

氏 名	郭 浩根
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学 位 記 号 番 号	博理工甲第 1026 号
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	Characterization of Histone Variants and their Post-Translational Modifications by Proteomic Analysis (ヒストンバリエントと翻訳後修飾のプロテオミクスによる解析)
論 文 審 査 委 員	委員長 連携准教授 堂前 直 委 員 連携教授 眞貝 洋一 委 員 准 教 授 小竹 敬久 委 員 教 授 高橋 康弘

論文の内容の要旨

Histones and their post-translational modifications (PTMs) intricately exist in chromatin. Various histone variants are encoded by specific genes and they exhibit functions associated with chromatin dynamics. PTMs are decorated in histones and play a key role in chromatin remodeling that is associated with the biological activities. PTMs, which mainly exist in the N-termini of histones, are of interest to epigenetics and proteomics researchers because of their unique structural and functional features. Hence, characterization of histone variants and their PTMs is required for determining their site and sequence. Several histone variants and their PTMs have been discovered by using analytical techniques such as western blotting, antibody-based techniques, and other instruments. Specifically, mass spectrometry (MS) has become a universal and powerful tool for the characterization of histone variants and their PTMs due to its higher sensitivity, accuracy, and compatibility compared with other techniques. MS-based analytical techniques are being developed for identifying novel and specific histone variants and their PTMs. These efforts to date have provided useful information to proteomics and epigenetics researchers. Spermatogenesis is the process that generates sperms, and testis-specific histones are expressed during this stage. Some of the testis-specific histones have been reported to be associated with certain biological functions such as fertility. PTMs, including methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitination, which are associated with chromatin dynamics are detected during spermatogenesis. Despite several proteomic and epigenetic studies on histone variants and their PTMs during spermatogenesis, MS-based characterization has not been fully investigated. In this research, I have characterized histone variants and their PTMs by MS-based analysis in the mouse testis to provide proteomic and epigenetic information during spermatogenesis.

My first aim was a comprehensive characterization of histone variants in the mouse testis. Histone variants were separated using high performance liquid chromatography (HPLC) utilizing a reversed-phase (RP) column with ion-pairing reagent, followed by measuring intact histones using MS. Mass spectra were characterized by deconvolution and fragmentation based on the information obtained from the database. In this research, four testis-histone variants, H1t, TH2A, TH2B and H3t were detected in the mouse testis, which were not observed in the mouse epididymis. The results showed that over-expressed H2B and H3 variants were detected in the epididymis. In particular, approximately 80% of

H3t was proportionally compensated as an increase abundance of H3.2 in the epididymis, compared to the decreased abundance of H3t in the testis. Several histone variants, including somatic and testis-specific histones were identified by top-down analysis. Moreover, these analyses revealed the masses of PTMs on the histone variant using deconvolution.

My second aim was an improved attempt of our previous study to comprehensively detect PTMs on histones. I characterized the PTMs on the N-termini of histone H3 variants, including H3t, in the mouse testis using matrix assisted laser desorption/ionization-in source decay (MALDI-ISD) analysis. The matrix selection was a crucial factor for the MALDI-ISD. First, the matrix was selected for the analysis. Second, the H3 variants were separated using the HPLC, utilizing the RP column with ion-pairing reagent, and then measured using MALDI-ISD. In this research, super dihydroxybenzoic acid (sDHB) yielded higher sensitive and wide-ranged relative abundances compared to 1,5-diaminonaphthalene. Using sDHB as the matrix, I characterized the N- and C-terminal of H3 variants and identified lysine (K) 9 modifications using the fragmentation. Modifications on K9 of H3t were also detected in this research. In particular, an over-modified + 42 Da shift was observed from the K9 of H3t in the mouse testis. MALDI-ISD based top-down analysis showed a novel characterization process for histone tails, including their PTMs.

MS-based characterization research on histone variants and their PTMs is important to understand their specific patterns and sites. In this research, the results demonstrated a comprehensive approach for the characterization of histone variants and their PTMs using the MS-based top-down approaches. These strategies will provide information for future proteomic and epigenetic studies, which can be applied for identifying other samples to detect novel or specific patterns on proteins.

論文の審査結果の要旨

本学位論文の審査委員会は、当該論文の発表会を平成 28 年 7 月 29 日に埼玉大学理学部 3 号館第 3 会議室にて公開で開催し、詳細な質疑をもとに論文内容を審査した。以下に、学位論文の審査結果を要約する。

本論文は、エピゲノム制御を行うヒストンのバリエーション及びその翻訳後修飾の状態を網羅的に解析するための手法を開発し、マウス精巣と上皮細胞に適用して比較した研究である。

第一章では、序論として 1.1. ヒストンバリエーションと翻訳後修飾について及び 1.2. 質量分析でおこなわれてきたヒストンの翻訳後修飾解析について述べている。4つのコアヒストン（H2A, H2B, H3, H4）とリンカーヒストン（H1）には、それぞれいくつかのバリエーションが存在することが知られている。また、コアヒストンの N 末端付近には、メチル化、アセチル化、リン酸化といった多くの翻訳後修飾（Post-translational modifications, PTMs）があり、細胞分化、アポトーシス、遺伝子発現といった様々な生物活性において重要な役割を果たしていることが研究により明らかにされてきた。翻訳後修飾はクロマチンの再構成（Chromatin remodeling）に関与しており、活性型（Euchromatin）と抑制型（Heterochromatin）といったヒストンと DNA の間の物理的相互作用を変化させており、ヒストンにおける複雑な翻訳後修飾に基づくヒストンコード仮説が提唱され、クロマチンリモデリングとの関与が示されてきた。これに続き、ヒストンの機能と構造、特に翻訳後修飾の研究は進められてきているが、その詳細や全貌についての研究は進展中である。また、精子形成においてはバリエーションが変化することや精巣特異的ヒストンバリエーションが受精能に重要であることが示されている。加えて、現在までの質量分析によるヒストン解析の状況がまとめられ、完全に消化してペプチドを分析するボトムアップの手法とタンパク質から直接解析するトップダウンの手法に合わせ、中間的な大きさの断片を分析するミドルダウンの手法について解説している。その中で、バリエーションを分けてその変動を見つつ、バリエーションごとの修飾を解析するためにトップダウン法を選択して、ヒストンバリエーションの状態やその修飾状況について詳細に解析を行った。

第二章では、マウスの精巣を材料に、バリエーションを分離し、トップダウン質量分析法によるヒストンバリエーションの解析について記載されている。今までヒストンの分離は、逆相 HPLC で行われてきているが、これにイオンペア試薬として HFBA（Heptafluorobutyric acid）を利用することで、ヒストンのバリエーションを高度に分離・精製が可能であった。精巣と上皮を比べることで、精巣特異的バリエーションを容易に見つけることが出来た。これらのピークを、トリプシンで消化して MALDI-TOF MS 及び nLC-ESI-MS/MS にてペプチドマスフィンガープリント法及びシーケンスタグ法で同定を行いピークのアノテーションを行った。それぞれのヒストンを LC-MS 分析で正確に質量を測定することで、その修飾の状態を正確に把握することが出来た。精巣特異的 TH2B を含むヒストン H2B のバリエーションは理論値通りではほぼ修飾を受けておらず、マイナー成分として H2B1F, TH2B はアセチル化体が検出された。H2A では、主要な成分は理論値通りで修飾のない H2A.Z 以外は N 末端がアセチル化されて検出された。微量成分として、H2A1 はメチル化体が、H2A.X ではリン酸化体が検出できた。H3 ではハイパーメチル化が検出でき、H4 では N 末端がアセチル化され、かつジメチル化されたものが主要成分であり、その他メチル化・アセチル化の状態が違うものも検出された。TH2A, TH2B, H3t をトップダウン解析することで、アミノ酸配列の確認を行うことが出来た。H3t については、メチル化されているものを選んで分析したがメチル化の部位を正確に決めることはできなかった。翻

訳後修飾部位についての解析は多様性が高いため、この方法でさらに進めることは困難であったが、精巢ヒストンのバリエーションについてはその多様性を確認でき、修飾の状態について比較可能となった。

第三章では、ヒストンバリエーションごとの修飾部位解析について述べている。ヒストン H3 の K3, K9, K14 のメチル化・アセチル化状態が転写誘導とよく相関することが知られており、特に H3K9 のメチル化はヘテロクロマチン化を起こすことが知られている。H3K9 のメチル化状態を調べるには、2 章で開発した ESI を用いたトップダウン法では切断部位が限られてしまい、難しい。そこで、N 末端及び C 末端の配列情報が良く得られる MALDI-TOF MS による ISD (In source decay) 法を試みた。ヒストン H3 のバリエーションを第 2 章の方法で精製し、二つのマトリックス (sDHB, DAN) で ISD 法を比較した。分析の結果、sDHB を用いることで、N 末端から 26 残基までの配列情報を得ることが出来、特に H3K9 にメチル化による多様性があることが分かった。H3.1, H3.2, H3.3, H3t のメチル化状態では、H3t が特にトリメチル化が多く、他のバリエーションと異なることが判明した。

以上、本学位論文は、細胞内のヒストンのバリエーションやその修飾状態を調べるための方法の研究であり、かつこれを用いて精巢ヒストンの網羅的な状態を調べた研究である。ヒストン精製では今まで既存の方法より分離が向上し、各バリエーションを単離できた。また、H3K9 の修飾の状況も調べることが出来た。これらの方法は、発生の段階やクローン技術などエピゲノムの影響を調べる際にヒストンの網羅的な状態を見るための方法として今後さらに利用されることが期待される非常に重要な研究である。以上のことから、本論文は博士の学位に相当する内容であると判断された。