

博士論文（要約）

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

奈良 大輔

令和 2 年度 (2020 年度)

博士論文

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

(Establishment of research tools for histone *O*-GlcNAc modification and
characterization of histone *O*-GlcNAc modification)

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 (2018 年度) 博士課程進学

細胞生化学研究室所属 博士課程 3 年

奈良 大輔

指導教員 田中 智

目次

中表紙	1
目次	2
緒言	6
本文	6
1. 序	6
2. エピジェネティクス	7
3. ナクレオソーム	7
4. コアヒストン	8
5. ヒストン修飾	8
6. O-GlcNAc 修飾	10
7. ヒストン O-GlcNAc 修飾	12
8. 本研究の目的と内容	13
図 P-1 ナクレオソームの構造と模式図	15
図 P-2 マウスのヒストン H2A および H4 遺伝子の一覧	16
図 P-3 代表的なタンパク質翻訳後修飾の概要図	18
図 P-4 O-GlcNAc 修飾の概要図	20
図 P-5 O-GlcNAc 修飾の栄養応答性	21
図 P-6 各コアヒストンのアミノ酸配列と現在までに発見されたヒストン O-GlcNAc 修飾	22
第 1 章 合成 S40Gc 化 H2A を用いたナクレオソーム再構成と H2AS40Gc 含有ナクレオソームを用いた生化学的解析	25
序論	26
結果	29
1. S40Gc-H2A の純度の確認	29
2. H2AS40Gc を含んだナクレオソームの再構成	29
3. H2AS40Gc がヒストン-DNA 間相互作用に及ぼす影響の評価	30
4. H2AS40Gc がナクレオソームの安定性に及ぼす影響の評価	30
考察	32
図 1-1 人工合成した S40Gc-H2A の純度の確認	36

図 1-2	透析法によるヌクレオソーム再構成法の概要	38
図 1-3	S40Gc-H2A を用いて再構成したヌクレオソームの確認	40
図 1-4	H2AS40Gc NCP の MNase 感受性試験の結果	42
図 1-5	H2AS40Gc NCP の熱安定性試験の結果	44
図 1-6	精製前に 55°C で温めた H2AS40Gc NCP の性質	46
図 1-7	本研究から示唆された H2AS40Gc の働き	47
図 1-8	H2AS40Gc NCP の結晶化の試み	48

第 2 章 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4#Gc 特異抗体の樹立と

当該抗体の特性解析	49
序論	50
結果	52
1. 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾に対する抗体産生細胞クローン候補の選択	52
2. Protein G カラム精製 20H3 抗体の Western Blotting および ELISA における反応性	53
3. 20H3 抗体の保存条件の検討と Western Blotting における使用法の条件検討	54
4. 20H3 抗体の Western Blotting による反応特異性の解析	55
5. H4#GP カラムを用いた精製方法の検討	56
6. 組換えタンパク質を用いた 20H3 抗体の反応特異性の解析	58
7. 20H3 抗体の免疫沈降および ChIP における使用の可否と使用条件の検討	58
8. 20H3 抗体の免疫染色における使用の可否と使用条件の検討	59
考察	61
表 2-1 20H3 抗体の保存溶媒および温度条件検討 (図 2-4a) において用意した条件区	65
表 2-2 20H3 抗体の Western Blotting 使用条件検討 (図 2-4b) において用意した条件区	65
図 2-1 O-GlcNAc 化ペプチドライブラリーを用いたモノクローナル抗体の作製	66
図 2-2 ハイブリドーマのスクリーニング	68
図 2-3 Protein G カラムを用いて精製した 20H3 抗体の反応性	70
図 2-4 20H3 抗体の保存および Western Blotting における使用条件の検討	72
図 2-5 20H3 抗体の反応特異性の解析	74
図 2-6 H4#GP カラムを用いた 20H3 抗体精製の評価	78
図 2-7 強制発現した組換えヒストンを用いた 20H3 抗体の反応性の確認	81
図 2-8 20H3 抗体の IP および ChIP における使用条件の検討	82
図 2-9 IP における 20H3 抗体の吸収実験	84
図 2-10 20H3 抗体を免疫染色で使用する際の細胞固定および透過処理条件の検討	85
図 2-11 20H3 抗体を免疫染色に使用する際の抗体濃度の検討	88
図 2-12 H4#Gc の mES 細胞核内における局在	90

第3章 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4#Gc 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	91
序論.....	92
結果.....	95
1. H4#Gc の多能性幹細胞ゲノム上における局在領域.....	95
2. H4#Gc が局在するゲノム領域のクロマチン構造の緩み度合い.....	96
3. H4#Gc と共局在する他のエピジェネティクス因子.....	97
4. 細胞外グルコースに応じた H4#Gc 修飾量の変化.....	97
5. 細胞外グルコース濃度が異なる mES 細胞間での H4#Gc の局在遺伝子の比較.....	98
6. H4#Gc の 1mMG-mES 細胞ゲノム上における局在領域.....	99
考察.....	100
図 3-1 ChIP-seq の概要.....	104
図 3-2 多能性幹細胞における H4#Gc のゲノム DNA 上の存在領域.....	106
図 3-3 H4#Gc が存在する遺伝子領域の発現量解析.....	108
図 3-4 DNase-seq の概要.....	110
図 3-5 H4#Gc 局在領域におけるクロマチン構造の緩み具合.....	112
図 3-6 H4#Gc 局在領域における他のエピジェネティクス因子の存在.....	114
図 3-7 細胞外グルコース濃度の違いによる H4#Gc 修飾量の変化.....	116
図 3-8 1mMG-mES 細胞と 25mMG-mES 細胞における H4#Gc の局在遺伝子.....	118
図 3-9 1mMG-mES 細胞における H4#Gc 局在領域と局在遺伝子の発現量解析.....	120
図 3-10 H4Thr# の位置と本研究から予想される H4#Gc の働き.....	122
総合討論	125
本文.....	126
図 C-1 真核生物間での H4Thr# の保存性と H4#Gc の動物種間保存性.....	133
材料と方法	137
本文.....	138
特記事項.....	138
I. 用いた培養細胞とその培養法.....	138
II. 用いた動物の情報.....	142
III. ヒストン O-GlcNAc 修飾に対する新規特異抗体の作製.....	143
IV. 免疫染色.....	146
V. 様々なタンパク質抽出法.....	148

VI. 培養細胞から抽出したタンパク質を用いた実験および解析	150
VII. クロマチン免疫沈降 (ChIP)および ChIP-seq 解析	157
VIII. 発現ベクターを用いた培養細胞での一過性強制発現	166
IX. 合成ヒストンを用いたヌクレオソーム再構成	169
X. 再構成ヌクレオソームの生化学的解析	172
XI. コアヒストンのアミノ酸配列やヌクレオソーム構造を用いた解析など	174
XII. 統計解析	175
表 M-1 用いた抗体の情報	176
表 M-2 用いたプライマーの情報	176
表 M-3 用いた合成ペプチドの情報	177
表 M-4 用いた公開シーケンスデータの情報 (ChIP-seq)	177
表 M-5 用いた公開シーケンスデータの情報 (ChIP-seq 以外)	178
図 M-1 RP-HPLC によるヒストン分画の概要	179
図 M-2 ハンギングドロップ蒸気拡散法によるヌクレオソーム結晶化の概要	181
引用文献	183
原著論文	184
参照した学位論文	204
論文内容の要旨	205
本文	206
各章のまとめ	210
謝辞	213
令和3年(2021年)1月記	214
令和3年(2021年)3月追記	216



緒言

1. 序

本研究は、タンパク質の翻訳後修飾の1つである *O*-GlcNAc 修飾の生物学的な意義を解明するという最終的な目標に向けて遂行した研究である。詳細は後述するが、*O*-GlcNAc 修飾には、被修飾部位に関わらずその付加および除去する酵素はそれぞれ単一であるという特筆すべき性質がある。こうした *O*-GlcNAc 修飾の特性のため、その生物学的意義の全容を解明するためには、個々の *O*-GlcNAc 修飾をそれぞれ詳細に解析することが不可欠だと考えられた。そこで、本研究も、*O*-GlcNAc 修飾が付加される数多くのタンパク質の中から特定の *O*-GlcNAc 修飾に絞って解析を行うこととした。近年に *O*-GlcNAc 修飾が付加することが報告されたタンパク質の1つにヒストンがある。*O*-GlcNAc 修飾を含め、ヒストンの翻訳後修飾は特にヒストン修飾と呼ばれる。ヒストンは真核生物の核内において DNA と共にヌクレオソームと呼ばれる複合体を構成することなどから、ヒストン修飾は遺伝子発現制御様式の一つであるエピジェネティクスの主な構成要素とされている。このことから、数多存在するタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾の中でも、とりわけヒストンの *O*-GlcNAc 修飾はエピジェネティクス因子としての働きが期待される。しかしそれと同時に、ヒストン *O*-GlcNAc 修飾は、その特性や機能がほとんど明らかでない *O*-GlcNAc 修飾の1つでもある。以上のことから、本研究ではヒストン *O*-GlcNAc 修飾に焦点を当てることとした。

以下、本研究で主に扱うヒストン *O*-GlcNAc 修飾について理解するために重要な概念 (エピジェネティクス、ヌクレオソーム、コアヒストン、ヒストン修飾、*O*-GlcNAc 修飾など)について順に説明する。次いで、ヒストン *O*-GlcNAc 修飾全般についてこれまでに明らかになっていることを述べた上で、ヒストン *O*-GlcNAc 修飾を含めた *O*-GlcNAc 修飾研究の課題とその課題を見据えて行った本研究について概説する。

2. エピジェネティクス

「エピジェネティクス」は、「DNA の塩基配列の変化を伴わず、娘細胞あるいは子孫へと継承される遺伝子発現変化を制御する仕組み、およびそれを研究する学問」である (Goldberg et al., 2007; Riggs et al., 1996)。真核生物においてゲノム DNA は、基本的にヒストンタンパク質の複合体に巻き付いて、クロマチンと呼ばれる高次構造を形成して存在する (Koyama and Kurumizaka, 2018)。エピジェネティクスの主な担い手は、DNA のメチル化、および多種多様なヒストンの翻訳後修飾であり、これらがクロマチン構造を変化させることで、細胞固有の遺伝子発現パターンの成立、DNA 修復、およびトランスポゾンの抑制によるゲノムの安定化などに関与する (Kakutani et al., 1996; Kato et al., 2003; Klose and Bird, 2006; Miura et al., 2001; Singer et al., 2001)。その他のエピジェネティクスの担い手には、ヒストン・バリエーションや、ポリコーム群タンパク質、ノンコーディング RNA などが報告されている (Bitterge and Schneider, 2014; Clapier and Cairns, 2009; Hoghoughi et al., 2017; Meister, 2013; Schuettengruber et al., 2017)。DNA メチル化やヒストンの翻訳後修飾などによるエピジェネティック制御機構は、同じ遺伝情報を持つ細胞が、個体内において組織や細胞固有の機能を発揮、維持するために必要不可欠な機構であり、すべての生命現象の基盤ともいうことができる。

3. ヌクレオソーム

クロマチンの構造単位であるヌクレオソームは、生物種を超えてアミノ酸配列が極めてよく保存されている 4 種のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) からなるヒストン 8 量体と、それに巻き付いて存在する 145~147 塩基長の DNA によって構成されており、さらにそれらがリンカー DNA で結ばれている (Davey et al., 2002; Koyama and Kurumizaka, 2018; Luger et al., 1997; Makde et al., 2010; Ong et al., 2007; Richmond and Davey, 2003; Simpson, 1978)。ヒストン 8 量体は、H2A と H2B による 2 量体が 2 つと、H3 と H4 それぞれ 2 つずつから形成される 4 量体が 1 つ組み合わさり形成されている (図 P-1) (Eickbush and Moudrianakis, 1978; Tachiwana et al., 2010)。

4. コアヒストン

各コアヒストンには、異なる遺伝子にコードされ、アミノ酸配列がわずかに異なるが機能には差異が確認されていないサブタイプが存在し、これらはヒストン・アイソフォームと呼ばれている (Hayakawa et al., 2017; Hirosawa et al., 2016)。例えばマウスでは、ゲノム上に 18 コピーの *H2A* 遺伝子が存在し、9 種類の *H2A* アイソフォームがコードされている。一方で、*H4* 遺伝子はゲノム上に 13 コピー存在するが、コードされる *H4* タンパク質のアミノ酸配列は全て同一である (図 P-2)。さらにコアヒストンには、ヒストン・バリエントと呼ばれる、アミノ酸配列の違いに加え、機能も異なると考えられているサブタイプも存在する。例えば *H2A* においては、*H2A.X*、*H2A.Z*、*H2A.Bbd*、および *MacroH2A* などが報告されている (Bönisch and Hake, 2012)。いくつかのヒストン・バリエントは、DNA 修復や転写活性の制御に関与し、エピジェネティクスにおいて重要な役割を果たしていると考えられている (Biterge and Schneider, 2014)。*H2B* および *H3* にも、精巣特異的な *testis-H2B* や遺伝子転写促進に関与すると考えられている *H3.3* などのヒストン・バリエントが以前より報告されていた (Biterge and Schneider, 2014; Buschbeck and Hake, 2017; Hoghoughi et al., 2017; Koyama and Kurumizaka, 2018; Malik and Henikoff, 2003; Talbert and Henikoff, 2010)。一方、*H4* にはバリエントが存在しないとされていたが、近年、ヒト科動物特異的な *H4* のヒストン・バリエントが報告された (Long et al., 2019; Pang et al., 2020)。

5. ヒストン修飾

多種多様な分子が様々なコアヒストン、およびヒストン・バリエント上のアミノ酸残基に付加する現象は、一般にヒストン修飾と呼ばれ、ヌクレオソームの構造を直接的ないしは間接的に制御する、主要なエピジェネティクスの 1 つである (Tessarz and Kouzarides, 2014; Zentner and Henikoff, 2013)。代表的なヒストン修飾に、メチル化 (me) やアセチル化 (ac)、リン酸化 (ph)、モノユビキチン化 (ub) などがある (図 P-3) (Gräff and Tsai, 2013; Hirosawa et al., 2018; Jambhekar et al., 2019; Rossetto et al., 2012; Sabari et al., 2017; Weake and Workman, 2008)。

ヒストンメチル化修飾は、リシン (Lys, K)およびアルギニン (Arg, R)残基に付加される修飾である。リシン残基のメチル化には、モノメチル化 (me1)、ジメチル化 (me2)、およびトリメチル化 (me3)の3つの状態が存在する (図 P-3a) (Black et al., 2012; Hyun et al., 2017; Jambhekar et al., 2019)。また、アルギニン残基のメチル化にも、モノメチル化、非対称的ジメチル化 (me2a)、および対称的ジメチル化 (me2s)の3つの状態が存在する (図 P-3b) (Blanc and Richard, 2017; Guccione and Richard, 2019; Jambhekar et al., 2019)。ヒストンメチル化修飾は、標的アミノ酸のヒストン部位やメチル化修飾状態によって異なる機能を持つことが知られている。例えば、H3のN末端から4番目のアミノ酸であるリシン (K4)のモノメチル化、ジメチル化、およびトリメチル化 (H3K4me1/2/3、以下同様に省略して記す)は、転写が活発な遺伝子領域近傍に存在し、転写の促進に関与するとされている (Black et al., 2012; Hyun et al., 2017; Jambhekar et al., 2019; Santos-Rosa et al., 2002)。一方で、ヘテロクロマチンに存在する代表的なヒストン修飾である H3K9me2/3 や H3K27me3 は、遺伝子の転写抑制に関与することが報告されている (Black et al., 2012; Hyun et al., 2017; Jambhekar et al., 2019; Nakayama et al., 2001; Wang et al., 2003)。

ヒストンアセチル化修飾は、ヒストンのリシン残基に付加される修飾である (図 P-3c) (Grunstein, 1997; Gräff and Tsai, 2013; Sabari et al., 2017; Verdin and Ott, 2015)。リシン残基の持つ正電荷がアセチル化によって打ち消されることでDNAとヒストンの結合が弱まるので、メチル化とは異なり、修飾部位に関わらずほぼ全てのヒストンアセチル化修飾が遺伝子の活性化に関与することが知られている (Gräff and Tsai, 2013; Sabari et al., 2017; Verdin and Ott, 2015)。

ヒストンリン酸化修飾は、セリン (Ser, S)あるいはスレオニン (Thr, T)残基に付加される修飾であり、遺伝子の活性化に関与している (図 P-3d) (Anest et al., 2003; Maile et al., 2004; Rossetto et al., 2012)。また、H3S10ph や H3T28ph、H3T32phなどは遺伝子の活性化に関与するだけでなく、細胞分裂に寄与することが知られている (Caperta et al., 2008; Pérez-Cadahía et al., 2009; Rossetto et al., 2012)。この他に重要なヒストンリン酸化修飾として、H2Aのバリエーションである H2A.X のリン酸化 (H2A.XS139ph)がある。この修飾を持つ H2A.X は γ -H2A.X と呼ばれ、DNAの二本鎖切断が生じた際に多く発現し、修復タンパク質を引き寄

せる役割を担うことで、DNA 修復に関与すると考えられている (Paull et al., 2000; Rogakou et al., 1998; Rossetto et al., 2012)。

ヒストンモノユビキチン化修飾は、ユビキチンの C 末端のグリシン (Gly) 残基を介して、リシン残基に付加される修飾である (図 P-3e) (Kulathu and Komander, 2012; Weake and Workman, 2008)。修飾部位によって役割が異なり、H2AK119ub は基本的に転写活性を抑制し、H2BK120ub は転写活性を促進すると考えられている (Wang et al., 2004; Weake and Workman, 2008; Zhu et al., 2005)。また、H3K14/18/23ub には DNA メチル化酵素の 1 つである Dnmt1 が結合し、そのメチル化酵素活性を増大させることで DNA メチル化パターンの維持に寄与することが報告されている (Ishiyama et al., 2017; Nishiyama et al., 2020; Qin et al., 2015)。

以上の様に従来から研究されてきた、メチル化修飾やアセチル化修飾などと比べるとより近年になって、ヒストンの *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン(*O*-GlcNAc)化修飾 (Gc)が報告された (Sakabe et al., 2010)。

6. *O*-GlcNAc 修飾

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 1 つである 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 (図 P-4) (Bond and Hanover, 2015; Hanover et al., 2012; Hardivillé and Hart, 2014)。*O*-GlcNAc 修飾を付加、および除去する酵素は、*O*-GlcNAc 転移酵素 (*O*-GlcNAc transferase, OGT)と *O*-GlcNAc 除去酵素 (*O*-GlcNAcase, OGA) のそれぞれ 1 つずつしか存在しないため、可逆的な *O*-GlcNAc 修飾の付加と除去は、OGT と OGA のみで行われている (Bond and Hanover, 2015; Hanover et al., 2012; Hardivillé and Hart, 2014; Hart, 2019; Tan et al., 2017; Yang and Qian, 2017)。

OGT ノックアウトマウスは胎生致死であり、OGT ノックアウト胚性幹細胞 (Embryonic stem cell, ES 細胞)は樹立できず、ES 細胞で OGT をノックダウンすると分化が促

進される (Miura et al., 2018; O'Donnell et al., 2004; Shafi et al., 2000)。一方、OGA ノックアウトマウスでは発生の遅れと高い新生子致死性が認められ、OGA ノックアウト ES 細胞は樹立できるが、分化能に異常が見られることなどが報告されている (Olivier-Van Stichelen et al., 2017)。これらのことから、*O*-GlcNAc 修飾の制御は初期胚や多能性幹細胞の未分化維持、分化制御、および生存に重要だと考えられている (Jang et al., 2012; Miura and Nishihara, 2016; Sharma et al., 2018)。

O-GlcNAc 修飾の基質である UDP-GlcNAc は、細胞に取り込まれたグルコースの一部が代謝されるヘキソサミン合成経路 (Hexosamine biosynthetic pathway, HBP) の代謝産物であるが、グルコースの他にグルタミンやアセチル CoA、ATP、ウリジンの一部も UDP-GlcNAc の合成に用いられることから、*O*-GlcNAc 修飾は HBP で代謝されるグルコースは勿論のこと、アミノ酸や脂質、核酸といった様々な栄養因子に応答性を持つ栄養センサーとしての働きを有すると考えられている (図 P-5) (Bond and Hanover, 2015; Hanover et al., 2012; Hardivillé and Hart, 2014; Hart, 2019; McClain, 2002; McClain and Crook, 1996; Tan et al., 2017; Yang and Qian, 2017)。実際に、様々なタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾量が、線維芽細胞や心筋細胞、膵管上皮細胞などにおいて細胞外グルコース濃度と正の相関を示すことが報告されている (Durning et al., 2016; Goldberg et al., 2006; Hu et al., 2019; Hu et al., 2009; Parker et al., 2003; Walgren et al., 2003)。さらに、OGT やタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾が、細胞外栄養状態に応答した遺伝子の発現制御に関与することや、細胞のインスリン抵抗性の獲得に寄与することが示唆されており、*O*-GlcNAc 修飾は糖尿病をはじめとした代謝性疾患と密接に関与すると指摘されている (Bond and Hanover, 2015; Butkinaree et al., 2010; Durning et al., 2016; Hanover et al., 2012; Hardivillé and Hart, 2016; Hart, 2019; Lagerlöf et al., 2016; Ruan et al., 2017; Ruan et al., 2013)。この他に、細胞のがん化や、がん細胞の異常な代謝や増殖に、OGT、およびタンパク質 *O*-GlcNAc 修飾が関与することも報告されている (de Queiroz et al., 2014; Fardini et al., 2013; Forma et al., 2014; Park et al., 2017; Peng et al., 2017)。

O-GlcNAc 修飾がリン酸化修飾と同じくセリン/スレオニン残基に付加される修飾であることを根拠に、これらの修飾は拮抗する関係にあると考えられており、実際に *O*-GlcNAc 修飾が同一あるいは近傍に位置するアミノ酸残基のリン酸化を阻害することが

報告されている (Miura et al., 2018; Tan et al., 2017; Wang et al., 2008; Wang et al., 2007; Wang et al., 2010)。この2つの修飾の拮抗関係は、Yin-Yang の関係と呼ばれ、*O*-GlcNAc 修飾の主要な作用機序の1つと考えられている。

動物では、少なくとも真正後生動物において OGT、OGA、および *O*-GlcNAc 化タンパク質が存在することが報告されている (Selvan et al., 2015)。動物以外の生物種において、真菌では、機能を持った OGT、および *O*-GlcNAc 化タンパク質を有する種と有さない種のどちらも存在することが示唆されている (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997; Nakanishi et al., 2017; Oh et al., 2016)。また、植物では、OGA は未発見であるが、OGT と *O*-GlcNAc 化タンパク質が発見されている (Hartweck et al., 2002; Thornton et al., 1999)。これまでにヒストンを含め数百以上のタンパク質において *O*-GlcNAc 修飾の付加が確認されている (Bond and Hanover, 2015; Hart, 2019; Sakabe et al., 2010; Yang and Qian, 2017)。

7. ヒストン *O*-GlcNAc 修飾

現在までに報告されたヒストン *O*-GlcNAc 修飾は、H2AS40Gc、H2AT101Gc、H2A.XT101Gc、H2A.XS139Gc、H2BS36Gc、H2BT52Gc、H2BS55Gc、H2BS56Gc、H2BS64Gc、H2BS91Gc、H2BS112Gc、H2BS123Gc、H3S10Gc、H3T32Gc、H3.3T80Gc、および H4S47Gc の計 16 種類である (図 P-6) (Chen and Yu, 2016; Fong et al., 2012; Fujiki et al., 2011; Hahne and Kuster, 2012; Hirosawa et al., 2018; Hirosawa et al., 2016; Sakabe et al., 2010; Schoupe et al., 2011; Zhang et al., 2011)。このように、全てのコアヒストンはもとより、H2A.X や H3.3 といったヒストン・バリエーション上においても *O*-GlcNAc 修飾が報告されている。しかしながら、特異抗体をはじめとしたヒストン *O*-GlcNAc 修飾の研究ツールがほとんど得られていないことを主な要因として、H2AS40、および H2BS112 以外の部位の *O*-GlcNAc 修飾に関しては、発見の報告のみに留まり、さらなる機能解析は報告されていない。

8. 本研究の目的と内容

以上のように、*O*-GlcNAc 修飾には、いかなるタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾も、その付加と除去を担う酵素がそれぞれ OGT と OGA に限られるという特徴がある。しかし、OGT や OGA の基質・部位特異性を含む、*O*-GlcNAc 修飾の付加と除去の制御機構については未だほとんど明らかにされていない。また、OGT/OGA の機能阻害や過剰発現は多岐にわたる基質タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾に影響を及ぼすため、タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾がもつ生理的機能に関する理解も遅れている。

O-GlcNAc 修飾の生理的機能を理解するためには、様々な *O*-GlcNAc 修飾を一括りにした解析では限界があり、特定のタンパク質の、特定のアミノ酸残基の *O*-GlcNAc 修飾に焦点を絞った解析が必要不可欠である。そこで私は、ヒストンの *O*-GlcNAc 修飾に着目することとした。ヒストンの *O*-GlcNAc は、タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾の中でもとりわけ機能解析が進展していないが、栄養応答と遺伝子発現を直結する可能性のある、エピジェネティクス制御機構としての働きが期待される。本研究では、ヒストン *O*-GlcNAc 修飾研究、さらにはタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾の研究進展のため、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 修飾の特性や機能を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、当研究室で発見・報告したヒストン *O*-GlcNAc 修飾である H2AS40Gc に注目し、共同研究グループによる任意の位置が *O*-GlcNAc 化されたタンパク質の人工合成法を用いて合成された H2S40Gc 化ヒストンを用い、ヌクレオソームの *in vitro* 再構成系による生化学的な解析を行った。第 2 章では、ヒストン *O*-GlcNAc 修飾の機能解析に非常に有用なツールである、新たなヒストン *O*-GlcNAc 修飾特異抗体の樹立を試み、獲得した抗体の特性解析から、新規ヒストン *O*-GlcNAc 修飾を同定した。さらに第 3 章では、前半部において、固定したクロマチンを用いた免疫沈降であるクロマチン免疫沈降 (ChIP) と網羅的な DNA シークエンスを組み合わせた解析法である ChIP-seq を、前章で獲得した抗体を用いて行い、新規 *O*-GlcNAc 修飾が付加されたヌクレオソームのゲノム上における局在領域を解析した。後半部においては、同じく獲得した抗体を用いた解析によって、当該修飾につ

いて細胞外グルコース濃度に対する応答性を検証した。

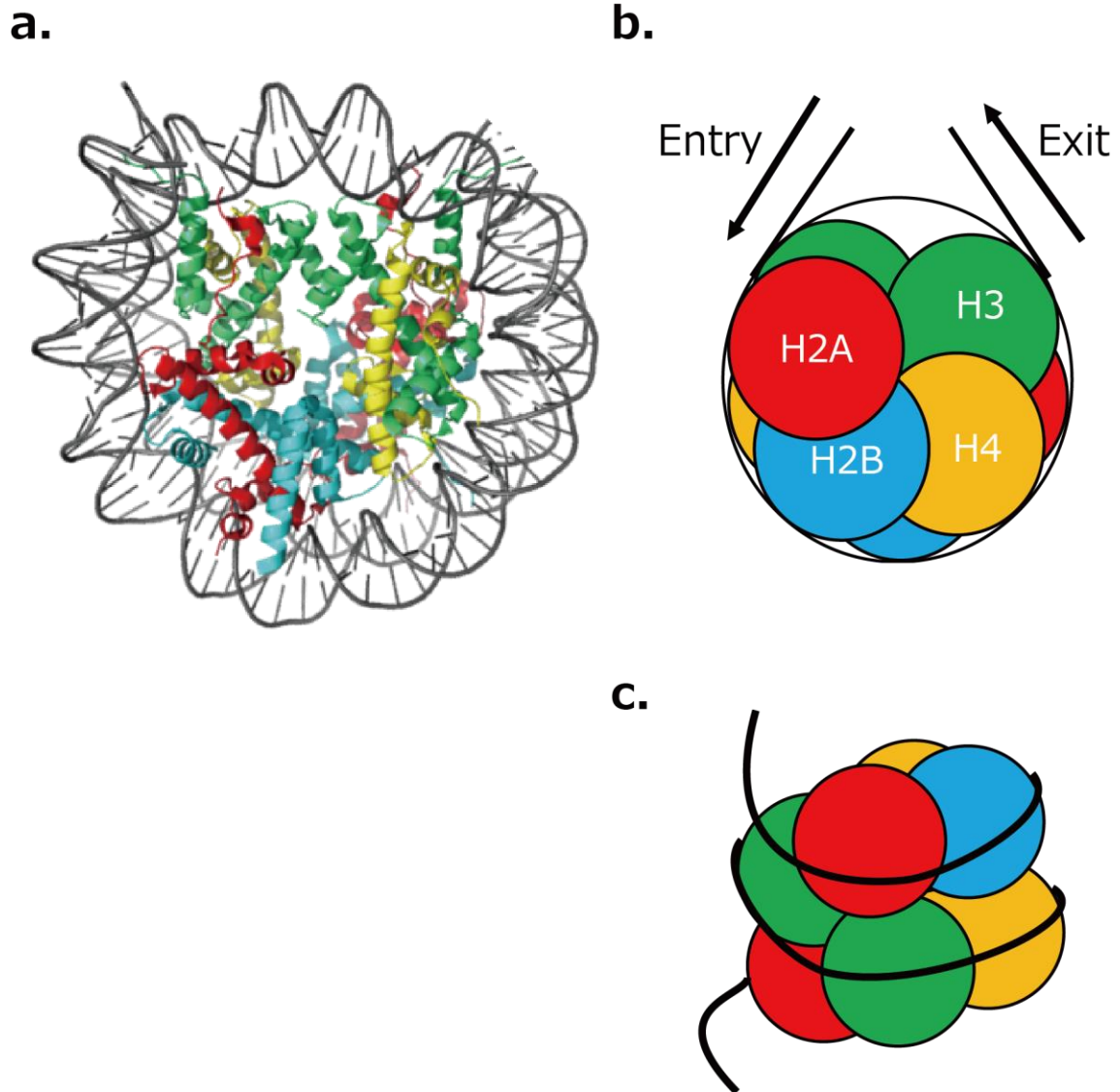
図 P-1

図 P-1 ヌクレオソームの構造と模式図

(a) ヌクレオソームの X 線結晶構造。構造データは日本蛋白質構造データバンク (Protein Data Bank Japan, PDBj) (<https://pdj.org>)より取得した (PDB ID: 3afa, *The human nucleosome structure*) (Tachiwana et al., 2010)。DNA、ヒストン H2A、H2B、H3、および H4 を、黒、赤、青、緑、および黄色でそれぞれ色付けをした。

(b) (a)のヌクレオソームの結晶構造の模式図。色は(a)に準ずる。

(c) (b)のヌクレオソームを側面より見た模式図。

図 P-2

a.

Cluster 1 (Chromosome 13)

H2A1A (<i>hist1h2aa</i>)	LLRQGN Y AQRIGAGA
H2A1B (<i>hist1h2ab</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1C (<i>hist1h2ac</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1D (<i>hist1h2ad</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1E (<i>hist1h2ae</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1F (<i>hist1h2af</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1G (<i>hist1h2ag</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1h (<i>hist1h2ah</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1i (<i>hist1h2ai</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1k (<i>hist1h2ak</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1n (<i>hist1h2an</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1o (<i>hist1h2ao</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
H2A1p (<i>hist1h2ap</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA

Cluster 2 (Chromosome 3)

H2A2A1 (<i>hist2h2aa1</i>)	LLRKG N Y A ERVGAGA
H2A2A2 (<i>hist2h2aa2</i>)	LLRKG N Y A ERVGAGA
H2A2B (<i>hist2h2ab</i>)	LLRKG N Y A ERVGAGA
H2A2C (<i>hist2h2ac</i>)	LLRKG N Y A ERVGAGA

Cluster 3 (Chromosome 11)

H2A3 (<i>hist3h2a</i>)	LLRKG N Y S ERVGAGA
--------------------------	-----------------------------------

b.

(本要約中では都合により削除)

図 P-2 マウスのヒストン *H2A* および *H4* 遺伝子の一覧

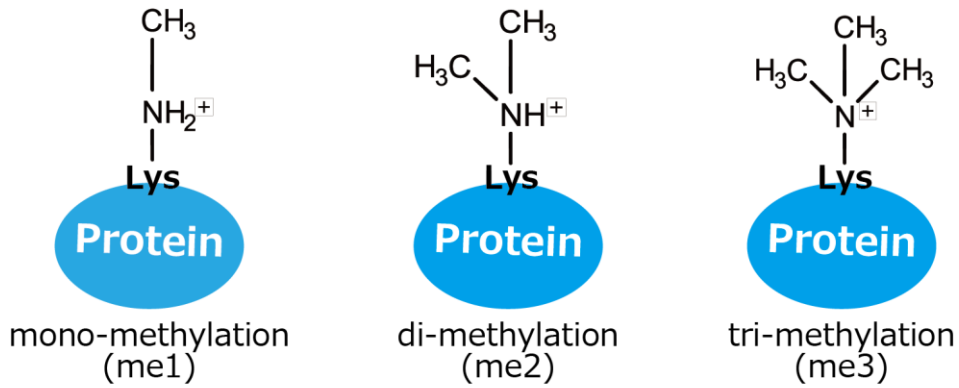
(a) マウスにおいて報告されている全 *H2A* 遺伝子と、コードされているアミノ酸配列の一部。アミノ酸配列は、各 *H2A* 遺伝子がコードするアミノ酸配列のうち、N末端より40番目のアミノ酸残基を中心に15アミノ酸残基を示している。H2ASer40は赤字で示した。アミノ酸配列の異なるもの同士がアイソフォームの関係性となる。同一のアイソフォームに分類される遺伝子名は同一色となるように色分けし、9種類の *H2A* アイソフォームの分類を示した。

(b) 全 *H4* 遺伝子にコードされているアミノ酸配列の一部。アミノ酸配列は、各遺伝子がコードするアミノ酸配列のうち、*H4* の N 末端より#番目のアミノ酸残基を中心に 15 アミノ酸残基を示している。*H4*#を赤字で示した。各アミノ酸配列は、Ensembl genome database (<http://www.ensembl.org>)を参照した。

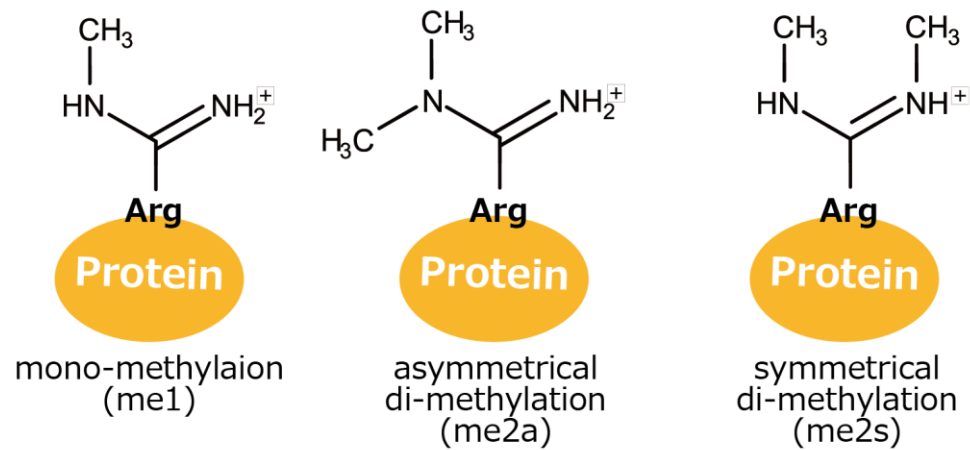
(※図 P-2b (2020 年 12 月提出版の論文中での図 S-P2b に相当)は、学術論文として発表予定の内容の一部抵触するので、本要約中では削除した。)

図 P-3

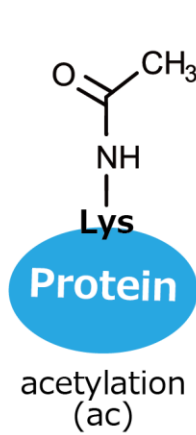
a.



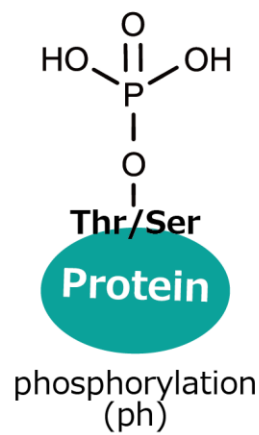
b.



c.



d.



e.

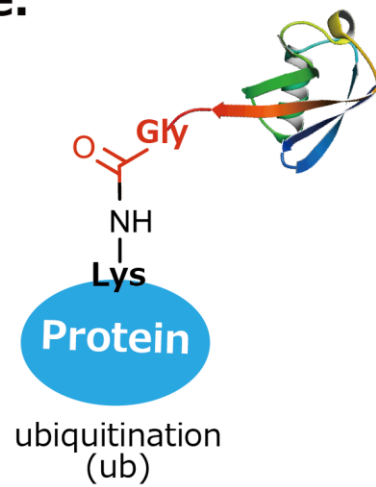
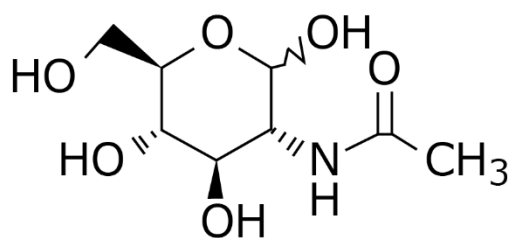


図 P-3 代表的なタンパク質翻訳後修飾の概要図

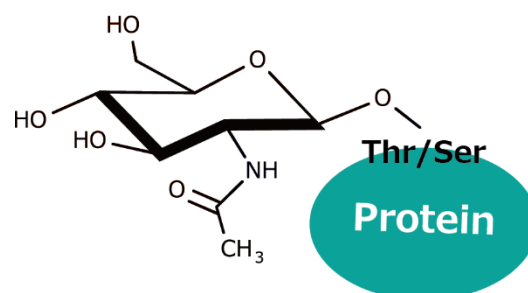
リシン残基のメチル化修飾 **(a)**、アルギニン残基のメチル化修飾 **(b)**、アセチル化修飾 **(c)**、リン酸化修飾 **(d)**、およびユビキチン化修飾 **(e)**の概要図。ユビキチンの構造データは PDBj (<https://pdj.org>)より取得した (PDB ID: 1ubq, *STRUCTURE OF UBIQUITIN REFINED AT 1.8 ANGSTROMS RESOLUTION*) (Vijay-Kumar et al., 1987)。

図 P-4

a.

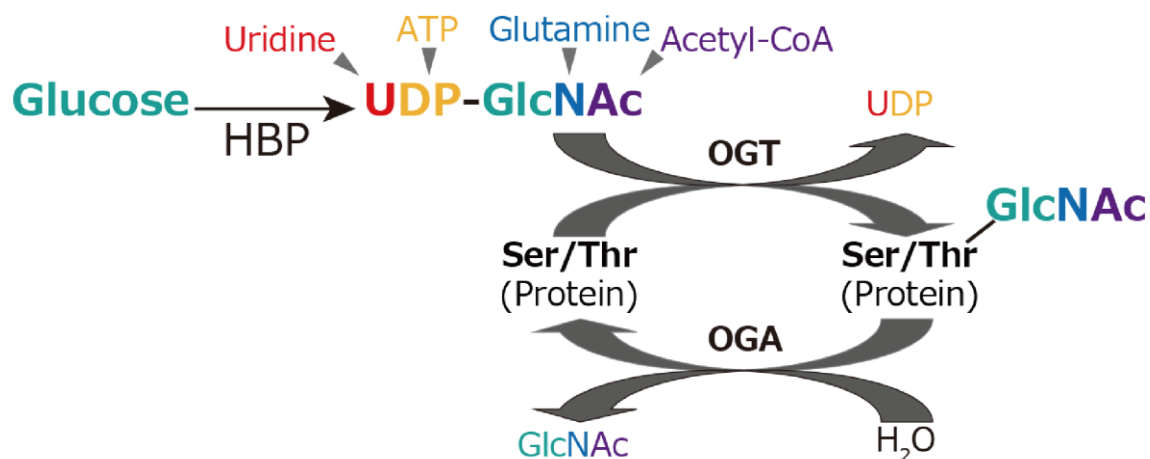


b.

**図 P-4 O-GlcNAc 修飾の概要図**

(a) GlcNAc (正式名称: *N*-アセチル-D-グルコサミン, 組成式: $C_8H_{15}NO_6$, 分子量: 221.2078) の構造式。GlcNAc は、六炭糖およびアミノ糖の一種である。図および GlcNAc の情報は、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.kegg.jp>) の GlcNAc の頁 (C00140) を参照した。

(b) *O*-GlcNAc 修飾の概要図。*O*-GlcNAc 修飾は、タンパク質に含まれる Ser あるいは Thr 残基の側鎖に含まれるヒドロキシ基と、GlcNAc の 1 位の炭素原子に付加されているヒドロキシ基が反応し、*O*-結合型に結合するヒストンをはじめとしたタンパク質翻訳後修飾の 1 つである。

図 P-5**図 P-5 O-GlcNAc 修飾の栄養応答性**

HBP を介した Glucose の代謝とタンパク質への O-GlcNAc 修飾の付加、および除去の概要。O-GlcNAc 修飾の基質である UDP-GlcNAc は、グルコースの一部が代謝される HBP の産物である。UDP-GlcNAc 合成の過程でウリジン、ATP、グルタミン、およびアセチル CoA（それぞれの由来を異なる色で示す）が用いられることから、O-GlcNAc 修飾は栄養センサーとしての働きがあると考えられている。UDP-GlcNAc の GlcNAc 残基は OGT によってタンパク質の Ser あるいは Thr の側鎖のヒドロキシ基に付加される。一方で、タンパク質 O-GlcNAc 修飾は、OGA による加水分解で除去される。

図 P-6

H2A

SGRGKQGGKARAKAKSRSSR
 AGLQFPVGRVHRLLRKGNYS₄₀
 ERVGAGAPVYLAADVLEYLTA
 EILELAGNAARDNKKTRIIP
 RHLQLAIRNDEELNKLGRV
 TIAQGGVLPNIQAVLLPKKT₁₀₁
 ESHHKAKGK

(Thr101 and Ser139 on H2A.X)

H2B

PEPSRSTPAPKKGSKKAITK
 AQKKGKRRKRGRKESYSIY₃₆
 VYKVLKQVHPDTGIS₅₂SKAMG₅₅₅₆
 IMNS₆₄FVNDIFERIASEASRL
 AHYNKRSTIT₉₁SREVQTAVRL
 LLPGELAKHAV₁₁₂SEGTKAVTK
 YTSSK

H3

ARTKQTARK₁₀STGGKAPRKQL
 ATKAARKSAPAT₃₂GGVKKPHR
 YRPGTVALREIRRYQKSTEL
 LIRKLPFQRLVREIAQDFKT
 DLRFQSSAVMALQEACEAYL
 VGLFEDTNLCAIHAKRVTIM
 PKDIQLARRIRGERA

(Ser80 on H3.3)

H4

SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK
 VLRDNIQGITKPAIRRLARR
 GGVKRI₄₇SGLIYEETRGLVKV
 FLENVIRDAVTYTEHAKRKT
 VTAMDVVYALKRQGR_TLYGF
 GG

図 P-6 各コアヒストンのアミノ酸配列と現在までに発見されたヒストン O-GlcNAc 修飾

O-GlcNAc 付加が報告されているアミノ酸残基を、各コアヒストンのアミノ酸配列上に太字で示す。H2A および H3 のバリエーションである H2A.X と H3.3 の、O-GlcNAc 修飾が報告されているアミノ酸残基については、それぞれ H2A および H3 のアミノ酸配列下部に示した。

図に示すアミノ酸配列は、マウスの H2A3a、H2B3a、H31a、および H41a のものを示している (Ensembl genome database, <http://www.ensembl.org> を参照)。

—空白のページ—

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

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、

あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5 年以内 to 出版予定)

第 2 章

新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4#Gc 特異抗体の樹立と 当該抗体の特性解析

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、
あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5 年以内に出版予定)

第 3 章

新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4#Gc 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

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、
あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5 年以内 to 出版予定)

総合討論

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、
あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5年以内に出版予定)

材料と方法

材料と方法

(特記事項)

特に記載がない限り、試薬は富士フイルム 和光純薬株式会社 (旧：和光純薬工業株式会社)より購入した。プライマーは Sigma-Aldrich Japan または FASMAC より購入した。用いた抗体の情報、プライマーの塩基配列、合成ペプチドの配列、および公開シーケンスデータの情報は、表にまとめて記した [表 M-1 抗体の情報、表 M-2 プライマーの情報、表 M-3 合成ペプチドの情報、表 M-4 用いた公開シーケンスデータの情報 (ChIP-seq)、表 M-5 用いた公開シーケンスデータの情報(ChIP-seq 以外)]。

I. 用いた培養細胞とその培養法

mES 細胞、mTS 細胞、hiPS 細胞、および HeLa 細胞の培養は、CO₂ インキュベータ (SANYO)を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。Sf9 細胞の培養はインキュベータ (SANYO)を用いて、27°Cの条件下で行った。培養には全て培養皿を使用した。使用した培養皿は、特に記載がない場合、100 mm 培養皿 (日本ジェネティクス)であり、培地量を 10 ml として用いた。

(1) mES 細胞の培養

1-i. mES 細胞の未分化維持培養

本研究で用いた mES 細胞株は、129S4/SvJae マウス胚盤胞期胚由来の ES-J1 株であり、American Type Culture Collection (ATCC)より購入した。mES 細胞の培養には、通常時は 100 mm ゼラチンコート培養皿を用いた。Gelatin from porcine skin (Sigma-Aldrich Japan) を 0.1% w/v となるように MilliQ 水に溶解し、オートクレーブで滅菌したものをを用いて、100 mm ゼラチンコート培養皿を作製した。mES 細胞用培地は、通常時では、終濃度が 15% FBS

(BIOWEST)、1% Penicillin-Streptomycin Solution (x100)、0.1 mM 2-Mercaptoethanol、2 mM L-Glutamine、1 mM Sodium Pyruvate、1% MEM Non-essential Amino Acid Solution となるように調整した DMEM (high glucose)を用いた。グルコース濃度を変えて培養する際には、通常培養用の培地と同じ終濃度で各サプリメントを添加した DMEM (no glucose)を、45% D-(+)-Glucose Solution(Sigma-Aldrich Japan)を用いて 1 mM、5 mM、10 mM、および 25 mM グルコース濃度となるように調整した上で用いた。mES 細胞を未分化状態に保つため、終濃度が 1,500 U/ml となるように白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) (オリエンタル酵母)を加えた。

播種した日を 0 日とし、1 日目に培地交換、2 日目に継代を行った。その後はコンフルエントにならないよう、2 日おきに継代を行った。継代の際には、 1×10^6 個の細胞を 10 ml の培地中に懸濁し、各培養皿に播種した。培養した細胞は、0.05% Trypsin-1 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) in PBS (-) (Trypsin-EDTA(Invitrogen)、PBS (-) (PBS (-) の組成: 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 10 mM di-Sodium hydrogen phosphate, 1.8 mM potassium dihydrogen-phosphate)、EDTA-4Na を用いて作製)を用いて培養皿から細胞をはがして回収し、使用するまで -80°C で凍結保存した。

1-ii. mES 細胞への強制発現ベクターの遺伝子導入

mES 細胞への強制発現ベクターの遺伝子導入の際には、培養皿は 6 well 培養皿 (NUNC)(0~2 日目)および 100 mm 培養皿 (2~4 日目)を用い、試薬は Lipofectamine 2000 (Thermo fisher)および Opti MEM (gibco)を用いて行った。6 well 培養皿および 100 mm 培養皿は、0.1% w/v ゼラチン溶液を用いてゼラチンコート処理をした上で用いた。6 well 培養皿に 1 well あたり 2×10^5 個の mES 細胞を通常培養時の mES 細胞用培地 (LIF 添加) 2 ml に懸濁して播種した。1 日後 (1 日目)に、PBS (-)で 2 回洗浄した上で、1 well あたり 4 μg の強制発現ベクター、および 5 μl の Lipofectamine 2000 を含んだ 500 μl の Opti MEM を加えて、強制発現ベクターの遺伝子導入を行った。CO₂ インキュベータに 4 時間静置した後、各 dish の Opti MEM を除去後、終濃度が 15% FBS、0.1 mM 2-Mercaptoethanol、2 mM L-Glutamine、1 mM Sodium Pyruvate、1% MEM Non-essential Amino Acid Solution となるように調整した、

Penicillin/Streptomycin free の DMEM (high glucose) を 1 well あたり LIF を添加した上で 2 ml 加えた。2 日目に 2 well 分の細胞を 1 つにまとめて、1,500 U/ml の LIF および 2 $\mu\text{g/ml}$ の puromycin を含んだ 10 ml の通常培養時の mES 細胞用培地に懸濁し、100 mm 培養皿 1 枚に播種した。3 日目に培地交換を行い、同じく LIF、および 2 $\mu\text{g/ml}$ の puromycin を含んだ 10 ml の通常培養時の mES 細胞用培地中で培養した。4 日目に 0.05% Trypsin-1 mM EDTA in PBS (-) を用いて培養皿より細胞を剥離した。剥離した細胞を 1 つにまとめて 10 ml の mES 細胞用の培地に懸濁した。細胞懸濁液 10 μl と trypan blue (Invitrogen) 10 μl をよく混合し、うち 10 μl を用いて Countess (Invitrogen) により生細胞数および生細胞の割合を測定した。残りの細胞は、使用するまで -80°C で凍結保存した。

(2) mTS 細胞の未分化維持培養

本研究で用いた mTS 細胞株は、当研究室で樹立された C57BL/6N マウス胚盤胞期胚 (胚性 3.5 日) 由来の TS-#4 株である。TS 細胞の培養には、通常時は 100 mm 培養皿を用いた。TS 細胞用培地は、通常時では終濃度が 20% FBS (BIOWEST)、1% Penicillin-Streptomycin Solution (x100)、0.1 mM 2-Mercaptoethanol、2 mM L-Glutamine、1 mM Sodium Pyruvate となるように調整した RPMI-1640 (high glucose) を用いた。グルコース濃度を変えて培養する際には、通常培養用の培地と同じ終濃度で各サプリメントを添加した RPMI-1640 (no glucose) を、45% D-(+)-Glucose Solution を用いて 1 mM、5 mM、11 mM、および 25 mM グルコース濃度となるように調整した上で用いた。TS 細胞を未分化状態に保つため、終濃度がそれぞれ 25 $\mu\text{g/ml}$ FGF4、10 ng/ml Activin A (R&D)、および、1 $\mu\text{g/ml}$ Heparin (Sigma-Aldrich Japan) となるように添加した。

播種した日を 0 日とし、1 日目に培地交換、2 日目に継代を行った。その後はコンフルエントにならないよう、継代してから 2 日目に培地交換し、4 日目に継代を行った。継代の際には、 1×10^5 個の細胞を 10 ml の培地中に懸濁し、各培養皿に播種した。培養した細胞は、0.05% Trypsin-1 mM EDTA in PBS (-) を用いて培養皿から細胞を剥離してから回収し、使用するまで -80°C で凍結保存した。

(3) hiPS 細胞の培養

本研究で用いた hiPS 細胞は、京都大学再生医科学研究所 (現 ウイルス・再生医科学研究所)の山中伸弥教授のグループによって樹立された 201B7 株であり、文部科学省の National Bio Resource Project (NBRP)を通じて、理化学研究所バイオリソース研究センター (RIKEN BRC)より提供を受けた (Takahashi et al., 2007)。hiPS 細胞用培地は、ReproStem 培地 (ReproCELL, Japan)を用いた。また、未分化状態を維持するため、hiPS 細胞は単層の mitomycin C 処理された STO/Neo resistant/LIF (SNL)フィーダー細胞上で培養し、終濃度が 5 ng/mL となるように bFGF を培地に加えた。培養皿は特に記載がない限り、60 mm 培養皿 (FALCON)を使用した。

hiPS 細胞を播種する前日に、約 5×10^5 個 (60 mm 培養皿)あるいは約 1.5×10^6 個 (100 mm 培養皿)の SNL フィーダー細胞を培養皿に播種した。SNL フィーダー細胞の培地 (フィーダー培地)は、終濃度が 10% FBS、2 mM L-Glutamine、1% Penicillin-Streptomycin Solution (x100)となるように調整した DMEM (high glucose)を用いた。フィーダー培地を除去後、hiPS 細胞用培地と共に hiPS 細胞を播種した。培地交換は毎日行い、細胞継代は約 3 日おきに行った。hiPS 細胞剥離液は、20% knockout serum replacement (KSR) (Thermo), 0.25% trypsin, 1 mg/mL collagenase IV, 1 mM CaCl₂ in PBS (-)溶液を使用した。細胞播種時は、継代前の約 1/3 相当量の hiPS 細胞を培養皿に播種をした。

(4) HeLa 細胞の培養

HeLa 細胞は、ATCC より購入した。HeLa 細胞用培地は、10% FBS、2 mM L-Glutamine、1 mM Sodium Pyruvate、1% MEM Non-essential Amino Acid となるように調整した DMEM (high glucose)を用いた。mES 細胞の継代方法と同様の手順で 4 日おきに継代し、細胞播種時に 60%コンフルエントになるように、HeLa 細胞を 100 mm 培養皿に播種をした。

(5) Sf9 細胞の培養

Sf9 細胞は、Gibco より購入した。Sf9 細胞用培地は、FBS が 10%の終濃度になるように加えた Grace insect medium (GIBCO)を用いた。HeLa 細胞と同じく、約 4 日でコンフルエントになる。コンフルエントになった際に継代を行った。細胞をはがすときは、培地を取り除いた後、培養液で培養皿を洗い流すようにかけて、浮いてきた Sf9 細胞を遠沈管に回収した。mES 細胞、および HeLa 細胞の継代の方法と同様の手順で継代し、細胞播種時に 80%コンフルエントになるように、Sf9 細胞を 100 mm 培養皿に播種した。

(6) hES 細胞について

本研究の ChIP-seq で使用した hES 細胞のクロマチンは、H9 株の hES 細胞由来である。細胞より抽出され、固定化されたクロマチンを、ウィスコンシン州立大学マジソン校の鈴木正敏博士より分与いただいた。

II. 用いた動物の情報

ネットアイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の肝臓は、東京大学大学院理学系研究科分子生物学研究室の平良眞規博士と山元孝佳博士より分与していただいた。ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、慶應義塾大学の牧野伸司博士と榎本博一博士より分与していただいた。*X. tropicalis* の肝臓は、解剖用ハサミを用いて細かく切り、2 ml tube に取り分け、液体窒素で凍結し、使用するまで-30°Cで保存した。*D. rerio* は、1 匹ずつ 2 ml tube 内に入れ、液体窒素で凍結し、使用するまで-30°Cで保存した。

III. ヒストン O-GlcNAc 修飾に対する新規特異抗体の作製

抗体産生細胞の作製、ELISA による 1 次スクリーニング、抗体産生細胞のクローニング、抗体のサブタイプの同定、および H4#GP カラムの作製はジェノスタッフ株式会社に依頼した。抗体産生の抗原や ELISA などで使用する各合成糖付加ペプチド (Glyco Peptides, GP)、および合成糖非付加ペプチド (Naked Peptides, NP)については、ペプチド研究所に作製を依頼した。本研究で使用した Glyco Peptides および Naked Peptides の配列は表にまとめて記した (表 M-3)。

(1) 抗体産生細胞クローンの作製と ELISA による 1 次スクリーニング (※外部委託)

4 種類の Glyco Peptides を抗原、GST をキャリアーとして、マウス由来の抗体産生細胞クローンを作製した。作製に用いたマウスの系統は BALB/cA であり、ミエローマ細胞株は P3U1 である。作製した抗体産生細胞クローン由来の培養上清を、抗原に用いた 4 種類の Glyco Peptides の混合物、および抗原に用いた Glyco Peptides と同じアミノ酸配列の Naked Peptides を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)による 1 次スクリーニングに供した。Glyco Peptides の混合物に比較的高い反応性を示し、かつ Naked Peptides の混合物に比較的低い反応性を示した 9 種類の抗体産生細胞クローンを選択した。

(2) 抗体産生細胞クローンが産生する抗体のアイソタイプ等の同定 (※外部委託)

培養上清を用いた ELISA による 1 次スクリーニングを基に選択した 9 種類の抗体産生細胞クローンによって産生される抗体のアイソタイプ、サブタイプ、および軽鎖の種類と同定には、Iso Strip マウスモノクローナル抗体アイソタイプピングキット (Roche)が用いられた。

(3) 抗体産生細胞クローンの Western Blotting による 2 次スクリーニング

Western Blotting で利用可能な抗体を獲得するため、抗体産生細胞クローンの 2 次スクリーニングとして、mES 細胞から抽出した粗精製ヒストンを電気泳動に供した Western Blotting を行った。各抗体産生細胞クローンより得られた培養上清を 1 次抗体として使用した。プロトコルは、後述の”VI. 培養細胞から抽出したタンパク質を用いた実験および解析 (4) SDS-PAGE および Western Blotting”に記載した方法に従った。この結果、20H3 抗体を選択した。

(4) 20H3 抗体の精製

4-i. Protein G カラムによる抗体精製

20H3 抗体産生細胞クローンの培養上清を、MAbTrap Kit (GE Healthcare)によるアフィニティークロマトグラフィーを用いた抗体精製に供した。以下特に記載がない限りは、MAbTrap Kit 付属の試薬および器具を用いた。作業は全て氷上で行った。最初に、Protein G カラムを、3 ml の Binding buffer (20 mM Sodium phosphate, pH 7.0)により平衡化した。計 35 ml の 20H3 抗体産生細胞クローンの培養上清を、5 ml ずつ平衡化したカラムに透過させ、続いて 20 ml の Binding buffer による洗浄を行った。洗浄後、Elution buffer (100 mM Glycine-HCl, pH 2.5)により溶出画分を 1 ml ずつ分取した (Elution 1~5)。酸による変性を防ぐため、分取後即座に Neutralizing buffer (1.0 M tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-HCl , pH 9.0) を 0.25 ml 加え、中和した。分取した Elution 1~5 画分、Wash 画分、Flow Through 画分、および培養上清の各タンパク質濃度を、分光光度計 (ND-1000, nanodrop) を用いて測定した。

4-ii. H4#GP カラムによる抗体精製

H4 の N 末端から#番目のアミノ酸である Ser/Thr の O-GlcNAc 修飾 (H4#Gc)に相当する Glyco Peptides である H4#GP を結合させたセファロースビーズ 3 ml を充填したアフィニティークラム (H4#GP カラム)を使用した、20H3 抗体産生細胞クローンの培養上清からの抗体精製を行った。以下の作業はすべて氷上で行った。ミリ Q 水 10 ml でカラムを洗浄した後、10 ml の TBS (37 mM sodium chloride (NaCl), 20 mM Tris-HCl (pH 7.6))でカラムの

pH を平衡化した。150 ml の 20H3 抗体産生細胞クローンの培養上清を平衡化したカラムに透過させた。カラムを通過した培養上清を回収し、再度カラムを通過させることを2回繰り返した (→Flow Through 画分)。培養上清がカラムを通過した後、順に TBS 10 ml、洗浄 buffer (1 M NaCl, 1% Triton-100 in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) 30 ml (→Wash 画分)、TBS 30 ml、0.15 M NaCl 10 ml でカラムを洗浄した。溶出 buffer (0.1 M Glycine-HCl, pH 2.5) を 3 ml ずつ、計 20 ml カラムに加え、あらかじめ 50 μ l の 1 M Tris が加えられた 1.5 ml tube (WATSON) に約 1 ml ずつ回収した (→Elution 1~20)。Elution 1~20、Wash 画分、Flow Through 画分、および培養上清の各タンパク質濃度を、分光光度計を用いて波長 280 nm の吸光度を測定することによって測定した。

(5) Dot Blot

Nitrocellulose Membrane (Thermo Scientific) 上に、各サンプルを約 2 cm 間隔で 3 μ l ずつ滴下し風乾した。PBS blocking buffer (5% BSA (Sigma-Aldrich Japan), 0.05% Tween 20 in PBS (-)) に浸し、室温で 30 分間振盪してブロッキングした。PBS-T で 5 分間 3 回洗浄した後、alkaline phosphatase (AP) 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) を 1:5,000 に希釈して加え、室温で 1 時間振盪した。PBS-T で 5 分間 3 回洗浄した後、AP の基質を含む発色液 NBT/BCIP stock solution (Roche) を加えた。発色後、MilliQ 水で 3 回洗浄し、乾燥させ観察した。

(6) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

96 穴プレート (Sumitomo Bakelite) の各 well に抗原となる合成ペプチドを PBS(-) で 5 μ g/ml に希釈して加え、37°C で 1 時間インキュベータ (SANYO) に静置した。PBS-T で 3 回洗浄した後、PBS Blocking buffer を加えて室温で 30 分間振盪した。PBS-T で 3 回洗浄した後、各 well に 50 μ l ずつ 1 次抗体相当溶液 (20H3 抗体産生細胞クローンの培養上清原液、20H3 抗体 H4#GP カラム精製時の Flow Through 画分溶液、PBS (-) で 1,000 倍希釈した 20H3 抗体 H4#GP カラム精製時の各溶出画分溶液、あるいは PBS(-) で 1 μ g/ml に調整した 20H3 抗体または 20B2 抗体溶液) を加え、4°C で 1 晩振盪させた。PBS-T で 3 回洗浄

した後に、horseradish peroxidase (HRP)標識 Anti-mouse IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) を PBS-T で 1:5,000 に希釈して加え、室温で 1 時間振盪させた。PBS-T で 3 回洗浄した後、peroxidase の基質を含む発色液 OPD substrate (Thermo Scientific)を加えて 37°Cでインキュベーターに静置した。静置してから 15 分後に 1 mol/l H₂SO₄を加え、酵素反応を停止させた。マイクロプレートリーダー (Bio Rad)で各 well の 490 nm における吸光度を測定した。

IV. 免疫染色

(1) 培養細胞の準備

本研究では、mES 細胞のみを免疫染色に使用した。培養皿は、カバーガラス (MATSUNAMI) を入れた上で、0.1% ゼラチンでコーティングした 4 well 培養皿 (NUNC) を用いた。mES 細胞を播種時に約 8 割コンフルエントとなるように培養皿に播種した後、使用日まで 37°C、5% CO₂ でインキュベートした。細胞固定の前には、PBS (-) で 2 回洗浄作業を行った。洗浄作業後、20H3 抗体使用時の細胞固定条件の条件検討の際には、メタノール、4% パラホルムアルデヒド in PBS (-) (PFA 溶液)、3% PFA 溶液あるいは 2% PFA 溶液を 200 µl/well で加え、室温で 30 分間固定した。それ以外の場合には、2% PFA 溶液を 200 µl/well で加え、室温で 30 分間固定した。固定後には、PBS (-) で 2 回洗浄作業を行った上で、膜透過処理を行った。20H3 抗体使用時の膜透過処理条件の条件検討の際には、0.2% Triton X-100 in PBS (-)あるいは 0.5% Triton X-100 in PBS (-)を 200 µl/well で加え、室温で 30 分間反応させた。それ以外の場合では、0.2% Triton X-100 in PBS (-)を 200 µl/well で加え、室温で 30 分間反応させた。PBS (-) によって 2 度洗浄した後、PBS blocking buffer を加えて、室温で 2 時間静置し、ブロッキング処理を行った。

(2) 抗体反応

ブロッキングに続いて、1次抗体反応を行った。免疫染色には20H3抗体(抗H4#Gc抗体)と正常マウスIgG(全分子, 精製品)を用いた。抗体の希釈にはPBS blocking bufferを使用した。抗体は、細胞固定および膜透過処理の条件検討時には終濃度10 µg/mlとなるように添加した。また、抗体濃度の条件検討時には、終濃度が10 µg/ml、5 µg/ml、2 µg/ml、あるいは1 µg/mlになるように抗体を添加した。条件検討後のアッセイには、終濃度2 µg/mlで用いた。いずれ条件においても4°Cで1晩静置して1次抗体反応を行った。

1次抗体反応後、細胞を0.05% Tween 20-PBS (-) (PBS-T)に10分間室温で静置して3度繰り返して洗浄した上で、2次抗体反応を行った。2次抗体はいずれの場合もAlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen)を終濃度2 µg/mlで使用し、希釈にはPBS blocking bufferを用いた。遮光した上で、室温で1時間静置して2次抗体反応を行った。

2次抗体反応後、1次抗体反応後と同じ方法で洗浄を行った。その後、PBS (-)を用いて1 µg/mlに希釈したDAPI (Doujindo)溶液に浸して、遮光下の室温で20分間反応させて細胞核染色を行った。

(3) 蛍光および明視野観察

DAPI溶液との反応後、細胞をPBS (-)に5分静置する置換洗浄を行った上で封入を行った。封入液にはいずれの場合もVECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories)を用いて、スライドガラスを作製した。スライドガラスの蛍光および明視野観察には、共焦点レーザー顕微鏡LSM700 (ZEISS)を使用した。

V. 様々なタンパク質抽出法

(1) 培養細胞および動物組織からのヒストン抽出と精製

ヒストンの抽出および精製には Histone Purification MINI kit (Active Motif) を用いた。キット付属のプロトコルに従い、特に記載がない場合 Histone Purification MINI kit 付属の試薬および器具を用いた。

培養細胞ペレット ($2.0\sim 4.0 \times 10^7$ 個の細胞)、あるいは凍結粉碎した動物組織 (2 ml tube の約 1/10 量)が入った tube 内に Extraction Buffer を 0.8 ml 加え、十分に懸濁を行った後、rotator (BIO CRAFT) を用いて 4°C で 1 晩回転混和し、遠心機 (Tomy) を用いて 10 分、 $20,400 \times g$, 4°C の条件で遠心分離を行った。上清を別の tube に回収し、移した上清の 4 分の 1 量の 5 x Neutralization Buffer を加え中和した。中和されているかどうかは pH 試験紙で確認した。中和反応後のサンプルを、ヒストン抽出物 (Crude Histone) とした。Crude Histone は使用するまで、 -30°C で保存した。

Crude Histone からヒストンの精製を行う場合は、ヒストンの抽出後以下の作業を行った。まず、ヒストン精製用 column に 0.5 ml の Equilibration Buffer を加え、3 分、 $600 \times g$, 4°C の条件で遠心を行い、透過液を取り除いた。この作業を 3 回行い、column を平衡化した。次に、0.5 ml の Crude Histone を平衡化 column に加え、3 分、 $600 \times g$, 4°C の条件で遠心した後、Flow Through fraction を回収した。Flow Through 回収後、0.5 ml の Histone Wash Buffer をカラムに加え、3 分、 $600 \times g$, 4°C の条件で遠心した。遠心後 column を通過した溶液を Wash fraction として回収した。さらに 2 回同様の手順で洗浄を行った。洗浄後、100 μl の Elution Buffer を column に加え、3 分、 $600 \times g$, 4°C の条件で遠心し、Elution fraction を回収した。この作業を 5 回行った。ここまでで回収したすべての fraction は、使用するまで -30°C で保存した。

(2) 細胞質画分および核画分タンパク質溶液の抽出

細胞質画分および核画分のタンパク質の抽出には、Lysopure Nuclear and Cytoplasmic Extraction kit を用いた。プロトコルは kit 付属のプロトコルに従った。1 x 10⁷ の細胞数のペレットに対して 500 µl の Nuclear fractionation buffer を加え、よくピペッティングをした。10 分間氷上で静置し、10 秒間ボルテックスを行ってよく混合してから、10 分、500 ×g、4°C の条件で遠心した。遠心後、上清を Protein LoBind 1.5 ml tube (ependolf) に取り分け、さらに 10 分、20,000 ×g、4°C の条件で遠心して得られた上清を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube に回収した (→細胞質画分タンパク質溶液)。ペレットは、2 秒間ボルテックスを行った後、SDS lysis buffer をペレットの量に合わせて 50~200 µl 加えた。Bioruptor (COSMO Bio) を用いて、超音波破碎を高速、[30 秒 on, 30 秒 off] × 60 cycles の設定で行い、可溶化させた後、10 分、20,000 ×g、4°C の条件で遠心して、上清を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube に回収した (→核画分タンパク質溶液)。細胞質画分および核画分タンパク質溶液は、使用するまで -30°C で保存した。

(3) 全細胞溶解液(Whole cell lysates)の抽出

3-i. SDS lysis buffer を用いた抽出方法

細胞ペレットの量に応じて、100 あるいは 200 µl の Lysopure Nuclear and Cytoplasmic Extraction kit に付属する SDS lysis buffer を加えた後、20 秒間ボルテックスを行ってよく攪拌させた。細胞ペレットを可溶化させるため、高速、[30 秒 on, 30 秒 off] × 60 cycles の設定で Bioruptor を用いて超音波破碎を行った後、10 分、20,000 ×g、4°C の条件で遠心して、上清を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube に回収した。使用するまで -30°C で保存した。

3-ii. RIPA lysis buffer を用いた抽出方法

1 x 10⁷ 個の細胞ペレットに対して、300 µl の RIPA lysis buffer (コスモバイオ) を加え、ピペッティングによってよく懸濁した。3 µl の 100 mM PMSF Solution (Active motif) を加え、30 分間氷上に静置した。20 秒間ボルテックスした後、Bioruptor を用いて、超音波

破碎を高速, [30 秒 on, 30 秒 off]×60 cycles の設定で行い、可溶化させた。超音波破碎後、10 分, 20,000 ×g, 4°Cの条件で遠心して、上清を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube に回収した。使用するまで-30°Cで保存した。

VI. 培養細胞から抽出したタンパク質を用いた実験および解析

(1) Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

1-i. RP-HPLC によるヒストン分画

各ヒストンはアミノ酸の組成やヒストン修飾状況の違いに応じて、疎水性の強さが異なっている。このため、細胞から抽出したヒストンの精製物を RP-HPLC にかけると、ヒストン修飾を維持しつつ疎水性の違いに応じて各ヒストンを分取することができる(図 M-1) (Hirosawa et al., 2016; Shechter et al., 2007)。

1-ii. RP-HPLC のための準備

Spectra/Por Micro Float-A-Lyzer Dialysis Device (Spectrum Laboratories) を用いて、精製ヒストンの溶媒を水に置換した。MilliQ 水とシリンジ (TERUMO)を用いて Dialysis Device の内部を十分に洗浄した後、新しいシリンジを用いて透析するサンプルを Dialysis Device 内に 100 µl 注入した。あらかじめ 4°Cに冷やした MilliQ 水に浮かべ、スターラー (IWAKI) を用いて攪拌しながら 4°Cで 2 時間置いた。2 時間経過した後、4°Cに冷やした新しい MilliQ 水に取り換え、そのまま 4°Cで 1 晩置いた。翌日、シリンジを用いて 2 ml tube にサンプルを回収した。

透析に続いて、濃縮を行った。濃縮用のセルには、Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters Ultracel-3k (Millipore) を用いた。濃縮したいサンプルを濃縮用のセルに移し、10 分, 5,100 ×g, 4°Cの条件で 1 度目の遠心を行った。1 度目の遠心後は、100 µl に濃縮されるまで 4°C, 5,100 ×g で遠心を行った。100 µl まで濃縮が終わった後、濃縮用セルから 2 ml tube に移した。すぐに用いない場合は、使用するまで-30°Cで保存した。

1-iii. BCA 法によるタンパク質濃度測定

上記の方法を用いて、透析および濃縮したヒストン精製物について、Bicinchoninic acid (BCA) タンパク質定量法 (BCA 法) によってサンプル中のタンパク質濃度を測定した。96 穴プレート (Bio research) の各 well に、標準液もしくはサンプルを 5 μ l ずつ分注した。標準液には、BSA を 2,000 ng/ml、1,500 ng/ml、1,000 ng/ml、750 ng/ml、500 ng/ml、250 ng/ml の濃度となるように MilliQ 水で希釈した BSA 溶液と、MilliQ 水 (0 μ g/ml) を用いた。BCA assay kit 付属の Reagent A と Reagent B の 50:1 混合溶液を標準液もしくはサンプルの入った well に 100 μ l ずつ加えた。プレートにシールをし、プレートシェーカー (NISSIN) で 30 秒間振動混和させた。振動混和をした後、スピンドウンし、インキュベータ (SANYO) を用いて 37°C で 30 分間反応をさせた。スピンドウン後にシールを外して、マイクロプレートリーダー (Bio Rad) を用いて 570 nm の波長の吸光度を計測し、タンパク質濃度を測定した。測定結果を元に、RP-HPLC に供するタンパク質量を決定した。

1-iv. RP-HPLC によるヒストン分画

本研究では 50 μ g のヒストン精製物を RP-HPLC に供した。LC-10Ai HPLC system (Shimadzu) に取り付けられた Aeris Widepore 3.6 μ m XB-C8 column (Phenomenex) を用いて、ヒストン分画を行った。最初に Buffer A (5% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)) により、HPLC の column の平衡化を行った。続いてヒストン分画を直線勾配溶出によって行った。Buffer B (90% acetonitrile, 0.1% TFA) の濃度変化を、次ページの表で示したタイムラインのように設定した。流速 0.5 ml/分で流して溶出させた。溶出液は 30 秒ごとに分けて回収した。溶出の様子は、214 nm UV の吸光度によって観察した。分取により得られた分画は使用するまで -30°C で保存した。

時間 (分)	Buffer B (%)
5	0
15	35
25	35
62.5	50
62.51	65
72.5	100
80	100
81	0
95	Stop

(RP-HPLC で使用したタイムライン)

(2) SDS-PAGE および Western Blotting

すべての Western Blotting において、タンパク質分離には sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用いた。使用したゲルはいずれの場合も 15% SDS-PAGE ゲルであり、MiniPROTEIN system Glass plates (BIO-RAD) と 15 well 1.0 mm 厚の comb を用いて作製した。分離ゲルは、1.17 ml のオートクレーブ滅菌 MilliQ 水 (滅菌水)、2.5 ml の 30% Acrylamide/Bis solution 37.5:1 (BIO-RAD)、1.25 ml の 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)、50 μ l の 10% SDS、25 μ l の 10% Ammonium persulfate (APS) (BIO-RAD)、および 2.5 μ l の N,N,N',N',-tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED) (BIO-RAD) を混合して作製した。濃縮ゲルは、1.47 ml の滅菌水、0.4 ml の 30% Acrylamide/Bis solution 37.5:1、0.625 ml の 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、25 μ l の 10% SDS、12.5 μ l の 10% APS、および 2.5 μ l の TEMED を混合して作製した。Running buffer は、25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS 溶液を用いた。

アプライするサンプルの濃度調整は、”VI. 培養細胞から抽出したタンパク質を用いた実験および解析 (1) Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) 1-iii. BCA 法によるタンパク質濃度測定”に記載した BCA 法によるタンパク質濃度測定結果を参照して行った。アプライするサンプルは、Lane marker reducing sample buffer (Thermo) と 5:3 の割合で混合し、ボルテックスおよびスピンドウンをした後、100°C で 3 分間煮沸した。この後、再度ボルテックスし、スピンドウンした。用いるゲルを、泳動槽 (BIO-RAD) にセットし、Running buffer を適量加え、サンプルおよびマーカー (WIDE-VIEW Prestained Protein Size Marker III) をアプライした。その後、200 V で 60 分間電気泳動を行った。

電気泳動後、ゲルから、メタノールに浸し Transfer buffer (20% Methanol in Running Buffer)に浸した poly vinylidene difluoride membrane (Millipore)へタンパク質転写を行った。転写装置 (BIO CRAFT)を用いて、45分 15V の条件で転写を行った。メンブレンへの転写を確認するため、Ponceau S Solution (Sigma-Aldrich Japan)を用いてメンブレンを染色した。MilliQ 水を用いて Ponceau S Solution をメンブレンから洗い流した後、ブロッキングを行った。抗 O-GlcNAc 修飾抗体 (RL2 抗体)を 1 次抗体として用いるときは、5%スキムミルク TBS blocking buffer (5% スキムミルク, 0.05% Tween-20 in TBS)を用いた。20H3 抗体を TBS 系の buffer で用いる際や、抗 FLAG 抗体、および抗 β actin 抗体を 1 次抗体として用いるときは、5% BSA TBS blocking buffer (5% BSA, 0.05% Tween-20 in TBS)を用いた。抗体産生細胞クローンの培養上清、20B2 抗体、20H3 抗体、抗 14-3-3 β 抗体、および各抗ヒストン抗体を 1 次抗体として用いるときは、PBS blocking buffer (5% BSA, 0.05% Tween-20 in PBS (-) (以降は PBS 表記))を用いた。メンブレンを blocking buffer に浸し、室温で 1 時間もしくは 4°C で 1 晩振盪した。

ブロッキング後、1 次抗体反応を行った。Western Blotting の 1 次抗体として用いた抗体は、各抗体産生細胞クローンの培養上清、20B2 抗体 (抗 H2AS40Gc 抗体)、20H3 抗体、抗 β actin 抗体 (Sigma-aldrich Japan, A1978)、抗 14-3-3 β 抗体 (Santa cruz, sc-628)、RL2 抗体 (Abcam, ab2739)、抗 FLAG 抗体 (Sigma-aldrich Japan, F1804)、抗 H2A 抗体 (Abcam, ab13923)、抗 H2B 抗体 (Abcam, ab1790)、抗 H3 抗体 (Abcam, ab1791)、抗 H4 抗体 (Abcam, ab10158)である (抗体希釈率については最後のページの表を参照)。各抗体産生細胞クローンの培養上清は原液で用いた。抗体希釈液は、20B2 抗体、20H3 抗体、抗 14-3-3 β 抗体、および各抗ヒストン抗体は PBS-T、抗 β actin 抗体、RL2 抗体、および抗 FLAG 抗体は TBS-T (0.05% Tween-20 in TBS)を用いた。

1 次抗体反応後、抗 β actin 抗体、RL2 抗体、および抗 FLAG 抗体では TBS-T、それ以外の抗体あるいは抗体産生細胞の培養上清を用いた場合では PBS-T (0.05% Tween-20 in PBS)にメンブレンを浸して、室温 7 分間振盪を 2 回行った (Wash)。Wash の後、2 次抗体反応を行った。抗体産生細胞の培養上清、20B2 抗体、20H3 抗体、RL2 抗体、および抗 FLAG 抗体を 1 次抗体に用いたメンブレンに対しては、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson

Immuno Research) を、抗 14-3-3 β 抗体、抗 β actin 抗体、および各抗ヒストン抗体を 1 次抗体として用いたメンブレンに対しては HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) をそれぞれ 2 次抗体として用いた。どちらの抗体も希釈液により 5,000 倍希釈して用いた。抗体希釈液は、1 次抗体と同じものを用いた。メンブレンを 2 次抗体液に浸して、室温で 1 時間もしくは 4°C で 1 晩振盪した。

2 次抗体反応の後、1 次抗体反応後と同じ方法で Wash を行った。ImmunoStar Zeta (FLAG 強制発現確認)、および Basic (それ以外) を用いて Detection を行った。ImmunoStar Basic、および Zeta 付属の Chemiluminescence Solution A と Solution B を 1:1 で混ぜ合わせた液でメンブレンを 2 分間浸し、Genegnome system high resolution system 100 (Syngene) を用いて検出を行った。

同一のメンブレンに別の抗体を用いる場合、Stripping 作業を行った。Stripping Solution 付属のプロトコルに従った。現像後のメンブレンを TBS-T に浸し、室温で 7 分間振盪を 2 回行った。その後、Stripping Solution に室温で 10 分間振盪した。Stripping Solution を取り除き、TBS-T にメンブレンを浸して、室温で 7 分間振盪を 3 回行った。この後の作業は上記のブロッキングの作業以降を繰り返した。

Image J によってバンドを定量する際は、1 つのバンドにつき 3 回測定した結果の平均値をとり、そのバンドの数値とした。20H3 抗体によるバンドの定量値を、対応する H4 抗体によるバンドの定量値で補正した値で比較を行った。

(3) 銀染色

銀染色には、SilverQuest Silver Staining Kit (Invitrogen) を用いた。以下特に記載がない限り、試薬は Kit 付属の試薬を用いた。作業はすべて室温で行った。最初に、電気泳動によりタンパク質を分離したゲルの固定を行った。固定液 (40% Ethanol, 10% Acetic Acid) にゲルを浸し、1 晩振盪させた。30% Ethanol に浸し 10 分間振盪させて洗浄した後、Sensitizer 溶液 (30% Ethanol, 10% Sensitizer) に浸し、10 分間振盪させた。30% Ethanol に浸し 10 分間

振盪させる 1st wash と、MilliQ 水に浸し 10 分間振盪させる 2nd wash の後、Stainer 溶液 (1% Stainer) に浸し 15 分振盪させた。MilliQ 水に浸し 1 分間振盪し洗浄した後、Developer 溶液 (10% Developer, 1 drop Developer enhancer) に浸し振盪させ、現像した。様子を見ながら適度に現像されたら、Stopper を加え反応を停止させて、10 分間振盪させた。MilliQ 水で適度に洗浄した後、観察を行った。

(4) 免疫沈降 (IP; Immunoprecipitation)

以下で用いる IP lysis buffer の組成は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA · 2Na, 1% Triton X-100 である。また、RIPA buffer の組成は、20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholic acid, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA · 2Na である。

4-i. 抗 FLAG ビーズを用いた免疫沈降

強制発現ベクターを遺伝子導入した mES 細胞の核画分からの、3xFLAG タグ付き H4WT および 3xFLAG タグ付き H4#A の精製には、FLAG Beads を用いた免疫沈降によって行った。Protein LoBind 1.5 ml tube 中に、20 μ l 分の FLAG Beads をまず加え、800 μ l の TBS を用いて 2 回 beads を洗浄した。洗浄後、100 μ g のタンパク質を含んだ各核画分タンパク質溶液および 1 μ l の protein inhibitor cocktail (Active motif) を加え、IP lysis buffer を用いて 100 μ l にメスアップした。ピペッティングによってよく懸濁した後、4°C で 1 晩回転混和させた。翌日に、800 μ l の TBS を用いて 3 回 beads を洗浄した。2 倍希釈した Lane marker reducing sample buffer を 25 μ l 加え、よくピペッティングした後、100°C で 3 分間静置し、タンパク質を溶出させた。タンパク質が溶出した 2 倍希釈 Lane marker reducing sample buffer を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube 中に移し、使用するまで -30°C で凍結保存した。

4-ii. Dynabeads を用いた免疫沈降

抗 FLAG 抗体以外の抗体を供する免疫沈降には、Dynabeads M280 sheep anti-Mouse IgG (Thermo fisher)を用いて行った。Protein LoBind 1.5 ml tube 中に、50 μ l 分の Dynabeads を取り分け、800 μ l の PBS を用いて 2 回 beads を洗浄した。洗浄した後、5 μ g 分の抗体を含んだ抗体液を加え、IP lysis buffer あるいは RIPA buffer (免疫沈降の条件検討時のみ、以下同様)を用いて 100 μ l にメスアップした。免疫沈降には 20H3 抗体、および Mouse Control IgG2a (abcam, ab18413)を抗体として用いた。4°Cで 6 時間回転混和させ、beads に抗体を付着させた。beads が浸っている抗体液を取り除き、100 μ g のタンパク質を含んだ mES 細胞核画分タンパク質溶液、および 1 μ l の protein inhibitor cocktail を加え、IP lysis buffer あるいは RIPA buffer を用いて 100 μ l にメスアップした。4°Cで 1 晩回転混和させ、抗体と反応させた。800 μ l の IP lysis buffer あるいは RIPA buffer を用いて beads を 4 回洗浄した。2 倍希釈した Lane marker reducing sample buffer を 40 μ l 加え、よくピペティングした後、100°C で 3 分間静置し、タンパク質を溶出させた。タンパク質が溶出した 2 倍希釈 Lane marker reducing sample buffer を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube 中に移し、使用するまで-30°Cで凍結保存した。

(5) 吸収実験

20H3 抗体液 (1 mg/ml)と各合成ペプチド溶液 (5 mg/ml)を、質量比 1:1 (=モル比 1:100)となるように、Protein LoBind 1.5 ml tube 中に、5 μ l の 20H3 抗体液と 1 μ l の各合成ペプチド溶液あるいは PBS-T を混合した。PBS-T で 100 μ l にメスアップし、4°Cで 1 晩回転混和させた。吸収実験には、H4#GP、H4##GP、および H4#/73NP を用いた。吸収実験用に各合成ペプチド溶液と反応させた 20H3 抗体液は、Western Blotting の 1 次抗体および免疫沈降の抗体として用いた。

VII. クロマチン免疫沈降 (ChIP)および ChIP-seq 解析

ChIP アッセイは Solomon らの報告 (Solomon et al., 1988)を基にして、ChIP-IT Express kit (Active motif) を用いて行った。

(1) DNA とタンパク質の架橋反応 (クロマチンの固定)

本研究で ChIP に用いた細胞は、mES 細胞、mTS 細胞、hiPS 細胞、および hES 細胞である。hES 細胞については固定済みクロマチンサンプルを分与いただいた。hES 細胞以外の細胞については、細胞回収時に DNA とタンパク質の架橋処理を行った。mES 細胞と mTS 細胞の場合は、0.05% Trypsin-1 mM EDTA in PBS (-)を用いて細胞を培養皿からはがした後、各細胞培養用の培地を加え酵素反応を停止させた。hiPS 細胞の場合は、hiPS 細胞剥離液をかけて剥離を促した上で、剥離液を除いた後、新しい hiPS 用培地に懸濁して反応を停止させた。PBS(-)で 2 回洗浄した後に、10 ml の各細胞培養用の培地に懸濁した。1.1 ml の 10% 中性ホルムアルデヒド (ナカライ)を加えて 20 分室温で回転混和し、DNA とタンパク質を架橋し、細胞を固定した。1.1 ml の 10x Glycine (Active motif)を加えて反応を停止させた。4°C, 178.9 ×g, 3 分の条件で遠心し、上清を取り除いた。氷冷した PBS (-)で 2 回洗浄した後、mES 細胞は 1 x 10⁷ 個ずつの、TS 細胞は 2 x 10⁶ 個ずつの、hiPS 細胞は 100 mm 培養皿 1 枚コンフルエントずつのペレットとなるように 2 ml tube に取り分け、使用するまで-80°Cで凍結保存した。

(2)細胞からのクロマチン抽出と抽出クロマチンの架橋と量の測定

以下特に記載がない場合、ChIP-IT Express kit (Active motif)付属の試薬である。試薬の液量は、細胞ペレットの細胞数が 1 x 10⁷ 個 (mES 細胞と hES 細胞)の場合の量を表記している (mTS 細胞および hiPS 細胞の場合は、それぞれ以下の表記の 5 分の 1 倍量および 5 分の 4 倍量となる)。

あらかじめ、Protease inhibitor cocktail と 100 mM PMSF を 2.5 μ l ずつ、500 μ l の Lysis buffer と 500 μ l の Digestion buffer それぞれに添加し、Lysis mixture と Digestion mixture を作製しておいた。架橋処理してある細胞ペレットに 500 μ l の Lysis mixture を加え、ピペッティングによってよく懸濁した後、氷上で 30 分間静置した。マイクロ乳棒 (eppendorf) を用いて 100 回すりつぶした後、4°C, 2,300 \times g, 10 分の条件で遠心した。上清を取り除き、500 μ l の Digestion mixture を加え、ピペッティングによってよく懸濁した。Bioruptor (COSMO Bio) を用いて、超音波破碎を高速, [30 秒 on, 30 秒 off] \times 1 cycle の設定で行った後、37°C で 5 分間静置した。この間に、shearing cocktail を 50% グリセロールで 100 倍希釈して、shearing cocktail mixture を作製した。作製した shearing cocktail mixture を 25 μ l 添加し、5 回ほどピペッティングして混和した。さらに 37°C で 15 分間静置し、10 μ l の 0.5 M の EDTA (pH8.0) を添加した後、氷上で 15 分間静置した。4°C, 20,000 \times g, 10 分の条件で遠心した後、上清を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube に移した (1 回目回収のクロマチン溶液)。残ったペレットに、新しい Digestion mixture を 100 μ l 加えよくピペッティングし、10 秒間ボルテックスして完全に混和させた後、4°C, 20,000 \times g, 5 分の条件で遠心し、上清を 1 回目回収のクロマチン溶液と混合して回収した。

クロマチン溶液の一部を用いて、クロマチンの切れ具合の確認とクロマチン溶液に含まれる DNA 濃度を測定した。残りのクロマチン溶液は使用するまで、-30°C で凍結保存した。20 μ l のクロマチン溶液を、新しい 1.5 ml tube に移し、180 μ l の ChIP elution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS) と 1.8 μ l の 5 M NaCl を加え、ボルテックスしてよく混和させた後、65°C で 1 晩静置し、脱架橋反応させて DNA をクロマチンから分離させた。翌日、1 μ l の RNase A を加えて、37°C に 30 分間静置し RNA を分解後、1 μ l の Protease K を加えて、42°C に 1 時間以上静置しタンパク質を分解した。フェノール・クロロホルム抽出による除タンパク質処理を行った後、エタノール沈殿によって DNA を精製し、10 μ l の TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) に懸濁した (→脱架橋反応クロマチン溶液)。この溶液の DNA 濃度を、分光光度計による波長 260 nm の吸光度測定を用いて定量した。なお、上記の過程で 2 倍に濃縮されているので、測定値の 2 分の 1 の値が元のクロマチン溶液の DNA 濃度となる。DNA 1 μ g 分の脱架橋反応クロマチン DNA 溶液に、その 10 分の 1 量の 10x Loading Buffer を加えた上で、Gel-Red (Biotium) を

10,000 分の 1 倍量添加された 1.5%TAE アガロースゲル中で、電気泳動槽 Mupid-2plus (Advance)を用いて電気泳動を行い、トランスイルミネーター (Viber-Lourma)でバンドを検出し、クロマチンがサンプル間で一様に切断されていることを確認した。

(3) クロマチン免疫沈降 (ChIP)

3-i. ChIP 反応

ChIP 反応には、Dynabeads M280 sheep anti-Mouse IgG (Thermo fisher)を用いた。Protein LoBind 1.5 ml tube 中に、50 μ l 分の Dynabeads を取り分け、800 μ l の PBS を用いて 2 回 beads を洗浄した。洗浄した後、5 μ g 分の抗体を含んだ抗体液を加え、IP lysis buffer を用いて 100 μ l にメスアップした。ChIP 反応には 20H3 抗体、および Mouse Control IgG2a を抗体として用いた。4°Cで 6 時間回転混和させ、beads に抗体を付着させた。beads が浸っている抗体液を取り除き、1 μ g 分のクロマチンを含んだ 100 μ l の IP lysis buffer を加えた。4°Cで 1 晩回転混和し、クロマチンと抗体を反応させた。翌日、800 μ l の IP lysis buffer で 2 回、800 μ l の IP lysis buffer (500 mM NaCl)で 1 回、800 μ l の TE buffer で 1 回 beads を洗浄した (→洗浄 beads)。

3-ii. ChIP-seq 用ライブラリー調整

各洗浄 beads に 50 μ l の ChIP elution buffer を加えた後、95°Cで 10 分間煮沸する。その後、できる限り早急にインキュベータ内に移し、65°Cで 1 晩静置し、脱架橋反応を行う (→ChIP DNA)。その際に、あらかじめ DNA 0.5 μ g 相当の各クロマチンを ChIP elution buffer を用いて 50 μ l にメスアップしておいたものも同時に 65°Cで 1 晩静置し、同じく脱架橋反応を行う (→Input DNA)。翌日、1 μ l の RNase A を加えて、37°Cに 30 分間静置することによって RNA を分解し、1 μ l の Protease K を加えて、42°Cに 1 時間以上静置することによってタンパク質を分解した。フェノール・クロロホルム抽出による除タンパク質を行った後、エタノール沈殿によって DNA を精製し、ChIP DNA は 6~7 μ l、Input DNA は 10 μ l の TE buffer に懸濁した。その後、溶液の DNA 濃度を、分光光度計による波長 260 nm の吸光度測定を用いて定量した。いずれも使用するまで、4°Cで保存した。

3-iii. ChIP サンプルを用いた Western Blotting

ChIP したサンプルを Western Blotting で使用する場合には、各洗浄 beads に 2 倍希釈した Lane marker reducing sample buffer を 25 μ l 加え、よくピペティングした後、100°C で 3 分間静置し、タンパク質を溶出させた。タンパク質が溶出した 2 倍希釈 Lane marker reducing sample buffer を新しい Protein LoBind 1.5 ml tube 中に移し、使用するまで -30°C で凍結保存した。当該サンプルを用いた Western Blotting のプロトコルは、”VI. 培養細胞から抽出したタンパク質を用いた実験および解析 (4) SDS-PAGE および Western Blotting” に記載された Western Blotting の方法に従った。

(4) sequence の準備

4-i. sequence に用いる library の作製

次世代シーケンサーに ChIP DNA および Input DNA を供するにあたり、sequence 用のアダプター付加などの準備を、KAPA Hyper Prep kit (日本ジェネティクス) を基本的に用いて行った。以下、特に記載がない場合、KAPA Hyper Prep kit 付属の試薬である。

吸光度測定結果を参照して、DNA 濃度が 1 ng/ μ l となるように TE buffer を用いて各 ChIP DNA および Input DNA の濃度調整を行った。その後、50 μ l の 1 ng/ μ l ChIP DNA あるいは Input DNA に対し、7 μ l の End Repair & A-Tailing Buffer と 3 μ l の End Repair & A-Tailing Enzyme Mix を加え、[20°C で 30 分間→65°C で 30 分間→4°C で hold] の条件でサーマルサイクラーに供することにより、DNA 末端の平滑化およびアダプター付加に必要な polyA テールの付加を順次行った (→ER&AT products)。アダプター配列の付加反応を行うため、計 60 μ l の各 ER&AT products に対して 5 μ l の TruSeq DNA adapters (illumina)、5 μ l の滅菌水、30 μ l の Ligation buffer、および 10 μ l の DNA ligase を加えた上で、20°C で 15 分間静置した。なお、アダプターの配列の違いによってどの DNA 由来であるかが判別できるように、サンプル間で異なる DNA adaptor index を用いた。アダプター配列が付加された DNA の精製を行うために、88 μ l の KAPA Pure Beads を各サンプルに加えた後、室温で 15 分間静置した。Beads が浸っている溶液を取り除き、80% エタノールで 2 回洗浄した後、室温で 5 分間

静置して Beads を乾燥させた上で、22 μ l の Ultra pure H₂O に浸して室温で 2 分間静置し、DNA を溶出させた (→ChIP-pre-library DNA)。

DNA 量が微量であるのでシーケンスにかける DNA 量を増やすため、20 μ l の ChIP-pre-library DNA に 25 μ l の(2x) KAPA HiFi Hot Start Ready Mix、および 5 μ l の (10x) KAPA library Amplification Mix を加えた上で、サーマルサイクラーを用いて 98°C 45 秒, [98°C 15 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒] × 8 cycles, 72°C 1 分, 4°C forever の条件で PCR を行った。PCR 後、精製を行うために 50 μ l の KAPA Pure Beads を各サンプルに加えた後、室温で 15 分間静置した。Beads が浸っている溶液を取り除き、80% エタノールで 2 回洗浄した後、室温で 5 分間静置して Beads を乾燥させた上で、22 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に浸して室温で 2 分間静置し、DNA を溶出させた (→ChIP library)。各 ChIP library の DNA 濃度を、分光光度計による波長 260 nm の吸光度測定を用いて定量した。

4-ii. ChIP library の濃度測定と sequence

溶出した各 DNA の正確なモル濃度は、RT-qPCR を用いた方法によって算出した。以下、特に記載がない場合、Library Quantification Kit (TAKARA) 付属の試薬である。

吸光度測定の結果を参照し、大まかな各 ChIP library のモル濃度を算出する (大まかなモル濃度 (nM) = 吸光度測定による濃度 (ng/ μ l) × 10⁶ / 250 (bp) (= 平均 library DNA 配列長) / 650 (= 1 bp あたりの平均分子量))。算出した大まかなモル濃度を基に、0.01~10 pM の範囲に収まるように各 ChIP library を希釈する。希釈した ChIP library、DNA 標準液 (0.01 pM、0.1 pM、1 pM、および 10 pM の 4 種) あるいは RNase-free 水の 2 μ l に対して、10 μ l の 2x Terra PCR Direct TB green premix、4 μ l の 5x Primer Mix、および 4 μ l の RNase-free 水を加え、反応溶液を準備した。調整した反応溶液を RT-qPCR で用いる 96 穴プレート (96LightCycler 480 Multiwell plate 96, white (Roche)) の各ウェルにアプライした。アプライした 96 穴プレートを、LightCycler96 (Roche) にセットし、RT-qPCR を行った。PCR 反応の条件は、98°C 2 分, [98°C 10 秒, 60°C 15 秒, 68°C 45 秒] × 40 cycles, 95°C 10 秒, 65°C 60 秒, 97°C 1 秒である。反応後、解析ソフト LightCycler96 SW1.1 (Roche) を用いて各サンプルの C_q 値を

計算した。DNA 標準液および RNA-free 水の Cq 値を基に作製した検量線を基に、より正確な各 ChIP library の DNA モル濃度を算出した。算出したモル濃度を基に、各 ChIP library の 4 nM DNA 溶液を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて作製し、その各 4 nM DNA 溶液を 3 μ l ずつ 1 本のエッペンチューブに取り、全て混ぜ合わせた (\rightarrow ChIP-seq mixture)。ChIP-seq mixture は用いるまで-30°Cで凍結保存した。

ChIP-seq mixture の次世代シーケンサーによるシーケンスは、GENEWIZ に委託した。シーケンスには、Hiseq 4000 system (illumina)が用いられた。得られたサンプルごとのリード数 (データ量)は、mES-Input DNA が 15,885,978 (約 4.8 Gbases (Gb))、mES-ChIP DNA が 13,101,108 (約 3.9 Gb)、1mMGlC- mES-Input DNA が 16,562,604 (約 5.0 GB)、1mMGlC-mES-ChIP DNA が 12,207,182(約 3.7 Gb)、hiPS-Input DNA が 22,049,263 (約 6.6 Gb)、hiPS-ChIP DNA が 14,312,724 (約 4.3 Gb)、hES-Input DNA が 23,812,761 (約 7.1 Gb)、および hES-ChIP DNA が 15,506,348 (約 4.7 Gb)であった。

(5) sequence データ解析

本研究において行ったシーケンスデータの解析は、特に記載がない限り Galaxy プラットフォーム (<https://usegalaxy.org>)内のソフトウェアを用いて行った。

5-i. ChIP-seq 解析

ChIP-seq のリードデータを、いずれも FASTQ Groomer にかけて上で、Bowtie2 を用いてゲノム DNA 上にマッピングし、各細胞種の ChIP および Input サンプル(Input-seq) のマッピングデータを得た。マッピング先として用いたマウスおよびヒトのゲノム DNA 配列データは、それぞれ mm10 および hg38 である。ピークの検出には、各マッピングデータを MACS に供することによって行った。各 Input-seq をコントロールデータとして使用し、また MACS の設定値として、“tag size” は 25 bp、“bandwidth”は 300 bp、および“p-value cutoff for peak detection”は 10e-03 (マウス由来の培養細胞の場合)あるいは 10e-05 (ヒト由来の培養細胞の場合)を用いた。20H3 抗体による各 ChIP-seq データを供して MACS により得られた

ピークデータは、図 3-2a,c,d、図 3-3a-f、図 3-5d-i、図 3-6b、図 3-8、および図 3-9 の作図に用いられた。これらのうち、円グラフおよびベン図を使用した解析は、Excel を用いて行った。また、公開 ChIP-seq データを供して MACS により得られたピークデータは、図 3-6b の作図に用いられた。

mES 細胞における 20H3 抗体による ChIP-seq データおよび Input-seq データのマッピングデータを BamCompare にかけることによって、Input-seq データによって標準化された H4#Gc の全ゲノム上におけるカバレッジトラックデータ (波形データ)を得た。この波形データは、図 3-5a-c の作図に用いられた。

本研究で用いた公開 ChIP-seq データは、表 M-4 にまとめて記載した。また、本研究で行った 20H3 抗体による ChIP-seq データとそれに対応した Input-seq データのシーケンスデータとその一部の付随データは、GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)内の Accession: GSE153008 において公開する。

5-ii. RNA-seq 解析

本研究で用いた RNA-seq データはいずれも GEO において公開されたデータである。用いた公開データの詳細については表 M-5 にまとめて記載した。

RNA-seq のリードデータは、いずれも FASTQ Groomer にかけた上で、HISAT2 を用いて mm10 (マウス由来の培養細胞の場合)あるいは hg38 (ヒト由来の培養細胞の場合)にマッピングし、RNA-seq のマッピングデータを得た。アセンブリ、および各転写物の転写量を示す TPM の算出は、ガイドデータとして NCBI Refseq の *Mus musculus* annotation dataset を用いて、StringTie によって行った。StringTie によって得られたデータは、図 3-3a-f、および図 3-9b, c の作図に用いられた。

5-iii. DNase-seq、FAIRE-seq、および ATAC-seq 解析

本研究で用いた DNase-seq、FAIRE-seq、および ATAC-seq データはいずれも GEO において公開されたデータである。用いた公開データの詳細については表 M-5 にまとめて記載した。本研究で用いた DNase-seq のピークデータである DNase I hyper sensitivity sites や FAIRE-seq、および FAIRE-seq のピークデータは、以前に同定されたデータを使用した (Li et al., 2017; Murtha et al., 2015; Vierstra et al., 2014)。マウスゲノムデータとして mm10 を準拠していなかったピークデータについては、Convert genome coordinates を用いて mm10 に準拠したピークデータに変換した上で使用した。これらのピークデータは、図 3-5a-c において用いられた。

DNase-seq、FAIRE-seq、および ATAC-seq のリードデータは、いずれも FASTQ Groover にかけて上で、Bowtie2 を用いて mm10 にマッピングし、各 seq データのマッピングデータを得た。各マッピングデータを BamCompare にかけることによって、各 seq データの波形データを得た。この波形データは、図 3-5d-i を作図する際に用いられた。

5-iv. 20H3 抗体による ChIP-seq データと他の seq データ間の比較解析

図 3-6b における 20H3 抗体による ChIP-seq データとその他の公開 ChIP-seq データとの比較解析の結果を示すヒートマップは、各 ChIP-seq データのピークデータを活用し、R (<https://www.r-project.org>) を用いて作図した。図 3-3a-f および図 3-9b, c における 20H3 抗体による ChIP-seq データと RNA-seq データとの比較解析を示す棒グラフ、および箱ひげ図は、20H3 抗体による ChIP-seq のピークデータと RNA-seq の StringTie によるデータを活用し、それぞれ Excel、および R を用いて作図した。図 3-5a-c における 20H3 抗体による ChIP-seq データと DNase-seq、FAIRE-seq、および ATAC-seq との比較解析の結果を示すグラフは、20H3 抗体による ChIP-seq の波形データ、および DNase-seq、FAIRE-seq、および ATAC-seq のピークデータを活用し、computeMatrix と plotProfile を用いて作図を行った。同様に、図 3-5d-f におけるグラフおよびヒートマップは、20H3 抗体による ChIP-seq のピークデータと、DNase-seq、FAIRE-seq、あるいは ATAC-seq の波形データを活用し、computeMatrix と plotProfile を用いて作図を行った。

5-v. ヒトおよびマウスの全ゲノム DNA の領域分類

図 3-2b,e のヒトおよびマウスの全ゲノム DNA の領域分類を示した円グラフは、それぞれ hg38 および mm10 のゲノムデータを活用し、Excel を用いて作図した。

5-vi. 遺伝子オントロジー (GO)解析

GO 解析は、1mMG-mES 細胞および 25mMG-mES 細胞における 20H3 抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果得られた H4#Gc 局在遺伝子の Ref-seq ID リストを用いて AmiGO2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>)で行った。本研究において、GO 解析は biological process に属する term に対するアノテーションを各遺伝子に施す方法で、AmiGO2 のデフォルト値を使用して行った。

VIII. 発現ベクターを用いた培養細胞での一過性強制発現

哺乳類由来細胞において、3xFLAG タグ付き H4a (H4WT)を強制発現させるためのベクターとして、pCAG-3xFLAG-H4WT-PGK-Puromycine-IRES-VENUS-pA ベクター (pCAG-H4WT)を当研究室ですでに所有していた。本研究では、3xFLAG タグ付き H4#A を哺乳類由来細胞において強制発現させるためのベクター (pCAG-H4#A)を、pCAG-3xH4WT を鋳型として新たに作製した上で、pCAG-H4WT および pCAG-3xH4#A を mES 細胞に強制発現させた。

なお、以下の大腸菌に対する形質転換を用いた実験は、本研究科の遺伝子組換え生物等委員会の承認を受けた実験の一環として行った。(承認番号: L17-053)

(1) H4#A 強制発現用ベクターの作製

pCAG-H4WT の塩基配列のうち、H4WT の#番目のアミノ酸をコードする部分を、5'-ACC (スレオニンのコドン)から 5'-GCC (アラニンのコドン)に置換することによって、pCAG-H4#A を作製した。作製には、Prime STAR Mutagenesis Basal kit (TAKARA)を用いた。14 μ l の滅菌水に、kit 付属の Prime STAR Max Premix (2x)を 25 μ l、2 μ M に希釈した pCAG-H4#A 作製の forward primer と reverse primer を 5 μ l ずつ、および、鋳型となる 20 pg/ μ l の pCAG-H4WT を 1 μ l 加え、よく混合した。この混合液を 95°C 3分, [98°C 10秒, 55°C 15秒, 72°C 45秒]×30 cycles の条件で PCR にかけた。PCR 産物のうち 10 μ l に、1.1 μ l の 10x Loading Buffer を加えた上で、Gel-Red を 10,000 分の 1 倍量添加した 1.5%TAE アガロースゲル中で、電気泳動槽 Mupid-2plus を用いて電気泳動を行い、トランスイルミネーターでバンドを検出した。予測されるベクターの大きさである 9 kbp 付近にバンドを確認した。

(2) カット・チェックおよびシーケンス反応

カット・チェックおよびシーケンスを行って、標的とした場所が意図したように置換されていることを確認するため、得られた PCR 産物を大腸菌に形質転換し、PCR

産物であるプラスミドを増やした。XL1-Blue MRF' SuperCompetent Cells (STRATAGENE)を基に、当研究室で作製した XL1-Blue 株コンピテントセル溶液 100 μ l 中に、TE buffer で 1,000 倍希釈した上記の PCR 産物を 2 μ l 添加し、氷上で 30 分間静置した。42°C で 90 秒間ヒートショックを行った後、氷上で 5 分間再び静置して、コンピテントセルの形質転換を行った。形質転換したコンピテントセル溶液に LB 培地 1 ml を加え、そのうちの 100 μ l を、100 μ l の 50 mg/ml Ampicillin を塗布した LB プレート上にコンラージ棒で塗り広げ、37°C で 16 時間インキュベートした。LB プレート上から、コロニーを 5 つピックアップし、LB 培地を 5 ml 入れた 5 本のラウンドチューブ中でそれぞれ 37°C 16 時間振盪培養した。16 時間後に、菌液を 25°C, 9,100 \times g, 10 分の条件で遠心分離し、1.5 ml tube 内でペレットとした。各ペレットに、50 μ l の EasyPrep buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 15% Sucrose, 2 mg/ml Lysozyme, 0.2 mg/ml RNase A (ニッポンジーン), 0.1 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich Japan)) を加え、5 分間ボルテックスミキサーでボルテックスし、室温で 10 分間静置した後、100°C に 90 秒間静置した。続いて、90 秒間氷上に静置した後、25°C, 20,000 \times g, 10 分の条件で遠心して、上清中にプラスミド DNA を得た。

得られた各プラスミド DNA 溶液のうち、2 μ l を用いてカット・チェックを行った。2 μ l の各プラスミド DNA 溶液中に、1 μ l の 10x H Buffer (TAKARA)、0.1 μ l の 10 U/ μ l NotI (TAKARA)、および 6.9 μ l の滅菌水を加えて、37°C で 1 時間インキュベートして制限酵素反応を行った。反応後、1.1 μ l の 10x Loading Buffer を加え、Gel-Red を 10,000 分の 1 倍量添加された 2% TAE アガロースゲル中で、電気泳動槽 Mupid-2plus を用いて電気泳動を行い、トランスイルミネーターでバンドを検出した。結果として、制限酵素によって切り取られる領域に該当する短い断片によるバンドと、それ以外のプラスミドの領域からなる長い断片によるバンドの両方が、予測されるゲル中の位置に検出された。カット・チェックに用いなかった、残りのプラスミド DNA 溶液は、DNA 精製用のカラム (Zymo Research) を用いて精製し、最終的に 11 μ l の TE buffer にプラスミドを溶出させた。プラスミド溶液 1 μ l を供して、分光光度計による波長 260 nm の吸光度測定を用いた濃度定量後、残りの 10 μ l のプラスミド溶液を 50 ng/ μ l となるように TE buffer を用いて濃度調整した。

50 ng/ μ l の各プラスミド溶液を用いてシーケンサーを行った。2 μ l の 50 ng/ μ l プラスミド溶液、1.6 μ l の BigDye Terminator v1.1, v3.1, 5x Sequencing Buffer (Abcam)、0.8 μ l の BigDye Terminator v3.1 (Abcam)、0.0064 μ l の 50 μ M pCAG-3xFLAG-H4 シーケンス反応用の Forward primer または Reverse primer、および 5.536 μ l の滅菌水を混ぜ合わせた後、96°C 30 秒, [96°C 30 秒, 50°C 30 秒, 60°C 4 分] \times 40 cycles, 15°C forever の条件で PCR にかけた。エタノール沈殿によって、PCR 産物中の DNA を精製した後、12.5 μ l の HiDi ホルムアルデヒド (Applied Biosystems) に溶出させた。5 分間ボルテックスミキサーでボルテックスし、100°C で 3 分間静置し、氷上で 3 分間静置した上で、シーケンサーにかけた。最終的に、Finch TV (Digital World Biolog) をシーケンスデータの解析ソフトとして用いて、#番目のアミノ酸のコドンが 5'-ACC (スレオニンのコドン) から 5'-GCC (アラニンのコドン) へ置換されていることを確認した。

(3) 強制発現用ベクターの準備と遺伝子導入

pCAG-H4WT および pCAG-H4#A をそれぞれ形質転換したコンピテントセルの、LB プレート上のコロニーをそれぞれピックアップし、オートクレーブにより滅菌済みの 100 ml の LB 培地が入った、各々別の羽根つきフラスコ内に加えて、37°C で 16 時間振盪培養し、増殖させた。16 時間後、得られた菌液から Quantum Prep Plasmid Midi Prep kit (Bio-Rad) を用い、kit のプロトコルに基づいてプラスミド DNA を抽出、および精製した。得られたプラスミド DNA 溶液をエタノール沈殿によってさらに精製し、滅菌水で 2 μ g/ μ l となるように希釈して、遺伝子導入に用いた。

pCAG-H4WT および pCAG-H4#A の遺伝子導入には、mES 細胞を用いた。mES 細胞へ強制発現ベクターを遺伝子導入する方法の詳細は、"I. 用いた培養細胞とその培養法 (1) mES 細胞の培養 1-i. mES 細胞への強制発現ベクターの遺伝子導入"に記載した。

IX. 合成ヒストンを用いたヌクレオソーム再構成

以下、特に記載がない限り試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

(1) S40Gc-H2A の準備とその精製確認

Ser40 にのみ *O*-GlcNAc 修飾が付加された H2A である S40Gc-H2A は、大阪大学の蛋白質研究所の川上徹准教授のグループに合成頂いた (Asahina et al., 2019)。S40Gc-H2A の精製度を確認するために行った SDS-PAGE のプロトコルは、”VI. 培養細胞から抽出したタンパク質を用いた実験および解析 (4) SDS-PAGE および Western Blotting”に記載の SDS-PAGE の方法に従った。電気泳動後の SDS-PAGE ゲルの CBB 染色には、Bio-Safe CBB G-250 stain (BIO-RAD)を使用した。染色後は、MilliQ 水に浸して適度に洗浄した上で、観察を行った。

S40Gc-H2A の MS/MS 解析は理化学研究所環境資源科学研究センター 生命分子解析ユニットの堂前直博士に行って頂いた。MS/MS 解析のサンプルとして、MilliQ 水に溶解させた S40Gc-H2A を使用した。

(2) H2AS40Gc NCP および Unmodified NCP の再構成

ヌクレオソーム再構成に用いた、ヒトのヒストン H2A、H2B、H3.1、および H4 は、東京大学の定量生命科学研究所の胡桃坂仁志教授のグループによってリコンビナントタンパク質として精製されたものを使用した (Suzuki et al., 2016; Tachiwana et al., 2010; Tachiwana et al., 2011; Tanaka et al., 2004)。また、ヌクレオソーム再構成に用いた DNA は、ヒトの α -satellite DNA に基づいた回文配列を有する 146 bp の DNA(146 bp DNA)であり、リコンビナントヒストンと同じく東京大学の定量生命科学研究所の胡桃坂仁志教授のグループによって作出されたものを使用した (Dyer et al., 2004; Harp et al., 1996; Luger et al., 1997; Tsunaka et al., 2005)。

最初に、H2A-H2B dimer、S40Gc-H2A-H2B dimer、および H3-H4 tetramer の作出を行った。リコンビナント H2A と H2B、Gc-H2A とリコンビナント H2B、あるいはリコンビナント H3 と H4 がそれぞれ等モル比となるように混合した上で、変性 buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 M guanidine hydrochloride, 20 mM β -mercaptoethanol) をヒストンの終濃度が 1.0 mg/ml となるように加え、4°C で 2 時間回転混和した。その後、巻き戻し buffer (10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol) で 1 回につき 4 時間以上の透析を 4°C 下において 4 回行った。H2A-H2B dimer、Gc-H2A-H2B dimer あるいは H3-H4 tetramer を含んだ溶液を HiLoad 16/60 Superdex 200 gel-filtration column chromatography (GE Healthcare) に供し、巻き戻し buffer 中にそれぞれ精製を行った。各精製溶液は、Amicon Ultra-Centrifugal Filters Ultracel-10k (Millipore) を用いて適当な濃度になるように濃縮した。

精製および濃縮したヒストン複合体と 146 bp DNA を用いて、いずれのヒストン修飾も含まないヌクレオソームである Unmodified NCP、および H2AS40Gc のみ付加されたヌクレオソームである H2AS40Gc NCP ヌクレオソームの再構成を透析法により行った。透析法に用いるヒストンや DNA のロットが変わるごとに、小規模ヌクレオソーム再構成法である希釈法を行い、各ヒストン複合体と DNA の最適な混合比を推定した。推定した最適な混合比となるように H2A-H2B dimer あるいは Gc-H2A-H2B dimer、H3-H4 tetramer、および 146 bp DNA を、2 M KCl 条件下で DNA の終濃度が 0.8 mg/ml となるよう混合した上で、RBH buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 2 M KCl) に透析した。透析外液の塩濃度を徐々に低下させることで、ヌクレオソームを再構成させるために、RBL buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25 M KCl) を透析外液 400ml に対して、0.8 ml/min で加え攪拌しながら、8.0 ml/min の流速で透析外液を排出した (図 2-2a)。4°C で 2 晩かけて塩濃度を低下させた後、新たな RBL buffer で 1 晩透析した。

透析したサンプルを回収した後、30% Sucrose 溶液と 5:1 の割合で混合した上で、分取用電気泳動装置である PrepCell (モデル 491, BIO-RAD) 内で非変性条件下電気泳動用ゲルである 6% Native-PAGE ゲルに添加し、ヌクレオソームを回収バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT) によって溶出した (図 2-2b)。6% Native-PAGE ゲルの作製には、40(w/v)%- Acrylamide/Bis solution 37.5:1 (40% AB) を 1.2 ml、4×TBE buffer (0.71 M Tris,

0.71 M Boric acid, 8 mM EDTA)を 1 ml あるいは 0.4 ml、10% APS を 80 μ l、および TEMED を 8 μ l 混合した上で、MilliQ 水によって 8 ml にメスアップして作製した溶液を使用した。PrepCell 用の泳動 buffer は、0.5 あるいは 0.2 \times TBE buffer を用いた。30% Sucrose 溶液と 5:1 の割合で混合した。回収 buffer は UV 吸光度の計測を行う。UV 吸光度のピークを参考に、溶出画分を 6% Native-PAGE に供して、ヌクレオソームを含む画分を判別した上で、ヌクレオソームを含む画分を回収した。回収したヌクレオソーム溶液は、Amicon Ultra-Centrifugal Filters Ultracel-30k (Millipore)を用いて適当な濃度になるように濃縮した。濃縮した各ヌクレオソーム溶液は使用するまで氷上保存した。

再構成したヌクレオソームの確認のために、Native-PAGE、および SDS-PAGE を行った。Native-PAGE の場合は、6% Native-PAGE ゲルによって展開した後、各ヌクレオソーム、および遊離した DNA は、エチジウムブロマイドを用いて可視化した。Native-PAGE ゲルの作出法は上述の PrepCell の Native-PAGE ゲル作成方法に準じた。また、Native-PAGE にサンプルをアプライする際には、30% Sucrose 溶液と 5:1 の割合で混合した。SDS-PAGE の場合は、18% SDS-PAGE ゲルで展開した後、タンパク質を、CBB 溶液によって染色した。分離ゲルは、MilliQ 水を 1.68 ml、40% AB を 2.7 ml、1.5 M Tris-HCl (pH8.8)を 1.5 ml、10% SDS を 60 μ l、10% APS を 60 μ l、および TEMED を 6 μ l 混合した溶液を用いて作製した。濃縮ゲルは MilliQ 水を 1.85 ml、40% AB を 0.25 ml、0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)を 0.25 ml、10% SDS を 20 μ l、10% APS を 20 μ l、および TEMED を 2 μ l を混合して作製した。SDS-PAGE にサンプルをアプライする際には、2 \times Sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 50% Glycerol)と 5:1 の割合で混合した。

X. 再構成ヌクレオソームの生化学的解析

以下、特に記載がない限り試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

(1) MNase 感受性試験

MNase 感受性試験は、ヌクレオソームに巻きついた DNA の末端部をはじめとした DNA とヒストンの相互作用の度合いを評価するための解析である (Koyama et al., 2017; Osakabe et al., 2018)。あらかじめ 40 ng/μl となるように MNase buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 5 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM DTT)を用いて各ヌクレオソーム溶液を希釈する。また、MNase dilution buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM NaCl, 1mM Tris)を用いて 15 mU/μl MNase (TAKARA)溶液を調整した。そして、35 μl の希釈ヌクレオソーム溶液、28 μl の 15 mU/μl MNase 溶液、および 7 μl の 10x MNase buffer (200 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM NaCl, 25 mM CaCl₂, 10 mM DTT)を混合し、70 μl の MNase 反応溶液を調整し、37 °Cで反応させる。その後、0 分から 15 分の間で3分ごとに 10 μl ずつ回収し、5 μl のタンパク質分解溶液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM EDTA、0.1% SDS、0.5 mg/ml proteinase K) を加えて反応を停止させた。これらの反応産物は 8% Native-PAGE ゲルで展開し、各ヌクレオソーム、および遊離した DNA は、エチジウムブロマイドを用いて可視化した。ゲル作製方法やサンプルをアプライする方法は”IX. 合成ヒストンを用いたヌクレオソーム再構成 (2) H2AS40Gc NCP および Unmodified NCP の再構成”に記載した Native-PAGE の方法に準じた。

(2) 熱安定性試験

熱安定性試験は、ヌクレオソーム構造の安定性を評価するための解析である (図 2-5a) (Koyama et al., 2017; Machida et al., 2016; Taguchi et al., 2014)。あらかじめ濃度が 250 ng/μl となるように回収 buffer を用いて各ヌクレオソーム溶液を希釈する。そして、9 μl の希釈した各ヌクレオソーム溶液あるいは回収 buffer に対して、回収 buffer を 8 μl、2 M NaCl を 1 μl、および 50x SYPRO Orange (Sigma-Aldrich)を 2 μl 加え、20 μl の熱安定性試験反応液を作製した。1 実験回において各条件区において反応液を 3 サンプルずつ、計 9 サ

サンプルを用意し、それぞれ 19 μ l を熱安定性試験に供した。StepOnePlus Real-Time PCR unit (Applied Biosystems)を用いて、各熱安定性試験反応液を 26°Cから 95°Cまで 1°Cずつ上昇させ、その際の SYPRO Orange の蛍光量を測定した。各ヌクレオソームを加えて測定した際の蛍光量は、いずれのヌクレオソームも含まない回収 buffer を加えて測定した際の対応する蛍光量を用いて補正した。T°Cにおける正規化された蛍光量 ($F(T)_{\text{normalized}}$)は次の式から算出した。この時、 $F(T)$, $F(26)$, $F(95)$ はそれぞれ T°C, 26°C, 95°Cの補正済み蛍光量を示す。

$$F(T)_{\text{normalized}} = (F(T) - F(26)) / (F(95) - F(26))$$

また、T°Cにおける蛍光量の変化量 ($dF(T)/dT$)は次の式から算出した。

$$dF(T)/dT = F(T)_{\text{normalized}} - F(T - 1)_{\text{normalized}}, F(25) = 0$$

(3) H2AS40Gc NCP の結晶化の試み

H2AS40Gc を含んだヌクレオソームの立体構造を決定するため、X 線結晶構造解析を試みた。H2AS40Gc NCP 結晶化のために、精製した H2AS40Gc NCP を CCS buffer (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 1 mM EDTA) で 1 回につき 1 晩の透析を 4°C下において 2 回行った。透析後、Amicon Ultra-Centrifugal Filters Ultracel-30k (Millipore)を用いて 2-3 mg/ml になるように濃縮した。濃縮した各ヌクレオソーム溶液は使用するまで氷上保存した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行った (図 M-2)。2 μ l の H2AS40Gc NCP 溶液と 2 μ l の Sample buffer (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 70-75 mM KCl, 105-110 mM MnCl₂)をカバーガラス上で混合した後、直ちにカバーガラスを 900 μ l の reserver solution (20 mM potassium cacodylate (pH 6.0), 50 mM KCl, 60-70 mM MnCl₂)が入った容器に被せて、流動パラフィンを用いて密封し、20°C で静置した。得られた結晶を 4°C 条件下にて、2% trehalose、および 30% PEG400 を添加した reservoir solution に浸した後、液体窒素で瞬間凍結した。

凍結した結晶の X 線構造解析については、東京大学の定量生命科学研究so胡桃坂研究室の小山昌子博士および野澤佳世博士に委託した。

XI. コアヒストンのアミノ酸配列やヌクレオソーム構造を用いた解析など

(1) コアヒストンのアミノ酸配列の一覧図

図 P-2 のマウスのヒストン *H2A* 遺伝子および *H4* 遺伝子の全パラログの 40 番目のアミノ酸を中心とした前後 15 残基のアミノ酸配列、および図 P-6 のマウスのコアヒストン (*H2A*, *H2B*, *H3*, *H4*)の全アミノ酸配列の一覧を示した図に関しては、ensembl genome database (<http://www.ensembl.org>)を参照して作製した。図 C-1b,c の様々な生物種のヒストン *H4* の 71 番目のアミノ酸残基を中心に 15 アミノ酸残基を示した図に関しては、uniprot (<http://www.uniprot.org>)を参照して作製した。

(2) ヒストン *H4* のアミノ酸配列による系統樹

図 C-1a のヒストン *H4* のアミノ酸配列を用いた真核生物の系統樹作製には、uniprot (<http://www.uniprot.org>)より収集した各真核生物のヒストン *H4* のアミノ酸配列を Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)に供して行ったクラスタリング解析の結果を用いた。クラスタリング解析は、Clustal W のデフォルト値で行った。解析結果の系統樹描画には、TreeView X (version 0.5.0) (<https://treeview-x.en.softonic.com>)を用いた。

(3) ヌクレオソームの結晶構造を用いた解析

図 3-10b のヌクレオソーム結晶構造データを用いた解析は、PyMOL (<https://pymol.org>)を用いて行った。使用したヌクレオソームの X 線結晶構造データは日本蛋白質構造データバンク (Protein Data Bank Japan, PDBj) (<https://pdbj.org>)より取得し、*The human nucleosome structure* (PDB ID: 3afa) (Tachiwana et al., 2010)のデータを使用した。H4Thr#を中心として、ヌクレオソーム構造内においてその 5Å 内に位置する他ヒストンのアミノ酸残基を PyMOL を使用して検索した。

(3) タンパク質の翻訳後修飾の構造式

図 P-3 および図 P-4b の各翻訳後修飾の構造式の描画には、Marvin Sketch (<https://chemaxon.com/products/marvin>)を使用した。図 P-3e で使用したユビキチンの構造データは、PDBj (<https://pdbj.org>)より取得し、*STRUCTURE OF UBIQUITIN REFINED AT 1.8 ANGSTROMS RESOLUTION* (PDB ID: 1ubq) (Vijay-Kumar et al., 1987)のデータを使用した。図 P-3a の GlcNAc の構造式は、Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.kegg.jp>)の GlcNAc の頁 (C00140)より引用した。

XII. 統計解析

図 1-4b は two-tailed Student's t test、図 3-3b,d,f および図 3-9c は Wilcoxon rank sum test、そして図 2-3c および図 3-7c, f は Tukey-Kramer test によりそれぞれ統計解析を行った。Student's t test は Excel を用いて行った。また、Wilcoxon rank sum test および Tukey-Kramer test は R (<https://www.r-project.org>)を用いて行った。two-tailed Student's t test および Tukey-Kramer test では $p < 0.05$ 、Wilcoxon rank sum test では $p < 0.01$ で有意差判定を行った。

表 M-1, 表 M-2

表 M-1 用いた抗体の情報

(※学術論文として発表予定の内容に一部抵触するので、本要約中では削除した。)

表 M-2 用いたプライマーの情報

(※学術論文として発表予定の内容に一部抵触するので、本要約中では削除した。)

表 M-3, 表 M-4**表 M-3 用いた合成ペプチドの情報**

(※学術論文として発表予定の内容に一部抵触するので、本要約中では削除した。)

表 M-4 用いた公開シーケンスデータの情報 (ChIP-seq)

Epigenetic factor name	Cell	GEO accession number
H2A.X	mESCs	GSE71866
H2A.Z	mESCs	GSE85505
H2AS40Gc	mESCs	GSE77999
H2AK119ub	mESCs	GSE107377
H2BS120ub	mESCs	GSE76569
H3.3	mESCs	GSE96660
H3K4me1	mESCs	GSE49847
H3K4me2	mESCs	GSE18515
H3K4me3	mESCs	GSE73426
H3K9ac	mESCs	GSE49847
H3K9me2	mESCs	GSE97947
H3K9me3	mESCs	GSE49847
H3S10ph	mESCs	GSE97947
H3K14ac	mESCs	GSE31284
H3K27ac	mESCs	GSE49847
H3K27me3	mESCs	GSE73426
H3K36me3	mESCs	GSE49847
H3K79me2	mESCs	GSE11724
H4#Gc	mESCs, hESCs, hiPSCs	GSE153008 (本研究により新たに公開)

表 M-5**表 M-5 用いた公開シーケンスデータの情報 (ChIP-seq 以外)**

Sample name	Cell	GEO accession number
RNA-seq		
mESC-25mMGluc-RNA-seq	mESCs	GSE77999
mESC-1mMGluc-RNA-seq	mESCs	GSE77999
hESC-RNA-seq	hESCs	GSE80264
hiPSC-RNA-seq	hiPSCs	GSE56568
Open chromatin analysis		
ATAC-seq	mESCs	GSE93029
DHS-seq	mESCs	GSE51336
FAIRE-seq	mESCs	GSE58520

図 M-1

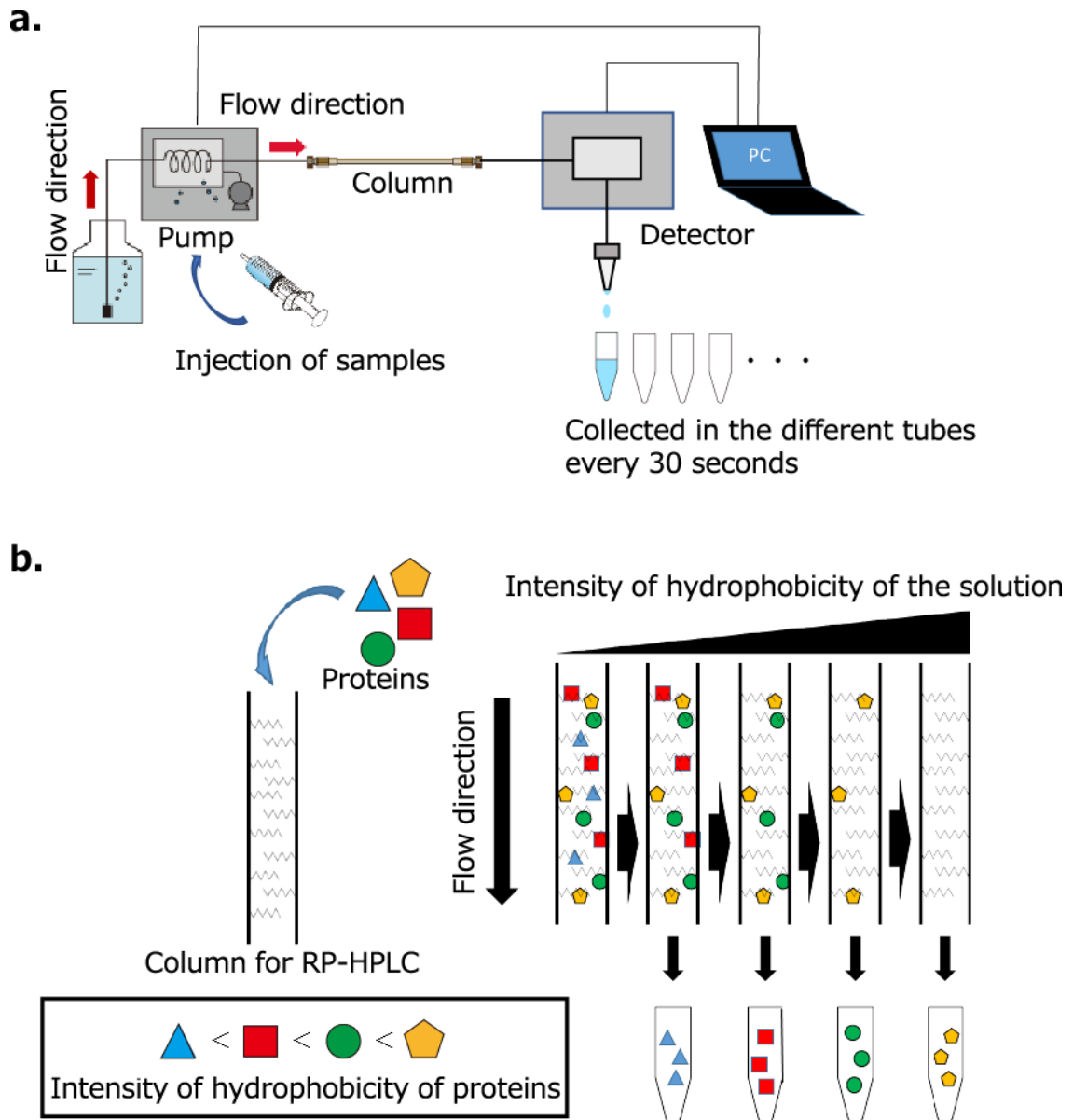


図 M-1 RP-HPLC によるヒストン分画の概要

(a) RP-HPLC の装置の概要図。RP-HPLC はパソコンによって制御した。サンプルはシリンジを用いて注入した。カラムを透過する液の吸光度を測定することによって、タンパク質を

検出した。カラムを透過した液が 30 秒ごとに異なる tube に自動的に回収されるように、プログラムを組んだ。

(b) RP-HPLC の原理の概略を示した。タンパク質を吸着させたカラム内に有機溶媒を流す。流す有機溶媒の疎水性を一定の割合で徐々に上昇させると、疎水性の低いタンパク質ほど早く有機溶媒に溶出するので、疎水性の違いに応じてタンパク質を分取することができる。

図 M-2

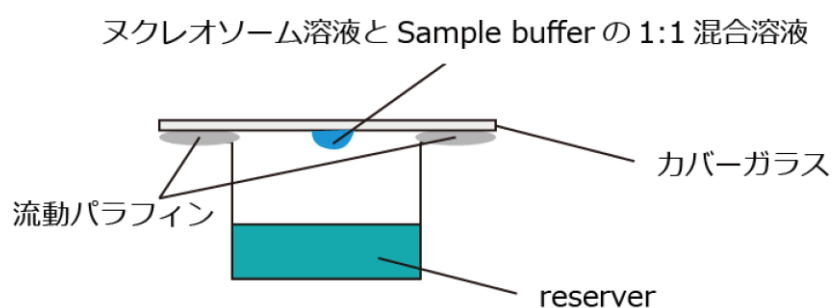


図 M-2 ハンギングドロップ蒸気拡散法によるヌクレオソーム結晶化の概要

ヌクレオソーム溶液と Sample buffer の混合溶液よりも reserver のカコジル酸の濃度を 2 倍濃くすることにより、その濃度に近づこうと徐々にヌクレオソームと Sample buffer の混合溶液の水が徐々に蒸発する。その際に、適正な条件であればヌクレオソームの均一な結晶化が起こる。

(空白のページ)

引用文献

引用文献

(原著論文)

Anderson, K.W., and Turko, I.V. (2015). Histone post-translational modifications in frontal cortex from human donors with Alzheimer's disease. *Clin Proteomics* 12, 26.

Anest, V., Hanson, J.L., Cogswell, P.C., Steinbrecher, K.A., Strahl, B.D., and Baldwin, A.S. (2003). A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 423, 659-663.

Aoto, T., Saitoh, N., Ichimura, T., Niwa, H., and Nakao, M. (2006). Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Dev Biol* 298, 354-367.

Asahina, Y., Kawakami, T., and Hojo, H. (2019). Glycopeptide Synthesis Based on a TFA-Labile Protection Strategy and One-Pot Four-Segment Ligation for the Synthesis of O-Glycosylated Histone H2A. *European Journal of Organic Chemistry* 2019, 1915-1920.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.

Bitterge, B., and Schneider, R. (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res* 356, 457-466.

Black, J.C., Van Rechem, C., and Whetstine, J.R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 48, 491-507.

Blanc, R.S., and Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell* 65, 8-24.

Bond, M.R., and Hanover, J.A. (2015). A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol* 208, 869-880.

Buschbeck, M., and Hake, S.B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 299-314.

Butkinaree, C., Park, K., and Hart, G.W. (2010). O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800, 96-106.

Bönisch, C., and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res* 40, 10719-10741.

Caperta, A.D., Rosa, M., Delgado, M., Karimi, R., Demidov, D., Viegas, W., and Houben, A. (2008). Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet Genome Res* 122, 73-79.

Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., and Yu, X. (2013). TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* 493, 561-564.

Chen, Q., and Yu, X. (2016). OGT restrains the expansion of DNA damage signaling. *Nucleic Acids Res* 44, 9266-9278.

Cheung, W.D., and Hart, G.W. (2008). AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem* 283, 13009-13020.

Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 *Suppl 1*, S60-67.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304.

Cole, H.A., Ocampo, J., Iben, J.R., Chereji, R.V., and Clark, D.J. (2014). Heavy transcription of yeast genes correlates with differential loss of histone H2B relative to H4 and queued RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 42, 12512-12522.

Comer, F.I., Vosseller, K., Wells, L., Accavitti, M.A., and Hart, G.W. (2001). Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *Anal Biochem* 293, 169-177.

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol* 319, 1097-1113.

de Queiroz, R.M., Carvalho, E., and Dias, W.B. (2014). *O*-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front Oncol* 4, 132.

DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab* 2, 127-129.

Dehennaut, V., Lefebvre, T., Sellier, C., Leroy, Y., Gross, B., Walker, S., Cacan, R., Michalski, J.C., Vilain, J.P., and Bodart, J.F. (2007). *O*-linked *N*-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282, 12527-12536.

Durning, S.P., Flanagan-Steet, H., Prasad, N., and Wells, L. (2016). *O*-Linked β -*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) Acts as a Glucose Sensor to Epigenetically Regulate the Insulin Gene in Pancreatic Beta Cells. *J Biol Chem* 291, 2107-2118.

Dyer, P.N., Edayathumangalam, R.S., White, C.L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U.M., and Luger, K. (2004). Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol* 375, 23-44.

Eickbush, T.H., and Moudrianakis, E.N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* 17, 4955-4964.

El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P.L., Roeder, R.G., Cooper, M.E., and Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 205, 2409-2417.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Fardini, Y., Dehennaut, V., Lefebvre, T., and Issad, T. (2013). *O*-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 99.

Fong, J.J., Nguyen, B.L., Bridger, R., Medrano, E.E., Wells, L., Pan, S., and Sifers, R.N. (2012). β -*N*-Acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J Biol Chem* 287, 12195-12203.

Forma, E., Józwiak, P., Bryś, M., and Krześlak, A. (2014). The potential role of *O*-GlcNAc modification in cancer epigenetics. *Cell Mol Biol Lett* 19, 438-460.

Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H.H., Igarashi, K., *et al.* (2011). GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* 480, 557-560.

Ghosh, S.K., Bond, M.R., Love, D.C., Ashwell, G.G., Krause, M.W., and Hanover, J.A. (2014). Disruption of *O*-GlcNAc Cycling in *C. elegans* Perturbs Nucleotide Sugar Pools and Complex Glycans. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 197.

Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-638.

Goldberg, H.J., Whiteside, C.I., Hart, G.W., and Fantus, I.G. (2006). Posttranslational, reversible *O*-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* *147*, 222-231.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* *389*, 349-352.

Gräff, J., and Tsai, L.H. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci* *14*, 97-111.

Guccione, E., and Richard, S. (2019). The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 642-657.

Hahne, H., and Kuster, B. (2012). Discovery of *O*-GlcNAc-6-phosphate modified proteins in large-scale phosphoproteomics data. *Mol Cell Proteomics* *11*, 1063-1069.

Han, J., Zhang, L., Guo, H., Wysham, W.Z., Roque, D.R., Willson, A.K., Sheng, X., Zhou, C., and Bae-Jump, V.L. (2015). Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecol Oncol* *138*, 668-675.

Han, L., Ma, Q., Li, J., Liu, H., Li, W., Ma, G., Xu, Q., Zhou, S., and Wu, E. (2011). High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR. *PLoS One* *6*, e27074.

Hanover, J.A., Krause, M.W., and Love, D.C. (2012). Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through *O*-GlcNAcylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 312-321.

Hardivillé, S., and Hart, G.W. (2014). Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by *O*-GlcNAcylation. *Cell Metab* *20*, 208-213.

Hardivillé, S., and Hart, G.W. (2016). Nutrient regulation of gene expression by *O*-GlcNAcylation of chromatin. *Curr Opin Chem Biol* 33, 88-94.

Harp, J.M., Uberbacher, E.C., Roberson, A.E., Palmer, E.L., Gewiess, A., and Bunick, G.J. (1996). X-ray diffraction analysis of crystals containing twofold symmetric nucleosome core particles. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 283-288.

Hart, G.W. (2019). Nutrient regulation of signaling and transcription. *J Biol Chem* 294, 2211-2231.

Hartweck, L.M., Genger, R.K., Grey, W.M., and Olszewski, N.E. (2006). SECRET AGENT and SPINDLY have overlapping roles in the development of *Arabidopsis thaliana* L. Heyn. *J Exp Bot* 57, 865-875.

Hartweck, L.M., Scott, C.L., and Olszewski, N.E. (2002). Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* 161, 1279-1291.

Hayakawa, K., Hirosawa, M., Tani, R., Yoneda, C., Tanaka, S., and Shiota, K. (2017). H2A *O*-GlcNAcylation at serine 40 functions genomic protection in association with acetylated H2AZ or γ H2AX. *Epigenetics Chromatin* 10, 51.

Hayakawa, K., Nishitani, K., and Tanaka, S. (2019). Kynurenine, 3-OH-kynurenine, and anthranilate are nutrient metabolites that alter H3K4 trimethylation and H2AS40 *O*-GlcNAcylation at hypothalamus-related loci. *Sci Rep* 9, 19768.

Hesketh, G.G., and Dennis, J.W. (2017). *N*-acetylglucosamine: more than a silent partner in insulin resistance. *Glycobiology* 27, 595-598.

Hirosawa, M., Hayakawa, K., Shiota, K., and Tanaka, S. (2018). Histone *O*-GlcNAcylation and Potential Biological Functions. *OBM Genetics* 2, 1-1.

Hirosawa, M., Hayakawa, K., Yoneda, C., Arai, D., Shiota, H., Suzuki, T., Tanaka, S., Dohmae, N., and Shiota, K. (2016). Novel *O*-GlcNAcylation on Ser(40) of canonical H2A isoforms specific to viviparity. *Sci Rep* 6, 31785.

Hoghoughi, N., Barral, S., Vargas, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2017). Histone variants: essential actors in the male genome programming. *J Biochem.*

Holt, G.D., Snow, C.M., Senior, A., Haltiwanger, R.S., Gerace, L., and Hart, G.W. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Cell Biol* 104, 1157-1164.

Horikoshi, N., Sato, K., Shimada, K., Arimura, Y., Osakabe, A., Tachiwana, H., Hayashi-Takanaka, Y., Iwasaki, W., Kagawa, W., Harata, M., *et al.* (2013). Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 2431-2439.

Hu, C.M., Tien, S.C., Hsieh, P.K., Jeng, Y.M., Chang, M.C., Chang, Y.T., Chen, Y.J., Lee, E.Y.P., and Lee, W.H. (2019). High Glucose Triggers Nucleotide Imbalance through *O*-GlcNAcylation of Key Enzymes and Induces KRAS Mutation in Pancreatic Cells. *Cell Metab* 29, 1334-1349.e1310.

Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B.T., Trauger, S.A., Han, W., Oyeleye, M.O., and Dillmann, W.H. (2009). Increased enzymatic *O*-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* 284, 547-555.

Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* 49, e324.

Ishiyama, S., Nishiyama, A., Saeki, Y., Moritsugu, K., Morimoto, D., Yamaguchi, L., Arai, N., Matsumura, R., Kawakami, T., Mishima, Y., *et al.* (2017). Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance. *Mol Cell* 68, 350-360.e357.

Jambhekar, A., Dhall, A., and Shi, Y. (2019). Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 625-641.

Janetzko, J., and Walker, S. (2014). The making of a sweet modification: structure and function of *O*-GlcNAc transferase. *J Biol Chem* 289, 34424-34432.

Jang, H., Kim, T.W., Yoon, S., Choi, S.Y., Kang, T.W., Kim, S.Y., Kwon, Y.W., Cho, E.J., and Youn, H.D. (2012). *O*-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11, 62-74.

Jung, J.H., Iwabuchi, K., Yang, Z., and Loeken, M.R. (2016). Embryonic Stem Cell Proliferation Stimulated By Altered Anabolic Metabolism From Glucose Transporter 2-Transported Glucosamine. *Sci Rep* 6, 28452.

Jung, J.H., Wang, X.D., and Loeken, M.R. (2013). Mouse embryonic stem cells established in physiological-glucose media express the high KM Glut2 glucose transporter expressed by normal embryos. *Stem Cells Transl Med* 2, 929-934.

Kakutani, T., Jeddeloh, J.A., Flowers, S.K., Munakata, K., and Richards, E.J. (1996). Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12406-12411.

Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S.E., and Kakutani, T. (2003). Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in Arabidopsis. *Curr Biol* 13, 421-426.

Kimura, H., and Cook, P.R. (2001). Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol* 153, 1341-1353.

Klein, D.C., and Hainer, S.J. (2020). Genomic methods in profiling DNA accessibility and factor localization. *Chromosome Res* 28, 69-85.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89-97.

Kondoh, H., Lleonart, M.E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J., and Beach, D. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 9, 293-299.

Koyama, M., and Kurumizaka, H. (2018). Structural diversity of the nucleosome. *J Biochem* 163, 85-95.

Koyama, M., Nagakura, W., Tanaka, H., Kujirai, T., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Kurumizaka, H. (2017). In vitro reconstitution and biochemical analyses of the *Schizosaccharomyces pombe* nucleosome. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 896-901.

Kreppel, L.K., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272, 9308-9315.

Kulathu, Y., and Komander, D. (2012). Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 508-523.

Lagerlöf, O., Slocomb, J.E., Hong, I., Aponte, Y., Blackshaw, S., Hart, G.W., and Huganir, R.L. (2016). The nutrient sensor OGT in PVN neurons regulates feeding. *Science* 351, 1293-1296.

Lercher, L., Raj, R., Patel, N.A., Price, J., Mohammed, S., Robinson, C.V., Schofield, C.J., and Davis, B.G. (2015). Generation of a synthetic GlcNAcylated nucleosome reveals regulation of stability by H2A-Thr101 GlcNAcylation. *Nat Commun* 6, 7978.

Li, D., Liu, J., Yang, X., Zhou, C., Guo, J., Wu, C., Qin, Y., Guo, L., He, J., Yu, S., *et al.* (2017). Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming. *Cell Stem Cell* 21, 819-833.e816.

Long, M., Sun, X., Shi, W., Yanru, A., Leung, S.T.C., Ding, D., Cheema, M.S., MacPherson, N., Nelson, C.J., Ausio, J., *et al.* (2019). A novel histone H4 variant H4G regulates rDNA transcription in breast cancer. *Nucleic Acids Res* 47, 8399-8409.

Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M., and Hanover, J.A. (1997). *O*-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272, 9316-9324.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Machida, S., Sekine, S., Nishiyama, Y., Horikoshi, N., and Kurumizaka, H. (2016). Structural and biochemical analyses of monoubiquitinated human histones H2B and H4. *Open Biol* 6.

Maile, T., Kwoczyński, S., Katzenberger, R.J., Wassarman, D.A., and Sauer, F. (2004). TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B. *Science* 304, 1010-1014.

Makde, R.D., England, J.R., Yennawar, H.P., and Tan, S. (2010). Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature* 467, 562-566.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10, 882-891.

Mardis, E.R. (2007). ChIP-seq: welcome to the new frontier. *Nat Methods* 4, 613-614.

Mariappa, D., Zheng, X., Schimpl, M., Raimi, O., Ferenbach, A.T., Müller, H.A., and van Aalten, D.M. (2015). Dual functionality of *O*-GlcNAc transferase is required for *Drosophila* development. *Open Biol* 5, 150234.

Mariño-Ramírez, L., Kann, M.G., Shoemaker, B.A., and Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* 2, 719-729.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

McClain, D.A. (2002). Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications* 16, 72-80.

McClain, D.A., and Crook, E.D. (1996). Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45, 1003-1009.

McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C., and Hanover, J.A. (2002). Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10695-10699.

McClelland Descalzo, D.L., Satoorian, T.S., Walker, L.M., Sparks, N.R., Pulyanina, P.Y., and Zur Nieden, N.I. (2016). Glucose-Induced Oxidative Stress Reduces Proliferation in Embryonic Stem Cells via FOXO3A/ β -Catenin-Dependent Transcription of p21(cip1). *Stem Cell Reports* 7, 55-68.

Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 14, 447-459.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., and Kakutani, T. (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411, 212-214.

Miura, T., Kume, M., Kawamura, T., Yamamoto, K., Hamakubo, T., and Nishihara, S. (2018). *O*-GlcNAc on PKC ζ Inhibits the FGF4-PKC ζ -MEK-ERK1/2 Pathway via Inhibition of PKC ζ Phosphorylation in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 10, 272-286.

Miura, T., and Nishihara, S. (2016). *O*-GlcNAc is required for the survival of primed pluripotent stem cells and their reversion to the naïve state. *Biochem Biophys Res Commun* 480, 655-661.

Mosley, A.L., and Ozcan, S. (2003). Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4. *J Biol Chem* 278, 19660-19666.

Murtha, M., Strino, F., Tokcaer-Keskin, Z., Sumru Bayin, N., Shalabi, D., Xi, X., Kluger, Y., and Dailey, L. (2015). Comparative FAIRE-seq analysis reveals distinguishing features of the chromatin structure of ground state- and primed-pluripotent cells. *Stem Cells* 33, 378-391.

Nakanishi, H., Li, F., Han, B., Arai, S., and Gao, X.D. (2017). Yeast cells as an assay system for in vivo *O*-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 1861, 1159-1167.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.

Nishitani, K., Hayakawa, K., and Tanaka, S. (2019). Extracellular glucose levels in cultures of undifferentiated mouse trophoblast stem cells affect gene expression during subsequent differentiation with replicable cell line-dependent variation. *J Reprod Dev* 65, 19-27.

Nishiyama, A., Mulholland, C.B., Bultmann, S., Kori, S., Endo, A., Saeki, Y., Qin, W., Trummer, C., Chiba, Y., Yokoyama, H., *et al.* (2020). Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nat Commun* 11, 1222.

O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., and Marth, J.D. (2004). Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol Cell Biol* 24, 1680-1690.

Oh, H.J., Moon, H.Y., Cheon, S.A., Hahn, Y., and Kang, H.A. (2016). Functional analysis of recombinant human and *Yarrowia lipolytica* *O*-GlcNAc transferases expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol* 54, 667-674.

Olivier-Van Stichelen, S., Wang, P., Comly, M., Love, D.C., and Hanover, J.A. (2017). Nutrient-driven *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) cycling impacts neurodevelopmental timing and metabolism. *J Biol Chem* 292, 6076-6085.

Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., and Hartweck, L.M. (2010). *O*-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochim Biophys Acta* 1800, 49-56.

Ong, M.S., Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2007). DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core. *J Mol Biol* 368, 1067-1074.

Osakabe, A., Lorkovic, Z.J., Kobayashi, W., Tachiwana, H., Yelagandula, R., Kurumizaka, H., and Berger, F. (2018). Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility. *Nucleic Acids Res* 46, 7675-7685.

Pang, M.Y.H., Sun, X., Ausió, J., and Ishibashi, T. (2020). Histone H4 variant, H4G, drives ribosomal RNA transcription and breast cancer cell proliferation by loosening nucleolar chromatin structure. *J Cell Physiol*.

Park, S.K., Zhou, X., Pendleton, K.E., Hunter, O.V., Kohler, J.J., O'Donnell, K.A., and Conrad, N.K. (2017). A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates *O*-GlcNAc Transferase Intron Retention and *O*-GlcNAc Homeostasis. *Cell Rep* 20, 1088-1099.

Parker, G.J., Lund, K.C., Taylor, R.P., and McClain, D.A. (2003). Insulin resistance of glycogen synthase mediated by *O*-linked *N*-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 278, 10022-10027.

Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.

Peng, C., Zhu, Y., Zhang, W., Liao, Q., Chen, Y., Zhao, X., Guo, Q., Shen, P., Zhen, B., Qian, X., *et al.* (2017). Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor *O*-GlcNAcylation. *Mol Cell* 68, 591-604.e595.

Potter, M., Newport, E., and Morten, K.J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans* 44, 1499-1505.

Pérez-Cadahía, B., Drobic, B., and Davie, J.R. (2009). H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol* 87, 695-709.

Qin, W., Wolf, P., Liu, N., Link, S., Smets, M., La Mastra, F., Forné, I., Pichler, G., Hörl, D., Fellingner, K., *et al.* (2015). DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res* 25, 911-929.

Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145-150.

Riggs, A.D., Martienssen, R.A., and Russo, V.E.A. (1996). *Epigenetic Mechanisms Regulating Gene Expression* (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A., *et al.* (2007). Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods* 4, 651-657.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.

Rossetto, D., Avvakumov, N., and Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7, 1098-1108.

Ruan, H.B., Ma, Y., Torres, S., Zhang, B., Feriod, C., Heck, R.M., Qian, K., Fu, M., Li, X., Nathanson, M.H., *et al.* (2017). Calcium-dependent *O*-GlcNAc signaling drives liver autophagy in adaptation to starvation. *Genes Dev* 31, 1655-1665.

Ruan, H.B., Singh, J.P., Li, M.D., Wu, J., and Yang, X. (2013). Cracking the *O*-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24, 301-309.

Rønningen, T., Shah, A., Oldenburg, A.R., Vekterud, K., Delbarre, E., Moskaug, J., and Collas, P. (2015). Prepatterning of differentiation-driven nuclear lamin A/C-associated chromatin domains by GlcNAcylated histone H2B. *Genome Res* 25, 1825-1835.

Sabari, B.R., Zhang, D., Allis, C.D., and Zhao, Y. (2017). Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 90-101.

Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G.W. (2010). Beta-*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19915-19920.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.

Schouppe, D., Ghesquière, B., Menschaert, G., De Vos, W.H., Bourque, S., Trooskens, G., Proost, P., Gevaert, K., and Van Damme, E.J. (2011). Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. *Plant Physiol* 155, 1091-1102.

Schuettengruber, B., Bourbon, H.M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* 171, 34-57.

Selvan, N., Mariappa, D., van den Toorn, H.W., Heck, A.J., Ferenbach, A.T., and van Aalten, D.M. (2015). The Early Metazoan *Trichoplax adhaerens* Possesses a Functional *O*-GlcNAc System. *J Biol Chem* 290, 11969-11982.

Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W., and Marth, J.D. (2000). The *O*-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5735-5739.

Sharma, N.S., Saluja, A.K., and Banerjee, S. (2018). "Nutrient-sensing" and self-renewal: *O*-GlcNAc in a new role. *J Bioenerg Biomembr* 50, 205-211.

Shechter, D., Dormann, H.L., Allis, C.D., and Hake, S.B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2, 1445-1457.

Shi, L., Wen, H., and Shi, X. (2017). The Histone Variant H3.3 in Transcriptional Regulation and Human Disease. *J Mol Biol* 429, 1934-1945.

Simpson, R.T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17, 5524-5531.

Singer, T., Yordan, C., and Martienssen, R.A. (2001). Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation (DDM1)*. *Genes Dev* 15, 591-602.

Snow, C.M., Senior, A., and Gerace, L. (1987). Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol* 104, 1143-1156.

Solomon, M.J., Larsen, P.L., and Varshavsky, A. (1988). Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53, 937-947.

Suzuki, Y., Horikoshi, N., Kato, D., and Kurumizaka, H. (2016). Crystal structure of the nucleosome containing histone H3 with crotonylated lysine 122. *Biochem Biophys Res Commun* 469, 483-489.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 10454-10459.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *67*, 578-583.

Taguchi, H., Horikoshi, N., Arimura, Y., and Kurumizaka, H. (2014). A method for evaluating nucleosome stability with a protein-binding fluorescent dye. *Methods* *70*, 119-126.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.

Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 264-275.

Tan, E.P., Duncan, F.E., and Slawson, C. (2017). The sweet side of the cell cycle. *Biochem Soc Trans* *45*, 313-322.

Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Rossant, J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* *282*, 2072-2075.

Tanaka, Y., Tawaramoto-Sasanuma, M., Kawaguchi, S., Ohta, T., Yoda, K., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2004). Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* *33*, 3-11.

- Taylor, R.P., Parker, G.J., Hazel, M.W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M.J., and McClain, D.A. (2008). Glucose deprivation stimulates *O*-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of *O*-linked *N*-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 283, 6050-6057.
- Tessarz, P., and Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 703-708.
- Thornton, T.M., Swain, S.M., and Olszewski, N.E. (1999). Gibberellin signal transduction presents ellipsis to the SPY who *O*-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci* 4, 424-428.
- Tsunaka, Y., Kajimura, N., Tate, S., and Morikawa, K. (2005). Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res* 33, 3424-3434.
- Turinetto, V., and Giachino, C. (2015). Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 43, 2489-2498.
- Turner, J.R., Tartakoff, A.M., and Greenspan, N.S. (1990). Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic *O*-linked *N*-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5608-5612.
- Verdin, E., and Ott, M. (2015). 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 258-264.
- Vierstra, J., Rynes, E., Sandstrom, R., Zhang, M., Canfield, T., Hansen, R.S., Stehling-Sun, S., Sabo, P.J., Byron, R., Humbert, R., *et al.* (2014). Mouse regulatory DNA landscapes reveal global principles of cis-regulatory evolution. *Science* 346, 1007-1012.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., and Cook, W.J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194, 531-544.

Vosseller, K., Wells, L., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by *O*-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5313-5318.

Waker, C.A., Albers, R.E., Pye, R.L., Doliboa, S.R., Wyatt, C.N., Brown, T.L., and Mayes, D.A. (2017). AMPK Knockdown in Placental Labyrinthine Progenitor Cells Results in Restriction of Critical Energy Resources and Terminal Differentiation Failure. *Stem Cells Dev* 26, 808-817.

Walgren, J.L., Vincent, T.S., Schey, K.L., and Buse, M.G. (2003). High glucose and insulin promote *O*-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E424-434.

Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R.G., and Zhang, Y. (2003). mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell* 12, 475-487.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.

Wang, J., Alexander, P., Wu, L., Hammer, R., Cleaver, O., and McKnight, S.L. (2009). Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science* 325, 435-439.

Wang, Z., Gucek, M., and Hart, G.W. (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated *O*-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13793-13798.

Wang, Z., Pandey, A., and Hart, G.W. (2007). Dynamic interplay between *O*-linked *N*-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* 6, 1365-1379.

Wang, Z., Udeshi, N.D., Slawson, C., Compton, P.D., Sakabe, K., Cheung, W.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2010). Extensive crosstalk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal* 3, ra2.

WARBURG, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8, 519-530.

Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29, 653-663.

Webster, D.M., Teo, C.F., Sun, Y., Wloga, D., Gay, S., Klonowski, K.D., Wells, L., and Dougan, S.T. (2009). *O*-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev Biol* 9, 28.

Wu, J., Ocampo, A., and Belmonte, J.C.I. (2016). Cellular Metabolism and Induced Pluripotency. *Cell* 166, 1371-1385.

Xie, Y., Zhou, S., Jiang, Z., Dai, J., Puscheck, E.E., Lee, I., Parker, G., Hüttemann, M., and Rappolee, D.A. (2014). Hypoxic stress induces, but cannot sustain trophoblast stem cell differentiation to labyrinthine placenta due to mitochondrial insufficiency. *Stem Cell Res* 13, 478-491.

Xu, Q., Yang, C., Du, Y., Chen, Y., Liu, H., Deng, M., Zhang, H., Zhang, L., Liu, T., Liu, Q., *et al.* (2014). AMPK regulates histone H2B *O*-GlcNAcylation. *Nucleic Acids Res* 42, 5594-5604.

Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J., *et al.* (2008). Phosphoinositide signalling links *O*-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451, 964-969.

Yang, X., and Qian, K. (2017). Protein *O*-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 452-465.

Yoshioka, H., McCarrey, J.R., and Yamazaki, Y. (2009). Dynamic nuclear organization of constitutive heterochromatin during fetal male germ cell development in mice. *Biol Reprod* 80, 804-812.

Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 20, 259-266.

Zhang, S., Roche, K., Nasheuer, H.P., and Lowndes, N.F. (2011). Modification of histones by sugar β -*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. *J Biol Chem* 286, 37483-37495.

Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.D., Mandal, S.S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* 20, 601-611.

大山 邦夫・渡来 仁・保田 立二 (1991). 糖タンパク質糖鎖に対するモノクローナル抗体作製のための基礎的研究. *環境病態研報告* 62, 38-45.

(参照した学位論文)

米田智佳子. マウス胚性幹細胞におけるグルコース感受性エピジェネティクスに関する研究. 修士論文. 2014.

西谷健汰. 細胞外グルコース環境がマウス栄養膜幹細胞に及ぼす影響. 修士論文. 2015.

奈良大輔. 新規ヒストン *O*-GlcNAc 修飾 (H4#Gc)の発見とその特性解析. 修士論文. 2016.

論文内容の要旨

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

(※当文章は、学術論文として発表予定の内容に抵触するので、本要約中では削除した。)

第2章 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4#Gc 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-

(※当文章は、学術論文として発表予定の内容に抵触するので、本要約中では削除した。)

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。

(※当文章は、学術論文として発表予定の内容に抵触するので、本要約中では削除した。)

第 3 章 新規ヒストン O-GlcNAc 修飾 H4#Gc 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、H4#Gc 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、H4#Gc のゲノム DNA 上の局在

(※当文章は、学術論文として発表予定の内容に抵触するので、本要約中では削除した。)

本章後半においては、H4#Gc 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 H4#Gc 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

(※当文章は、学術論文として発表予定の内容に抵触するので、本要約中では削除した。)

結論

(※当文章は、学術論文として発表予定の内容に抵触するので、本要約中では削除した。)

2020年12月 初版提出

2021年3月 一部修正

各章のまとめ

第1章

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5年以内に出版予定)

第2章

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5年以内に出版予定)

第3章

本章の内容は、学術論文として刊行される計画がある、
あるいは刊行内容に関わるため公表できない。

(5年以内に出版予定)

(空白のページ)

謝辭

謝辞

実験の遂行方針の決定や本論文の作製にあたり、優しく諭すように的確な助言を授けて下さり、終始多くのご指導を頂きました。また、外部の研究室への出向も快く承諾下さり、結果として途中で戻ってくるようになった際にも温かく受け入れ下さりました指導教員の田中智教授に心から感謝いたします。

実験の遂行や本論文の作製のみならず、研究室内外様々なことに相談に乗って下さるだけでなく、ご自身の体調が優れておられない現在におきましても、未だ多くの面で未熟な筆者を学部生の頃より支え、優しく丁寧に指導してくださいました、廣澤瑞子前助教に誠に感謝いたします。

本研究の遂行において陰ながらご支援下さり、お会いした際やお電話において激励の言葉をかけてくださいました、塩田邦郎前教授に心より感謝致します。

第1章におけます S40Gc-H2A を使用した解析を進めるにあたりまして、筆者の実験遂行や考察を手厚く支えて下さりました上に、構造解析を実際に行って下さりました東京大学 定量生命科学研究所の胡桃坂仁志教授、小山昌子前助教、野澤佳世助教、並びに胡桃坂研究室の皆さまに深謝申し上げます。

第1章において使用しました S40Gc-H2A を大量に合成し、快く幾度とお送り下さりました大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質有機化学研究室の北條裕信教授、川上徹准教授、朝比奈雄也助教、並びに研究室の皆さまに深謝申し上げます。

第1章の研究の立ち上げにおきましてご尽力頂きました、中村学園大学 栄養科学部 栄養科学科の末武勲教授に深く感謝致します。

第2章、および第3章の実験の遂行において、サンプルの分与や助言を下さりました上に、何度伺っても快く相談に乗って下さりました、早川晃司前特任助教に深く感謝いたします。

第3章におけるインフォマティクス解析などにおきまして筆者の補助や助言を下さりました、細胞生化学研究室の先輩であります松本翔馬博士に心より感謝申し上げます

MS/MS 解析を行っていただきました、理化学研究所環境資源科学研究センター 生命分子解析ユニットの堂前直ユニットリーダーはじめ生命分子解析ユニットの皆さまに感謝致します。

短い間ではありましたが、お会いしました際にはいつも気さくにご挨拶下さり、ゼミなどを通じて助言を与えて下さいました、片岡直行准教授に深く感謝致します。

研究に関わる話からとりとめのない話まで様々な相談に乗って下さり、支えて下さりました細胞生化学研究室の先輩であります西谷健汰博士に深く感謝致します。

実験の面でも、またそれ以外の面でも、研究室生活を充実した楽しいものにして下さいました、細胞生化学研究室のその他先輩方や後輩の皆様心より感謝致します。

最後に、今日に至るまで私を温かく見守り、常に気にかけて、味方となって支えて下さいました、両親をはじめとした家族・親族、友人、並びに婚約者であります松山佳織さんに心から感謝致します。

令和3年(2021年)1月 奈良大輔

(追記)

本論文の査読をして下さり、令和2年11月4日の予備審査会および令和3年1月28日の本審査会を通じて、貴重なご意見やご指摘を賜り下さいました審査委員の先生方のお力添えの下、本論文を完成させることができました。博士論文審査の副査を務めて下さいました、農学生命科学研究科応用動物科学専攻・応用遺伝学研究室の内藤邦彦教授、同・動物細胞制御学研究室の高橋伸一郎教授、同・細胞生化学研究室の片岡直行准教授および東京大学定量生命科学研究所の胡桃坂仁志教授、そして主査を務めて下さいました、指導教員でもあります田中智教授に改めて厚く御礼申し上げます。

令和3年(2021年)3月 奈良大輔