

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

H26 年度
実績報告書

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: Peter Carlton (京都大学物質細胞-統合システム拠点、特定拠点准教授)

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関与する転写因子群の機能解析

§ 2. 研究実施の概要

本研究では、幹細胞における多分化能性維持と幹細胞からの分化を決定づけるエピゲノム状態、特にゲノム DNA のメチル化、ヒドロキシメチル化をゲノム上、及び生細胞の核における分布を、3 次元的に明らかにする手法を開発することを目的とした。

まず、末武グループが、ゲノム上でのプロモーター上流にメチル化、及びその酸化物であるヒドロキシメチル化部位のクラスターが頻出する事を示し、そのクラスターの位置関係が転写に及ぼす影響を明らかにした。

菊地グループとカールトングループは細胞におけるエピゲノム状態を可視化するためのプローブと顕微鏡での観察手法の開発に取り組んでいる。菊地グループは白川・末武グループが明らかにした、MBD1 と MBD 4 の DNA 結合における塩基修飾特異性を利用して、PYP-MBD と YOCNB を使う系を開発し、生細胞においてこれらのプローブがメチル化 DNA と結合した時にのみ蛍光を発するようにすることに成功している。一方、カールトングループは GFP:MBD1, mCherry:MBD4 を使って染色した固定細胞の差分の独立成分解析により、ヒドロキシメチルシトシンの 3 次元分布の超高分解能可視化を行った。

メチル化・脱メチル化に關与する分子機構の研究として白川・末武グループは、主として維持メチル化酵素 Dnmt1 とのそのリクルートを行う UHRF1 を取り上げた。UHRF1 は TTD-PHD-SRA ドメインを持ち、TTD-PHD ドメインは修飾を受けたヒストン H3 N 末テールを、SRA ドメインは片鎖メチル化 DNA を認識する。興味深いことに、これらドメインのドメイン間相互作用および立体配置の変化が、UHRF1 の複数のエピジェネティックマーカーの相乗的な認識を制御するという分子機構が示唆された。また、末武グループの研究結果から、UHRF1 の SRA ドメインは UHRF1 の RFTS ドメインに結合すること、さらに、その相互作用により Dnmt1 の活性抑制が解かれることがわかった。その RFTS ドメインはモノ-またはジ-ユビキチン化した H3 テールと強く結合する。今後は、これらの因子間の相互作用による活性化メカニズムを明らかにする。

白川グループは、細胞の分化状態を定量的に測定し、それとエピゲノム状態との相関を明らかにすることを目的として、ナノダイヤモンドの光検出磁気共鳴 (ODMR) を利用した、細胞膜や細胞骨格のダイナミクス (運動性) の計測を目指したナノジャイロスコープ顕微鏡を作製した。

<今年度で代表的な原著論文>

1. Minoshima M, Matsumoto T, and Kikuchi K. “Development of a Fluorogenic Probe Based on a DNA Staining Dye for Continuous Monitoring of the Histone Deacetylase Reaction.” *Anal. Chem.* 86(15):7925-7930, 2014 (DOI: 10.1021/ac501881s)
2. Shingo Sotoma, Yosuke Yoshinari, Ryuji Igarashi, Akiyoshi Yamazaki, Shige H. Yoshimura, Hidesato Tochio, Masahiro Shirakawa and Yoshie Harada, “Effective Production of Fluorescent Nanodiamond Containing Negatively-Charged Nitro-gen-Vacancy Center by Ion Irradiation.” *Diamond and Related Materials* 49 , pp.33-38 ,2014

(DOI:10.1016/j.diamond.2014.07.011)

3. S. Sotoma, K. Akagi, S. Hosokawa, R. Igarashi, H. Tochio, Y. Harada and M. Shirakawa, “Comprehensive and quantitative analysis for controlling the physical/chemical states and particle properties of nanodiamonds for biological applications”, RSC Adv., ,5, pp.13818–13827, (DOI: 10.1039/C4RA16482B)