

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370076
 研究課題名 (和文) 特異的ヒストン修飾を持つクロマチンの構造と動態の解明
 研究課題名 (英文) The structure and dynamics of chromatin harboring specific histone modifications
 研究代表者
 木村 宏 (KIMURA HIROSHI)
 大阪大学・生命機能研究科・准教授
 研究者番号：30241392

研究成果の概要 (和文)：

特定のヒストン修飾を持つクロマチンの構成成分とダイナミクスを明らかにするため、ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体を用いた免疫沈降と質量分析、及び、生細胞観察を行った。転写抑制や活性化に関わる修飾の特異的抗体ビーズを作製し、クロマチン免疫沈降を行い、共沈した蛋白質を同定した。また、抗体の抗原結合断片を調製し蛍光標識した後、培養細胞に導入することで、生きた細胞でヒストン修飾を検出することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

To understand the structure and dynamics of specialized chromatin harboring distinct histone modifications, we employed chromatin immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis and live cell imaging by using modification-specific monoclonal antibodies. Using affinity beads coated with different antibodies, distinct sets of proteins were identified as components of chromatin enriched in specific modifications. A method for visualizing specific histone modifications in living cells was also developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体構造・機能・分配、クロマチン、核構造、細胞周期、細胞構造、機能

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞核中の DNA は、クロマチンの基本単位であるヌクレオソーム構造 (146～147 塩基対の DNA が、H2A、H2B、H3、H4、各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体を取り

巻いた構造) をとって存在している。ヒストン分子の修飾は、Lys 残基のメチル化、アセチル化、ユビキチン化、Arg 残基のメチル化、Ser と Thr 残基のリン酸化など多岐にわたっており、遺伝子発現制御、DNA 修復、染色体

凝縮などに重要な役割を果たしている。従って、これらの修飾の制御機構を明らかにすることは、染色体機能発現の基本原則を理解するうえで必須な課題であるだけでなく、再生医療や癌などの疾病の治療にも貢献できると考えられる。

ゲノム上のヒストン修飾のプロファイルの解析には、修飾されたヒストンを特異的に認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) が用いられ、また、特異抗体を用いた免疫蛍光染色により細胞核内におけるヒストン修飾の空間的情報も得ることができる。修飾ヒストンに対する抗体は多種類に渡って市販されているが、その多くはウサギポリクローナル抗体であるため、ロット間で差がある上に、我々が行った ELISA による解析では、特定の修飾に対する特異性が低いものも多く見られた。そこで、我々は修飾ヒストンを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を進めてきた。実際に、これらの抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行ったところ、トリメチル化 H3 Lys4 (H3K4me3) は転写されている遺伝子の転写開始点付近に、ジメチル化 H3 Lys4 (H3K4me2) は開始点から少し下流に、そしてトリメチル化 H3 Lys9 (H3K9me3) は不活性な遺伝子に濃縮されて存在することが確認できた。従って、我々が樹立したモノクローナル抗体を使用することで、特別な修飾を持つクロマチンの構成成分や生細胞における動態を系統的に明らかにできると考え、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、ChIP とプロテオミクスを用いた生化学的方法、及び、蛍光標識抗体を用いた細胞生物学的方法により、特異的な修飾を持つヒストンが濃縮されたクロマチンの構造と動態を明らかにすることを目的として行った。具体的には、修飾ヒストンモノクローナル抗体を用いて ChIP を行い、特定の修飾を持つヒストンを含むクロマチンを回収し、プロテオミクス解析によりそれぞれの修飾ヒストンと結合している蛋白質の同定を行う。そして、それらのクロマチン構成蛋白質の細胞周期に伴う変化、及び酸化ストレスや熱ショックなど様々な刺激に対応した変化を明らかにする。さらに、特異的修飾抗体により回収されるヒストンがどのようなバリエーションにより構成されるか、また、その他にどのような修飾を受けているのかを明らかにする。また、蛍光標識抗体を用いて生細胞内の異なる修飾クロマチンドメインの動態を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 特定の修飾を持つヒストンを含むクロ

マチンの構成成分の同定

H3K9me3、アセチル化 H3 Lys9/27 (H3K9/27ac)、トリメチル化 H3 Lys27 (H3K27me3) 特異的モノクローナル抗体を精製し、protein A アガロースに吸着させた後、dimethyl pimelimidate で架橋することで、抗体ビーズを作製した。コントロールとしてマウス IgG と RNA ポリメラーゼ II 特異的抗体ビーズも作製した。

細胞をホルムアルデヒドで処理してクロマチン蛋白質と DNA を架橋し、超音波処理によりクロマチンの断片化を行った。断片化されたクロマチンを抗体ビーズと混合し、ビーズに結合したクロマチンを回収した。SDS でクロマチンを溶出した後、熱処理により脱クロソリンクし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した。蛋白質の検出は、Coomassie Brilliant Blue 染色、特異的抗体を用いた Western ブロッキング、質量分析などにより行った。

(2) ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体を用いた生細胞内ヒストン修飾ダイナミクスの可視化

修飾特異的モノクローナル抗体から Fab を調製し、蛍光色素とコンジュゲートした後、ビーズローディング法を用いてガラスボトムディッシュ上の培養細胞に導入した。そして、EM-CCD を装着した蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行った。

4. 研究成果

(1) 特定の修飾を持つヒストンを含むクロマチンの構成成分の同定

特定のヒストン修飾を持つクロマチンを濃縮するために、修飾ヒストン特異的抗体ビーズを調製した。HeLa 細胞を 10 分間ホルムアルデヒド処理して蛋白質と DNA の架橋を行った後、これらのビーズを用いてクロマチン免疫沈降を行い、目的の修飾が免疫沈降物に濃縮されているかどうかを Western ブロッキングにより確認した (図 1)。その結果、H3K9me3 及び H3K9/27ac が、それぞれの特異的抗体ビーズにより回収されることが明らかになった。

この免疫沈降産物を SDS-PAGE で分離後、ゲルの断片化、トリプシン消化を行い、質量分析 (LC-MS) により、共沈する蛋白質を同定した。その結果、ヒストン H1 や FACT (Facilitating Chromatin Transcription) などクロマチンに比較的多量に存在する蛋白質は、H3K9ac と H3K9me3 抗体ビーズで共に回収されることが分かった。また、転写や修復の制御に関わる PML (Promyelocytic Leukemia) は H3K9/27ac 抗体ビーズに、ヘテロクロマチン蛋白質 HP1 は H3K9me3 抗体ビー

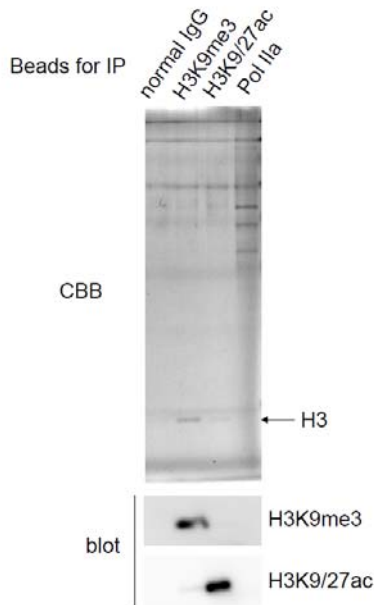


図1. ChIP-western

HeLa細胞をクロスリンクした後、超音波処理によりクロマチンを断片化し、抗体結合ビーズを用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。免疫沈降物を15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、Coomassie染色とウェスタンブロッティングを行った。

ズにそれぞれ回収された。一方、mRNA のポリアデニル化に関わる因子 (PABPC4; poly A binding protein, cytoplasmic 4 など) は RNA ポリメラーゼ II 抗体ビーズに回収されたほか、いくつかの転写因子は H3K9ac ビーズと RNA ポリメラーゼ II 抗体ビーズの両方への結合が見られた。これらの結果は、それぞれのヒストン修飾の持つ役割 (つまり H3K9me3 の転写抑制と H3K9ac の転写活性化における機能) と一致している。また、条件的ヘテロクロマチンに濃縮される H3K27me3 に特異的な抗体ビーズを用いた免疫沈降物には、多くの核小体関連因子が含まれていた。しかし、核小体関連蛋白質が条件的ヘテロクロマチンの形成に直接関与するのか、あるいはヘテロクロマチンが核膜や核小体の近傍に局在するための位置効果によるものなのか、については今後の解析が必要である。本研究により、ヒストン修飾特異的抗体ビーズを用いたクロマチン免疫沈降により得られた蛋白質を質量分析で同定することで、特異的ヒストン修飾を持つクロマチンの構成成分を網羅的に解析できることが明らかになった。

また、ホルムアルデヒドによる架橋の影響を検討したところ、架橋したクロマチンを用いたほうが多種類の蛋白質が同定されたが、両者で共通して検出される蛋白質も多く同定された。従って、ネイティブクロマチン ChIP と架橋したクロマチンを用いた ChIP の両方を併用することで、特定のヒストン修飾

を持つクロマチンに強固に結合する蛋白質と一過性もしくは弱く結合する蛋白質を区別できると考えられた。

(2) ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体を用いた生細胞内ヒストン修飾ダイナミクスの可視化

生細胞におけるヒストン修飾ダイナミクスの解析に用いるため、ヒストン修飾特異的モノクローナル抗体から抗原結合断片 (Fab) を調製し、蛍光標識した。その蛍光標識 Fab を培養細胞に導入すると、固定細胞を用いた免疫染色で見られるパターンと同様な局在が観察された。特に、ヒストン H2B-mRFP を発現する細胞を用いて、特定の修飾とヒストン全体の分布を生きた細胞内で比較することが可能になった。ジメチル化 H3 Lys9 (H3K9me2) 特異的抗体は、H2B-mRFP と同様にクロマチン全体に局在するが、H3K9/K27ac 特異的抗体は H2B-mRFP が濃縮されない脱凝縮したユークロマチン部分に局在した (図2)。

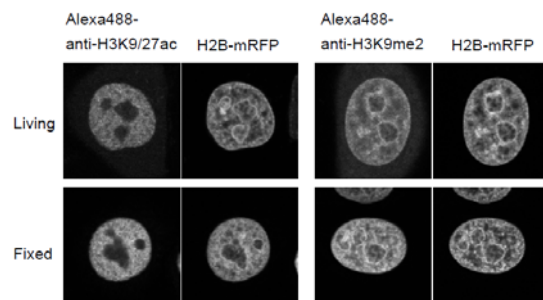


図2. 生細胞内のヒストン修飾

生きた細胞(上)または固定した細胞(下)の共焦点顕微鏡観察像。

(上) Alexa488標識H3K9/27ac特異的Fab(左)または Alexa488標識H3K9me2特異的Fab(右)をヒストン H2B-mRFP発現HeLa細胞に導入した。

(下) ヒストンH2B-mRFP発現HeLa細胞を固定し、Alexa488標識H3K9/27ac特異的抗体(左)または Alexa488標識H3K9me2特異的抗体(右)を用いて免疫染色を行なった。

また、不活性 X 染色体上に濃縮される H3K27me3 を特異的に認識する Alexa488 標識 Fab をヒト培養細胞に導入すると、不活性 X 染色体の数に対応した数の濃染される部位が観察された (図3)。正常核型を持つヒト女性由来の繊維芽細胞では、2本の X 染色体のうち1本が不活性化されるため一箇所の濃染部位が見られた。一方、X 染色体を4本持つ Klinefelter 症候群患者由来の繊維芽細胞では、3本の不活性 X 染色体が存在するため、3箇所の濃染部位が見られた。これらの不活性 X 染色体は、固定した細胞を用いた免疫染色や fluoresce in situ hybridization により観察されていたように、核膜や核小体の近傍に存在した。

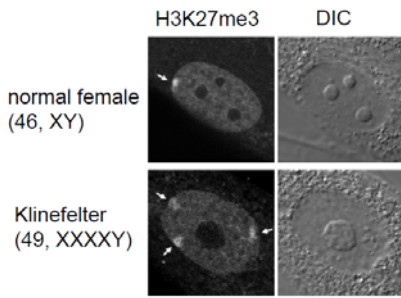


図3. 生細胞内不活性X染色体の検出
 蛍光標識H3K27me3Fabを細胞に導入すると不活性X染色体(矢印)に濃縮される。
 (上)正常核型細胞。(下) Klinefelter症候群患者由来の細胞。

さらに、マウス雌細胞に Alexa488 標識 H3K27me3 特異的 Fab と Cy3 標識 H3K27ac 特異的 Fab を同時に導入した結果、H3K27me3 が濃縮する領域から H3K27ac が排除されていること、及び分裂期の不活性染色体上にも H3K27me3 が保持されていることが明らかになった(図4)。また、H3K27me3 特異的 Fab を用いて不活性 X 染色体の動態を解析したところ、細胞周期を通じて細胞核内でのダイナミックな局在性の変化は見られなかった。したがって、不活性 X 染色体は核膜周辺や核小体周辺に局在したまま複製することが示唆された。

また、リン酸化 H3 Ser10 (H3S10ph) 特異的 Fab を用いて、細胞周期に伴うヒストンリン酸化のダイナミクスを解析した。HeLa 細胞に Alexa488 標識 H3S10ph 特異的 Fab を導入し、タイムラプス観察を行ったところ、H3S10 のリン酸化 foci が染色体凝縮の 10~20 分前から検出でき、その後凝縮した染色体に高度にリン酸化が起こることが明らかになった

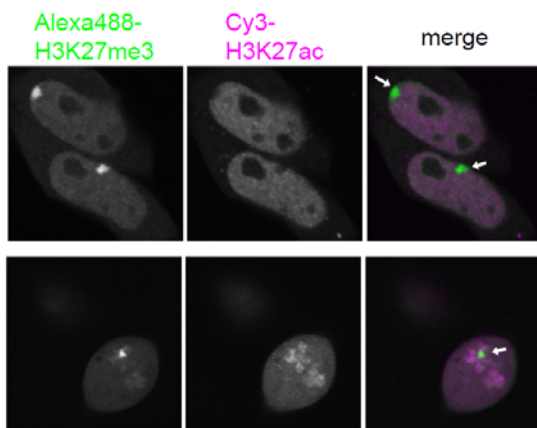


図4. 生細胞におけるH3K27me3とH3K27acの排他的局在
 マウスMC12細胞にAAlexa488標識H3K27me3特異的FabとCy3標識H3K27ac特異的Fabを導入し、共焦点顕微鏡で蛍光像を取得した。
 (上)間期の細胞核。(下)分裂期の染色体。

(図5)。H3S10ph 抗体を導入された細胞も通常どおり複数回分裂したことから、Fab の導入と蛍光イメージングは適切な条件で行う限り細胞増殖に影響を与えないことが確認された。

様々な細胞種で染色体凝縮前の H3S10 リン酸化の時期を測定したところ、染色体分配異常が高頻度で見られるがん細胞ではリン酸化が染色体凝縮の直前に起こるのに対して、正常二倍体細胞では S 期後半や G2 期の早い時期から見られることが明らかになった(図3)。また、正常二倍体細胞で H3S10ph foci が検出できる時期にそのリン酸化酵素である aurora B の阻害剤を添加すると foci が消失した。このことから、間期のリン酸化状態はリン酸化と脱リン酸化のダイナミックなバランスにより維持されていると示唆された。

本研究により、修飾ヒストン特異的モノクローナル抗体を用いることで、特定の修飾を持つクロマチンの構成成分とダイナミクスを明らかにすることが可能になると示唆された。今後、更なる解析により、ヒストン修飾のダイナミクスとその意義が明らかになると考えられる。

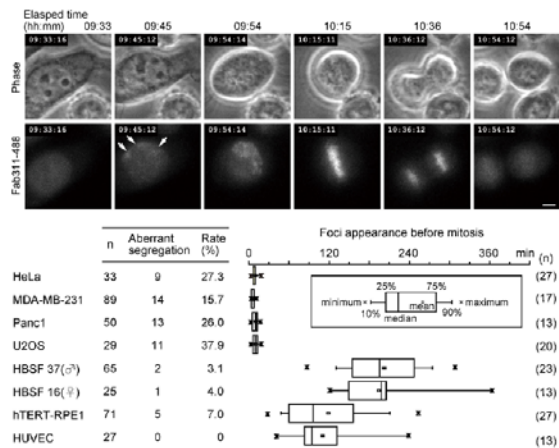


図5. 生細胞におけるH3S10phの動態
 (上) HeLa細胞にAlexa488標識H3S10ph特異的 Fabを導入し、タイムラプス観察を行った。分裂期直前にH3S10ph fociが検出された(矢印)。
 (下)様々な細胞における染色体分配異常の頻度と H3S10ph fociの形成時期。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

(1) Nozawa, R.-S., Nagao, K., Masuda, H.-T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., and Obuse, C. (2010). Human POGZ modulates HP1 dissociation from

mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nature Cell Biol.* in press 査読有

(2) Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* in press 査読有

(3) 木村 宏, 林 陽子. (2010). 特異的モノクローナル抗体を用いたメチル化ヒストンダイナミクスの可視化. *実験医学 (増刊号)*, 印刷中. 査読無

(4) Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., and Yamagata, K. (2010). Visualization of DNA methylation and histone modifications in living cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* Epub ahead of print: doi:10.1016/j.ceb.2010.02.0041. 査読有

(5) Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., and Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464, 927-931. 査読有

(6) Hashimoto, H., Takami, Y., Sonoda, E., Iwasaki, T., Iwano, H., Tachibana, M., Takeda, S., Nakayama, T., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2010). Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture. *Nucleic Acids Res.* Epub ahead of print: doi:10.1093/nar/gkq076 査読有

(7) Numa, H., Kim, J.M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., Mochizuki, Y., Kimura, H., Shinozaki, K., Toyoda, T., Seki, M., Yoshikawa, M., and Habu Y. (2010). Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in Arabidopsis thaliana. *EMBO J.*, 29:352-362. 査読有

(8) Hayashi-Takanaka, Y., Yamagata, K., Nozaki, N., and Kimura, H. (2009). Visualizing histone modifications in living cells: spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J. Cell Biol.* 187, 781-790. 査読有

(9) Goto, Y. and Kimura, H. (2009). Inactive X chromosome-specific histone H3 modifications and CpG hypomethylation flank a chromatin boundary between an X-inactivated and an escape gene. *Nucleic Acids Res.* 37, 7416-7428. 査読有

(10) Wada, Y., Ohta, Y., Xu, M., Tsutsumi,

S., Minami, T., Inoue, K., Komura, D., Kitakami, J., Oshida, N., Papantonis, A., Izumi, A., Kobayashi, M., Meguro, H., Kanki, Y., Mimura, I., Yamamoto, K., Matakai, C., Hamakubo, T., Shirahige, K., Aburatani, H., Kimura, H., Kodama, T., Cook, P.R., and Ihara, S. (2009). A wave of nascent transcription on activated human genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 18357-18361. 査読有

(11) Cardinale, S., Bergmann, J.H., Kelly, D., Nakano, M., Valdivia, M.M., Kimura, H., Masumoto, H., Larionov, V. and Earnshaw, W.C. (2009). Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by a chromatin modifier. *Mol. Biol. Cell* 20, 4194-4204. 査読有

(12) Ishimura, A., Terashima, M., Kimura, H., Akagi, K., Suzuki, Y., Sugano, S., and Suzuki, T. (2009). Histone demethylase Jmjd2c increases the expression of Mdm2 oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389: 366-371. 査読有

(13) 木村 宏, 林 陽子. (2009). ヒストンダイナミクスの可視化と膜透過化細胞による再構成. *実験医学 (増刊号)*, 27, 2833-2838. 査読無

(14) Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H. and Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* 27, 2681-2690. 査読有

(15) Kim, J.-M., Kim To, T., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., Toyoda, T., Kimura, H., Shinozaki, K. and Seki, M. (2008). Alterations of lysine modifications on histone H3 N-tail under drought stress conditions in Arabidopsis thaliana *Plant Cell Physiol.* 49, 1580-1588. 査読有

(16) Tachiwana, H., Osakabe, A., Kimura, H. and Kurumizaka, H. (2008). Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucl. Acids Res.* 36, 2208-2218. 査読有

(17) Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Goto, Y., Takizawa, N. and Nozaki, N. (2008). Organization of histone H3 modifications revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.* 33, 61-73. 査読有

(18) 木村 宏. (2008). ビフォー&アフター フォトブリーチ. *蛋白質核酸酵素*, 53, 1992-1999. 査読無

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) H. Kimura: Visualizing histone modifications in living cells. 第 32 回日本分子生物学会 (December 9-12, 2009, 横浜)
- (2) 木村 宏: 染色体の損傷と分配異常に伴うヒストン修飾のダイナミクス. 日本放射線影響学会第 52 回大会 (November 11-13, 2009, 広島)
- (3) 木村 宏, 林 (高中) 陽子, 山縣一夫, 野崎直仁: 正常細胞とがん細胞におけるヒストン H3 リン酸化ダイナミクスの差異. 第 82 回日本生化学会大会 (October 21-24, 2009, 神戸)
- (4) H. Kimura, Y. Hayashi-Takanaka, K. Yamagata, and N. Nozaki: Visualization of histone modifications in living cells. *EMBO Conference on Nuclear Structure and Dynamics* (September 30-October 4, 2009, L'Isle-sur-la-Sorgue, France)
- (5) Y. Hayashi-Takanaka, K. Yamagata, N. Nozaki, and H. Kimura. Visualization of histone modifications in living cells. 第 61 回日本細胞生物学会大会 (June 2-4, 2009, 名古屋)
- (6) 林 (高中) 陽子, 山縣一夫, 野崎直仁, 木村 宏: 生細胞内ヒストン修飾の可視化. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会 (May 22-23, 2009, 東京)
- (7) Y. Hayashi-Takanaka, N. Nozaki, and H. Kimura: Live-cell imaging of histone H3 phosphorylation in G2/M phase. *Mitosis and Cancer Symposium* (February 26-27, 2009, Amsterdam, The Netherlands)
- (8) 木村 宏, 林 (高中) 陽子, 野崎直仁: 細胞周期と転写の活性化に伴うヒストン修飾のダイナミクス. *BMB2008* (December 9-12, 2008, 神戸)
- (9) H. Kimura, Y. Hayashi-Takanaka, and N. Nozaki: The modification and dynamics of histones in human cells as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *ICH2008: 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry* (August 23-28, 2008, Gdansk, Poland)
- (10) H. Kimura, Y. Hayashi-Takanaka, Y. Goto and N. Nozaki: Histone modifications associated with transcription activation and silencing as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Benzon Symposium No. 55. Transcription, Chromatin and Disease* (August 18-21, 2008, Copenhagen, Denmark)
- (11) Y. Hayashi-Takanaka, N. Nozaki, and H. Kimura: Dynamics of histone modifications during the cell cycle and

gene activation. *International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise '08* (May 28-30, 2008, Shima, Japan)

- (12) H. Kimura: Histone dynamics and modification in human cells. *Millipore Bio Forum 2008* (March 7, 2008, Tokyo, Japan)
- (13) 木村 宏, 林 (高中) 陽子, 立和名博昭, 越坂部晃永, 胡桃坂仁志, 野崎直仁: ヒストン交換と修飾のダイナミクス. *BMB2007* (December 11-14, 2007, 横浜)

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 平岡 泰, 原田昌彦, 木村 宏, 田代聡: 編. 細胞核-遺伝情報制御と疾患: 染色体・核輸送のダイナミクスと細胞分化から個体発生, 破綻による疾患まで. *実験医学増刊* (羊土社), 239 頁 (2009). 編集・分担執筆
- (2) 林 陽子, 後藤友二, 木村 宏. クロマチン免疫沈降法. 「エピジェネティクス実験プロトコール (牛島俊和・眞貝洋一/編)」, 羊土社, pp.143-166 (2008). 分担執筆
- (3) 原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰: 編. 「講義と実習: 生細胞蛍光イメージング - 阪大・北大顕微鏡コースブックス」(共立出版), 302 頁 (2007). 編集・分担執筆

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号: 30241392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし