

令和元年6月11日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07157

研究課題名(和文) 胚性ゲノム活性化に伴うヒストン修飾動態のin vivoイメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging of histone modification dynamics during ZGA

研究代表者

佐藤 優子 (Sato, Yuko)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：70435882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュ卵に蛍光標識した活性型RNAポリメラーゼII特異的Fabを注入しライブ観察を行うことで、胚ゲノム活性化を観察し計測することに成功した。同様にヒストン修飾特異的Fabを導入することで、H3K27acが転写活性化の前に上昇することがわかった。また、胚性ゲノム活性化に先立って発現が亢進するmiR-430クラスターにおいて、H3K27acが転写よりも先に上昇することも明らかにした。アセチル化ヒストン結合タンパク質の阻害剤を添加することで活性型RNAポリメラーゼIIの集積が見られなくなることから、H3K27acが胚性ゲノム活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで生きた胚の中で発生過程におけるヒストン修飾レベルを調べる方法はなかった。今回初めて転写活性化とヒストン修飾動態を同時に観察することに成功した。本研究で開発した方法は、今後個体レベルでのクロマチン動態研究に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To visualize the onset of ZGA in living embryos, we injected Fab specific to Ser2 phosphorylated RNA polymerase II (RNAP2 Ser2ph) into fertilized eggs. Fluorescence microscopy showed that RNAP2 Ser2ph-Fab became concentrated in nuclei at around 1024-cell stages, indicating that global gene activation was faithfully detected by our system. We also detected a few RNAP2 Ser2ph foci corresponded to the clusters of miR-430 genes, which are highly expressed in early stages.

To detect changes in the levels of histone modifications during ZGA, modification-specific Fabs were injected with RNAP2 Ser2ph-Fab. We found that H3K27ac was the most dynamically increased along with ZGA. The nuclear accumulation of H3K27ac-Fab started earlier than that of RNAP2 Ser2ph-Fab. In addition, H3K27ac also appeared in miR-430 foci earlier than RNAP2 Ser2ph. Inhibition of bromodomain-containing proteins diminished RNAP2Ser2ph accumulation. These results suggest that H3K27ac promotes ZGA and drives transcription.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス 胚性ゲノム活性化 ライブイメージング 転写 ヒストン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾は、細胞機能制御に重要な役割を担っていることが幅広い分野で明らかにされている。特にヒストン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、分化刺激などにより動的に変化するため、細胞分化過程の基盤として働くと考えられている。しかし、ヒストン修飾レベルの細胞機能に応じた継時的変化や、細胞表現型から遡及的に修飾動態の意義を明らかにするような解析はほとんど進められていなかった。これはヒストンに限らず、蛋白質の翻訳後修飾を生きた細胞で可視化するための手段が乏しいことが主な要因であると考えられた。申請者らはこれまで独自にヒストン修飾特異的モノクローナル抗体を開発し、従来の方法によるエピジェネティクス解析を進める一方で、修飾部位特異的抗体由来の蛍光プローブを開発し、ヒストン修飾の生細胞観察系を樹立してきた(図1)。

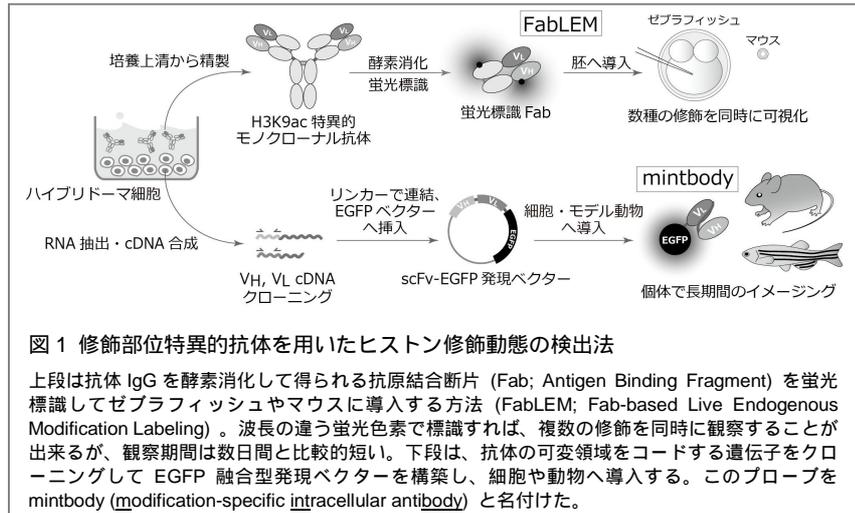


図1 修飾部位特異的抗体を用いたヒストン修飾動態の検出法

上段は抗体 IgG を酵素消化して得られる抗原結合断片 (Fab; Antigen Binding Fragment) を蛍光標識してゼブラフィッシュやマウスに導入する方法 (FabLEM; Fab-based Live Endogenous Modification Labeling)。波長の違う蛍光色素で標識すれば、複数の修飾を同時に観察することが出来るが、観察期間は数日間と比較的短い。下段は、抗体の可変領域をコードする遺伝子をクローニングして EGFP 融合型発現ベクターを構築し、細胞や動物へ導入する。このプローブを mintbody (modification-specific intracellular antibody) と名付けた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュ胚発生をモデルとして、転写開始に伴うヒストン修飾の変動を生体内で可視化して定量化することを目的とした。ゼブラフィッシュでは、受精卵が約 1000 個の細胞に分裂するまでのおよそ 3 時間半の間、胚ゲノムからの転写はほとんど起こらず、この間は母親から受け継がれた卵子由来の転写産物やタンパク質を利用することがわかっている。胚ゲノムからの転写の活性化は、zygotic genome activation (ZGA) と呼ばれており、転写活性化の制御にヒストン修飾が関与することが報告されている。しかし ZGA における転写のタイミングとヒストン修飾の変化量の解析は未だ行われていない。本研究は、ゼブラフィッシュ発生過程の胚性ゲノム活性化に伴うヒストン修飾変動を可視化して定量化することで、転写活性化におけるヒストン修飾変動の意義を生体内で明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) ゼブラフィッシュ初期発生過程において、胚性ゲノム活性化 (ZGA; zygotic genome activation) に伴う転写活性化とヒストン修飾の変化を、ライブイメージングにより計測し、変化のタイミングと変化量を明らかにしてヒストン修飾変動プロファイルを作成する。
- (2) ヒストン修飾変動プロファイルをもとに、転写活性化に重要であると予想される修飾について、修飾酵素活性を阻害する化合物を添加した場合の転写活性の変化を調べ、ヒストン修飾の意義を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 胚ゲノム活性化の可視化とヒストン修飾動態

ゼブラフィッシュ受精卵に蛍光標識した RNA ポリメラーゼ II Ser2 リン酸化特異的抗原結合断片 (RNAP2 Ser2ph-Fab) を注入し、共焦点顕微鏡下でライブ観察を行ったところ、発生段階が進むにつれて RNAP2 Ser2ph-Fab が核へ集積した。細胞質と核のシグナル比を定量化したところ、1024 細胞期付近で起こる ZGA に伴って核/細胞質比の上昇が観察できた。すなわち、胚ゲノム活性化をライブイメージングにより観察し計測することに成功

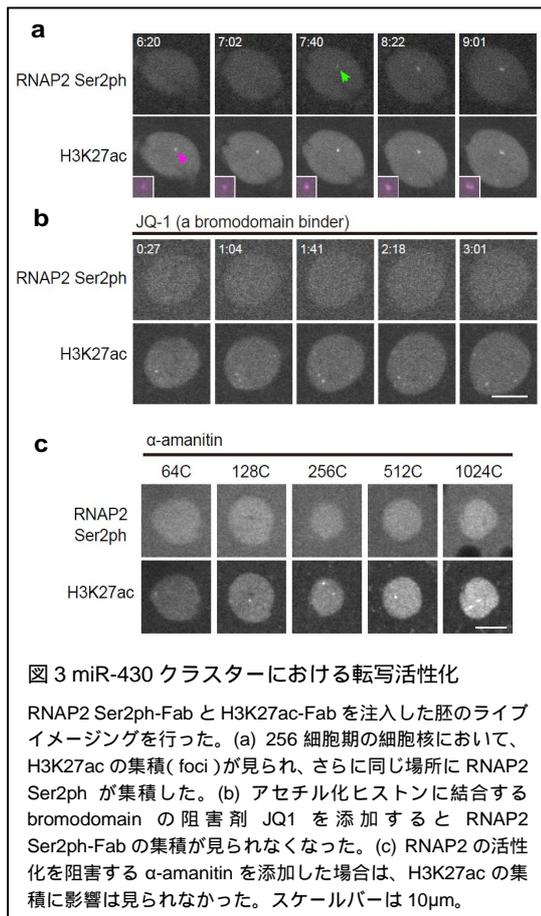
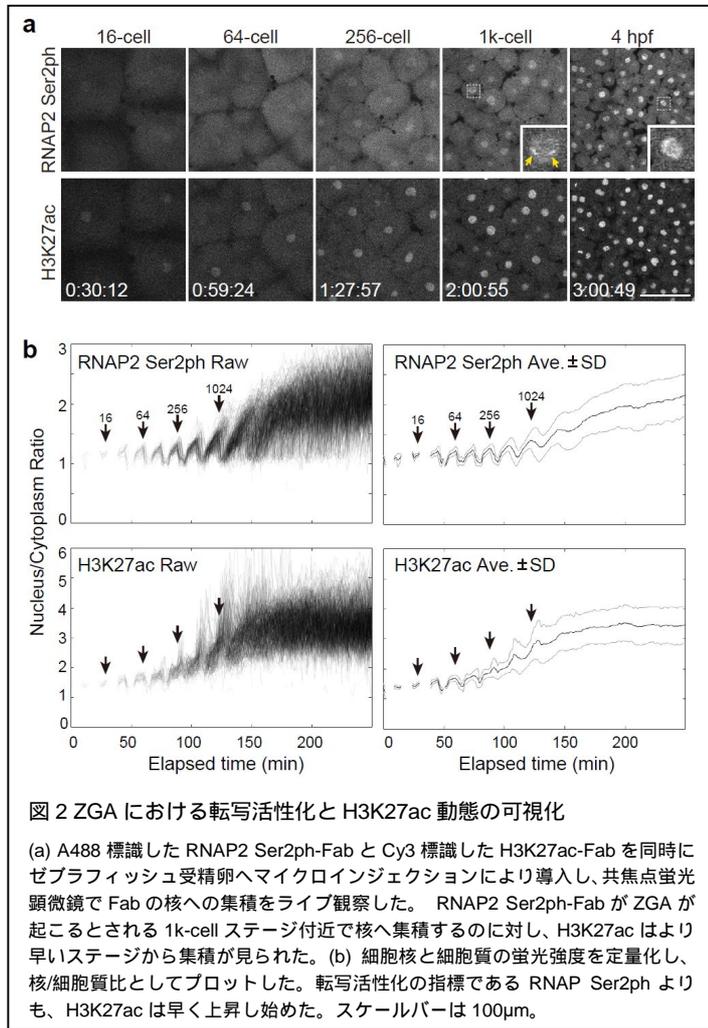
した(図2)。また、RNAP2 Ser2ph-Fab と同時に異なる蛍光色素で標識したヒストン修飾特異的 Fab を注入して胚ゲノム活性化に伴うヒストン修飾動態を解析した。細胞分化や発生において修飾レベルの変化が報告されている主なヒストン修飾のうち、H3K27ac が最も大きく、RNAP2 Ser2ph よりもやや早いタイミングで上昇することがわかった(図2)。さらに、ZGA よりも早い時期の細胞核に、RNAP2 Ser2ph の集積が観られた(図2a、黄色矢印)。RNAP2 Ser2ph の集積部位 (foci) は、major ZGA よりも前に高レベルで発現する miR-430 クラスター遺伝子であることを、miR-430 特異的モルフォリノを使って確認した。

miR-430 クラスターの発現開始についてさらに詳しく調べるため、H3K27ac と RNAP2 Ser2ph を同時に観察したところ、

256 細胞期において、まず H3K27ac が foci に集積し、数秒遅れて RNAP2 Ser2ph が集まる様子が観察された(図3a)。

(2) H3K27ac の転写活性化における重要性  
プロモドメインタンパク質(アセチル化ヒストンに結合し、転写装置をリクルートする働きを持つ因子)の阻害剤 JQ-1 を添加したところ、RNAP2 Ser2ph foci が検出されなくなった(図3b)ことから、miR-430 クラスターの転写活性化には、H3K27ac レベルの上昇とプロモドメインタンパク質による転写誘導が必要であることが示唆された。一方で、RNA ポリメラーゼの活性化を阻害する  $\alpha$ -amanitin を添加しても H3K27ac の foci への集積に変化は見られなかった(図3c)。

以上の結果から、ゼブラフィッシュ初期発生過程の ZGA には、H3K27ac レベルの上昇が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は ZGA におけるクロマチン高次構造の解明や、ZGA において遺伝子特異的に転写が開始される仕組みについて検討していく予定である。



## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Sato Y, Hilbert L, Oda H, Wan Y, Heddleston JM, Chew T-L, Ziburdaev V, Keller P, Lionnet T, Vastenhouw N, and Kimura H. Quantitative measurements of chromatin modification dynamics during zygotic genome activation. *bioRxiv* 601393, 2019
2. Hilbert L, Sato Y, Kimura H, Jülicher F, Honigmann A, Ziburdaev V, Vastenhouw NL. Transcription organizes euchromatin similar to an active microemulsion. *bioRxiv* 234112, 2018
3. Sato Y, Stasevich TJ, Kimura H. Visualizing the Dynamics of Inactive X Chromosomes in Living Cells Using Antibody-Based Fluorescent Probes. *Methods Mol Biol.* 2018;1861:91-102.
4. \*Sato Y, Kujirai T, Arai R, Asakawa H, Ohtsuki C, Horikoshi N, Yamagata K, Ueda J, Nagase T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kimura A, Kurumizaka H, \*Kimura H. A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation. *J Mol Biol.* 428(20), 3385-3902, 2016
5. Sato Y, Mukai M, Kimura H. Histone Acetylation on Drosophila Polytene Chromosomes Visualized by Mintbody. *Cytologia.* 80(4), 383-384, 2015

### 〔学会発表〕(計 8 件)

1. 第 12 回 日本エピジェネティクス研究会年会 (平成 30 年 5 月 24 ~ 25 日) 北海道立道民活動センターかでの 2・7 (北海道・札幌市) ランチョンセミナー「細胞内抗体 Mintbody を用いた生細胞エピジェネティクス解析」佐藤優子、木村宏
2. Cold Spring Harbor Laboratory “Nuclear Organization & Function” (平成 30 年 5 月 1-5 日) ポスター発表 “Zygotic genome activation is dynamically mediated by histone acetylation in zebrafish” Sato Y, Hilbert L, Ziburdaev V, Vastenhouw N, Kimura H
3. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (平成 29 年 12 月 9 日) 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市) オーガナイザー・招待講演「ゼブラフィッシュ胚ゲノム活性化におけるヒストン修飾動態の意義」 Sato Y, Hilbert L, Ziburdaev V, Vastenhouw N, Kimura H
4. 第 11 回 日本エピジェネティクス研究会年会 (平成 29 年 5 月 22 ~ 23 日) 東京一ツ橋学術総合センター (東京都・千代田区) ポスター発表「Zygotic genome activation is dynamically mediated by histone acetylation」 Sato Y, Hilbert L, Ziburdaev V, Vastenhouw N, Kimura H
5. EMBO workshop “Awakening of the genome: The maternal-to-zygotic transition” (23-26 Apr 2017) Dresden (ドイツ) 口頭発表 “Zygotic genome activation is dynamically mediated by histone acetylation” Sato Y, Hilbert L, Ziburdaev V, Vastenhouw N, Kimura H
6. EMBL Conference “Nuclear structure and dynamics” (7-11 Oct 2015) Isle sur la sorgue (フランス) ポスター発表 “Visualizing the inactive X chromosome in vivo by using H4K20me1-specific intracellular antibody probe” Sato Y, Kimura H
7. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function (August 23-26, 2015) 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市) ポスター発表 “Visualizing The Inactive X Chromosome in Living Cells by Using H4K20me1-mintbody” Sato Y, Kimura H (Best Poster Award 受賞)
8. 第 9 回 日本エピジェネティクス研究会年会 (平成 27 年 5 月 25 ~ 26 日) 東京一ツ橋学術総合センター (東京都・千代田区) ポスター発表「ゼブラフィッシュ胚性ゲノム活性化に伴うヒストン修飾動態の *in vivo* イメージング」佐藤優子、木村宏

### 〔図書〕(計 1 件)

1. Kimura H, Sato Y. DNA Replication and Histone Modification. *DNA Replication, Recombination, and Repair* (Fumio Hanaoka and Kaouru Sugawara ed), Springer Japan 出版, 2016, 555 (pp469-488 を担当)

〔産業財産権〕 該当なし

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

## 6 . 研究組織

- (1)研究分担者 該当なし  
(2)研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。