

審査の結果の要旨

氏名 奈良 大輔

O-GlcNAc 修飾は、タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に、N-アセチルグルコサミン (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。ヒストンにおいてもこの修飾が複数発見されているが、多くの場合、修飾を特異的に認識する抗体が得られていないことなどの理由で、その機能や特性はほとんど明らかにされていない。3章からなる本論文では、新規ヒストン O-GlcNAc 修飾の研究ツールの確立と、それを用いたヒストン O-GlcNAc 修飾の特性、および機能解析の進展を目的とした研究が行われた。

第1章では、先行研究で発見されていた、ヒストン 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) の、ヌクレオソーム構造への影響が解析された。まず、人工合成された、H2AS40Gc を有する H2A タンパク質 (S40Gc-H2A) を用い、この修飾を持つヒストンもヌクレオソーム構造を取り得ることを明らかにした。S40Gc-H2A を含むヌクレオソームと、非修飾ヌクレオソームを比較したところ、DNA の「巻きつき状態」に顕著な差は見られなかったものの、H2AS40Gc の存在によりヌクレオソーム構造の安定性が低下し、H2A-H2B ダイマーが1つ欠けたヌクレオソーム構造 (ヘキサソーム) をとりやすくなることが強く示唆された。

第2章では、新たなヒストン O-GlcNAc 修飾の同定を目的に、新規特異抗体の樹立と、その特性解析が行われた。予備的な分析の結果、未報告の 4 ヶ所の O-GlcNAc 修飾の存在が示唆されていた。そこで、これら 4 ヶ所の新規ヒストン O-GlcNAc 修飾候補に相当する O-GlcNAc 化ペプチドを合成し、それらを抗原としてマウスに免疫し、複数のハイブリドーマクローンを得た。得られたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をスクリーニングした結果、少なくともイムノブロッティングに使用可能な、新たな特異抗体 (20H3 抗体) を獲得した。さらに、ELISA や組換えヒストン変異体を供したイムノブロッティングなどから、20H3 抗体は、これまでに報告の無かった H4T71Gc を特異的に認識する抗体であることが判明した。また、種々の条件検討で、20H3 抗体がクロマチン免疫沈降 (ChIP) や免疫染色にも使用可能であることが確認された。

第3章では、20H3 抗体を利用し、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が行われた。まず、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 が行われ、RNA-seq データとの比較で、ゲノム DNA 上の H4T71Gc の存在領域の特徴が解析された。その結果、H4T71Gc は転写活性の比較的高い遺伝子領域に偏在することが判明した。また、mES 細胞における 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も明らかとされた。さらに、H4T71Gc は、H3K36me3 や H3K4me1、H3K27ac、H3K9ac、H3.3 といった転写の促進に関わるエピジェネティクス因子と共局在する傾向にあることがわかった。H4Thr71 が H4-H2B 会合面に存在することも加味し、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、または維持に寄与する、新たなエピジェネティクス修飾である可能性が考えられた。

第3章ではまた、異なるグルコース濃度下で培養した細胞における H4T71Gc 修飾量が解析され、mES 細胞においては、通常の 25 mM 条件と比較し、低濃度 (1 mM) のグルコース濃度下で有意に H4T71Gc 修飾量が増加することが判明した。ChIP-seq の結果、低グルコース濃度条件においても、H4T71Gc は比較的転写活性の高い遺伝子領域に偏在する傾向があることが示された。

以上、H2AS40Gc はヌクレオソーム構造の安定性に影響を与え、特殊なヘキサソームの構造への変化を促す新たなエピジェネティクス因子であることが示唆された。また、新たなヒストン O-GlcNAc 修飾の研究ツールである 20H3 抗体の獲得に成功し、H4T71Gc の発見に至った。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、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。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。