 유전적 전사 억제를 유도한다(1-3). 전유전체 메틸화는 억제된 후성전자 요소의 발현을 재활성화시키고(4), 인프린팅 유전자를 양쪽 염색체에서 발현하 도록 만든다(5). 인프린팅 유전자는 일반적으로 모체 또는 부계 유래의 단일 염색체에서만 발현된다. 인공 적으로 메틸화된 Pol II 의존 프로모터가 세포에 도입 되면, 유전적 억제 이전에 일정 기간 활발히 전사된다 (6, 7). 이는 전사 기계에 직접적으로 사이토신 메틸화의 영향보다는 메틸화에 의존하는 억제 인자의 모집이 억 제를 유도한다는 것을 나타낸다.

생화학적 연구를 통해 메틸화된 DNA에 결합하는 단 백질이 메틸화에 의존하는 전사 억제 인자의 특성을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나 MeCP2 및 기타 메 킬화에 의존하는 DNA 결합 단백질을 단독으로 또는 조합하여 제거하더라도, 메틸화된 프로모터는 vivo에 서 재활성화되지 않았다(8). 메틸화된 DNA 결합 단백 질의 제거는 DNA 메틸전달효소 유전자 삭제에 의해 유발된 표현보다 훨씬 덜 심각한 결함을 초래했다(9).

메틸화에 의존하는 억제 복합체의 구성 요소와 실제 전사를 억제하는 메커니즘은 여전히 알려져 있지 않 다. 메틸화된 후성전자 요소 프로모터의 억제는 TRIM28 단백질(또는 KAP1 및 TIF1β로도 알려짐) (10)에 의존하며, 메틸화에 의존하는 단일 염색체 발 현도 인프린팅 유전자에 적용된다(11). 그러나 TRIM28은 DNA와 결합하지 않으며 억제 활성을 가지지 않는 구조적 인자이다(12, 13). 우리는 메틸화에 의존하여 TRIM28과 상호작용하는 인자를 식별하기 위해 결합된 유전적 및 생화학적 스크린을 개발했다. 이 스크린에서 강력히 풍부하게 나타난 유일한 인자는 O-연결 β-N-아세틸글루코사민 전달효소(OGT)였다. OGT는 핵과 세포질에서 활동하는 유일한 단백질 글 리코실전달효소이다. OGT는 다양한 경로에서 중요한 조절 기능을 수행하지만(14), 이전에는 DNA 메틸화 와 직접적으로 관련이 없었다. 전유전체 분석 결과, TRIM28과 OGT로 수정된 단백질은 전사 요소 프로 모터와 인프린팅 제어 영역에서 공존하는 것으로 나타 났다. DNA 메틸화가 없는 경우, 유전자 양성화에 중 요한 역할을 하는 여러 단백질이 OGT에 의해 수정되 지 않았다. 새로운 편집 방법을 이용한 표적 단백질의 디글리코실화는 메틸화된 후성전자 요소 프로모터의 전사를 재활성화했다. 이러한 데이터는 O-글리코실화 가 메틸화된 프로모터의 전사를 재활성화했다. 이러한 데이터는 O-글리코실화 가 메틸화된 프로모터의 전사를 재활성화했다. 이러한 데이터는 O-글리코실화 가 메틸화된 프로모터의 전사를 재활성화했다.

결과

TRIM28의 제거는 전유전체 메틸화 상실을 유발하는 돌연변이와 유사한 특성을 보인다. 마우스 배아에서 Trim28의 강력히 저기능형 앨리일의 동형접합은 유의 미한 메틸화 상실을 초래하지 않는다.

중요성

메틸화된 포유류 프로모터는 핵 인자에 의해 전사적으 로 억제되지만, 이러한 인자들의 정체와 메틸화에 의 한 억제의 분자적 메커니즘은 오랫동안 밝혀지지 않았 다. 여기서 우리는 메틸화된 프로모터가 O-연결 β-N- 아세틸글루코사민 전달효소(OGT)를 모집한다는 것 을 보여준다. OGT는 여러 염색질 인자를 세린과 티로 신 수산화기에서 단일 글리코실화한다. 이 수정은 해 당 수산화기에서 단백질 인산화를 억제하고, 여러 염 색질 인자의 구조적 전환을 유도하여 억제 활성을 조 정하거나 강화하여 억제 상태를 공고히 만든다.