

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21406

研究課題名（和文）人工細胞膜に封入した後成修飾クロマチン繊維の細胞内導入と遺伝子発現の定量的理解

研究課題名（英文）Intracellular delivery and gene expression analysis of modified chromatin fibers encapsulated in artificial membranes

研究代表者

梅原 崇史（Umehara, Takashi）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：20415095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒストンを修飾したヌクレオソームを試験管内で再構成して人工細胞膜を用いたリポソームに封入することによりクロマチンを細胞内に導入するための技術開発と、再構成した試料をDNA仲介反応系で評価することを研究目的とした。その結果、長鎖ヌクレオソームをリポソームに封入するための再構成条件を見いだした。また、ヒストンH2BのN末端テイルをアセチル化すると再構成ヌクレオソームが局所的に不安定化することを明らかにした。さらに、細胞サイズのリポソームに遺伝子転写カセットを封入することでリポソーム内での転写・翻訳反応を再現性よく観察する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、細胞サイズの人工リポソームにおいて遺伝子の転写反応とタンパク質の翻訳反応を分割してその産物量を継時的に測定する試験管内反応系が確立できた。これにより、従来技術の無細胞転写・翻訳系では解析することが困難だったセントラルドグマの反応素過程ごとの制御分子機構を数学的に記述するための方法論の確立に道筋がついた点に学術的な意義がある。また、長鎖のヌクレオソームを人工膜リポソームに封入する技術が確立できた点も細胞へのエピゲノム断片の導入技術開発に向けて学術的な意義があったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop techniques to reconstitute nucleosomes with designed histone modifications in vitro, encapsulate them into artificial cell membrane-based liposomes to introduce chromatin into cells, and evaluated them in DNA-mediated reactions in vitro. As a result, we found the reconstitution conditions to encapsulate long nucleosomes into a liposome. We also found that acetylation of the N-terminal tail of histone H2B locally destabilizes the reconstituted nucleosome. Furthermore, by encapsulating gene transcription cassettes in cell-sized liposomes, we established an experimental system to observe transcription and translation reactions in liposomes with good reproducibility.

研究分野：生化学

キーワード：アセチル化 エピゲノム クロマチン ヌクレオソーム リポソーム 細胞膜

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピゲノムを細胞内に導入する技術としては哺乳動物の人工染色体技術が知られており、ゲノムの改変に大きな役割を果たしている。しかしこれらの人工染色体はDT40細胞などの相同組み換えを介して目的遺伝子を導入するため、調製する染色体のエピジェネティクス情報を外部から自由に操作することができず、リジンアセチル化修飾などのエピジェネティクス修飾情報がゲノム制御に果たす生理的役割を定量的に理解することは困難である。また、遺伝子を細胞内に導入して細胞の形質を転換する従来技術としてプラスミドやウイルスベクターを用いる方法が知られているが、導入できる遺伝子長がおおむね100 kb以下に限定される。通常の形質転換技術よりも長鎖の人工DNA断片を細胞に導入するためには、長鎖DNAをヌクレオソーム化することを介してDNA分子を凝縮させる技術と、その長鎖ヌクレオソームを人工細胞膜に封入することを介して細胞内に導入するための技術の開発が必要と考えられる状況にあった。研究代表者は研究開始時点においてエピジェネティクス修飾を含むヌクレオソームを試験管内再構成する技術開発に関してリジンアセチル化(文献1)、リジンモノメチル化(文献2)、DNAのCpGメチル化(文献3)を含む修飾ヌクレオソームをミリグラム規模で調製する技術を確立していた。そのため、エピジェネティクス修飾情報を含む長鎖ヌクレオソームを人工細胞膜に封入できれば個々のエピジェネティクス修飾が果たす役割を定量的に理解でき、エピジェネティクス修飾を導入したヌクレオソームの再構成を通してエピゲノムを改変する技術開発につながることを考えられた。また、古典的な人工細胞膜作製法によるDNA封入は自己組織的な手法であるため、長鎖DNAの封入や封入濃度の制御が困難な問題点があった。さらに従来技術では溶液量が多く必要なことから、修飾ヌクレオソームに代表される希少サンプルの人工細胞膜への封入が難しい。研究分担者は、研究開始時点においてガラスキャピラリー中に約10 µLの試料を入れ、ジェット水流によりシャボン玉のように人工細胞膜内にサンプルを封入する人工細胞膜作製(ジェット法)を開発していた(文献4)。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえて、本研究では種々のDNAやヒストンのリジン残基をアセチル化したヌクレオソームを研究材料としてそれらを人工細胞膜内に封入し、DNAからのRNAの転写反応やタンパク質の翻訳反応に与える影響を解析することを研究目的とした。また、エピジェネティクス修飾情報を含む長鎖ヌクレオソームを人工細胞膜に封入することで長鎖ヌクレオソームを細胞に導入する技術を開発することを目指した。さらにこれらの技術的な試行を通して、先行技術では実現が難しかった長鎖ヌクレオソーム凝縮体の再構成とその細胞内導入技術の確立のどこにボトルネックがあるのかを検討することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1):長鎖ヌクレオソームの試験管内再構成とその評価

人工細胞膜封入の試験管内再構成を進めるためのモデルDNAとして、遺伝子の転写・翻訳カセットを含むDNA、ヌクレオソームを形成しやすいことが知られているWidom 601 DNA配列の12回直列反復配列から成るDNA、および93 kbと177 kbの環状プラスミドDNAを用いた。精製したDNAについて、非ヌクレオソーム化の状態、環状、または直鎖の状態においてヌクレオソームの試験管内再構成を検討した。ヌクレオソームに導入する後成修飾は、真核生物の遺伝子の転写活性化で中心的な役割を果たすことが知られているヒストンのアセチル化のうち、ヒストンH4のN末端テイルの4箇所のリジン残基(K5/K8/K12/K16)のアセチル化、または2箇所のリジン残基(K12/K16)のアセチル化をモデル系とした。また、再構成系においてアセチル化を受けたヌクレオソームからの各ヒストンサブユニットの脱離の度合いを包括的に評価するため、ヒストンH3のN末端テイルの2箇所のリジン残基(K14/K18)のアセチル化、またはヒストンH2BのN末端テイルの4箇所のリジン残基(K12/K15/K20/K23)のアセチル化を導入したヌクレオソームもそれぞれ個別に再構成し、無修飾のヌクレオソームと比較するための評価系に加えた。

(2):DNAと長鎖ヌクレオソームの人工細胞膜封入とその評価

研究項目(1)で調製したDNAまたは無修飾または後成修飾入りの長鎖ヌクレオソームの試料を人工細胞膜に封入するための技術を検討した。研究分担者が開発済みのマイクロデバイスによる人工細胞膜の作製法の応用により、長鎖ヌクレオソームの1分子の効率的な封入について、人工細胞膜形成時の水流速度や脂質組成を変えることで効率的な封入条件を検討した。また、研究代表者が作製した無細胞転写/翻訳システムにおける転写/翻訳反応を継時的にモニターできる系を細胞サイズリポソームに封入し、リポソーム内で転写・翻訳反応を観察した。特にリポソームの電荷の違いがリポソーム内へ封入されるプラスミドDNA量、リポソーム内における転写反応量や翻訳反応量のどこに影響を及ぼすかを検討した。

4. 研究成果

(1):長鎖ヌクレオソームの試験管内再構成とその評価 (リポソームへの封入実験)

93 kbp および 177 kbp の環状プラスミド DNA を用いてヌクレオソームの再構成を試みた。ヌクレオソームの再構成を検討するために各 5 μg 以上の DNA を調製した (図 1 左)。このうち、177 kbp の DNA を用いて H2A, H2B, H3, H4 の各 2 分子から成るヒストン八量体と混合し、ヌクレオソームの試験管内再構成を行った。再構成の方法は、塩濃度が高い緩衝液 (2 M NaCl 溶液) に透析をしながら塩濃度が低い緩衝液 (0 M NaCl 溶液) を徐々に添加することで全体の塩濃度を下げていき、最終的に塩が入っていない緩衝液で透析した (図 1 中央)。ヌクレオソームの再構成はリンカーヒストンの 1 種である H1.4 の添加の有無でそれぞれ検討した。研究代表者が調製したヌクレオソームを研究分担者がマイクロデバイスによるリポソーム形成法を用いてリポソームへの長鎖ヌクレオソームの封入検討実験を行なった。その結果、ヌクレオソームと考えられる粒子を封入していることが確認できた (図 1 右)。

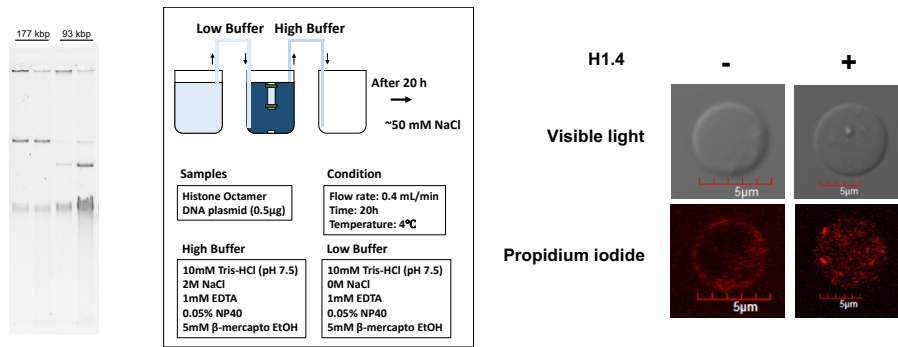


図 1 長鎖ヌクレオソームの試験管内再構成と人工細胞膜内への封入検討

左: 再構成に用いた長鎖 DNA の電気泳動像
中央: 透析法による長鎖ヌクレオソームの試験管内再構成
右: 人工細胞膜内への長鎖ヌクレオソームの封入実験

(2):長鎖ヌクレオソームの試験管内再構成とその評価 (修飾導入後の安定性評価)

本研究の実施過程において、個々のヌクレオソームコア粒子にヒストンの化学修飾を導入した長鎖ヌクレオソームを再構成・利用する段階でヌクレオソーム化の効率やその安定性に影響が出る可能性が浮上した。そこで、ヌクレオソーム化されないリンカー-DNA を両端に含む 180 bp のモノヌクレオソームについて、ヒストンの H2B, H3, H4 のそれぞれの N 末端テイルにリジンアセチル化を導入したヌクレオソームと無修飾のヌクレオソームを個別に再構成してそれらの熱安定性を評価した。その結果、ヒストン H3 テイルやヒストン H4 テイルにリジンのアセチル化を導入したヌクレオソームでは、無修飾のヌクレオソームと比べて、ヌクレオソームが 2 段階で解離する温度ピークがどちらもほとんど影響を受けないことが判明した。それに対して、ヒストン H2B テイルにリジンのアセチル化を導入したヌクレオソームでは、ヌクレオソームからの H2A-H2B 二量体が解離する温度ピークのみが約 2°C 低下することがわかった (図 2)。これらの結果から、再構成したモノヌクレオソームは H3 テイルまたは H4 テイルのリジンアセチル化の導入に対してその物理化学的な安定性を維持するが、H2B テイルのアセチル化はヌクレオソーム内に局所的な熱不安定性を引き起こし、これが細胞内において特定の遺伝子の転写を活性化する駆動力となっている可能性が示唆された。

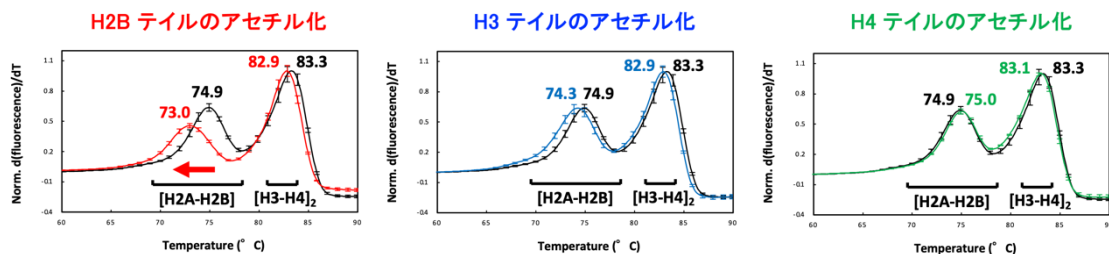


図 2 ヌクレオソームのヒストンテイルのアセチル化が熱安定性に及ぼす影響

左: ヒストン H2B テイルにリジンアセチル化を導入したヌクレオソーム
中央: ヒストン H3 テイルにリジンアセチル化を導入したヌクレオソーム
右: ヒストン H4 テイルにリジンアセチル化を導入したヌクレオソーム
各グラフにおいて黒色のデータは無修飾のヌクレオソームのデータを示し、色つきのデータは各ヒストンテイルがリジンアセチル化を受けたヌクレオソームのデータを示す。ヌクレオソームから H2A-H2B 二量体が解離する温度ピークと H3-H4 四量体が解離する温度ピークのうち、H2B テイルをアセチル化したヌクレオソームにおいて H2A-H2B 二量体の解離が選択的に促進されることを示している。

(3): DNAと長鎖ヌクレオソームの人工細胞膜封入とその評価

リポソーム内に蛍光で遺伝子転写/タンパク質翻訳反応をモニターできる無細胞転写/翻訳システムを細胞サイズリポソーム内に封入し、顕微鏡にて両者の反応を継時的に同時観察した。その結果、リポソームの電荷の違いや封入したプラスミドDNAに関わらず、リポソーム形成後30分で遺伝子転写による蛍光シグナルが最大になった。タンパク質翻訳による蛍光シグナルは、リポソーム形成後から約60分経過した時点から観察され始めた。また、リポソームの電荷によって転写反応量が異なることを明らかにした。この転写反応量の違いが、そのまま翻訳反応量の違いに影響することがわかった。

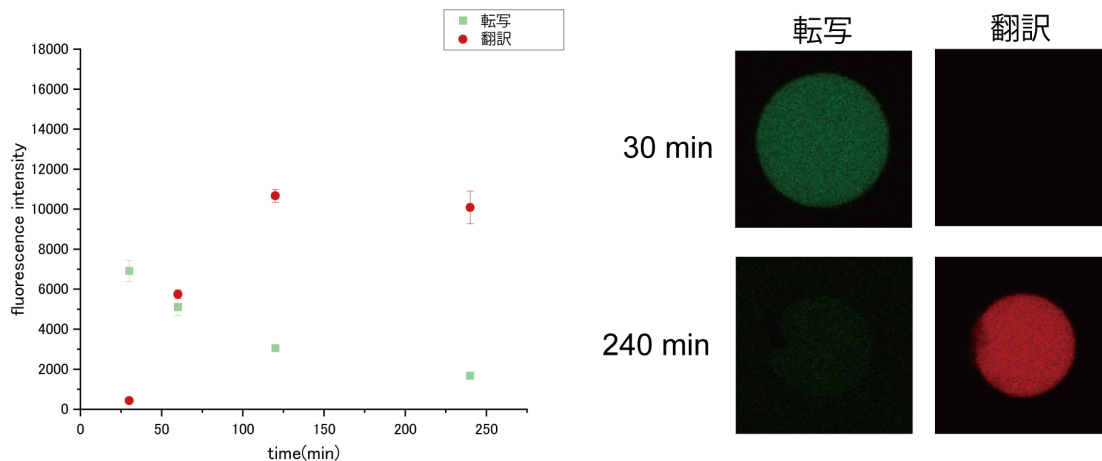


図3 リポソーム内における遺伝子転写/タンパク質翻訳反応の継時的観察

左: 転写/翻訳反応の継時グラフ

右: リポソームの顕微鏡像

<引用文献>

- 1) Wakamori M, Fujii Y, Suka N, Shirouzu M, Sakamoto K, Umehara T, Yokoyama S. Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. *Sci. Rep.* 5, 17204 (2015).
- 2) Yanagisawa T, Takahashi M, Mukai T, Sato S, Wakamori M, Shirouzu M, Sakamoto K, Umehara T, Yokoyama S. Multiple site-specific installations of $N\epsilon$ -monomethyl-L-lysine into histone proteins by cell-based and cell-free protein synthesis. *Chembiochem* 15(12), 1830 (2014).
- 3) Fujii Y, Wakamori M, Umehara T, Yokoyama S. Crystal structure of human nucleosome core particle containing enzymatically introduced CpG methylation. *FEBS Open Bio.* 6(6), 498 (2016).
- 4) Kamiya K, Kawano R, Osaki T, Akiyoshi K, Takeuchi S. Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nat. Chem.* 8(9), 881 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Wakamori Masatoshi, Okabe Kohki, Ura Kiyoe, Funatsu Takashi, Takinoue Masahiro, Umehara Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Quantification of the effect of site-specific histone acetylation on chromatin transcription rate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 12648 ~ 12659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa1050	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6件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三輪明星, 神谷厚輝
2. 発表標題 膜透過性ペプチドと非対称膜リボソームの相互作用の観察
3. 学会等名 細胞を創る研究会 14.0
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪明星, 神谷厚輝
2. 発表標題 膜透過性ペプチドとリボソームの相互作用における膜組成の影響
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Umehara, T.
2. 発表標題 Quantifying the effect of epigenetic modification on chromatin transcription
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅原崇史
2. 発表標題 組合せ化学修飾情報のゲノム規模マッピング
3. 学会等名 第141回 日本薬学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷厚輝
2. 発表標題 生体分子の再構成による人工細胞膜の機能化
3. 学会等名 立命館大学「生体膜・脂質研究の最前線」シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Umehara, T.
2. 発表標題 Binding preferences of YEATS domains to acetylated nucleosomes
3. 学会等名 FASEB The Reversible Protein Acetylation in Health and Disease Conference (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究 分担者	神谷 厚輝 (Kamiya Koki) (70612315)	群馬大学・大学院理工学府・助教 (12301)	

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
---------	---------