

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25503002

研究課題名(和文)細胞密度依存的な遺伝子発現とヒストン修飾

研究課題名(英文)Cell culture conditions regulates histone modification.

研究代表者

林 陽子 (Hayashi-Takanaka, Yoko)

東京工業大学・生命理工学研究科・産学官連携研究員

研究者番号：50397551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞密度依存的にヒストン修飾のレベルが変化することに着目し、細胞密度依存的なエピジェネティクス制御と遺伝子発現調節の解明を目標とした。

これまで作製したヒストン修飾抗体を用いて、細胞密度依存的な変化を調べたところ、培地中にヒストンアセチル化を上昇させる物質があることが分かった。特にこれは3時間以内で起こる、比較的早い反応であった。一方で、メチル化修飾では短時間では変化がみられず、24時間以上の培養によって減少した。つまりアセチル化とメチル化ではその制御が異なることが示唆された。さらに、これらヒストン修飾を変化させる物質のひとつに乳酸が挙げられることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The levels of histone modifications change depending on the surrounding environments. To validate the effects of cell culture condition on histone modification, cells were cultured under various cell conditions and the levels of histone modifications were measured. When dense cell cultured supernatant were added to the culture medium, the levels of histone acetylation, and methylation, increased and decreased, respectively. The levels of histone acetylation changed within 3 hr, which was relatively fast. On the other hands, the levels of methylation decreased after 24 hr, suggesting that the histone acetylation and methylation are regulated by different mechanism. Furthermore, we found that one of the factor which changed histone modifications in dense cell cultured supernatant was lactic acid.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒストン修飾 細胞培養 メチル化 アセチル化

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、後天的遺伝情報とも呼ばれ、分化・老化・癌化など様々な生命現象に深く関わる。ヒストン修飾はその一端を担い、遺伝子の発現調節に大きな影響を及ぼす。ヒストンにはN末端を中心に、メチル化やアセチル化、リン酸化などの修飾部位があり、遺伝子発現を始めとするゲノム高次機能の制御には、ヒストン修飾が重要な役割を果たすことが分かってきている。申請者はこれまで木村宏博士と共に、様々なヒストン修飾に対するモノクローナル抗体の作製と評価を行ってきた。

培養条件下において細胞密度は、細胞増殖に密接な関わりがある。つまり低密度では増殖能が低く、細胞が増えるに従って増殖スピードも上昇し、最適増殖密度では最も増殖能が高い。これを超えてさらに高密度になると再び増殖能は低くなる。

同時に、細胞密度は、細胞の形質自体にも深く関与することが経験的に知られている。例えば、神経細胞初代培養の場合、適切な細胞密度の場合は神経突起を伸ばして成長するが、低密度では突起の伸長が見られなくなる。未分化細胞の場合、適切な未分化能の維持には、許容範囲の細胞密度があり、これらの範囲を超えると分化を引き起こす。

これらの細胞密度による増殖と細胞形質の調節は、培地中の栄養素量や細胞が分泌する増殖因子などに起因する細胞代謝系が関与していると考えられる。また、高密度における増殖阻害は、細胞が隣の細胞と接触することが一因と考えられている。

そこで細胞密度が、細胞の形質に影響を与える過程で、ヒストン修飾にも変化が見られるのではないかと、もしもそうであれば、具体的にどのような変化が起こるのかを網羅的に調べることで、環境変化とヒストン修飾の関係を理解できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

細胞密度は、増殖能や細胞の性質の維持には欠かせない条件であることが古くから知られているものの、エピジェネティクス制御との関わりが報告された例はない。そこで本研究では、細胞密度依存的にヒストン修飾のレベルが変化することに着目し、細胞密度依存的なエピジェネティクス制御と遺伝子発現調節の解明を目標とした。

3. 研究の方法

予備的実験として、細胞密度が濃い状態で培養したときと、薄い密度で培養したときとでは、細胞の形が異なることに気がついた。そこでまず、低密度培養と高密度培養とで、ヒストン修飾のレベルが異なるかどうかを調べた。次に、培養上清がヒストン修飾に

も影響を与えるかどうかを調べるために、図1のような実験を行った。具体的には、通常の細胞密度で細胞を準備し、そこに通常よりも5~10倍程度濃い細胞密度で一日以上培養したときの培養上清を加える。この条件で、細胞を培養したあとに、細胞を固定し、様々なヒストン修飾で調べた。

加えて、これらの条件でゲノム上のヒストン就職の分布が異なるかどうかを調べるために、クロマチン免疫沈降を行った。

4. 研究成果

細胞密度を通常の培養条件よりも10~30分の1程度に薄く培養すると、様々なヒストンH3メチル化修飾(K4、K9、K27、K36などのトリメチル)などで、低密度培養の細胞のほうが高いレベルを示すことが分かった。一方、アセチル化修飾は、低密度培養で減少することを確認した。

つぎにこの現象が、細胞密度による培地からの影響によるものであることを確かめるために(図2)、高密度培養由来の培地を加えて数時間経ったところで細胞を回収しヒストン修飾の変化を調べた。その結果、試したすべてのアセチル化では、そのレベルが上昇することが分かった。特に高密度培地由来の割合が高いほど上昇し、これは3時間以内で起こる、比較的早い反応であることがわかった。一方で、メチル化修飾では、短時間では変化がみられず、24時間以上の培養によって、減少することが分かった。したがって、アセチル化とメチル化は、それぞれ別の経路によって、制御されている可能性が示唆された。

次に、高密度培養由来の培地において、何が原因因子かを調べるために、培養上清を50、30、10、3 kDaのサイズで分画し、どの画分にヒストン修飾を変化させるものがあるのかを調べた(図3)。その結果、アセチル化およびメチル化ともに、3 kDa以下の画分で変化することがわかった。そこで細胞を高密度で培養した場合に分泌する低分子量物質として探索したところ、乳酸が考えられた。

乳酸には、代謝産物のひとつであり、脱アセチル化酵素阻害剤として働くことが報告されていた。したがって、これが濃度依存的なヒストン修飾の変化を導く一因であると考えられた。

そこで、通常の培地に異なる乳酸濃度になるように加え、ヒストン修飾の変化を調べたところ、乳酸濃度依存的に、ヒストンアセチル化は上昇することがわかった。また、メチル化も24時間の培養によって減少することが確認できた。したがって、乳酸はアセチル化を上昇させると共に、メチル化の減少にも関与することが示唆された。

特にヒストンH4K20モノメチル化では、図4に見られるように、通常の培養と比較して、濃い細胞密度で培養したときの培養上清を

加えて一昼夜培養した場合、および乳酸を加えた場合では、全体にメチル化のレベルが減少し、なかでも G1 期のダイナミックレンジが狭くなるのが分かった。これまで研究から、H4K20 モノメチル化の細胞周期における変動は、他のメチル化と異なることがわかっている。例えば、他のメチル化は G1 期では上昇するのに対し、H4K20 モノメチル化では減少する。つまり、乳酸に対するアセチル化とメチル化の反応時間の違いは、H4K20 モノメチル化が関与しているかどうかではないかと考えた。つまり、H4K20 モノメチル化がアセチル化の変動を受けて変化し、これが他のメチル化へ影響しているのではないかと現在考えている。

並行して、九州大学大川恭行研究室らの共同研究により、細胞密度の異なる細胞集団を回収し、それぞれ ChIP-seq を行った。その結果、低密度培養では、ヒストン H3K9 トリメチル化修飾は、テロメア周辺のメチル化が上昇する一方で、ヒストン H4K16 アセチル化修飾は、遺伝子の転写開始点を中心に減少することを確認した。

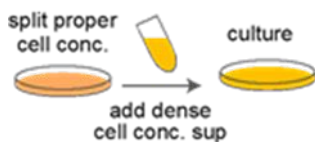


図1 培養方法

通常の細胞密度で細胞を培養し、さらに濃い細胞密度で培養したときの培養上清を加えて、培養する。続けて、細胞を固定し、ヒストン修飾の変化を調べるために免疫染色を行う。それぞれの実験によって、高密度培養由来の培地を含む割合は異なる。

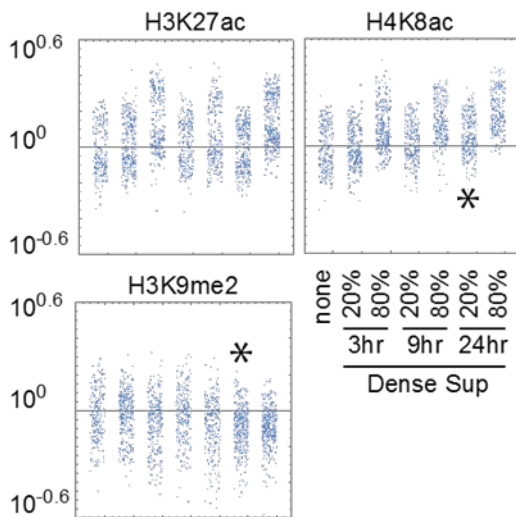


図2 培養上清によるヒストン修飾への影響

通常の細胞密度で細胞を培養し、ここに高密度培養由来の培地を加えて、一昼夜培養した。H3K27ac や H4K8ac を始めとしたヒストンアセチル化は、高密度培養由来の培地

を含む割合が高いと、上昇した。一方で、H3H9me2 を含むヒストンメチル化では高密度培養由来の培地の割合というよりは、インキュベーション時間に依存し、特に 24 時間の培養では、減少することが分かった。

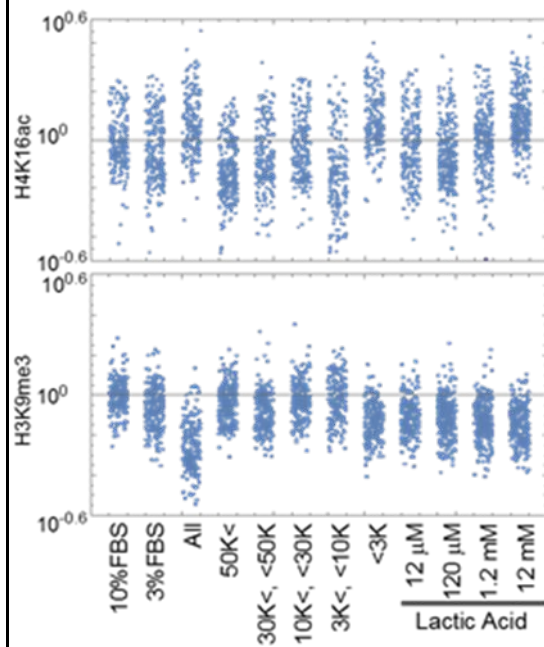


図3 培地中に含まれる乳酸によるヒストン修飾のレベルの変化

10%FBS が含まれる培地、3%FBS が含まれる培地、濃い細胞密度で培養したときの培養上清で培養したもの (All)、All からそれぞれ分画したもの (50KDa 以上、30KDa 以上 50KDa 以下、10KDa 以上 30KDa 以下、3KDa 以上 10K 以下、3KDa 以下)、もしくは通常の培地に、乳酸をそれぞれの濃度で加えたもので、一昼夜、細胞を培養し固定した。(上) ヒストン H4K16 アセチル化、(下) ヒストン H3K9 トリメチル化を示す。アセチル化が、3KDa 以下の小さな分画で上昇した。また乳酸を加えた場合でも上昇することがわかった。一方メチル化では、濃い細胞密度で培養したときの培養上清で培養したもの (All) が最も減少した。また 3KDa 以下でも乳酸を加えた場合でも同様に減少することがわかった。

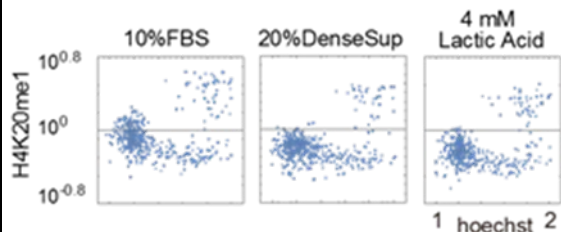


図4 ヒストン H4K20me1 修飾への影響

通常の細胞密度で細胞を培養した場合 (左)、濃い細胞密度で培養したときの培養上清を加えて一昼夜培養した場合 (中央)、および乳酸を加えた場合 (右) を示す。横軸に Hoechst をとることで、Hoechst=1 の周辺が G1 期、

Hoechst=2 周辺が G2 期、中間の移行期が S 期に相当する。通常の培地と比較して、乳酸や濃い培養密度由来の培養上清を加えた場合では、特に G1 期のダイナミックレンジが狭いことがわかった。

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 6 件)

1. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging.

Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H.

PLoS One (査読有) 2014 Sep 3;9(9):e106271. doi: 10.1371/journal.pone.0106271. eCollection 2014.

2. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells.

Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H.

Nature (査読有) 2014 Dec 11;516(7530):272-5. doi: 10.1038/nature13714. Epub 2014 Sep 21.

3. Early development of cloned bovine embryos produced from oocytes enucleated by fluorescence metaphase II imaging using a conventional halogen-lamp microscope.

Iwamoto D, Yamagata K, Kishi M, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Wakayama T, Saeki K.

Cell Reprogram. (査読有) 2015 Apr;17(2):106-14. doi: 10.1089/cell.2014.0086.

4. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo.

Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y.

Histochem Cell Biol. (査読有) 2015 Aug;144(2):101-9. doi: 10.1007/s00418-015-1344-0. Epub 2015 Jul 3. Review.

5. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies.

Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H.

Chromosome Res. (査読有) 2015 Dec;23(4):753-66. doi: 10.1007/s10577-015-9486-4. Epub 2015 Sep 5.

6. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells.

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.

Sci Rep. (査読有) 2016 Apr 11;6:24318. doi: 10.1038/srep24318.

[学会発表](計 4 件)

1. 林陽子・野崎直仁・木村宏 日本分子生物学会(神戸) 生細胞蛍光イメージングに適した低分子蛍光色素の探索(ポスター) 2013/12/4

2. 林陽子・野崎直仁・木村宏 がん代謝研究会(東京) 多重免疫染色法を用いた細胞周期や代謝産物によるヒストン修飾動態の計測(口頭・ポスター) 2014/7/10

3. 林陽子・野崎直仁・木村宏 内藤カンファレンス(Epigenetics-From histone code to therapeutic strategy)(札幌) Distribution and its function of histone H4 modifications revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. (ポスター) 2015/9/16

4. 林陽子・野崎直仁・木村宏 日本分子生物学会(神戸) 特異的抗体によるヒストン H4 修飾動態の単一細胞解析(ポスター) 2015/12/2

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

林 陽子 (Yoko Hayashi-Takanaka)
東京工業大学・生命理工学研究科・産学官連
携研究員

研究者番号： 50397551

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：