

新学術領域「グライコエピジェネティクス」の創生に向けた基盤研究

研究代表者 早川 晃司 (獣医学部 獣医学科)

担当：グリコシル化解析ツールの開発およびエピゲノム解析

研究分担者 俵 修一 (獣医学部 獣医学科)

担当：グリコシル化創薬ターゲット因子および小分子化合物の探索

藤原 信行 (獣医学部 獣医学科)

担当：細胞生物学的手法を用いたグリコシル化の機能解析

背景と経緯

本プロジェクトでは、食と健康の分野に貢献することを目指すと共に、新学術領域「グライコエピジェネティクス」の創生に向けた基盤研究を遂行する。これに至った背景を以下に述べる。

背景 I 食の豊かさがもたらした弊害

先人達の功績により、現在我々は飽食の時代の只中にいる (図 1)。しかし、その弊害として糖尿病に代表される慢性疾患の増加がもたらされ、メタボリックシンドロームという言葉が生まれた。慢性疾患は食生活など習慣が発症の要因となり得ることはこれまでの研究で明白ではあるものの、今後も多くの方が慢性疾患に罹り、生命の危機を回避し続け、生きていかざるをえない。そのため、新たな視点から予防・治療法の技術基盤を確立し続け、慢性疾患であったとしても健康寿命を長期化させるための戦略が必要となる。

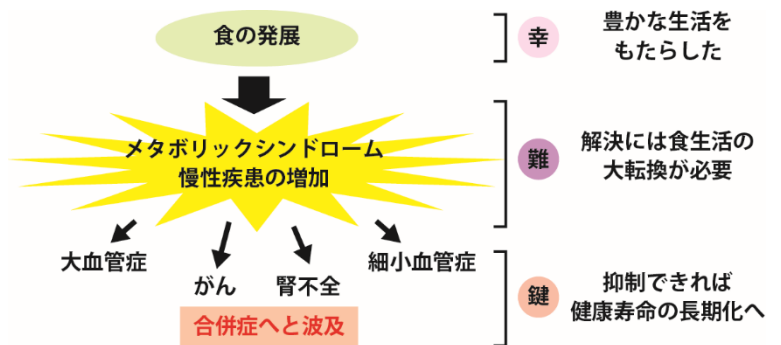


図 1 慢性疾患 - 合併症の克服に向けて

背景 II 栄養とエピジェネティクス

生命の進化とは如何に栄養を取り込むかであり、例え下等生物では毒であっても高等生物はそれを有用化する仕組みを獲得した。これは進化の過程で、ゲノム上にある遺伝子およびその制御の多様化によって達成された側面がある (Hayakawa et al., *Mamm Genome*, 2012)。栄養が過剰・不足した時、細胞のゲノムスイッチが切り替わり、哺乳動

物においては各細胞種の機能発揮は栄養条件に依存している。ゲノムスイッチとして働く「エピジェネティクス制御系」は遺伝子機能の記憶装置であるため、エピジェネティクス変化は長期的な細胞機能の異常や欠損となって現れ、個体の慢性疾患に繋がり、合併症の発症の原因になり得ることは容易に想像できる。

背景 III ヒストンのグリコシル化の発見

エピジェネティクス制御の中心はヒストンタンパク質に施される化学修飾（ヒストン修飾）であり、これまでにメチル化など多数の修飾が見つかった。では、どの修飾が栄養シグナルと遺伝子利用を繋ぐ鍵となるだろうか。申請者はこれまでにヒストン H2A の 40 番目のセリンにグリコシル化が起こること（ヒストンのグリコシル化）を発見した（Hayakawa et al., *Sci Rep*, 2016; Hayakawa et al., *Epigene Chrom*, 2017）。この修飾の基質となる UDP-GlcNAc の産生には、グルコース、アミノ酸や核酸など様々な代謝経路が関与する。また、これまでの申請者の研究において、グルコースや特定の栄養素（代謝中間体）によって修飾量が増減することを明らかにしている（Hayakawa et al., *Sci Rep.*, 2019）。つまり、グリコシル化は栄養センサーとして働くヒストン修飾系であり、栄養環境に依存した遺伝子調節機構としての働きが期待できるのである（図 2）。

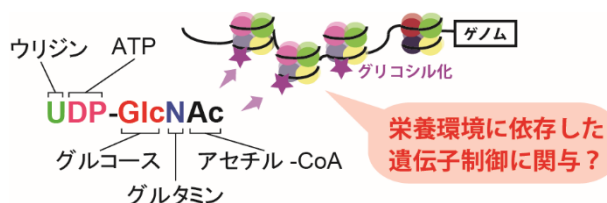


図 2 UDP-GlcNAc 代謝とグリコシル化

研究期間内の目標

以上の背景より、「慢性疾患および合併症の原因メカニズムとしてのヒストンのグリコシル化の重要性」が浮上してくるものの、これを証明するためには、(1) 基礎・応用研究のために、ヒストンのグリコシル化を人工的に調節する技術がない、(2) 糖尿病や高血圧の個体で実際にヒストンのグリコシル化に変化があるかが不明である、といった問題を解決する必要がある。これらの問題を踏まえ、本研究期間では、以下の 3 項目を期間内で遂行する。

- ✓ ヒストンのグリコシル化解析ツールの開発
- ✓ 慢性疾患におけるヒストングリコシル化動態および機能の解析
- ✓ ヒストングリコシル化創薬ターゲット因子の探索

以上を達成することができれば、慢性疾患の発症および維持におけるヒストングリコシル化の重要性を示すことができるだけでなく、将来的に本学発となる新学術領域「グライコエピジェネティクス」の創生へとつながり、様々な課題の大型競争的資金の獲得にも有利に働くことが期待できる。

プロジェクトの進捗状況

・ヒストンのグリコシル化特異的抗体の配列情報の取得、および細胞内の局在解析

代表者はこれまでにヒストン H2A の 40 番目のセリンにグリコシル化が施されること(H2AS40Gc)を発見し、それを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を行ってきた。本研究では、この抗体を利用した H2AS40Gc 特異的な分解法の確立を試みた。

まず初めに、H2AS40Gc 特異抗体を産生するハイブリドーマより、単鎖可変領域(scFv 領域)の配列決定を行った。次に、この配列に GFP を融合することで、scFv が細胞内で期待される局在を示すか解析を行った。scFv はヒストン修飾を認識するはずであるため、核内への局在が期待され、一部の細胞ではその期待通り scFv の核内への局在化が認められた。既報 (Kabayama et al., Nat Commun, 2020)を参考に、タグ配列である 3xFLAG および HA を scFv に付加し、可溶性を高めることを試みた。しかし、タグを付加しても核内への蓄積は促進されることはなかった。

次に、実際に発現させた scFv がグリコシル化されたヒストンを分解するかを、抗体分解因子 TRIM21 と同時に scFv を発現させて確認した。その結果、顕著な分解を起さなかった。そこで、ランダム PCR 法で scFv の変異体をいくつか作成して分解への影響を調べたところ、いくつかの変異体で有意な分解が起こっていることが明らかとなった (図 3)。つまり、本研究によって、修飾ヒストン特異的な分解法を開発することに成功したのである。

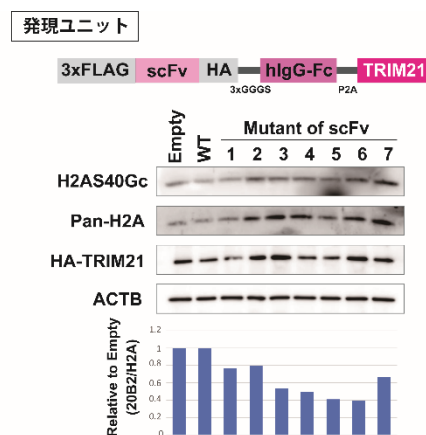


図 3 scFv への変異挿入による分解の効率化

・創薬標的としての H2AS40Gc 調節因子の探索

グリコシル化の修飾酵素は O-GlcNAc transferase (OGT) の 1 種類のみで、OGT にはタンパク質特異性はない。そのため、ヒストン H2 特異的にグリコシル化が起こるためには、OGT に加え、特異性を保証する因子の存在が必須となる。この因子の同定を行うことができれば、H2AS40Gc を標的とした創薬開発に結び付けることができる。

そこで我々は、40 番目がセリン (S40) またはアラニン (A40) である H2A タンパク質をそれぞれ細胞内で発現させ、それらの H2A に結合するタンパク質群を網羅的に調べ比較解析することで、H2AS40Gc 調節因子の探索を試みた。その結果、結合タンパク質群を LC-MS/MS 解析に供したところ、S40 タイプに特異的に結合するタンパク質候補を 11 種類同定することが出来た。

・糖尿病患者由来の近位尿細管上皮細胞における解析

ヒストンのグリコシル化が栄養に関連した慢性疾患の治療標的分子になりえるかを

明らかにするために、糖尿病患者由来の腎近位尿細管上皮細胞(RPTEC)におけるグリコシル化レベルの解析を行った。免疫蛍光染色法およびウエスタンブロットング法どちらの解析においても、糖尿病患者由来の RPTEC では健常者に比べて、有意にグリコシル化レベルが高かった。

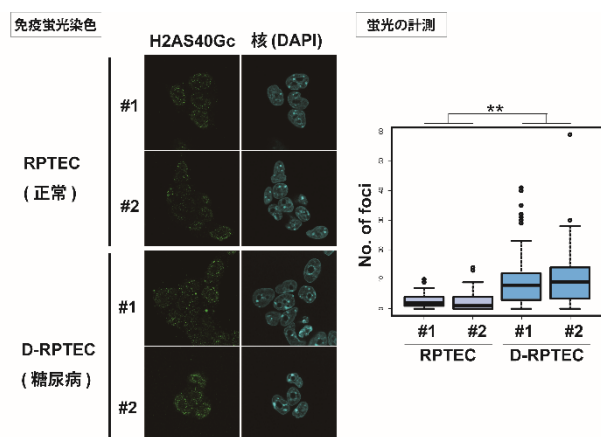


図 4 糖尿病患者由来の近位尿細管上皮細胞 (D-RPTEC) における解析