

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06748

研究課題名(和文)細胞種特異的ヒストン修飾解析系を用いた脱分化をもたらすエピジェネテックスの解明

研究課題名(英文) Cell type-specific histone modification analysis system to elucidate epigenetics leading to dedifferentiation.

研究代表者

坂本 卓也 (Sakamoto, Takuya)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・講師

研究者番号：40637691

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)：シロイヌナズナにおいて、転写活性化の指標となるエピジェネティックマークのH3K4me3とRNAポリメラーゼII Ser2のリン酸化に対する機能的なmintbodyの開発に成功した。mintbodyは修飾特異的細胞内抗体と蛍光プローブを用いた修飾の変化を検出するバイオセンサーである。いずれのmintbodyもイメージングにより細胞単位での修飾レベルの定量が可能であり、植物の発生などの過程での各修飾のモニタリングに有用であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、動物細胞や植物の培養細胞において、mintbodyが機能することが報告されてきたが、植物体での報告はなかった。本研究成果により植物体でmintbodyが機能することを初めて示すことができた。また、RNAポリメラーゼII Ser2のリン酸化に対するmintbodyは、動植物を通じて初めてゲノムワイドな修飾の解析にも利用できることを示すことができた。今後、mintbodyを特定の細胞種のみで発現させることにより、従来のセルソーティングなどの手法よりも簡便に特定の細胞種毎の詳細なエピジェネティック解析への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In Arabidopsis, we have successfully developed functional mintbody for the epigenetic mark H3K4me3 and phosphorylation of RNA polymerase II Ser2 (RNAPII Ser2P), which are indicators of transcriptional activation. Mintbody is a biosensor that detects modification changes using modification-specific intracellular antibodies and fluorescent probes. Both mintbody can quantify the modification level at the cellular level by imaging, and we were able to show that they are useful for monitoring each modification during plant development and other processes. In the future, it is expected that mintbody will be used for detailed epigenetic analysis of each specific cell type.

研究分野：植物分子細胞生物学、植物分子生理学

キーワード：ヒストン修飾 mintbody

1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾や DNA のメチル化といったエピジェネティック制御は、遺伝子発現を直接的に制御する。研究開始当初の時点で、ヒストン修飾をターゲットとしたクロマチン免疫沈降 - シーケンス (ChIP-seq) や DNA メチル化をターゲットとした bisulfite-seq 法により、植物の発生過程や環境刺激応答におけるゲノムワイドでのエピジェネティック制御について知見が蓄積されてきていた。しかし、殆どの解析は、個体、器官レベルであり、細胞種レベルの解析は僅かであった。例えば、根の側根の発生やカルス化に伴う脱分化は根の内鞘細胞から始まること知られるように (Sugimoto et al., 2011, *Trends in Cell Biology*)、ある時間軸におけるエピジェネティック制御の変化は細胞種毎に異なることは自明であることから、特定の細胞種だけに焦点を当てた解析により、これまでのマクロな解析では検出できなかった変化や特徴の検出が期待される。実際に、根端分裂組織での細胞種毎の DNA メチル化解析によって、他細胞種と比べてコルメラ根冠細胞は特徴的な DNA メチル化パターンを有していることが検出されている (Kawakatsu et al., 2016, *Nature Plants*)。同様に、側根の発生やカルス化に伴う脱分化においては、他細胞を排除し内鞘細胞のみの解析が可能となることで、未だ明らかとなっていない脱分化をもたらす初期のエピジェネティクス制御を明らかにできると考えられた。

特定の細胞種を集める既存の手法としては、研究開始当初の時点では、細胞種特異的な蛍光プローブを用いたセルソーティングが主であった。しかし、この手法では、非常に高価な装置と高い技術を要する上、セルソーティングの前段階で細胞をプロトプラスト化させる必要があるが、細胞が生きた状態で行うため、プロトプラスト化の過程におけるエピジェネティック制御への影響を排除できない。また、INTACT (isolation of nuclei tagged in specific cell types) と呼ばれる手法では、特定の細胞種の核膜をビオチン化し、ビオチン-ストレプトアビジン結合反応を利用することで、細胞種特異的な核の単離が可能となる (Deal and Henikoff, 2011, *Nature Protocols*)。しかし、この報告から研究開始当初の時点での 7 年の間で、当該手法を利用した植物の研究報告は極僅かであり、その技術的困難さが窺えた。そこで、新たな細胞種特異的なエピジェネティック解析手法を開発することが、様々な生命現象における細胞種毎のエピジェネティック制御の理解に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、エピジェネティック制御の中でもヒストン修飾に着目し、まず、特定のヒストン修飾を認識する抗体をもとに作成した蛍光プローブである mintbody を細胞種特異的プロモーター下で発現制御させ、目的のヒストン修飾の変化をライブでイメージングできる手法を確立する。また、この手法を利用して、細胞種毎のゲノムワイドな特定のヒストン修飾状態の解析手法を確立する。そして、以上の 2 つの手法を用いて、発生過程における特定の細胞種でのヒストン修飾変化を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始当初までに、ヒストン修飾変化の検出を可能とする生細胞ライブイメージング手法として、マウス由来の修飾特異的細胞内抗体と蛍光プローブを用いたヒストン修飾バイオセンサー mintbody (Modification specific intracellular antibody) が開発されていた (Sato et al., 2013, *Scientific Reports*)。Mintbody は通常細胞質と核内で発現し、ヒストン修飾レベルの上昇に応じた核内への mintbody の集積によりヒストン修飾レベルの変化を生きた細胞で観察することができる (図 1)。

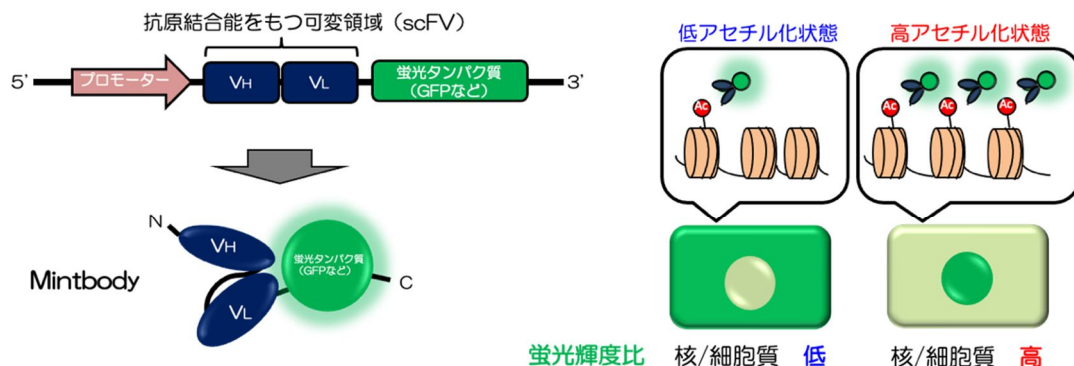


図 1. Mintbody を利用した特定のヒストン修飾のライブイメージング～ヒストンのアセチル化を認識する mintbody の例～

これまでに研究代表者らは、タバコ BY2 培養細胞を用いた解析により、免疫システムを持たない植物細胞においても mintbody が特定の修飾ヒストンに対する抗体として作用することを明らかにしている (Kurita, Sakamoto et al., 2017, *Scientific Reports*)。この成果から、mintbody をライブイメージングだけでなく、内在性のヒストン修飾抗体として利用して ChIP-seq 法を行

うことにより、特定のヒストン修飾の変化を検出できると考えられた(図2)。さらに、細胞種特異的プロモーターにより mintbody を発現する細胞を限定することで、細胞種特異的なヒストン修飾解析が可能となると考えられた。

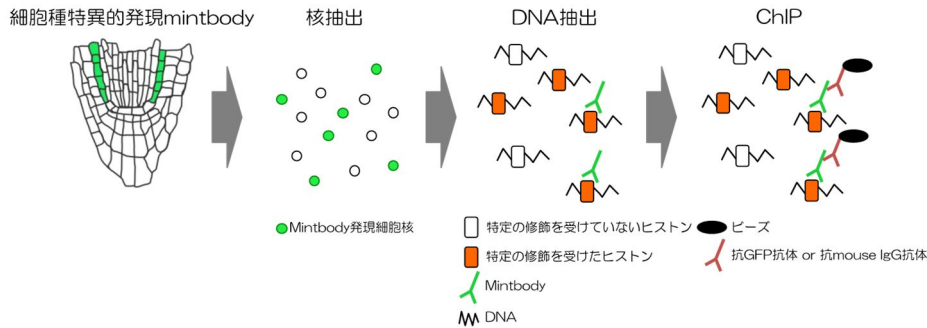


図2. Mintbodyを利用した細胞種特異的な特定のヒストン修飾解析～根の内皮細胞を対象とした場合～

そこで、まず、ヒストン修飾のうち、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのアセチル化 (H3K9ac)、ヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3)、そしてヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) に対する mintbody の作成を行った。H3K9ac 及び H3K4me3 は転写の活性化、H3K27me3 は転写の抑制化のエピジェネティックマークとして知られている。これらの修飾に対するマウスモノクローナル抗体由来の抗原結合能を持つ可変領域 (scFV) の DNA 配列と GFP の DNA 配列を融合した mintbody を作成し、mintbody をユビキタスなプロモーター (CaMV 35S プロモーター) 制御下で発現させたシロイヌナズナ植物体を作成した。導入にあたっては、より正確かつ簡便に細胞内の mintbody の蛍光輝度変化を検出するために、同一プロモーター制御下で同時に mintbody と内部標準としての核特異的に発現する異なる蛍光タンパク質を発現させるようにした。これにより、核マーカーの蛍光輝度の変化で mintbody の蛍光輝度変化を補正することにより、核の蛍光観察のみでヒストン修飾レベルの変化を捉えることが可能となる。同一プロモーターによる同時発現制御には、2A ペプチドを用いたバイシストロニック発現システムを用いた。

次に、作成した形質転換植物体を用いて、それぞれの mintbody の標的ヒストン修飾の認識機能の検証を行った。ここでは、ライブイメージングによる各ヒストン修飾の阻害剤への応答の検証、免疫染色や免疫沈降など生化学的解析による標的ヒストン修飾への mintbody の結合能の検証、そして、抗 GFP 抗体或いは抗 mouse-IgG 抗体を用いた ChIP-seq 法と、既存の各修飾に対する抗体を用いた ChIP-seq との比較から、mintbody によるゲノムワイドな標的ヒストン修飾分布の検出機能の検証を行うこととした。

4. 研究成果

作成した形質転換植物体を用いて、H3K9ac、H3K4me3 および H3K27me3 の 3 種のヒストン修飾に対する各 mintbody の認識機能を検証した結果、H3K4me3-mintbody のみ、阻害剤への期待される応答を示した。また、H3K4me3-mintbody を発現する植物からのタンパク質抽出液を用いたファウエスタン解析により H3K4me3-mintbody の H3K4me3 への結合能が示された。しかしながら、H3K9ac-および H3K27me3-mintbody に関しては、阻害剤への期待される応答および標的ヒストン修飾への結合能は見出されなかった。この理由としては、これらの mintbody が植物体内で正しくフォールディングせず抗体として機能していない可能性が考えられた。この問題の解決には、scFV と GFP との間のリンカー配列を検討するか、新たに異なるマウスモノクローナル抗体由来の scFV の DNA 配列を獲得して検証する必要があると考えられた。

次に、標的ヒストン修飾の認識機能が見出された H3K4me3-mintbody について、GFP 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行なった。しかしながら、これには成功せず、H3K4me3-mintbody の標的ヒストン修飾への結合強度が低い可能性があると考えられた。これらのことから、現時点では、当初予定していた細胞種特異的なヒストン修飾の ChIP-seq に使用できる可能性のある mintbody の確立には至っていない。

一方で、H3K4me3-mintbody は生化学的解析による H3K4me3 の認識能、そして阻害剤への応答能が見られたことから、ライブイメージングには使用できると判断した。そこで、H3K4me3-mintbody を用いて、根の組織や、根を脱分化させて作成した細胞塊のカルスから再分化させた際の H3K4me3 レベルの変化を観察した。同一プロモーターで発現させた核タンパク質の蛍光輝度を用いて、それぞれの細胞の H3K4me3 レベルを相対的に定量したところ、根の組織の中でも表皮、皮相、内皮細胞と比べて内鞘細胞で H3K4me3 レベルが高いこと、再分化によって新たに発生した茎頂分裂組織で H3K4me3 レベルが高いことを見出した。このことから、H3K4me3-mintbody が、植物の発生などにおいて細胞単位での H3K4me3 レベルのモニタリングに有用なツールであることが示された。この成果に関しては、現在論文投稿準備中である。

また、当初の予定にはなかったが、転写活性化の直接的な指標となる RNA ポリメラーゼ II Ser2 のリン酸化 (PolII Ser2P) を認識する mintbody の作製も試みた。PolII Ser2P-mintbody は、RNA ポリメラーゼ II Ser2 のリン酸化阻害剤への応答および PolII Ser2P への生化学的な結合能を示した。植物組織における PolII Ser2P-mintbody のライブイメージングから、H3K4me3-mintbody と

同様に、細胞単位での PolII Ser2 レベルのモニタリングに有用なツールであることが示された。また、PolII Ser2P-mintbody 発現植物の GFP 抗体を用いた ChIP-seq と、既存の PolII Ser2P に対する抗体を用いた ChIP-seq との間に、高い共通性が見られたことから、PolII Ser2P-mintbody が ChIP-seq にも有用なツールであることが示された。この成果に関しては、論文発表に至った。

以上のように、当初予定していたヒストン修飾の中で、H3K9ac および H3K27me3 を標的とする機能的な mintbody の開発には至らなかったものの、H3K4me3 や PolII Ser2P-mintbody の結果から、植物体での初めての機能的 mintbody 開発の成功、そして、動物も含めて初めての mintbody を用いた ChIP-seq の成功という成果を挙げることができた。特に、PolII Ser2P-mintbody の成果からは、今後 H3K9ac や H3K27me3-mintbody の再構築、H3K4me3 の改良を行うことで、それらを ChIP-seq のツールにできる可能性が示された。将来的に、mintbody を利用した細胞種特異的なヒストン修飾解析の実行可能性を期待させる成果であると言える。

<引用文献>

Deal and Henikoff, The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in *Arabidopsis thaliana*, Nature Protocols, 2011. 6:56-68.

Kawakatsu et al., Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem, Nature Plants, 2016. 2:16058.

Kurita et al., Live imaging of H3K9 acetylation in plant cells, Sci. Rep., 2017. 7:45894.

Sato et al., Genetically encoded system to track histone modification *in vivo*, Sci. Rep., 2013. 3:2436.

Sugimoto et al., Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? , Trends Cell Biol., 2011. 4:212-218.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Oko, N Ito, and T. Sakamoto	4. 巻 133
2. 論文標題 The mechanisms and significance of the positional control of centromeres and telomeres in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 471-478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2019.12.12.873885	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 S. Nishioka, T. Sakamoto, and S. Matsunaga	4. 巻 85
2. 論文標題 Roles of BRAHMA and its interacting partners in plant chromatin remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 263-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.85.263	査読の有無 無
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 Y. Fujiwara, S. Matsunaga, and T. Sakamoto	4. 巻 86
2. 論文標題 Next generation sequence-based technologies for analyzing DNA strand breaks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 3-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.86.3	査読の有無 無
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 M. Shibuta, T. Sakamoto, T. Yamaoka, M. Yoshikawa, S. Kasamatsu, N. Yagi, S. Fujimoto, T. Suzuki, S. Uchino, Y. Sato. H. Kimura, and S. Matsunaga	4. 巻 4
2. 論文標題 A live imaging system to analyze spatiotemporal dynamics of RNA polymerase II modification in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02106-0	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松永幸大、澁田未央、松岡慈、三浦理奈、坂本卓也
2. 発表標題 エピジェネティックプライミングによる再生制御
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁田未央、吉川真由、山岡珠子、坂本卓也、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 RNAポリメラーゼIIセリン2リン酸化のライブイメージングシステムの構築
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁田未央、吉川真由、山岡珠子、坂本卓也、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 ヒストン修飾やRNAポリメラーゼII修飾のライブイメージングシステムの構築
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澁田未央、栗田和貴、松岡慈、坂本卓也、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナにおける翻訳後修飾ライブイメージングシステムの確立
3. 学会等名 遺伝学会第91回福井大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mio Shibuta, Megumi Matsuoka, Mayu Yoshikawa, Kazuki Kurita, Yamako Yamaoka, Takuya Sakamoto, Hiroshi Kimura, Sachihito Matsunaga
2. 発表標題 Live imaging system to track post-translational modification dynamics in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 Frontiers in plant environmental response research: local signaling "long-distance communication and memory for developmental plasticity" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mio Shibuta, Megumi Matsuoka, Mayu Yoshikawa, Kazuki Kurita, Yamako Yamaoka, Takuya Sakamoto, Hiroshi Kimura, Sachihito Matsunaga
2. 発表標題 Live imaging system to tracking post-translational modification dynamics in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 SEB conference on "Impact of chromatin domains on plant phenotypes" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澁田未央、松岡慈、吉川真由、栗田和貴、山岡珠子、坂本卓也、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 RNAポリメラーゼIIセリン2リン酸化修飾のライブイメージングシステムの開発
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁田未央、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 RNAポリメラーゼII-CTD修飾の核内分布の観察
3. 学会等名 日本植物形態学会第33回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濫田未央、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 RNAポリメラーゼII-CTD修飾の核内分布から転写活性の高い核内領域を読み解く
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濫田未央、松岡慈、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 ヒストン修飾およびPoIII-CTD修飾のイメージングと画像解析から時空間的転写ステータスを読み解く
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
スイス	University of Zurich		