

博士論文

論文題目 メチル化 DNA 水酸化酵素 TET による
エピゲノム制御機構の解析

氏名 伊藤 亮

目次

論文内容の要旨	1
略語一覧	5
第一章 序論	6
第二章 メチル化シトシン水酸化酵素 TET3 複合体の同定と機能解析	22
第一節 緒言	23
第二節 材料と方法	24
第三節 結果	
第一項 TET3 相互作用因子の同定	35
第二項 TET3 と OGT の相互作用様式の検討	37
第三項 OGT による TET3 の GlcNAc 修飾	39
第四項 TET3 による OGT の局在制御	41
第五項 TET3 による OGT タンパク質の安定化	42
第四節 小括	45
第三章 軟骨細胞分化における TET ファミリー遺伝子の機能解析	63
第一節 緒言	64
第二節 材料と方法	65
第三節 結果	
第一項 細胞分化における TET 遺伝子発現の挙動	70
第二項 軟骨細胞分化における TET の発現挙動	71
第三項 軟骨細胞分化に伴うメチル化環境の解析	72
第四項 軟骨細胞分化における 5hmC の機能	73
第五項 軟骨細胞分化における TET1 の役割	74
第四節 小括	75
第四章 総合討論	81
第一節 本研究のまとめ	82

第二節 本研究の成果	
第一項 TET3-OGT 複合体の同定	83
第二項 TET3 の GlcNAc 修飾の同定	84
第三項 OGT タンパク質の安定化機構	84
第四項 軟骨細胞分化におけるメチルシトシン水酸化	85
第五項 軟骨細胞分化における TET1 の機能	86
第三節 今後の展望	87
引用文献	90
謝辞	96

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 23 年博士課程入学
氏名 伊藤 亮
指導教員 白髭 克彦

論文題目 メチル化 DNA 水酸化酵素 TET によるエピゲノム制御機構の解析

第一章 序論

ヒトをはじめとする多細胞生物では時期・空間特異的に様々な遺伝子が発現しており、この遺伝子発現調節機構の一つとしてエピゲノム制御による転写調節が知られている。エピゲノム制御は DNA 配列に依存せず、クロマチン構造を変化させることで転写に影響を与え、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾や DNA のシトシン残基のメチル化などが知られている。

ヒストン修飾によるエピゲノム制御では、ヒストンのテイル領域がアセチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることでクロマチン構造が変化し、転写が調節されると考えられている。一方、大腸菌をはじめ様々な生物においてゲノム中のシトシン塩基がメチル化されている。特に動植物においては、CG 配列の多くがメチル化されており、さらにプロモーター DNA のメチル化は遺伝子発現を抑制することが知られている。このような DNA のメチル化は DNA メチル基転移酵素により厳密に制御されており、一般的に動物細胞では、一度受けたメチル化修飾は除去されることがなく安定であると考えられていた。しかしながら最近になって、メチルシトシンを水酸化する酵素 Ten-eleven translocation (TET) が同定された。TET はメチルシトシンの水酸化反応を促すことで脱メチル化反応を引き起こすと考えられている。

また、エピゲノム制御による遺伝子発現調節は細胞の表現型決定に大きな影響を与えることが知られている。例えば、5-アザシチジンによる間葉系幹細胞の DNA メチル化環境の攪乱は、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞への分化がもたらされることが古くから知られている。しかしながら、TET によるメチルシトシン水酸化反応と細胞分化の関係性は未だ不明なままである。

エピゲノム制御機構には様々な因子が複合的、協調的に機能していることが知られている。本研究では、TET を題材とし、その機能解析を行うことで新規エピゲノム制御機構を明らかにすることを目的とした。中でも、TET ファミリーの内、複合体構成因子の明らかにされていない TET3 に着目し、生化学的手法を用いて新規エピゲノム制御機構の解明を目指した。また、TET によるエピゲノム制御機構と生命現象の関係を明確にするため、培養細胞の分化系を用いて解析を行った。

第二章 メチル化シトシン水酸化酵素 TET3 複合体の同定と機能解析

TET3 は受精時のエピジェネティックなリプログラミングや神経、目の発生に重要であることが報告されている。しかしながら、多くのエピゲノム制御因子がそうであるように複合体形成を有無やその構成因子は明らかにされていない。本研究では生化学的手法を用いて複合体を精製し、構成因子の同定を行った。その結果、TET3 の主要な相互作用因子として O 結合型 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (O-GlcNAc transferase, OGT) を同定した。OGT はヒストンを GlcNAc 修飾することが報告されており、プロモーター近傍のヒストン GlcNAc 修飾は遺伝子発現を促進する可能性が示唆されている。

そこで、TET3 と OGT の結合様式を詳細に解析した。その結果、TET3 と OGT の相互作用には TET3 の C 末端領域に存在する H ドメインが重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、TET ファミリー内における OGT 結合の保存性を解析し、TET2、TET3 が特に強い OGT 結合性を有することを示した。

OGT は多様なタンパク質を基質として GlcNAc 化し、その機能を調節することが知られている。その知見を元に、TET3 も OGT により GlcNAc 化され、メチルシトシン水酸化活性が調節されている可能性を予想した。抗 GlcNAc 抗体を用いた解析、及び質量分析を行った結果、TET3 は OGT により GlcNAc 修飾を受けることが明らかとなった。しかしながら、その GlcNAc 修飾が与えるメチル化 DNA 水酸化活性への影響は検出されなかった。

また、最近になって、TET2、TET3 が OGT と相互作用し、さらに TET2 は OGT のク

ロマチンリクルートを促進することが明らかにされた¹⁾。本研究では、同様に TET3 も OGT の局在を制御する機能を持つことを示した。詳細な解析の結果、TET3 は OGT タンパク質を安定化し、タンパク質レベルで発現量を亢進することを新たに見出した。

第三章 軟骨細胞分化における TET ファミリー遺伝子の機能解析

細胞の表現型決定とエピゲノム制御は密接な関わりを持つことが知られおり、特に DNA のメチル化環境と細胞分化の関わりはよく研究されている。しかしながら、最近になって提唱されている TET によるメチルシトシン水酸化反応と細胞分化の関係は未だ不明なままである。そこで、培養細胞の分化系をモデルとして TET の新規生理作用の解明を試みた。

TET によるエピゲノム制御化にある細胞では TET の発現が亢進していることが予想された。そこで、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞分化における TET ファミリー遺伝子の発現量を解析した。その結果、脂肪細胞、軟骨細胞では分化に伴い TET1、及び TET2 の発現が顕著に上昇することが明らかとなった。また、軟骨細胞に含まれるゲノム DNA のメチルシトシン、水酸化メチルシトシンの含有量を解析した結果、分化に伴い、メチルシトシンは減少し、水酸化メチルシトシンは顕著に増加することが示された。さらに、分化に伴い発現が上昇する X 型コラーゲン遺伝子のプロモーターでは、メチルシトシンが水酸化されていることが示唆された。

次に、メチルシトシン水酸化が軟骨細胞分化に与える影響を検証した。TET3 の触媒領域を発現し異所的にメチルシトシンを水酸化させる培養細胞系を構築し、解析に用いた。しかしながら、人為的にメチルシトシンを水酸化させた細胞でも軟骨細胞分化に影響は見られなかった。

また、TET1 がメチルシトシン水酸化以外のメカニズムで機能している可能性を予想し、検証した。TET1 に対する shRNA を発現する細胞株を作製し、軟骨分化刺激を与えた。その結果、アルシアンブルー染色では明確な違いは見られなかったが、II 型コラーゲンや X 型コラーゲンなどの分化マーカーとなる遺伝子の発現が上昇することを見出した。

第四章 総合討論

本研究では、メチルシトシン水酸化酵素 TET3 の主要な相互作用因子として OGT を同定した。さらに、TET2、TET3 と OGT の相互作用が特に強く保存されていることを明らかにした。TET ファミリーはそれぞれが特徴的な生理作用を有しており、本研究で示唆され

た TET-OGT 相互作用の選択性はそのような生理作用の多様性に寄与している可能性が考えられた。

また、最近、TET-OGT の相互作用に関する報告がなされた¹⁾。本研究で得られた TET3 が OGT のクロマチン局在を制御するという知見はこれまでの報告と合致するものであった。しかしながら、TET が OGT をクロマチンへとリクルートする具体的なメカニズムに関しては未だ明らかにされていなかった。本研究では、TET3 が OGT タンパク質の安定化をもたらすことを明らかにし、その結果 OGT のクロマチン局在を亢進することを新たに見出した²⁾。

一方、軟骨細胞分化に伴い TET1、及び TET2 の発現が上昇し、メチルシトシンの水酸化が亢進することを示した。これらの結果は分化に伴う脱メチル化に水酸化反応が関わることを強く示唆するものである。しかしながら、人為的にメチルシトシンを水酸化した細胞株を用いても軟骨細胞分化の進行に差は見られなかった。これらの結果は、メチルシトシンの水酸化自体は軟骨細胞分化の引き金になりえないことを示している。すなわち、軟骨細胞分化における脱メチル化反応には、TET によるメチルシトシン水酸化とともに、他の因子の介在が必要であることが予想される。

さらに本研究では、TET1 が軟骨細胞分化に対し抑制的に機能していることを明らかにした。これまで、TET1 による転写調節は、脱メチル化を介した活性化機構とヒストン脱アセチル化複合体を介した不活性化機構が報告されている。今回の結果から、軟骨細胞においては、TET1 がそのようなエピゲノム制御複合体を介して転写抑制的に機能している可能性が示唆された。

以上、本研究では TET3 による新規エピゲノム制御機構の分子基盤の一端を明らかにし、さらに、TET1 によるエピゲノム制御の新たな生理作用の可能性を示唆した。

(参考文献)

- 1) Chen Q, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. (2013) *Nature*, 493, 561-4
- 2) Ito R, Katsura S, Shimada H, Tsuchiya H, Hada M, Okumura T, Sugawara A, Yokoyama A. (2014) *Genes to Cells*, in press

略語一覽

293T	human embryonic kidney 293T
5-Aza	5-Azacytidine
5hmC	5-hydroxymethylcytosine
5mC	5-methylcytosine
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD	catalytic domain
CHX	cycloheximide
DNA	deoxyribonucleic acid
Dox	doxycyclin
GFP	green fluorescent protein
GlcNAc	N-acetylglucosamine
LC-MS/MS	liquid chromatography - mass spectrometry / mass spectrometry
OGT	O-linked N-acetylglucosamine transferase
RT-(q)PCR	reverse transcription-(quantitative) polynucleotide chain reaction
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interference RNA
TET	ten-eleven translocation
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine
WB	western blotting

第一章 序論

第一節 転写調節の多様性

ヒトをはじめとする多細胞生物は多種多様な細胞から構成されている。それらの細胞内では、それぞれに特異的な遺伝子群が発現し、機能していると考えられており、そのような時期・空間特異的な遺伝子発現機構の一つとして、転写調節機構が重要であることはよく知られている。転写反応の中でも特に遺伝子発現の多様性に寄与する mRNA の合成は RNA ポリメラーゼ II により行われ、その調節機構は多段階的であると考えられている(1,2)。

DNA 結合性の転写因子はそれぞれの因子に規定されている DNA 配列へと結合すると、共役因子 (コファクター) と共に複合体を形成する(2,3)。次に、転写開始点上流のプロモーター DNA では基本転写因子群と呼ばれるタンパク質群が RNA ポリメラーゼ II の会合を促進する(4,5)。さらに、基本転写因子群、及び転写伸長因子により RNA ポリメラーゼ II の C 末端領域がリン酸化され、RNA 合成が開始される(6) (Fig.1-1)。

第二節 エピゲノム制御

第一項 クロマチン構造とエピゲノム制御

真核生物において DNA はヒストンと呼ばれる塩基性タンパク質に結合した状態で核内に存在する。ヒストンは 4 種類のヒストンタンパク質 H2A、H2B、H3、H4 がそれぞれ 2 つずつ結合した八量体で存在する (Fig. 1-2a)。それぞれのヒストンには N 末端、C 末端、もしくはその両方にテイルと呼ばれる領域が存在し、このテイル領域は 8 量体から突出した状態で存在している。また、DNA の結合した状態はヌクレオソームと呼ばれる(7,8) (Fig. 1-2b)。真核生物のゲノムはこのヌクレオソームを最小単位とし、多数のヌクレオソームが連なった状態でクロマチン構造を形成している。クロマチン構造には多数のヌクレオソームが密に存在するヘテロクロマチンと疎であるユークロマチンが知られている。ヘテロクロマチンでは、ヌクレオソームが高度に凝縮しているがゆえに RNA ポリメラーゼ II などがリクルートできず転写が抑制された状態にある(9)。反対にユークロマチンでは活発に転写が行われている (Fig. 1-2c)。こういったクロマチン構造変換は様々な要因によりもたらされる。中でも、DNA 配列に依存せず、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチンリモデリング因子、ヒストン多様性や DNA のメチル化などに起因する制御様式はエピゲノム制御と呼ばれる。

第三節 DNA メチル化修飾によるエピジェネティック調節

第一項 シトシン塩基のメチル化と遺伝子発現制御の分子基盤

動物や植物ではシトシン塩基の 5 位の炭素がメチル化されたメチル化シトシン (5-methylcytosine, 5mC) が存在する (Fig.1-3a)。動物において、ゲノム上の CG から成る配列 (CpG 配列) の多くはメチル化されており、特に、遺伝子のプロモーターやその近傍の DNA メチル化は遺伝子発現を強固に抑制することが知られている。反対に転写が活発に行われている遺伝子のプロモーターにおいては、CpG 配列はメチル化されておらず、このような領域は CpG アイランドと呼ばれる (10,11) (Fig. 1-3b)。これらのような DNA メチル化によるエピゲノム制御は生体内においてトランスポゾンの抑制や X 染色体の片アレルの不活性化などに寄与していることが知られている(12,13)。

DNA メチル化による転写抑制にはいくつかのメカニズムが報告されている。一部の DNA 結合性転写因子は標的となる DNA がメチル化するとその標的配列への結合能が低下する (14) (Fig.1-3c 左図)。また、メチル化 DNA 結合因子 (methylated DNA binding protein, MBP) の寄与も知られている (Fig. 1-3c 右図)。Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) は古くからよく知られた MBP であり(15)、ヒストン脱アセチル化酵素を含む Nuclear receptor corepressor (NCoR) 複合体を呼び込みヒストン修飾を介して転写を抑制する(16)。Methyl-CpG binding domain protein (MBD) 1 もまたヒストン修飾酵素 SET domain bifurcated 1 (SETDB1) などと相互作用し、ヒストン修飾を介したクロマチンの凝縮を行う(17)。MBD2 は Nucleosome remodeling deacetylase (NuRD) 複合体と相互作用しクロマチン構造を変換することで転写抑制を行う(18)。これらのように、DNA のメチル化は様々な機構により遺伝子発現を抑制している。

上記のように DNA のメチル化はエピジェネティックな遺伝子発現調節において重要な役割を担っている。しかしながら、複製において DNA は新規に合成されており、複製が行われると DNA あたりのメチル化シトシン含量は半減することが予想される。ところが実際には、一度生体内で確立された DNA メチル化はほとんどが細胞分裂を経ても伝承されていき、そのような受動的な脱メチル化は起こらないことが知られている。このような DNA メチル化の維持には DNA メチル基転移酵素 1 (DNA methyltransferase, DNMT1) が寄与している。DNMT1 は新規合成されたばかりで片側のみがメチル化された DNA 鎖を標的とし、

鋳型としても一方の DNA 鎖をメチル化する(19,20) (Fig. 1-3d 上図)。このようにして DNA のメチル化は分裂後の娘細胞にも受け継がれていく。また、DNMT3a、DNMT3b は両鎖ともメチル化されていない DNA を標的とし、新規に DNA をメチル化する酵素として同定されており、特に初期発生に重要な役割を果たしていることが知られている(21) (Fig. 1-3d 下図)。

第二項 DNA 脱メチル化機構

DNA のメチル化は前述した受動的な脱メチル化の他にも、能動的な脱メチル化が起こることが徐々に明らかにされつつある。植物では、REPRESSOR OF SILENCING1 (ROS1)、DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2)、DEMETER-LIKE 2/3 (DML2/3)などの酵素が直接的にシトシン塩基のメチル基を除去する(22,23)。しかしながら、哺乳類ではこのような活性をもつ酵素は報告されておらず、植物とは異なる様々な機構が提唱されている(24)。DNA 傷害応答タンパク質である growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (Gadd45a) の関与するヌクレオチド除去修復は脱メチル化を引き起こすことが報告されている(25) (Fig. 1-4a)。また、Activation-induced cytidine deaminase (AID)、Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (APOBEC) により 5mC が脱アミノ化されチミン (T) に置換されると、G/T ミスマッチ修復酵素である Thymine-DNA glycosylase (TDG)、Methyl-CpG-binding domain protein 4 (MBD4) によりシトシンへと変換される(26,27) (Fig. 1-4b)。また、2009年には 5mC が酸化された状態である水酸化メチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine 5hmC) とともに、その酸化反応の責任酵素である Ten-eleven translocation (TET) が同定された(28,29)。TET はさらに酸化反応を起こし、5hmC をホルミルシトシン (5-formyl-cytosine, 5fC)、カルボキシルシトシン (5-carboxylcytosine, 5caC) へと変換する(30,31)。5hmC は DNMT1 との親和性の弱さゆえに複製時に希釈されることが示唆されている(32)。また、5fC や 5caC は TDG を介した塩基除去修復機構によりシトシンへと置換される機構が考えられている(30,33) (Fig. 1-4c)。

第三項 TET ファミリー

TET ファミリーは TET1、TET2、TET3 のタンパク質から構成され、これら全てのタン

パク質が 5mC を水酸化する活性をもち、この活性を司る触媒領域 (catalytic domain, CD) が C 末端側に保存されている(29) (Fig. 1-5a)。CD は Cysteine-rich domain (CRD)、及び double strand beta helix domain (DSBH) から構成されており、DSBH 内にはさらに HxD domain (HxD) と H domain (H) が保存されている。DSBH は一部のヒストン脱メチル化酵素に見られる jumonji C domain に類似した構造を示し、その類似性比較から HxD は鉄イオンと、H は鉄イオン及び α -ケトグルタル酸との結合が予測されている(34,35)。さらに、TET1 と TET3 には N 末端側に非メチル化 CpG 結合ドメインとして知られる CXXC domain (CXXC) が保存されている(33)。

2009 年に TET ファミリーが同定されて以降、いくつかのグループが TET の生理作用に関する研究を報告している。TET1 は ES 細胞の未分化能維持の他(34,36,37)、卵細胞の減数分裂や(38)、脳神経系で機能していることが報告されている(39,40)。TET2 は骨髄異形成症候群の原因遺伝子としても知られており、血球分化に深く関わっていると考えられている(41-44)。TET3 は受精時の父性 DNA の脱メチル化や(45,46)、アフリカツメガエルの眼及び神経の発生に必要であることが報告されている(47) (Fig. 1-5b)。

第四節 ヒストン修飾によるエピゲノム調節機構

第一項 ヒストン修飾の多様性

ヒストン修飾を介したエピゲノム制御はヌクレオソームから露出したテイル領域の特定のアミノ酸残基に見られる。これまでもリジン残基のアセチル化、リジン・アルギニン残基のメチル化、セリン・スレオニン残基のリン酸化、リジン残基のユビキチン化などが知られている(48-50) (Fig. 1-6a)。また、最近になって単糖である N-アセチルグルコサミン (N-Acetylglucosamine, GlcNAc) が修飾基として付加されることが報告されている(51)。このようなヒストン修飾はそれぞれの責任酵素により行われる(48,52)。例えば、アセチル化修飾は p300 や CREB-binding protein (CBP) などのヒストンアセチル化酵素 (HAT)、メチル化修飾は G9a、SET domain containing 1A (SET1A) や Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1 (MLL1) などヒストンメチル化酵素 (HMT)、リン酸化修飾は Mitogen- and stress- activated protein kinase 1 (MSK1) などの酵素、ユビキチン化修飾は Ring finger protein 20 (RNF20) などの酵素により行われる。また、GlcNAc 化修飾は O 結合型 GlcNAc 転移酵素 (O-linked GlcNAc transferase, OGT) により付加される(51,53)。

こういった付加反応の多くは可逆的であり、逆反応を担う酵素、例えば、脱アセチル化酵素 (HDAC)、脱メチル化酵素 (HDM)なども知られている。また、GlcNAc 修飾の除去は脱GlcNAc 酵素 (O-GlcNAcase, OGA) の関与が予想される(Fig. 1-6b)。

第二項 ヒストンの修飾の機能

ヒストン修飾は様々な機構で遺伝子の発現を調節することが知られている (Fig. 1-6c)。例えば、プロモーター近傍のヒストン H3 や H4 のリジン残基のアセチル化は遺伝子の発現を上昇させる。ヒストンは多くのリジン残基を含むことで強い正電荷を帯び、強固に DNA に結合しているが、リジン残基のアセチル化修飾はその正電荷を打ち消すことで DNA との親和性を減弱させる。その結果、ヌクレオソーム構造が緩み、他の転写因子などの結合が促進し、転写が活性化すると考えられている(50)。また、リジン残基のメチル化はより複雑な機能性を有する。H3 の 4 番目のリジン残基 (H3K4) のメチル化は発現の活発な遺伝子のプロモーター上で見られる。例えば、Bromodomain PHD finger transcription factor (BPTF) は PHD フィンガー領域を介してトリメチル化された H3K4 を認識し、Imitation SWI (ISWI) などとクロマチンリモデリング複合体である Nucleosome remodeling factor (NURF) 複合体を形成し、クロマチン構造を弛緩することで転写を活性化させる(54)。一方、H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化は発現が抑制された遺伝子のの上流で良く見られる。Heterochromatin protein 1 (HP1) のクロモドメインはメチル化された H3K9 に結合し、HP1 自身がホモ二量体を形成することでヘテロクロマチンが形成され、転写が抑制されると考えられている(55)。さらに、H4 の 47 番目、H2B の 36 番目のセリン残基や H2A101 番目のスレオニン残基に見られる GlcNAc 修飾はクロマチンの凝縮に関与することが示唆されている(51,56)。これらのように、遺伝子発現においてヒストン修飾は様々な機構を通して機能している。

第六節 エピゲノミクスと生命現象

第一項 細胞分化とエピゲノミクス

エピゲノム制御は様々な生命現象に関与することが知られており、中でも、生体を形成する細胞の表現型決定に重要であると考えられている。多細胞生物のほぼすべての細胞が

同じ配列の DNA を持つにも関わらず、各組織の機能を規定しうる多種多様な細胞に分化できるのは、組織特異的転写因子とともにそれぞれの組織特異的なエピゲノム環境が整えられているからであると考えられている。

そのエピゲノム制御機構として、古くは DNA メチル化による制御が知られている。1979年、マウス間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 様である 10T1/2 細胞に DNMT 阻害剤であるシチジン類縁体 5-Azacytidine (5-Aza) を処理することで筋細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞への分化を誘導できることが報告された (57)(Fig. 1-7a)。この 5-Aza による分化誘導はそれぞれの分化誘導遺伝子の DNA メチル化による転写抑制の解除により引き起こされることが示唆されている(58)。また、近年活発に研究が進められている体細胞リプログラミングにおいても、エピゲノム制御が関与することが知られている。体細胞から induced-pluripotent stem (iPS) 細胞が誘導される際、Nanog 遺伝子などプロモーター上では活発に脱メチル化が起こる(59,60)。さらに、5-Aza を処理することでリプログラミング効率が向上することが報告されている(61)。以上のように、細胞のエピゲノム制御はその細胞特異的な遺伝子発現を通して表現型決定に大きく寄与すると考えられている。また、本研究で着目した軟骨細胞分化については次項で詳述する。

第二項 軟骨細胞分化とエピゲノム制御

生体の骨格の多くは軟骨への分化を介した骨格形成 (軟骨内骨化)であるため、軟骨細胞分化が骨格形成に重要であるといえる。この間葉系幹細胞から誘導される軟骨細胞分化はいくつかのステージに分類され、それぞれに重要な転写調節因子や増殖因子が存在することが知られている(62,63) (Fig. 1-7b)。間葉系幹細胞が凝集し、静止軟骨細胞 (resting chondrocyte)へと分化すると、軟骨細胞分化において中心的な役割を果たす SRY- related high mobility group box (Sox) 9 の発現上昇が見られる(64)。その後、増殖軟骨細胞 (proliferative chondrocyte)、そして肥大軟骨細胞 (hypertrophic chondrocyte) へと分化が進むにつれ bone morphogenetic proteins (BMPs) や runt related transcription factor (Runx) 2 などが主要な因子として機能する(65-67)。

肥大軟骨細胞のマーカータンパク質でもある 10 型コラーゲン A1 (collagen 10A1, Col10a1) は分化に伴い発現上昇するとともに、プロモーターの一部の CpG のメチル化レベルが低下することが報告されている(68)。また、Sox9 はアセチル化酵素である CBP/P300 との相互作用を介してヒストンをアセチル化し、転写を調節していることが知られている

(69)。これらのように軟骨細胞分化においてもエピゲノム制御が関与することが示唆されているが、未だその多くは良く理解されていない。

第八節 本研究の課題

以上のように、様々な生命現象にはエピゲノミックな転写制御が深く関わっていることが知られているが、それらの全容は未だ明らかにされていないことが多い。そのようなエピゲノム制御機構の中でも、最近になって同定された TET はこれまで明らかにされてこなかったメチル化 DNA の脱メチル化機構に重要な役割を担っていることが示唆されており、その生理作用や作用機序が徐々に明らかにされつつある。これまで報告された TET の研究で示されたことは TET の生理作用とその作用機構の多様性である。すなわち、TET ファミリー内においてもそれぞれが独立した機能と分子基盤を持つことが考えられる。本研究では、そのような TET ファミリーを題材として、エピゲノム制御の分子基盤とそれに関わる生命現象の一端を明らかにすることを目的とする。

これまで様々な研究で明らかにされてきたように、エピゲノム制御因子の多くは他のタンパク質との相互作用を介して複合体を形成し機能することが考えられる。実際に、TET ファミリーの内、TET1 は NCoR 複合体や NuRD 複合体に組み込まれていることが示唆されている(70,71)。そこで第二章では、未だ複合体構成因子が明らかにされていなかった TET3 に着目し、生化学的手法を用いて複合体精製を試みた (Fig. 1-8a)。第三章においては、TET の生理的な機能の解析を、特に間葉系幹細胞の軟骨細胞分化系に着目して行った (Fig. 1-8b)。

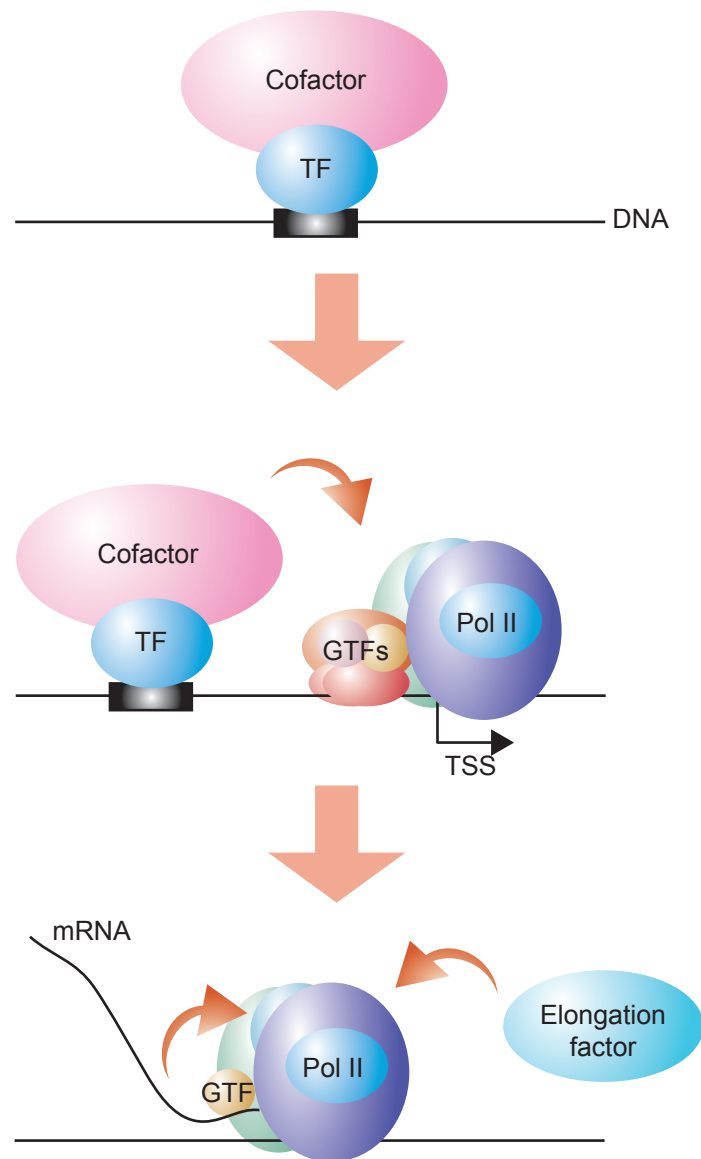
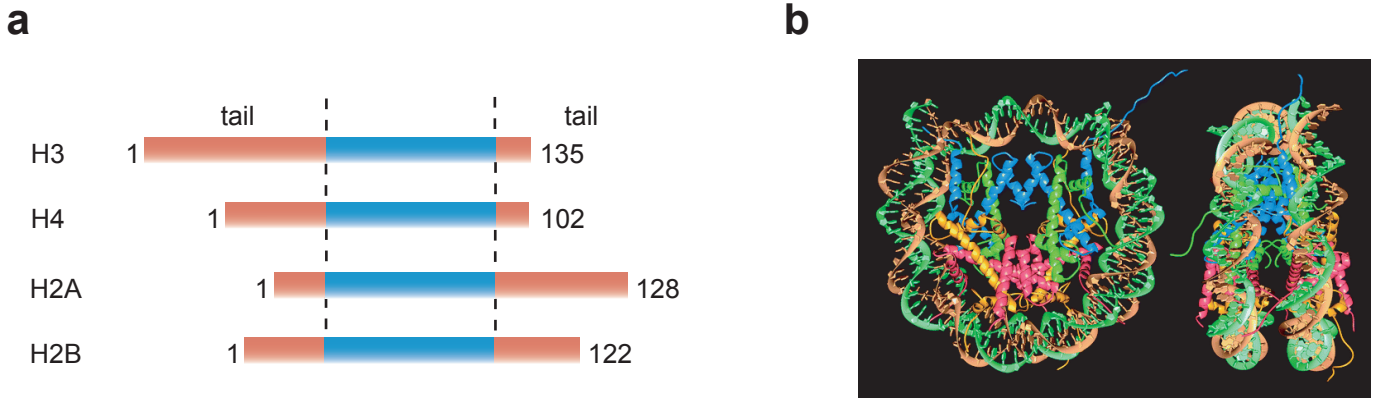


Fig. 1-1 転写制御の概要

DNA結合性転写因子 (Transcription factor) が転写開始点 (transcription start site) 近傍のプロモーターDNAへ結合すると、転写共役因子 (Cofactor) と複合体を形成する。その後、基本転写因子群 (General transcription factors) やRNAポリメラーゼII (Pol II) がリクルートし、転写開始前複合体が形成される。RNAポリメラーゼIIのC末端領域 (CTD) が一部の基本転写因子や転写伸長因子 (Elongation factor) によりリン酸化されることでRNAポリメラーゼIIが駆動し、RNA合成が行われる。



Nature 389, 251-60 (1997)

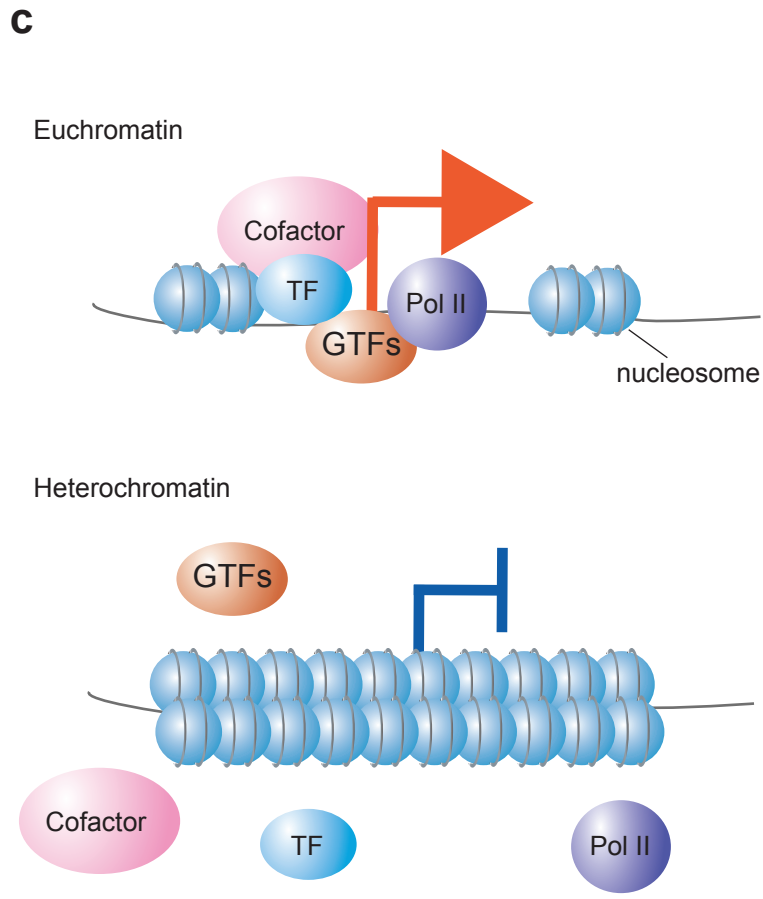


Fig. 1-2 ヒストンとヌクレオソームから成るクロマチン構造
 (a) ヒストンタンパク質ファミリーの模式図 ファミリーの内、H2A、H2B、H3、およびH4の一次構造を示した。それぞれのタンパク質には、テイル領域と呼ばれる突出部位 (赤) が存在する。(b) ヌクレオソームの結晶構造 ヌクレオソームはH3、H4、H2A、H2Bが二つずつ結合したヒストンオクタマーにDNAが巻き付く構造をとる。図中では、H3が青、H4が緑、H2Aが黄、H2Bが赤で示されている。(c)クロマチン構造と転写活性 真核生物のゲノムDNAは多数のヌクレオソームが重合したクロマチン構造をとる。この内、ヌクレオソームが疎である領域はユークロマチンと呼ばれ活発に転写が行われている (上図)。一方、ヌクレオソームが密な部分はヘテロクロマチンと呼ばれ、他の転写関連因子が結合できないため、転写はあまり行われていない (下図)。

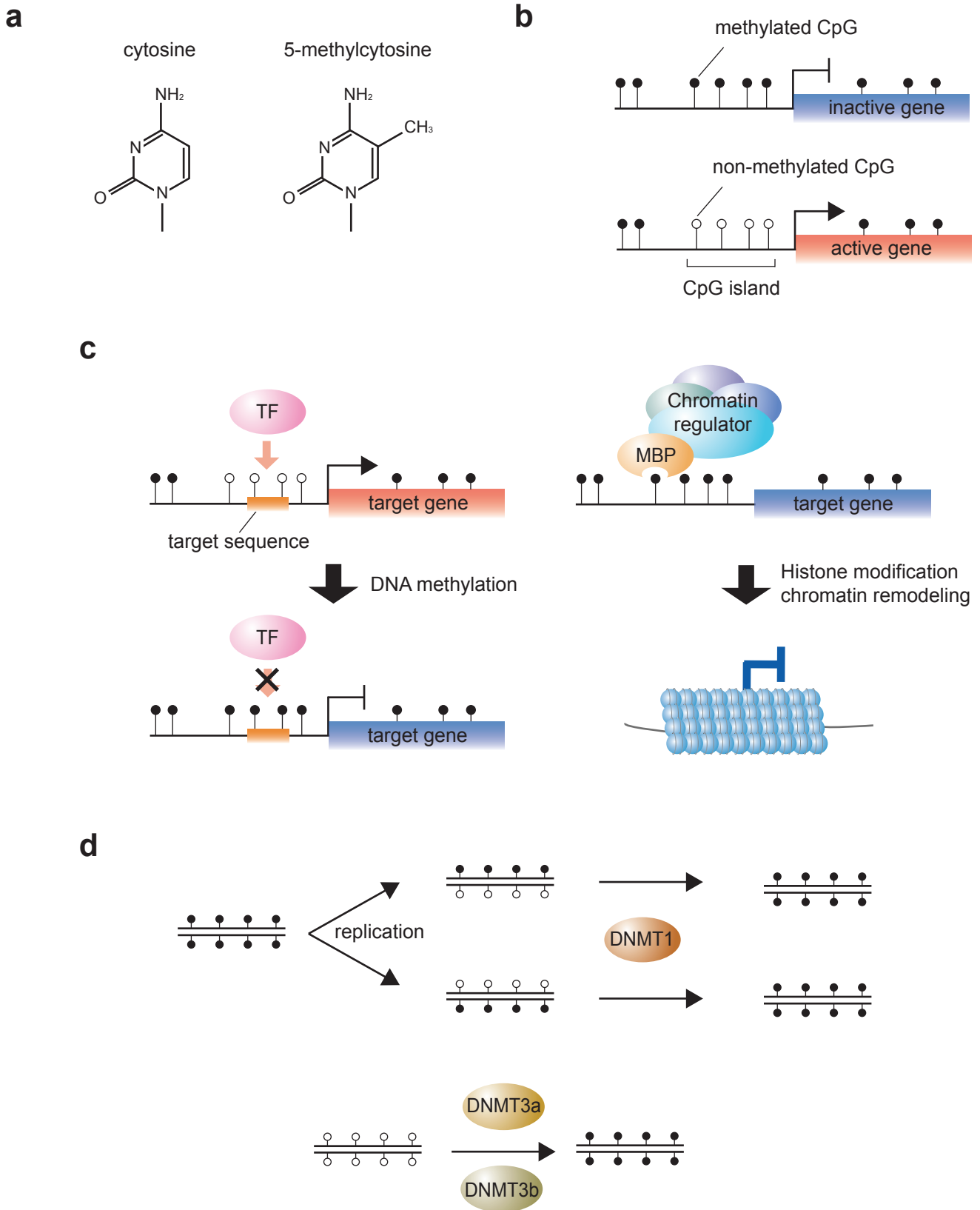


Fig. 1-3 DNAメチル化修飾とエピゲノム調節

(a) シトシンとメチルシトシンの模式図 (b) プロモーターDNAのメチル化と転写に対する影響 (c) メチル化DNAによる遺伝子発現抑制の分子機構 一部の転写因子は標的配列がメチル化されると、DNAとの親和性が低下する(左図)。一方、MeCP2などのMethylated DNA binding protein (MBP)などは、他のヒストン修飾酵素やクロマチンリモデリング因子などのエピゲノム制御因子をリクルートし、クロマチン構造の変換する(右図)。(d) DNAメチル化機構 DNMT1は複製により新生される非メチル化DNA鎖を認識し、メチル化を行う(上図)。DNMT3a、DNMT3bはメチル化されていないDNAを認識してメチル化を行う(下図)。

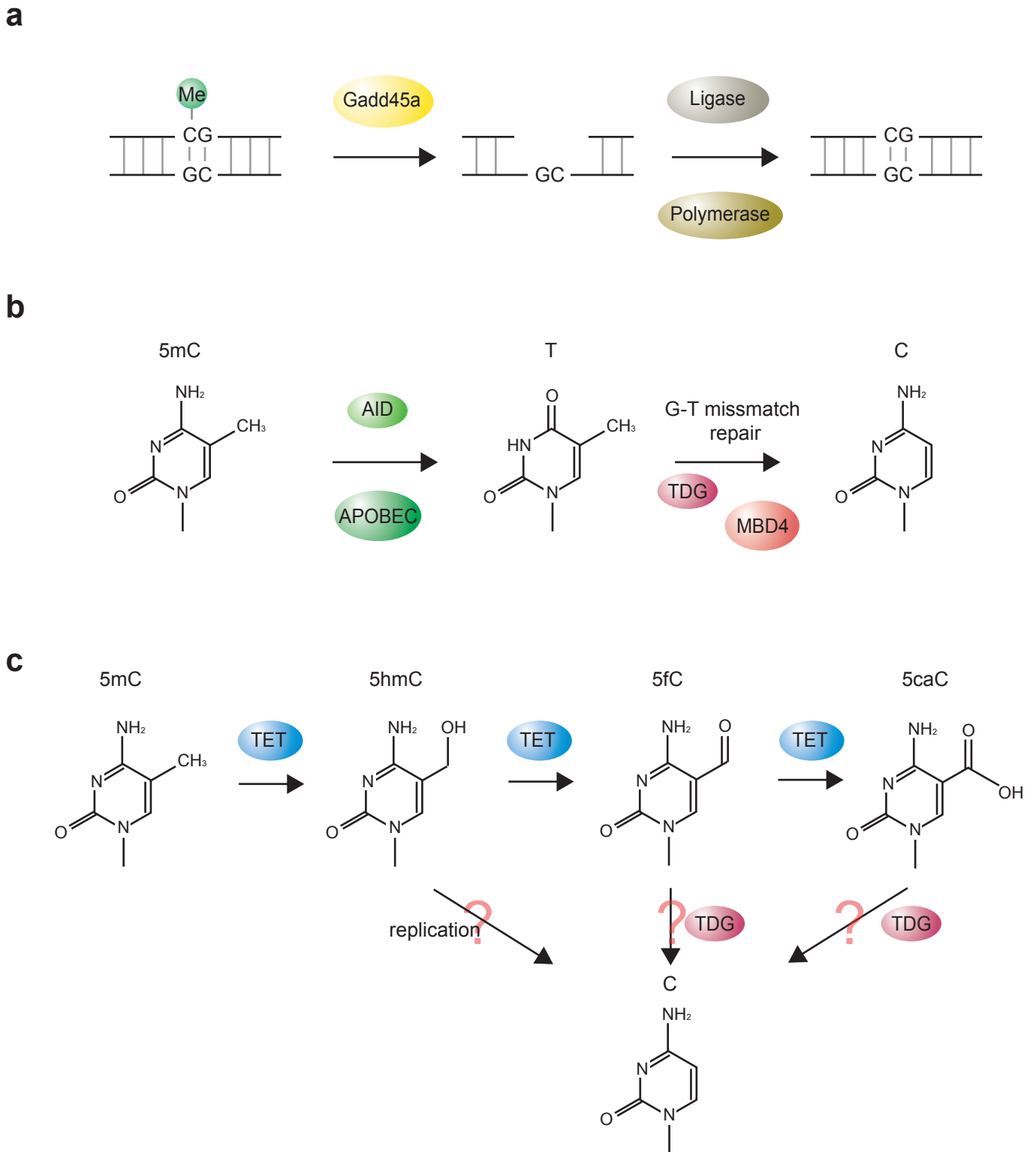
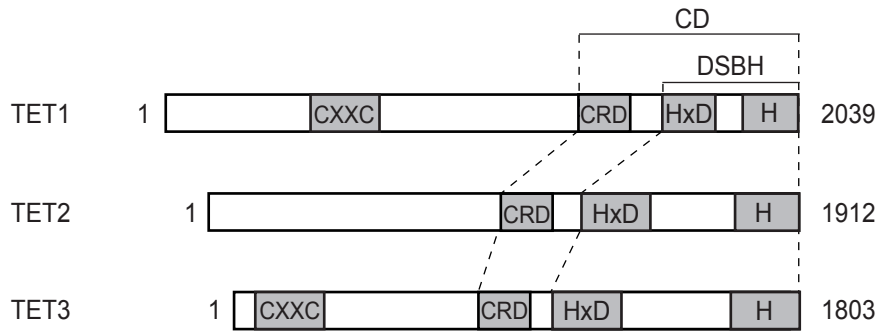


Fig. 1-4 様々なDNA脱メチル化の分子機構

(a) Gadd45aによる脱メチル化 Gadd45aやDNA polymerase、Ligaseの関与するヌクレオチド除去修復によりメチル基が除去される。(b) AID/APOBECを介したDNA脱メチル化 AID/APOBECの脱アミノ化により5mCはTへ変換される。その後、TはG-Tミスマッチ修復機構によりCへと変換する。(c) TETによる5mCの水酸化 TETは5mCを酸化し、5hmC、5fC、そして5caCへと変換する。5hmCはDNMT1との親和性の低さから複製時に維持されない可能性が示唆されている。また、5fCと5caCはTDGによる塩基除去修復されることが報告されている。

C: cytosine, T: thymine, 5mC: 5-methylcytosine, 5hmC: 5-hydroxymethylcytosine, 5fC: 5-formylcytosine, 5caC: 5-carboxylcytosine

a



b

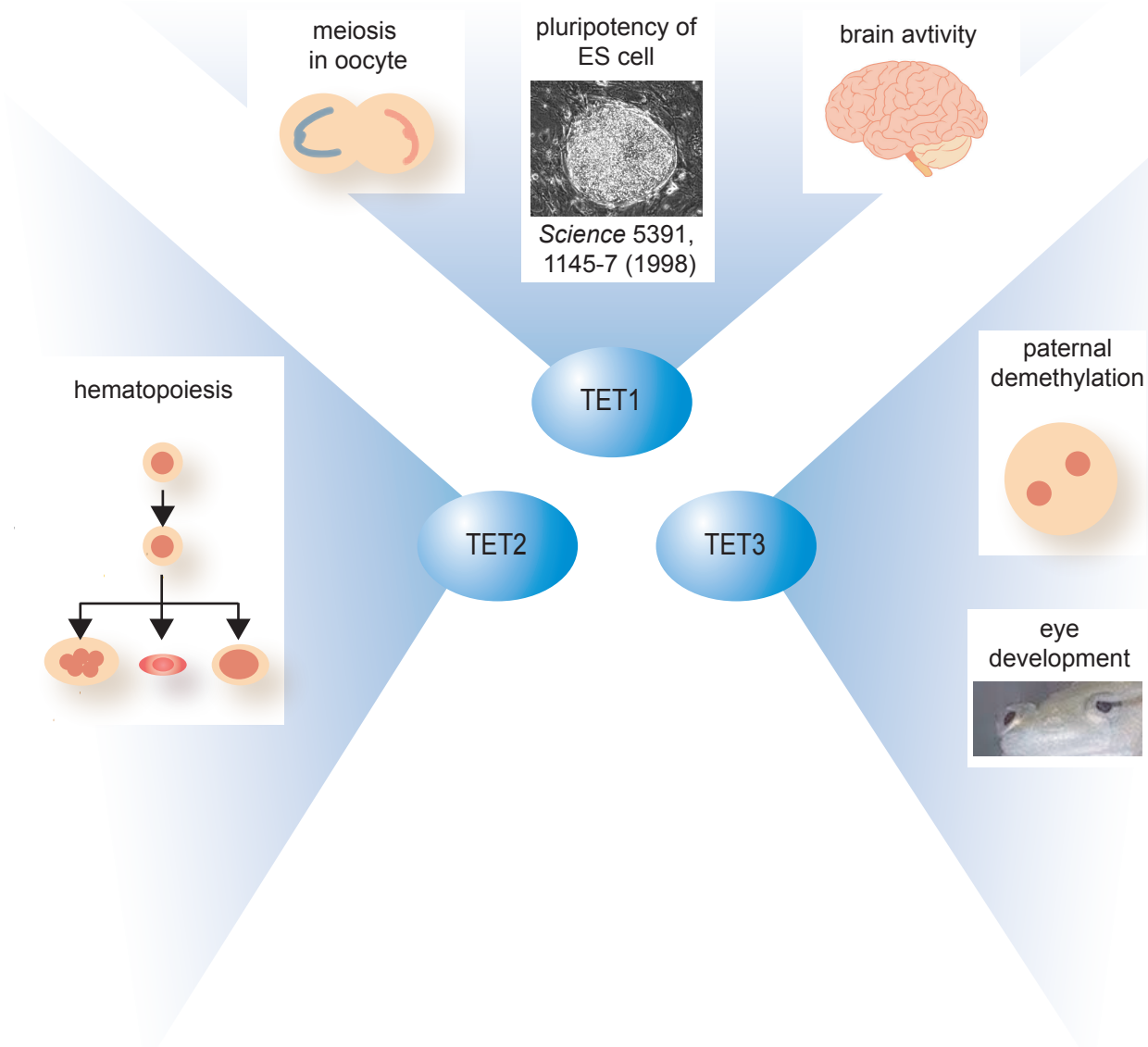


Fig. 1-5 TETファミリーの構造

(a) マウスTETファミリーの分子構造 TETファミリーに属するすべてのタンパク質はcysteine-rich domain (CRD)、double-stranded beta helix domain (DSBH)から成る触媒領域 (catalytic domain, CD) を保存している。また、TET1、TET3はCXXC domain (CXXC) を有する。(b) TETファミリーの生理作用 TET1はES細胞の未分化能維持、卵細胞の減数分裂や脳の神経活動に影響を与える。TET2は造血幹細胞の未分化能維持や運命決定に重要である。また、TET3は受精時の父性前核におけるDNA脱メチル化やアフリカツメガエルでは眼の形成に重要であることが報告されている。

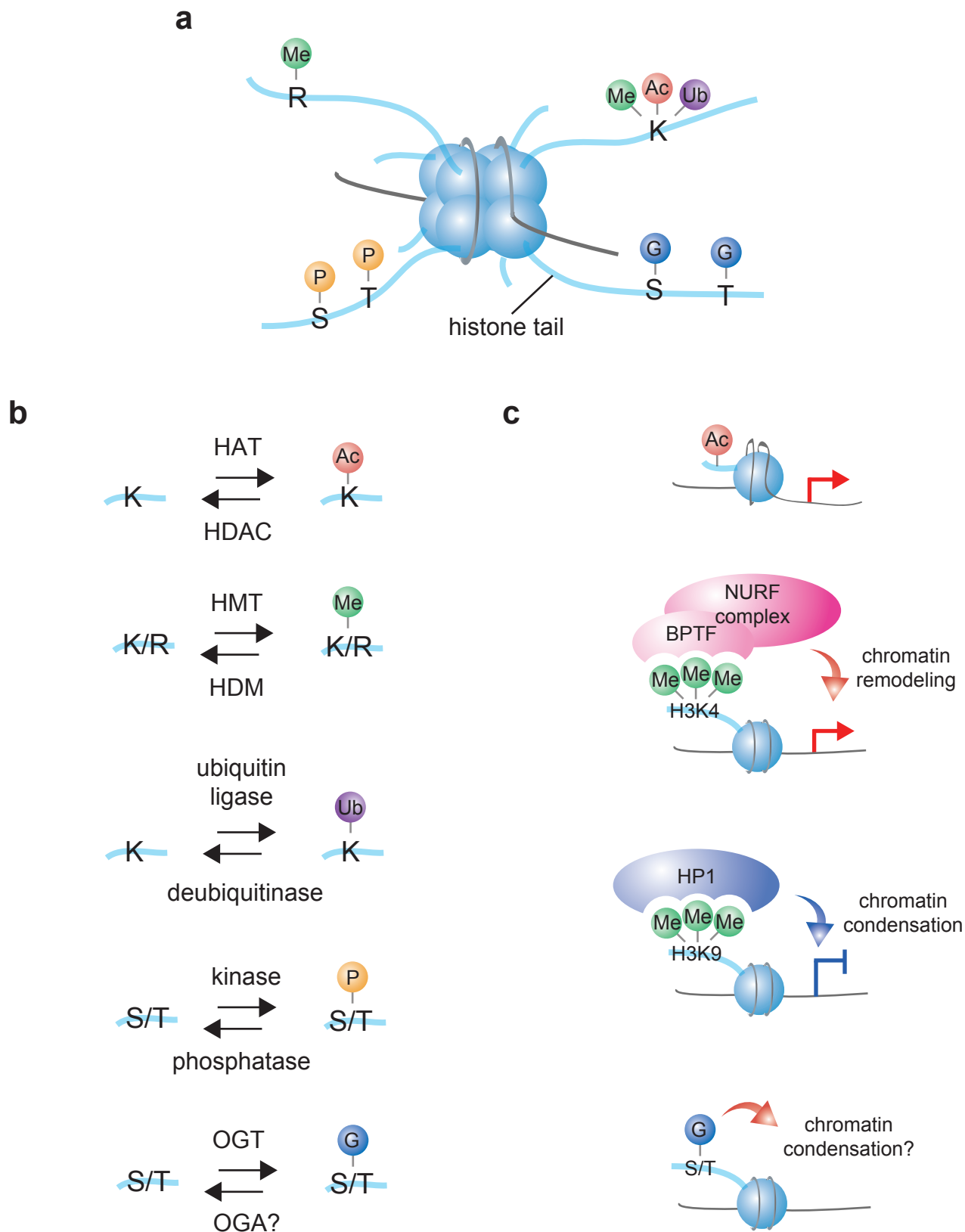
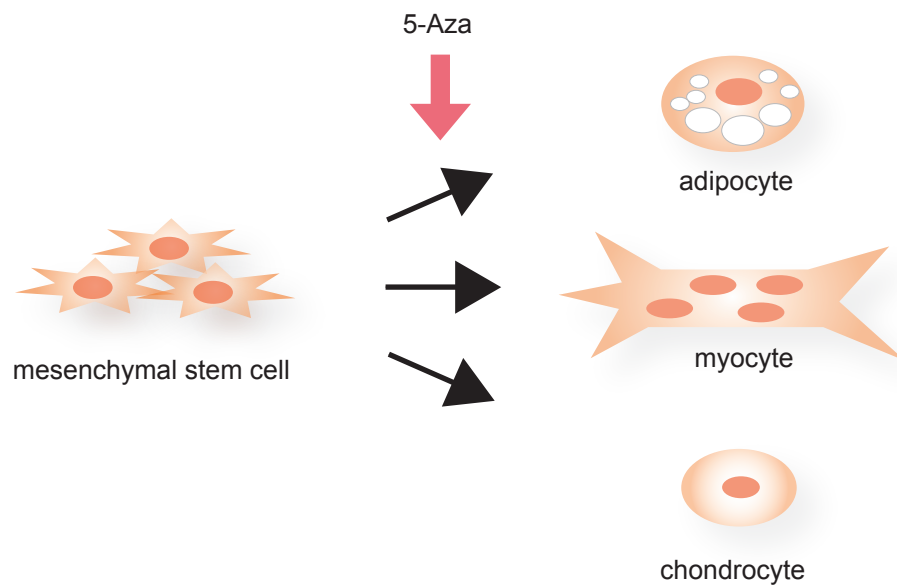


Fig. 1-6 ヒストン修飾の多様性とGlcNAc修飾

(a) 主なヒストン修飾 セリン残基 (S)、スレオニン残基 (T)はリン酸化修飾 (P)、GlcNAc化修飾 (G) を、リジン残基 (K)、アルギニン残基 (R) はメチル化修飾 (Me) を受ける。また、リジン残基はアセチル化修飾 (Ac)、ユビキチン化修飾 (Ub) を受ける。(b) ヒストン修飾酵素 脱GlcNAc修飾にはOGAの関与が疑われる。(c) ヒストン修飾の機能 ヒストンアセチル化やH3K4トリメチル化は転写を活性化させ、H3K9トリメチル化は抑制する。ヒストンGlcNAc修飾はクロマチンの濃縮を引き起こすことが示唆されている。

a



b

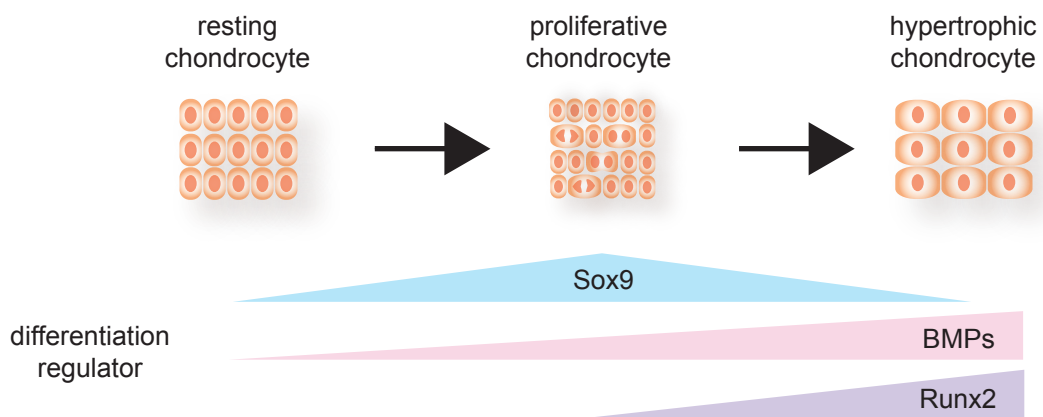
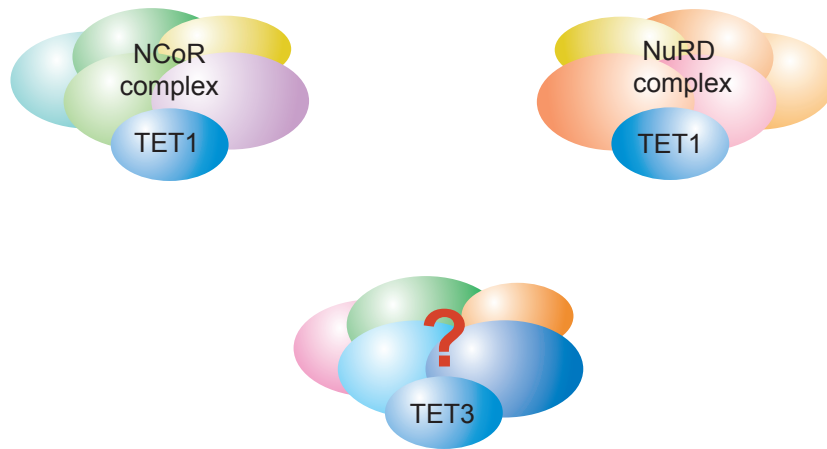


Fig. 1-7 □ エピゲノミクスと細胞分化

(a) DNAメチル化と細胞分化 間葉系幹細胞様であるC3H10T1/2細胞にDNMT阻害剤5-Azacytidine (5-Aza)を処理することで脂肪細胞、筋細胞、および軟骨細胞に分化することが知られている。

(b) 軟骨細胞分化の概要 間葉系幹細胞の凝集から始まり、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞を経て肥大軟骨細胞へと分化する。これらの分化過程は転写因子Sox9やRunx2、増殖因子BMPsなどにより制御されている。

a



b

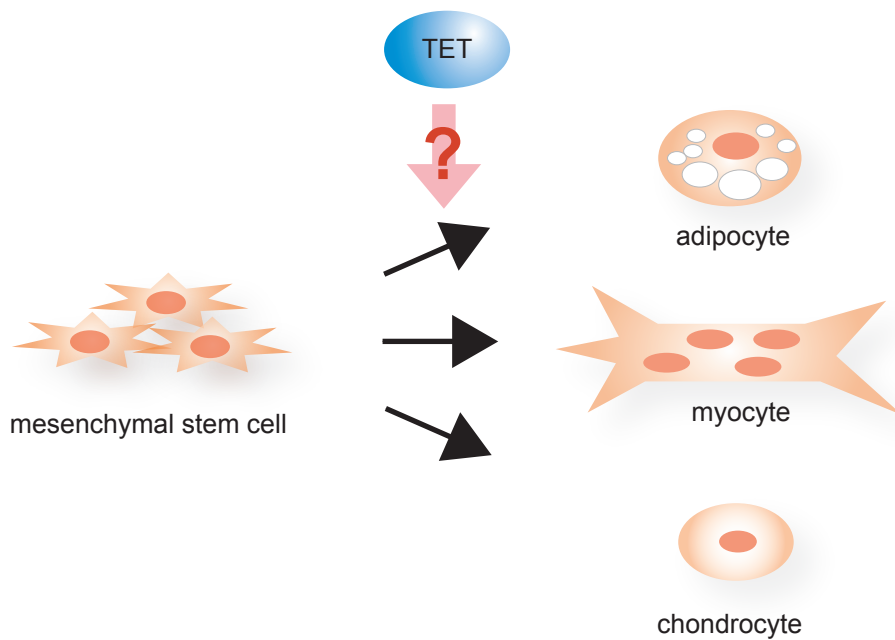


Fig. 1-8 本研究の目的

(a) TET3複合体の同定と機能解析 TET1はNCoR複合体、NuRD複合体と相互作用することが報告されている。TET3も同様に複合体を形成することが予想されるが未だ良くわかっていない。本研究では、生化学的アプローチを用いてTET3複合体の構成因子を明らかにすることを目的とする。

(b) 間葉系幹細胞の細胞分化におけるTETの機能解析 間葉系幹細胞の分化にはDNAのメチル化環境が大きな影響を与えることが知られている。本研究では、DNAメチル化環境を変化させる機能を有するTETの細胞分化における生理作用を明らかにすることを目的とする。

第二章 メチル化 DNA 水酸化酵素 TET3 複合体 の同定と機能解析

第一節 緒言

これまで多くのエピゲノム制御因子が機能的な複合体を形成していることが報告されている。メチル化 DNA 水酸化酵素である TET ファミリーのうち、TET1 は NCoR や NuRD と複合体を形成し、メチル化 DNA 水酸化以外の機能を有することが報告されている(70,71)。また、TET1 は ES 細胞の未分化維持に(34,36)、TET2 は血球分化に(41-44)、TET3 は受精時のエピジェネティックなリプログラミングや眼の発生に重要な役割を果たしていることが報告されている(45-47)。TET ファミリーは一様にメチル化 DNA の水酸化活性を持つが、このように多彩な生理作用を示す。これらの知見から、TET1 のみならず、TET2、TET3 も同様に複合体を形成し、多機能性を獲得している可能性が考えられる。

そこで本章では、特に TET3 に着目し、生化学的手法を用いて TET3 複合体の同定を試みた。同定した TET3 相互作用因子との結合様式や、その機能と作用機序などを詳細に解析した。

第二節 材料と方法

第一項 材料

1. プラスミド

pcDNA-FLAG ;	pcDNA3.1 ベクターに FLAG タグを挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 short ;	pcDNA-FLAG ベクターにマウス TET3 の N 末端側領域の欠失体 (NP_898961.2 、 137-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET2 ;	pcDNA-FLAG ベクターにマウス TET2 (2-1912 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-GFP ;	pcDNA3.1 ベクターに GFP タグを挿入したもの。
pcDNA-GFP-TET3 short ;	pcDNA-GFP ベクターに TET3 short (137-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 short Δ CD ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 short の触媒領域欠失体 (137-831 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 full ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 (2-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 Δ CD ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 full の触媒領域欠失体 (2-831 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 CD ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 の触媒領域 (832-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 Δ N1001 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1002-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 Δ N1024 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1025-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 Δ N1169 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1070-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 Δ N1305 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1306-1803 a.a.) を挿入したもの。

pcDNA-FLAG-TET3 ΔN1416 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1417-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 ΔN1507 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1508-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 ΔN1644 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の N 末端側領域の欠失体 (1645-1803 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET3 ΔC1645 ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET3 CD の C 末端側領域の欠失体 (832-1644 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET1 CD ;	pcDNA-FLAG ベクターにマウス TET1 の触媒領域 (1367-2007 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-TET2 CD ;	pcDNA-FLAG ベクターに TET2 の触媒領域 (871-1912 a.a.) を挿入したもの。
pcDNA-FLAG-LSD1 ;	pcDNA-FLAG ベクターにヒト LSD1 を挿入したものの。
pcDNA-FLAG-TET3 CD mut ;	pcDNA-FLAG-TET3 CD の 1085 番目のヒスチジン、1087 番目のアスパラギン酸をそれぞれチロシン、アラニンに置換した変異体。
pFastBac-FLAG ;	pFastBac ベクターに FLAG タグを挿入したもの。
pFastBac-FLAG-OGT ;	pFastBac-FLAG ベクターにヒト OGT を挿入したもの。
pENTR-H1-control ;	pENTR-H1 ベクターにマウス TET2 遺伝子を標的とした shRNA 配列を挿入したもの。標的配列は 5'-GCTCTGAACAGTATTCAAAGC -3'。ヒトにおいては何れの遺伝子も標的としない。
CS-RfA-CG-control ;	pENTR-H1-control をもとに CS-RfA-CG ベクターにマウス TET2 shRNA 配列を挿入したもの。
CS-RfA-CG-shTET3 ;	CS-RfA-CG ベクターにヒト TET3 遺伝子を標的とする shRNA 配列を挿入したもの。標的配列は 5'-GATGATAACCTAATTTTCAT -3'。東京大学分子細胞生物学研究所分子情報研究分野秋山徹博士より御供

与いただいた。

pCAG-HIVgp ; HIV ウイルス由来の Gag-Pol タンパク質がコードされている。

pCMV-VSV-G-RSV-Rev ; VSV-G タンパク質、及び Rev タンパク質がコードされている。pCAG-HIVgp とともに理研バイオリソースセンター三好浩之博士より御供与いただいた。

2. 抗体

マウス抗 FLAG 抗体 (Sigma, F3165)、ウサギ抗 FLAG 抗体 (Sigma, F2555)、抗 GFP 抗体 (Immunology Consultants Laboratory, RGFP-45A)、抗 5hmC 抗体 (Active motif, 39769)、抗 GlcNAc 抗体 (Abcam, ab93858)、抗 OGT 抗体 (Santa Cruz, sc-74546)、抗 Actin 抗体 (Santa Cruz, sc-1616)、抗 α -Tubulin 抗体 (Santa Cruz, sc-5286)、抗 HDAC1 抗体 (Santa Cruz, sc-8410)、抗 Histone H3 抗体 (Abcam, ab1791)、抗 Histone H2B 抗体 (Millipore, 07-371)

3. siRNA

ヒト OGT に対する siRNA は QIAGEN 社より購入した (SI02665131)。

第二項 方法

1. 細胞培養、トランスフェクション、薬剤処理

293T 細胞、及び HeLa 細胞の培養は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、Wako) に 10% の Fetal bovine serum (FBS、Cell Culture biosciences) を加えたものを使用した。FBS には非働化処理 (55 °C、30 分) を行った。培養は 37 °C、5 % の CO₂ 雰囲気下において行った。細胞の継代には Trypsin/EDTA (Life Technologies) を用いた。

培養細胞へのプラスミド、及び siRNA の導入には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、それぞれ添付説明書に従い操作を行った。

GlcNAc 転移酵素である OGA の阻害剤 PUGNAc (Toronto Research Chemicals Inc.) はエ

タノールに溶解して調製した。また、翻訳阻害剤シクロヘキシミド (CHX、Calbiochem) はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

2. 核抽出液の調製

まず、一過的に FLAG-TET3 short を発現させた 293T 細胞から核抽出液を調製した。具体的には、293T 細胞に pcDNA-FLAG もしくは pcDNA-FLAG-TET3 short をトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収し、PBS による洗浄を行った。回収した細胞は 5 cpv (packed cell volume) の Buffer A (10 mM HEPES-KOH、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.5 mM DTT、Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem)、pH 7.9) を加え、攪拌した後、氷上にて 10 分間静置した。4 °C 条件下、2,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。得られた細胞ペレットは 2 cpv の Buffer A を加えて懸濁し、氷上にて冷却したダウンス型ホモジェナイザーに移した。loose 型のペッスルを用いて細胞ペレットをホモジェナイズし、細胞膜を破碎した。この時、細胞膜が破碎されていることを光学顕微鏡にて確認した。得られた懸濁液は 4 °C 条件下、20,000 xg で 20 分間遠心分離し、上清を除去した。得られた核ペレットをダウンス型ホモジェナイザーに移し、NaCl の終濃度が 300mM になるように Buffer C (20 mM HEPES-KOH、25 % Glycerol、0.42 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、Protease Inhibitor Cocktail Set III、pH 7.9) を加えた。loose 型のペッスルを用いて核ペレットをホモジェナイズし、核タンパク質を抽出した。さらに氷上にて 30 分間静置し、核タンパク質の可溶化させた。この時、3 分ごとに 1、2 回ホモジェナイズし、溶液を懸濁した。その後、懸濁液は 4 °C 条件下、20,000 xg で 20 分間遠心分離を行い、上清を回収した。この上清を Buffer D (20 mM HEPES-KOH、20 % Glycerol、0.1 M KCl、0.2 mM EDTA、0.5 mM PMSF、1 mM benzamidine、0.5 mM DTT、pH 7.9) を用いて透析した。透析は、4 °C 条件下で 3 時間以上行った後、さらに新しい Buffer D に置換して一晩行った。透析した抽出液は 4 °C 条件下、20,000 xg で 20 分間遠心分離した後、上清を回収し核抽出液とした。

3. TET3 複合体の精製

抗 FLAG 抗体を用いたバッチ法により FLAG-TET3 のアフィニティー精製を行った。

抗 FLAG 抗体を固着させた M2 アガロースビーズ (Sigma) は使用前に 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5) を加え、室温で 2 分間静置することで洗浄した。その後、0.1 % Tween-20 を含む 200 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化した。さらに Buffer D で平衡化した後、核抽出液に加えた。核抽出液と M2 アガロースビーズの反応は 4 °C 条件下で 3 時間以上攪拌させた。その後、スイングローターを用いて 4 °C 条件下、2000 rpm で 30 秒間遠心分離した。沈殿したビーズを吸わないように注意しながら上清を除去し、再び Buffer D を加え、4 °C 条件下で 5 分間攪拌し洗浄した。攪拌後、2000rpm で 30 秒間遠心分離し、上清を除去した。これらの操作を計 5 回繰り返し、非特異的に結合したタンパク質を除去した。洗浄後のビーズにはビーズと等量の Elution buffer (0.4 mg/ml FLAG peptide (Sigma) を含む BufferD) を加え、室温で 1 時間振盪した。

なお、TET2 複合体も上記と同様の方法で精製した。

4. 電気泳動、銀染色、コロイダルブルー染色、ウェスタンブロットティング

銀染色、コロイダルブルー染色を行うサンプルの電気泳動には Multi Gel II mini (コスモ・バイオ) を用いた。電気泳動後、それぞれ銀染色 II キットワコー (Wako)、Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) を用い、添付説明書通りに行った。また、質量分析のための銀染色には SilverQuest silver staining kit (Life Technologies) を用い、説明書通りに操作した。

ウェスタンブロットティングでは、ゲルにタンパク質を展開した後、Mini trans-blot (Bio-Rad) を用いて PVDF メンブレン (Millipore) に 100 V の電圧を 2 時間かけることで転写した。タンパク質を転写したメンブレンは 3 % スキムミルクを溶解した PBST (0.1 % Tween-20 を含む PBS) に浸し、室温で 1 時間振盪した。PBST で洗浄した後、適当量の一次抗体と反応させた。マウス抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体に対する HRP 標識された二次抗体には、Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE healthcare、NA931V)、Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (GE healthcare、934V)、Goat Immunoglobulins /HRP (DAKO、P0449) をそれぞれ用いた。化学発光基質として、Pierce Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) もしくは Luminata Forte Western HRP substrate (Milipore) を用い、検出は X-RAY FILM (KONICA MINOLTA) に露光させて現像した。

5. LC-MS/MS、タンパク質同定、翻訳後修飾同定

質量分析の前処理には *in gel* 消化法と *in solution* 消化法の 2 通りの手法を用いた。*in gel* 消化法では、SDS-PAGE にて精製産物を展開し、銀染色によりタンパク質を可視化した後、目的のバンドを切り出し 1 mm³ 程度に切り刻んだ。SilverQuest silver staining kit の説明書に従い脱銀処理を行った後、蒸留水で洗浄した。次に、100 % アセトニトリルを加えて室温で 15 分間静置し、脱水処理し、スピードバックを用いて乾固させた。ゲル片に還元 Buffer (10 mM DTT、0.1 M NH₄HCO₃) を加え、56 °C で 45 分間震盪した。ゲル片を室温まで冷却し、溶液を除去した。さらに、アルキル化 Buffer (55 mM ヨードアセトアミド、0.1 M NH₄HCO₃) を加え室温で遮光しながら 30 分間震盪した。溶液を除去した後、蒸留水で洗浄し、50 % アセトニトリルを含む 25 mM NH₄HCO₃ を加え、室温で 10 分間震盪した。溶液を除去し、再び 50 % アセトニトリルを含む 25 mM NH₄HCO₃ を加えて同様の処理を行った。次に、100 % アセトニトリルを加え、室温で 5 分間静置し、0.1 M NH₄HCO₃ を等量加え、室温で 15 分間静置した。溶液を除き、スピードバックを用いて乾固させた。5ul の消化 Buffer (0.05 mg/ml Trypsin Gold (Promega)、50 mM NH₄HCO₃) をゲル片に加え、氷上で 20 分間静置することで液を浸透させる。37 °C で 6 時間保温し、トリプシンによる消化を促進させる。次に、溶出 Buffer (10 % ギ酸、50 % アセトニトリル) を加え室温で 15 分間震盪する。この溶出操作を計 5 回繰り返して消化されたペプチドを集め、スピードバックで風乾させる。蒸留水を加え、ギ酸、アセトニトリルをそれぞれの終濃度が 0.1 %、2 % になるように加えた。超音波洗浄機で 1 分間の処理を計 3 回行い、最後に 15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、沈殿を吸わないように注意しながら上清を回収した。スペクトル測定は LTQ Orbitrap Velos ETD (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られたスペクトルデータは Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析し、ペプチド配列とタンパク質の照合には SEQUEST を、またデータベースには NCBI のタンパク質データベースを用いた。

TET3 及び TET2 複合体は *in solution* 消化法による解析も行った。まず、それぞれの精製産物に終濃度 5 mM になるように DTT を加え、56 °C で 30 分間処理し、タンパク質を還元させた。次に、10 mM になるようにヨードアセトアミドを加え、暗所で 1 時間静置した。サンプルの 4 倍量のメタノールを加え、混和させた。さらに、溶液の 5 分の 1 量のクロロホルムを加えて混和した後、2 分の 1 量の蒸留水を加えて混和した。室温条件下、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、二層に分かれたサンプルから上層を除去する。下

層の3倍量のメタノールを加えて混和させると、不溶化したタンパク質が沈殿した。この沈殿を15,000 rpmで3分間遠心分離し、上清を除去した。70%エタノールでペレットを洗浄し、スピードバックを用いて風乾させた。次に、65 mM Tris-HCl (pH 8.5)を加え、超音波洗浄機で1分間の処理を計5回行い、タンパク質を溶解させた。さらに、25 ng/ulになるように Trypsin Gold を加え、37 °Cで6時間処理した。消化後、ギ酸、アセトニトリルをそれぞれ終濃度0.1%、2%になるように加え、4 °C条件下、15,000 rpmで5分間遠心分離し、上清を回収した。スペクトル測定、及びそのデータ解析は in gel 消化法と同様に行った。同定したタンパク質データは DAVID Bioinformatics Resource (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いてアノテーションを行い、KEYWORD に「transcription」が含まれるタンパク質を抽出した。さらにそれらのタンパク質の同定したペプチド数をコントロール群と比較することで絞り込んだ。

in vitro GlcNAcylation 法と質量分析を組み合わせることで TET3 の翻訳後修飾の探索を行った。*in vitro* GlcNAcylation 反応産物をゲルに展開し、コロイダルブルー染色を行い TET3 short タンパク質を可視化した。バンドを切り出し、刻んだ後、50%アセトニトリルを含む 25 mM NH₄HCO₃ を加え、室温で10分間震盪した。この操作を計2回繰り返し、さらに、100%アセトニトリルを加えて室温で5分間静置した。脱水されたゲル片に 100mM NH₄HCO₃ を加え室温で5分間静置し、再び膨潤させた。これらの操作により、ゲル片中の色素が取り除かれる。これ以降の操作は in gel 消化法に準ずる。得たペプチドは LTQ Orbitrap Velos ETD によりスペクトルを測定し、Proteome Discoverer を用いて解析した。このとき、参照データにはマウス TET3 (NP_898961.2) を用いた。

6. 細胞抽出液の調製

293T 細胞を PBS で洗浄後、TNE buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, Protease Inhibitor Cocktail Set III, pH 7.9) に懸濁し、氷上で10分間静置した。4度条件下、13,000 rpm で20分間遠心分離し、上清を細胞抽出液とした。また、全細胞抽出液を調製する際は、TNE buffer に懸濁後、超音波発生機 UR-21P (TOMY) を10秒間の処理を5回繰り返すことで可溶化させた。以降の操作は細胞抽出液の調製法に準ずる。

7. 免疫染色

pcDNA-GFP-TET3 short をトランスフェクションした HeLa 細胞は 4 % パラホルムアルデヒド、2 mM MgCl₂、5 mM EGTA を含む PBS 中で室温条件下、5 分間静置し固定処理を行った。PBS 洗浄後、0.5 % Triton X-100 を含む PBS を加え、室温で 5 分間静置し細胞膜を易透化させた。次に、1 % BSA を含む PBS 中で 40 分間、37 °C で静置しブロッキングした。Can Get Signal immunostain (Toyobo) で 50 倍希釈した抗 OGT 抗体を加え、37 °C 条件下で 1 時間反応させた。PBST (0.1 % Triton X-100 in PBS) で 3 回洗浄し、二次抗体として PBS で 200 倍希釈した goat α -mouse IgG antibody conjugated to Alexa 594 (Invitrogen) を反応させた。その後、スライドを洗浄後、VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories) でマウントした。共焦点蛍光顕微鏡を用いた観察には 510 confocal laser scanning system (Zeiss) を用いた。

8. 免疫沈降法

TNE buffer で平衡化した M2 Agarose ビーズに細胞抽出液を加え、4 °C 条件下で 2 時間以上攪拌させた。2,000 rpm で 30 秒間遠心分離し、ビーズを沈殿させ、上清を除いた。次に、TNE buffer を加え、4 °C で 5 分間攪拌し、ビーズを洗浄した。この洗浄操作を計 3 回繰り返した後、ビーズと等量のサンプルバッファー (100 mM Tris-HCl、4 % SDS、0.2 % BPB、20 % Glycerol、10 % 2-メルカプトエタノール) を加え 95 °C で 3 分間煮沸した。なお、GlcNAc タンパク質の解析を行う際は、TNE buffer に 1 mM ストレプトゾトシンを加えた。

9. ゲノム DNA 抽出、ドットブロッキング

回収後、PBS で洗浄した 293T 細胞をゲノム DNA 抽出 buffer (50 mM Tris-HCl、20 mM EDTA、100 mM NaCl、1 % SDS、pH7.9) を加え、超音波発生機 UR-21P で 30 秒間処理した。次に、終濃度 0.15 mg/ml になるように Proteinase K (Wako) を加え、55 °C で 3 時間以上振盪した。抽出液はフェノール-クロロホルム処理を 2 度行った後、エタノール沈殿によりゲノム DNA を抽出した。

ドットブロッキングは既に報告されている論文を参考にして行った(34)。具体的には、Bio-Dot apparatus (Bio-Rad) を用いてゲノム DNA をナイロンメンブレン Biotrans

(PALL corporation) にブロットし、UV Stratalinker (Stratagene) を用いて UV 照射し、クロスリンクさせた。メンブレンは 1 % BSA を含む PBST 中で室温条件下、30 分間振盪した。PBST で洗浄後、抗 5hmC 抗体を Can Get Signal (Toyobo) で 1,000 倍希釈し、4 °C 条件下で一晩反応させた。このとき、反応液が攪拌されるように転倒混和させ続けた。その後、PBST で 3 度洗浄し、二次抗体を希釈した 3 % スキムミルク溶液中で室温条件下、1 時間反応させた。PBST で 3 度、PBS で 2 度洗浄した。発光、現像の操作はウエスタンブロッティングに準ずる。また、ローディングコントロールのため、検出の終わったメンブレンは PBS にて洗浄後、メチレンブルー染色を行った。メチレンブルー染色はメンブレンを染色液 (0.5 % メチレンブルー、0.1 M 酢酸ナトリウム) に浸し、1 時間以上振盪した後、脱イオン水で洗浄した。

10. RNA 抽出、RT-qPCR

293T 細胞は PBS を用いて洗浄し、ISOGEN (NIPPON GENE) を加えて溶解させた。クロロホルムを加えて RNA を抽出し、イソプロパノールで RNA を沈殿させた。70 % エタノールで洗浄した後、DEPC 水に RNA を溶解させた。精製した RNA を基に Prime Script RT master mix (Takara) を用いて逆転写反応を行った。

得た cDNA を鋳型とし、KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用いてリアルタイム PCR を行った。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

ヒト <i>OGT</i> 、	forward ; 5'-ATCCTGATTTGTACTGTGTTTCGC-3'
	reverse ; 5'-AAGCTACTGCAAAGTTCGGTT-3'
ヒト <i>TET3</i> 、	forward ; 5'-CCCATTGCAAAGTGGGTGAT-3'
	reverse ; 5'-CAGGCCAGGATGAGGATGAC-3'
ヒト <i>GAPDH</i> 、	forward ; 5'-ATCCATCACCATCTTCCAG-3'
	Reverse ; 5'-ATGAGTCCTTCCACGATACC-3'

11. 組み換えタンパク質の調製、*in vitro* GlcNAcylation 法

FLAG-OGT の調製はバキュロウイルス Bac-to-Bac システム (Invitrogen) を用い、操作は添付説明書に従った。まず、DH10Bac (Life Technologies) に pFastBac-FLAG-OGT

を組み込み、バクミドを調製した。次に、昆虫細胞 Sf-9 に Cellfectin II (Life Technologies) を用いて FLAG-OGT 遺伝子を組み込んだバクミドを感染させ、FLAG-OGT を発現するバキュロウイルスを作製した。このウイルスを Sf-9 細胞に感染させ、72 時間後に細胞を回収し、PBS にて洗浄した。細胞は Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM EDTA, 20 % Glycerol, 2 mM DTT, Protease Inhibitor Cocktail Set III、pH 7.9) に懸濁し、ダウンス型ホモジェナイザーに移した。抽出液を調製した。tight 型のペッスルを用いて細胞を破碎し、氷上で 30 分間静置した。この時、5 分ごとにペッスルを動かし、抽出液を混和させた。4 °C 条件下、11,000 rpm で 10 分間超遠心分離し、上清を回収後、等量の Dilution buffer (20 mM Tris-HCl, 10 % Glycerol, 0.02 % NP-40, Protease Inhibitor Cocktail Set III、pH 7.9) を加え、攪拌した。得た抽出液には M2 Agarose ビーズを加え、4 °C 条件下で 4 時間反応させた。2,000 rpm で 30 秒間遠心分離し、ビーズを沈殿させ、上清を除去した。次に、Wash buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 15 % Glycerol, 1 mM DTT, 0.01 % NP-40, pH 7.9) を加え、4 °C 条件下で 5 分間攪拌し、ビーズの洗浄を行った。この洗浄操作は計 4 回行った。ビーズには Elution buffer (0.4 mg/ml FLAG peptide を含む Wash buffer) を加えて室温で 30 分間静置し、FLAG-OGT を溶出した。

FLAG-TET3 short、FLAG-TET3 CD、FLAG-TET3 CD ΔC1645 は 293T 細胞に発現させ、TNE buffer を用いて抽出液を調製し、M2 Agarose ビーズで免疫沈降した。TNE buffer でビーズを洗浄した後、0.4 mg/ml FLAG peptide を含む TNE buffer を加えて室温で 30 分間静置し、核タンパク質を溶出した。

in vitro GlcNAcylation 法では、FLAG-OGT と FLAG-TET3 を GlcNAcylation buffer (50 mM Tris-HCl, 12.5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 2 mM UDP-GlcNAc (Sigma)、pH 7.5) 中で一晩、37 °C で保温し、反応させた。

1 2. レンチウイルスを用いた shRNA 導入株の作製

293T 細胞に pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev と CS-RfA-CG-TET3、もしくは CS-RfA-CG-control をトランスフェクションし、24 時間後に 10 μM ホルスコリンを含む培地に置換した。さらに 48 時間培養し、レンチウイルスを含む培養上清を得た。この培養上清は 0.22 μm のフィルターに通した後、293T 細胞に混和させ、10 μg/ml ポリブレンを加えて室温条件下、1,000 *xg* で 1 時間遠心分離することで細胞にウイルスを感染

させた。細胞は 4、5 日培養した後、解析に用いた。

1 3. 細胞質、核、クロマチンタンパク質の分画抽出

293T 細胞を回収、PBS 洗浄後、Buffer A に懸濁し、氷上にて 10 分間静置した。4 °C 条件下、13,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を細胞質抽出液とした。沈殿した核画分は再び Buffer A を加えて洗浄した後、Buffer C に懸濁し、氷上にて 10 分間静置した。同様の条件で遠心分離し、上清を核抽出液とした。不溶性の沈殿物は Buffer C で洗浄した後、chromatin extraction buffer (20 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、500 mM NaCl、Protease Inhibitor Cocktail Set III、pH 7.9) に懸濁し、UR-21P を用いて 10 秒間の超音波処理を 5 回行った。氷上にて 10 分間静置し、遠心分離した後、上清をクロマチン画分として回収した。

1 4. デンシトメトリー

ウエスタンブロッティングにより得たフィルムデータを元に、Quantity One (Bio-Rad)、もしくは Image J を用いてバンド密度を定量した。一枚のフィルムから独立に 3 回測定し、その平均値、標準偏差をグラフに表した。

第三節 結果

第一項 TET3 相互作用因子の同定

エピゲノム制御因子は単独で機能することは少なく、いくつかの因子が会合した複合体を形成していることが知られている(72,73)。また、TETファミリーはそれぞれが同様の酵素活性を持つにも関わらず、多面的な生理作用を持つことが報告されている(74)。その要因の一つとして、TET複合体構成因子の多様性が考えられた。そこで、本研究ではTETファミリーの中で解析の進んでいないTET3に着目し、生化学的手法を用いて複合体の精製を行い、質量分析機を用いた相互作用因子の同定を試みた (Fig. 2-1a)。

TET3は同定された当初、現在知られている全長配列(1803アミノ酸)よりN末端領域を欠如したバリエーション(136番目のメチオニン以降、NP_898961.2)が全長配列として報告されていた。本研究では、137番目以降のアミノ酸で構成されるタンパク質をTET3 shortとし、複合体精製に用いた。まず、293T細胞にFLAG-TET3 shortを発現させ、核抽出液を調製し、FLAG抗体を利用したアフィニティー精製を行った。得た精製産物はSDS-PAGEにて展開した後、銀染色を行った (Fig. 2-1b、右図)。その結果、ベイトタンパク質であるFLAG-TET3 shortを約180kDa付近で検出することができた。このとき、FLAG抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、このバンドと同位置にFLAG-TET3 shortが検出されることを確認した (Fig. 2-1b、左図)。また、銀染色像において、FLAG-TET3 shortサンプルに特異的なバンドを約100kDa付近に観察することができた。次に、この100kDa付近のバンドを切り出し、in gel消化法にてペプチド断片化し、LC-MS/MSによるスペクトル測定を行った。FLAG-TET3 shortのバンドから取得したデータを解析した結果、38本のTET3由来のペプチドを同定し、全長タンパク質に対する割合は27.82%であった (Fig. 2-1c)。同様にして100kDa付近のバンドから得たデータを解析すると、O結合型GlcNAc転移酵素(O-GlcNAc transferase、OGT)由来のペプチドを26本、29.25%の割合で同定できた。

また、この結果の妥当性を検証するため、in solution消化法により前処理した質量分析も行った。この方法は、特定のバンドだけを解析するin gel消化法と異なり、サンプルに含まれるタンパク質を網羅的に解析することが出来る。一般に、in solution消化法においては、サンプル中に様々な交雑物が含まれるためタンパク質あたりの検出感度は低下するとされているが、その点は高速液体クロマトグラフィーを流す時間を長くする

ことで分離能を向上させ補った。その結果、コントロールサンプルでは 635 種類、FLAG-TET3 short サンプルで 687 種類のタンパク質を同定した (Fig. 2-2a、上図)。また、コントロール、FLAG-TET3 short それぞれのサンプルから 2 本、69 本の TET3 由来のペプチドを、さらに 8 本、42 本の OGT 由来のペプチドを同定した (Fig. 2-2a、下図)。これらの結果は、少量のバックグラウンドが含まれるが、FLAG-TET3 short に特異的に OGT が結合していることを示しており、in gel 消化法の結果と合致するものであった。また、in solution 消化法の利点として、相互作用因子の網羅的な探索が可能であることが挙げられる。しかしながら、FLAG-TET3 short サンプルから同定されたタンパク質 687 種のうち、532 種のタンパク質がコントロールサンプルにおいても同定されており、これらのデータから真の TET3 結合因子を見出すためにはさらなるデータの解析が必要であった。そこで、687 種のタンパク質を米国 NIH により管理されているデータベース DAVID に参照し、転写調節に機能を持つものに絞り込んだ。その結果 114 種を抽出し、さらに、これらのタンパク質は FLAG-TET3 short サンプルでのみ同定できたもの 23 種、FLAG-TET3 short サンプルにおいてコントロールサンプルの 2 倍以上のペプチド断片を同定できたもの 6 種に分類した (Fig. 2-2b)。FLAG-TET3 short のみで同定できたタンパク質には NuRD 複合体や NCoR 複合体に含まれる Retinoblastoma-binding protein 7 (RBBP7) や、NuRD 複合体との相互作用が報告されている Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 (CHD7) が含まれていた (Fig. 2-2c)。また、コントロールの 2 倍以上のペプチド断片数で同定されたタンパク質には NCoR 複合体構成因子である SIN3 transcription regulator family member A (SIN3A) が含まれていた (Fig. 2-2d)。

TET3 複合体構成因子のファミリー間の特異性、保存性を調べるため、FLAG-TET2 複合体の精製も試みた。FLAG-TET3 short と同様にして精製した FLAG-TET2 複合体は SDS-PAGE にて展開し、銀染色で含まれるタンパク質を可視化した (Fig. 2-3a)。その結果、ベイトタンパク質である FLAG-TET2 に由来すると思われる約 200kDa のバンドの他、いくつかの TET2 サンプルに特異的なバンドを見出した。これらのサンプルは in solution 消化法によりペプチド断片化し、LC-MS/MS に供した。得たデータを解析した結果、コントロールサンプルで 213 種、FLAG-TET2 サンプルで 255 種のタンパク質を同定した (Fig. 2-3b、upper panel)。特に、FLAG-TET2 サンプルのみで 101 本の TET2 由来ペプチド、14 本の OGT 由来ペプチドを同定した (Fig. 2-3b、bottom panel)。本実験より、TET3 と TET2 の間で OGT との結合性が保存されていることが示唆された。ま

た、TET3 複合体と同様の手順 (Fig. 2-2b) でデータの解析を行い、FLAG-TET2 サンプルでのみ同定されたタンパク質 25 種、FLAG-TET2 サンプルで 2 倍以上同定されたタンパク質 1 種を抽出した。FLAG-TET2 サンプルのみで同定されたタンパク質には NCoR 複合体や NuRD 複合体に含まれる HDAC1 やヒストンリジンメチル基転移酵素 SET1A などが含まれていた (Fig. 2-3c)。また、FLAG-TET2 サンプルでコントロールの 2 倍以上のペプチド断片を同定できたタンパク質として CHD7 が挙げられた。

これまで結果より、TET3、TET2 と OGT が複合体を形成している可能性が示唆された。しかしながら、今回の研究で行ったような細胞抽出液を用いた解析では、各タンパク質の局在を考慮しておらず、抽出液中のみでの相互作用である可能性が無視できない。そこで共焦点蛍光顕微鏡を用いたイメージング解析により、この問題の解決を試みた。まず、TET3 short に GFP タグを組み込んだ発現ベクターを作出した。その GFP-TET3 short を 293T 細胞に発現させ、GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより目的タンパク質が発現していることを確認した (Fig. 2-4a)。次に、GFP-TET3 short を HeLa 細胞に発現させ、OGT 抗体を用いた免疫染色により各タンパク質の局在を調べた (Fig. 2-4b)。GFP-TET3 short (緑) はすべての細胞で観察できるほどの発現量を確保できなかったが、発現を確認出来る細胞では主に核での局在が観察できた。また、OGT (赤) はほぼすべての細胞において核への局在が観察された。より高倍率のレンズを用いて解析を行い、両者のタンパク質が類似した局在パターンを示し、特に核小体を除いた領域に存在することが明らかとなった (Fig. 2-4b、右図)。

第二項 TET3 と OGT の相互作用様式の検討

続いて同定した TET3 と OGT の相互作用を免疫沈降法とウェスタンブロッティングにより検証した。この時、これまでの解析に用いた TET3 short と共に全長 TET3 (TET3 full) やいくつかの欠失体などを用いた (Fig.2-5)。具体的には、TET3 short、TET3 full の触媒領域 (CD) を欠失したもの (TET3 short Δ CD、TET3 Δ CD)、触媒領域のみをもつもの (TET3 CD)、TET3 CD からさらに N 末端側を欠失したもの (TET3 CD Δ N1001、 Δ N1024、 Δ N1169、 Δ N1305、 Δ N1416、 Δ N1507、 Δ N1644)、及び TET3 CD から C 末端側を欠失したもの (TET3 CD Δ C1645) を作製した。ネガティブコントロールには FLAG 配列のみの空ベクター、及びヒストンのリジン残基を基質として TET と同様にメ

チル基の水酸化を行う Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) を用いた(75)。その結果、FLAG-TET3 short を免疫沈降したサンプルで OGT を検出することができた (Fig. 2-6a, lane 8)。TET3 CD の免疫沈降産物にも OGT が含まれており (Fig. 2-6a, lane 9)、TET3 short Δ CD でも OGT が検出されたが TET3 short、TET3 CD と比較するとその結合量は少なかった (Fig. 2-6a, lane 10)。一方、CXXC ドメインは CXXC1、MLL1 などに保存されている領域であり、それらの酵素活性に重要であることが知られている(76,77)。また、TET3 においてもアフリカツメガエルの眼や神経の発生に重要であることが報告されている(47)。そこで、この CXXC ドメインが TET3 と OGT の相互作用に与える影響を検証した。CXXC を含む TET3 full は TET3 CD と同様に OGT 結合能を示した (Fig. 2-6b, lane 6)。しかしながら、CXXC ドメインを持つが触媒領域を欠いた TET3 Δ CD は TET3 short Δ CD (Fig. 2-6a, lane 10) と同様に有意に OGT 結合量が減少していた (Fig. 2-6b, lane 8)。

TET3 short、もしくは TET3 full と TET3 CD にはそれぞれのタンパク質発現量に大きな差あり (Fig. 2-6a, lanes 3 and 4, Fig. 2-6b, lanes 2 and 3)、この違いは分子量に起因すると考えられる。TET3 short、TET3 full は発現量が少ないにも関わらず、同程度に結合した OGT が検出された。この結果は TET3 short や TET3 full だけがもつ N 末端領域が OGT との結合に関与する可能性を示唆するものであるが、N 末端領域のみをもつ TET3 short Δ CD、TET3 Δ CD ではほとんど OGT を検出できなかった。これらの結果から、OGT との結合には TET3 の触媒領域が重要であると考えられ、より詳細な結合領域を探索することを目的に TET3 CD に由来する様々な長さの欠失体を用いて解析を行った。免疫沈降のネガティブコントロールには IgG を用いた。その結果、N 末端側を欠失した TET3 CD Δ N1001、 Δ N1024、 Δ N1169 のいずれの免疫沈降産物においても OGT が検出された (Fig. 2-6c, lanes 8, 9 and 10)。同様に、 Δ N1305、 Δ N1416、 Δ N1507、及び Δ N1644 においても OGT との結合を検出した (Fig. 2-6c, lanes 18–21)。しかしながら、TET3 CD の C 末端側の H ドメインを欠失した Δ C1645 においては OGT を出できなかった (Fig. 2-6c, lane 22)。

また、OGT との相互作用の TET ファミリー内における保存性を解析した。実験には TET1、TET2 及び TET3 の触媒領域を用いた (Fig. 2-7a)。293T 細胞にこれらのタンパク質を発現させた後、ゲノム DNA 中の水酸化メチルシトシン含量をドットブロッキングにより解析し、メチルシトシン水酸化活性を保有していることを確認した (Fig. 2-7b)。これら触媒領域を用いて免疫沈降法を行った結果、TET2 CD では TET3 CD と同程度の

OGTを検出できた (Fig. 2-7c, lane 9)。また、TET1 CDにおいてはTET2、TET3と比べると少ないながらもOGTを検出できた (Fig. 2-7c, lane 8)。

次に、TET3のメチル化シトシン水酸化活性とOGTとの相互作用の相関を調べた。解析にはTET3 CDとその触媒活性欠失変異体 (TET3 CD mut) を用いた (Fig. 2-8a)。TET3 CD mutは既報の論文を参考に作製し、HxDドメイン内の鉄 (II) イオン結合領域であると推測されている1085番目のヒスチジンと1087番目のアスパラギン酸をそれぞれチロシン、アラニンに点変異させたものである(34)。TET3 CD mutの触媒活性の欠失は抗5hmC抗体を用いたドットブロッキングで確認した (Fig. 2-8b)。この変異体を用いて免疫沈降法を行った結果、TET3 CD mutの免疫沈降産物にはTET3 CDと同程度のOGTが含まれていた (Fig. 2-8c, lane 9)。

第三項 OGTによるTET3のGlcNAc修飾

OGTはGlcNAc基転移酵素であり、これまでも様々なタンパク質がその基質であることが報告されている。例えば、RNAポリメラーゼIIの触媒サブユニットのC末端領域 (CTD) はリン酸化により活性が調節されるが、このCTDはOGTによりGlcNAc化され転写が調節される(78,79)。また、カゼインキナーゼII (CK2) はGlcNAc修飾によって酵素活性が調節を受けることが報告されている(80)。これらの知見を元に、TET3もOGTとの相互作用を介してGlcNAc化され、メチル化シトシン水酸化活性が調節されるという仮説を立て、検証した。

まず、293T細胞にTET3 shortを発現させ、免疫沈降産物を用いたウェスタンブロッキングにて解析した。検出には抗GlcNAc抗体を用いた。その結果、TET3 shortと同様の位置にTET3 shortサンプル特異的なバンドが検出された (Fig. 2-9a, lane 15)。また、GlcNAc修飾を蓄積させることを目的に、GlcNAc除去酵素OGAの阻害剤であるPUGNAcを処理した。その結果、細胞内のGlcNAc修飾タンパク質の増加が確認でき (Fig. 2-9a, lanes 10 and 12)、さらに、FLAG-TET3 shortのGlcNAc修飾量の増加が認められた (Fig. 2-9a, lane 16)。

上記の結果より、TET3がGlcNAc修飾を受けている可能性が示唆された。しかしながら、脱GlcNAc修飾酵素の阻害という実験の性質上GlcNAc付加がOGTにより行われているという実証は得られなかった。そこで、OGTの発現を抑制したときにTET3のGlcNAc修飾状態がどのような影響を受けるのかを検証した。まず、293T細胞にOGT

に対する siRNA を導入し、発現抑制を試みた。RT-qPCR により、有意に *OGT* mRNA 発現が抑制されていることを確認した (Fig. 2-9b、左図)。また、細胞抽出液を用いたウエスタンブロッティングでは、*OGT* タンパク質量の減少を確認できた (Fig. 2-9b、右図)。FLAG-TET3 short をトランスフェクションした 293T 細胞にさらに siRNA を導入し、24 時間後に細胞抽出液を調製した。この抽出液を用いてウエスタンブロッティングによって GlcNAc レベルを解析した。その結果、抽出液中の GlcNAc 化タンパク質は顕著に減少していた (Fig. 2-9c、lanes 2 and 4)。この抽出液を用いた免疫沈降産物では、抗 GlcNAc 抗体で検出できた FLAG-TET3 short の量は減少していた (Fig. 2-9c、lane 6)。

OGT による TET3 の GlcNAc 修飾の可能性をより深く検証するため、*in vitro* における再構築反応系を検討した。まず、反応に必要な組み換えタンパク質を調製した。*OGT* は昆虫細胞に、TET3 short、TET3 CD、及び TET3 CD Δ C1645 は 293T 細胞に発現させ、FLAG 抗体を用いたアフィニティー精製を行った。得たタンパク質は SDS-PAGE にて展開後、CBB 染色、もしくはコロイダルブルー染色にて可視化した (Fig. 2-10a)。*in vitro* GlcNAcylation 反応産物は抗 GlcNAc 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、TET3 short、TET3 CD を基質としたサンプルでは顕著に GlcNAc 化したそれぞれのタンパク質を検出した (Fig. 2-10b、lanes 3 and 6)。しかしながら、*OGT* との結合性を示さない TET3 CD Δ C1645 サンプルでは (Fig. 2-6c、lane 22)、GlcNAc 化したタンパク質を検出できなかった (Fig. 2-10b、lane 9)。

これまでの実験では、TET3 が *OGT* により GlcNAc されることを検証したが、TET3 の GlcNAc 化される部位に関してはあまり情報が得られていない。そこで、*in vitro* GlcNAcylation 法と LC-MS/MS を用いた質量分析を用いて TET3 の GlcNAc 修飾部位の網羅的な同定を試みた。Fig. 2-10 と同様にして、TET3 short の *in vitro* GlcNAcylation 反応産物を取得し、SDS-PAGE にて展開後、コロイダルブルー染色を行い可視化した (Fig. 2-11a、左図)。TET3 short のバンドを切り出し、前処理を行い、LC-MS/MS に供した。その結果、*OGT* を加えなかったコントロールサンプルでは 84 種類の TET3 に由来するペプチド断片を同定し、*OGT* を加えたサンプルでは 90 種類のペプチドを同定した (Fig. 2-11a、右図)。これらのデータを比較し、*OGT* を加えた場合のみで同定できた修飾ペプチドを 5 種抽出した (Fig. 2-11b)。

次に、*OGT* による GlcNAc 修飾が TET3 の酵素活性にどのような影響を与えるのかを検証した。293T 細胞に TET3 short、もしくは TET3 CD を発現させ、さらに PUGNAc

処理により GlcNAc 修飾を蓄積させた。そのように処理した細胞からゲノム DNA を抽出し、抗 5hmC 抗体を用いたドットブロッキングにより解析した。その結果、TET3 short, TET3 CD の発現によりゲノム中の 5hmC 含量は増加したが、PUGNAc 処理による変化は見いだせなかった (Fig. 2-12a, lanes 3 and 4, 5 and 6)。また、siRNA を用いて OGT の発現を抑制し、GlcNAc 修飾を低下させた状態での TET3 short、及び TET3 full の活性を調べた。TET short と TET3 full のいずれにおいてもメチルシトシン水酸化活性の変化は見られなかった (Fig. 2-12b, lanes 3 and 4, 7 and 8, 19 and 20, 23 and 24)。

第四項 TET3 による OGT の局在制御

これまでの結果より、TET3 が OGT と相互作用し GlcNAc 修飾を受けることから、OGT による TET3 の機能調節を想定し研究を進めてきた。しかしながら、GlcNAc 修飾はゲノム全体に及ぼすような TET3 のメチルシトシン水酸化活性に影響を与えないことが示唆された (Fig. 2-12)。このような経緯を鑑みて、TET3 により OGT の機能が調節されるという可能性を検証することにした。また、最近になって TET2、及び TET3 が OGT と複合体を形成していることを報告する論文が発表された(81)。その論文では、TET2 によって OGT のクロマチンへのリクルートが調節されていることが明らかにされている。そこで本研究では、TET2 と同様に、TET3 による OGT 局在調節を仮定し、検討した。

293T 細胞に TET3 CD、及び TET3 full を発現させ、細胞質、核、クロマチン画分を分画抽出した。それらの抽出液をウエスタンブロッティングにより解析した結果、TET3 CD、TET3 full を発現させるとクロマチン画分における OGT 量が増加することが見いだされた (Fig. 2-13a, lanes 8 and 9)。

また、OGT のクロマチンリクルートと TET3-OGT 相互作用の相関を検討するため、OGT との結合能を有する欠失体 TET3 CD Δ N1001 (Fig. 2-6c, lane 8)、OGT との結合能をもたない欠失体 Δ C1645 (Fig. 2-6c, lane 22) を用いて実験を行った。その結果、 Δ N1001 は CD 同様にクロマチン画分における OGT 量を増加させたのに対し、 Δ C1645 では OGT 量に変化は見られなかった (Fig. 2-13, 左図, lanes 11 and 12)。このとき得たフィルムを用いてデンシトメトリー解析を行い、クロマチン画分における OGT のバンド密度を定量した。その結果、TET3 CD ではコントロールに対して約 4 倍、 Δ N1001 では約 2.5 倍の増加が認められた (Fig. 2-13b, 右図)。

次に、TET3 による OGT のクロマチンリクルートにメチルシトシン水酸化活性が関与

するか否かを検討した。その結果、TET3 CD 同様に TET3 CD mut においてもクロマチン画分における OGT 量の増加が見出された (Fig. 2-13c、左図、lane 9)。また、その増加量は CD 同様に約 4 倍であった (Fig. 2-13c、右図)。

第五項 TET3 による OGT タンパク質の安定化

これまでの結果より、TET3 が TET2 同様に OGT のクロマチンリクルートを促進することが示唆された。しかしながら、TET による OGT のクロマチンリクルートの作用機序は未だ明らかにされていない。本研究のこれまでの実験から、293T 細胞に TET3 を発現させると OGT タンパク質の発現量も増加する傾向にあることが認められた (Fig. 2-6、2-7)。そこで、TET が OGT タンパク質量を増加させ、結果的にクロマチン中に存在する OGT 量を増加させる、という仮説を立て以下の実験を行った。

293T 細胞に TET3 CD、 Δ N1001、 Δ C1645 を発現させた後、全細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにて OGT タンパク質の発現量を評価した。その結果、OGT と結合できない TET3 CD Δ C1645 ではコントロールとの差は見られなかったが (Fig. 2-14、left panel、lane 4)、OGT との結合能を有する TET3 CD、 Δ N1001 を用いた場合では OGT タンパク質発現量が増加していた (Fig. 2-14a、left panel、lanes 2 and 3)。このデータを元にデンストメトリー解析を行った結果、TET3 CD では約 3 倍、 Δ N1645 では約 2 倍に OGT 量が増加していた (Fig. 2-14、right panel)。次に、この TET3 による OGT タンパク質発現亢進の TET ファミリー間での保存性を検証した。TET1 CD、TET2 CD、及び TET3 CD を 293T 細胞に発現させ、OGT 量をウエスタンブロッティングにて解析した。その結果、TET1 CD、TET2 CD、TET3 CD の全てにおいて OGT タンパク質発現の増加が見出せた (Fig. 2-14b、lanes 2-4)。

以上の結果から、細胞内に過剰発現した TET は OGT タンパク質の発現量を増加させることが示唆された。しかしながら、過剰発現系での解析は人為的な実験系であるため、本来の性質とは異なる結果が得られる可能性が否定できない。そこでこれまでの実験法とは逆に、TET3 の発現抑制実験を用いて TET3 により OGT の発現が制御されるか否かを検証した。TET3 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを作製し、293T 細胞に感染させた。感染 4 日、もしくは 5 日後、細胞を回収し TET3、OGT mRNA の発現量を RT-qPCR により解析した。その結果、導入した細胞では明確に TET3 mRNA の発現抑制が認められた (Fig. 2-14c、上図)。しかしながら、OGT mRNA の発現量に差は見られ

なかった (Fig. 2-14c、中図)。同様に処理した細胞から、全細胞抽出液を調製し、OGT タンパク質をウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、TET3 の発現を抑制した細胞では、OGT 量が減少していることを見出した (Fig. 2-14c、下図)。

これまでの結果より、TET3 の発現を抑制すると、OGT mRNA の発現量に変化は見られないが、OGT タンパク質の発現量が減少することが示された。これらの結果は TET3 による OGT の発現量増大が転写レベルではなく、タンパク質レベルで行われていることを示唆している。そこで、TET3 が OGT タンパク質の安定性を調節している可能性を以下の実験で検証した。293T 細胞にタンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミドを処理し、OGT タンパク質の発現量をウエスタンブロッティングで解析した。コントロールサンプルでは、20、40、60 μM で3時間シクロヘキシミド処理することで OGT タンパク質の濃度依存的な減少が認められた (Fig. 2-15a、lanes 4–6)。しかしながら、TET3 CD を発現させると 20、40、60 μM の処理区においても OGT 量の減少は見られなかった (Fig. 2-15a、lanes 10 and 11)。また、コントロールサンプルでは時間依存的な OGT の減少が認められたのに対し (Fig. 2-15b、lanes 3 and 4)、TET3 CD を発現させるとそのような傾向は見られなくなった (Fig. 2-15b、lanes 7 and 8)。

ウエスタンブロッティングの欠点として、脆弱な定量性が挙げられる。そこで、本実験ではシクロヘキシミド処理をしていない TET3 CD サンプル 20、10、5、2.5 μg を標準サンプルとして用い、得た結果のバンド密度をデンストメトリー解析により定量した。標準サンプルの測定値をプロットし、近似直線を算出した (Fig. 2-15b、左下図)。その決定係数 (R^2) は 0.989 であり、この値は、20 μg から 2.5 μg の範囲で十分な定量性が認められることを示している。従って、今回の実験で得られた、シクロヘキシミド処理による OGT タンパク質の時間依存的な減少と TET3 CD 発現による OGT 量増加は (Fig. 2-15b、右下図)、十分に定量可能な範囲で見出されたことが示された。

これまで TET3 が OGT の発現を増加させ、OGT のクロマチンリクルートを促進することを想定して研究を進めた。実際に、TET3 は OGT タンパク質を安定化することでその発現を増大させていることが示唆された。しかしながら、OGT タンパク質の発現量とクロマチン局在との相関に関しては未だ不明瞭なままである。その点を明確にするため、タンパク質発現量をシクロヘキシミドで減少させた条件の下、OGT の局在を解析した。293T 細胞に 40 μM シクロヘキシミド処理を 12 時間行い、細胞質、核、クロマチン画分を分画抽出した。それら抽出液中の OGT 量をウエスタンブロッティングにて解析した。

まず、細胞質画分に含まれる OGT 量の減少を認めることができた (Fig. 2-16、lanes 1 and 2)。また、核画分 (lanes 3 and 4)、クロマチン画分 (lanes 5 and 6) においても同様に OGT 量が減少していることが見出された。タンパク質の分解は細胞質で見られる現象であり、今回の結果は細胞質の OGT 量が核、及びクロマチンの OGT 量に反映されることを示している。

第四節 小括

本章では、メチルシトシン水酸化酵素である TET3 に着目し、生化学的な手法を用いて相互作用因子を探索した。その結果、GlcNAc 基転移酵素 OGT を同定することができた(Fig. 2-1, 2)。様々な欠失体を用いた解析より、TET3 の C 末端領域に存在する H ドメインが OGT との相互作用に重要な役割を担っていることが示された(Fig. 2-6)。また、全ての TET ファミリーにおいて OGT との結合性が見られたが、特に TET2、及び TET3 が強く OGT と相互作用することが示唆された(Fig. 2-7)。

次に、TET3 は OGT によって GlcNAc 修飾を受けることが示唆された(Fig. 2-9)。その OGT による GlcNAc 化には、TET3 の H ドメインを介した相互作用が重要であることが示された(Fig. 2-10)。しかしながら、ゲノム全体に含まれる 5hmC 量を評価した限りでは、TET3 の GlcNAc 化はそのメチルシトシン水酸化活性に影響を与えないことが示唆された(Fig. 2-12)。

また、本章で明らかにした TET-OGT 複合体は、最近、いくつかのグループにより報告された(81-83)。中でも、Chen らのグループは TET2 により OGT のクロマチンリクルートが促進されることを報告した。本章では、TET3 も同様に OGT のクロマチン局在を亢進する機能を有することを追証することができた(Fig. 2-13)。また、TET による OGT の局在制御に関して、その詳細な作用機序は不明であった。しかしながら本研究により、TET3 によって OGT を安定化され(Fig. 2-14, 15)、タンパク質レベルで発現量を増加させることが OGT のクロマチンリクルートに寄与することが明らかとなった (Fig. 2-17)。

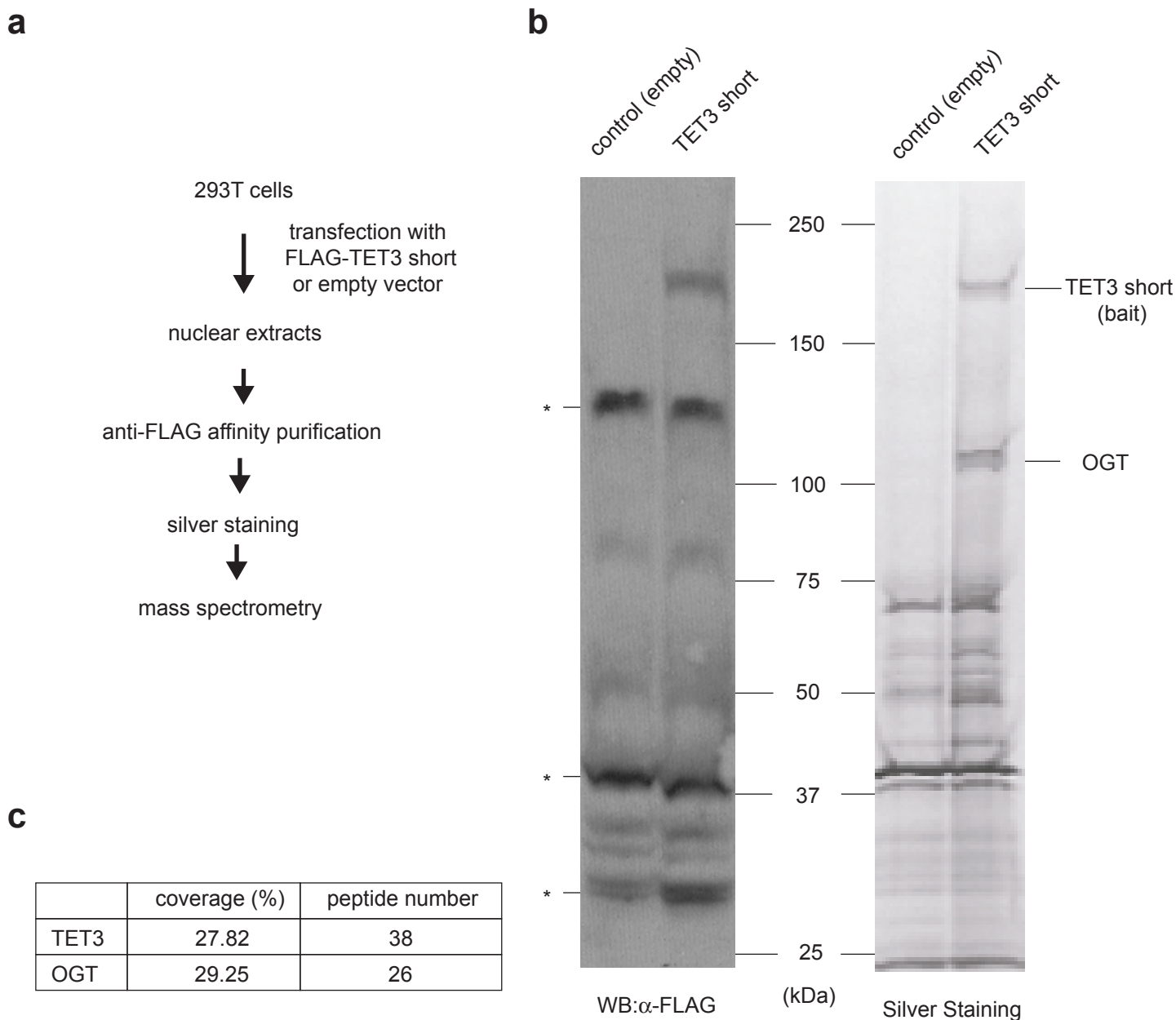
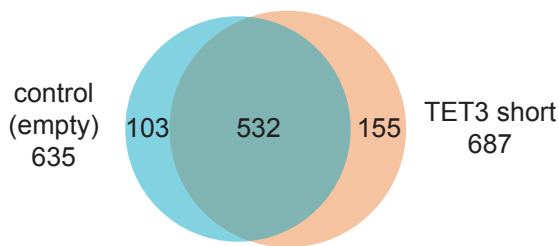
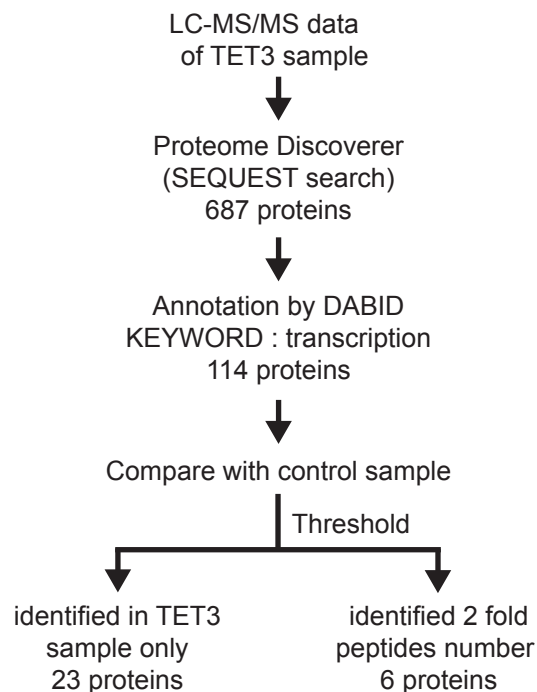


Fig.2-1 FLAG-TET3を過剰発現させた293T細胞を用いたTET3相互作用因子の取得
 (a) 過剰発現系によるFLAG-TET3相互作用因子の同定手順 293T細胞にpcDNA3-FLAG-TET3 shortを過剰発現させ、核抽出液を調製し、その抽出液を用いてFLAGアフィニティ精製を行った。精製産物はSDS-PAGEにて展開後、銀染色に供じた。さらに、FLAG-TET3特異的なバンドを切り出した後、質量分析計を用いて解析した。コントロールにはpcDNA3-FLAGを用いた。(b) 精製産物の解析 精製産物を2-15%グラディエントゲルに展開した後、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロットティング (左図)、及び銀染色 (右図) を行った。*は非特異的なバンドを示す。(c) TET3特異的なバンドの質量分析結果 銀染色により得られた200kDa付近、及び100kDa付近のバンド切り出し、質量分析を行った。同定したアミノ酸の全アミノ酸配列に対する割合 (coverage) と同定したペプチド配列の種数 (peptide number) を記した。

a

	peptide number	
	control	TET3
TET3	2	69

	peptide number	
	control	TET3
OGT	8	42

b**c**

	peptide number			peptide number	
	control	TET3		control	TET3
RBBP7	0	10	ING1L	0	2
CHD7	0	6	p53BP1	0	2
PELP1	0	4	RBBP5	0	2
SAP130	0	4	TAF5	0	2
SAP30	0	3	MED4	0	2
TBL1	0	3	SHARP	0	2
SDS3	0	3	FOXC1	0	2
RPB1	0	3	HIRA	0	2
RPB2	0	3	ARID4B	0	2
RBM14	0	3	NME1	0	2
ZFP281	0	2	C21orf66	0	2
DP2	0	2			

d

	peptide number	
	control	TET3
SIN3A	16	38
BPTF	4	16
NONO	3	8
CDC73	2	7
FOXK1	3	7
ASH2L	2	4

Fig.2-2 TET3相互作用因子の網羅的解析

(a) TET3相互作用因子の網羅的探索 Fig.2-1と同様の精製産物を直接還元、アルキル化、メタノール/クロロホルム沈殿、トリプシン消化したサンプル調製し、LC-MS/MS解析を行った。コントロール、TET3サンプルそれぞれの同定結果をベン図で示した。また、TET3及びOGTの同定したペプチド数をそれぞれ記した。(b) LC-MS/MSデータの解析手順 TET3のLC-MS/MS解析結果をProteome Discovererを用いてSEQUEST検索を行った。同定した687種のタンパク質をDAVIDを用いてアノテーション解析し、転写関連タンパク質114種を抽出した。それらのタンパク質のペプチド数をコントロールサンプルのLC-MS/MS解析結果と比較した。(c) TET3サンプルのみで同定したタンパク質23種 (d) コントロールに対して2倍以上のペプチド数を同定できたタンパク質6種

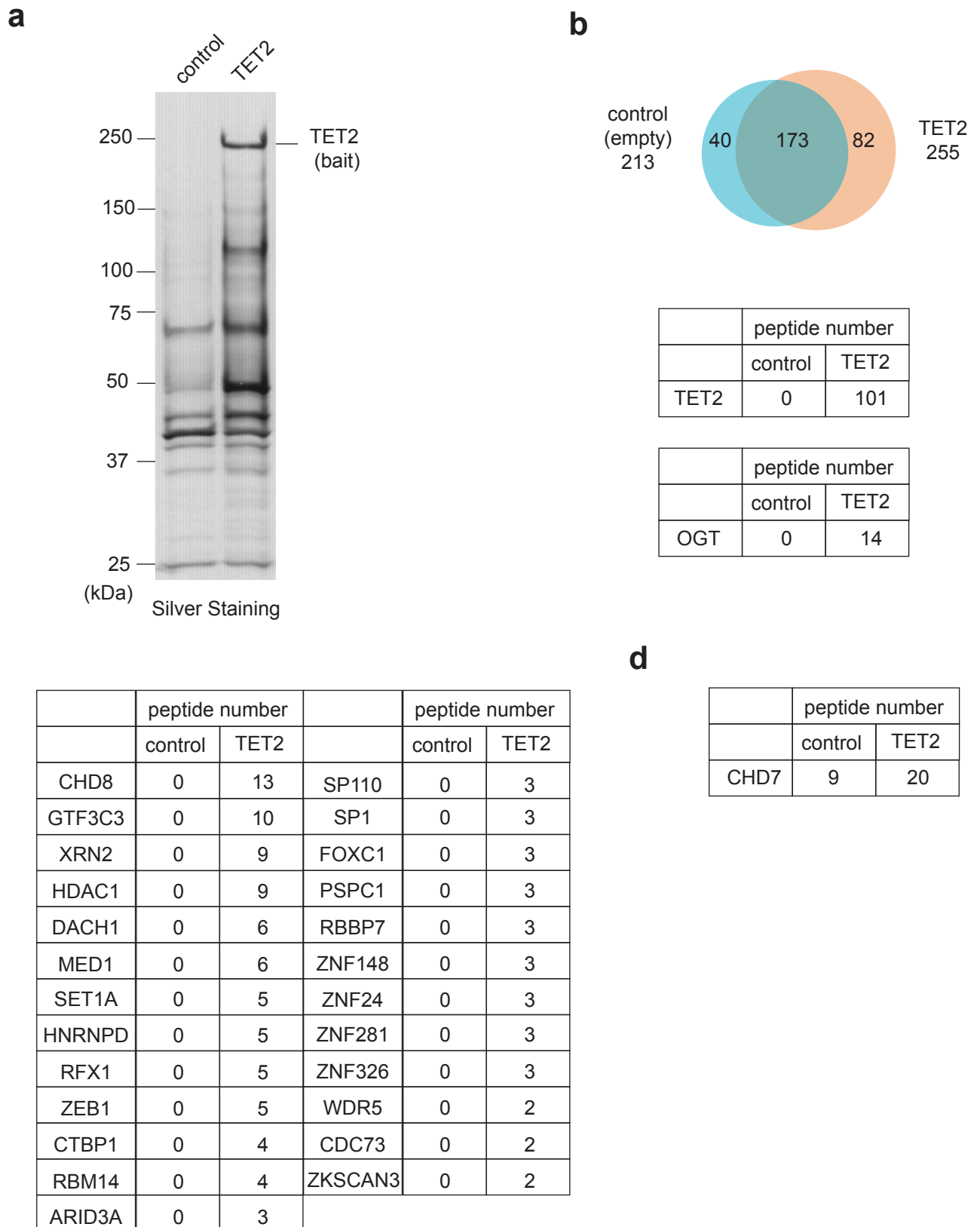


Fig.2-3 TET2相互作用因子の網羅的解析

(a) TET2精製産物の解析 Fig.2-1aと同様にしてTET2複合体を精製し、その産物を2-15%グラディエントゲルに展開し、銀染色を行った。(b) TET2相互作用因子の網羅的探索 Fig. 2-2と同様にTET2精製産物を用いてLC-MS/MS解析を行った。コントロール、TET2サンプルそれぞれの同定結果をベン図で示した。また、TET2及びOGTの同定したペプチド数をそれぞれ記した。(c) TET2サンプルでのみ同定したタンパク質25種 Fig. 2-2bと同様の手順で解析を行った (d) コントロールに対して2倍以上のペプチド数を同定できたタンパク質1種

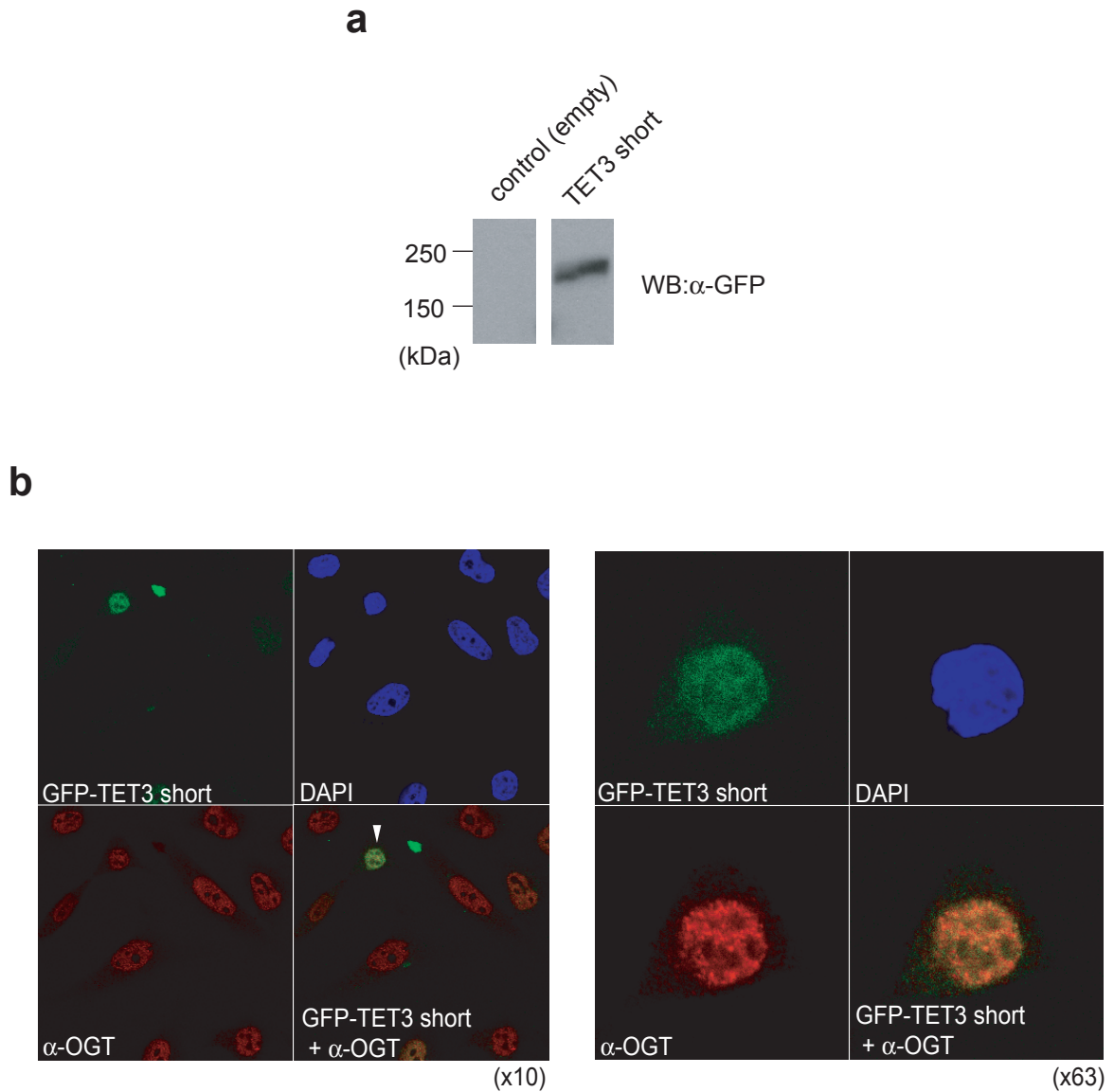


Fig.2-4 細胞内におけるTET3とOGTは核内に共局在する

(a) GFP-TET3の発現確認 pcDNA3-GFP-TET3 shortを293T細胞にトランスフェクションし、細胞を回収後、全細胞抽出液を調製した。それらの抽出液を用いてウエスタンブロッティングし、抗GFP抗体を用いて検出した。コントロールにはpcDNA3-GFPを用いた。(b) 蛍光顕微鏡を用いたTET3とOGTの局在解析 pcDNA3-GFP-TET3を導入したHeLa細胞に、抗OGT抗体を用いた免疫染色を行った。GFP-TET3 short (緑)、OGT(赤)、及びDAPI(青)は蛍光顕微鏡を用いて観察した。まず、10倍の対物レンズを用いて観察し(左図)、矢頭で示した細胞はさらに63倍の対物レンズを用いて観察した(右図)。

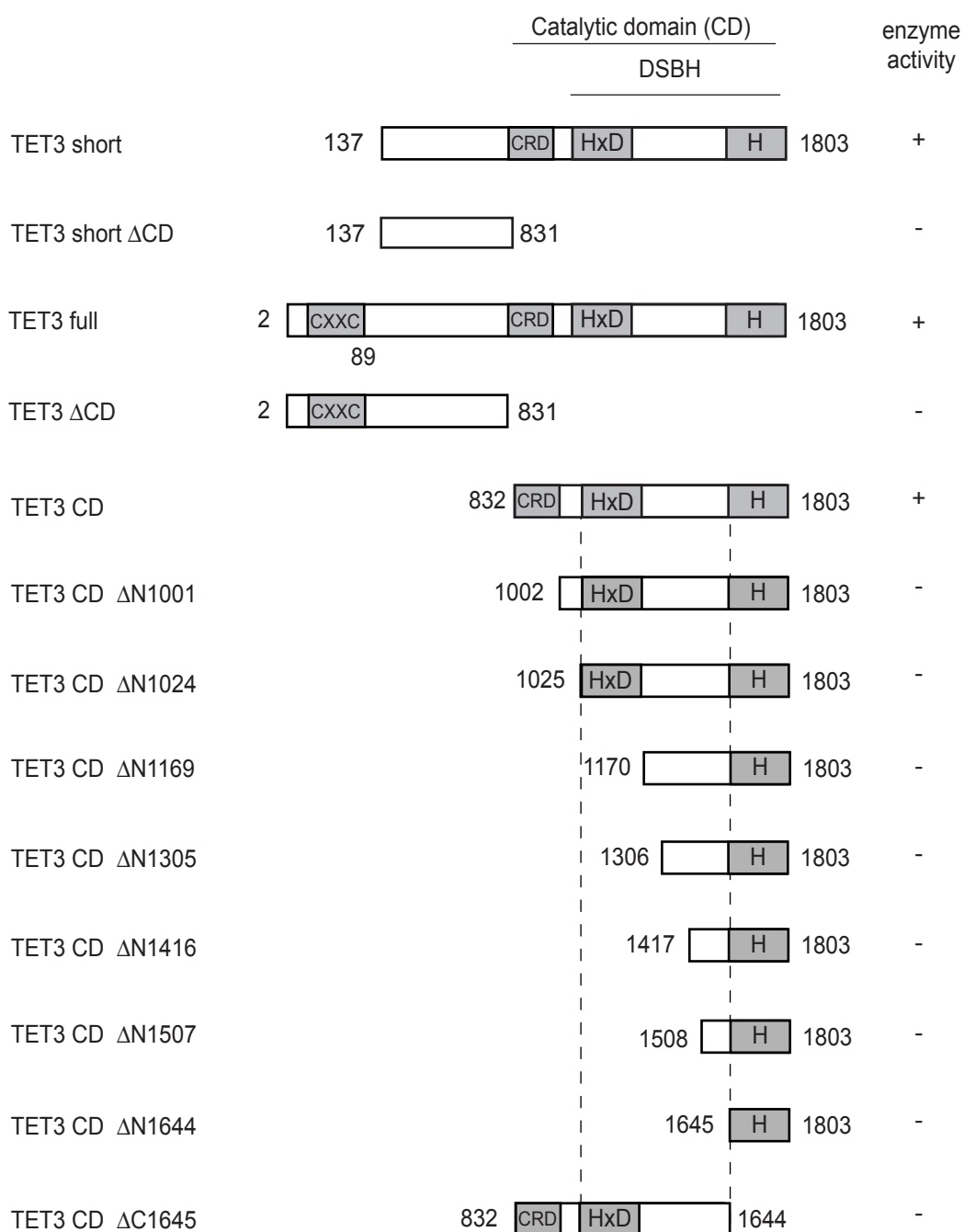


Fig.2-5 TET3およびTET3欠失変異体の構造

マウスTET3欠失変異体の構造 TET3は1803個のアミノ酸から成り、CXXC (57-89)、CRD (832-1002)、DSBH (1025-1803)、HxD (1025-1169)、H (1645-1803)が保存されている。本研究では137番目から1803番目のアミノ酸を持つバリエーション(NM_183138.2)をTET3 shortとした。また、2番目から1803番目のアミノ酸配列を持つものを全長TET3 (TET3 full)とした。これらを元に作製した欠失変異体を図示した。

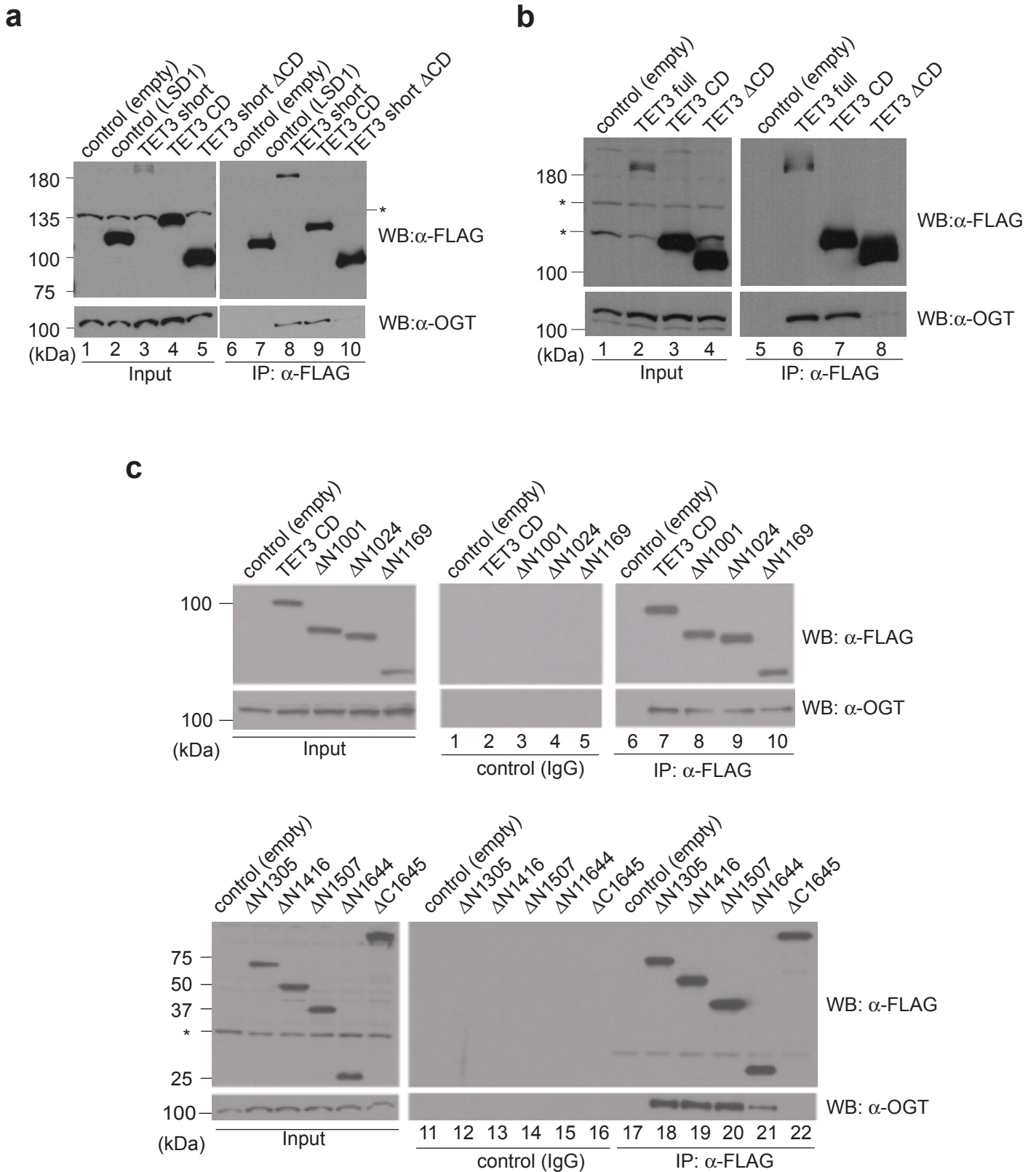
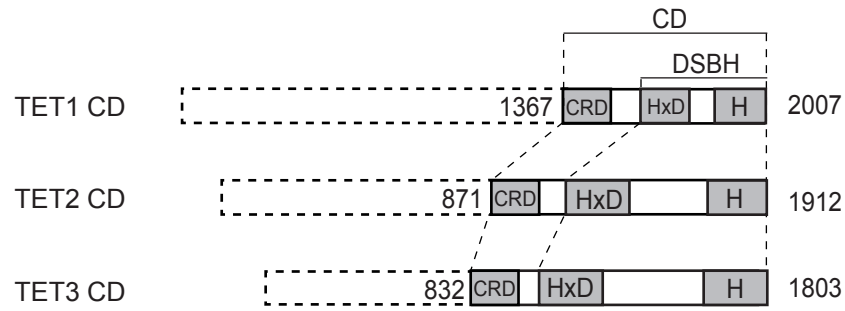
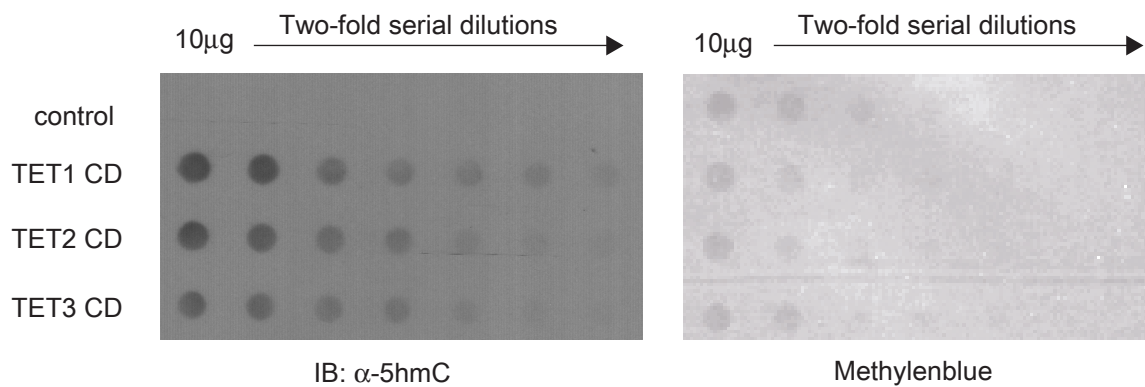
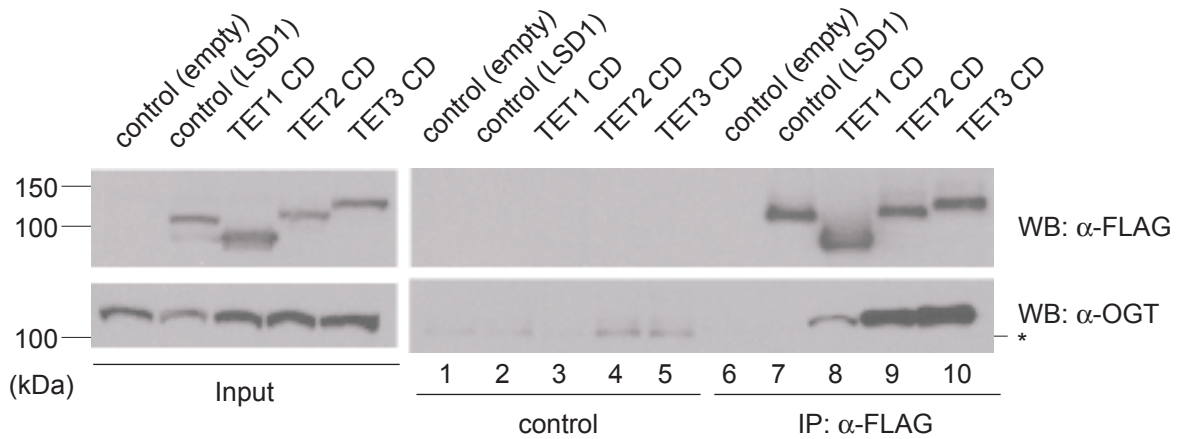


Fig.2-6 TET3のH domainを介したOGTとの結合

(a) 免疫共沈降法によるTET3とOGTの相互作用の検証 293T細胞にFLAGタグ付きTET3 short、TET3 CD、TET3 short ΔCDを発現させ全細胞抽出液を調製し、FLAG抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降のコントロールにはマウスIgGを用いた。それらの免疫沈降産物中のOGTをウェスタンブロッティングで検出した。FLAG-LSD1はネガティブコントロールとして用いた。*は非特異的なバンドを示す。(b) 全長TET3とOGTの相互作用 (a)と同様の実験をTET3 full、TET3 CD、TET3 ΔCDを用いて行った。(c) OGTはTET3 CD ΔC1645と結合しない 同様に、TET3 CD ΔN1001、ΔN1024、ΔN1169 (上図)、ΔN1305、ΔN1416、ΔN1507、ΔC1645 (下図)のOGTとの結合性を解析した。

a**b****c****Fig.2-7 TET CDとOGTの相互作用の保存性**

(a) TETファミリーCDの構造 本研究で作製したマウスTETの各CDを図示した。(b) TET CDのメチルシトシン水酸化活性 293T細胞にTET1 CD、TET2 CD、TET3 CDを発現させ、ゲノムDNA中の水酸化メチルシトシンの含量をドットブロッキングにより解析した。(c) TET CDとOGTの相互作用 TET1 CD、TET2 CD、TET3 CDを導入した293T細胞を用いて免疫共沈降法によりOGTとの結合性を解析した。

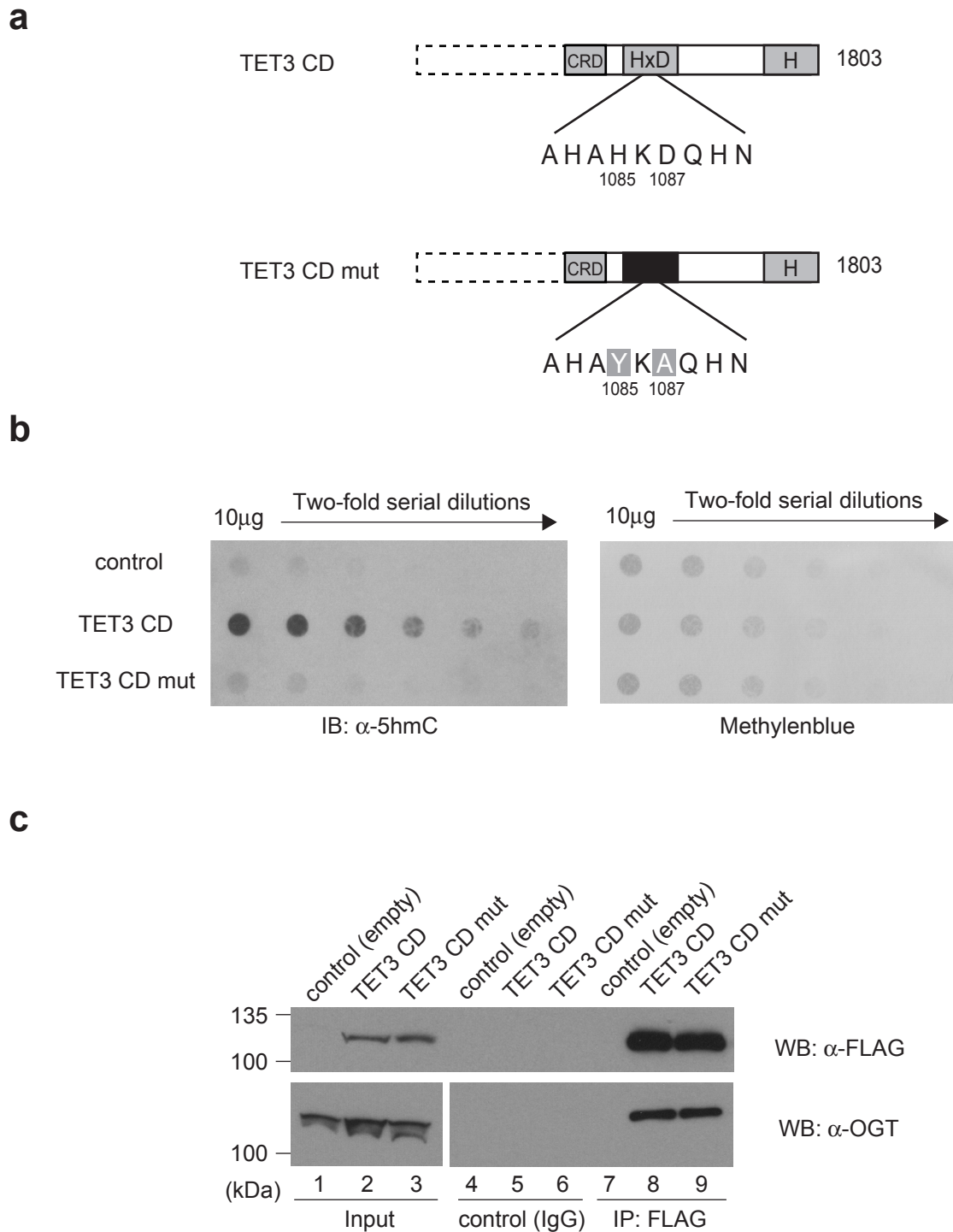
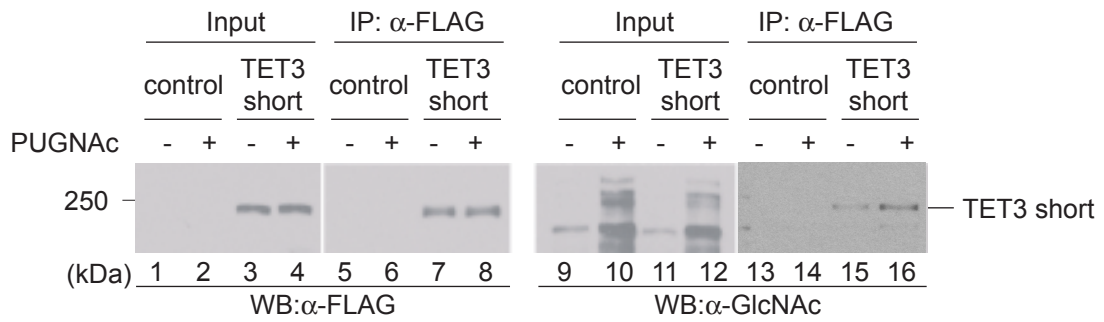
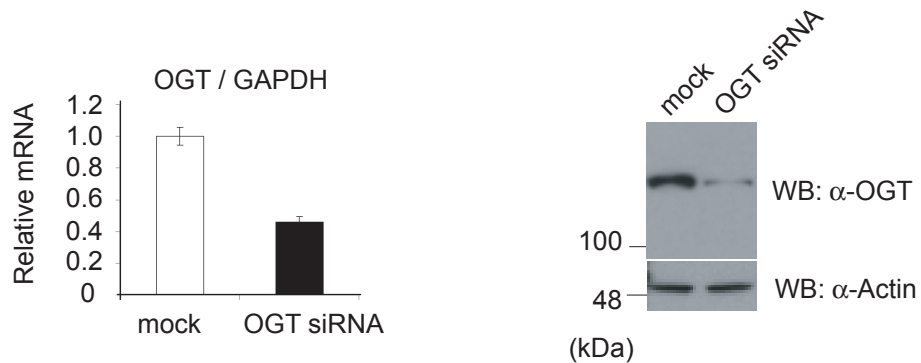
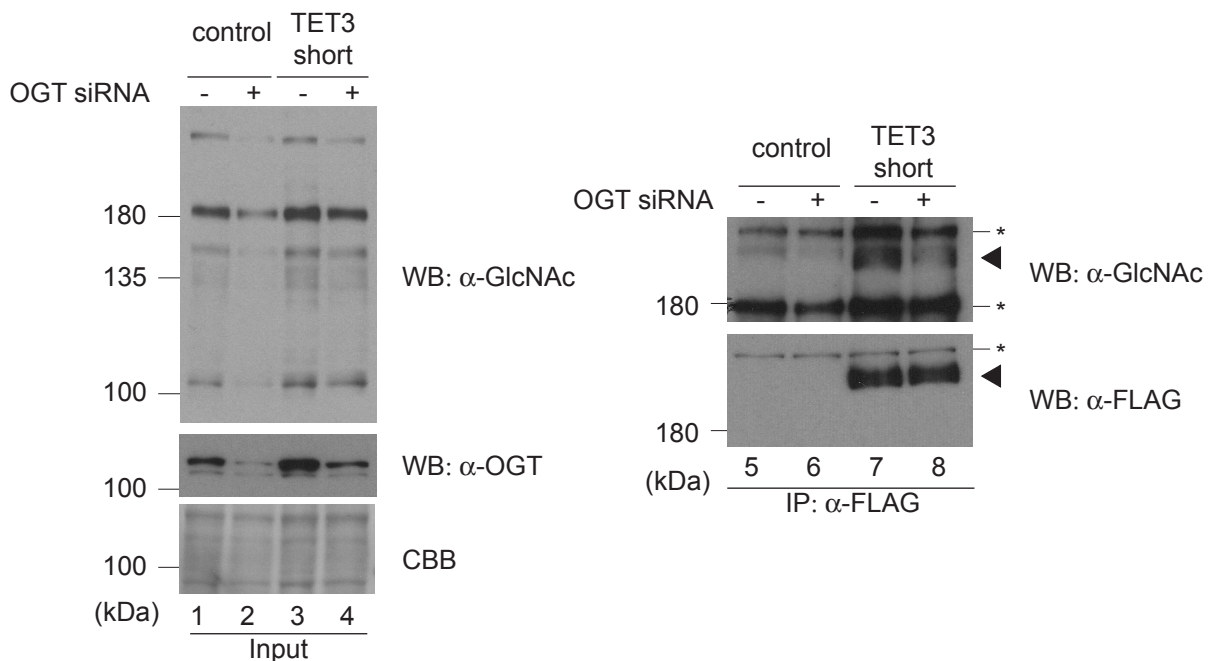
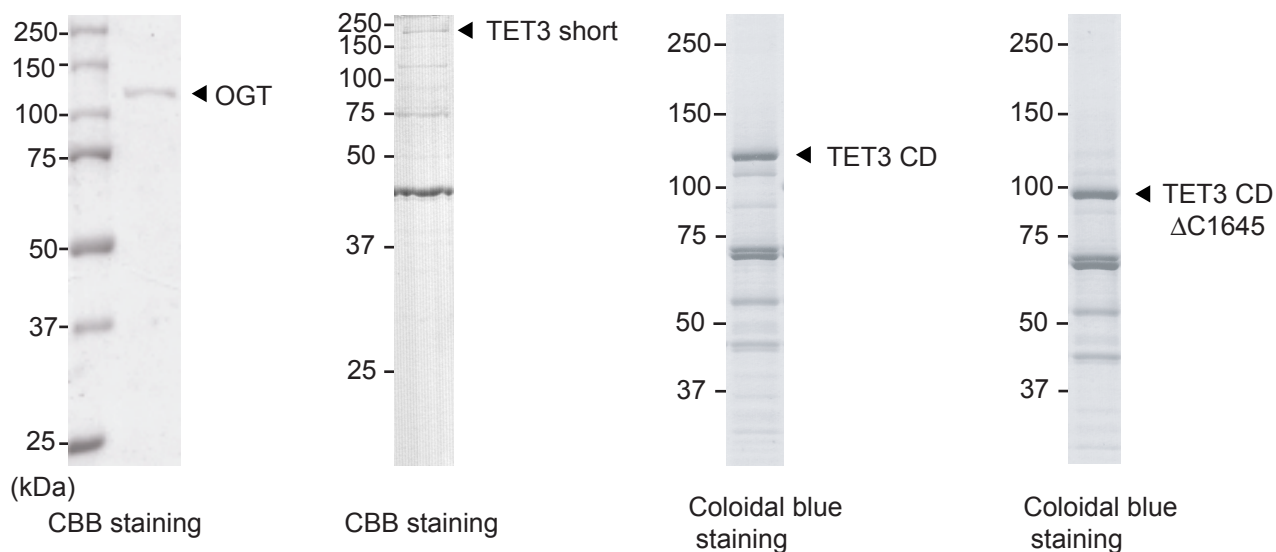


Fig.2-8 TET3とOGTの相互作用はTET3のメチルシトシン水酸化活性に依存しない
 (a) TET3 CD mutの構造 1085番目ヒスチジン(H)、1087番目のアスパラギン酸(D)をそれぞれチロシン(Y)、アラニン(A)へ置換した。(b) TET3 CD mutがメチルシトシン水酸化活性を欠失していることを確認した。(c) TET3 CD mutとOGTの相互作用 TET3 CD mutを導入した293T細胞を用いて免疫共沈降法によりOGTとの結合性を解析した。

a**b****c****Fig.2-9 TET3はOGTによりGlcNAc修飾を受ける**

(a) TET3のGlcNAc修飾とPUGNAc処理によるその蓄積 293T細胞にTET3 shortを発現させ、PUGNAc処理の後、免疫沈降を行った。その産物を抗GlcNAc抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析した。(b) siRNAを用いたOGTの発現抑制 OGTに対するsiRNAを導入した293T細胞からRNAを抽出し、RT-qPCRによりOGT mRNAの発現量を解析した(左図)。また、同様に処理した細胞の抽出液を調製し、OGTタンパク質の発現量をウエスタンブロッティングで解析した(右図)。(c) OGT発現抑制によるTET3 GlcNAc修飾の減少 TET3 shortを発現させた293T細胞にさらにOGT siRNAを導入した後、(a)と同様の解析を行った。タンパク質のローディングコントロールとしてCBB染色を行い、矢頭はTET3 shortのバンドを示す。

a



b

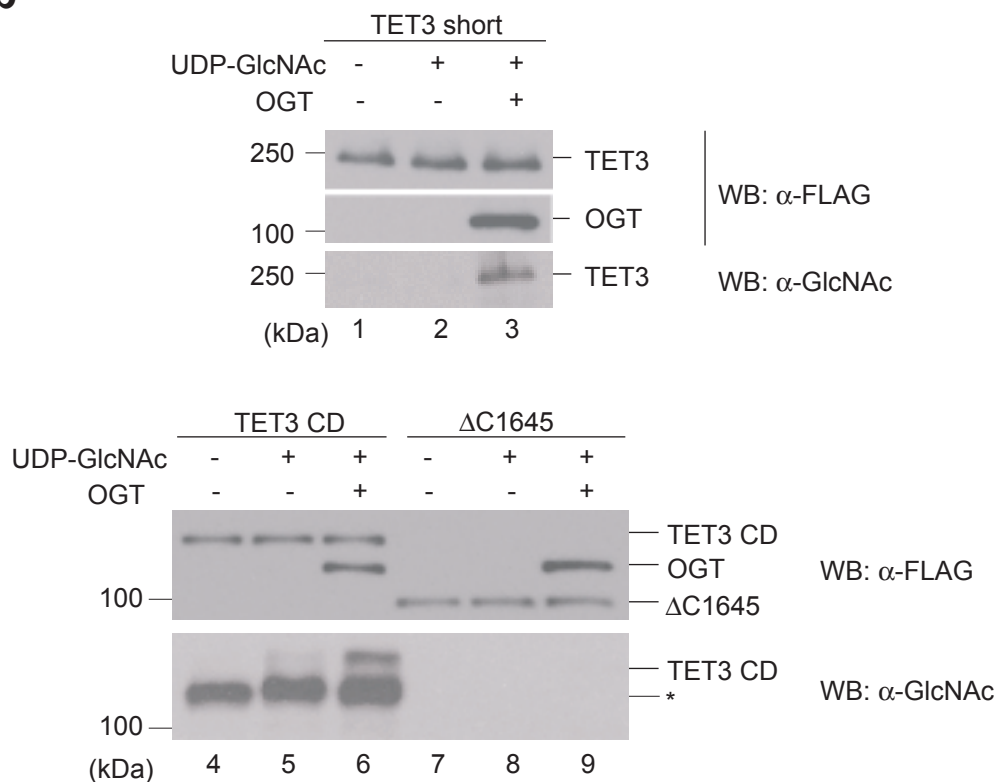
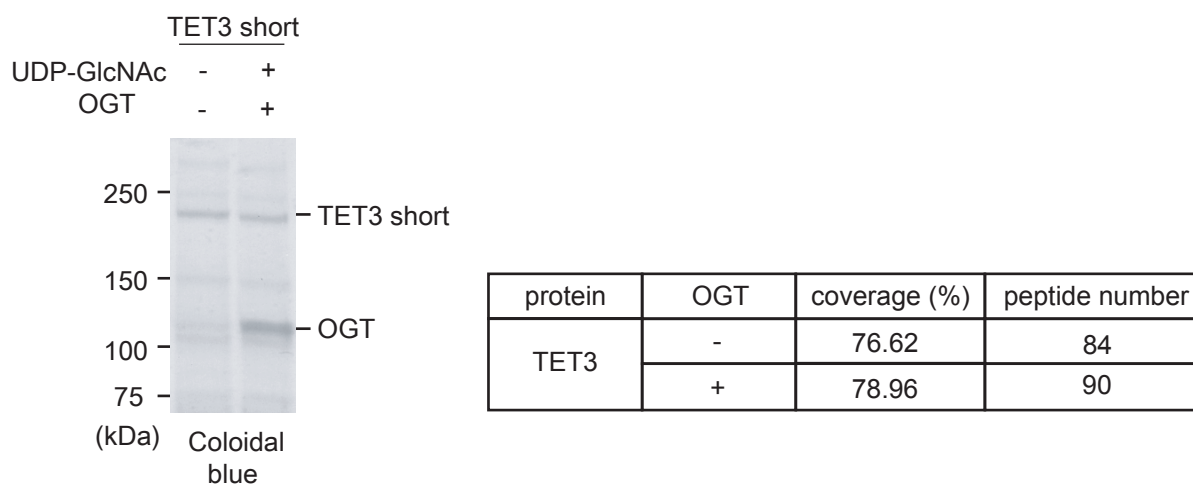


Fig.2-10 H domainはTET3のGlcNAc化に必要である

(a)組み換えタンパク質 OGTは昆虫細胞Sf-9に、TET3は293T細胞に発現させ、それぞれをFLAG抗体を用いて精製した。(b) *in vitro* GlcNAcylation法によるTET3のGlcNAc化 TET3 short、TET3 CD、TET3 CD ΔC1645を基質として*in vitro* GlcNAcylation法を行った。反応産物はウエスタンブロッティングにより解析した。

a



b

GlcNAcylated peptides	
sequence	position
QLST S GAPVNGAR	152
EAPLL S SEPDTHQK	514
GGL S QQSLKPSLK	1218
QEPIDPL T QAESIPR	1413
TPLPEASQNGGPSHLWGQY S GGPSMSPK	1447

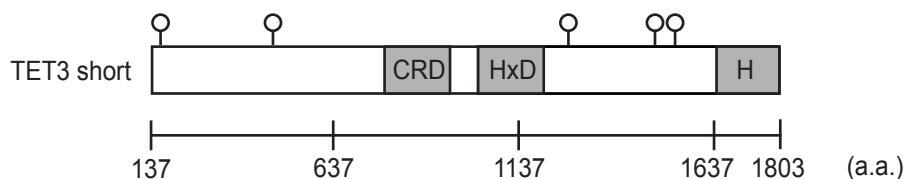


Fig.2-11 TET3 GlcNAc化部位の網羅的解析

(a) *in vitro* GlcNAcylation反応産物を用いた質量分析 反応産物はSDS-PAGEで展開し、コロイダルブルー染色を行った(左図)。 目的のバンドを切り出し、前処理後、質量分析を行った(右表)。(b) 同定されたTET3のGlcNAc候補部位 GlcNAc化が予測されるアミノ酸残基を太字で示した(上表)。また、それらの部位をモデル図で図示した(下図)。

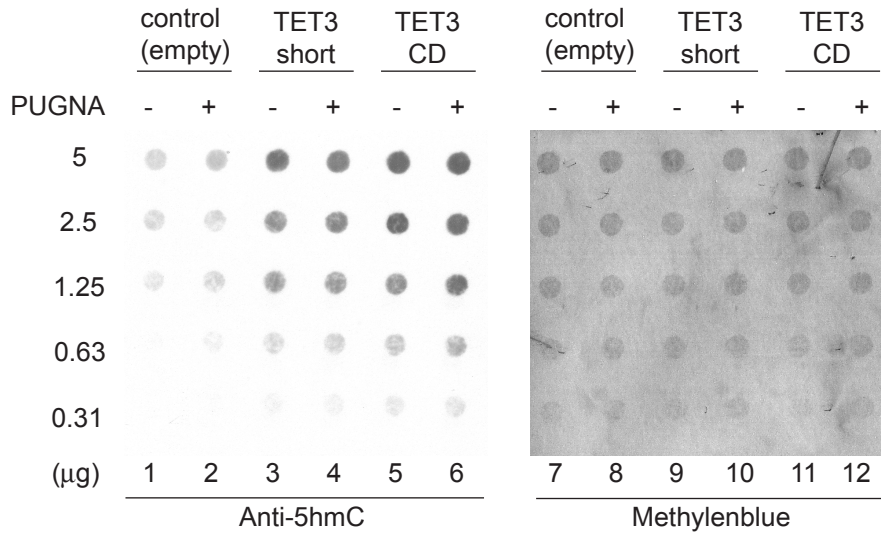
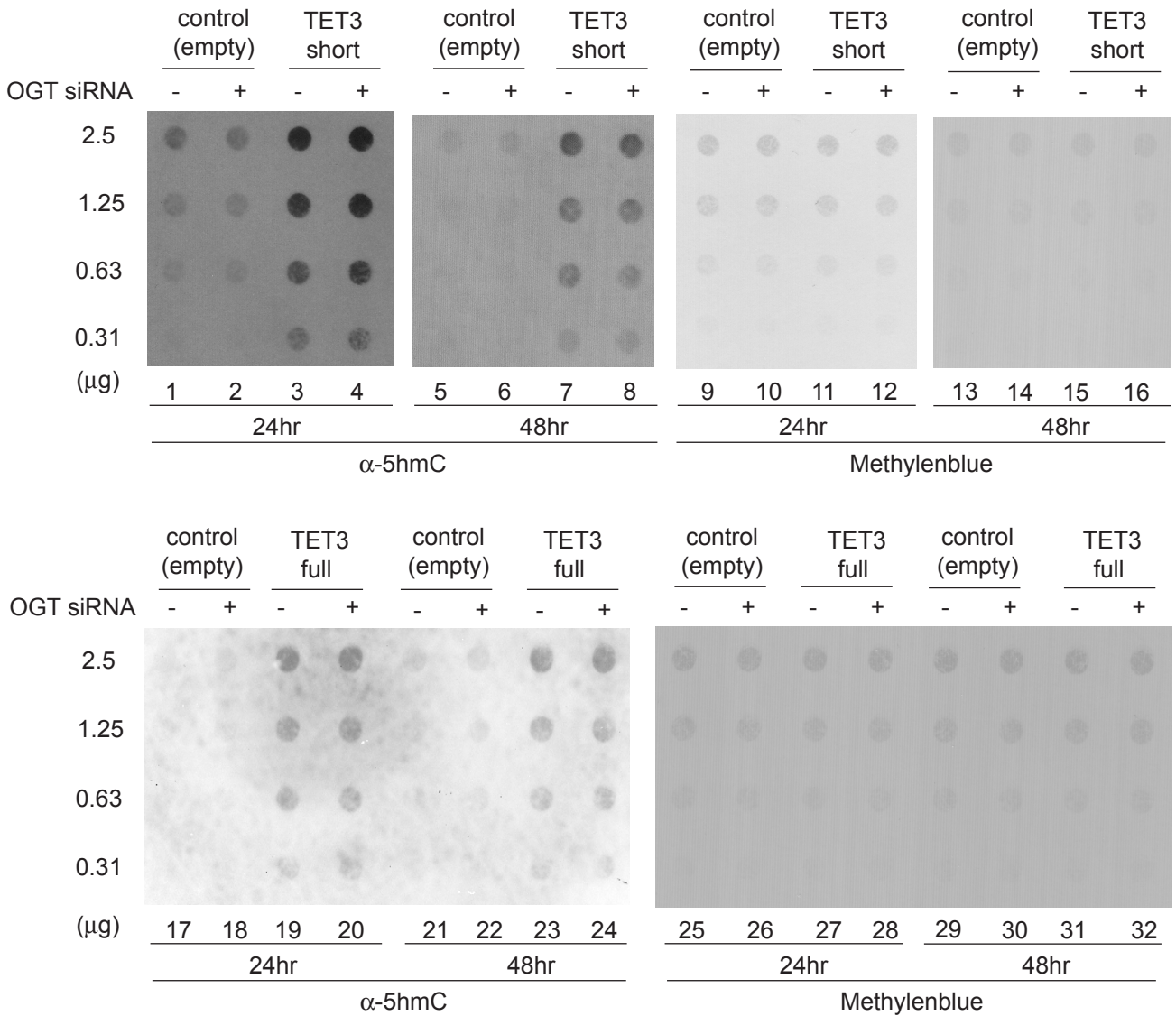
a**b**

Fig.2-12 GlcNAc化レベルとTET3のメチルシトシン水酸化活性の相関

(a) PUGNAc処理の影響 TET3 short、TET3 CDを発現させた293T細胞に40μM PUGNAcを24時間処理した後、ゲノムDNAを抽出し、抗5hmC抗体を用いたドットブロッキングにて解析した。(b) OGT siRNAを導入した後、24時間、48時間後にゲノムDNAを抽出し、(a)と同様の実験を行った。

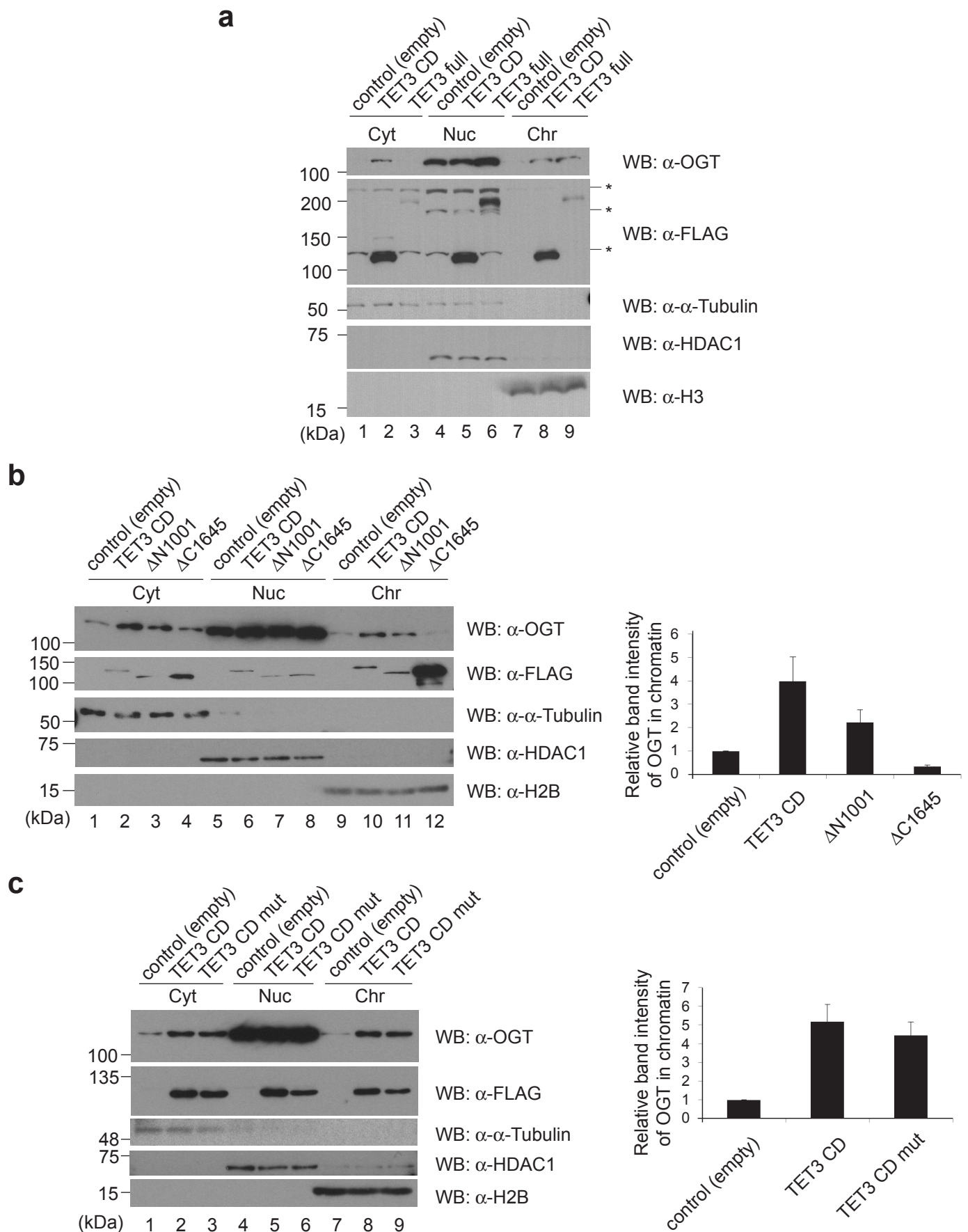


Fig.2-13 TET3はOGTのクロマチン画分への局在を促進する

(a) TET3のOGT局在への影響 TET3 full、TET3 CDを発現させた293T細胞から細胞質画分(Cyt)、核画分(Nuc)、クロマチン画分(Chr)を抽出し、ウエスタンブロッティングによりOGTの局在を解析した。 α -tubulin、HDAC1、H3もしくはH2Bはそれぞれ細胞質、核、クロマチン画分のマーカータンパク質として検出した。(b)(c) Δ N1001、 Δ C1645もしくはTET3 CD mutを発現させ、(a)と同様の実験を行った。得られたバンドの密度はQuantity Oneを用いて解析した(各右図)。エラーバーは標準偏差を示す。

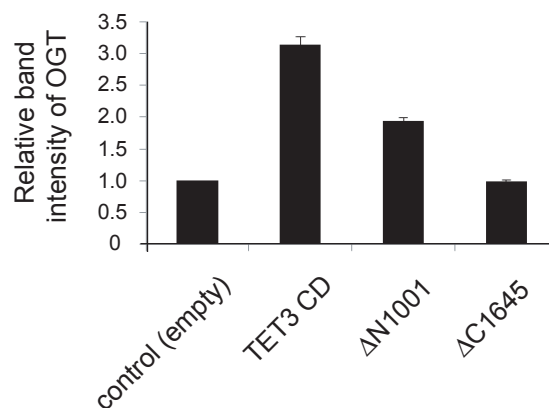
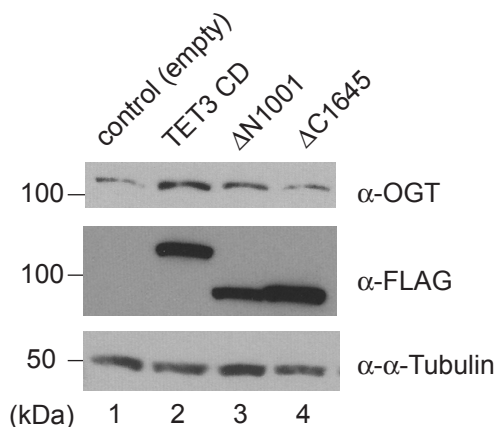
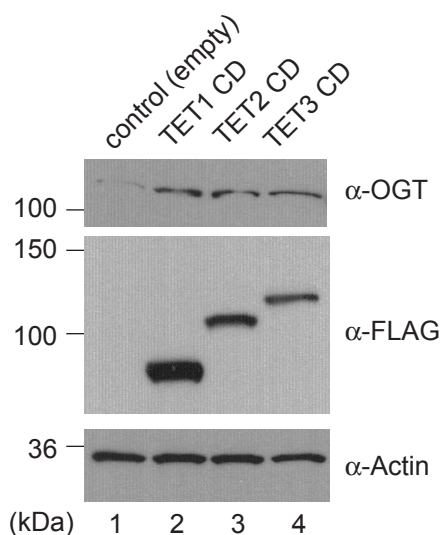
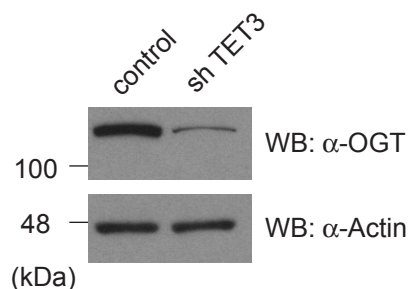
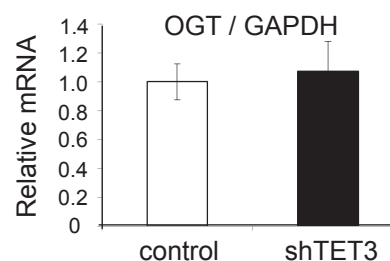
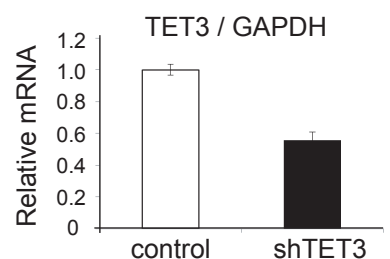
a**b****c**

Fig.2-14 TET3はOGTタンパク質の発現を増加させる

(a) TET3のOGTタンパク質発現への影響 TET3 CD、 Δ N1001、 Δ C1645を発現させた293T細胞から全細胞抽出液を抽出し、ウエスタンブロッティングによりOGTの発現量を解析した(左図)。またFig.2-13と同様にバンド密度を測定した(右図)。(b) TET CD間におけるOGT発現増強の保存性 TET1 CD、TET2 CD、TET3 CDを用いて(a)と同様の実験を行った。(c) TET3発現抑制のOGT発現量に対する影響 レンチウイルスベクターを用い、TET3に対するshRNAを293T細胞に発現させた。mRNA発現量、タンパク質発現量をそれぞれRT-qPCR(上図)、ウエスタンブロッティング(下図)により解析した。

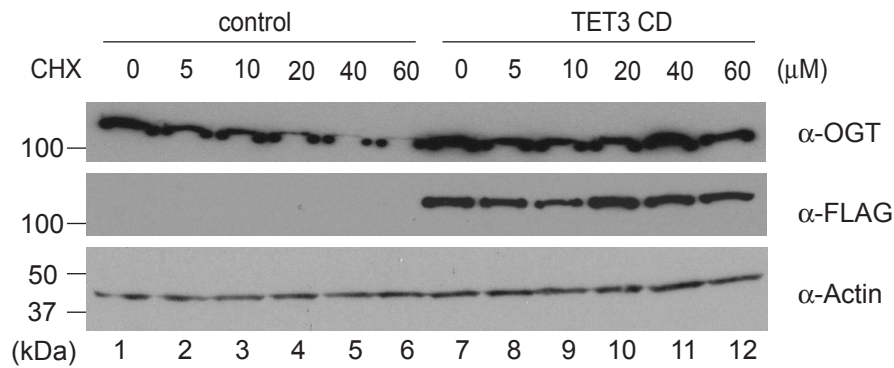
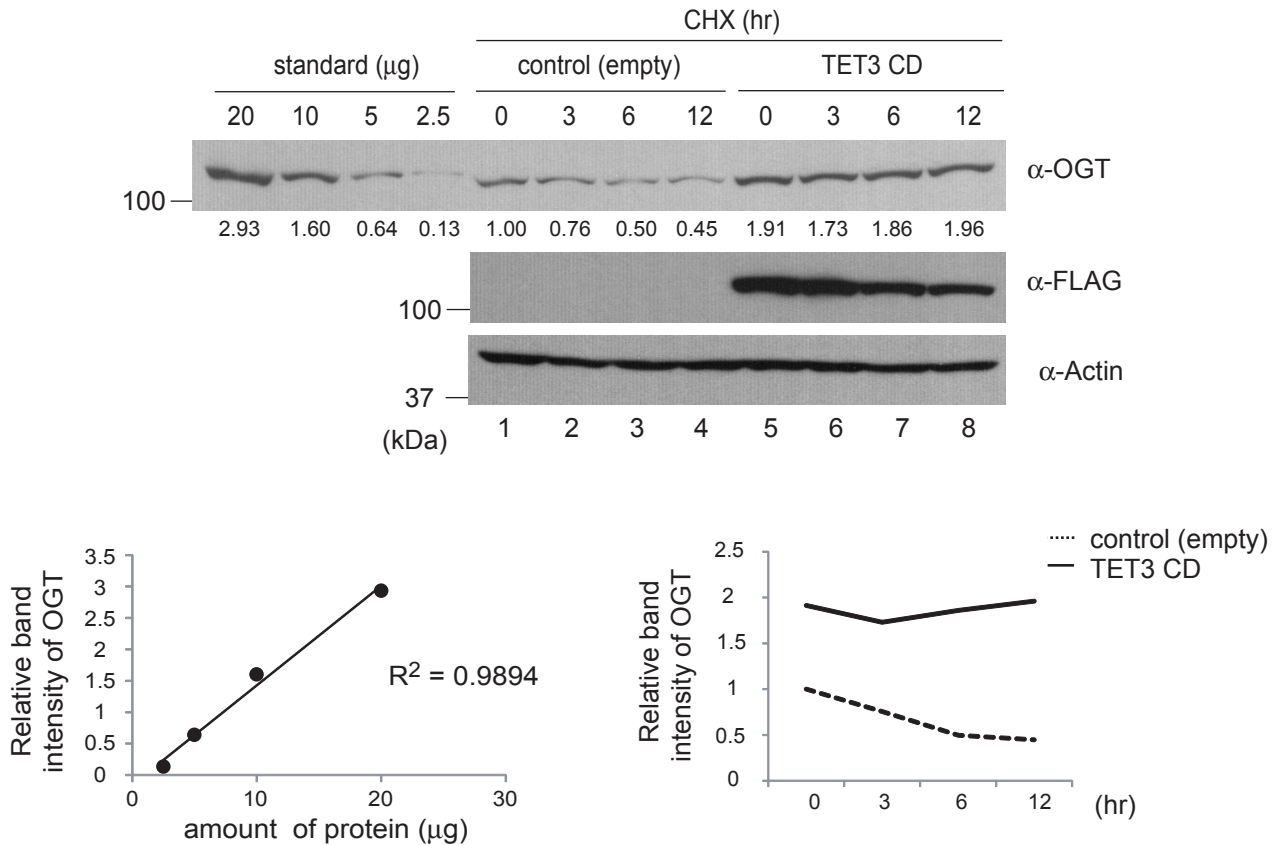
a**b**

Fig.2-15 TET3はOGTタンパク質の安定化に寄与する

(a) TET3によるOGTタンパク質の安定化 TET3 CDを発現させた293T細胞に各濃度のシクロヘキサミド (CHX) を3時間処理し、抽出液を用いてウエスタンブロッティングを行い、OGTタンパク質の発現量を解析した。(b) (a)と同様にして40μM シクロヘキサミドを各時間処理し、解析した。バンド密度はImage Jを用いて測定し、得られた測定値を図の下に示した(上図)。また、それらの値をグラフ化した(下図)。

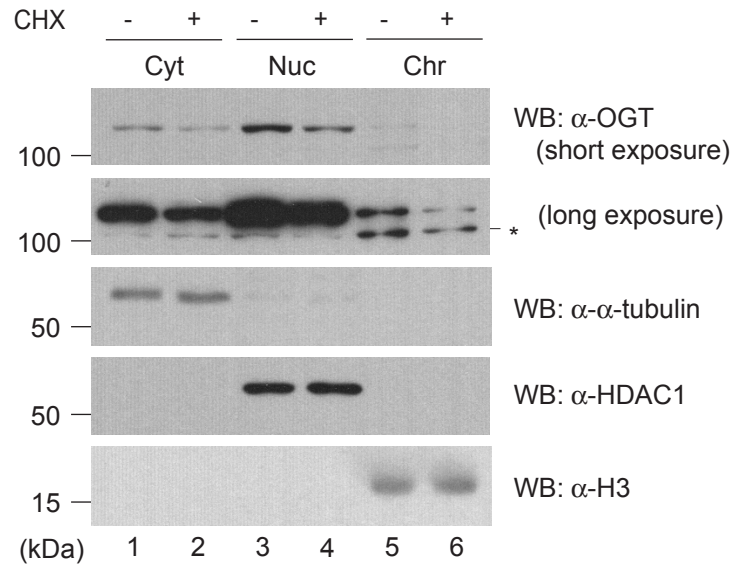


Fig.2-16 OGTタンパク質の発現量とクロマチン局在量の相関
 293T細胞に40 μ M シクロヒキシミドを12時間処理し、細胞質、核、クロマチン画分を抽出した。得た抽出液をウエスタンブロッティングにて解析し、OGTの局在量を検出した。

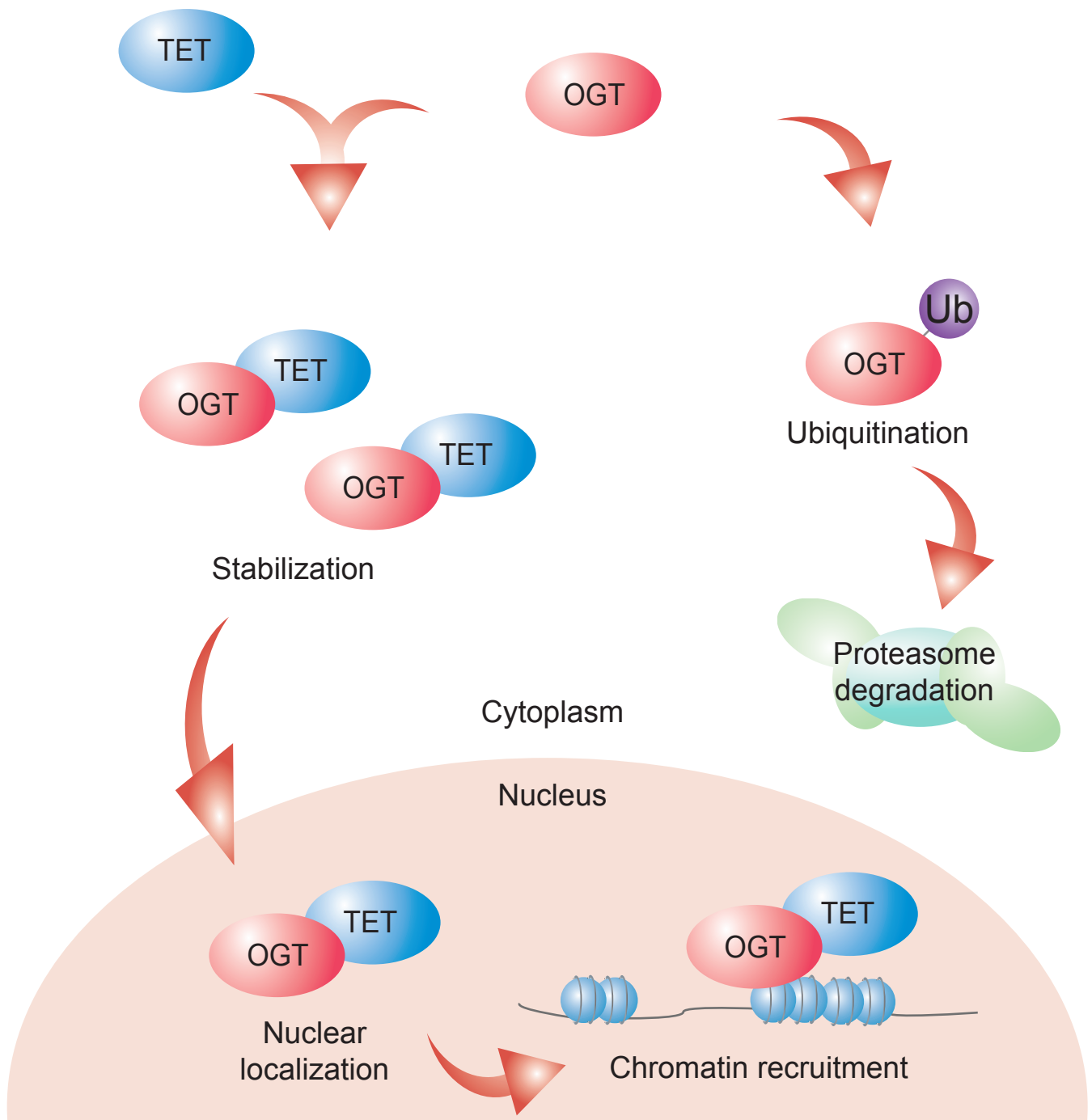


Fig.2-17 TET3によるOGTのクロマチンリクルート亢進の作用機序
 OGTはユビキチン修飾を受け、タンパク質発現が調節されていることが示唆されている (Science 337, 1541-6 (2012))。本章より、TET3はOGTタンパク質の安定性に寄与し、発現量の調節を介してOGTのクロマチンリクルートを亢進することが明らかとなった。

第三章 軟骨細胞分化における TET の発現解析、 及び TET1 の機能解析

第一節 緒言

最近同定された TET は徐々に生体内における役割が明らかにされつつある。特に、それぞれの遺伝子のノックアウトマウスをモデルとした研究が進んでおり、それらの成果が報告されている。TET1 欠失マウスはそれまで必要であるとされていた幹細胞の多能性維持には必須でないことを示し、また、TET1 を欠失することにより体長が小さくなることが報告された(84)。TET2 欠失マウスは外見上に野生型との差は見られないが、造血幹細胞の自己増殖能を上昇し、正常な分化能が失われていることが報告されている(41-44)。また、TET3 欠失マウスは新生児致死性を示すことが明らかにされており、卵細胞における TET3 の欠失は受精時の雄性 DNA の脱メチル化が起こらず、正常な発生が阻害されていることが報告されている(46)。

一方、古くから DNA のメチル化環境が細胞の分化に深くかかわっていることが報告されている。特に間葉系幹細胞からの脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞への分化制御にはメチルシトシンが重要な調節要因である(57,58)。しかしながら、昨今新しく提唱されている TET によるメチルシトシン水酸化反応の概念とメチル化 DNA により制御される細胞分化概念、この 2 つの概念の関わりは未だ不明なままである。本章では、培養細胞の分化系をモデルとして用い、TET の生理的な機能を解析することを目的とした。

第二節 材料と方法

第一項 材料

1. プラスミド

pRetroX-Tight-pur-FLAG ;	pRetroX-Tight-pur ベクターに FLAG タグを挿入したもの。
pRetroX-Tight-pur-FLAG-TET3 CD ;	pRetroX-Tight-pur-FLAG ベクターにヒト TET3 の触媒領域 (832- 1803 a.a.)を挿入したもの。
pRetroX-Tet-On-Advanced ;	Tet リプレッサーと VP16 転写活性化ドメインの融合タンパク質を発現する。
CS-RfA-EG-control ;	CS-RfA-EG ベクターにいずれの遺伝子も標的にしない配列を挿入したもの。CS-RfA-EG-shTET1 とともに東京大学分子細胞生物学研究所ゲノム情報解析研究分野藤木克則博士より御供与いただいた。
CS-RfA-EG-shTET1 ;	CS-RfA-EG ベクターにマウス TET1 遺伝子を標的とする shRNA 配列を挿入したもの。
pCAG-HIVgp ;	第二章参照。
pCMV-VSV-G-RSV-Rev ;	第二章参照。

2. 抗体

抗 TET1 抗体 (Millipore, 09-872)、抗 TET2 抗体 (Sigma, SAB2501479)、抗 Col 2 抗体 (Santa Cruz, sc-7764)、抗 5mC 抗体 (Activemotif, 39649)。抗 OGT 抗体、抗 Actin 抗体、抗 5hmC 抗体、抗 FLAG 抗体は第二章参照。

3. プライマー-DNA

マウス TET1、 forward ; 5'-GAGCCTGTTCCTCGATGTGG-3'

reverse ; 5'-CAAACCCACCTGAGGCTGTT-3'
マウス TET2、 forward ; 5'-AACCTGGCTACTGTCATTGCTCCA-3'
reverse ; 5'-ATGTTCTGCTGGTCTCTGTGGGAA-3'
マウス TET3、 forward ; 5'-TCCGGATTGAGAAGGTCATC-3'
reverse ; 5'-CCAGGCCAGGATCAAGATAA -3'
マウス PPAR α 、 forward ; 5'-GCCTGCGGAAGCCCTTTGGT-3'
reverse ; 5'-CAGCAAGCCTGGGCGGTCTC-3'
マウス Adiponectin、 forward ; 5'-CAAGGCCGTTCTCTTCACCTAC-3'
reverse ; 5'-TCCCCATCCCCATACACCT-3'
マウス GAPDH、 forward ; 5'-AAATGGTGAAGGTGCGGTGTG-3'
reverse ; 5'-TGAAGGGGTGCTTGATGG-3'
マウス Myogenin、 forward ; 5'-CTACAGGCCTTGCTCAGCTC-3'
reverse ; 5'-AGATTGTGGGCGTCTGTAGG-3'
マウス Col 2、 forward ; 5'-AGGGCAACAGCAGGTTCCACATAC-3'
reverse ; 5'-TGTCCACACCAAATTCCTGTTCA-3'
マウス Col 10、 forward ; 5'-CTTCATCCCATACGCCATAAAGA-3'
reverse ; 5'-GCTGATATTCCTGGTGGTCCTG-3'
マウス Col 10 promoter、 forward ; 5'-TTTTGTACGCCTGCCCGTTA-3'
reverse ; 5'-TGGATAATGCCTTCCCCACG-3'

第二項 方法

1. 細胞培養、分化誘導

3T3-L1 細胞は DMEM high glucose (Wako) に 10 % FBS、及び 1 % Anti-Anti (Gibco) を加えたもの、C2C12 細胞は DMEM に 20 % FBS、及び 1 % Anti-Anti を加えたもの、C3H10T1/2 細胞は DMEM に 10 % FBS、及び 1 % Anti-Anti を加えたものを用いて培養した。各細胞の培養は 37 °C、5 % の CO₂ 雰囲気下において行った。各細胞は分化能の低下を防ぐため、低密度で維持し 2、3 日に 1 回の割合で継代培養した。また、同様の条件下で PLAT-E 細胞を DMEM に 10 % FBS、1 μ g/ml ピューロマイシン、10 μ g/ml ブラスタサイジン加えた培地を用いて培養した。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化は既報の論文を参考に一部改変して行った(85)。30 %コンフルエントになるように細胞を播種し、約 3 日かけて 100 %コンフルエントになるまで培養した。さらに 2 日間 100 %コンフルエントの状態を続け、次に、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン (Takara)、2.5 μM デキサメタゾン (Takara)、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン (Takara)、10 mM トログリタゾンを含む培地に置換した。3 日間培養した後、継代培養に使用した DMEM high glucose 培地に戻し、培養を続けた。

C2C12 細胞は 50 %コンフルエントになるように細胞を播種し、3 日間培養した。100 %コンフルエントになった細胞は、培地を 0.5 % FBS を含む DMEM に置換し培養を続けた。

C3H10T1/2 細胞の軟骨細胞分化は、既報の論文を参考に、マイクロマス培養法を行った(86,87)。細胞を 10^7 個/ml の濃度で用意し、24 ウェルプレートの各ウェルの中央へ 10 μl (10^5 個) ずつ播種した。この時気泡が入らないように注意し、また、できるだけ滴下した細胞懸濁液が正円を描くようにした。37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間培養し、接着させた後、0.1 mg/ml BMP 2、10 % FBS、1 % Anti-Anti を含む DMEM high glucose 培地を加えた。以降は 2 日ごとに新鮮な培地に交換した。このとき、BMP 2 は加え続けた。回収の際は、中心部の分化の進んだ細胞のみを回収するように注意した。

2. RNA 抽出、RT-(q)PCR

RNA 抽出、RT-qPCR は第二章参照。RT-PCR では、反応産物は臭化エチジウムを含む 2%アガロースゲルにて電気泳動し、紫外線を照射し検出、撮影した。

3. アルシアンブルー染色

軟骨細胞へと分化誘導した細胞は一度 PBS にて洗浄し、固定 buffer (4 %パラホルムアルデヒド、3.75 mM NaOH を含む PBS)を加えて 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下で一晩以上静置した。固定した細胞は 0.1 M 塩酸で 2 回洗浄した後、染色 buffer (0.04 M 塩酸、5 mg/ml アルシアンブルー (Sigma)を含む PBS)を加え、室温で 30 分間静置した。再び 0.1 M 塩酸で 2 回洗浄し、室温で乾燥させた。乾燥させたサンプルはデジタルカメラで撮影した。

4. 軟骨細胞からのタンパク質抽出、ウエスタンブロッティング

軟骨細胞からのタンパク質抽出は、第二章記載の全細胞抽出液調製法にて行った。また、ウエスタンブロッティングは第二章参照。

5. ゲノム DNA 抽出、ドットブロッティング

第二章参照。

6. 5-hydroxymethylated DNA immunoprecipitation (5hMeDIP)法

5hMeDIP 法は分子細胞生物学研究所分子情報研究分野高井弘基氏より手技を御教示いただいた。まず、軟骨細胞からゲノム DNA を抽出した。得た DNA 4 μ g を IP buffer (10 mM リン酸ナトリウム、140 mM NaCl、0.05 % Triton X-100、pH 7.0) 中に溶解させ、抗 5hmC 抗体 3 μ g を加え 4 $^{\circ}$ C 条件下で一晩転倒混和させた。IP buffer で 3 回洗浄し、平衡化した Protein G Dynabeads (Life Technologies) を加え、再び 4 度条件下で 2 時間転倒混和させた。IP buffer で 3 回洗浄した後、Elution buffer (0.2 mg/ml Proteinase K を含む IP buffer) を加え、55 $^{\circ}$ C で 3 時間振盪した。上清回収後、再び Elution buffer を加え、55 $^{\circ}$ C で 30 分間振盪した。回収した上清は 1 つにまとめ、フェノール-クロロホルム処理をした後、エタノール沈殿を行った。得た DNA は TE buffer に溶解させ、リアルタイム PCR による定量を行った。リアルタイム PCR に関しては第二章参照。

7. Tet-on システムを用いた TET3 CD 発現細胞株の作製

レトロウイルスのパッケージング細胞である PLAT-E 細胞に pRetroX-Tet-On-Advanced、pRetroX-Tight-pur-FLAG、もしくは pRetroX-Tight-pur-FLAG-TET3 CD をトランスフェクションし、翌日、新鮮な培地に交換した。さらに 24 時間培養後、それぞれの上清を回収し 1,000 rpm、室温、5 分間遠心分離した。その上清に終濃度 5 % になるように FBS を加え、ウイルス液 (Tet-On-Advanced、FLAG、FLAG-TET3 CD) とした。C3H10T1/2 細胞懸濁液に Tet-On-Advanced と FLAG、もしくは FLAG-TET3 CD のウイルス液を混合して加え、さらに終濃度 40 μ g/ml になるようにポリブレンを加えた後、1000 \times g、室温条件下で 2 時間遠心分離した。沈殿した細胞を再び懸濁し、シャーレへ播種した。翌日、培地を新しいものに交換し、1 μ g/ml ピューロマイシン、1 mg/ml G418

を加え、培養した。puromycin、G418を加えた培地で一週間以上培養した後に各解析に用いた。TET3 CDの発現誘導にはドキシサイクリンを4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で用いた。軟骨細胞分化実験に用いた各細胞株は、分化誘導の2日前からドキシサイクリンを加えて培養した。

8. レンチウイルスを用いた shRNA 導入株の作製

第二章参照。

第三節 結果

第一項 細胞分化における TET 遺伝子発現の挙動

細胞の表現型決定とエピゲノム制御は非常に密接な関わりを持つことが示唆されており、特に DNA のメチル化環境と細胞分化の関わりは良く研究されている。例えば、DNA メチル化酵素 DNMT3a 及び DNMT3b の欠失はマウス胎児の発生に重大な欠陥が生じる (21)。また、マウス繊維芽細胞 C3H10T1/2 細胞に DNMT 阻害剤 5-Aza を処理すると脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞に分化することが報告されている (57,58)。しかしながら、最近になって提唱されているメチル化 DNA の水酸化反応が細胞分化に対しどのような役割を果たしているのかは明らかになっていない。そこで、本研究では培養細胞の分化系を用い、TET が細胞分化においてどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。

TET の制御下にある細胞では、TET 自体が十分に発現していることが予想される。そこで、まずは TET の発現亢進が見られるような細胞分化系の探索を試みた。はじめに、マウス繊維芽細胞 3T3-L1 をインスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン、及びトログリタゾンを加え脂肪細胞分化を誘導した。分化誘導 3 日目では微小な脂肪滴が蓄積され、6 日目にはその脂肪滴の顕在化が観察できた。各時期の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、分化誘導 3、6 日目には脂肪細胞分化のマーカーとなる Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) やアディポネクチン (Adiponectin) の顕著な発現上昇が見られた (Fig. 3-1a)。さらに、TET 遺伝子の発現を解析した結果、TET1、及び TET2 は分化誘導 3、6 日目にのみ検出され、TET3 は分化前から検出されたが、分化 6 日目においては発現が減少していた。

次に、マウス骨格筋由来細胞 C2C12 細胞を低血清条件下 (0.5 % FBS) で培養することで筋細胞へと分化誘導した。分化誘導 3 日目から細胞の凝集が見られ始め、9 日目には筋管様の構造を形成していた。これらの細胞を用い RNA 抽出、RT-PCR を行った。その結果、誘導 6 日目には筋分化マーカーとして知られるマイオジェニン (Myogenin) の発現が上昇していた (Fig. 3-1b)。TET1 は分化誘導前から検出することができたが、誘導 9 日目では検出できなかった。TET2 は誘導 6 日目に一過的な発現上昇が見られたが、9 日目には検出できなくなっていた。TET3 は分化に関わらず、安定的に検出することができた。

また、マウス繊維芽細胞 C3H10T1/2 は BMP 2 を用いたマイクロマス培養法にて軟骨細胞へと分化誘導した。分化した細胞を用いて RT-PCR を行った結果、分化マーカーである II 型コラーゲン (Col 2)、X 型コラーゲン (Col 10) の発現が上昇していることを確認した (Fig. 3-1c)。また、TET1、TET2 は分化前には検出できなかったが、誘導 5、9 日目では検出することができた。逆に、分化前に検出できた TET3 は分化後には検出することができなかった。

第二項 軟骨細胞分化における TET の発現変動

TET 発現の挙動を解析した結果、脂肪細胞分化、及び軟骨細胞分化において TET1、TET2 の発現が上昇することが明らかとなった (Fig. 3-1)。また、これまでに報告されているノックアウトマウスの表現型において、TET1 欠失マウスと TET2 欠失マウスは両者とも正常に生み出されるが、特に TET1 欠失マウスでは体長が減少することが報告されている (84,88)。体長の決定因子として軟骨形成が重要であることが知られており、例えば、軟骨細胞分化調節の中心分子の一つである Runx 2 の欠失マウスでは体長の低下が見られ、この表現型は軟骨細胞から骨細胞への置換が破綻していること起因している (65,66)。このような報告と今回の結果を鑑み、本研究では軟骨細胞分化に着目し以降の解析を行った。

軟骨細胞は間葉系幹細胞に由来し、凝集した間葉系幹細胞は静止軟骨細胞へと分化する。さらに増殖軟骨細胞を経て、肥大軟骨細胞へと分化が進む。これら軟骨細胞はコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸などの酸性ムコ多糖類やコラーゲン繊維などを分泌することが知られており、このうち酸性ムコ多糖類はアルシアンブルー色素を用いた染色が可能である。実際に C3H10T1/2 細胞をマイクロマス培養法で培養すると、培養時間に従いアルシアンブルーによる染色域の拡大が見受けられた (Fig. 3-2a)。このように軟骨細胞に分化させた細胞を回収し、RT-qPCR による遺伝子発現変動を解析した。その結果、増殖軟骨細胞で特異的に発現するとされている Col 2 は分化誘導 9 日目に発現のピークが見られ、肥大軟骨細胞で特異的に発現するとされている Col 10 は分化誘導 12 日目にピークが見られた (Fig. 3-2b、上図)。同様にして、TET 遺伝子の発現を解析した結果、TET1 は分化に伴い発現が上昇し、特に分化 9 日目にピークが見られた (左下図)。TET2 も同じく分化に伴い発現が上昇したが (中央下図)、発現のピークは分化 12 日目であった。また、TET3 は分化に伴い発現の低下が見られた (右下図)。

次に、これまでに明らかとなった軟骨細胞分化に伴う TET 遺伝子の mRNA 発現変動が、実際にタンパク質レベルでも起こっている現象なのかを検証した。軟骨細胞の抽出液を用いてウエスタンブロッティングにより解析した結果、分化誘導 9、12 日目に Col 2 タンパク質の発現を確認した (Fig. 3-2c)。TET1 タンパク質は分化 6 日目から発現が増加し始め、9、12 日目において顕著に増加していた。TET2 も TET1 同様、6 日目から検出され始め、9、12 日目において発現量の増加が見出された。また、第二章において TET2、及び TET3 と OGT 複合体を同定し、それら機能相関を予想した。さらに、軟骨細胞分化において GlcNAc 修飾は分化開始の引き金になるとされ、マウス奇形腫由来の ATDC5 細胞を軟骨細胞に分化させると OGT タンパク質の発現が上昇することが報告されている(89)。そのような知見を元に、軟骨細胞において発現上昇する TET2 と OGT が複合体を形成していることを予想し、まず C3H10T1/2 細胞の軟骨細胞分化における OGT の発現変化を検討した。しかしながら、ATDC5 細胞とは異なり、C3H10T1/2 細胞の軟骨細胞分化においては OGT タンパク質の発現は、分化に伴い減少することが明らかとなった。この結果から、TET2 と OGT が協調的に機能する可能性は低いと考えられた。

第三項 軟骨細胞分化に伴う DNA メチル化環境の変化

これまでの結果より、軟骨細胞分化に伴い mRNA レベル、タンパク質レベルの両方で TET1、TET2 が上昇することが見出された。そこで、軟骨細胞分化に伴う DNA メチル化環境の変化を解析した。軟骨細胞に分化させた C3H10T1/2 細胞から DNA を抽出し、抗 5mC 抗体、抗 5hmC 抗体を用いたドットブロッティングにより解析した。その結果、分化に伴い、ゲノム DNA 中に含まれる 5hmC が顕著に増加していることを見出した (Fig. 3-3a、上図)。また、5mC 量はわずかに減少していた (Fig.3-3a、下図)。

これまで、Col 10 プロモーター上における一部の CpG 配列において、軟骨細胞分化に伴いメチル化修飾が除去されることが報告されている(68)。この報告と本研究で明らかとなった分化に伴い 5hmC が増加する点を鑑みると、軟骨細胞分化に伴い、TET により 5mC が水酸化されて 5hmC へと置換され、メチル基が除去されている可能性が考えられた。そこで Col 10 プロモーターにおける 5hmC の存在の有無を検証した。方法としては、分化/未分化細胞のゲノム DNA を用い、5hMeDIP 法を用いた。抗 5hmC 抗体を用いて濃縮した 5hmC を含む DNA 断片を鋳型とし、Col 10 プロモーター近傍のプライマー配

列を設計し、リアルタイム PCR を行った。その結果、未分化細胞の DNA ではネガティブコントロールサンプルと抗 5hmC 抗体の免疫沈降産物の間で、シグナル強度の差は見られなかった (Fig. 3-3b)。それに対し、分化 12 日目の軟骨細胞の DNA を用いると抗 5hmC 抗体を用いたサンプルにおいて、顕著なシグナルの増加が見出すことができた。

第四項 軟骨細胞分化における 5hmC の役割

以上より、軟骨細胞分化に付随する Col 10 遺伝子発現上昇の際、そのプロモーターのメチルシトシンは水酸化されていることが示された。この結果は遺伝子発現とプロモーター上の 5hmC 量に相関があることを示唆しており、5hmC が軟骨特異的遺伝子の転写量を上昇させ、軟骨細胞分化を促進させていることが予想された。そこで、メチルシトシン水酸化の軟骨分化への影響を調べるため、5hmC を人工的に導入した細胞に分化刺激を与え、軟骨分化程度、及びマーカー遺伝子の発現を解析した。5hmC の導入には TET3 CD を C3H10T1/2 細胞に異所的に発現させた。このとき 5hmC が軟骨分化に影響すると仮定すると、恒常的に TET3 CD が発現していると細胞株では分化状態が変化する可能性が考えられた。そこで、ドキシサイクリン (Dox) により発現が誘導される Tet-on システムを用いた。Tet-on-TET3 CD 及び、Tet リプレッサー-VP16 転写活性化ドメインを発現させた細胞は、ドキシサイクリンを添加することで TET3 CD を発現することをウエスタンブロットティングにより確認した (Fig. 3-5a)。また、同様に処理した細胞のゲノム DNA を抽出し、ドットブロットティングにより 5hmC 含量が増加していることを示した (Fig. 3-5b)。この細胞株は分化刺激を与えない状態では細胞形態やアルシアンブルー染色程度に差は見られなかった (Fig. 3-4c)。また、この細胞株に BMP 2 による分化刺激を与え、分化程度をアルシアンブルー染色により解析した。その結果、5hmC の含量に関わらず分化程度に変化はみられなかった。次に、RT-qPCR により TET3 CD、及び分化マーカーである Col 2 の発現量を定量した。その結果、TET3 CD の発現は培養日数に従い減少するもののコントロールに対し増加していることを確認した (Fig. 3-4d、左図)。TET3 CD の発現低下はマイクロマス培養法に起因すると考えられる。マイクロマス培養法では、細胞を過密条件下で培養するため、ドキシサイクリンによる TET3 CD の誘導が不完全なものになったことが推測される。また、Col 2 の発現量はコントロールと TET3 CD 発現サンプルの間に差は見られなかった (Fig. 3-4、右図)。以上の結果から、5hmC は軟骨細胞分化やそれに伴う遺伝子発現制御に影響を与えないことを示唆するものであった。

第 5 項 軟骨細胞分化における TET1 の役割

TET1 によるエピゲノム制御には複数のメカニズムの存在が報告されている。メチルシトシンの水酸化とそれに伴う脱メチル化による転写活性化の他、NCoR 複合体との相互作用を介したヒストン脱アセチル化や(70)、NuRD 複合体を介したクロマチンリモデリングによる転写抑制機構が既に報告されている(71)。これらのような知見から、軟骨細胞分化においても TET1 はメチルシトシンの水酸化以外のメカニズムで機能している可能性を考え、検証した。TET1 の発現を shRNA により抑制し、細胞分化への影響を解析した。shRNA を恒常的に発現する細胞株を作製し、分化刺激を与えた結果、アルシアンブルー染色程度に差は見られなかった (Fig. 3-5a)。しかしながら、これらの細胞から RNA を抽出し RT-qPCR を行った結果、TET1 に対する shRNA を発現する細胞では、Col 2、Col 10 の発現が上昇する傾向にあることが見出された (Fig. 3-5b、中図、下図)。これらの結果から、TET1 は少なくとも軟骨細胞の分化マーカーである Col 2、Col 10 遺伝子の発現に関与していることが考えられた。これらの影響がアルシアンブルー染色による解析で見られなかった原因としては、shRNA による TET1 の発現抑制が不完全であった可能性が挙げられる (Fig. 3-5b、上図)。

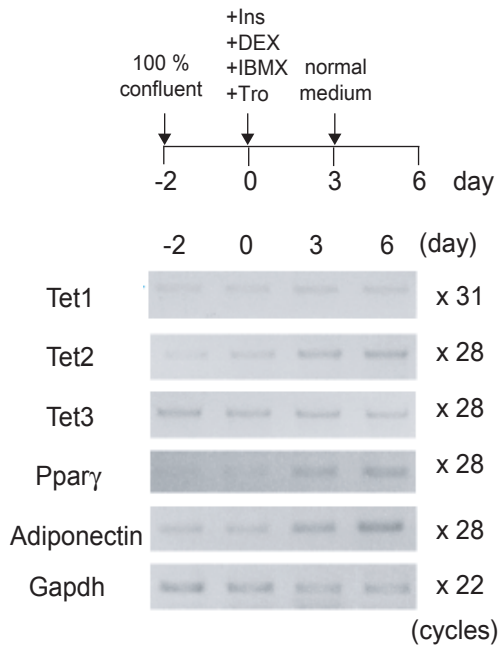
第四節 小括

本章では、細胞分化とメチルシトシン水酸化の関連性を、培養細胞系を用いて解析した。はじめに、脂肪、筋、軟骨細胞分化におけるメチルシトシン水酸化酵素 TET の発現解析を行った。その結果、脂肪細胞、および軟骨細胞分化において TET 遺伝子の発現上昇を認めることができた(Fig. 3-1, 2)。脂肪細胞と 5hmC の関係は最近報告されているが(90)、軟骨細胞分化とメチルシトシン水酸化の関係性は未だ報告されていないものである。

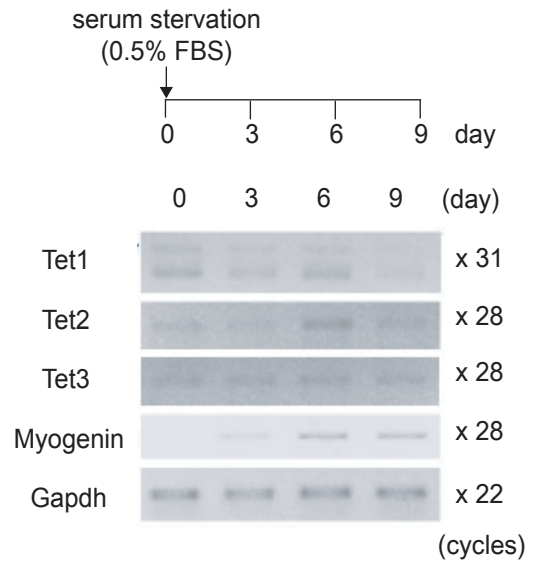
次に、軟骨細胞中のゲノム DNA に含まれる 5hmC 量の変動を解析した。その結果、軟骨細胞分化に伴い、5hmC 量の顕著な増加が見出された(Fig. 3-3)。特に、分化に伴い脱メチル化されることが報告されている Col 10 プロモーターでは、メチルシトシンの水酸化が行われていることが示唆された。しかしながら、人為的に 5hmC を導入した培養細胞では軟骨細胞への分化誘導能に変化は見られなかった(Fig. 3-4)。

また、TET1 の発現量を低下させた細胞の解析から、TET1 は分化マーカーである Col 2、Col 10 の遺伝子発現を抑制している可能性が示唆された(Fig. 3-5)。これらの結果から、軟骨細胞分化において TET1 はメチルシトシンの水酸化活性に依存しない機構により標的遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

a adipocyte differentiation



b muscle differentiation



c chondrocyte differentiation

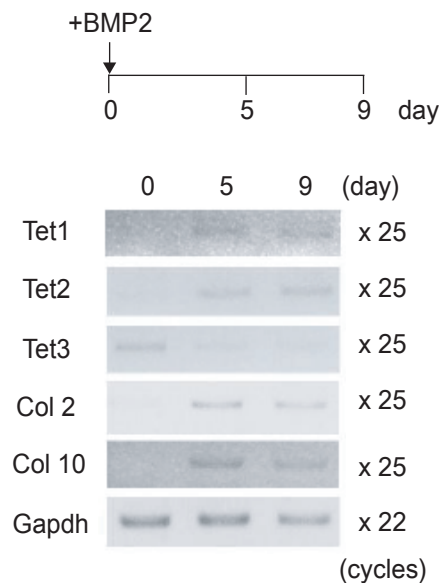


Fig.3-1 脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞分化におけるTet遺伝子の発現変動

(a) 脂肪細胞分化 3T3-L1細胞をインスリン (Ins)、デキサメタゾン (DEX)、イソブチルメチルキサンチン (IBMX)、およびトログリタゾン (Tro)を用いて脂肪細胞へと分化させ、RT-PCRを行った。Adiponectin、PPAR γ は分化マーカーとして検出した。また、インターナルコントロールとしてGAPDHを検出した。(b)筋細胞分化 C2C12細胞に低血清刺激(0.5 % FBS)を与えて筋細胞へと分化させ、RT-PCRを行った。Myogeninは分化マーカーとして検出した。(c) 軟骨細胞分化 C3H10T1/2細胞をBMP 2を用いたマイクロマス培養法により軟骨細胞へと分化させ、RT-PCRを行った。Col 2、Col 10は分化マーカーとして検出した。

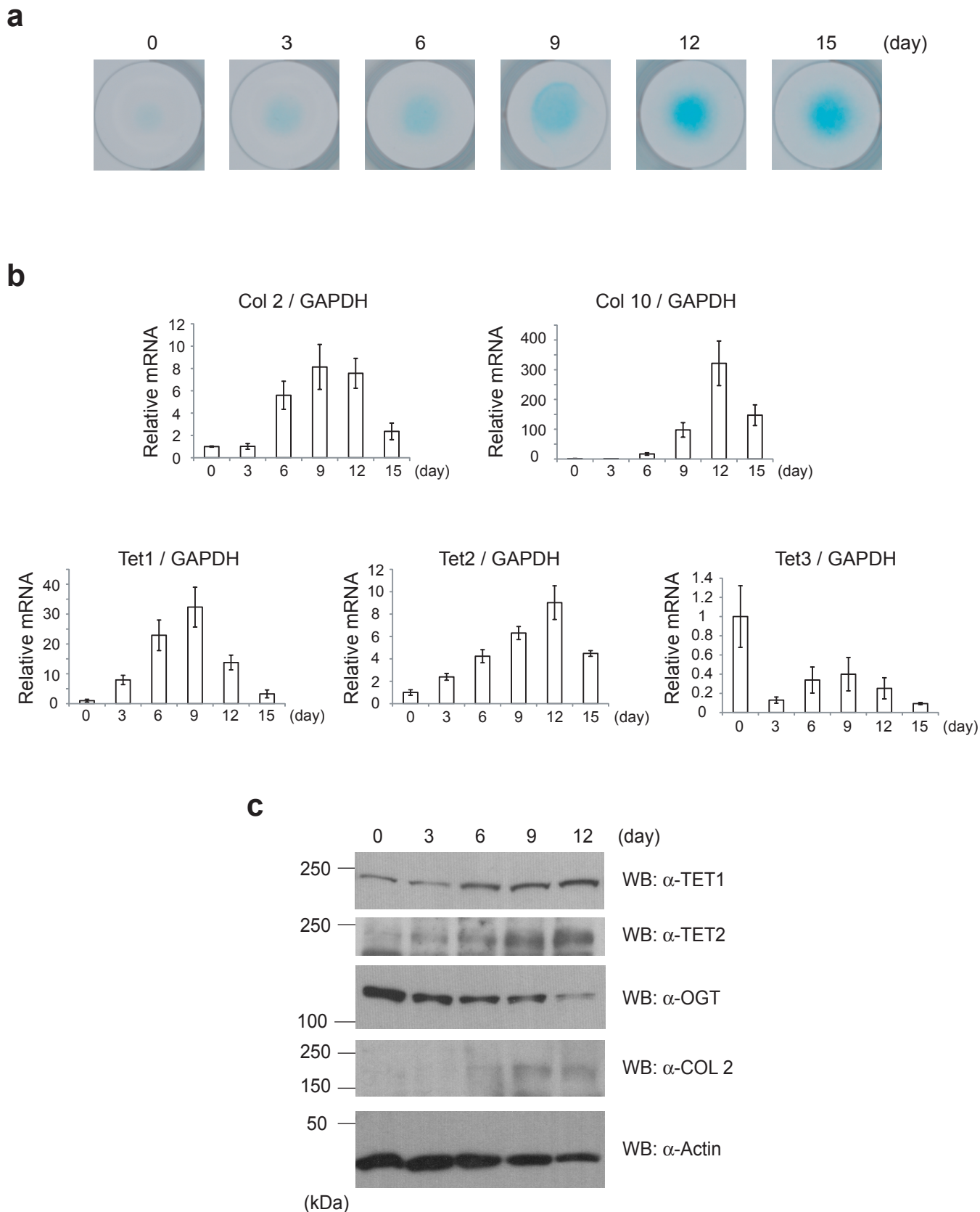


Fig.3-2 軟骨細胞分化におけるTet発現変動の詳細な解析

(a) アルシアンブルー染色 軟骨細胞分化させたC3H10T1/2細胞を用いてアルシアンブルー染色を行った。(b) 軟骨細胞分化時のTet遺伝子発現の解析 (a)と同様に処理した細胞を用いてRT-qPCRを行った。インターナルコントロールにはGapdhを用いた。(c) 軟骨細胞分化時のTETタンパク質の発現解析 (a)と同様に処理した細胞から抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングを行った。

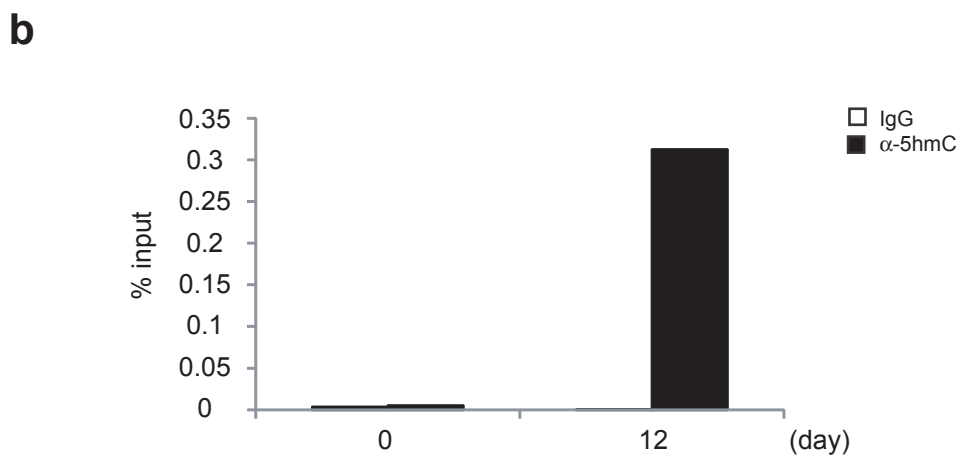
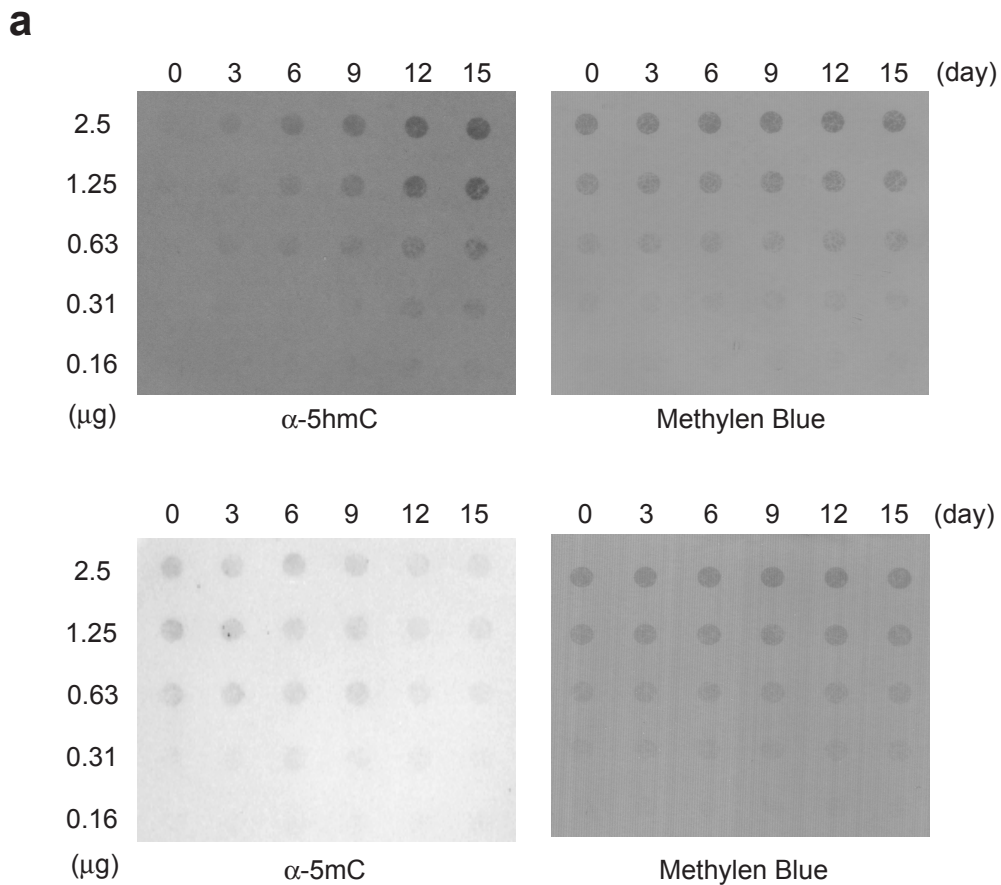
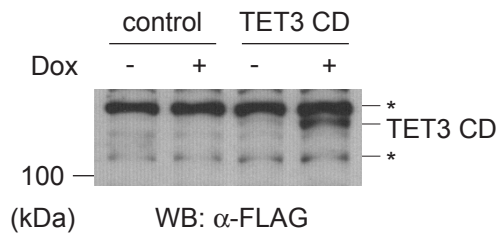
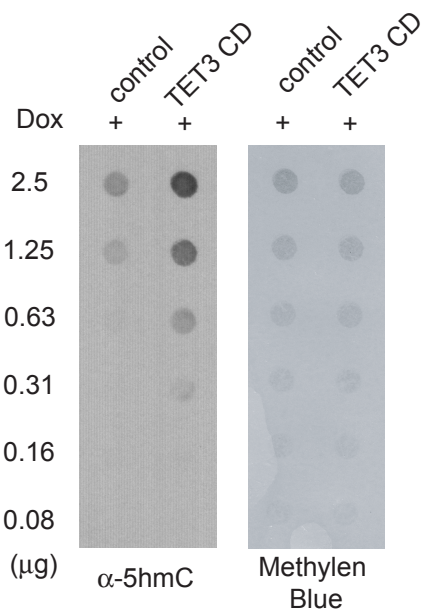
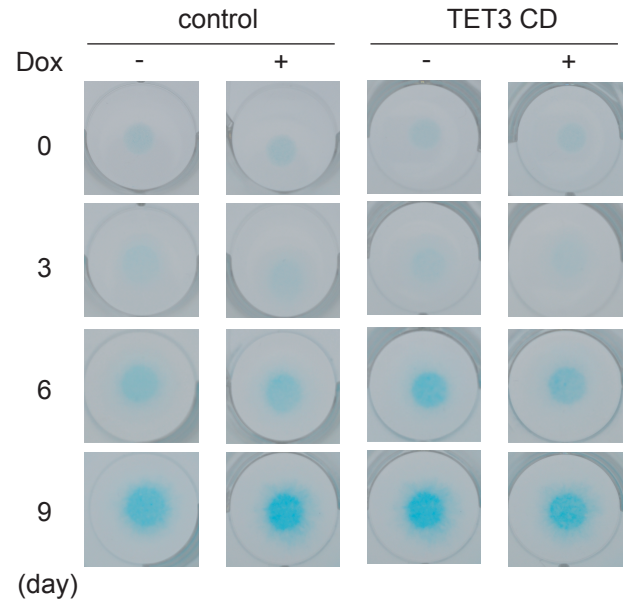
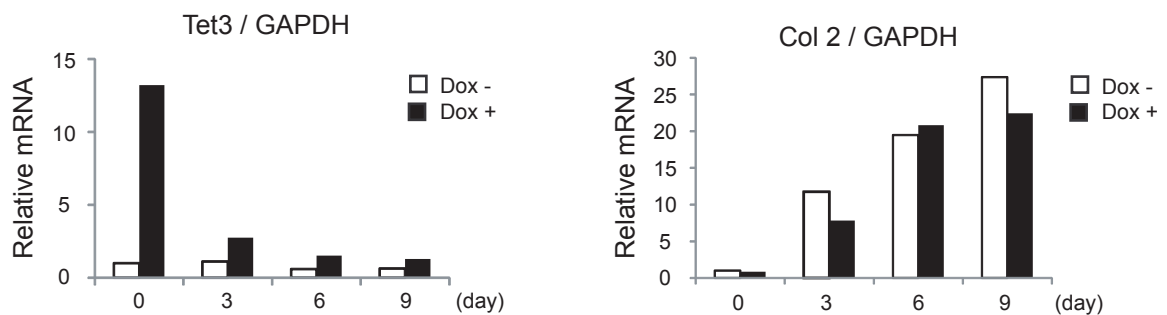


Fig.3-3 軟骨細胞分化に伴う5hmC量の変化

(a) 軟骨細胞へと分化誘導したC3H10T1/2細胞からゲノムDNAを抽出し、ドットブロッキングにより5hmC、5mC含量を解析した。DNAのローディングコントロールとしてメチレンブルー染色を行った。(b) Col 10プロモーター上の5hmCは分化に伴い増加する。軟骨細胞分化の誘導前後のC3H10T1/2細胞からゲノムDNAを抽出し、5-hydroxymethyl DNA immunoprecipitation (5hMeDIP)法を行い、Col 10プロモーター上における5hmCの含量を解析した。

a**b****c****d****Fig.3-4 軟骨細胞分化に対する5hmCの影響**

(a) Tet-onシステムを用いたTET3 CDの発現誘導 C3H10T1/2細胞を元にドキシサイクリン (Dox) 誘導性TET3 CD発現株を作製した。発現誘導時のTET3 CDをウエスタンブロッティングにて確認した。*は非特異的なバンドを示す。(b) TET3 CD発現誘導時の5hmC量 TET3 CDを発現誘導した際の5hmC含量をドットブロッティングにて解析した。(c) 軟骨細胞分化に対する5hmC量増加の影響 5hmC量を増加させた条件下で軟骨細胞分化を誘導した。その分化程度をアルシアンブルー染色にて解析した。(d) (c)と同様に処理した細胞を用いてRT-qPCRを行った。

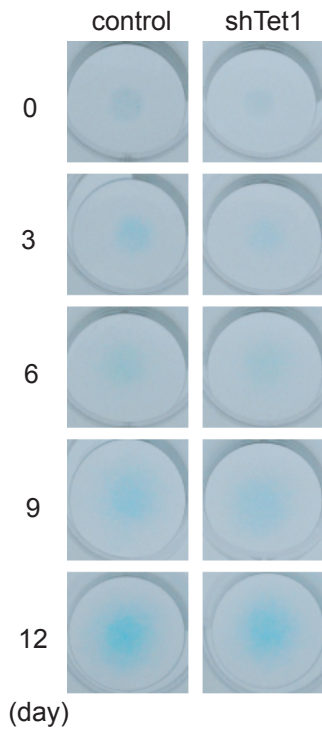
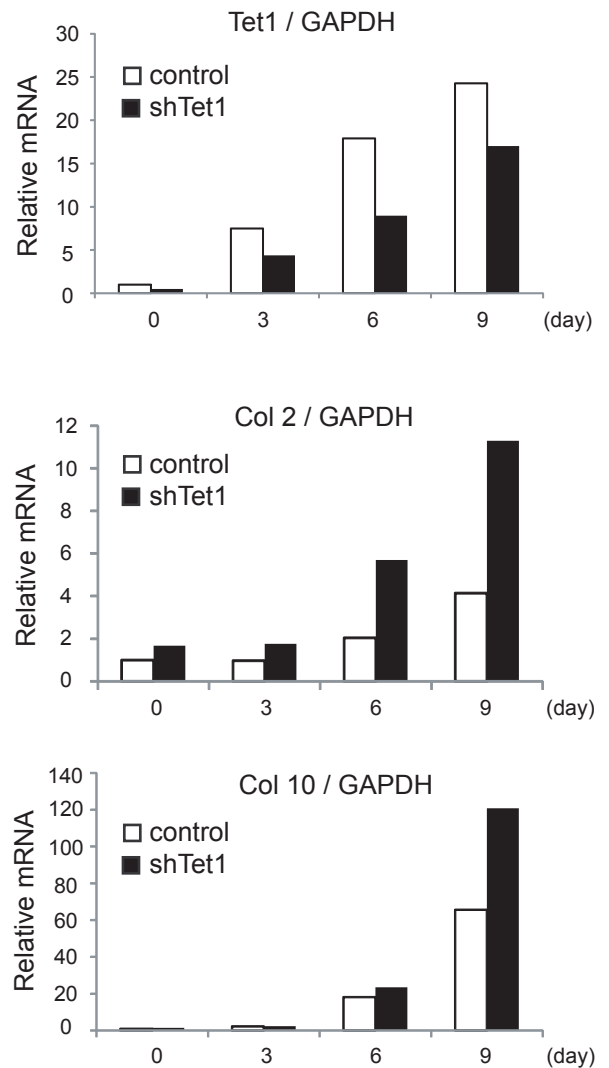
a**b**

Fig.3-5 軟骨細胞分化に対するTet1発現抑制の影響

(a) Tet1発現抑制株を用いた分化誘導実験 Tet1に対するshRNAを発現させた細胞株を作製した。その細胞を軟骨細胞へと分化誘導し、分化程度をアルシアンブルー染色にて解析した。(b) (a)と同様に処理した細胞を用いてRT-qPCRを行い、分化マーカーであるCol 2、およびCol 10の発現量を指標に分化程度を解析した。

第四章 総合討論

第一節 本研究のまとめ

本研究では第二章において、メチルシトシン水酸化酵素 TET を題材とし、新規エピゲノム制御機構の探索、及びその分子基盤の解明を試みた。また第三章では、細胞分化に寄与するエピゲノム制御機構を明らかにするため、細胞分化における TET ファミリーの生理作用に関する解析を行った。その結果、以下の点を明らかにした。

- 1) 第二章では TET3 複合体の主要な構成因子として OGT を生化学的手法により同定した。また、TET3 は OGT のクロマチンへの局在を亢進することを明らかにした。これまで、TET2 が OGT のクロマチンリクルートを促進することは報告されていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、TET3 が相互作用を介して OGT タンパク質を安定化し、その結果、クロマチンに局在する OGT タンパク質量が増加することを明らかにした。
- 2) 第三章では軟骨細胞分化において TET1、及び TET2 遺伝子の発現が増加し、メチルシトシンの水酸化が亢進されていることを明らかにした。さらに、TET1 が軟骨細胞分化に対して抑制的に機能している可能性を示唆することができた。

以上、本研究では、新規エピゲノム制御機構として TET3-OGT 複合体の存在とその新たな分子機構の一端を示し、また、軟骨細胞分化における TET1 の生理的機能を示唆することができた。

第二節 本研究の成果

第一項 TET3-OGT 複合体の同定

本研究では、生化学的手法により TET3 と OGT が複合体を形成していることを明らかにした (Fig. 2-1, 2-2)。さらに、TET2 も同様に OGT と結合し (Fig. 2-3, 2-7c)、TET1 は弱いながらも OGT と親和性を持つことを示した (Fig. 2-7c)。また、それらの相互作用には C 末端領域に存在する H ドメインが重要であることを明らかにした (Fig. 2-6)。

TET1 は ES 細胞の未分化能維持に関与すること(34,36,37)、神経細胞の機能に影響を与えることが報告されている(39,40)。TET2 は血球分化との関わりが示唆されており(41-44)、TET3 は受精時の雄性 DNA の脱メチル化や神経発生との関わりが報告されている(45-47)。TET ファミリーは皆同様にメチルシトシンの水酸化活性を持つが、上記のように、それぞれが多様な生理的機能を持つことが示されている。その多様性の要因の一つとして、TET 複合体の構成因子の多様性が考えられる。実際、本研究で明らかとなった OGT との相互作用に関しては、TET2、及び TET3 が選択的に強い親和性を示し、TET の多様な生理作用が複合体形成によるものである可能性が考えられる。

これまでも TET を含むエピゲノム制御複合体はいくつか知られており、TET1 は NCoR 複合体や NuRD 複合体と相互作用することが報告されている(70,71) (Fig. 1-8)。本研究において TET3 の相互作用因子を網羅的に探索した結果、NCoR 複合体の構成因子である RBBP7、SAP130、SAP30、SIN3A を同定した (Fig. 2-2)。これらの結果から、TET3 も TET1 同様に NCoR 複合体と相互作用する可能性が示唆された。また、TET2 は NCoR 複合体と相互作用しないことが示唆されており(70)、実際に TET2 複合体中に SIN3A、SAP130、SAP30 などの構成因子は検出されなかった(Fig. 2-3)。これらの結果は TET1、及び TET3 のみが NCoR 複合体と相互作用することを示唆しており、TET ファミリーの含まれるエピゲノム複合体の多様性を支持する。

また、最近、TET-OGT 複合体に関するいくつかの論文が報告されており、Chen らは TET2、及び TET3 が OGT と相互作用し、さらに TET2 が OGT のクロマチン局在を促進することを明らかにした (81) (Fig. 4-1a)。Vella らは ES 細胞において TET1、TET2 が OGT と複合体を形成し、TET1 が OGT のクロマチン局在を促進すること、さらに OGT が TET1 の標的遺伝子選択性に影響を与えていることを明らかにした(82) (Fig. 4-1b)。Deplus らは TET ファミリーの中でも特に TET2、TET3 が OGT と強く相互作用し、OGT

による GlcNAc 修飾を介して SET1A/ COMPASS 複合体によるヒストン H3K4 メチル化を亢進することを示した(83) (Fig. 4-1c)。本論文で示した TET-OGT 間の相互作用に関する結果は、TET ファミリー全てが OGT と相互作用し、TET2 と TET3 が特に強い結合性を示すという点で上記の報告と矛盾しないものであった。

第二項 TET3 の GlcNAc 修飾の同定

OGT はこれまでも多様なタンパク質を GlcNAc 化することが報告されてきた(56,91,92)。本研究では TET3 も OGT との相互作用を介して GlcNAc 修飾を受けることを明らかにした(Fig. 2-9, 10, 11)。例えば、リン酸化酵素 Casein kinase II (CK2) は OGT によって GlcNAc 修飾を受けることで、そのリン酸化活性が調節されることが報告されている(80)。本研究においても、そのような GlcNAc 化による TET3 のメチルシトシン水酸化活性の調節を予想し、解析を行った。しかし、予想に反し GlcNAc 修飾を減少させても TET3 の活性に変化は見られなかった (Fig. 2-12)。しかしながら、Vella らは一部のプロモーターにおいてのみ、OGT が TET の活性に影響を与えることを示唆している(82)。本研究で行った解析は、ゲノム中の 5hmC を非特異的に検出するものであり、一部のプロモーターにおける微細な変化は検出できていなかった可能性が考えられる。以上の見解から、OGT は GlcNAc 修飾を介し、TET3 の標的遺伝子特異的にメチルシトシン水酸化活性を調節している可能性が残っている。

第三項 OGT タンパク質の安定化機構

これまでも Vella や Chen らのグループから TET1、あるいは TET2 が OGT のクロマチン局在を亢進させることが報告されていた(81,82)。本研究では、TET3 も同様に OGT のクロマチンリクルートを促進させる働きをもつことを明らかにした (Fig.2-13)。さらに、その TET3 の機能には H ドメインを介した OGT との相互作用に依存し、メチルシトシン水酸化活性には依存しないことを示した (Fig. 2-13b, c)。また、OGT タンパク質の安定化という TET の新規機能を見出した (Fig. 2-14, 15)。これらの結果は、これまで明らかになっていなかった TET による OGT のクロマチン局在促進が、OGT タンパク質の安定化を介して行われている可能性を示唆するものである (Fig.4-1d)。

OGT が GlcNAc 修飾を介して SP1 や ChREBP など多様なタンパク質の安定性を調節

することは報告されていた(93,94)。しかしながら、OGT 自体のタンパク質安定性に関してはあまり解析されておらず不明な点が多い。最近になり、脱ユビキチン化酵素 BAP1 が OGT のユビキチン化修飾を除去し、ユビキチン-プロテアソーム系による分解を抑制していることが示唆された(95)。この報告と本研究結果を鑑みると、OGT は TET3 によりユビキチン化が阻害され、プロテアソーム分解が抑制されることで安定化している可能性が示唆された。

一方、Vella らの報告では、TET1 もしくは TET2 は OGT の発現量に影響せずにクロマチンへのリクルートを促進するというものであった(82)。この点において、Vella らの報告は本研究の結果と一致しない。この原因の一つとして Vella らはマウス ES 細胞を用い、本研究は 293T 細胞を用いたことが挙げられる。前述の通り、OGT タンパク質の安定性にはユビキチン-プロテアソーム系による制御が強く示唆されている。ユビキチン付加反応には多種多様なタンパク質が関与するが、中でも特に、基質認識を担う E3 リガーゼは多様性に富むことが知られている(96)。従って、E3 リガーゼのような細胞種特異的なタンパク質の発現の差異が結果の違いに結びついたと考えられる。

第四項 軟骨細胞分化におけるメチルシトシン水酸化

本研究では、脂肪細胞、及び軟骨細胞分化において TET1、TET2 の発現が上昇することを明らかにした (Fig. 3-1)。さらに、軟骨細胞においては、ゲノム DNA 中の 5hmC 含量が顕著に増加することを示し、実際に細胞分化に伴い脱メチル化が起こる Col 10 プロモーター上でメチルシトシンが水酸化されていることが明らかとなった (Fig. 3-3)。これまで、軟骨細胞では、Sox 9 や Runx 2 などの転写因子が分化に必須であることが知られている(64-66)。また、ヒストン脱アセチル化酵素である SirT1 やヒストンメチル化酵素 SETDB1 はエピゲノム制御を介して軟骨分化を調節していることが報告されている(97,98)。しかしながら、軟骨細胞分化と TET によるメチルシトシン水酸化の関連性に関しては未だ何の知見も得られていない。本研究で明らかとなった軟骨細胞分化における TET1、TET2 の挙動は、軟骨形成におけるエピゲノム制御の分子基盤を明らかにする端緒になるものと考えられる (Fig. 4-2a)。

また、ドキシサイクリン誘導性 TET3 CD 発現株を用いた解析から、メチルシトシンの水酸化反応だけでは軟骨細胞の分化には影響を与えないことが明らかとなった (Fig. 3-4c, d)。しかしながら、メチルシトシンの水酸化が軟骨細胞自体の役割、例えば、プロ

テオグリカンなどを含む細胞外マトリクスの構築・破壊や、成長ホルモン IGF-1 の分泌などへの関わりは否定できず、今後の解析が必要である (Fig. 4-2a)。

第五項 軟骨細胞分化における TET1 の機能

本研究において、軟骨細胞分化におけるメチルシトシン水酸化の生理的意義を明らかにすることはできなかった。しかしながら、分化に伴う発現上昇が顕著である TET1 の発現を抑制すると、軟骨細胞分化のマーカー遺伝子である Col 2、Col 10 の発現が上昇することが示された (Fig. 3-5b)。これらの結果から、TET1 の軟骨分化に関する作用機構として二つの仮説が考えられた。一つ目として、Col 2、Col 10 の転写に抑制的な遺伝子の発現を TET1 が活性化し、間接的に軟骨細胞分化を調節している可能性が考えられた。二つ目として、TET1 が Col 2、Col 10 の転写を直接抑制している可能性である。このうち、二つ目の仮説を支持する結果として、Col 10 プロモーター上に 5hmC が存在する結果が得られている (Fig. 3-3b)。メチルシトシンが水酸化されていることから、少なくともいずれかの TET がプロモーターに直接リクルートしていることが考えられる。また、TET1 によるエピゲノム制御には、メチルシトシン水酸化を介した脱メチル化による転写活性化の他にも、転写抑制的な機能が存在することが報告されている。例えば、TET1 は NCoR 複合体と相互作用し、複合体の標的プロモーターへのリクルート促進、ヒストン脱アセチル化をもたらすことで転写を抑制する(70)。また、MBD3 を含む NURD 複合体とも相互作用することが知られ(71)、さらには、5hmC と PRC2 複合体による H3K27me3 の局在に相関が見られることも報告されている(99,100)。これらのように TET1 が転写抑制的に機能する知見も得られており、本研究で明らかとなった軟骨細胞分化における TET1 の機能は転写抑制的であることが予想される。

第三節 今後の展望

第二章において、TET3 と OGT の相互作用、及びその複合体における TET3 の作用メカニズムを明らかにした。しかしながら、TET3-OGT の複合体としての生理的機能は未知のままである。今後、TET3 の関与が知られている生命現象、例えば、神経発生や受精時における雄性 DNA の脱メチル化に TET3-OGT 複合体がどのような影響を与えているのかを明らかにする必要がある。

また、第三章では、軟骨細胞分化に TET1 が関与している可能性が示唆された。TET1 は転写抑制的に機能していることが想定できたが、その具体的な分子機構は不明のままである。従って、軟骨細胞分化における TET1 の作用機序を転写抑制複合体に視点を移し、解析する必要があると考えられる。また、本研究による仮説は、培養細胞系を用いた実験でのみ検証しており、生体内における TET1 の軟骨細胞分化に対する寄与に関しては、何ら知見が得られていない。今後、軟骨細胞特異的 TET1 欠失マウスを作製、解析することで本研究により示唆された TET1 の新たな生理作用を生体レベルで検証することができると考えている。

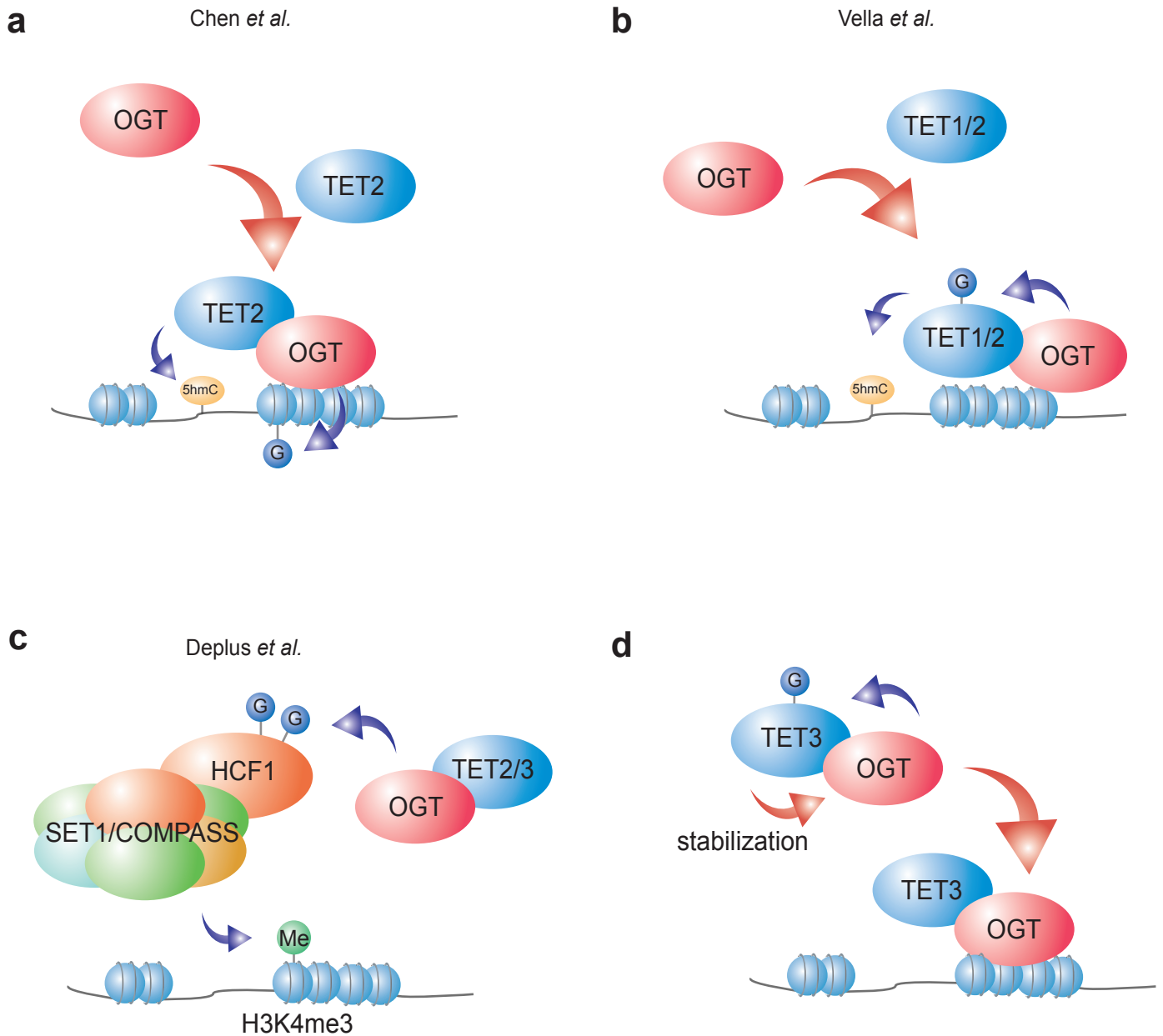
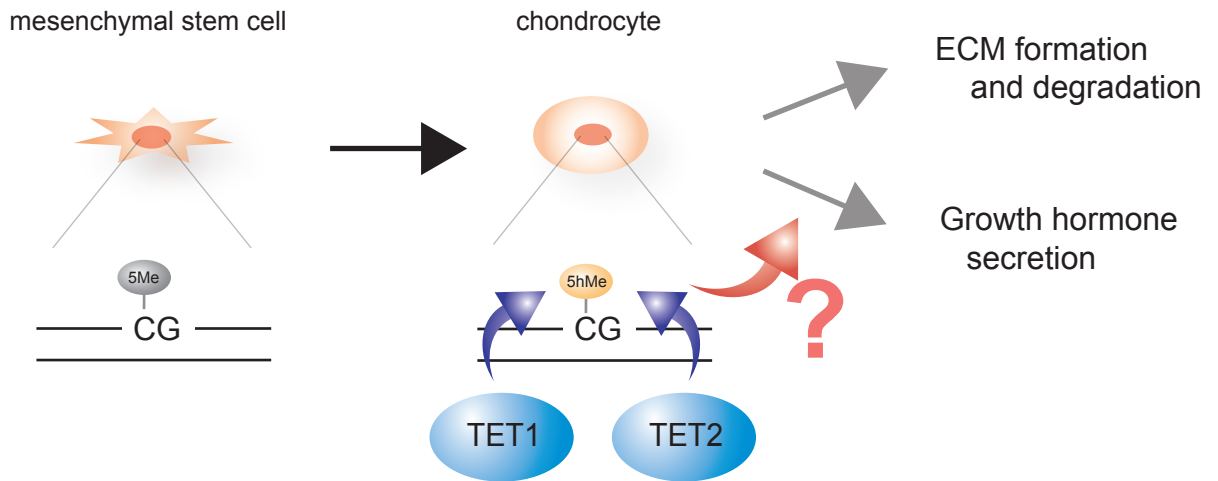


Fig.4-1 TET-OGT複合体の機能

(a) ChenらはTET2がOGTのクロマチンリクルートを促進し、ヒストンGlcNAc化を通して遺伝子発現を活性化していることを示した(Nature 493(7433):561-4 (2012))。 (b) VellaらはTET1、TET2がOGTと結合し、OGTのクロマチン局在を促進すること、さらに、TET1のGlcNAc修飾が標的的特異性に寄与していることを報告した(Mol Cell 49(4):645-56 (2013))。 (c) DeplusらはTET2、TET3がOGTによるHCF1のGlcNAc修飾を調節し、SET1/COMPASSによるヒストンH3K4me3修飾を制御していることを示した(EMBO J. 32(5):645-55 (2013))。 (d) 本研究では、TET3がOGTを安定化し、OGTのクロマチン局在を促進していることを明らかにした (第二章)。

a



b

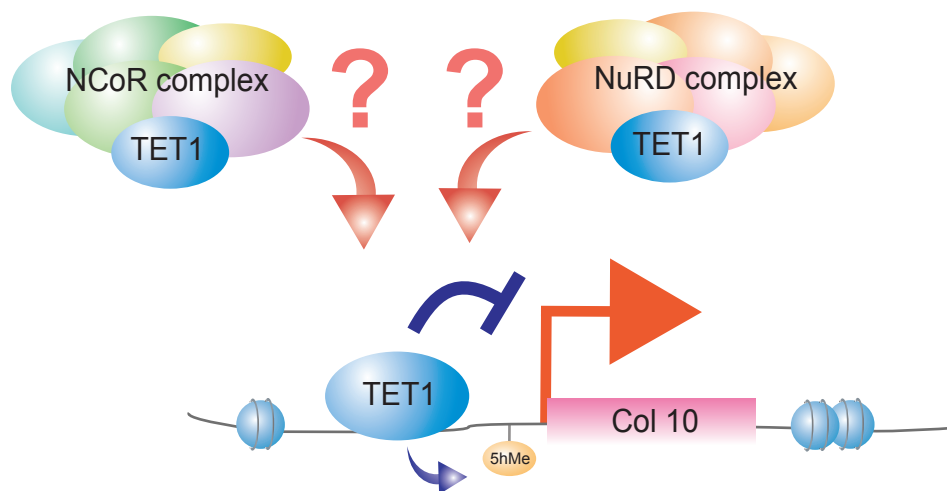


Fig.4-2 TET-OGT複合体の機能

(a) 本研究では、軟骨細胞分化に伴いTET1、及びTET2の発現が上昇し、ゲノム中のメチルトシンが水酸化されることを明らかにした。(b) 軟骨細胞において、TET1はCol 10遺伝子の転写を抑制している。この抑制的なTET1の機能はNCoR複合体を介したヒストン脱アセチル化や、NuRD複合体を介したクロマチン凝縮による可能性が考えられる。

引用文献

1. Levine, M., and Tjian, R. (2003) *Nature* **424**, 147-151
2. Kadonaga, J. T. (2004) *Cell* **116**, 247-257
3. Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., and Workman, J. L. (2000) *Trends Biochem Sci* **25**, 15-19
4. Roeder, R. G. (1991) *Trends Biochem Sci* **16**, 402-408
5. Goodrich, J. A., Cutler, G., and Tjian, R. (1996) *Cell* **84**, 825-830
6. Orphanides, G., and Reinberg, D. (2000) *Nature* **407**, 471-475
7. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) *Nature* **389**, 251-260
8. Luger, K., Dechassa, M. L., and Tremethick, D. J. (2012) *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 436-447
9. Beisel, C., and Paro, R. (2011) *Nat Rev Genet* **12**, 123-135
10. Bird, A. (2002) *Genes Dev* **16**, 6-21
11. Deaton, A. M., and Bird, A. (2011) *Genes Dev* **25**, 1010-1022
12. Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. (2001) *Nature* **411**, 834-842
13. Ferguson-Smith, A. C., Cattanaach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V., and Surani, M. A. (1991) *Nature* **351**, 667-670
14. Mancini, D. N., Rodenhiser, D. I., Ainsworth, P. J., O'Malley, F. P., Singh, S. M., Xing, W., and Archer, T. K. (1998) *Oncogene* **16**, 1161-1169
15. Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992) *Cell* **69**, 905-914
16. Rietveld, L. E., Caldenhoven, E., and Stunnenberg, H. G. (2002) *EMBO J* **21**, 1389-1397
17. Sarraf, S. A., and Stancheva, I. (2004) *Mol Cell* **15**, 595-605
18. Brackertz, M., Boeke, J., Zhang, R., and Renkawitz, R. (2002) *J Biol Chem* **277**, 40958-40966
19. Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U., and Bestor, T. H. (1992) *Cell* **71**, 865-873
20. Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M., and Koseki, H. (2007) *Nature* **450**, 908-912
21. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999) *Cell* **99**, 247-257
22. Ooi, S. K., and Bestor, T. H. (2008) *Cell* **133**, 1145-1148
23. Feng, S., Jacobsen, S. E., and Reik, W. (2010) *Science* **330**, 622-627
24. Wu, S. C., and Zhang, Y. (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 607-620

25. Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., and Niehrs, C. (2007) *Nature* **445**, 671-675
26. Jost, J. P. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4684-4688
27. Fritz, E. L., and Papavasiliou, F. N. (2010) *Genes Dev* **24**, 2107-2114
28. Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009) *Science* **324**, 929-930
29. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., and Rao, A. (2009) *Science* **324**, 930-935
30. He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C. X., Zhang, K., He, C., and Xu, G. L. (2011) *Science* **333**, 1303-1307
31. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., and Zhang, Y. (2011) *Science* **333**, 1300-1303
32. Inoue, A., and Zhang, Y. (2011) *Science* **334**, 194
33. Shen, L., and Zhang, Y. (2013) *Curr Opin Cell Biol* **25**, 289-296
34. Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., and Zhang, Y. (2010) *Nature* **466**, 1129-1133
35. Upadhyay, A. K., Horton, J. R., Zhang, X., and Cheng, X. (2010) *Curr Opin Struct Biol* **21**, 750-760
36. Koh, K. P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C. A., Mostoslavsky, G., Lahesmaa, R., Orkin, S. H., Rodig, S. J., Daley, G. Q., and Rao, A. (2011) *Cell Stem Cell* **8**, 200-213
37. Ficiz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J., Andrews, S., and Reik, W. (2011) *Nature* **473**, 398-402
38. Yamaguchi, S., Shen, L., Liu, Y., Sandler, D., and Zhang, Y. (2013) *Nature* **504**, 460-464
39. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., and Song, H. (2011) *Cell* **145**, 423-434
40. Zhang, R. R., Cui, Q. Y., Murai, K., Lim, Y. C., Smith, Z. D., Jin, S., Ye, P., Rosa, L., Lee, Y. K., Wu, H. P., Liu, W., Xu, Z. M., Yang, L., Ding, Y. Q., Tang, F., Meissner, A., Ding, C., Shi, Y., and Xu, G. L. (2013) *Cell Stem Cell* **13**, 237-245
41. Quivoron, C., Couronne, L., Della Valle, V., Lopez, C. K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M. H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., Bastard, C., Mercher, T., and Bernard, O. A. (2011) *Cancer Cell* **20**, 25-38

42. Pronier, E., Almire, C., Mokrani, H., Vasanthakumar, A., Simon, A., da Costa Reis Monte Mor, B., Masse, A., Le Couedic, J. P., Pendino, F., Carbonne, B., Larghero, J., Ravanat, J. L., Casadevall, N., Bernard, O. A., Droin, N., Solary, E., Godley, L. A., Vainchenker, W., Plo, I., and Delhommeau, F. (2011) *Blood* **118**, 2551-2555
43. Ko, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Thompson, E. C., Hastie, R., Tsangaratou, A., Rajewsky, K., Koralov, S. B., and Rao, A. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14566-14571
44. Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M. E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., Perna, F., Pandey, S., Madzo, J., Song, C., Dai, Q., He, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Nimer, S. D., Melnick, A., Godley, L. A., Aifantis, I., and Levine, R. L. (2011) *Cancer Cell* **20**, 11-24
45. Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., and Walter, J. (2011) *Nat Commun* **2**, 241
46. Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., Xie, Z. G., Shi, L., He, X., Jin, S. G., Iqbal, K., Shi, Y. G., Deng, Z., Szabo, P. E., Pfeifer, G. P., Li, J., and Xu, G. L. (2011) *Nature* **477**, 606-610
47. Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J. G., Bian, C., Hu, Y., Hu, D., Zhao, B., Cerovina, T., Diao, J., Wu, F., He, H. H., Cui, Q., Clark, E., Ma, C., Barbara, A., Veenstra, G. J., Xu, G., Kaiser, U. B., Liu, X. S., Sugrue, S. P., He, X., Min, J., Kato, Y., and Shi, Y. G. (2012) *Cell* **151**, 1200-1213
48. Kouzarides, T. (2007) *Cell* **128**, 693-705
49. Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. (2007) *Cell* **128**, 707-719
50. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011) *Cell Res* **21**, 381-395
51. Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G. W. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19915-19920
52. Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J., and Zhang, Y. (2007) *Cell* **131**, 633-636
53. Zhang, S., Roche, K., Nasheuer, H. P., and Lowndes, N. F. (2011) *J Biol Chem* **286**, 37483-37495
54. Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P., Wu, C., and Allis, C. D. (2006) *Nature* **442**, 86-90
55. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001) *Nature* **410**, 116-120
56. Hanover, J. A., Krause, M. W., and Love, D. C. (2012) *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**,

312-321

57. Taylor, S. M., and Jones, P. A. (1979) *Cell* **17**, 771-779
58. Pinney, D. F., and Emerson, C. P., Jr. (1989) *Environ Health Perspect* **80**, 221-227
59. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) *Cell* **126**, 663-676
60. Watanabe, A., Yamada, Y., and Yamanaka, S. (2013) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20120292
61. Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S., and Meissner, A. (2008) *Nature* **454**, 49-55
62. Kronenberg, H. M. (2003) *Nature* **423**, 332-336
63. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2006) *J Cell Biochem* **97**, 33-44
64. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., and de Crombrughe, B. (2002) *Genes Dev* **16**, 2813-2828
65. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. (1997) *Cell* **89**, 755-764
66. Ueta, C., Iwamoto, M., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Ohmori, T., Enomoto, H., Nakata, K., Takada, K., Kurisu, K., and Komori, T. (2001) *J Cell Biol* **153**, 87-100
67. De Luca, F., Barnes, K. M., Uyeda, J. A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V., and Baron, J. (2001) *Endocrinology* **142**, 430-436
68. Zimmermann, P., Boeuf, S., Dickhut, A., Boehmer, S., Olek, S., and Richter, W. (2008) *Arthritis Rheum* **58**, 2743-2753
69. Tsuda, M., Takahashi, S., Takahashi, Y., and Asahara, H. (2003) *J Biol Chem* **278**, 27224-27229
70. Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M. T., Johansen, J. V., Cloos, P. A., Rappsilber, J., and Helin, K. (2011) *Nature* **473**, 343-348
71. Yildirim, O., Li, R., Hung, J. H., Chen, P. B., Dong, X., Ee, L. S., Weng, Z., Rando, O. J., and Fazzio, T. G. (2011) *Cell* **147**, 1498-1510
72. Lemon, B., and Tjian, R. (2000) *Genes Dev* **14**, 2551-2569
73. Wysocka, J., Milne, T. A., and Allis, C. D. (2005) *Cell* **122**, 654-658
74. Pastor, W. A., Aravind, L., and Rao, A. (2013) *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 341-356
75. Yokoyama, A., Takezawa, S., Schule, R., Kitagawa, H., and Kato, S. (2008) *Mol Cell Biol* **28**, 3995-4003
76. Xu, C., Bian, C., Lam, R., Dong, A., and Min, J. (2011) *Nat Commun* **2**, 227
77. Allen, M. D., Grummitt, C. G., Hilcenko, C., Min, S. Y., Tonkin, L. M., Johnson, C. M., Freund, S. M., Bycroft, M., and Warren, A. J. (2006) *EMBO J* **25**, 4503-4512

78. Kelly, W. G., Dahmus, M. E., and Hart, G. W. (1993) *J Biol Chem* **268**, 10416-10424
79. Ranuncolo, S. M., Ghosh, S., Hanover, J. A., Hart, G. W., and Lewis, B. A. (2012) *J Biol Chem* **287**, 23549-23561
80. Tarrant, M. K., Rho, H. S., Xie, Z., Jiang, Y. L., Gross, C., Culhane, J. C., Yan, G., Qian, J., Ichikawa, Y., Matsuoka, T., Zachara, N., Etkorn, F. A., Hart, G. W., Jeong, J. S., Blackshaw, S., Zhu, H., and Cole, P. A. (2012) *Nat Chem Biol* **8**, 262-269
81. Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., and Yu, X. (2012) *Nature* **493**, 561-564
82. Vella, P., Scelfo, A., Jammula, S., Chiacchiera, F., Williams, K., Cuomo, A., Roberto, A., Christensen, J., Bonaldi, T., Helin, K., and Pasini, D. (2013) *Mol Cell* **49**, 645-656
83. Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M. K., Defrance, M., Mendez, J., Murphy, N., Dawson, M. A., Volkmar, M., Putmans, P., Calonne, E., Shih, A. H., Levine, R. L., Bernard, O., Mercher, T., Solary, E., Urh, M., Daniels, D. L., and Fuks, F. (2013) *EMBO J* **32**, 645-655
84. Dawlaty, M. M., Ganz, K., Powell, B. E., Hu, Y. C., Markoulaki, S., Cheng, A. W., Gao, Q., Kim, J., Choi, S. W., Page, D. C., and Jaenisch, R. (2011) *Cell Stem Cell* **9**, 166-175
85. Okuno, Y., Ohtake, F., Igarashi, K., Kanno, J., Matsumoto, T., Takada, I., Kato, S., and Imai, Y. (2013) *Diabetes* **62**, 1426-1434
86. Haas, A. R., and Tuan, R. S. (1999) *Differentiation* **64**, 77-89
87. Si, Y., Inoue, K., Igarashi, K., Kanno, J., and Imai, Y. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* **437**, 579-584
88. Tan, L., and Shi, Y. G. (2012) *Development* **139**, 1895-1902
89. Andres-Bergos, J., Tardio, L., Larranaga-Vera, A., Gomez, R., Herrero-Beaumont, G., and Largo, R. (2012) *J Biol Chem* **287**, 33615-33628
90. Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., and Murata, M. (2013) *Nat Commun* **4**, 2262
91. Hart, G. W., Housley, M. P., and Slawson, C. (2007) *Nature* **446**, 1017-1022
92. Hanover, J. A., Krause, M. W., and Love, D. C. (2010) *Biochim Biophys Acta* **1800**, 80-95
93. Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D. B., Paterson, A. J., and Kudlow, J. E. (2003) *Cell* **115**, 715-725
94. Guinez, C., Filhoulaud, G., Rayah-Benhamed, F., Marmier, S., Dubuquoy, C., Dentin, R., Moldes, M., Burnol, A. F., Yang, X., Lefebvre, T., Girard, J., and Postic, C. (2011) *Diabetes* **60**, 1399-1413
95. Dey, A., Seshasayee, D., Noubade, R., French, D. M., Liu, J., Chaurushiya, M. S., Kirkpatrick, D. S., Pham, V. C., Lill, J. R., Bakalarski, C. E., Wu, J., Phu, L.,

- Katavolos, P., LaFave, L. M., Abdel-Wahab, O., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Dong, K., Lin, Z., Balazs, M., Suriben, R., Newton, K., Hymowitz, S., Garcia-Manero, G., Martin, F., Levine, R. L., and Dixit, V. M. (2012) *Science* **337**, 1541-1546
96. Kulathu, Y., and Komander, D. (2012) *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 508-523
97. Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E. J., and Hall, D. J. (2008) *J Biol Chem* **283**, 36300-36310
98. Lawson, K. A., Teteak, C. J., Zou, J., Hacquebord, J., Ghatan, A., Zielinska-Kwiatkowska, A., Fernandes, R. J., Chansky, H. A., and Yang, L. (2013) *J Biol Chem* **288**, 32119-32125
99. Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A. J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y., Zhang, K., and Shi, Y. G. (2011) *Mol Cell* **42**, 451-464
100. Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y. E., and Zhang, Y. (2011) *Nature* **473**, 389-393

謝辞

本研究の機会とご助言を与えてくださいました東京大学分子細胞生物学研究所教授 白髭克彦先生に深く感謝申し上げます。

懇切なるご指導を賜りました東北大学大学院医学系研究科教授 菅原明先生、相馬中央病院 加藤茂明先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、ご指導頂きました東北大学大学院医学系研究科助教 横山敦先生、かずさ DNA 研究所 藤木亮次先生、愛媛大学教授 今井祐記先生に心より感謝申し上げます。

実験材料を御供与くださいました東京大学分子細胞生物学研究所分子情報研究分野 高井弘基氏、同ゲノム情報解析研究分野 藤木克則博士、並びに、実験遂行にあたりご助力いただきました同発生・再生研究分野 宮田奈保子氏に深く感謝いたします。

多大なるご指導ご協力頂きました関根弘樹博士、橋場和華氏に、研究遂行にご助力いただきました秘書 金井由美子氏、中川優理氏に心より感謝いたします。また、活発な議論を交わしていただきました朝妻知子博士、桂章吾氏、辻直也氏、鴨志田祐己氏、土屋光氏、羽田政司氏、松村厚佑氏、坂田豊典氏をはじめ核内情報研究分野、ゲノム情報解析研究分野の皆様にも深く御礼申し上げます。

最後に、温かい励ましで応援して下さった家族に深く感謝致します。

平成 25 年 12 月 25 日

東京大学大学院博士課程

農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

伊藤 亮