

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17719

研究課題名(和文) 特定ゲノム領域の可視化とエピゲノム操作を用いた遺伝子発現制御の動態解析

研究課題名(英文) Kinetic analysis of gene expression regulation using visualization and epigenomic manipulation of specific genomic regions

研究代表者

半田 哲也 (Handa, Tetsuya)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任助教

研究者番号：40772570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞核内でクロマチン構造の変化と遺伝子発現の動態を明らかにするために、本研究では独自の翻訳後修飾可視化技術とCRISPR/Cas9を応用した特定ゲノム領域の可視化およびエピゲノム編集を組み合わせ、生細胞イメージング計測を行った。ヘテロクロマチン構造領域からのRNA Polymerase 2 (RNAPol2)の活性化において、ヒストンH3 Lys27などのアセチル化修飾がRNAPol2の活性化とは独立に先行して起こること、転写活性化に伴いクロマチンの凝集性と運動性がダイナミックに変化し、クロマチンの運動性はヒストン修飾やRNA Pol2の活性化と相関があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、従来の細胞を固定するようなスナップショット的な解析では理解が進んでいなかった、環境応答や細胞分化の際にクロマチン構造がどのように変化し、遺伝子発現が制御されているのかという問題に取り組んだ。反応過程の経路図的な理解にとどまらず、ヒストン修飾を介したクロマチンの運動性制御とRNAPol2活性化との相関など、転写制御の新たな側面の発見につながった。また、人為的な遺伝子発現制御は細胞の形質を操作するための技術として重要であり、将来的な高効率な細胞の分化誘導やリプログラミングの基盤技術開発につながることを期待でき、再生医療等にも広く波及効果を及ぼすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the dynamics of chromatin structural changes and transcriptional activation in live-cell imaging by combining post-translational modification specific probes against histone and RNA Polymerase 2 (RNAPol2) with CRISPR/Cas9-based visualization of specific genomic regions and manipulation of the epigenome. The histone acetylation including H3K27ac preceded and was independent of activation of RNAPol2. The chromatin structure changed and the mobility correlated with histone modifications and RNAPol2 states.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エpiジェネティクス 遺伝子発現制御 ヒストン修飾 クロマチン 生細胞イメージング CRISPR/Cas9  
エピゲノム編集 RNA Polymerase 2

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒストンの翻訳後修飾は遺伝子発現制御に重要な役割を果たしており、細胞の形質発現制御の基盤として働いている。クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq によるエピゲノム解析から、ヒストンの特定のアミノ酸残基の翻訳後修飾と転写活性に高い相関があることが分かっている。また、3C (Chromosome Conformation Capture) をベースとするクロマチン間相互作用の解析から、クロマチン高次構造の形成が遺伝子発現制御に重要であることが明らかになりつつある。しかし、細胞を固定して解析するようなアプローチでは、あるスナップショットを見ているに過ぎず、発生や分化、環境応答の際に、クロマチン構造がどのように変化し、遺伝子発現が制御されているのかという問題に関してはあまり理解が進んでいない。生細胞イメージングによる先行研究において、ホルモン応答性遺伝子アレイを用いた転写活性化では、ヒストン H3 Lys27 のアセチル化 (H3K27ac) が、RNA Polymerase 2 (RNAPol2) の転写開始から伸長への移行を促進していることが明らかにされている。しかしながら、ここで使用していた遺伝子アレイでは、あらかじめ H3 Lys4 のトリメチル化 (H3K4me3) や H3K27ac が高く、すみやかに転写が起こるように準備されたクロマチン状態の特徴を有していた。一方、不活性なクロマチン構造から転写がどのように活性化するのは明らかにできていない。また、クロマチンの運動性が転写活性と相関することが分かってきたが、ヒストン修飾の関与については不明である。

### 2. 研究の目的

生細胞イメージング計測により、生細胞核内で転写制御のダイナミクスを明らかにする。ヘテロクロマチン領域からの転写活性化として、ヒト細胞での熱ショック応答における Satellite III (Sat3) 領域からの non-coding RNA の転写に着目し、不活性なクロマチン構造からどのように RNAPol2 が活性化されるのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 熱ショック応答での Sat3 転写活性化の可視化

熱ショック応答のマスター転写因子である HSF1 に mCherry 等の蛍光タンパク質を融合し、安定発現細胞株を樹立した。ヒストンや RNAPol2 の翻訳後修飾を生細胞で可視化するために FabLEM 法を用いた。FabLEM 法では、修飾特異的モノクローナル抗体から抗原認識断片 Fab を調整し、蛍光標識した後にビーズローディングにより細胞に導入した。生細胞イメージングには、スピニングディスク型共焦点顕微鏡システム (ニコン Ti-E, 横河電機 CSU-W1, Andor iXon3 EM-CCD) を使用し、4D 画像解析には Imaris (Bitplane) を用いた。

#### (2) 転写活性化に伴う Sat3 領域の動態解析

CRISPR/Cas9 を利用し、ヌクレアーゼ活性を失活させた dCas9 に sfGFP 等の蛍光タンパク質を融合し、Sat3 領域に対するガイド RNA (sgRNA) とともに細胞に発現させた。熱ショック応答に伴う Sat3 クロマチン領域の凝集性 (体積) および運動性を生細胞イメージングから計測した。より高速でのイメージングを行うために、生細胞イメージングには先のシステムに加えて、Dragonfly (Andor) 共焦点ユニットを使用した。

#### (3) エピゲノム編集を用いたヒストン修飾の機能解析

Sat3 領域での転写活性化におけるヒストン修飾の機能を明らかにするために、dCas9 にヒストン修飾酵素等の機能ドメインを付加し、人為的にヒストン修飾や核内局在を操作した状態で、熱ショックに応答した Sat3 転写活性化を生細胞イメージングした。

### 4. 研究成果

#### (1) 熱ショック応答での Sat3 転写活性化の可視化

熱ショックに応答した Sat3 領域でのヒストン修飾の変化と RNAPol2 活性化のキネティクスを明らかにするために、HSF1-mCherry を安定発現する hTERT RPE-1 細胞を用いて、FabLEM 法による生細胞イメージングを行った。熱ショック誘導後、HSF1-mCherry は Sat3 領域に集積し 2 つの大きな局在を示す。続いて、そこに H3K27ac、転写開始型 RNAPol2 である Ser5 がリン酸化された RNAPol2Ser5ph が集積してきた (図 1)。転写伸長型である Ser2 リン酸化型 RNAPol2Ser2ph は、さらに遅いタイミングで集積してきた。H3K27ac に加えて、H3K9ac 等も RNAPol2 の活性化に先行していた。ヒストンのアセチル化修飾と RNAPol2 活性化の依存関係を調べるために、各種阻害剤を添加した条件で調べた。THZ1 や Flavopiridol を添加し、RNAPol2 のリン酸化を阻害した条件においても、HSF1 に続き H3K27ac が集積してき

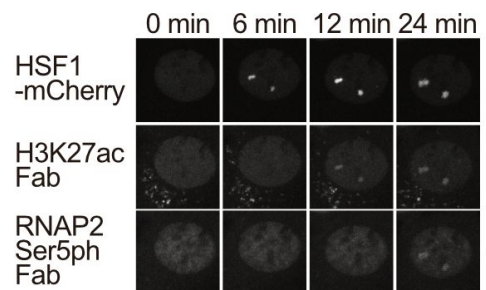


図1. 熱ショック応答における転写活性化のキネティクス. HSF1 に続き、H3K27ac、RNAPol2Ser5の順で集積する。

たことから、ヒストンのアセチル化は RNAPo2 活性化とは独立に先行して起こることが分かった。一方、ヒストンのアセチル化を認識し結合する BRD4 等を JQ1 により阻害した条件では、RNAPo2 のリン酸化の集積が遅延あるいは減弱していたことから、ヒストンのアセチル化とその下流で機能する BRD4 が RNAPo2 活性化に重要であることが分かった。固定細胞を用いた免疫染色と ChIP-qPCR 解析から、H3K27ac, H3K9ac に加えて H3K18ac, H4K5acK8ac などのヒストンアセチル化修飾も熱ショック後の Sat3 領域に集積していることが分かった。一方、H3K4me3 や H3K36me3 など、転写活性と正の相関が知られているメチル化修飾は集積していなかった。また、ヘテロクロマチン構造の基盤となっている H3K9me3 は、熱ショック後も Sat3 領域で高いレベルで維持されていたことから、ヘテロクロマチン構造を解消せずに、ヒストンアセチル化修飾が導入され、RNAPo2 活性化に機能していると考えられる。

### (2) 転写活性化に伴う Sat3 領域の動態解析

dCas9-3xsfGFP と Sat3 配列に対する sgRNA を hTERT RPE-1 細胞に発現させると、2つの foci として Sat3 領域を可視化できる。熱ショック誘導後、この領域に HSF1 が集積してくる (図 2)。dCas9 で可視化した Sat3 領域の体積を計測したところ、HSF1 の集積に伴い、体積が増加し、クロマチン構造が脱凝集していることが分かった。THZ1 や JQ1 存在下でも、熱ショック後に Sat3 領域の体積が増加したことから、ヒストンのアセチル化修飾より下流、RNAPo2 の活性化には依存せずに、クロマチンの脱凝集が起こることが分かった。次に、dCas9 で可視化された 2つの foci 間の距離変動から算出される平均二乗変位として MSCD (Mean Square change in distance) を計測したところ、Sat3 領域の運動性は、熱ショック誘導後、一過的に亢進し、その後減弱することが分かった。それぞれ、ヒストンアセチル化修飾と RNAPo2 活性化のタイミングに対応していたことから、阻害剤存在下で計測を行った。その結果、THZ1 存在下では、クロマチンの運動性は亢進したままであったことから、RNAPo2 の活性化、特に転写開始型への移行がクロマチンの運動性を制限していることが示唆された。

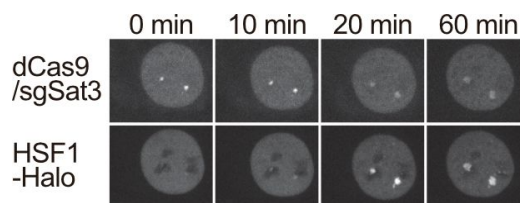


図2. CRISPR/dCas9によるSat3領域の可視化. 熱ショック誘導後に、HSF1が集積する。

### (3) エピゲノム編集を用いたヒストン修飾の機能解析

ヒストンのアセチル化修飾を特定ゲノム領域に導入するために、dCas9 に p300 酵素活性ドメインを融合した。Sat3 に対する sgRNA とともに発現させると、熱ショック前から Sat3 領域に H3K27ac が高度に集積していた (図 3)。RT-qPCR により RNA の発現量を調べたところ、熱ショック前から Sat3 の転写が亢進していた。また MSCD も亢進していたことから、アセチル化の導入によるクロマチン運動性の亢進が RNAPo2 活性化に寄与している可能性が考えられた。そこで、クロマチンの運動性を制限す

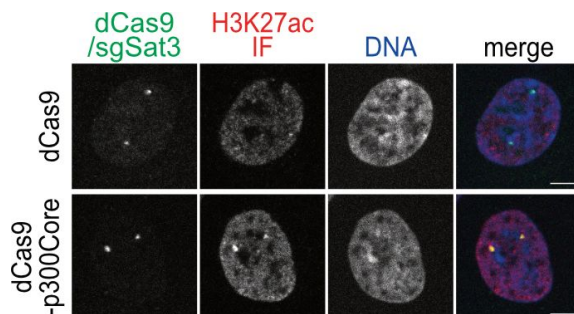


図3. dCas9-p300Coreにより、熱ショック前からSat3領域にH3K27acが導入される。

るために、核内局在も変化してしまうが、CRISPR-GO システムを導入し、dCas9 に ABI ドメイン、核膜内膜に存在する Emerin に PYL1 ドメインを融合し、アブジジン酸添加によるヘテロ二量体形成を介して、Sat3 領域を核膜近傍に繫留した。Sat3 領域が核膜近傍に繫留された細胞では、熱ショック後のクロマチン運動性の亢進は見られず、HSF1 や H3K27ac の集積は起こるが、リン酸化型 RNAPo2 が減弱していた。このことから、クロマチンの運動性亢進が RNAPo2 活性化に重要であると考えられる。また、dCas9 に KDM4D を融合させると、Sat3 領域での H3K9me3 が減少、MSCD の亢進が見られ、熱ショック後の Sat3 転写量が増加していた。このことから、H3K9me3 による転写抑制の機能には、クロマチン運動性の制限が関わっていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Uchino Satoshi, Ito Yuma, Sato Yuko, Handa Tetsuya, Ohkawa Yasuyuki, Tokunaga Makio, Kimura Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Visualizing transcription sites in living cells using a genetically encoded probe specific for the elongating form of RNA polymerase II	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.04.27.441582	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Forero-Quintero Linda S., Raymond William, Handa Tetsuya, Saxton Matthew N., Morisaki Tatsuya, Kimura Hiroshi, Bertrand Edouard, Munsky Brian, Stasevich Timothy J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Live-cell imaging reveals the spatiotemporal organization of endogenous RNA polymerase II phosphorylation at a single gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23417-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Chavez Alfredo Esquivel, Maki Takahisa, Tsubouchi Hideo, Handa Testuya, Kimura Hiroshi, Haber James E., Thon Genevieve, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Euchromatin factors HULC and Set1C affect heterochromatin organization for mating-type switching in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.03.23.436714	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tjalsma Sjoerd J D, Hori Mayako, Sato Yuko, Bousard Aurelie, Ohi Akito, Raposo Ana Cláudia, Roensch Julia, Le Saux Agnes, Nogami Jumpei, Maehara Kazumitsu, Kujirai Tomoya, Handa Tetsuya, Bagó's Arnal Sandra, Ohkawa Yasuyuki, Kurumizaka Hitoshi, da Rocha Simão Teixeira, ?ylicz Jan J, Kimura Hiroshi, Heard Edith	4. 巻 22
2. 論文標題 H4K20me1 and H3K27me3 are concurrently loaded onto the inactive X chromosome but dispensable for inducing gene silencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Maehara Kazumitsu, Tomimatsu Kosuke, Harada Akihito, Tanaka Kaori, Sato Shoko, Okada Seiji, Handa Tetsuya, Kurumizaka Hitoshi, Kimura Hiroshi, Ohkawa Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Modeling population size independent tissue epigenomes by ChIL-seq with single-thin sections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.12.18.423434	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Handa Tetsuya, Harada Akihito, Maehara Kazumitsu, Sato Shoko, Nakao Masaru, Goto Naoki, Kurumizaka Hitoshi, Ohkawa Yasuyuki, Kimura Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 3334 ~ 3360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-020-0375-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagata Kazuo, Nagai Kouhei, ..., Handa Tetsuya (17番目), Kimura Hiroshi, Hosoi Yoshihiko, Mitani Tasuku, Matsumoto Kazuya, Iritani Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Signs of biological activities of 28,000-year-old mammoth nuclei in mouse oocytes visualized by live-cell imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40546-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Tetsuya Handa, Yasuhiro Arimura, Jumpei Nogami, Yoko Hayashi-Takanaka, Katsuhiko Shirahige, Hitoshi Kurumizaka, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa	4. 巻 21
2. 論文標題 A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 287-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-018-0248-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuya Handa, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura	4. 巻 -
2. 論文標題 Detailed protocol Chromatin Integration labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protocol Exchange	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/protex.2018.122	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taiga Yamazaki, Yu Hatano, Tetsuya Handa, Sakiko Kato, Kensuke Hoida, Rui Yamamura, Takashi Fukuyama, Takayuki Uematsu, Noritada Kobayashi, Hiroshi Kimura, Kazuo Yamagata	4. 巻 12
2. 論文標題 Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PolS One	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0177764. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 半田哲也、原田哲仁、前原一満、大川恭行、木村宏
2. 発表標題 Multi-ChIL法による少数細胞の複数エピゲノムの同時解析
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 半田哲也、木村宏
2. 発表標題 特定ゲノム領域の生細胞イメージングとエピゲノム操作による遺伝子発現制御
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Handa, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Yasuhiro Arimura, Jumpei Nogami, Yoko Hayashi-Takanaka, Katsuhiko Shirahige, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Chromatin integration labeling technology enables low-input epigenomic profiling
3. 学会等名 2018 Cold Spring Harbor meeting: Nuclear Organization & Function (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 半田哲也
2. 発表標題 特定ゲノム領域の生細胞イメージングとエピゲノム操作による遺伝子発現制御
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第3回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Handa, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Yasuhiro Arimura, Jumpei Nogami, Yoko Hayashi-Takanaka, Katsuhiko Shirahige, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 A chromatin integration labeling method enables epigenomic profiling with lower input
3. 学会等名 3R&3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Handa, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Dynamics of Histone Modifications and RNA Polymerase II in Heat Shock Response
3. 学会等名 EMBO Conference: Chromatin and Epigenetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 半田哲也、木村宏
2. 発表標題 熱ショック応答におけるヒストン修飾とRNA Polymerase 2 の動態解析
3. 学会等名 第11回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 半田哲也、木村宏
2. 発表標題 熱ショック応答におけるヒストン修飾とRNA Polymerase 2 の動態解析
3. 学会等名 第2回クロマチン動構造ワークショップ
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 半田哲也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 270
3. 書名 実験医学別冊 - エピゲノムをもっと見るための クロマチン解析実践プロトコール (分担執筆)	

1. 著者名 半田哲也、木村宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)メディカルドゥ	5. 総ページ数 168
3. 書名 遺伝子医学 通巻31号(復刊6号) 特集/エピゲノム医療 (分担執筆)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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, 胡桃坂仁志, 木村宏, 半田哲也, 他3名	権利者 国立大学法人九州大学、国立大学法人東京工業
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/019309	出願年 2017年	国内・外国の別 外国



〔取得〕 計0件

〔その他〕

世界初、単一細胞での遺伝子発現制御解析に成功  
<https://www.titech.ac.jp/news/2018/042981.html>

同一の細胞から複数のエピゲノム情報を同時に検出する技術開発に成功  
<https://www.titech.ac.jp/news/2020/047602.html>  
A detailed step-by-step protocol of ChIL-seq... <https://protocolsmethods.springernature.com/posts/chromatin-integration-labeling-for-mapping-dna-binding-proteins-and-modifications-with-low-input>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Colorado State University			
デンマーク	University of Copenhagen			
フランス	Institut Curie			
ドイツ	EMBL Heidelberg			