

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K06062  
研究課題名(和文) 単一遺伝子座のエピジェネティック動態解析を指向した生細胞イメージング手法の開発  
  
研究課題名(英文) Development of a live cell imaging method for visualization of epigenetic dynamics at a single locus  
  
研究代表者  
岡田 悟 (Okada, Satoshi)  
  
九州大学・医学研究院・助教  
  
研究者番号：30734488  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンの翻訳後修飾が「どのタイミングで」「どの細胞で」「どの種類の修飾が」「ゲノム上のどの位置で」生じるのか同時に調べることができる手法を構築するための要素技術の開発を進めた。具体的には、特定遺伝子座でのヒストン修飾変化を可視化を指向したBiFCの高度化を試みた。GFP結合タンパク質の共発現によって、GFP由来蛍光タンパク質のBiFCシグナルの増強効果が得られることを見出した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

BiFCは生きた細胞の中で2つのタンパク質が近接したことを検出することのできる手法である。ヒストン修飾の変化を生細胞内で追跡する手法を実現するためには、BiFCによって再構成されたタンパク質の輝度と光安定性を高める必要がある。本研究では、GFP結合タンパク質を共発現させることで、GFP由来蛍光タンパク質のBiFCシグナルの増強効果が得られることを見出した。この現象は、複数のGFP由来蛍光タンパク質で生じ、かつ、細胞質および細胞核内でのタンパク質間相互作用によるBiFCを増強できることを確認した。上記のBiFCの増強効果はBiFCを利用する系に幅広く適用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：At present, no method allows us to simultaneously investigate when, in which cell, which type of modification, and at which position in the genome post-translational modifications of histones occur. We are attempting to develop elemental technologies to construct such a method. Specifically, we attempted to improve the BiFC to visualize histone modification changes at specific loci. We found that co-expression of GFP-binding proteins enhances the BiFC signal and delays the fading effect of GFP-derived fluorescent proteins.

研究分野：分子生物学

キーワード：BiFC 可視化 生細胞イメージング 出芽酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命システムは柔軟性を持つ。その根底にあるのは、保持しているゲノム DNA 配列そのものは不変であっても、環境の変化などの外部刺激や細胞周期の進行などの内因性の情報に応じて、その読み出しパターンを変化させ、そのパターンを保持・継承するという機構である。この機構はエピジェネティック制御と呼ばれる。DNA のメチル化とヒストンの翻訳後修飾というふたつの分子機構がエピジェネティック制御において中核的な役割を果たしている。

ヒストンは DNA に結合するタンパク質である。ヒストン 8 量体に DNA が巻き付いた構造はヌクレオソームとよばれ、クロマチンの構成単位となっている。ヒストンは N 末側にテイルとよばれる部分を持ち、この領域には翻訳後修飾を受ける残基が複数存在する。ヒストンテイルの翻訳後修飾によって、近傍の遺伝子の転写やクロマチン構造の制御がなされている。ヒストンの翻訳後修飾の種類は多様であり、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化などが知られている。ヒストンの修飾は、修飾の種類、修飾を受けた残基、修飾同士の組み合わせによって多様な機能を発揮する。これまで、各修飾の「書き込み」「消去」「読み出し」を担う分子の同定が数多くなされるとともに、これらのヒストン修飾関連タンパク質と修飾ヒストンテイルペプチドの共結晶構造が解析され、詳細な結合様式が明らかになっている例も多い(Patel and Wang, 2013, PMID:23642229)。

ヒストン修飾は可逆的なものであり、この可逆性がエピジェネティック制御の柔軟性を規定している。その制御メカニズムを理解するためには、「どのタイミングで」「どの細胞において」「どの種類の修飾が」「ゲノム上のどの位置で」生じるのか、つまり、ヒストン修飾の時空間的動態を追跡し、それに加えて、下流の生命現象との関連性を調べることでできる実験手法が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

「どの種類の修飾が」「ゲノム上のどの位置で」生じているかを調べる方法としては、クロマチン免疫沈降法(ChIP)がある。次世代シーケンシング技術と組み合わせた手法(ChIP-Seq)により、特定のヒストン修飾の分布をゲノムワイドに調べることができる。しかしながら、試料として多数の細胞を必要とし、また、細胞の破碎をとまなう手法であるため、「どの細胞において」という情報を得ることは困難であり、また、修飾の生じた細胞のその後の挙動を追跡することはできない。

個々の細胞に注目したヒストン修飾解析手法としては、蛍光体で標識した抗修飾ヒストン抗体を細胞にインジェクトする方法(Hayashi-Takanaka et al., 2011, PMID:21576221)や、抗修飾ヒストン抗体フラグメントと蛍光タンパク質の融合タンパク質を細胞内で発現させる方法(Sato et al., 2013, PMID:23942372)が試みられている。これらは非侵襲的な方法であり、「どのタイミングで」「どの細胞において」「どの種類の修飾が」生じているのかを知ることができるが、注目しているヒストン修飾が「ゲノム上のどの位置で」生じているのかを区別することができない。

ヒストン修飾を介したエピジェネティック制御動態を単一細胞レベルで理解するため、これらの方法の限界を克服し、「どのタイミングで」「どの細胞において」「どの種類の修飾が」「ゲノム上のどの位置で」生じるのかを生細胞内で連続的に追跡できる独自の手法を開発することを本研究の目的とする。

本提案手法を技術的に確立することができれば、ヒストン修飾を介したエピジェネティック制御の動的側面をより深く定量的に理解できるようになり、一細胞を対象としたゲノムワイド解析と相乗的にエピジェネティクス研究に寄与することができると期待される。

### 3. 研究の方法

生細胞内において特定の遺伝子座近傍で生じるヒストン修飾の変化を可視化するためには、a) 遺伝子座を特定する、b) ヒストン修飾の有無を検出する、c) 特定の遺伝子座でヒストン修飾に変化があったことを検出可能な情報に変換する、3つのモジュールを組み合わせる必要がある。本研究においては、以下の組み合わせを利用する。

- 遺伝子座特定モジュールとして dCas9 + ガイド RNA (CRISPR/Cas9 システムに由来)
- ヒストン修飾検出モジュールとして ヒストン修飾認識ドメイン
- 情報変換モジュールとして Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)

化膿レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* は CRISPR/Cas9 システムとよばれる防御機構を持つ。この機構において、ファージなどに由来する外来 DNA を切断する酵素が Cas9 である。Cas9 はガイド RNA (gRNA) と複合体を形成し、gRNA によって指定される DNA 上の領域でハイブリダイゼーションを生じて結合し、DNA を切断する。dCas9 は Cas9 に D10A, H840A の変異を導入したものであり、gRNA との複合体形成を介した DNA への結合活性をもつが、DNA の切断活性をもたない。よって、dCas9 との融合タンパク質をつくり、適切な gRNA を設計することで、任意のタンパク質をゲノム DNA 上の特定の位置に局在させることが可能になる。

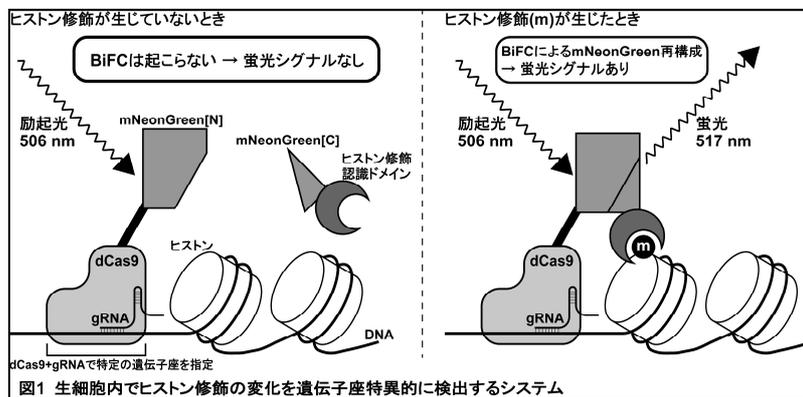


図1 生細胞内でヒストン修飾の変化を遺伝子座特異的に検出するシステム

細が明らかになっている例が多くある。構造情報に基づいて、ヒストン修飾認識ドメインを切り出して、ヒストン修飾の変化を検出するモジュールとして利用することができる。BiFCは生細胞内でタンパク質間相互作用の検出に用いられる。タンパク質Aに蛍光タンパク質mNeonGreenのN末側フラグメント(mNeonGreen[N])を、タンパク質BにmNeonGreenのC末側フラグメント(mNeonGreen[C])をそれぞれ融合させておく。タンパク質A-Bが相互作用する場合(分子間距離が約15nmにまで近接)、mNeonGreenが再構成されて蛍光分子団が形成され、蛍光が観察される。この方法で生細胞内のタンパク質間距離情報を蛍光シグナルとして読みだすことができる。

以上の3つのモジュールを組み合わせることによって、「特定の遺伝子座」での「ヒストン修飾の変化」を「生細胞内で検出する」ことが可能になる。すなわち、dCas9にmNeonGreen[N]を、ヒストン修飾認識ドメインにmNeonGreen[C]をそれぞれ融合させたものを細胞内で発現させる。この条件下では、gRNAによって指定された遺伝子座近傍で特定のヒストン修飾が起こった時だけBiFCを生じ、mNeonGreenの蛍光が観察されることになる(図1)。

#### 4. 研究成果

##### 【GFP結合タンパク質の共発現によるBiFCシグナルの増強効果の発見】

出芽酵母のセントロメア特異的なヒストンH3パリアントであるCse4タンパク質間のVenus-BiFC系をモデルとして用いた。GFP結合タンパク質の同時発現によって、BiFCフラグメント間の相互作用を安定化することでBiFC効率を高めることを試みた。その結果、Cse4-Cse4 BiFC系と共にGFP結合タンパク質を発現させることによって、Cse4-Cse4 Venus-BiFCシグナルの中央値を約5倍上昇させることができた。

##### 【高輝度・高光安定性蛍光タンパク質の新規BiFC化】

従来BiFCに利用されてきたVenusを始めとする蛍光タンパク質は蛍光輝度および光安定性の面で改善の余地がある。本研究では、近年発表された高輝度・高光安定性蛍光タンパク質を新規にBiFC化することを試みた。これまで当研究室でBiFC化してきた蛍光タンパク質と合わせて、下記の幅広い波長の蛍光タンパク質シリーズをBiFC化することができた。

[黄緑色蛍光タンパク質] mClover3, mNeonGreen

[黄色蛍光タンパク質] YPet, mGold

[赤色蛍光タンパク質] mRuby2, mRuby3, mScarlet-1

##### 【GFP結合タンパク質の共発現によるBiFCシグナルの増強効果の一般性】

Cse4タンパク質間Venus-BiFC系で確認された、GFP結合タンパク質によるBiFCシグナルの増強効果について、その一般性を確かめる実験を実施した。GFP結合タンパク質によるVenus-BiFCシグナルの増強効果は、核小体タンパク質複合体ペアであるNet1-Sir2間や細胞膜直下の細胞質側に局在するCdc11-Smt3間でも確認された。また、Venusの他、YPet, mGold, mClover3といった、GFPに由来する改変型蛍光タンパク質についてもGFP結合タンパク質の共発現によるBiFCシグナルの増強効果が確認された。GFP-GFP結合タンパク質の共結晶構造情報を解析し、GFP-GFP結合タンパク質間の相互作用に必要なGFP側のアミノ酸残基59残基を特定した。GFP由来の蛍光タンパク質ではこれら59残基の保存性が高いのに対して、GFPに由来しない蛍光タンパク質では、保存性が低いことが明らかになった。この結果と対応して、GFPに由来しない蛍光タンパク質の場合には、GFP結合タンパク質によるBiFCシグナル増強効果が見られなかった。以上の結果から、GFP結合タンパク質の共発現によるBiFCシグナルの増強効果は、幅広い相互作用タンパク質ペアおよび幅広い蛍光タンパク質(GFP由来)について適用可能であることが示唆される。

生体内において、ヒストンのテイル部分には多様な修飾がなされ、それぞれの修飾を特異的に認識するタンパク質がその情報を「読み出す」役割を持ち、クロマチン構造の変化などに関与している。これらの修飾ヒストン読み出しタンパク質と修飾ヒストンテイルペプチドの間の結合様式は、結晶構造解析によってその詳

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Doi Goro, Okada Satoshi, Yasukawa Takehiro, Sugiyama Yuki, Bala Siqin, Miyazaki Shintaro, Kang Dongchon, Ito Takashi	4. 巻 49
2. 論文標題 Catalytically inactive Cas9 impairs DNA replication fork progression to induce focal genomic instability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 954 ~ 968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa1241	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田悟、中川志都美、神野聖也、伊藤隆司
2. 発表標題 CRISPRとBiFC を利用して特定遺伝子座へのタンパク質リクルートメントを生細胞内で可視化する手法
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田悟、中川志都美、伊藤隆司
2. 発表標題 Rad52の画像解析を利用してin vivoでのガイドRNAの機能性を評価する
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田悟、中川志都美、伊藤隆司
2. 発表標題 A simple microscopic method to evaluate in vivo functionality of guide RNAs by imaging Rad52
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土井 吾郎、岡田 悟、伊藤隆司
2. 発表標題 dCas9はタンデムリピート配列のコピー数を不安定化させる
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 悟、中川志都美、神野聖也、伊藤隆司
2. 発表標題 CRISPRとBiFCを利用した遺伝子座特異的タンパク質-タンパク質近接イベント可視化手法の開発
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 悟、中川志都美、神野聖也、伊藤隆司
2. 発表標題 CRISPRとBiFCを利用した遺伝子座特異的なタンパク質間近接事象の可視化
3. 学会等名 第51回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 悟、中川志都美、神野聖也、伊藤隆司
2. 発表標題 CRISPRとBiFCを利用して特定遺伝子座へのタンパク質リクルートメントを生細胞内で可視化する手法の開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 悟
2. 発表標題 出芽酵母でのCRISPR/Cpf1 システムの利用について
3. 学会等名 酵母研究若手の会第5回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 悟
2. 発表標題 出芽酵母向けゲノム編集ツールについて
3. 学会等名 酵母研究若手の会 第6回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田 悟、土井吾郎、楠元恵美子、伊藤隆司
2. 発表標題 簡便に利用できる出芽酵母ゲノム編集向けプラスミドシリーズの構築
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回研究報告会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------