

栄養によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の研究 ーリン酸化がHP1の機能変化に与える効果の研究ー

1. 研究の目的

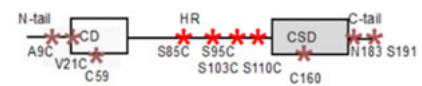
私たちの体は、摂取する栄養により影響を受け変化するものの、その制御詳細については明らかでない。しかし、その可逆的な性質から、その機構にはエピジェネティクスが関与すると考えられる。エピジェネティクス制御機構には、主に2つの機構（DNAメチル化とヒストン修飾）がある。早い反応には、一般的にヒストン修飾の制御が寄与するため、本研究では、ヒストン修飾を認識し、エピジェネティクス制御の鍵蛋白質であるHP1について、栄養による制御を明らかにする。つまり、本研究は、栄養によるエピジェネティクス制御の分子機構を明らかにすることが目的である。

2. 研究の計画

(1) ゲノムDNAを核内でコンパクトにしまうのに必要なタンパク質として、ヒストン（4種（H2A, H2B, H3, H4））がある。ヒストン分子に、多種多様の化学修飾が導入されると、遺伝子発現やクロマチン形成に影響を与える。本研究では、抑制系のエピジェネティクス制御の「ヒストンH3の9番目のトリメチル化（H3K9me3）」を認識するヘテロクロマチンタンパク質（HP1）に注目する。HP1は、研究代表者が長年研究を続けていたタンパク質であり、転写因子などが近づけないようにクロマチンを固い構造（ヘテロクロマチン）に変化させ、転写抑制に関与する。そのため、HP1の制御研究は、栄養と遺伝子発現とを結びつけうる重要な研究となる。

HP1は2つのドメイン（クロモドメイン（CD）とクロモシヤドウドメイン（CSD））をもち、CDでH3K9me3を認識し、CSDで2量体形成する。CDとCSDを繋ぐHR、CDのN末端側にN-tail、CSDのC側にC-tailがあり（右図）、それらは、立体構造を持たないIntrinsic disorder領域である。HP1上には、多数のリン酸化部位がある。試験管内で、N-tailはカゼインキナーゼII（CKII）によりリン酸化され、CDのH3K9me3への結合活性が10倍程度に促進され（Shimojo et al., Sci Rep 2016）、ゲノム上のターゲット部位へのリクルートが促進されると考えられている。またそのリン酸化は、多量体形成を伴った構造変化を促し、相液相分離が誘導される（Larson et al., Nature 2017）。本計画では、HP1の機能変化、並びにCKIIといった上流の制御との関連性を明らかにし、栄養とエピジェネティックな遺伝子発現制御の一部分を分子レベルで明らかにする。

HP1 α



(2) 細胞内のグルコース濃度、アミノ酸濃度、脂肪酸濃度の栄養条件変化の上昇に伴い、ヘキソサミン生合成経路の最終産物で、栄養センサーと言われているUDP-N-アセチルグルコサミン（UDP-GlcNAc）レベルは上昇する（Bond and Hanover, 2013; Hart et al., 2011; Vaidyanathan et al., 2014）。UDP-GlcNAc濃度上昇に伴い、N-アセチルグルコサミン転移酵素（OGT）活性が上昇する。また、CKIIがO-GlcNAc化されると、その基質特異性が変化する。これらのことから、栄養がエピジェネティクス制御に深く影響していることが推測される。本計画では、栄養によりHP1のリン酸化が変化するか、そのリン酸化部位はどこか、それにより物性に变化があるか、さらにはリン酸化によりゲノム上の特定の領域に集まるか、それに伴いクロマチン構造が変化するか、最終的にエピジェネティックな遺伝子発現制御にどのように関わるかを明らかにする。

細胞がどのように栄養に応答するかという分子メカニズムを調べるために、複数の栄養条件（アミノ酸、ピルビン酸等の含有量を変化させる）で培養細胞を培養し、CKII上のGlcNAc修飾の変化については免疫沈降後質量分析、並びに遺伝子発現抑制に関与するとされるHP1の発現変化についてはウエスタン、リアルタイムPCR等により確認する。同時に、HP1分子上の化学修飾がどのように変化するかを、質量分析により解析して、その変化を明らかにす

る。また、動物肝でも変化が見えるか検討する。

3. 研究の成果

(1) HP1 α の機能について

本研究では、HP1 α の機能変化、並びにCKIIといった上流の制御との関連性を明らかにし、栄養とエピジェネティックな遺伝子発現制御の一部分を、分子レベルで明らかにするのの一つの目的とした。HP1 α の生化学的性質や、遺伝学的性質は、よく知られているものの、それらだけでは、その生理的意義や制御が十分に理解できていない。それらについて、理解を深めることができれば、基礎的分野だけでなく、応用分野にも活かせると考え研究を進めた。

HP1の制御をより深く理解するために、その物性について検討した結果、研究発表（学会誌①）にあるように、これまで明らかにされていない分子運動性について報告できた。具体的には、HP1分子は、2つのドメインとそれを取り囲むように、Intrinsically disordered region (IDR)がある。

これまで、ケミカルクロスリンク法を用いて、HP1のN末端IDRがリン酸化されると、その部分は、正確な結合部位は明らかにされていないものの、分子中央にあってIDRとして知られるヒンジ領域 (HR) に結合するとされている。なお、HRはDNAやRNAにも配列非依存的に結合する。この重要なHR領域は、NMR解析などにより、非常に運動性の高い領域とされていた。私は、まず非リン酸化HP1 α の運動性について、右図に示す位置のアミノ酸にそれぞれ、電子スピンを導入し、その運動性について電子スピン共鳴法を使って詳細に調べた。

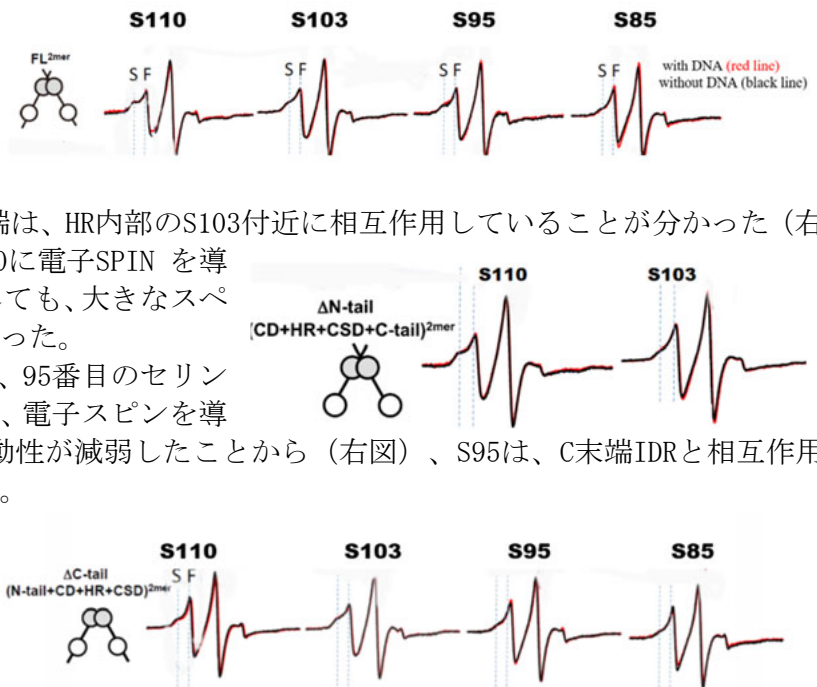
その結果、HR内部では、予想通り運動性が高いスペクトルを示すものの、遅い運動性を示すピーク (SLOW (S)) が現れた。その現れ方は、電子スピン導入部位によって異なることが分かったため、HR領域は均一に運動性が高いわけではなく、部位依存的な運動性を示すことが分かった (右図)。

そこで、103番目のセリン残基 (S103) をシステインに置換し電子SPINを導入し、かつN末端を削除すると、遅い運動性を示すピークが大きく減弱化し、N末端は、HR内部のS103付近に相互作用していることが分かった (右図)。

一方、C末端IDRの除去では、95番目のセリン残基をシステインに置換して、電子スピンを導入した場合 (S95)、遅い運動性が減弱したことから (右図)、S95は、C末端IDRと相互作用している可能性が示唆された。

さらに、HP1 α は、2量体を形成するので、この相互作用が2量体間で生じるかを、2量体形成変異体を用いて調べたところ、C末端とHRの相互作用は分子内、一方、N末端とHRの相互作用は2量体間 (分子間) で生じていることが示唆された。なお、これらスペクトル測定時に、HRに結合するとされるDNAを加えても、スペクトルに大きな変化が見いだせなかったため、DNAはHRとFuzzyな結合をしているものと考えている。驚いたことに、HRでなく、CDの運動性が、DNAを添加することで抑制されることを見出し、同時に報告した。

以上これらは、非リン酸化HP1 α を用いた研究であるが、今後、N末端がリン酸化されたときのHP1 α の制御を理解するうえで、重要な発見になると考えている。



(2) 細胞の栄養応答性について

この領域の研究は、まず細胞内での HP1 α や CKII 分子上の GlcNAc 修飾を市販の抗体（所有していた分もあるが）を用いて検討しようと様々試みたが、非常に難航し、研究が進展していない。つまり、GlcNAc 修飾が、安定に検出できなかったため、さらなる検討が要される。同時に、糖化修飾を行う酵素の発現は終わっているが、安定的に活性を得ていないため、それに関する研究も遅延している。

HP1 α のリン酸化については、リン酸化酵素である CKII 発現ベクターを入手したが、リン酸化 HP1 α を安定に発現精製するには至っていないが、近日中に可能になる見込みである。なお、すでに、複数の培養細胞を安定に培養する準備、リアルタイム PCR、ウエスタンなどの SETUP は整えることを終了した。抗体で簡便に検出する系が立ち上がり次第、より詳細な質量分析解析を、共同研究者と共に進める準備を整えている。

4. 研究の反省・考察

(1) HP1 α の機能について

研究をスタートして、HP1 α の分子ダイナミクスを検討すると、リン酸化される前の対照となる「非リン酸化 HP1 α の分子ダイナミクス」も、十分に理解されていないため、その解析に時間を要した。与えられた研究期間のため、非リン酸化の HP1 α について先行して研究・発表した（学会誌①(Suetake et al., 2023)）。

リン酸化部位の確定はできないものの、大腸菌内で主に HP1 α の N 末端がリン酸化されるといわれる実験条件を整えた。早急に研究成果を得るため、同時並行してリン酸化 MIMIC の変異体による研究を進めてきた。現在、preliminary ではあるが、驚いたことに、N 末端にリン酸化 MIMIC の変異を入れ、HR に結合するとされる条件にしても、その変異近傍のアミノ酸の運動性は低下せず、隣にある CD ドメインの運動性が低下することを見出した（未発表）。現在のところ、このリン酸化は、安定した生化学的結合を促進するのではなく、分子間・分子内で Fuzzy な結合を担っていると考えている。その点について、さらに研究を進めている。将来、詳細解析に必要な「半合成リン酸化 HP1 α 」について、NMR 解析により、タンパク質の変性・再生がうまく行きそうな部位を検討し、その部位を利用してリン酸化合成ペプチドと連結して用意する準備を整えている。

このように、栄養の分子機構を詳細に理解するため、物性の理解を進めている。今後、この課題領域については、進展があると考えている。

(2) 細胞の栄養応答性について

① GlcNAc 修飾抗体の反応性について

いくつかの抗体を使って検討したが、現在では信号が不安定であり、安定検出に至っていない。もちろん、脱糖鎖化阻害剤の検討も行ってきた。安定検出できていないため、培養細胞や動物肝を用いた実験が進行していない。研究計画時には、複数の市販抗体や論文があるため、容易に検出できると踏んだが問題である。

② OGT について

OGT は大腸菌で発現する準備がすでにできており、タグを複数変更すると共に、タグを除去する作業も行った。しかしながら、組換え体には、安定な糖化活性が認められなかった。そのため、本来であれば、全長の分子を使って解析する必要があるが、活性条件を検討するため、市販酵素の発現領域に絞り込んだ発現ベクターを作り終えたところである。この部分領域の組換え体には、安定に活性が認められ、全長酵素に活性が得られることになれば、すみやかに CKII などを処理して、酵素活性に影響を与えられるかを調べることができる。なお、OGT は、分子量が大きいため、経験的に大腸菌で安定精製ができるか心配があったが、研究計画時に調べた際、大腸菌発現による酵素を用いての活性やその構造の報告があるため、当方でも比較的容易に活性を手に入れることができると思ったのが問題である。

結論として、最も大きな反省点としてあげられるのは、タンパク質糖鎖（GlcNAc 修飾、OGT）に関して、多大な時間を要してしまい、計画通りに、研究が進んでいないことである。しかしながら、その過程で、順調であれば得られなかった想定外の経験を積むことにより、近い

うちに、何らかの業績として発表しうる研究の基盤を得た。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① **Suetake I***, Sato K, Sugishita T, Mishima Y, Takei T, Fujiwara T, Mutoh R, Shinohara A, Takui T, Miyata M, Hojo H, Arata T*. (2023) Dynamics of the HP1 Hinge Region with DNA Measured by Site-directed Spin Labeling-EPR Spectroscopy, *Appl Magn Reson.* **54**, 119–141. (*; corresponding) doi; 10.1007/s00723-022-01519-2

(2) 口頭発表

① **末武 勲** ヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) の動的理解、2023年3月3日、大阪大学蛋白質研究所セミナー タンパク質に挑戦する化学

(3) 出版物

① **Suetake I**, Mutoh R, Mishima Y, So M, Hojo H, Biological application of EPR. in Analytical techniques for the elucidation of protein function, pp. 13-38, **Suetake I**, Sharma RK, Hojo H, eds. Wiley. 2023