

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650009

研究課題名(和文) 内在ゲノム領域におけるヒストン修飾動態のリアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Real-time imaging of histone modification dynamics in the specific gene loci

研究代表者

佐藤 優子 (Sato, Yuko)

東京工業大学・生命理工学研究科・科学研究費研究員

研究者番号：70435882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、ゲノムDNA配列上の任意の領域を認識する細胞内プローブを構築し、細胞分化過程における特定の遺伝子領域のヒストン修飾動態を観察することを目的とした。ゲノムDNA配列上に散在する中程度反復配列を抽出し、TALEsプローブの構築を試みたところ、生細胞で標的的特異的に可視化できるものは得られなかった。一方で、ヒト培養細胞に導入したANCHORシステムと活性化型RNAポリメラーゼ特異的mintbodyにより、特定の遺伝子領域の転写活性化状態を生細胞で観察することが出来た。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to visualize the dynamics of histone modification in the specific gene loci in living cells. To visualize specific genome loci, we searched repetitive DNA sequence enriched in single loci and designed TALE protein. However, TALEs that are expected to bind to these sequences failed to label them in living cells. On the other hand, using a mintbody specific to phosphorylated RNA polymerase II combined with ANCHOR system that labeled the specific locus, active transcription at the single gene locus was visualized in human cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス イメージング クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1) DNAメチル化やヒストン修飾などによる後成的遺伝子発現制御(エピジェネティクス)は、細胞機能制御に重要な役割を担っていることが近年幅広い分野で明らかにされている。特にヒストンの翻訳後修飾によるクロマチン制御は、細胞世代を通して安定に伝達されると同時に、分化刺激により動的に変化する。我々はこれまでに、修飾特異的抗体由来の生細胞プローブを用いた2種類のライブセルイメージング系を開発してきた。これらの方法はいずれも、ゲノム全体のヒストン修飾動態や、不活性X染色体に濃縮されるヒストン修飾を、生細胞で追跡するのに良いツールである。しかし、特定の遺伝子領域の修飾動態を調べたい場合は、その遺伝子領域を生細胞で標識する系と組み合わせる必要がある。

(2) 哺乳類の生細胞核内のゲノムDNA上の特定配列の可視化は、人工的あるいはウイルスにより外来配列を多コピー挿入するモデルにより行われているが、内在の配列を可視化する系はマウスメジャーサテライト等の巨大反復配列の例以外は未だ存在しない。

2. 研究の目的

ゲノムDNA配列上の任意の領域を認識する細胞内プローブを構築し、細胞分化過程における特定の遺伝子領域のヒストン修飾動態を観察する。

3. 研究の方法

(1) ゲノムDNA上の中程度反復配列の探索
ヒトやマウスのゲノム配列の約半分の領域は、反復配列で構成されている。繰り返しの単位(塩基数)、反復回数、複雑度や分布は様々である。この中から、特定の領域に濃縮される中程度反復配列($10^1 \sim 10^5$)を見出し、この配列を特異的に認識する細胞内蛍光プローブを作製することで、ゲノム上の特定領域を可視化する(図1A)。

(2) 特定の遺伝子領域の生細胞イメージング

(1)で見出した標的候補配列から数個を選び、それぞれに特異的に結合するTALEsを構築し、蛍光タンパク質融合型の発現ベクターを作製する。

(3) ヒストン修飾可視化プローブの作製

我々はこれまでに、ヒストン修飾動態を生細胞で可視化するために、蛍光タンパク質を融合した一本鎖可変領域をmodification-specific intracellular antibody(mintbody)プローブとして利用するシステムを開発している。ヒストンH3K9ac特異的mintbodyについて既に報告しているが、本課題では新たなmintbody作製に取り組む。

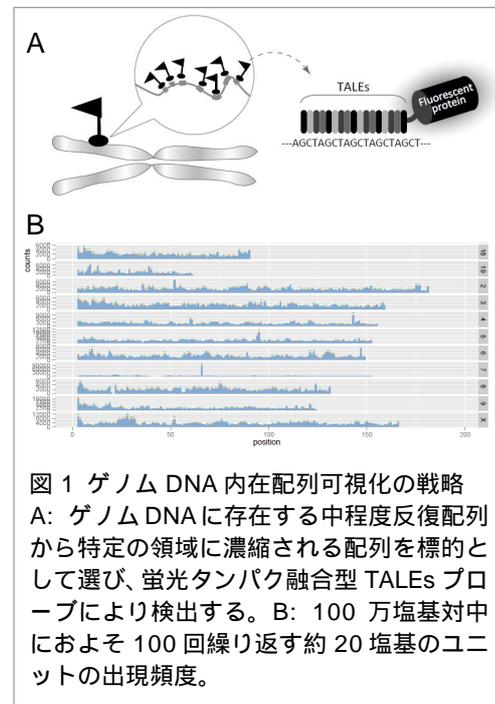


図1 ゲノムDNA内在配列可視化の戦略
A: ゲノムDNAに存在する中程度反復配列から特定の領域に濃縮される配列を標的として選び、蛍光タンパク融合型TALEsプローブにより検出する。B: 100万塩基対中におよそ100回繰り返す約20塩基のユニットの出現頻度。

(4) 特定の遺伝子領域のヒストン修飾動態の可視化

(2)で開発したDNA可視化プローブと(3)で開発したmintbodyを同時に細胞へ導入し、特定の遺伝子領域のヒストン修飾動態の可視化を行う。系が上手く動くことが確認できた場合、遺伝子改変マウスを作製し、生体イメージングに挑戦する。

4. 研究成果

(1) ゲノムDNA上の中程度反復配列の探索

図1Bに示すように、前原一満博士(九州大学)の協力によりDNA配列の網羅的解析を行い、ヒトおよびマウスのゲノム配列上には、中程度反復配列($10^1 \sim 10^5$)が全域に渡って散在することがわかった。このような配列のなかから、TALEsの標的となるものをヒト9番染色体およびマウスX染色体から各一箇所ずつ選択した。

(2) 特定の遺伝子領域の生細胞イメージング

(1)で選択したDNA配列を標的とするTALEs発現ベクターを構築し、GFP融合型として培養細胞に発現させた。これらのTALEsは、細胞核内への局在がみられたものの、大部分は核小体へ濃縮され、一部はfociを形成していた。FRAP解析の結果、このfoci

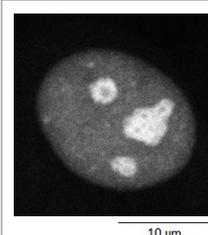


図2 TALEsプローブによるDNA標識
9番染色体の中程度反復配列を標的とするTALEsをHeLa細胞に発現させ、核小体への集積と非特異的なfociがみられた。

は非特異的な集積であることが示唆された(図2)。

(3) ヒストン修飾可視化プローブの作製

修飾特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抗体可変領域をコードする遺伝子を取得し、GFP融合型として細胞に発現させた。約40種類のクローンから、細胞内に安定に発現する2クローン(H4K20me1および活性化型RNAポリメラーゼII特異的mintbody)を得た。

(4) 特定の遺伝子領域のヒストン修飾動態の可視化

DNA領域の生細胞可視化法については、当初予定していたTALEsで良好なプローブが得られなかったため、新たなシステムとしてツールズ第三大学 Kerstin Bystricky 博士の開発したANCHORシステムの導入を試みた。ANCHORシステムは、ANCH(INT)配列とそれに特異的に結合するOR(ParB)タンパク質の結合を利用したものである。ANCH配列をゲノムDNAに挿入する必要があるが、この断片は比較的短く、挿入されたゲノム領域への影響が少ない。またORタンパク質のDNAへの結合は、DNAを鋳型とする生理的な機能にはほとんど影響しないと考えられている。ANCH配列の隣にMS2遺伝子を配置することで、MS2-coating protein(MCP)による転写産物の可視化もできる。

ANCH配列を導入したヒト培養細胞にmCherry-OR3、iRFP-MCP、活性化型RNAポリメラーゼプローブ(mintbody)を同時に発現させたところ、図3に示すように、三者の

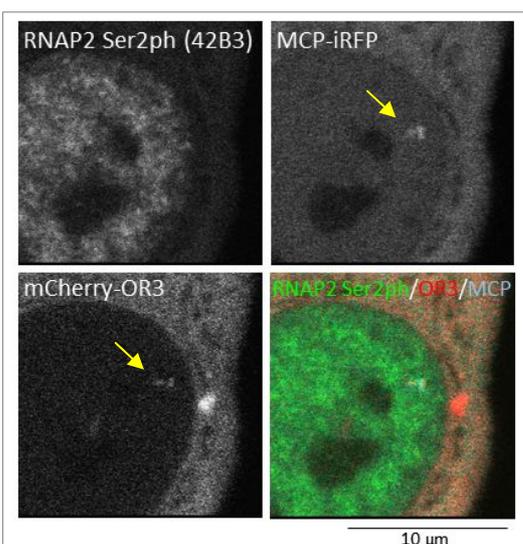


図3 ANCHORシステムによるDNA標識と活性化型RNAポリメラーゼの可視化
ANCH配列を導入したヒト培養細胞に、OR3、MCP、活性化型RNAポリメラーゼプローブ(RNAP2 Ser2ph(42B3))を導入して顕微鏡で観察した。特定の遺伝子領域(黄色矢印)における転写活性化動態を観察できる。

局在を生きた細胞の中で観察することができた。今後は、mintbodyの解像度を改善するため、一分子解析などを試みる予定である。

本研究により、内在ゲノム領域可視化の標的となりうる中程度反復配列が、ゲノムDNA配列上に多数存在することがわかった。当初の計画では、これらの標的配列を認識するTALEsプローブを用いて遺伝子領域を可視化する予定であったが、有用なものは得られなかった。一方でDNA配列を生細胞でターゲットする技術は、急速に進歩しており、CRISPR/Cas9やANCHORシステムなどで成功例が報告されている。我々は標的領域への影響が比較的少ないとされるANCHORシステムを導入し、活性化型RNAポリメラーゼ特異的mintbodyと共に観察することに成功した。今後、mintbodyの空間解像度を向上させることで、特定の遺伝子領域の転写活性化やヒストン修飾の動態を生細胞で観察する有用なツールとなることが期待される。

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6件)

1. Suzuki M, Takagi C, Miura S, Sakane Y, Suzuki M, Sakuma T, Sakamoto N, Endo T, Kamei Y, Sato Y, Kimura H, Yamamoto T, Ueno N, Suzuki KT. *In vivo* tracking of histone H3 lysine 9 acetylation in *Xenopus laevis* during tail regeneration. **Genes Cells**. 21(4), 358-369, 2016 (査読有) DOI: 10.1111/gtc.12349
2. Sato Y, Mukai M, Kimura H. Histone Acetylation on *Drosophila* Polytene Chromosomes Visualized by Mintbody. **Cytologia**. 80(4), 383-384, 2015 (査読無) DOI: 10.1508/cytologia.80.383
3. Maehara K, Harada A, Sato Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kimura H, Ohkawa Y. Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation. **Epigenetics Chromatin**. 8, 35, 2015 (査読有) DOI: 10.1186/s13072-015-0027-3
4. Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. **Nature**. 516, 272-5, 2014 (査読有) DOI: 10.1038/nature13714
5. Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N, Kimura H. Quantifying histone and

RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. **Methods**. 70(2-3), 77-78, 2014 (査 読 有) DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.08.002

6. Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, Kimura H. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. **Sci Rep**. 3, 2436, 2013 (査 読 有) DOI: 10.1038/srep02436

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Sato Y, “ Visualizing the inactive X chromosome in vivo by using H4K20me1-specific intracellular antibody probe”, EMBL Conference “Nuclear structure and dynamics”, 7-11 Oct 2015, Isle sur la sorgue (フランス)
2. 佐藤優子, 「 H4K20me1 特異的細胞内抗体を用いた不活性 X 染色体動態の in vivo 解析 」, 第 37 回 日本分子生物学会、平成 26 年 12 月 25 ~ 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
3. Sato Y, “ Intracellular antibody probes for visualizing histone modifications in vivo ”, 第 37 回 内藤コンファレンス、平成 26 年 7 月 15 ~ 18 日、ヒルトンニセコビレッジ (北海道・ニセコ町)
4. 佐藤優子, 「 細胞内抗体プローブを用いたヒストン修飾動態の生体イメージング 」, 第 8 回 日本エピジェネティクス研究会年会、平成 26 年 5 月 25 ~ 27 日、伊藤国際学術研究センター (東京大学構内) (東京都・文京区)

〔図書〕(計 1 件)

1. Kimura H and Sato Y. Histone Modification Sensors in Living Cells. Optical Probes in Biology (Jin Zhang, Sohun Mehta, Carsten Schultz ed), CRC Press, London, pp317-331, 2015

〔その他〕

ホームページ

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究ユニット 木村研究室
<http://kimura-lab.bio.titech.ac.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 優子 (Yuko Sato)

東京工業大学 大学院生命理工学研究科
科学研究費研究員
研究者番号 : 70435882

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし