

「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

H25 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

① 主たる共同研究者: 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關与する転写因子群の機能解析

§ 2. 研究実施の概要

本 CREST プロジェクトでは、DNA メチル化・脱メチル化によるエピゲノム制御を物理化学的に、かつ、三次元的観点から解明するための分子基盤研究および基盤手法の開発を行っている。H25 年度は、3つの項目について下記の研究を行った。

項目1 立体構造に立脚した DNA 脱メチル化の分子機構の解明(白川・末武グループ)

DNA 維持メチル化に不可欠な2つの因子、片鎖メチル化 DNA 結合タンパク質 UHRF1 と DNA メチル化酵素 Dnmt1 の協調的なクロマチン上での機能発現機構を理解するため、NMR 滴定法などを用いて2つのタンパク質の相互作用領域を同定し、構造解析を進めているところである。一方、末武グループは、UHRF1 との結合に依存した新たな Dnmt1 のメチル化活性制御機構を示唆する生化学的データを得ており、白川グループと共に複合体の構造機能解析を進め、その詳細な分子メカニズムを検証する計画である。また、Dnmt1 が UHRF1 によってユビキチン化されたヒストン H3 を認識するという最近の知見に基づき、生化学的な手法を用いて Dnmt1 の RFTS ドメインとダイユビキチン化ヒストンの結合能を評価した。その結果、RFTS ドメインは、モノユビキチン、ダイユビキチンには結合せず、ダイユビキチン化されたヒストンのみと結合することが *in vitro* の生化学的解析から示された。UHRF1 と Dnmt1 およびユビキチン化ヒストンと Dnmt1 の構造解析を進めるために必要な情報を得ることができた。また、ヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)の量は、細胞周期に依存して変化し、細胞周期の S 期では他の周期より低い傾向を見出した。また Dnmt3a、Dnmt3b の両遺伝子が、5hmC の量を規定することを明らかにした。

項目2 メチローム・デメチロームの核内一次元ならびに3次元マッピング(白川・カールトン・末武・古久保・菊地 グループ)

本研究項目では、重要なメチル化制御因子やメチル化シトシン(5mC)およびその酸化誘導体の細胞内局在をより高感度に可視化し、リアルタイムイメージング・定量解析を行うための技術改良、新規プローブ作成を行った。

カールトングループの高解像度顕微鏡を用いて、ヒト ES 細胞における Dnmt1 の核内局在のライブイメージングによる可視化を試みた。ヒト ES 細胞は、細胞周期が比較的長く、複製にかかる時間が比較的長いため、12 時間超の長時間ライブイメージングに際して、励起光によるブリーチング効果(発光シグナルの減衰)が顕著に起こり、取得画像のノイズが上がるという問題が発生した。カールトングループは、画像演算処理(デノイジング)による画像ノイズ除去法を利用し、この長時間ライブイメージングの問題を克服し、Dnmt1 の DNA 複製期前後における局在パターンの定量的解析を行った。

菊地グループは、独自の蛋白質標識技術を利用して、エピジェネティックな現象を解明するための化学プローブを合理的に設計・開発している。本年度の研究では、MBD 蛋白質を蛍光標識し、その局在を可視化することで、メチル化 DNA を観測することに成功した。更に、メチル化 DNA をより高い S/N 比で観測するための基盤技術の開発を行った。一方、末武グループは、白川グループの成果であるメチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1 および MBD4 のメチル化 CpG 結合ドメイン(MBD)の構造機能解析により明らかにされたメチル化・ヒドロキシメチル化シトシンへの結合特性の *in vivo* での検証を行っている。具体的には、蛍光標識した MBD ドメインを細胞内で発現させ、可視化し、5mC と 5hmC に結合する MBD4 と 5mC にのみ結合する MBD1 の分布様式の比較を行うことで、5hmC の局在を可視化できるかどうかを検証中である。菊地グループの開発したプローブを利用することによって、より精度の高い解析が期待される。古久保グループでは、ゼブラフィッシュならびにバフンウニの初期胚の DNA メチル化状態を解析し、少なくともウニ精子 DNA においては、5fC、5caC がさらに未知の化学修飾を受けている可能性を示唆するデータを得ている。このような新たな知見についても今回開発した基盤技術を用いた解析が可能になると考える。

項目3 幹細胞表現型マーカーとしての細胞粘弾性の計測(白川グループ)

新規に開発した光検出磁気共鳴顕微鏡に大幅な改良を加え、光学分解能を超える高い精度(10 ナノメートル精度)で細胞膜ナノ揺動を三次元的に可視化することに成功した。今年度の研究において、薬剤を用いた生細胞実験で細胞粘弾性と細胞骨格との間の相関関係を精密に定量することに成功している。これは、幹細胞の分化における細胞骨格の秩序化の過程を追跡する上で、本計測手法がそれに十分耐えうる定量性を持つことを示唆する結果である。この実験を行うにあたり、ナノダイヤモンドの高い疎水性が引き起こす分散性の低さと非特異結合を回避して特異的な分子標識を行うため、ナノダイヤモンドの表面を特殊な親水性ポリマーと標的分子特異的な抗体で修飾するという手法を確立した。以上の計測技術とナノダイヤモンド表面修飾技術とを組み合わせることで、我々は特定の生命現象を選択的に追跡し、これまで目で観ることのできなかつたナノ動態をリアルタイムで三次元的に可視化することが可能であろう。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

- 1 Takaoka Y, Kioi Y, Morito A, Otani J, Arita K, Ashihara E, Ariyoshi M, Tochio H, Shirakawa M, Hamachi I. “Quantitative comparison of protein dynamics in live cells and in vitro by in-cell (19)F-NMR.” *Chem Commun (Camb)*. 49, 2801-2803, 2013. (DOI: 10.1039/c3cc39205h.)
- 2 Yuichiro Hori and Tomoya Norinobu and Motoki Sato and Kyohei Arita and Masahiro Shirakawa and Kazuya Kikuchi, “Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins”, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 135, pp.12360-12365, 2013 (DOI: 10.1021/ja405745v)
- 3 Eric Lindberg and Shin Mizukami and Keiji Ibata and Takashi Fukano and Atsushi Miyawakide and Kazuya Kikuchi, “Development of Cell-Impermeable Coelenterazine Derivatives”, *Chemical Science*, vol.4, pp.4395-4400, 2013 (DOI: 10.1039/c3sc51985f)
- 4 Hembram DS, Haremaki T, Hamatsu J, Inoue J, Kamoshida H, Ikeya T, Mishima M, Mikawa T, Hayashi N, Shirakawa M, Ito Y. “An in-cell NMR study of monitoring stress-induced increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in HeLa cells.” *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Sep 6;438(4):653-9. (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.127.)
- 5 Eric Lindberg and Shin Mizukami and Keiji Ibata and Atsushi Miyawaki and Kazuya Kikuchi, “Development of Luminescent Coelenterazine Derivatives Activatable by β -Galactosidase for Monitoring Dual Gene Expression”, *Chemistry A European Journal*, vol.19, pp.14970-14976, 2013 (DOI: 10.1002/chem.201302002)
- 6 Tatsuya Nakamura and Shin Mizukami and Miho Tanaka and Kazuya Kikuchi, “Efficient Development of Luminescent Lanthanide(III) Complexes by Solid-phase Synthesis and On-resin Screening”, *Chemistry An Asian Journal*, vol.8, pp.2685-2690, 2013, (DOI: 10.1002/asia.201300759)
- 7 Otani J, Kimura H, Sharif J, Endo TA, Mishima Y, Kawakami T, Koseki H, Shirakawa M, Suetake I, and Tajima S. “Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells.” *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e82961. (DOI: 10.1371/journal.pone.0082961)
- 8 Satoshi Okada and Shin Mizukami and Yutaka Matsumura and Yoshichika Yoshiokabe and Kazuya Kikuchi, “A Nanospherical Polymer as an MRI Sensor without Paramagnetic or Superparamagnetic Species”, *Dalton Transactions*, vol. 42, pp.15864-15867, 2013 (DOI: 10.1039/c3dt50378j)
- 9 Hisashi Matsushita and Shin Mizukami and Fuminori Sugihara and Yosuke Nakanishi and Yoshichika Yoshioka and Kazuya Kikuchi, “Multifunctional Core-shell

Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ^{19}F Magnetic Resonance Imaging”,
Angewandte Chemie International Edition, vol.53, pp.1008-1011, 2014, (DOI:
10.1002/anie.201308500)

10 Berkyurek AC, Suetake I, Arita K, Takeshita K, Nakagawa A, Shirakawa M, and Tajima S. “The DNA methyltransferase Dnmt1 directly interacts with the SET and RING finger-associated (SRA) domain of the multifunctional protein Uhrf1 to facilitate accession of the catalytic center to hemi-methylated DNA.” J Biol Chem. 2014 Jan 3;289(1):379-86. (DOI: 10.1074/jbc.M113.523209. Epub 2013 Nov 19.)

11 Akimasa Yoshimura and Shin Mizukami and Yuki Mori and Yoshichika Yoshioka and Kazuya Kikuchi, “ ^1H MRI Detection of Gene Expression in Living Cells by Using Protein Tag and Biotinylation Probe”, Chemistry Letters, vol.43, pp.219-221, 2014, (DOI:10.1246/cl.130942)

12 Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. “Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes.” Mol Immunol. 2014 Mar;58(1):66-76. (DOI : 10.1016/j.molimm.)

13 Walinda E, Morimoto D, Sugase K, Konuma T, Tochio H, Shirakawa M, “Solution Structure of the Ubiquitin-associated (UBA) Domain of Human Autophagy Receptor NBR1 and its Interaction with Ubiquitin and Polyubiquitin” J Biol Chem. 2014 (in press)