

「エピゲノムに基づく診断・治療へ向けた新技術の創出研究」
平成23年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

白川 昌宏

京都大学大学院工学研究科・教授

幹細胞における多分化能性維持の分子機構とエピゲノム構造の三次元的解析

§1. 研究実施体制

(1)「京都大学大学院工学研究科」グループ(京都大学大学院工学研究科)

① 研究代表者:白川 昌宏 (京都大学工学研究科、教授)

② 研究項目

・DNA脱メチル化の構造基盤研究とエピゲノム構造の三次元的解析

(2)「京都大学物質-細胞統合システム拠点」グループ(京都大学物質細胞-統合システム拠点)

① 主たる共同研究者:カールトン, ピーター (京都大学物質細胞-統合システム拠点、特定拠点助教)

② 研究項目

・超解像度顕微鏡によるメチローム・デメチロームの解析

(3)「大阪大学蛋白質研究所」グループ(大阪大学蛋白質研究所)

① 主たる共同研究者:末武勲 (大阪大学蛋白質研究所、准教授)

② 研究項目

・DNAヒドロキシメチル化に関する研究

(4)「大阪大学大学院工学研究科」グループ(大阪大学大学院工学研究科)

① 主たる共同研究者:菊地 和也 (大阪大学大学院工学研究科、教授)

② 研究項目

・化学アプローチを用いたエピゲノム解析ツール開発

(5)「横浜市立大学」グループ(研究機関別)

① 研究代表者:古久保 哲朗 (横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科、教授)

② 研究項目

- ・Chromosome Conformation Capture(3C)法によるメチル化・脱メチル化部位の核内三次元マッピングと反応場構築に関与する転写因子群の機能解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(2-1)「京都大学大学院工学研究科」グループ

①メチル化DNAに結合する機能を持つMBD4(Methyl-CpG binding domain 4)は、DNA修復に関わるグリコシラーゼで、転写抑制にも関わることが知られている。MBD4によるメチル化DNAの認識は、そのMBDドメインが担っているが、H24年度は、MBDと様々なタイプのメチル化DNAとの複合体の結晶構造を決定し、その分子認識機構の詳細を解明した²。②光検出磁気共鳴顕微鏡によるダイヤモンドナノ粒子の選択観察法を開発し、同法が培養細胞や線虫に適用できることを示した¹⁾。同手法を利用した細胞粘弾性の計測法を開発しており、これまでCCDカメラを用いた視野観察により計測を行ってきたが、本年度は、アバランシェフォトダイオードを組み込んだ装置を開発した。これによって、信号取得に要する時間を大幅に短縮でき、より高い周波数特性を持つ運動の検出が可能となった。

(2-2)「京都大学物質-細胞統合システム拠点」グループ

H24年度は、H23年度に獲得した条件を使って、クロマチンのメチル化・ヒドロキシメチル化を、免疫染色を用いて高解像度及び超解像度顕微鏡で定量的に可視化して、その解析を開始した。共同研究グループ(2-3)から、メチル化DNAを認識するeGFP蛋白質の複合体(MBD1, MBD4, Dnmt1(DNAメチルトランスフェラーゼ1), Dnmt3a)を入手し、ヒトES細胞に発現させて可視化した。また、共同研究グループ(2-1)から入手したeGFPと、ヘミメチル化を認識するUHRF1の野生型・変異体・リン酸化ミミックをヒトES細胞に入れて、蛍光顕微鏡でライブイメージングを行い、UHRF1の活性による局在を定量的に可視化した。そして、市販の単鎖抗体「Chromobody」を使って、in vivoでDnmt1とPCNAのセルサイクルにおける共局在をヒトES細胞で計ることに成功した。画像処理の面で、コロニーの画像から細胞核を1つずつ特徴抽出し、5mCや5hmCの核膜からの距離と、他のラベルとの共局在を細胞毎に測定できるプログラムを作った。本年度は、線維芽細胞と心筋細胞へ分化するヒトES細胞のメチロームがどのように変わるかをイメージングで測り、Dnmt1,3とUHRF1のノックダウンと変異体を使って、メチロームのダイナミックな変化の分化への影響を明らかにする予定である。

(2-3)「大阪大学蛋白質研究所」グループ

平成24年度は、大きく分けて以下の3つの研究を行った。

- 1) DNA 複製や修復の過程で DNA メチル化を維持する Dnmt1 は、2 本鎖 DNA の一方の鎖がヒドロキシメチル化された DNA に対しては、試験管内でほとんど活性を示さないため、ヒドロキシメチル化部位は、DNA 複製時に脱メチル化される可能性を見出した。一方、新しく DNA メチル化模様を形成する Dnmt3a,3b は、ヒドロキシメチル化された DNA でもメチル化することができ、DNA 複製後のヒドロキシメチル化部位のメチル化状態を維持しうることが示唆された。ES 細胞のゲノム全体のヒドロキシメチル化量は、Dnmt3a, 3b をノックアウトすると、低下したため、細胞内でも、Dnmt3a,3bがヒドロキシメチル化の維持に必要であることが確認することができた(投稿準備中)。
- 2) ヒドロキシメチル化は、未分化細胞または、神経細胞に含有量が高いことが知られている。そこで、ヒト ES 細胞で神経前駆細胞に分化誘導させた細胞を用いて、DNA メチル化部位とヒドロキシメチル化部位について、マイクロアレイを用いて調べた。その結果、DNA メチル化とヒドロキシメチル化は、部分的にしか重ならなかった。現在、その分布について、さらなる解析を進めている。
- 3) ヒドロキシル化シトシンをフォルミル化シトシンに変換し、ヒドロキシル化シトシンの位置を塩基レベルで調べる方法、ならびにフォルミル基にタグを導入しヒドロキシル化シトシンを含む領域をゲノム DNA より濃縮する方法を確立しようと、様々な条件検討を行った。

(2-4)「大阪大学大学院工学研究科」グループ

我々は、化学のアプローチにより DNA やヒストンの修飾からなるエピゲノムを生細胞で可視化する技術を開発している。本年度は、我々の開発した蛋白質蛍光標識技術を利用して、DNA のメチル化及びヘミメチル化の可視化に関する研究を行った。これまでに、蛍光プローブに特異的に結合する蛋白質をタグとして標的蛋白質を標識する技術の開発に成功している。そこで、このタグ蛋白質にメチル化 DNA を特異的に認識する蛋白質ドメインである MBD を融合させ蛍光プローブにより標識し、その局在を蛍光イメージングによって解析する技術を開発した。またこれと並行して、ヒストン修飾に関わる酵素の一つであるヒストン脱アセチル化酵素の活性を可視化するために、検出原理の異なる2つのプローブの開発を行った^{4, 5)}。一つは、酵素反応により分子内エステル転移反応が起こり蛍光強度が増大するものであり、もう一つは、酵素と反応するとプローブの荷電状態が変化しプローブ同士が凝集し蛍光強度が増大するものである。これらのプローブを用いることで、ヒストン脱アセチル化酵素の活性を一段階の操作で簡便に検出することに成功した。

(2-5)「横浜市立大学」グループ

受精後、マウスの雄性前核では Tet3 の働きによりメチル化シトシンのゲノムワイドなヒドロキシル化が起こるが、雌性前核では Tet3 が核内に蓄積できず、しばらくの間は元のメチル化状態が維持される。この雄性前核特異的なメチル化状態のリプログラミングには、転写伸長因子である Elongator 複合体の機能が重要と考えられているが、その分子機構の詳細は不明である。

本年度は、他の生物種においても同様の雄性前核特異的な酸化修飾反応が起こるかについて検討するため、ゼブラフィッシュならびにバフンウニの初期胚を材料とし、各種のメチル化修飾シトシン残基(mC, hmC, fC, caC)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、これらの生物種においては、マウスの場合とは異なり、受精前の精子の段階において、すでに酸化反応がある程度進行していることが明らかとなった。また興味深いことに、バフンウニの場合には、Tet1/2/3の相同遺伝子は一種類しか存在せず、その一次構造はマウスのものとは大きく異なることが示唆された。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Igarashi, R., Yoshinari, Y., Yokota, H., Sugi, T., Sugihara, F., Ikeda, K., Sumiya, H., Tsuji, S., Mori, I., Tochio, H., Harada, Y., Shirakawa, M., “Real-time background-free selective imaging of fluorescent nanodiamonds in vivo”, *Nano Lett.*, Vol.12, No.11, pp.5726-5732, 2012 (DOI: 10.1021/nl302979d)
2. Unoki, M., Masuda, A., Dohmae, N., Arita, K., Yoshimatsu, M., Iwai, Y., Fukui, Y., Ueda, K., Hamamoto, R., Shirakawa, M., Sasaki, H., Nakamura, Y., “Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6)”, *J Biol Chem*, Vol. 288, No. 9, pp.6053-6062, 2013 (DOI: 10.1074/jbc.M112.433284)
3. Otani, J., Arita, K., Kato, T., Kinoshita, M., Kimura, H., Suetake, I., Tajima, S., Ariyoshi, M., Shirakawa, M. “Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4”, *J Biol Chem*, Vol. 288, No. 9, pp.6351-6362, 2013 (DOI: 10.1074/jbc.M112.431098)
4. Baba, R., Hori, Y., Mizukami, S., Kikuchi, K., “Development of a Fluorogenic Probe with a Transesterification Switch for Detection of Histone Deacetylase Activity”, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 134, No. 35, pp.14310-14313, 2012 (DOI: 10.1021/ja306045j)
5. Dhara, K., Hori, Y., Baba, R., Kikuchi, K., “A fluorescent probe for detection of histone deacetylase activity based on aggregation-induced emission”, *Chem. Commun.*, Vol. 48, No. 94, pp.11534-11536, 2012 (DOI: 10.1039/c2cc36591j)
6. Sadhu, K. K., Mizukami, S., Yoshimura, A., Kikuchi, K., “pH induced dual "OFF-ON-OFF" switch: influence of a suitably placed carboxylic acid”, *Org. Biomol. Chem.*, Vol. 11, No. 4, pp.563-568, 2013 (DOI: 10.1039/c2ob26630j)

7. Zeng, Z., Mizukami, S., Kikuchi, K., “Simple and real-time colorimetric assay for glycosidases activity using functionalized gold nanoparticles and its application for inhibitor screening”, *Anal. Chem.*, Vol. 84, No. 21, pp.9089-9095, 2012 (DOI: 10.1021/ac301677v)
8. Matsushita, H., Mizukami, S., Mori, Y., Sugihara, F., Shirakawa, M., Yoshioka, Y., Kikuchi, K., “¹⁹F MRI monitoring of gene expression in living cells through cell-surface β -lactamase activity”, *Chembiochem*, Vol. 13, No. 11, pp.1579-1583. 2012 (DOI: 10.1002/cbic.201200331)