

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657003

研究課題名(和文) 蛍光相互相関分光法を用いたヒストン修飾クロストークの計測

研究課題名(英文) Detection of histone modification cross-talk using fluorescence cross-correlation spectroscopy

研究代表者

木村 宏 (Hiroshi, Kimura)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：30241392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンの翻訳後修飾は、遺伝子発現などのゲノム機能の制御と維持に重要な役割を果たしているが、各修飾間のクロストークの全体像や意義は良く分かっていない。本研究は、蛍光相互相関分光法を用いた高感度かつ迅速なヒストン修飾コンビネーションの検出法を開発することを目的として行った。Alexa488標識抗体とCy5標識抗体、及び、精製ヒストンを用いた場合、蛍光標識抗体とヒストンの可溶化条件が異なるため反応中の凝集体の形成が問題となった。そこで、蛍光標識Fabとヌクレオソームを用いたところ凝集体形成の問題が改善された。また、FRETT計測により修飾コンビネーションを検出できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Post-translational histone modification plays an important role in the regulation and maintenance of genome function, such as transcription and DNA repair. It remains unknown, however, how a combination of different modifications is regulated and functions specifically. This study aimed to develop a rapid and sensitive system to detect a combination of modifications using fluorescence cross-correlation spectroscopy. When Alexa488-labeled and Cy5-labeled antibodies are mixed with purified histone complexes, they tended to form aggregations, because the solubilization conditions of labeled antibodies and histones were different. This problem was partly solved by using antigen-binding fragments and nucleosomes, instead of IgG and histones. Additional experiments revealed that a combination of different modifications could be detected by measuring fluorescence resonance energy transfer.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：クロマチン 染色体 蛍光相互相関分光法 エピジェネティクス 蛋白質翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

クロマチンの基本単位であるヌクレオソーム構造を形成するヒストン分子には、翻訳後修飾を受ける多数のアミノ酸残基が存在し、それらの複雑な修飾は、遺伝子発現、DNA修復、染色体分配などのゲノム機能の制御と維持に重要な役割を果たしている(図1)。



図1. ヒストンとヌクレオソーム

例えば、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基 (H3K4) のメチル化は転写の活性化に、9 番目及び 27 番目のリジン残基 (H3K9 及び H3K27) のメチル化は転写の抑制に働くことが知られている。これらの複数の修飾は、単一のヒストン分子上、あるいは単一ヌクレオソーム上で起こりうるが、その修飾間クロストークの全体像や意義は良く分かっていない (Latham and Dent, NSMB 14, 1017, 2007)。複数の修飾の制御が重要である例として、マウス胚性幹 (ES) 細胞における H3K4 と H3K27 のメチル化の共存があげられる。未分化細胞では、発現抑制された遺伝子の制御領域においても活性化に働く H3K4 のメチル化が保持されることで、多方向への分化に対応できると考えられている (Bernstein et al, Cell 125, 315, 2006)。この他にも、転写抑制における H2A ユビキチン化と H3K27 メチル化との協同的作用や DNA 損傷修復への H2AX リン酸化と H4 メチル化の関与など、複数の修飾の協調的あるいは排他的制御の存在が見つかっている。

このようなヒストン修飾の組み合わせを簡便に評価する技術の開発は、細胞の分化や外部刺激等に応答したヒストン修飾クロストークの動態の解明につながると考えられる。そこで、蛍光標識した修飾特異的抗体由来の抗原結合断片 (Fab) を用いた蛍光相互相関分光法 (FCCS; fluorescence cross-correlation spectroscopy) により、単一のヒストン分子あるいは単一のヌクレオソームにおける二つの修飾の存在を定量的・迅速・高感度に解析できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル修飾ペプチドを用いて、蛍光標識 Fab と FCCS による単一ヒストン分子上の二つのリジン残基の同時修飾の検出系を確立することを目的とした。そして、マウス ES 細胞の分化や初期胚発生に応じた H3K4 と H3K27 の同時トリメチル化修飾の動態を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

本研究では、FCCS 計測のモデル系として、調製が容易な非修飾型の組換えヒストンと非修飾部位特異的抗体を用いた。また、直接標識抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

・抗体の精製と Fab の調製

H3K4, H3K9, H3K27 の非修飾型あるいはメチル化やアセチル化などを認識する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を培養し、protein A カラム (GE Healthcare) を用いてその培養上清から抗体分子を精製した。また、プロテアーゼ (Thermo Scientific) を用いて抗原結合断片 (Fab) を調製し、protein A カラムを用いて精製した。これらの抗体や Fab は、Alexa488 (Life Technologies), Cy3 あるいは Cy5 (GE Healthcare) で標識した。標識抗体は、限外ろ過によりバッファーを生理食塩水 (PBS; phosphate-buffered saline) に置換した。

・FCCS

FCCS 計測は、40×Apochromat 水浸対物レンズ (NA 1.2; 補正環付き) を装着した共焦点顕微鏡 (LSM780; Zeiss) を用いて室温で行った。精製ヒストン H3-H4 とヌクレオソームは、胡桃坂仁志博士 (早稲田大・先進理工) に供与していただいた。

・免疫染色

HeLa 細胞を 4%ホルムアルデヒドで固定し、1% Triton X-100 で膜を透過化した後、Blocking One P (ナカライテスク) で処理し、直接標識抗体で染色した。DNA は Hoechst33342 で染色した。

4. 研究成果

(1) ヒストンと特異的抗体を用いた FCCS

Alexa488 標識 H3K9 非修飾抗体と Cy5 標識 H3K27 非修飾抗体を用いて FCCS 計測を行った。PBS 中で両者を 100 nM の濃度で混合して計測した場合、相互相関 (Cross-correlation) は見られなかった (図2)。そこに、精製したヒストン H3-H4 複合体を 40 nM の終濃度になるように加えたところ、加えた直後では若干の相互相関が見られた (図3)。これは、二つの抗体が同時に H3-H4 複合体に結合したことによると考えられる。

しかしながら、ヒストン複合体を添加してから 2 ~ 3 分後には、巨大な複合体のシグナルが出現し、自由拡散する単分子の数が低下し (図4、黄色の矢印) それに伴い相互相関も増加した。また、添加する H3-H4 の量を 400 nM にした場合、巨大複合体のシグナルがより顕著に見られた (図5、黄色の矢印)

これらの結果は、ヒストン複合体の添加により、Alexa488 標識 H3K9 抗体と Cy5 標識 H3K27 抗体が凝集体となったためと考えられた。

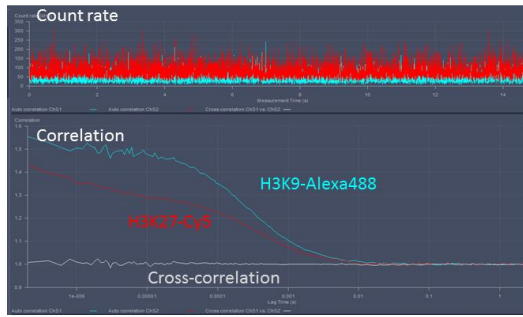


図2. PBS中の2種類の抗体のFCSとFCCS

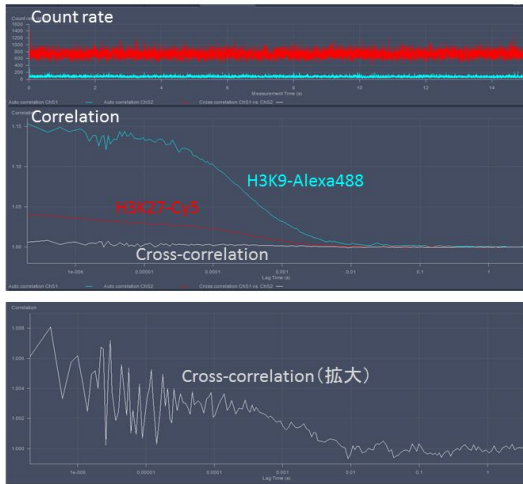


図3. PBS中の2種類の抗体とヒストンH3-H4 (50 nM)のFCSとFCCS (反応開始時)



図4. PBS中の2種類の抗体とヒストンH3-H4 (50 nM)のFCSとFCCS (数分間の反応後)

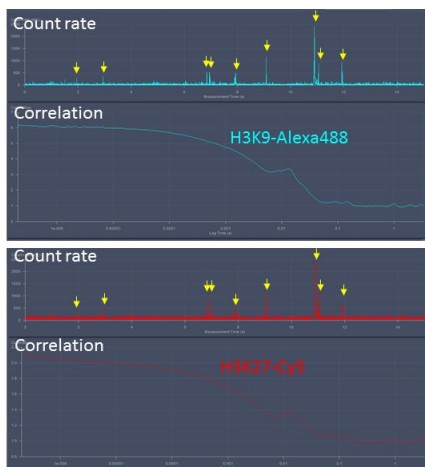


図5. PBS中の2種類の抗体とヒストンH3-H4 (400 nM)のFCSとFCCS (数分間の反応後)

標識抗体の凝集は、ヒストンを介して巨大複合体を形成している可能性とヒストン溶液（低張液）の添加によるバッファー組成の変化による可能性が考えられた。そこで、Alexa488 標識 H3K9 抗体の溶液（PBS）を低張液で希釈し、FCS 計測を行った。その結果、低張液中の蛍光標識抗体は、計測中に凝集することがわかった（図6）。一方、ヒストン H3-H4 複合体は PBS 中で不溶化する傾向があるため、単離したヒストンと蛍光標識抗体との結合を FCCS で検出するのは容易ではないと考えられた。

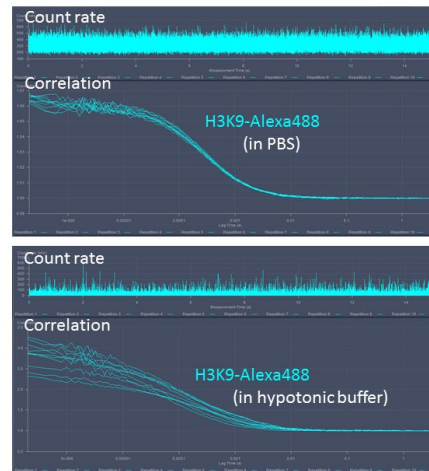


図6. PBSまたはhypotonic buffer中のAlexa488標識H3K9抗体のFCS

(2) ヌクレオソームを用いた FCCS

単離されたヒストンは、生理的塩濃度では不溶化しやすいことから、再構成ヌクレオソームを用いて FCCS 計測を行った。また、抗体分子（IgG）ではなく、Fab についても検討した。Fab は抗体より分子量が小さく、また、抗原への結合も 1 価であることから、凝集しづらいと考えられた。実際、蛍光標識 Fab を用いると低張液中での凝集は IgG に比べて起こりづらかった。また、ヌクレオソームを用いたほうが、PBS 中で凝集が起こりづらかった。図7に、Alexa488 標識 H3K4-Fab と Cy5 標識 H3K4-Fab の PBS 溶液（左）に再構成ヌクレオソームを加えたときに相互相関が増加した結果（右）を示す。この相互相関は、単一のヌクレオソーム含まれる 2 分子の H3 に Alexa488 標識 Fab と Cy5 標識 Fab が結合した結果と思われる。



図7. PBS中のAlexa488標識H3K4-FabとCy5標識H3K4-FabのFCCS

この結果は、Fab とモノヌクレオソームを用いて FCCS 計測により 2 種類の修飾が単一のヌクレオソーム上で起こっているかどうかを検出することが可能であることを示唆している。しかしながら、当初の目的であった少数細胞を用いた検出には、この方法はあまり適さないと考えられた。それは、ヒストンの調製とは異なり、モノヌクレオソームの調製には、大量の細胞が必要となるからである。そこで、蛍光標識抗体を用いて少数細胞で修飾の組み合わせを検出するための別な系の構築を試みた。

(3) FRET (蛍光共鳴エネルギー移動; fluorescence resonance energy transfer) を用いた計測

Alexa488 と Cy3 で蛍光標識した 2 種類の異なる抗体で細胞を免疫染色し、共焦点顕微鏡を用いてアクセプターフォトブリーチ法を試みた。その結果、H3K4me2 抗体と H3K27ac 抗体の間で FRET が起こることを確認できた。従って、この方法を用いることで、少数細胞や単一細胞レベルでヒストン修飾のコンビネーションが検出できると考えられた。今後、系統的かつ定量的解析により、異なる細胞種や異なる分化状態におけるヒストン修飾の動態を明らかにすることができると考えられる。

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 2 件)

Hayashi-Takanaka Y, Stasecich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging. PLoS One 9, e106271, 2014. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0106271

木村 宏、佐藤優子、林 陽子 . 内在性蛋白質翻訳後修飾の生細胞計測 . 生物物理 52, 234-235, 2012. 査読有
DOI: 10.2142/biophys.52.234

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kimura-lab.bio.titech.ac.jp/>
<http://www.bio.titech.ac.jp/laboratory/kimura-kajikawa/kimura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)
東京工業大学・生命理工学研究科・教授
研究者番号: 30241392

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし