

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：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
2. 研究開発課題名：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
3. 研究開発代表者： 白川 昌宏（京都大学大学院工学研究科）
4. 研究開発の成果

- ・ UHRF1, MBD4, TDG, 脱メチル化関連因子の構造機能解析

生化学的手法と X 線小角散乱を用いて、DNA 維持メチル化・受動的脱メチル化の中核因子である UHRF1 の機能ドメイン間のリンカー領域の Ser239 のリン酸化の機能解析を行った。その結果、Ser298 のリン酸化によるヒストン結合ドメインと DNA 結合ドメインの構造変化が UHRF1 のメチル化ヒストン H3 及び片鎖メチル化 DNA への結合モードを調節することが示された。これにより階層的な DNA メチル化・脱メチル化制御における UHRF1 の立体構造変換の役割が明らかになった。植物の MBD4 ホモログである Demeter による脱メチル化機構に注目し、その構造機能解析を行い、Demeter の安定で活性を持つ 700 アミノ酸の領域を同定した。この領域を用いて結晶化を行い、7Åまでの回折分解能を持つ結晶を得た。

- ・ダイヤモンド微粒子の調製、修飾法の確立・応用

本項目において、ビオチン化ナノダイヤモンドを用いたアビジン特異的なナノダイヤモンド標識技術、および Lifeact ペプチド表面修飾によるアクチン細胞骨格特異的なナノダイヤモンド標識技術の開発を行った。その結果、長分岐ポリグリセロールコートによる分子標識、ファロイジンに頼らない低毒性の分子標識法を確立することができた。またナノダイヤモンドのプラズマ照射による高輝度化技術の開発にも成功した。

- ・細胞粘弾性の計測

細胞膜粘弾性変化の計測を継続した。その結果、この変化はアクチン細胞骨格の秩序に帰着されるものと考えられたが、今後これを実証するために細胞内におけるアクチン標識を試みる予定である。

- ・DNA 損傷修復反応における 5hmC の役割の解明

5hmC 抗体による免疫染色を用いて、幹細胞と分化細胞での 5hmC の核内分布を高解像度顕微鏡で解析し、これまで全く知られていなかった、5hmC の DNA 修復反応における新規機能を発見するに至った。具体的には、下記の新規知見を明らかにした。

DNA 損傷箇所における 5hmC の生成には、HeLa 細胞では Tet2 のみが必須であることを明らかにした。

マウス Tet トリプルノックアウト細胞は、野生株と比べて、M 期の染色体分離の失敗が増加し、細胞の viability が下がることを示した。これは、Tet 酵素非存在化で、DNA 損傷の修復不足がゲノム不安定化に繋がることを示唆する。

加えて、脱メチル化機構を解析するためには、最初の産物である 5hmC を検出する必要があると考え、効率的な 5hmC 検出法を開発することを目的にした。そのため、酵素を用いる方法及び酸化剤を用いる方法と、genomic DNA への応用の検証、という 2 段階の実験を行った。

また、PYP タグと名付けたタグ蛋白質とメチル化 DNA 結合蛋白質 MBD1(1-112)の融合蛋白質を DNA 結合色素オキサゾールイエロー (YO) で標識することで、生細胞内でメチル化 DNA を特異的に認識し蛍光を発する小分子・ハイブリッドプローブの開発に成功した。