

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659179

研究課題名(和文) ヒストンH3リジン79(H3K79)メチル化特異的FRETプローブの開発

研究課題名(英文) Establishment of FRET probe specific for Methylation at Histone H3 Lysine79 (H3K79me)

研究代表者

牧野 吉倫(MAKINO, Yoshinori)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：60431334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンH3のリジン79(H3K79)のメチル化は、遺伝子の転写の活性化に資すること、心・血管系の発生、ES細胞の分化に必須であることが知られている。しかし生細胞内でH3K79メチル化を検出する技術は確立されていない。本研究において当初は、既知のメチル化結合タンパク質とH3K79メチル化との結合の可視化を試みたが、有意な結果が得られなかった。そこで改めてH3K79メチル化に結合するタンパク質を探索し、いくつかの候補を同定した。これによりメチル化の可視化が可能になるだけでなく、H3K79メチル化結合因子の性質の解明を通してH3K79メチル化の生理的意義が明らかになることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Methylation at lysine 79 in histone H3 (H3K79me) is known to contribute transcriptional activation, development of circular system, and differentiation of ES cells. However, no techniques to visualize H3K79me in live cells have been established yet. In this study, first, Visualization of association between a H3K79me binding protein and H3K79me by using FRET technique was challenged, but no significant results were obtained. Thus, I next searched as-yet-unknown proteins to recognize H3K79me, and identified several candidate proteins. This result will not only enables H3K79me to be visualized, but also contribute to uncover the physiological roles of H3K79me.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス Dot1L メチル化 可視化

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、遺伝子配列に依存しない遺伝子発現調節機構であり、基本的な細胞の生命活動を始め、発生、癌化などにも重要である。中でもヒストンのメチル化はよく知られたエピジェネティック修飾であり、細胞の多様かつ複雑な遺伝子発現調節に必須である。ヒストンメチル化の一つであるH3K79のメチル化は、ヒストンメチル化酵素Dot1L (disruptor of telomere silencing 1-like)によって特異的に触媒されることや、転写の活性化と相関すること、心・血管系の発生、ES細胞の分化、血赤芽球系の分化に必須であることが知られている(参考文献1)。また申請者は、精巣特異的Dot1Lノックアウトマウスを樹立・解析し、精子幹細胞の維持および精子形成にDot1Lが必須であることを明らかにしている。さらに、Dot1LおよびH3K79のメチル化は、テロメアサイレンシングやDNA損傷、細胞周期、染色体分配との関連性など、転写活性化以外の役割も報告されている。

Dot1LおよびH3K79メチル化の解析は、他のヒストン修飾と同様に生化学的な方法が主体である。特に最近では、ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation-sequencing)法が普及し、網羅的に遺伝子ごとのメチル化状態を調べられるようになった。しかしいずれの方法も、時間分解能が低い、個々の細胞について経時的な変化を調べられない、細胞形質のばらつき (heterogeneity)について定量的な情報が得づらいなどの問題点が見られ、特に細胞周期などのダイナミックな現象や染色体分配異常など稀な現象については解析が困難であった。

2. 研究の目的

上記エピジェネティクス研究における技術的な問題点を解決するため、時間および空間分解能の高いメチル化の検出方法を開発し、新しい側面からの知見を提供すべく、FRET (Förster/Fluorescence resonance energy transfer: FRET)については研究の方法を参照)を利用した技術を用いて、H3K79のメチル化を生きた細胞の中で可視化することを目的として研究を行った。

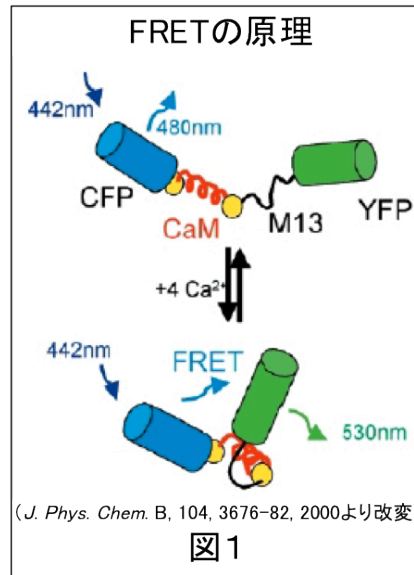
3. 研究の方法

FRET現象を利用してH3K79のメチル化を可視化する。

(1) FRETプロブの原理 (図1)

FRETとは、YFP (黄色蛍光タンパク質)とCFP (シアン蛍光タンパク質)がごく近傍(数nm程度)にある時にCFPを励起すると、CFPの持つ励起エネルギーがYFPへ遷移して、YFPの蛍光が観察されるようになる現象のことである。そこで融合タンパク質 (FRETプロブ)を細胞内で発現させれば、プロブの状態の変化によって、CFPとYFPが接近した時にはFRETが起こり、YFPの蛍光が観察される。

またそれ以外の際はCFPの蛍光が観察されることになる。そこで蛍光顕微鏡でCFPとYFP (FRET)の蛍光を観察して、その蛍光強度比を計算する事で、プロブの状態変化を観察することができる。



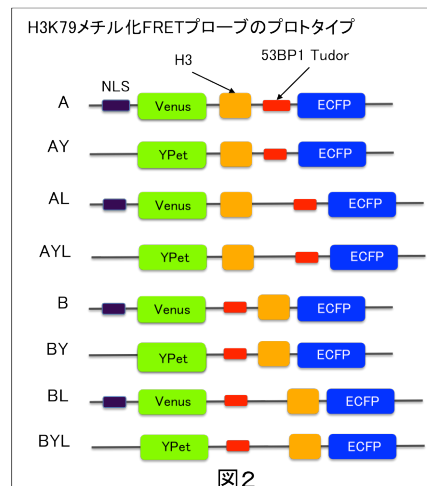
(2) FRETプロブの構成

プロブの構造は定法に則り、基質であるヒストンH3の全長配列と53BP1のTudorドメイン(メチル化K79と結合する、(参考文献2))を融合させ、更にそのN末端、C末端にそれぞれYFP、CFPをつなげたものを作製する。H3K79がメチル化されるとTudorドメインがH3K79と結合してFRETが起こる事が期待されるが、分子の順番、リンカーの長さ、YFPの種類などに改変の余地がある。

4. 研究成果

(1) FRETプロブのスクリーニング

最初にプロトタイプとして8種類のプロブを作製した(図2)。Dot1L安定過剰発現293T細胞株に作製したプロブを遺伝子導入し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光シグナルを取得し、FRET効率を定量化した。具体的には、取得した蛍光画像から、数十細胞の核領域のCFPおよびYFPの蛍光強度をImageJソフトウェアによって定量化した。



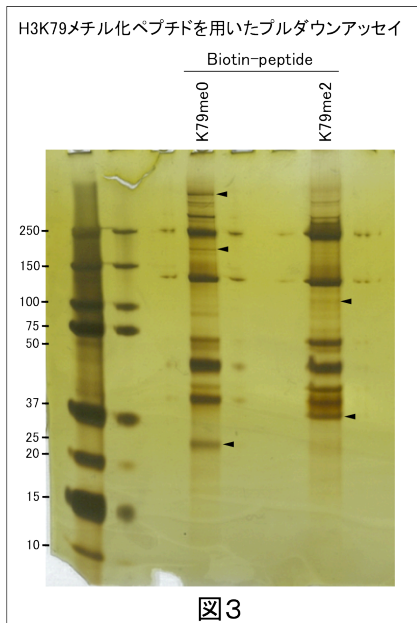
各細胞のCFPおよびYFPの蛍光強度からFRET比(=YFP/CFP)を計算した。野生型の293T細胞株から得られたFRET比の値を対照として、Dot1L過剰発現株においてFRET比の値が変化しているか調べた。結果、AYタイプのプローブ(図2)においてDot1L過剰発現によるFRET比の増加が認められた。次にこの結果をより詳細に確認するため、フローサイトメーターを用いて数万個の細胞の蛍光強度を取得しFRET比の値を計算した。定量化の結果、Dot1Lの過剰発現によるFRET比の有意な変化は認められなかった。本実験に用いたFRETプローブは53BP1タンパク質のメチル化結合ドメインを用いたが、53BP1とH3K79メチル化との結合については否定的な論文も出ており、フローサイトメーターを用いた実験の結果と併せて、53BP1タンパク質はFRETプローブのアクセプターとして適切ではないと結論づけた。

(2) H3K79メチル化結合タンパク質の同定についての試み

現在までのところ53BP1以外のH3K79メチル化結合タンパク質は報告されていないため、新規同定を試みた。

a. H3K79メチル化ペプチドを用いた方法

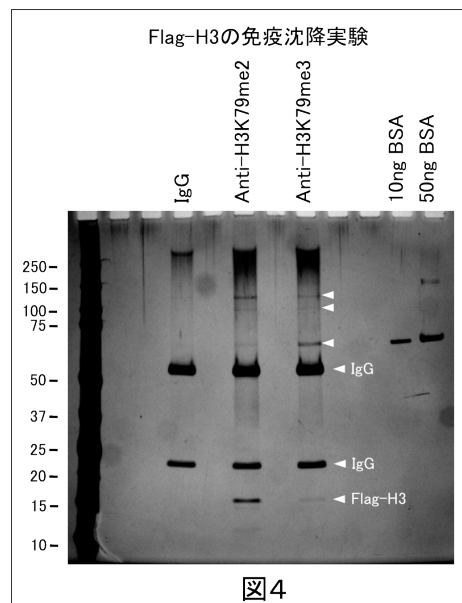
ビオチン化されたH3K79メチル化ペプチドを作製し、それをベイトとして293T細胞の核抽出液を用いたプルダウンアッセイを行った。プルダウンサンプルをSDS-PAGEおよび銀染色で解析したところ、数本のバンドが認められたため(図3)、質量分析計による同定を行った。ところが同定されたタンパク質とH3K79メチル化との結合は免疫沈降法で再現されなかった。原因としては、ビオチン結合タンパク質が優先的に同定されてしまったことや、H3K79メチル化との結合にはヌクレオソーム等の立体構造が必要であることなどが考えられた。



b. Flag-H3安定発現293T細胞株の作製と免疫沈降法による精製

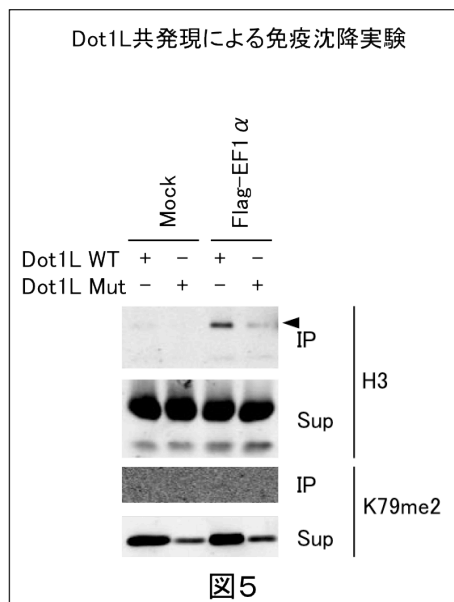
そこで、次にFlagタグ融合ヒストンH3を293T細胞の安定的に発現させた株を作製した。作製した細胞株のクロマチン分画をマイクロコッカルヌクレアーゼ(MNase)処理によってヌクレオソームを精製し、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行い、H3結合タンパク質を濃縮する方法を試みた。結果、Dot1Lを過剰発現した細胞においてもしない細胞においても、抗Flag抗体による免疫沈降によって濃縮されるH3結合タンパク質のバンドが多数認められた。これは、そもそもH3結合タンパク質が多数存在するためと考えられるが、多数のバンドの中で明らかにDot1L過剰発現においてのみ見られるものはなかった。

更なる精製が必要と判断し、抗Flag抗体による免疫沈降産物を、抗H3K79メチル化抗体を用いた免疫沈降法によって精製した。銀



染色法によって数本のバンドが認められたため(図4)、それぞれについて質量分析計による同定を行った。

同定された遺伝子の一つであるEF1 α とH3K79メチル化との結合を確認するために、Flagタグ融合遺伝子を発現させるプラスミドを作製し、293T細胞に導入した。上記のようにクロマチン分画からヌクレオソームを精製し、それを用いて抗Flag抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降産物を抗H3抗体によるウエスタンブロッティングで解析したところ、酵素活性のない変異型Dot1Lとの共発現よりも、野生型Dot1Lとの共発現によってH3との結合が増加した(図5)。この結果は、EF1 α がH3K79メチル化依存的にH3と結合することを示唆している。今後はメチル化依存的な結合をさらに確認するために、H3K79メチル化ペプチドによってこの結合が競合的に阻害されるかを調べる予定である。



本研究により新たな H3K79 メチル化結合因子の候補が同定できた。この成果は本研究の目的であった H3K79 メチル化 FRET プロブの開発に用いる予定である。また、53BP1 以外に結合タンパク質が発見されていないため (参考文献 2)、結合因子としての機能が確かめられれば、H3K79 および Dot1L がどのような機構によって転写や様々な生体内の現象に関与しているのかを解明する上において、大きな知見をもたらすことが予想される。

<参考文献>

1. Nguyen AT, Zhang Y. Genes Dev. 2011, 25:1345-58.
2. Huyen, Y. et al. Nature 2004, 432: 406-11

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 吉倫 (MAKINO Yoshinori)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助

教

研究者番号: 60431334