

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25116005

研究課題名(和文)計測と再構築による生細胞内クロマチンダイナミクスの高次元的理解

研究課題名(英文)A multidimensional analysis of chromatin dynamics in living cells by quantitative measurements and reconstruction

研究代表者

木村 宏(Kimura, Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：30241392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 124,900,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチン構造の動的変化は、遺伝情報の発現と維持を介して細胞の形質発現制御の基盤形成に働くと考えられる。本研究は、クロマチン動態の正確な「計測」と「再構築」を行い、生細胞や生物個体におけるクロマチンの動的変化とその機能発現における意義を明らかにすることを目的として行った。クロマチンを構成する主要な蛋白質であるヒストンの翻訳後修飾やDNAのメチル化を生きた細胞や個体で観察・計測する系を開発し、ヒストンのアセチル化が転写の活性化に重要な役割を果たすことを見出すなど、本研究は遺伝子発現制御の基本メカニズムの解明に大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：Chromatin dynamics plays an important role in cell regulation through the control of gene expression and genome integrity. This study aimed to reveal the significance of chromatin dynamics by quantitative measurements and reconstruction in living cells. We have developed techniques to monitor histone modification and DNA methylation in living cells, and revealed the function of histone acetylation in gene activation. This study greatly contributed to understand the basic mechanism of gene regulation in living cells.

研究分野：細胞生物学・エピジェネティクス

キーワード：クロマチン ヒストン修飾 遺伝子発現制御 転写 エピジェネティクス 細胞核

## 1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造の動的変化は、遺伝情報の発現と維持を介して細胞の形質発現制御の基盤形成に働くと考えられる。クロマチンは細胞核内で動的な構造であり、ミリ秒単位の局所的ゆらぎから、遺伝子の転写に応じた秒・分単位の構造変化、さらに細胞の分化や老化に伴う時間・日、あるいは年単位でのマイクロメートルに及ぶ核内配置の変化まで、様々な時空間スケールで変化する。また、細胞や個体が受けた環境変化やストレスにより大きく変化したクロマチン構造の次世代への継承も最近報告されている。

生細胞におけるクロマチンの動態は、蛍光蛋白質融合ヒストンなどにより観察されてきたが、特定の機能ドメインに着目した計測はほとんど行われていない。これまでに研究代表者や分担者は、FabLEM (Fab-based Live Endogenous Modification Labeling) や細胞内修飾特異的一本鎖可変領域抗体 mintbody (modification-specific intracellular antibody) などを開発し、培養細胞や初期胚レベルで、ヒストンの分子動態やヒストン修飾と DNA メチル化の動態を生きたまま可視化してきた。これらの独自の技術を用いて、新しい視点からクロマチン構造が理解できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、クロマチン動態の正確な「計測」と「再構築」を行い、生細胞や生物個体におけるクロマチンの動的変化とその機能発現における意義を明らかにすることを目的として行った。

(1) 「計測」: 生細胞イメージングによるクロマチン動態の理解

mintbody や FabLEM による細胞や生体内でのクロマチン動態計測技術を確立する。具体的には、mintbody を発現する培養細胞やノックイン (KI; knock-in) マウスを作製し、初期胚や各種体細胞、幹細胞、がん細胞を用いた計測により、発生・分化過程やストレス応答時におけるクロマチン構造変化を明らかにする。特に、H4K20me1 が不活性 X 染色体に濃縮されることに着目し、初期発生や核リプログラミング過程における X 染色体不活性化、再活性化の動的変動メカニズムを明らかにする。また、転写活性化や複製の過程におけるクロマチン動態を解明するために、新規プローブの開発を行うと共に、培養細胞のモデル系を用いて転写活性化におけるヒストン修飾の意義を明らかにする。

(2) 「再構築」: 再構成ポリヌクレオソーム解析によるクロマチン動態制御の理解

新学術領域代表者により作製された再構成ポリヌクレオソームを培養細胞や受精卵の核に導入し、その動態を内在性クロマチンのデータと比較し、クロマチン動態と転写などの機能発現制御に重要な要素を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) FabLEM による生細胞のヒストン修飾イメージング

ヒストンや RNA ポリメラーゼ II の翻訳後修飾特異的モノクローナル抗体を精製し、抗原結合断片 (Fab) を調製した後、Alexa488、Cy3、Cy5 等の蛍光色素で標識した。培養細胞へはビーズローディング法、ゼブラフィッシュ初期胚へはマイクロインジェクション法を用いて導入した (図 1)。

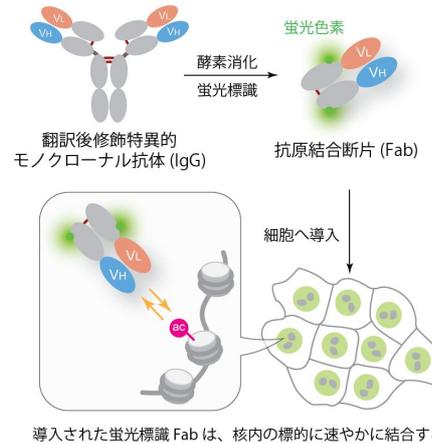


図 1. FabLEM

(科研費 NEWS 2015, vol 2, p12 より)

(2) Mintbody の作製

修飾特異的抗体を産生するマウスハイブリドーマから mRNA を抽出し、可変領域部位を RT-PCR により増幅し、クローニングした。蛍光蛋白質との融合蛋白質として発現するような融合遺伝子を作製し、大腸菌や培養細胞、マウス個体で発現させた。

(3) 蛍光顕微鏡観察と計測

蛍光観察は、倒立顕微鏡 (Ti-E; ニコン) スピンニング型共焦点顕微鏡 (CSU-W1; 横河電機) または、ポイントスキャン型共焦点顕微鏡 (FV1000; オリンパス) を用いて行った。画像の定量化は、Image J、Mathematica、Imaris 等により行った。

## 4. 研究成果

(1) FabLEM 法の確立

FabLEM により生細胞内のヒストン修飾動態の計測が可能であるが、同一の Fab でも結合させる蛍光色素によってバックグラウンドや細胞質の凝集したシグナルの現れ方に差が生じる。そこで、生細胞観察に適した蛍光色素の探索を行い、Alexa488 (緑) Cy3 (赤) Cy5 または CF640 (近赤外) が細胞内のイメージングに適していることを見出した。また、細胞周期を通じたヒストン H3 のアセチル化と RNA ポリメラーゼ II のリン酸化動態についても明らかにした。

(2) ステロイドホルモンによる転写活性化のキネティクス

RNAポリメラーゼIIの活性化のキネティクスとヒストン修飾の役割を明らかにするため、活性化型 RNAポリメラーゼIIの指標となるリン酸化に対する修飾抗体を作製し、FabLEM法により生細胞計測を行った。モデル系として、グルココルチコイドで誘導される遺伝子アレイの転写活性化を計測し、数理モデルへのフィッティングにより、転写活性化のキネティクスを明らかにした。また、ホルモン刺激前にH3K27acレベルが高い細胞では転写因子(グルココルチコイド受容体)の遺伝子アレイへの集積とRNAポリメラーゼIIの転写開始から伸長への移行が促進されることが分かった。これらの生細胞解析の結果は、クロマチン免疫沈降と大規模DNA塩基配列解析(ChIP-seq)による内在性遺伝子の解析からも支持された。これらの結果などから、H3K27acの転写活性化における意義と分子機構を明らかにした(図2)。

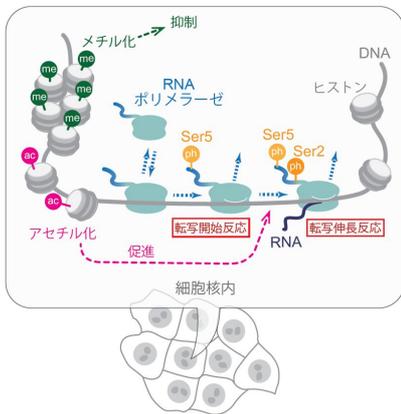


図2 . 転写制御におけるヒストンアセチル化の役割  
(科研費NEWS 2015, vol 2, p12より)

(3) ゼブラフィッシュ発生過程におけるヒストン修飾動態

胚性ゲノム活性化(ZGA; zygotic genome activation)や分化の過程でのヒストン修飾動態を明らかにするため、ゼブラフィッシュ受精卵を用いてFabLEM計測を行った。ゼブラフィッシュの胚発生過程では、初期には転写がおこらずDNA複製と細胞分裂を素早く繰り返すが、9~10回分裂すると転写が誘導されZGAが起こることが知られている。実際に、転写伸長反応の際に起こるRNAポリメラーゼIIのリン酸化特異的Fabは、発生初期には細胞核に局在化しないが、ZGAの時期に細胞核の一部に濃縮しはじめることがわかった。現在、様々なヒストン修飾抗体特異的Fabを用いてFabLEM計測を行っており、ヒストンH3アセチル化レベルがZGAの際に上昇するとの結果が得られている。今後、クロマチン制御を介したZGAのメカニズムの解明が期待でき

る。

(4) マウス生体内のヒストン修飾動態

H4K20me1に特異的なmintbodyプローブを開発した(図3)。H4K20me1は、雌由来の培養細胞では不活性X染色体に濃縮されることが報告されており、実際にマウス雌培養細胞の生細胞観察によりH4K20me1-mintbodyが不活性X染色体に濃縮されることが確認された。H4K20me1-mintbody発現細胞を用いた解析から、興味深いことにH4K20me1は発生の比較的初期では不活性X染色体に濃縮するが、細胞分化に伴いその濃縮が見られなくなることが見出された。H4K20me1は、これまでに細胞周期の制御、DNA損傷修復制御、転写制御など様々なクロマチン機能制御に関わることが示されており、mintbody発現マウスやそれ由来の細胞を用いることで、その制御機構の解明に貢献できると考えられた。

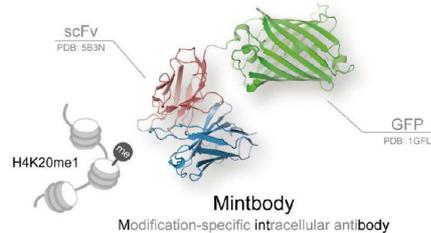


図3 . H4K20me1-mintbody  
(J Mol Biol, 428, 3885, 2016より)

(5) マウス生体内のDNAメチル化動態

発生や細胞分化過程におけるグローバルなDNAメチル化状態の変動を生きたまま観察することを目的に、メチル化DNAを認識するMBD1(Methyl-CpG Binding Domain protein 1)蛋白質のMBDドメインにmCherryを融合したプローブを全身で発現するマウス(MethylROと命名)を作製した。このマウスの着床前初期胚発生過程及びES細胞の樹立過程の長期間にわたって生細胞イメージングを行うことで、細胞分化が進行するに伴って特にセントロメア領域のDNAメチル化が上昇し、かつヘテロクロマチン構造が形成されていく様子を捉えることに成功した。また、MethylROマウスを用いて、イメージングのみならずmCherry抗体を用いたChIP-seqによりマウス個体での任意の組織におけるDNAメチル化領域も明らかにできることを示した。



図4 . DNAメチル化可視化プローブを発現するマウスMethylRO

(6) マウス新規ヒストンH3パリアント

### (H3t) の機能

H3t 遺伝子は、精巣で特異的に発現するヒストン H3 のバリエーションである (図 5)。H3t のノックアウト (KO) マウスを作製したところ、H3t-KO マウスの雄は完全に不妊であり、精巣では精子形成過程のごく初期に異常があり、精子がまったく形成されないことが明らかとなった。この結果は、組織特異的なヒストン H3 バリエーションが個体レベルで重要な機能を担っていることを示した最初の例となった。

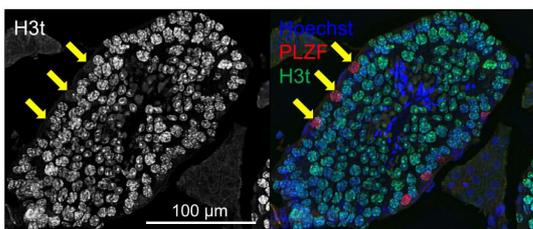


図 5 . H3t 特異的抗体を用いた精巣切片の免疫染色。

H3t は、PLZF 陽性の肝細胞では発現しておらず、分化した細胞で発現している。

### (7) 熱ショック応答のクロマチン導体

熱ショックストレスに応答した内在性転写単位の活性化メカニズムの解明のために、mCherry や HaloTag 融合型の熱ショック転写因子 (heat shock factor 1; HSF1) を発現する細胞を樹立し、FabLEM 解析により、熱ショックに応答したヒストンと RNA ポリメラーゼ II の翻訳後修飾の動態を解析した。また、dCas9-EGFP と特異的な sgRNA を用いて、サテライト III 領域の生細胞可視化系を開発した。

### (8) 細胞核の再構築

マウス受精卵の細胞質に DNA ビーズを導入すると、クロマチンアセンブリと部分的な核膜形成が起こることを見出した。核膜形成の効率は細胞質のビーズの場所に影響を受けることが示唆された。また、クロマチンビーズの作製条件についても検討した。

### (9) 将来展望

本研究により、ヒストン修飾や DNA メチル化などクロマチン修飾の計測が可能になった。特に、リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II とヒストン修飾の同時可視化によるキネティクス計測により、ステロイドホルモンに対する迅速な転写活性化におけるヒストンアセチル化の意義を明らかにすることができた。また、ヒストン修飾や DNA メチル化を生体内で可視化する系を構築し、モデルマウスの作製も行うことができた。今後、これらの技術や材料が発生や分化の際の遺伝子発現制御機構の解明に役立つと期待できる。

### 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 97 件)

1. Harada A, Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, Ohkawa Y. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun.* 2018, 9(1): 1400. doi: 10.1038/s41467-018-03845-1 査読有
2. Ruppert JG, Samejima K, Platani M, Molina O, Kimura H, Jeyaprakash AA, Ohta S, Earnshaw WC. HP1 targets the chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J.* 2018, 37(6). pii: e97677. doi: 10.15252/embj.201797677 査読有
3. Yamazaki T, Hatano Y, Handa T, Kato S, Hoida K, Yamamura R, Fukuyama T, Uematsu T, Kobayashi N, Kimura H, Yamagata K. Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase. *PLoS One.* 2017, 12(5): e0177764. doi: 10.1371/journal.pone.0177764 査読有
4. Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep.* 2017, 18(3): 593-600. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.065 査読有
5. Shirai A, Kawaguchi T, Shimojo H, Muramatsu D, Ishida-Yonetani M, Nishimura Y, Kimura H, Nakayama JI, Shinkai Y. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *eLife.* 2017, 6: pii: e25317. doi: 10.7554/eLife.31641 査読有
6. Sato Y, Kimura H. Semi-quantitative Analysis of H4K20me1 Levels in Living Cells Using Mintbody. *Bio-protocol.* 2017, 7(10): e2276. doi: 10.21769/BioProtoc.2276 査読有
7. 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.* 2016, 428(20): 3885-3902. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.010 査読有
8. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, Maehara K, Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(13): 6127-6141. doi: 10.1093/nar/gkw202 査読有
  9. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 2016, 6: 24318. doi: 10.1038/srep24318 査読有
  10. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 2015, 23(4): 753-66. doi: 10.1007/s10577-015-9486-4 査読有
  11. Kimura H, Yamagata K. Visualization of epigenetic modifications in preimplantation embryos. *Methods Mol Biol.* 2015, 1222: 127-147. doi: 10.1007/978-1-4939-1594-1\_10. 査読有
  12. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. *Histochem Cell Biol.* 2015, 144(2): 101-109. doi: 10.1007/s00418-015-1344-0 査読有
  13. Dias JD, Rito T, Torlai Triglia E, Kukalev A, Ferrai C, Chotalia M, Brookes E, Kimura H, Pombo A. Methylation of RNA polymerase II non-consensus Lysine residues marks early transcription in mammalian cells. *Elife.* 2015, 4. pii: e11215. doi: 10.7554/eLife.11215 査読有
  14. 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.* 2014, 516(7530): 272-275. doi: 10.1038/nature13714 査読有
  15. Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N, Kimura H. Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. *Methods.* 2014, 70(2-3): 77-88. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.08.002 査読有
  16. Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging. *PLoS One.* 2014, 9(9):e106271. doi: 10.1371/journal.pone.0106271 査読有
  17. Hori T, Shang WH, Toyoda A, Misu S, Monma N, Ikeo K, Molina O, Vargiu G, Fujiyama A, Kimura H, Earnshaw WC, Fukagawa T. Histone H4 Lys 20 mono-methylation of the CENP-A nucleosome is essential for kinetochore assembly. *Dev Cell.* 2014, 29(6): 740-749. doi: 10.1016/j.devcel.2014.05.001 査読有
  18. Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, Kimura H, Ohkawa Y, Yamagata K. Heterochromatin Dynamics during the Differentiation Process Revealed by the DNA Methylation Reporter Mouse, MethylRO. *Stem Cell Reports.* 2014, 2(6): 910-924. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.05.008 査読有
  19. 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.* 2013, 3: 2436. doi: 10.1038/srep02436 査読有
  20. Arimura Y, Kimura H, Oda T, Sato K, Osakabe A, Tachiwana H, Sato Y, Kinugasa Y, Ikura T, Sugiyama M, Sato M, Kurumizaka H. Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci Rep.* 2013, 3: 3510. doi: 10.1038/srep03510 査読有
- 他
- 〔学会発表〕(計 54 件)
1. Hiroshi Kimura: Chromatin modification dynamics during cell differentiation. Gordon Research Conference “Genome Architecture in Cell Fate & Disease”, Hong Kong,

- China, 2017/7/2-7.
2. Hiroshi Kimura: Chromatin modification dynamics during gene activation in living cells. 10th Berlin Summer Meeting, Max Delbruck Center, Berlin, Germany, 2017/6/8-10.
  3. Hiroshi Kimura: Chromatin modification dynamics during gene activation in living cells. 4D Nucleome : The Cell Nucleus in Space and Time, Krakow, Poland, 2017/5/14-17.
  4. Hiroshi Kimura Histone modification dynamics in living cell. Colorado Chromatin Meeting 2016, Fort Collins, Colorado, USA, 2016/8/8.
  5. Hiroshi Kimura: Tracking post-translational modifications in living cells. UK-Japan Symposium "From single molecules to cells and tissues", Leicester, UK, 2016/7/4-5
  6. Hiroshi Kimura: Tracking posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. 24<sup>th</sup> Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus/57<sup>th</sup> Symposium of the Society for Histochemistry. Vienna, Austria. 2015/8/20

他

〔図書〕(計 1 件)

1. 原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰. 新・生細胞 蛍光イメージング, 共立出版, 2015年11月25日, 340ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: ヒストン H3 トリメチル化リシン特異的モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片

発明者: 木村 宏, 佐藤優子, 大井彰人, 胡桃坂仁志, 鯨井智也, 大川恭行

権利者: 国立大学法人東京工業大学

種類: 特願

番号: 2017-111580 (PCT/JP2018/021688)

出願年月日: 2017年6月6日(2018年6月6日)

国内外の別: 国内(国際)

名称: DNA結合タンパク質の結合領域の近傍に所望のDNA断片を挿入する方法

発明者: 大川恭行, 原田哲仁, 胡桃坂仁志, 木村 宏, 半田哲也, 佐藤優子, 林 陽子

権利者: 国立大学法人九州大学, 国立大学法人東京工業大学

種類: 特願

番号: 2016-167967 (PCT/JP2017/019309)

出願年月日: 2016年8月30日(2017年8月15日)

国内外の別: 国内(国際)

〔その他〕

ホームページ等

東京工業大学・木村宏研究室:

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

東京工業大学・木村宏研究者情報

[http://t2r2.star.titech.ac.jp/cgi-bin/researcherinfo.cgi?q\\_researcher\\_content\\_number=CTT100673940](http://t2r2.star.titech.ac.jp/cgi-bin/researcherinfo.cgi?q_researcher_content_number=CTT100673940)

東京工業大学・科学技術創成研究院・細胞制御工学研究センター

<http://www.rcb.iir.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 宏 (KIMURA Hiroshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号: 30241392

(2)研究分担者

山縣 一夫 (YAMAGATA, Kazuo)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号: 10361312

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし