

論文内容の要旨

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用動物科学専攻

平成 30 年度博士課程進学

氏名 奈良 大輔

指導教員名 田中 智

論文題目：

ヒストン *O*-GlcNAc 修飾研究ツールの確立およびヒストン *O*-GlcNAc 修飾の特性解析

序論

O-GlcNAc 修飾は、タンパク質のセリンあるいはスレオニン残基に単糖の一種である GlcNAc が、*O*-結合型に付加するタンパク質翻訳後修飾の 1 つである。*O*-GlcNAc 修飾の基質である UDP-GlcNAc が 2~5% のグルコースが代謝されるヘキソサミン合成経路の代謝産物であることから、*O*-GlcNAc 修飾はグルコースをはじめとした栄養因子に応答性を持つ栄養センサーとしての働きが期待されている。比較的近年にヒストンにおいても *O*-GlcNAc 修飾が発見され、現在までに 16 種類のヒストン *O*-GlcNAc 修飾が報告されている。特異抗体が獲得された、H2A の N 末端から 40 番目のアミノ酸であるセリン (Ser40) の *O*-GlcNAc 修飾 (H2AS40Gc、以下同様に略す) および H2BS112Gc については特性および機能解析が進展しつつある。しかしながら、特異抗体などのヒストン *O*-GlcNAc 修飾の研究ツールがほとんど存在しないことから、その他のヒストン *O*-GlcNAc 修飾については発見のみの報告に留まり、その機能はおろか特性すらもほとんど明らかにされていない。そこで、本研究は新規ヒストン *O*-GlcNAc 修飾の研究ツールを確立すること、およびその確立されたツールを用いてヒストン *O*-GlcNAc 修飾の特性および機能解析を進展させることを目的とした。第 1 章において、共同研究グループへ Ser40 が *O*-GlcNAc 化されたヒストン H2A (S40Gc-H2A) の合成を委託し、合成された S40Gc-H2A を活用した生化学的な解析を行った。第 2 章において、新たなヒストン *O*-GlcNAc 修飾特異的モノクローナル抗体を樹立し、第 3 章において、その抗体を用いた新規ヒストン *O*-GlcNAc 修飾の特性解析を行った。

第 1 章 合成 S40Gc 化 H2A を用いたヌクレオソーム再構成と H2AS40Gc 含有ヌクレオソームを用いた生化学的解析

当研究室の先行研究によって発見された H2AS40Gc は、ヌクレオソーム内において H2A 同士が接する領域に位置することから、ヌクレオソーム構造に直接的な影響を与えることが期待されていた。そこで、本章では H2AS40Gc のヌクレオソーム構造に与える影響を実際に評価することを目的とした解析を行った。特定のアミノ酸残基のみ O-GlcNAc 化されたタンパク質の新規人工合成法によって大阪大学の共同研究グループにより合成された S40Gc-H2A を用いて、ヌクレオソームの再構成を試みた。その結果、いずれの化学修飾も含まないヌクレオソーム (Unmodified NCP) を再構成する既に確立された方法を用いて、S40Gc-H2A を含んだヌクレオソーム (H2AS40Gc NCP) を再構成できることがわかった。

次に、H2AS40Gc NCP と Unmodified NCP を用いて Micrococcal Nuclease (MNase) 感受性試験および熱安定性試験を行った。MNase 感受性試験の結果、H2AS40Gc はヌクレオソーム内の末端部をはじめとした DNA とヒストンの相互作用に対してはほとんど影響を与えない修飾であり、H2AS40Gc NCP と Unmodified NCP の間に構造上顕著な違いはないことが示唆された。その一方で、熱安定性試験の結果、H2AS40Gc が存在するとヌクレオソーム構造の安定性を低下させることが明らかとなった。さらには、H2AS40Gc NCP は H2A-H2B ダイマーが 1 つ欠けた構造 (ヘキサソーム) になりやすいことも示唆された。

第 2 章 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4T71Gc の特異抗体の樹立と当該抗体の特性解析

H2AS40Gc の特異抗体である 20B2 抗体は、当研究室の先行研究により獲得された。20B2 抗体を用いた解析の結果、H2AS40Gc は転写の促進に寄与する因子である可能性があることやゲノム修復にも寄与する因子であることが明らかにされた。このように、ヒストン O-GlcNAc 修飾を特異的に認識する新たなモノクローナル抗体は、ヒストン O-GlcNAc 修飾の特性および機能解析に非常に有用である。

20B2 抗体作製時に行った、マウス ES (mES) 細胞から精製したヒストンを供した予備的なアミノ酸分析および質量分析の結果、分析した当時において O-GlcNAc 修飾の付加が報告されていない、ヒストン上の 4 ヲ所のセリンあるいはスレオニン残基の O-GlcNAc 修飾の存在が示唆されていた。そこで、新規ヒストン O-GlcNAc 修飾を特異的に認識する新たなモノクローナル抗体の獲得を目的として、これら 4 ヲ所の新規ヒストン O-GlcNAc 修飾候補に相当する合成 O-GlcNAc 化ペプチドを抗原として得られたモノクローナル抗体をスクリーニングした結果、少なくとも Western Blotting に使用可能な、新たな特異抗体 (20H3 抗体) を獲得した。ELISA や組換えヒストン変異体を供した Western blotting などを行った結果より、20H3 抗体は、これまでに報告のなかった H4T71Gc を特異的に認識する抗体であることが判明した。

20H3 抗体が、Western Blotting 以外の抗体を用いた主要な解析法（免疫沈降、免疫染色）にも使用可能か、また使用可能であればその反応条件などを定めるため、両解析における 20H3 抗体の使用条件検討を行った。免疫沈降における条件検討の結果、イオン性界面活性剤を除いた buffer 系であれば 20H3 抗体は免疫沈降およびクロマチン免疫沈降（ChIP）に使用可能であることが判明した。また、免疫染色における条件検討の結果、20H3 抗体が使用可能となる、細胞の固定条件、透過処理条件および使用時の抗体濃度を特定した。20H3 抗体による mES 細胞の免疫染色像を確認した結果、H4T71Gc は核内の広範な領域に存在することが明らかとなった。以上より、20H3 抗体は、免疫沈降や免疫染色でも使用可能であることが確認された。

第 3 章 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4T71Gc の局在ゲノム領域と細胞外グルコース濃度に対する応答性の解析

本章前半においては、H4T71Gc のゲノム上の局在領域を明らかにすることを目的として、20H3 抗体を用いて、mES 細胞とヒト ES (hES) 細胞、ヒト iPS (hiPS) 細胞より抽出・固定したクロマチンに対する ChIP-seq を行い、H4T71Gc のゲノム DNA 上の局在領域の特徴を解析した。ChIP-seq と RNA-seq の比較解析を行った結果、mES 細胞、hES 細胞および hiPS 細胞いずれにおいても、H4T71Gc は比較的転写活性の高い遺伝子領域に局在する傾向があることが判明した。また、mES 細胞における 20H3 抗体を用いた ChIP-seq と公開データベースにある DNase-seq などとの比較解析の結果、クロマチン構造が緩んだ領域に H4T71Gc が存在する傾向が強いことが明らかとなった。さらに、mES 細胞における 20H3 抗体を用いた ChIP-seq と、他のエピジェネティクス因子に対する ChIP-seq の比較解析の結果、H4T71Gc は H3K36me3 や H3K4me1、H3K27ac、H3K9ac、H3.3 といった転写の促進に関わる因子と共局在する傾向にあることがわかった。以上に加え、H4Thr71 はヌクレオソーム中の H4-H2B 会合面に存在することも考慮すると、H4T71Gc は、ヌクレオソーム構造に直接影響を与えることで遺伝子転写活性の促進に寄与する新たなエピジェネティクス修飾である可能性がある。

本章後半においては、H4T71Gc のグルコース応答性を検証するために、通常培養条件である 25 mM に加えて、10、5 あるいは 1 mM のグルコース濃度に調整した培地中で培養した mES 細胞それぞれにおける H4T71Gc 修飾量を、20H3 抗体を用いた Western Blotting によって比較した。その結果、少なくとも mES 細胞においては、培地中のグルコース濃度が 25 mM であるとき (25mMG-mES) と比較して、1 mM であるとき (1mMG-mES) において有意に修飾量が増加することが判明した。1mMG-mES においても 20H3 抗体による ChIP-seq 解析を行った結果、1mMG-mES と 25mMG-mES における H4T71Gc の局在遺伝子が大きく変化はするが、1mMG-mES においても H4T71Gc は比較的転写活性の高い遺伝子領域に局在する傾向があることが判明した。

結論

S40Gc-H2A を活用した生化学的な解析の結果、H2AS40Gc はヌクレオソーム構造の安定性に影響を与える新たなエピジェネティクス因子であることが判明し、特殊なヘキサソームの構造へ変化を促す因子であることが示唆された。また、新たなヒストン *O*-GlcNAc 修飾の研究ツールとして、Western Blotting、免疫染色、免疫沈降および ChIP で用いることができる新規ヒストン *O*-GlcNAc 修飾特異的モノクローナル抗体として 20H3 抗体が樹立されるに至った。当該抗体の活用によって、H4T71Gc はグルコース応答性を備え、転写促進に関与する新たなヒストンマークである可能性があることが明らかとなった。以上のように本研究の進展の中で、糖類が直接的に関与するエピジェネティクス制御の仕組みについて新たな知見が得られた。今後、本研究より得られたツールを活用することによって、H2AS40Gc や H4T71Gc については勿論のこと、ヒストン *O*-GlcNAc 修飾を介したクロマチン構造の制御機構をはじめとした、糖類に依拠したエピジェネティクス制御のさらなる研究解析の進展が期待される。