

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0143

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュ胚性ゲノム活性化におけるクロマチン核内配置と転写制御機構

研究課題名（英文）Chromatin organization and transcription regulation during zebrafish zygotic genome activation

研究代表者

佐藤 優子（Sato, Yuko）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：70435882

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュ初期胚で発現する遺伝子について、128-512細胞期における各遺伝子領域の核内局在箇所をHybridization chain reaction（HCR）を用いて調べた。各遺伝子間の相対距離には特徴的な傾向はみられず、互いに核内にランダムに配置していることが示唆された。ジェネリア・リサーチキャンパス（アメリカ、バージニア州）を訪問し、ライトシート顕微鏡SiMViewを用いたライブ観察を行った。また、ウッズホール海洋生物学研究所（アメリカ、マサチューセッツ州）で開催されたdiSPIM workshopに参加し、ライトシート顕微鏡diSPIMの基本原理や操作法を習得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初期発生過程における胚ゲノム活性化メカニズムは、未だ明らかでない部分が多く残されている。細胞核内のDNAはヒストンタンパク質と結合したヌクレオソームを基本単位として、クロマチンと呼ばれる高次構造を形成して機能的に収納されている。近年のクロマチン研究において、初期発生過程の転写活性化とクロマチン高次構造の制御に注目が集まっている。本研究成果は当該分野の新たな知見として重要な意義を持つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Nuclear localization of genes during zebrafish early zygotic genome activation (128-512 cell stages) was investigated using Hybridization chain reaction (HCR). The results showed that relative distances of genes varied in the nucleus, which suggested that each gene localizes randomly in the nucleus during early zygotic genome activation. The living embryos injected with live-cell probes for transcription activation and histone modification were imaged using a SiMView lightsheet fluorescence microscope at Janelia Research Campus (VA, USA). The principal and operation of a diSPIM lightsheet microscope were learned by anticipating the diSPIM workshop held in Marine Biological Laboratory (MA, USA).

研究分野：細胞生物学

キーワード：クロマチン ZGA ゼブラフィッシュ ライブイメージング HCR RNA FISH

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

有性生殖において、受精後しばらくの間は胚ゲノムからの転写活性がない状態で発生が進む。この間は卵に蓄積された母性因子 (RNA、タンパク質) により細胞機能が営まれ、その後母性因子が減少していくと、胚ゲノムからの大規模な転写活性化がおこる。胚ゲノム活性化がどのようなメカニズムでおこるのかについては、諸説唱えられているが明白な答えは未だ得られていない。クロマチン免疫沈降シーケンシング解析 (ChIP-seq) などから、ヒストンの翻訳後修飾のダイナミックな変化が観察されているが、転写活性化とヒストン修飾の因果関係は詳しく調べられていなかった。この「ヒストン修飾の変化が転写活性化を促進しうるのか」という問いに答えるためには、まず転写活性化の前後でのヒストン修飾レベルの変化を継時的に観察する必要がある。我々はこれまで、翻訳後修飾に特異的な抗体由来する蛍光プローブを用いて、生きた細胞の中で転写活性化やヒストン修飾を可視化する技術を開発してきた。特に、Fab-based Live Endogenous Modification Labeling (FabLEM) は、抗原結合断片 (Antigen binding fragment; Fab) さえ調製できればどの修飾でも観察できる比較的簡便な方法である (図 1; Hayashi-Takanaka Y. et al. JCB. 2009; NAR. 2011)。

基課題「胚性ゲノム活性化に伴うヒストン修飾動態の in vivo イメージング」(基盤 C、平成 27~30 年度) では、転写活性化の指標として、RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニット C 末端反復配列 (TSPTSPS) 中の Ser2 リン酸化 (RNAP2 Ser2ph) に対する蛍光標識 Fab を一細胞期のゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションにより導入しライブイメージングを行った。取得したタイムラプス画像から細胞核と細胞質のシグナル強度を定量化して細胞質に対する細胞核のシグナル比を算出することで、一細胞レベルでの継時的な修飾動態を計測した。これまでの解析の結果、(1) RNAP2 Ser2ph 特異的 Fab の細胞核への濃縮率を指標として、全ゲノムレベルでの転写活性化を可視化することができること (図 2)、(2) 全ゲノムレベルの転写活性化に先んじて、細胞核内で活性化型 RNA ポリメラーゼの局所的な集積 (foci) が見られること (図 3)、(3) ヒストン H3 Lys27 アセチル化修飾 (H3K27ac) レベルが、全ゲノムレベルでも foci でも転写活性化よりも先に上昇すること (図 2、3)、を明らかにした (Sato Y. et al. Development 2019)。

2. 研究の目的

本研究では、基課題をさらに発展させるため、発生初期に見られる局所的な RNAP2 Ser2ph の集積部位 (図 3) において、どのような遺伝子群が転写されているのかを明らかにし、初期胚の転写活性化機構を解明することを目的とした。具体的には、生細胞中の転写産物の可視化法や、固定した細胞の mRNA の 1 分子レベルでの可視化、定量解析法を独自に樹立しているニューヨーク大学の Timothee Lionnet 博士 (Long X. et al. Nat Methods. 2017; Trcek T. et al. Nat Protoc. 2017) と共同研究を開始し、Lionnet 博士の転写産物可視化技術と我々の Fab による転写活性化

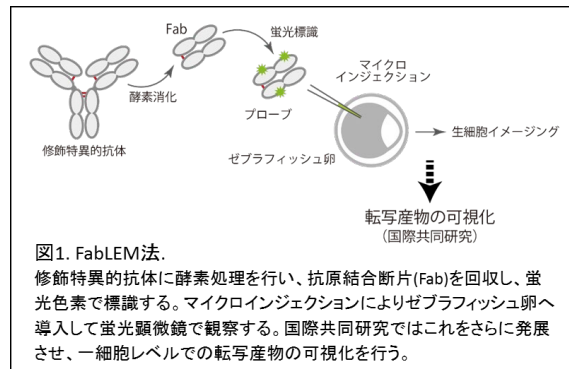


図1. FabLEM法.

修飾特異的抗体に酵素処理を行い、抗原結合断片 (Fab) を回収し、蛍光色素で標識する。マイクロインジェクションによりゼブラフィッシュ卵へ導入して蛍光顕微鏡で観察する。国際共同研究ではこれをさらに発展させ、一細胞レベルでの転写産物の可視化を行う。

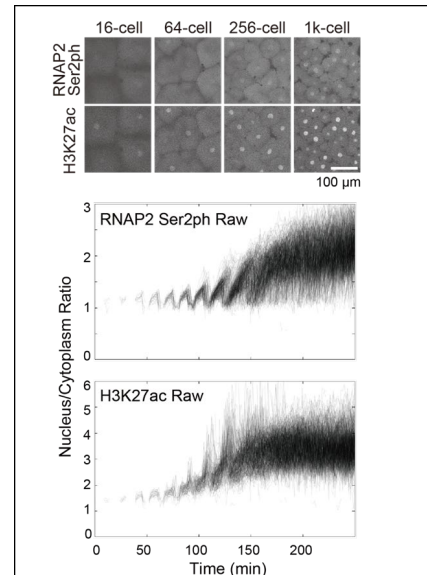


図2. 胚ゲノム活性化とヒストン修飾動態の可視化。転写の指標 (RNAP2 Ser2ph) とヒストン H3Lys27 アセチル化修飾 (H3K27ac) を同時に観察した。全ゲノムレベルにおいて H3K27ac が転写に先んじて上昇した。

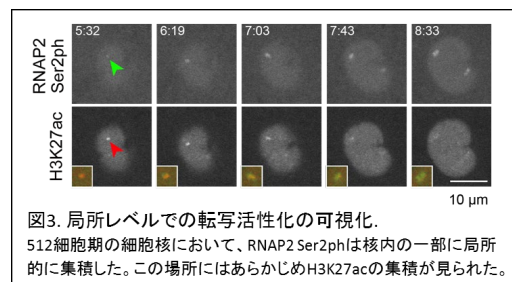


図3. 局所レベルでの転写活性化の可視化。

512細胞期の細胞核において、RNAP2 Ser2phは核内の一部に局所的に集積した。この場所にはあらかじめH3K27acの集積が見られた。

の可視化技術を合わせることで、ゼブラフィッシュ胚ゲノム活性化初期に、産生される転写産物の種類とその発現レベル、さらに遺伝子の核内局在を明らかにすることを目的とした（図1）。

3. 研究の方法

① ゼブラフィッシュ初期胚において活性化される遺伝子の核内配置

Heyn らの報告 (Heyn P. et al. Cell Reports 2014) をもとに、ゼブラフィッシュ初期胚で早期に発現する遺伝子9個を選択し、Hybridization chain reaction (HCR) 法により nascent RNA を検出するためのイントロンプローブの設計を行った。ゼブラフィッシュ受精卵に転写開始可視化プローブ (Alexa Fluor 488 標識 RNAP2 Ser5ph-Fab) をマイクロインジェクションし、共焦点蛍光顕微鏡を用いてライブイメージングを行った。128 細胞期、256 細胞期、512 細胞期について、転写開始 foci が観察されたタイミングで胚を固定した。固定した胚に対して標的となる遺伝子の HCR プローブを用いてハイブリダイゼーション反応を行った。遺伝子間の相対的な核内配置の比較を行うため、発生初期のステージを通して顕著な転写活性化が観察されたマイクロ RNA 遺伝子 (miR-430) に対する RNA FISH を同時に行った。HCR および FISH 反応後の胚を共焦点顕微鏡を用いて観察し、画像解析ソフト ImageJ により遺伝子間の距離を調べた。

② ライトシート顕微鏡を用いたゼブラフィッシュ初期胚の高速・高解像度ライブイメージング

ジェネリア・リサーチキャンパス (アメリカ、バージニア州) において、フィードバック補正機能のあるライトシート顕微鏡 SiMView を用いて、転写活性化及びヒストン翻訳後修飾を可視化するための蛍光プローブを導入したゼブラフィッシュ初期胚のライブイメージングを行った。また、ウッズホール海洋生物学研究所 (アメリカ、マサチューセッツ州) で開催された diSPIM workshop に参加し、diSPIM ライトシート顕微鏡の基本原理や操作法を習得した。

4. 研究成果

① ゼブラフィッシュ初期胚において活性化される遺伝子の核内配置

ゼブラフィッシュ初期胚で早期に発現する遺伝子9個について、512 細胞期の転写開始時にタイミングを合わせて固定した胚に対して HCR および RNA FISH を行い、プローブの特異性および感度

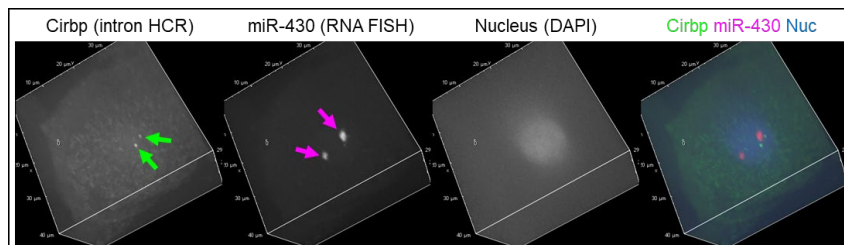


図4. HCR法によるCirbp nascent RNAの検出。

512細胞期の胚に対してCirbp遺伝子のイントロンに対するプローブを用いて、Cirbp nascent RNAを検出した(緑矢印)。miR-430転写産物をRNA FISHにより同時に検出した(マゼンタ矢印)。60倍レンズを用いて0.5 μm間隔で撮影した58枚の画像をNIS-elements 3Dプロジェクションで表示した。

の検証を行った。染色したサンプルはスピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いて撮影した。Cirbp 遺伝子の検出例を図4に示した。9個の遺伝子うち、hnrnpa1、Nanog、Cirbpの3つが検出可能であった(表1)。hnrnpa1、Nanog、Cirbp 遺伝子について、128 細胞期、256 細胞期、512 細胞期の胚で検出を行った。Nanog 遺伝子についての解析例を図5に示した。各遺伝子と miR-430 転写産物との核内相対位置を ImageJ で解析した(図6)。128 細胞期から 512 細胞期の間で、各遺伝子間の相対距離には特徴的な傾向はみられず、互いに核内にランダムに配置していることが示唆された。

Gene name	Chromosome	# probe pairs	Result (512-cell)	
			FISH signal (miR-430)	HCR signal
hnrnpa1	23	11	✓	2 spots
zgc:193933/Nanog	24	11	✓	2 spots
mycl1a	13	11	✓	None
cirbp	22	7	✓	2 spots
cd2bp2	3	20	None	None
hmga1a	23	20	✓	None
si:ch211-116m6.3/psip	23	20	✓	None
ctcf	18	17	✓	High background (aggregation)
rab11fp1b	10	20	✓	None

表1. HCR法による早期発現遺伝子領域の検出。

ゼブラフィッシュZGAの早期に発現する9個の遺伝子に対してHCRプローブを設計し、512細胞期の胚に対して検出を試みた。Hnrnpa1、Nanog、cirbpは検出可能であった。

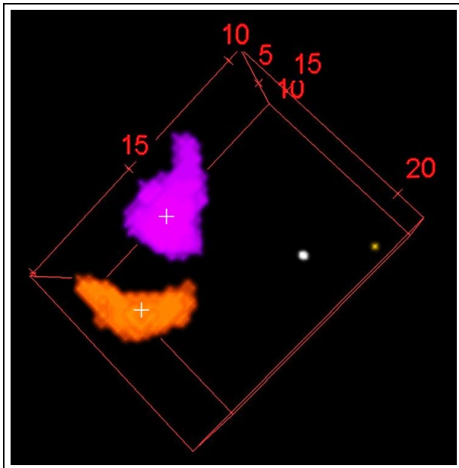


図5. Nanog nascent RNAとmiR-430転写産物の相対位置の解析。
512細胞期の胚で検出したNanog nascent RNA(白・黄スポット)とmiR-430転写産物(マゼンタ・オレンジ領域、重心を「+」で示した)の核内相対位置をImageJを用いて解析した。

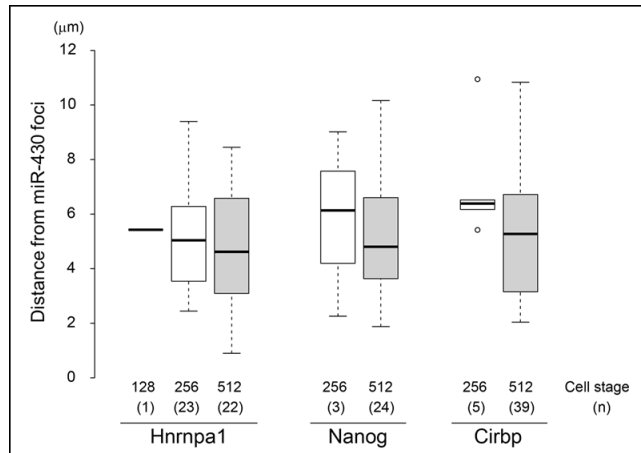


図6. 早期発現遺伝子nascent RNAとmiR-430転写産物の相対位置の解析。
128、256、512細胞期の胚で検出した各遺伝子のnascent RNAとmiR-430転写産物の核内相対位置をImageJを用いて解析し、プロットした。どの遺伝子も相対位置に特徴的な傾向はみられず、核内にランダムに配置していることが示唆された。

② ライトシート顕微鏡を用いたゼブラフィッシュ初期胚の高解像度イメージング

ジェネリア・リサーチキャンパス (アメリカ、バージニア州) を訪問し、Philipp Keller 博士および Advanced Imaging Center の協力のもと、ライトシート顕微鏡 SiMView を用いた観察を行った。転写活性化及びヒストン翻訳後修飾を可視化するための蛍光プローブを導入したゼブラフィッシュ初期胚のライブ観察画像を図7に示す。SiMView はフィードバック補正機能を搭載しているため、ゼブラフィッシュ初期胚全体を高度な時空間分解能でライブ観察することができた。この観察結果は、基課題の成果と併せて論文に発表した (Sato Y. et al. Development 2019)。また、ウッズホール海洋生物学研究所 (アメリカ、マサチューセッツ州) で開催された diSPIM workshop に参加し、diSPIM ライトシート顕微鏡の基本原則や操作法を習得した。固定したゼブラフィッシュ胚を観察したところ、Z 軸方向の解像度の改善がみられた (図8)。しかしながら、直行する2つの光路を用いた画像取得には時間がかかるため、初期胚の速い変化をとらえるためには撮影速度を短くする工夫 (シグナル輝度を向上させるなど) が必要であることが分かった。

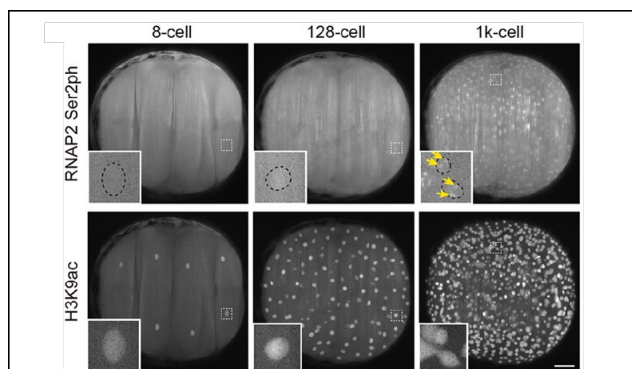


図7. ライトシート顕微鏡SiMViewを用いたライブイメージング。
転写活性化 (RNAP2 Ser2ph) およびヒストン修飾 (H3K9ac) を可視化する蛍光標識Fabプローブをマイクロインジェクションしたゼブラフィッシュ胚をアガロースゲルに包埋し、ライトシート顕微鏡SiMViewを用いてライブイメージングを行った。白破線の箇所を左下に拡大して示した。上段黒破線枠は細胞核の位置を示す。黄色矢印は細胞核内で転写活性化部位が集積している部分を示す。スケールバーは100 μm。

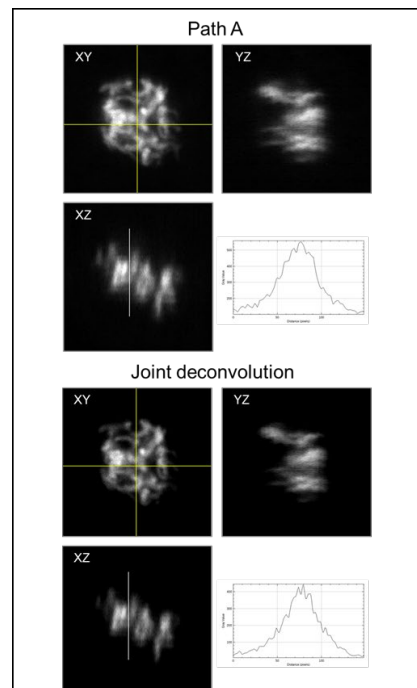


図8. ライトシート顕微鏡diSPIMを用いたイメージング。
ゼブラフィッシュ1k-cell stage胚を固定し、DAPI染色を行った。diSPIMを用いて撮影した胚の画像から、分裂期の細胞に注目して全中期～中期の染色体を拡大して示した。片側の光路を用いて観察した場合 (Path A) と比較して、直行する2光路により得られたシグナルを併せて修正した画像 (Joint deconvolution) ではXZ、YZ方向の解像度が向上していることが分かった。XZ画像の白線上のシグナルのラインプロットをグラフで示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Y, Hilbert L, Oda H, Wan Y, Heddleston JM, Chew T-L, Zaburdaev V, Keller P, Lionnet T, Vastenhouw N, and Kimura H	4. 巻 146
2. 論文標題 Histone H3K27 acetylation precedes active transcription during zebrafish zygotic genome activation as revealed by live cell analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev179127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.179127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hilbert Lennart, Sato Yuko, Kuznetsova Ksenia, Bianucci Tommaso, Kimura Hiroshi, Julicher Frank, Honigsmann Alf, Zaburdaev Vasily, Vastenhouw Nadine L.	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcription organizes euchromatin via microphase separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21589-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tjalsma Sjoerd J D, Hori Mayako, Sato Yuko, Bousard Aurelie, Ohi Akito, Raposo Ana Claudia, Roensch Julia, Le Saux Agnes, Nogami Jumpei, Maehara Kazumitsu, Kujirai Tomoya, Handa Tetsuya, Bages Arnal Sandra, Ohkawa Yasuyuki, Kurumizaka Hitoshi, da Rocha Simao Teixeira, Zylicz Jan J, Kimura Hiroshi, Heard Edith	4. 巻 22
2. 論文標題 H4K20me1 and H3K27me3 are concurrently loaded onto the inactive X chromosome but dispensable for inducing gene silencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e51989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchino Satoshi, Ito Yuma, Sato Yuko, Handa Tetsuya, Ohkawa Yasuyuki, Tokunaga Makio, Kimura Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Visualizing transcription sites in living cells using a genetically encoded probe specific for the elongating form of RNA polymerase II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.27.441582	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Sato, Hiroshi Kimura	4. 巻 2329
2. 論文標題 Dynamic Behavior of Inactive X Chromosome Territory During the Cell Cycle as Revealed by H3K27me3-Specific Intracellular Antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 237-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤優子、Nguyen Thi Bich Ngoc、小田春佳、半田哲也、西原秀典、原田哲仁、大川恭行、木村宏
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of histone modifications during zebrafish zygotic genome activation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Sato, Lennart Hilbert, Vasily Zaburdaev, Nadine Vastenhouw, and Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Histone modification dynamics during zygotic genome activation
3. 学会等名 International Symposium for Female Researchers in Chromatin Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	リオネット ティモシー (Lionnet Timothee)	ニューヨーク大学・Grossman School of Medicine・Assistant Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
アメリカ合衆国	ニューヨーク大学			