

令和元年6月14日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14785

研究課題名(和文) 修飾特異的な抗体を用いないヒストン翻訳後修飾の解析系の確立

研究課題名(英文) Analysis of histone modifications without using specific antibodies.

研究代表者

立和名 博昭 (Tachiwana, Hiroaki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・研究員

研究者番号：70546382

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)：ヒトをはじめとする真核生物において、遺伝情報であるDNAはクロマチンと呼ばれる構造を形成して細胞核内に収納されている。機能の異なる細胞が作り出され個体が形成されるためには、使われる遺伝子と使われない遺伝子の選別が必要である。クロマチンは、主要構成因子であるヒストンタンパク質が、アセチル化やメチル化などの化学修飾を受けることで構造を変化させ、遺伝子発現を制御している。本研究では、ヒストンの化学修飾を解析する新たな手法の確立を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は遺伝子発現制御機構に関して、新たな手法の開発を行なった萌芽研究である。遺伝子発現の異常は多くの疾患の原因となっている。そのため、その制御機構の解明が重要だと考えられている。本研究はゲノムDNAが形成しているクロマチン構造に着目して、クロマチン構造を介した遺伝子発現制御機構の研究に関する新たな手法の開発を行なった。この手法により、これまでに解析ができなかった事象の解析が可能となり、新たな知見が得られる。このことにより、遺伝子発現制御機構の解明に貢献し、疾患の制御にも繋がる次のアイデアの創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, DNA is packaged into chromatin structure and stored in the cell nucleus. Gene expression regulated by chromatin structure enables to generate different cell types. Histone proteins, major components of chromatin, undergo post translational modifications such as acetylation and methylation, which are crucial for chromatin structure and function. To analyze histone modifications, specific antibodies are essential. However, it is not easy to produce the antibodies and it is often rate limiting for researches. In this study, we established a new method to analyze chemical modification of histones without the need of producing specific antibodies.

研究分野：生化学

キーワード：クロマチン エピジェネティクス ヒストン

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

1. 研究開始当初の背景

同じ遺伝情報をもつ細胞が多様な機能を獲得している機構として、エピジェネティックな遺伝子発現制御に注目が集まっている。エピジェネティックな遺伝子発現制御は、DNA のメチル化、ヒストンの翻訳後修飾、クロマチン構造などにより DNA 配列に依存せずに転写を制御する機構である。ヒストンの翻訳後修飾は、数多く同定されているが、その中には転写不活性型のヘテロクロマチン、転写活性型のユークロマチンクロマチンおよび DNA 損傷修復に密接に関わるものがある。また、発生や分化において特異的にみられる翻訳後修飾も明らかになっている。このように、ヒストンの翻訳後修飾が生命現象と深く関わっているが、その解析は未だ十分ではない。現在の解析手法では、ヒストンの翻訳後修飾を識別するために、特異性の高い抗体の作製が不可欠である。この抗体の作製に費用と時間がかかってしまい、最も悪い場合には目的とする抗体を作製することができずに研究を断念することがある。さらに、ヒストンテール領域ではなくヌクレオソーム構造の内側に存在する修飾は抗体により認識されないため、現在の方法では解析ができない。この問題を解決するためには、ヒストン修飾を特異的に認識する抗体に頼らない新しい解析系を確立することが必要であると考え、申請者は本研究を着想した。

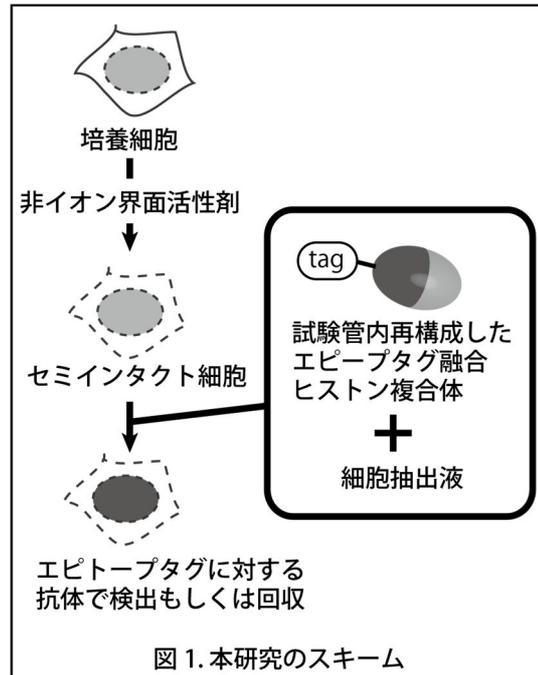
2. 研究の目的

本研究の目的は、in vivo 実験系と in vitro 実験系の利点を組み合わせた「半 vivo 半 vitro 実験系」を確立し、ヒストンの翻訳後修飾によるクロマチンの動態を解析することである。ヒストンの翻訳後修飾はクロマチン構造を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構に深く関わっているが、その全容の解明は進んでいない。これは、翻訳後修飾を受けたヒストンを解析するには、修飾型ヒストンに特異性の高い抗体に頼るしかなく、抗体の作製が律速となっているためである。そこで、本研究では、化学的に修飾を導入したりコンビナントヒストンとセミインタクト細胞を組み合わせた「半 vivo 半 vitro 実験系」を立ち上げ、修飾を認識するヒストン抗体に頼らずに翻訳後修飾を受けたヒストンのダイナミクスの解析を行い、ヒストンの翻訳後修飾とエピジェネティクスの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞を固定せずに界面活性剤により処理したセミインタクト細胞は、細胞膜と核膜に孔があいている細胞である。細胞内にあるタンパク質を含む可溶性物質は、セミインタクト細胞を作製する際に除かれる。しかし、クロマチンは不溶性であるためセミインタクト細胞の核内に留まる。そのため、外からタンパク質を加えてセミインタクト細胞のクロマチンと反応させることが可能である。本研究では、エピトープタグを付加したヒストンを大腸菌内で発現させ、精製を行なった。そして、精製したヒストンを用いてヒストン複合体を試験管内再構成した。得られたヒストン複合体をセミインタクト細胞のクロマチンと反応させて取り込ませることにより、ヒストンのダイナミクスの解析を行なった(図1)。

これまでに、大腸菌内で特殊なコドンを用いてアセチル化やメチル化されたアミノ酸を翻訳時に取り込ませる方法、精製したヒストンと化学合成した修飾されたペプチドを用いてネイティブクミカルライゲーションにより化学修飾されたヒストンを調製する方法が開発されている。これらの方法とセミインタクト細胞を用いたヒストンダイナミクスを解析する方法を組み合わせることにより、翻訳後修飾を受けたヒストンのダイナミクスの解析を行うことが可能である。



4. 研究成果

本研究では、HeLa 細胞を用いてセミインタクト細胞を調製した。これまでに主要型ヒストン、ヒストン亜種および変異体の計 15 種類のヒストンをエピトープタグ (HA、FLAG、V5 タグ) 融合タンパク質として精製を行い、それぞれを機能的な複合体 (H2A-H2B および H3-H4 複合体) として試験管内において再構成した。再構成したヒストン複合体を、セミインタクト細胞に加え、セミインタクト細胞のクロマチンに取り込ませ、そのダイナミクスを解析した。

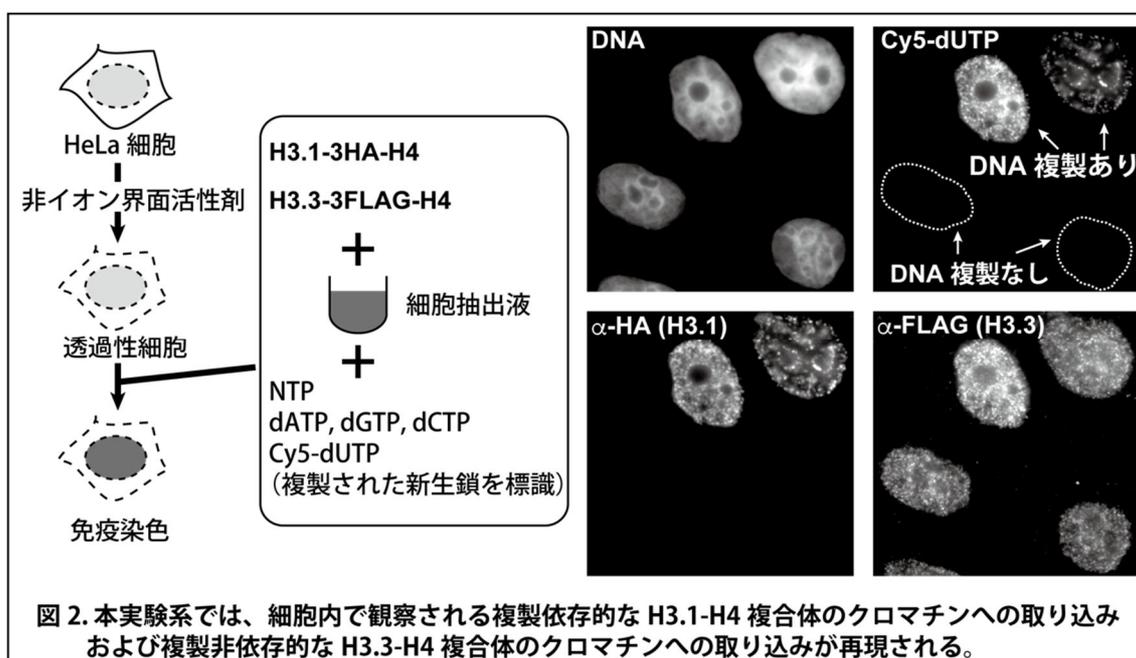
最初に免疫染色法により H3.1-H4 複合体および H3.3-H4 複合体の取り込みの解析を行なった結

果、細胞内で観察されている複製依存的な H3.1-H4 複合体のクロマチンに取り込みと複製非依存的な H3.3-H4 複合体クロマチンに取り込みが本実験系において再現されることが分かった(図 2)。さらに、どの領域に取り込まれたかを DNA 配列レベルで解析するために、セミインタクト細胞のクロマチンに取り込ませたヒストン複合体を含むクロマチン断片をクロマチン免疫沈降法により回収することに成功した。

さらに、主要型 H2A、H2A バリエーションである H2A.Z および H2A.X も H2B との複合体として精製を行い、セミインタクト細胞のクロマチンに取り込ませた。その結果、H2A および H2A.X は DNA 複製依存的および非依存的にクロマチンに取り込まれることが明らかとなった。一方で、H2A.Z は DNA 複製非依存的にクロマチンへ取り込まれることが分かった。

以上のことから、セミインタクト細胞とエピトープタグを付加したヒストン複合体を用いることで、特異的な抗体を用いずに、目的のヒストンのダイナミクスを解析する実験系の確立に成功した。

今後は、翻訳後修飾のはいたヒストン複合体を試験管内再構成し、そのダイナミクスを本実験系により明らかにする予定である。本研究の成果により、これまでに不可能であった離れた位置に存在する二つ以上の修飾をもつヒストンの解析やヌクレオソーム構造の内側に位置するアミノ酸が化学修飾されているヒストンの解析が可能となった。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Chromatin structure-dependent histone incorporation revealed by a genome-wide deposition assay

Tachiwana H, Dacher M, Maehara K, Harada A, Ohkawa Y, Kimura H, Kurumizaka H, Saitoh N

BioRxiv, 2019

doi: <https://doi.org/10.1101/641381>

The CENP-A centromere targeting domain facilitates H4K20 monomethylation in the nucleosome by structural polymorphism.

Arimura Y, Tachiwana H, Takagi H, Horii T, Kimura H, Fukagawa T, Kurumizaka H

Nature communications 10(1):576 2019

doi: [10.1038/s41467-019-08314-x](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08314-x).

Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA.

Yamamoto T, Sakamoto C, Tachiwana H, Kumabe M, Matsui T, Yamashita T, Shinagawa M, Ochiai K, Saitoh N, Nakao M

Scientific reports 8(1):15202 2018

doi: [10.1038/s41598-018-33227-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33227-y).

Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility.

Osakabe A, Lorkovic ZJ, Kobayashi W, Tachiwana H, Yelagandula R, Kurumizaka H, Berger F.

Nucleic Acids Research 46(15):7675-7685 2018

doi: 10.1093/nar/gky540.

Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis.

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.

Cell Reports 18(3):593-600 2017

doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.

〔学会発表〕(計6件)

立和名博昭、ダッシェ マリコ、原田哲仁、大川恭行、木村宏、胡桃坂仁志、斉藤典子「クロマチンの機能特徴づけるヒストンバリエーションの取り込み機構」第36回染色体ワークショップ、第17回核ダイナミクス研究会、2019

立和名 博昭、ダッシェ マリコ、原田哲仁、木村宏、大川恭行、胡桃坂仁志、斉藤典子「クロマチンの高次構造とヒストンダイナミクスの解析」第42回日本分子生物学会年会、2018年

立和名博昭「ヒストン H2A ファミリーのダイナミクス」蛋白研セミナー：細胞核とクロマチン構造が操る高次生命現象 2018年

Hiroaki Tachiwana「Structural analysis of the centromere specific nucleosome」第55回日本生物物理学会年会、2017年

立和名博昭「透過性細胞を用いたヒストンのダイナミクス解析」第35回染色体ワークショップ、第16回核ダイナミクス研究会、2018

立和名博昭「透過性細胞と再構成ヒストン複合体によるヒストン動態の解析」第42回日本分子生物学会年会、2017年

〔図書〕(計1件)

立和名博昭、実験医学別冊「あなたのタンパク質精製、大丈夫ですか？」第2章2, 6, 7, 羊土社

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0144850/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：ダッシェ マリコ

ローマ字氏名：DACHER, mariko

研究協力者氏名：胡桃坂 仁志

ローマ字氏名：KURUMIZAKA, hitoshi

研究協力者氏名：斉藤 典子

ローマ字氏名：SAITOH, noriko

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。