

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

(2-1)「京都大学大学院工学研究科」グループ

H23年度は、①DNAメチル化・脱メチル化に関わる蛋白質の構造機能解析に向け、メチル化DNA結合蛋白質、UHRF1とUHRF2の構造機能解析に着手した。特に、UHRF1とUHRF2のDNA結合特異性の違いを示唆する結果を得たので、今後は、このようなDNA認識の特異性の違いがUHRF2の機能にどのような影響を及ぼしているのか明らかにしていく予定である。次項(2-2)記載の通り、新規の蛋白質蛍光標識法の開発および超解像度蛍光顕微鏡(3D-SIM)の準備が順調に進んでおり、得られたメチル化DNA結合ドメインの構造機能相関に関する知見を踏まえて、細胞内のDNAメチル化部位の細胞内イメージングの準備が整いつつある。②ダイヤモンドを用いた光検出磁気共鳴顕微鏡による細胞粘弾性の計測の研究項目に関して、我々のグループでは、これまでに電子増倍型CCDカメラを用いた視野観察による光検出磁気共鳴を採用して開発してきた。本年度は、更に検出感度が高く、細胞内でのダイヤモンドの位置を三次元で精度よく決定できるような装置の改良に着手し、計画通りに順調に進んでいる。

(2-2)「京都大学物質・細胞統合システム拠点」グループ

H23年度は、免疫蛍光法および3D-SIM検出のための最適な条件を確立するために、メチルシトシン、DNMT1、およびヒドロキシメチルシトシンに対する市販の抗体を使用したヒトiPS細胞の免疫染色を行い、最適条件を模索した。今後、免疫染色より得られたシグナルの3次元情報を定量化し、測定・解析法のさらなる最適化・改良を行う。また、他の研究グループと協力して、様々なメチル化DNA結合ドメインを利用したDNAメチル化・ヘミメチル化プローブの開発、評価を行う。良好なプローブが得られたら、3D-SIM検出によりその核内分布を定量解析し、抗体染色の結果と比較することを計画している。

(2-3)「大阪大学蛋白質研究所」グループ

平成23年度は、大きく分けて以下の2つの研究を行った。①DNAヒドロキシメチル化を介した、DNAの脱メチル化の分子機構の解明、②ゲノムDNA中のヒドロキシメチル化部位のマッピングおよび配列情報を得る実験方法を確立する準備である。

①DNA複製や修復の過程でDNAメチル化を維持するDNAメチルトランスフェラーゼ(Dnmt)1が、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ことを見出した。Dnmt1と複合体を形成するNp95のSRAは、ヒドロキシメチル化DNAには弱い結合しか示さなかった。これらの結果は、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示唆している。(投稿準備中)。

②ゲノム DNA から、ヒドロキシメチル化部位を濃縮する手法の1つに、ヒドロキシメチル化シトシンに何らかのタグをつけ、それで分離精製する方法が数種類報告されている。私たちは、ヒドロキシル化シトシンを一端フォルミル化シトシンに変換したのち、フォルミル基にタグを導入して、ゲノム DNA より、ヒドロキシル化シトシンを含む領域を濃縮する実験系を確立しようとしている。同時に、ヒドロキシメチル化シトシンの位置をシーケンスレベルで調べる新規方法についても、研究を開始した。

(2-4)「大阪大学大学院工学研究科」グループ

本研究では、DNA メチル化状態を蛍光可視化することを目的として、タグ蛋白質と合成蛍光プローブを用いた蛋白質標識法の開発に取り組んだ。タグ蛋白質とは、蛍光プローブと特異的に結合し、遺伝子工学により融合させた標的蛋白質を蛍光標識するために用いられる。我々は、これまでに Photoactive yellow protein (PYP)をタグ蛋白質として見出し、その蛍光プローブの開発を行ってきた。本年度では、蛍光プローブの標識速度の改良と、その改良型プローブを用いた生細胞イメージングを行った。これまでに、開発したプローブはヒドロキシクマリンをリガンドとした構造を有していたが、反応速度の向上を考慮に入れて、新しいリガンド構造(ヒドロキシ桂皮酸)を持つプローブの設計を行った。その結果、この新規プローブによる PYP タグの標識速度を 100 倍以上向上させることに成功した¹。本プローブを用いて生細胞イメージングを行ったところ、PYP タグ融合蛋白質を発現した細胞から蛍光が観測された。

今後は、メチル化・ヘミメチル化・ヒドロキシメチル化 DNA を認識する蛋白質にそれぞれ PYP タグを融合させた遺伝子を設計し細胞核に発現させる。今年度開発したプローブにより、これらの融合蛋白質を標識し、DNA のメチル化状態のイメージングを目指す。

(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複合体の機能が必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、胚が透明で発生速度の速いゼブラフィッシュを材料とし、同様のメチル化リプログラミングの存在を確認するべく、実験系の構築を試みた。具体的には、まず飼育設備を整備し、その後メチル化シトシン(5mC)やヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)を特異的に認識する抗体を用いて、受精後の胚発生過程(10分~6時間)における両修飾塩基の存在量の経時的な変化を調べた。その結果、受精後には5mC量が徐々に増加する一方、5hmC量はほとんど変動しないことが明らかとなった。従って、マウスの場合とは異なり、ゼブラフィッシュの胚においては5mCから5hmCへの変換が起こらない、もしくは生じた5hmCが速やかに他の修飾塩基に変換されるものと考えられる。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Yuichiro Hori, NakakiKyohei, Motoki Sato, Kazuya Kikuchi, “Development of Protein Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association and No-wash Live-cell Imaging”, *Angew.Chem. Int. Ed.*, vol. 51,2012, (in press)