

研究報告書

「ヒストン修飾の動態を可視化検出するための系の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 1 月～平成 27 年 3 月

研究者: 佐々木 和樹

1. 研究のねらい

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列によらない発現制御機構であり、主に DNA のメチル化やヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などの化学修飾がその中心を担っていると考えられています。個体内では、遺伝子情報は共通しているにもかかわらず、器官ごとに異なる蛋白質が発現しており、細胞の分化の際にエピジェネティックな変化が起きている、また、近年、精力的に研究されている細胞のリプログラミングの過程において、細胞を初期化するために、エピジェネティックな変化が起きていると考えられています。しかし、ダイナミックに動いているヒストン修飾の変化を評価する方法は、共通して解析のために細胞を破碎もしくは固定する必要があるため、エピジェネティクスの変化がいつ起きているのか、どのように起きているのかといった詳細な解析は、今まで行われてきませんでした。また、癌、神経変性疾患、生活習慣病などの疾患に伴って、エピジェネティクスの異常が観察されており、エピジェネティクスの異常は疾患の原因となり得ると考えられています。そのため、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤などエピジェネティックな変化を人為的に誘導する化合物は、治療薬として期待されており、すでに HDAC 阻害剤である SAHA は、2006 年に皮膚 T 細胞性リンパ腫 (CTCL) の治療薬として米国で承認されています。そのため、生きた細胞内でヒストン修飾の変化を追うことが可能な検出技術は、薬剤スクリーニングや薬剤の細胞内での作用機序を調べる上での有効なツールになると考えています。

ヒストン修飾を可視化検出するために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した蛍光プローブ「Histac」を開発し、生細胞内でのエピジェネティクスの変化をリアルタイムに解析することを可能にしました。この蛍光プローブ開発を発展させ、ヒストン修飾蛍光プローブのシリーズ化及びスクリーニング系への応用を行っていきます。

2. 研究成果

(1) 概要

生細胞内のヒストン修飾の動態をリアルタイムに可視化検出するために、蛍光プローブ「Histac」を開発しました。「Histac」は、黄色蛍光蛋白質 Venus、修飾ヒストン結合ドメイン、フレキシブルなリンカー、ヒストン、青色蛍光蛋白質 CFP を順に繋ぎ、ヒストン修飾の変化を CFP と Venus 間の FRET の変化によって検出する蛍光プローブで、ヒストン H4 の N 末端の 4 か所のリジン (K5、K8、K12、K16) のうち K5 と K8 のアセチル化を検出するために、BRDT のアセチル化リジン結合ドメインであるプロモドメインを用いています。この BRDT を他のヒストン修飾結合蛋白質の結合ドメインに換えることで他のヒストン修飾を検出する蛍光プローブに変更することが可能です。この原理を用いて、ヒストン修飾を検出する蛍光プローブのシリーズ化を行いました。BRD2 のプロモドメインを用いてヒストン H3K9/K14 のアセチル化、HP1 α のクロモ

ドメインを用いてヒストン H3K9 のトリメチル化の蛍光プローブを作製しました。

蛍光プローブを薬剤スクリーニングに応用するためには、定常的に蛍光プローブを発現する細胞を作製し、ハイスループットな測定系を構築する必要があります。そこで、定常的に蛍光プローブを発現する細胞の樹立を試みました。piggyBac のトランスポゾンを用い、HeLaS3 もしくは COS7 細胞に導入し、Venus の蛍光を指標にフローサイトメーターにより回収しました。Histac はヒストンを含む大きな蛋白質であるため、Histac の発現により細胞に異常がでないか確認した。細胞周期、遺伝子発現解析ともに異常がないことがわかりました。

(2) 詳細

研究テーマ A 「Histac」のシリーズ化

1. Histac-H3K9/K14ac の開発

染色体の転座によって NUT タンパク質との融合タンパク質 BRD4-NUT をつくり、NUT midline carcinoma (NMC) という致死性の高い悪性腫瘍を生じさせることが知られている BRD4 のプロモドメインをヒストン修飾結合ドメインに用いて、ヒストン H3 のアセチル化蛍光プローブを作製しました。各ドメインを入れ替えたプローブを 9 種類作製し、アセチル化誘導に対し、蛍光強度比変化が大きいものを探しました。アセチル化の誘導には、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を用いました。最も応答の大きかったものは、培地交換により TSA を除いても応答が戻らず、不可逆的なプローブだったため、再度、蛍光プローブのスクリーニングをし、可逆性のある蛍光プローブを見つけました。アセチル化サイトの置換によって、作製した蛍光プローブの応答がヒストン H3K9 または K14 がアセチル化したときに応答するプローブであることがわかり、Histac-H3K9/K14 と名付けました。Histac-H3K9/K14 はアセチル化依存的に FRET が解離する方向に構造変化する蛍光プローブであることがわかりました。最近、BRD4 阻害剤が強力な抗癌活性を有することが報告され、BRD4 は抗癌剤開発の新規標的分子として大変注目されています。そこで、Histac-H3K9/K14 を用いて、プロモドメイン阻害剤(+)-JQ1 の生細胞での評価を行い、プロモドメイン阻害剤の探索に用いることができることを示しました。

2. Hismet-H3K9me3 の開発

修飾ヒストン結合ドメインに、トリメチル化ヒストン H3K9 と特異的に結合する HP1 α を用いることで、ヒストン H3K9 のトリメチル化を認識する蛍光プローブ Hismet-H3K9me3 を作製しました。ヒストンメチル化酵素阻害剤を用いて、細胞内のこの蛍光プローブ内のヒストン H3 の脱メチルを誘導すると FRET が上昇する方向に構造変化する様子が観察できました。H3K9 以外のメチル化サイトのリジンアルギニンに置換してもヒストンメチル化酵素阻害剤処理による脱メチル化の応答が観察できることから、作製した蛍光プローブがヒストン H3K9 のメチル化反応特異的に応答していることがわかりました。ヒストンメチル化酵素阻害剤として Chaetocin があるが、Chaetocin は他のメチル化酵素阻害剤と同様に細胞毒性が強く、ヒストンメチル化阻害活性のみられる 24 時間の観察に細胞が耐えられなかったため、新規合成された Chaetocin 類縁体を用いてスクリーニングしたところ、細胞への毒性が低く、ヒストンメチル化酵素阻害活性を持つ化合物を見出しました。また、この蛍光メチル化プローブを用いて、細胞分裂の際のヒストンメチル化の増減を調べたところ、細胞分裂前期に急速な蛍光強度比の上

昇が見られ、分裂前中期で一度減少した後、分裂中期で一度下げどまり、分裂後期で再び減少し、分裂終期で間期と同じレベルに戻りました。作製したヒストン H3K9 メチル化プローブは、ヒストン H3K9me3 と HP1 α のクロモドメインとの結合に基づくものであり、この結合はメチル化サイトに隣接する H3S10 のリン酸化によって解離するため、分裂前中期での蛍光強度比の減少は H3S10 がリン酸化をされていく過程を示しています。蛍光プローブの応答が H3K9 のメチル化もしくは H3S10 のリン酸化の影響を除くために蛍光プローブ内のヒストン H3K9 をアルギニンに置換した K9R と、ヒストン H3 の 10 番目のセリンを置換した S10A、S10E を作製したが、どの変異体も HP1 α との結合能がなくなるため、分裂前中期に蛍光強度比が減少し、分裂終期に間期の値に戻りました。

研究テーマ B 蛍光プローブを定常的に発現する細胞の確立

蛍光プローブを薬剤スクリーニングに応用するためには、定常的に蛍光プローブを発現する細胞を作製し、ハイスループットな測定系を構築する必要があります。そこで、定常的に蛍光プローブを発現する細胞の樹立を試みました。これまで、CFPとYFPを用いたFRET型の蛍光プローブは、CFPとYFPの配列が似ているため相同組み換えを起こしてしまい、定常的に発現する細胞を作製することができませんでした。今回、piggyBacのトランスポゾンを用いて細胞に導入することによって、Histacが定常的に発現する細胞を樹立することができました。Histacを含むトランスポゾンベクターとトランスポゼーズを同時に細胞に導入した後、Venusの蛍光を指標にフローサイトメーターにより回収しました。ゲノムDNAのPCR解析から相同組み換えを起こしていないことを確認し、DNA染色試薬であるHoechst33342染色にて染色体異常がないことも確認し、さらに遺伝子発現解析から蛍光プローブを発現しても遺伝子発現異常がないことも確認しています。Venusの強度から蛍光プローブの発現量はG2/M期でやや上昇していることがわかりました。ウェスタンブロット解析からHistacは相同組み換えを起こしておらず、さらにTSAによってアセチル化を誘導されることがわかりました。また一過性にHistacを発現させたときと同様に、アセチル化誘導により蛍光強度比変化が起こることも確認しています。

3. 今後の展開

完成した蛍光プローブを用いて、筋肉細胞や神経細胞の分化過程でのヒストン修飾の変化を観察します。ヒストン修飾化状態が分化誘導に関与しているかを調べるため、分化誘導時のヒストン修飾状態変化の時間経過を詳細に解析します。蛍光プローブの発現量が異なる細胞間では、基質と修飾酵素及び脱修飾酵素の比が異なり、応答の速度と変化量が異なってしまうという問題点がありました。そのため、蛍光プローブを薬剤スクリーニングに応用するためにハイスループットな測定系を構築するには、定常的に蛍光プローブを発現する細胞を作製する必要があります。今回の成果として 蛍光プローブを定常的に発現する細胞を作製することに成功しました。この細胞を用いて化合物ライブラリーの生細胞内での評価を行っていきたいと考えています。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

申請した研究課題は、他のヒストン修飾を標的とする蛍光プローブの開発し、Histac をシリーズ化すること、アセチル化蛍光プローブ Histac の感度向上、蛍光プローブを用いたスクリーニング系の確立、局在マーカー蛋白質と Histac シリーズの同時観察、分化誘導・再生の際に細胞内で起きているヒストン H4 アセチル化の動態変化の観察、を挙げました。Histac のシリーズ化に関しては他のヒストンのアセチル化(H3K9/K14)及び、ヒストンのメチル化まで蛍光プローブを展開しました。感度向上とスクリーニング系の確立のための定常安定発現株の樹立ですが、蛍光プローブ内のリンカーの長さの調節と各ドメインの順列組合せを入れ替えたものを作製しましたが、劇的に応答を大きくすることができませんでした。しかし、従来できていなかった蛍光プローブを発現する定常発現細胞の樹立がトランスポゾンの系を用いることで可能になりました。作製した蛍光プローブの発現が核に一様に発現し、応答も局所的なものが観察できなかったため、局在マーカーとの共発現は実現できませんでした。

蛍光プローブの候補が多数あったため、マルチウェル対応の XY 電動顕微鏡の購入が、研究を遂行する上で大いに貢献しました。備品や消耗品の購入も効率よく執行していたと評価しています。修士学生 2 人との研究実施体制でしたが、蛍光プローブのセレクション及び検証を学生に任せ、申請者はその応用を分担しました。その成果としてヒストン H3 のアセチル化蛍光プローブに関しては BRD2 の阻害剤の評価系を作製でき、H3K9 トリメチル化プローブに関しては細胞分裂の際に、ヒストン H3 と HP1 の一過性の結合の上昇を観察することができました。

Histac を定常的に発現する細胞の作製に目途がついたことで、将来的には、シリーズ化した蛍光プローブを定常的に発現する細胞を用いて、ケミカルライブラリーをはじめとする大量の薬剤のスクリーニングや薬剤効果のモニタリングを行いたい。新規の治療薬の開発への一助となることを期待しています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

生細胞内でのエピジェネティックな変化をリアルタイムで解析できるヒストンH3アセチル化蛍光プローブ、ヒストンメチル化蛍光プローブを開発し、その有用性を確認した。トランスポゾンベクターを用いて組換えを克服し、蛍光プローブを安定に発現する細胞を樹立した。今までHistacをはじめ複数プローブのシリーズ化、スクリーニング系の確立などを試み、その結果、抗がん剤開発の新規標的分子探索プローブを開発するなど一定の成果を納められた。これらプローブはエピジェネティック創薬に応用できると思われる。今後ともエピジェネティクス医薬品の研究開発や基礎研究に役に立つ技術開発を引き続きお願いしたい。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **Sasaki K.**, Ito A., and Yoshida Y. Development of live-cell imaging probes for monitoring histone modifications. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, 20, 1887-1892

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

- ・ **佐々木和樹** ヒストン修飾の動態を可視化検出するための蛍光プローブの開発 第87回日本生化学会大会 2014年10月, 京都
- ・ **佐々木和樹**, 伊藤昭博, 吉田 稔 ヒストン H3 アセチル化蛍光プローブと BRD4 ブロモドメイン阻害剤評価系の開発 第18回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014年6月, 仙台
- ・ **佐々木和樹**, 鈴木律裕, 伊藤昭博, 新家一男, 袖岡幹子, 中尾洋一, 吉田 稔 Development of novel FRET-based fluorescent probes for visualizing histone methylation in living cells 第65回日本細胞生物学会大会, 2013年6月, 名古屋
- ・ **佐々木和樹**, 鈴木律裕, 伊藤昭博, 新家一男, 袖岡幹子, 中尾洋一, 吉田 稔 Development of FRET-based probe for imaging of histone H3 trimethylation in living cells 第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013年5月, 奈良

受賞

第18回日本がん分子標的治療学会学術集会 若手優秀演題賞

「ヒストン H3 アセチル化蛍光プローブと BRD4 ブロモドメイン阻害剤評価系の開発」

佐々木和樹

2014年6月27日

第4回 理研 研究奨励賞

Development of Imaging System for Epigenetics Dynamics

佐々木和樹

2013年3月14日

著作物

- ・ **Sasaki K.** and Yoshida M. Genetically Encoded FRET Indicators for Live-cell Imaging of Histone Acetylation, Fluorescent Protein-Based Biosensors: **Methods in Molecular Biology**, 1071: 151-161

- ・ 佐々木和樹, 吉田 稔 (2013) エピジェネティクスの可視化技術と創薬, **遺伝子医学MOOK**, 25: 266-270