

## タンパク質ラベル化技術を応用したメチル化 DNA の可視化



技術解説

堀 雄一郎\*, 菊地 和也\*\*

Fluorescence Imaging of Methylated DNA Using Protein Labeling Technique

Key Words : PYP-tag, DNA-binding fluorogen, Hybrid Probe, Methylated DNA

## はじめに

DNAやヒストンの化学修飾は、クロマチン構造を変化させることにより、遺伝子発現を制御することが知られている<sup>1)</sup>。特に、DNAのメチル化は遺伝子発現を抑制する重要な化学修飾の一つである。この化学修飾は、DNAメチル基転移酵素であるDnmtによって触媒され、シトシンとグアニンが隣接した配列であるCpG配列に含まれるシトシンの5位に起こる<sup>2)</sup>(図1)。ゲノム上のシトシンが高レベルにメチル化されている領域は、ヘテロクロマチンと呼ばれ、凝縮したクロマチン構造を形成し、高度に遺伝子発現が抑制されている。そのメチル化レベルの異常は、遺伝子発現の異常をきたすうえに、ゲノムを不安定化し、様々な疾病に繋がることが報告されている<sup>3)</sup>。メチル化異常の代表的な疾病は癌であり、Dnmtの阻害剤は、癌治療の医薬品として現在用いられている<sup>4)</sup>。このように、DNAメチル

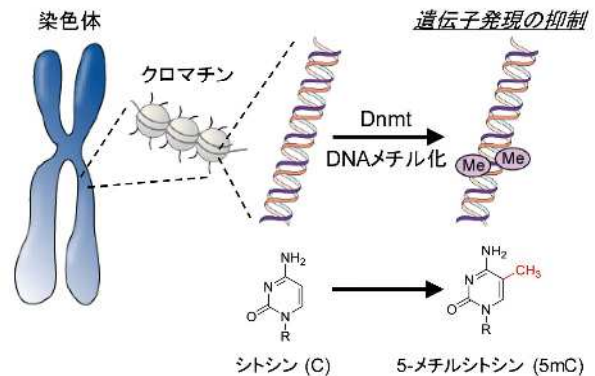


図1 DNAのシトシンのメチル化と遺伝子発現抑制。

化の関わる生命現象を明らかにすることは、生命科学のみならず、医学・創薬の観点からも極めて重要な課題である。

この課題に取り組むうえで、必須となるものが、5位がメチル化されたシトシン(5mC)を解析する手法である。これまでに、5mCを解析するために、バイサルファイトシーケンスと呼ばれるものや抗体を用いた手法が開発されてきた<sup>5)</sup>。これらの手法は、ゲノム配列中の5mCを同定、もしくはそのメチル化レベルを調べるものである。一方、これらの手法では、細胞を破碎する必要があるため、生きた細胞におけるメチル化DNAの動的挙動を追跡することはできない。生細胞で解析する手法としては、蛍光タンパク質を用いたものが報告されている。この手法では、メチル化DNAに結合するタンパク質ドメインであるMBDを蛍光タンパク質に融合させ、メチル化DNAに結合した融合タンパク質の局在を蛍光観測する<sup>6)</sup>。しかしながら、この手法では、遊離状態の融合タンパク質も蛍光を発するため、細胞から観測された蛍光がメチル化DNAに由来するかどうかは精密に判別できない。

そこで、著者らは、この問題を解決するために、



\* Yuichiro HORI

1976年12月生まれ  
京都大学 大学院薬学研究科博士課程  
(2004年)  
現在、大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 准教授 博士(薬学)  
ケミカルバイオロジー・蛍光イメージング  
TEL: 06-6879-7925  
FAX: 06-6879-7875  
E-mail: horiy@mls.eng.osaka-u.ac.jp



\*\* Kazuya KIKUCHI

1965年7月生まれ  
東京大学 大学院薬学系研究科博士課程  
(1994年)  
現在、大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 教授 博士(薬学)  
ケミカルバイオロジー  
TEL: 06-6879-7924  
FAX: 06-6879-7875  
E-mail: kkikuchi@mls.eng.osaka-u.ac.jp

メチル化DNAに結合すると蛍光強度が上昇する蛍光プローブを開発した<sup>7)</sup>。蛍光プローブとは、蛍光シグナルをもとにして、生体分子の細胞内局在や動態、または活性を可視化する分子のことをいう。開発した蛍光プローブは、遊離状態の蛍光強度が低く、メチル化DNAに結合したプローブの蛍光強度が高くなるため、蛍光が観測された細胞内部位にメチル化DNAが存在することが分かる。この蛍光プローブの開発の鍵となったのが、著者らがこれまでに開発してきたタンパク質ラベル化技術である。本稿では、最初に、このラベル化技術を紹介し、いかにして、メチル化DNAをイメージングする蛍光プローブを創り出したかを解説する。

### タグタンパク質を利用したタンパク質ラベル化技術

これまでの研究において、生細胞内の特定のタンパク質を蛍光プローブでラベル化し、その細胞内局在・動態をイメージングする技術を開発してきた<sup>8-10)</sup>。この技術では、ある特定の小分子リガンドと結合するタンパク質をタグとして用いる。このリガンドに蛍光色素を繋いだ蛍光プローブにより、タグタンパク質を細胞内で特異的に蛍光ラベル化できる。このとき、遺伝子工学により、タグタンパク質に標的タンパク質を融合させておけば、標的タンパク質を生細胞内で可視化することが可能となる。

著者らは、タグタンパク質として、独自にPYP (Photoactive Yellow Protein) を見出し、タンパク質ラベル化技術を開発してきた (図2a)。PYPは、紅色硫黄細菌由来である *Halorhodospira halophila* 由来の125アミノ酸 (14 kDa) からなる小タンパク質で、桂皮酸やクマリンの誘導体をリガンドとして結合することが知られている (図2b)。これらのリガンドに蛍光色素を繋いだり、リガンドそのものを改変した様々な蛍光プローブを開発してきた。開発した蛍光プローブは、細胞膜や細胞内部に発現するタンパク質を迅速に (数分~数十分) ラベル化することができる。また、プローブは、ラベル化前は非蛍光性であり、ラベル化に伴い蛍光強度が上昇するため、遊離プローブを洗浄除去しなくても、高コントラストにタンパク質をイメージングできる。更に、種々の波長の蛍光 (シアン~近赤外領域) を放つ蛍光プローブの開発にも成功しており、他の細胞染色色素と併用しマルチカラーイメージングもできるこ

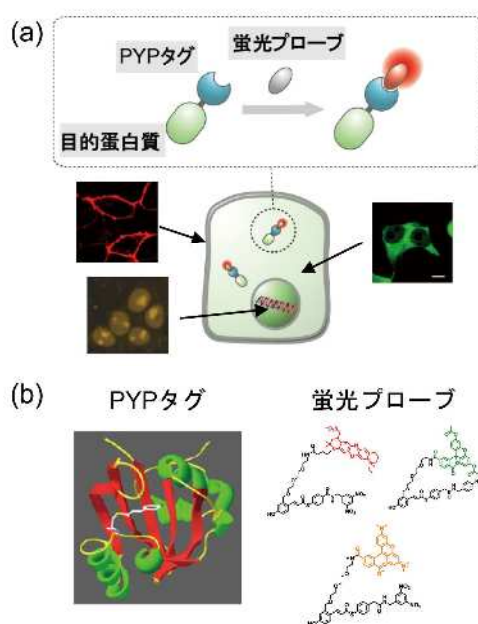


図2 タグタンパク質と合成蛍光プローブを利用したタンパク質ラベル化技術。(a) PYPタグラベル化技術の原理と蛍光イメージング。(b) PYPタグの立体構造と種々の蛍光プローブの化学構造。

とを示してきた。このように、このPYPタグラベル化技術は、生きた細胞内で種々の合成色素を容易にタンパク質に導入することを可能にした。

### ラベル化技術を利用したハイブリッドプローブの設計

メチル化DNAを細胞内で可視化する蛍光プローブの開発には、二つの要素が必要となる。一つは、メチル化DNAに特異的に結合する分子である。これには、前述の通り、メチル化DNA結合タンパク質であるMBDを用いればよい。もう一つは、DNAに結合したとき、蛍光強度を上昇させる分子である。分子・細胞生物学の研究でよく用いられる蛍光タンパク質の多くは、常に蛍光を発しており、DNAに結合したとき蛍光強度を上昇させるように改変するのは容易な話ではない。一方、合成蛍光色素であれば、DNAに結合したときのみ蛍光を発する核酸結合色素はよく知られている。このため、MBDと核酸結合色素を組み合わせて用いれば、メチル化DNAに結合し蛍光を増大させるプローブを開発できるのではないかと期待した。このとき、必須となる技術が、色素をタンパク質に導入するためのラベル化技術であり、PYPタグラベル化技術を応用しようと考えたわけである。

そこで、次のように、メチル化DNAの検出原理

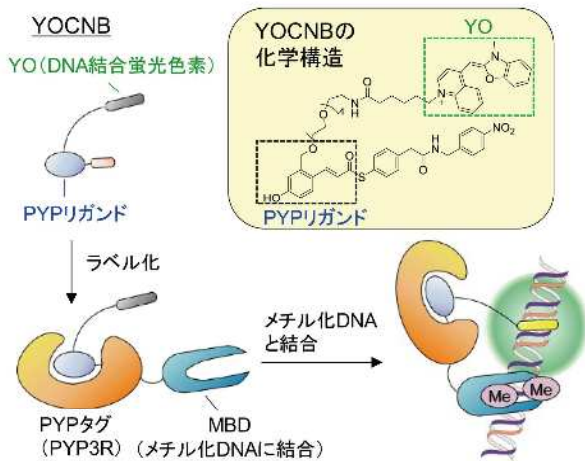


図3 ハイブリッドプローブによるメチル化DNAの蛍光検出の原理。

を考案した (図3)。まず、PYP タグの桂皮酸リガンドに核酸結合色素をつないだラベル化分子を合成する。次に、MBD に PYP タグを融合させ、そのラベル化分子と反応させることで、MBD 融合タンパク質に核酸結合色素を結合させる。この結果、合成分子とタンパク質からなるハイブリッドプローブを構築する。ラベル化分子及びハイブリッドプローブに組込まれた色素自体は、DNA に結合していない状態において蛍光が抑制されている。一方、MBD 部位がメチル化 DNA に結合すると、色素は DNA の近傍に配置され、その近接効果により、色素が DNA に結合し、蛍光強度を上昇させる。このとき、重要なポイントは、色素が MBD によらず、単独でメチル化されていない DNA に非特異的に結合しないようにすることである。そこで、これを防ぐために、敢えて DNA 結合親和性の低い色素を選択する。本研究では、オキサザールイエロー (YO) という低親和性の DNA 結合色素<sup>11)</sup>を用いることで、MBD とメチル化 DNA の結合により、YO が DNA に近づいたときのみ DNA に強く結合することを期待した。YO を桂皮酸リガンドに繋いだラベル化分子は、YOCNB と名付け合成した。

### ハイブリッドプローブの構築とメチル化 DNA への結合

ハイブリッドプローブを用いる実験を行う過程で、野生型の PYP タグをそのまま用いる場合、問題が生じることが判明した。それは、PYP タグが DNA

との相互作用を低下させることであった。PYP タグは、等電点が4.7の酸性タンパク質であり、生理的条件下では、負に帯電している。一方、標的であるメチル化 DNA もポリリン酸のポリマーであるから負に帯電しており、PYP タグとの間で静電反発が起こることが分かった。そこで、以前の研究で、PYP タグ表面にある3つの酸性アミノ酸を全て Arg に変異することで、中性の等電点を持つようになった変異体 PYP3R を開発しており<sup>9)</sup>、野生型 PYP タグの代わりにその変異体を用いることにした。

まず、PYP3R と MBD の融合タンパク質 PYP3R-MBD が YOCNB と結合しハイブリッドプローブを構築できるかを検証した。YOCNB のリガンド部分である桂皮酸誘導体は、PYP と結合すると 446 nm 付近の吸光度が上昇することが知られている。そこで、実際に PYP3R-MBD と YOCNB を反応させると、該当する波長領域に吸光度の上昇が観測された。このことから、PYP3R-MBD と YOCNB は結合しハイブリッドプローブが構築されることが示された。

次に、ハイブリッドプローブのメチル化 DNA への結合選択性を評価するために、ゲルシフトアッセイを行った。このアッセイ法は、タンパク質と DNA の相互作用を評価するもので、タンパク質と DNA を反応させゲル電気泳動を行うと、それらの相互作用がある場合は、DNA の移動度が低下し、ゲル上部にタンパク質-DNA 複合体を示すバンドが検出される。そこで、ハイブリッドプローブとメチル化 DNA または非メチル化 DNA を反応させ、ゲルシフトアッセイを行った (図4a)。その結果、メチル化 DNA と反応させたとき、ハイブリッドプローブとの複合体を示すバンドが明確に観測されたのに対し、非メチル化 DNA に対しては強度の強いバ

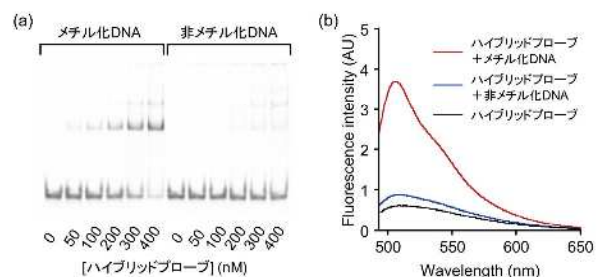


図4 ハイブリッドプローブのメチル化DNAとの結合と蛍光測定。(a) ハイブリッドプローブのメチル化DNAへの選択的結合。(b) ハイブリッドプローブによるメチル化DNAの蛍光検出。

ンドは確認できなかった。このことから、ハイブリッドプローブは、メチル化DNAに対し選択的に結合することが示された。

ハイブリッドプローブが、メチル化DNAとの結合の結果、蛍光強度を増大させるかを検証した。ハイブリッドプローブは、DNA非存在下や、非メチル化DNAと反応させたときでは、強い蛍光は観測されなかったのに対し、メチル化DNAと反応させたときは、蛍光強度の大きな上昇が観測された(図4b)。このことから、ハイブリッドプローブは、試験管レベルでは、メチル化DNAを蛍光検出することができることが示された。

### メチル化DNAの生細胞蛍光イメージング

メチル化DNAの生細胞における動態を可視化するには、当たり前のことであるが、ハイブリッドプローブが細胞内になければいけない。しかしながら、ハイブリッドプローブは、タンパク質を含むために、細胞膜透過性がなく、試験管でハイブリッドプローブを作り細胞に添加するわけにはいかない。このため、細胞内でタンパク質部分であるPYP3R-MBDを発現させ、合成分子であるYOCNBを細胞の培地に添加し細胞膜を透過させることで、細胞内でYOCNBとPYP3R-MBDを結合させハイブリッドプローブを構築する必要がある。

実際に、PYP3R-MBDの遺伝子をNIH3T3細胞に導入し発現させ、YOCNBを添加したところ、細胞核内から複数の特徴的な蛍光輝点が観測された(図5a)。このことからYOCNBは、少なくとも細胞膜を透過し核内に存在することは判明した。これに対し、PYP3Rのみの遺伝子を導入した細胞や、遺伝子発現をしていない細胞では、明確な蛍光シグナルは得られなかった。これらの結果は、PYP3R-MBD発現細胞の核内においてみられた蛍光輝点がメチル化DNAに由来することを示唆している。このことの実証を得るために、DNAのメチル化を阻害する試薬である5-azadCで細胞を処理し、蛍光シグナルがどのように変化するかを調べた。5-azadCは、DNA複製時にシチジンの代わりにDNAに取り込まれ、Dnmtに結合しDnmtのメチル化活性を阻害することが知られている<sup>12)</sup>。そこで、PYP3R-MBDの遺伝子を導入した細胞に対し5-azadCを添加・インキュベートすることでDNAのメチル化を阻害し、

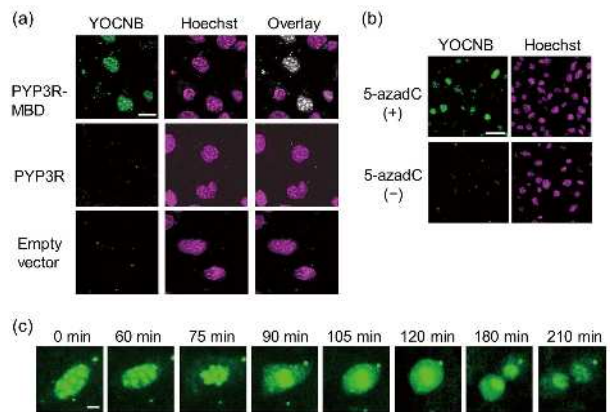


図5 ハイブリッドプローブを用いたメチル化DNAの生細胞蛍光イメージング。(a) 各種遺伝子 (PYP3R-MBD、PYP3R、Empty vector) 導入細胞へのYOCNBの添加とイメージング。ハイブリッドプローブの蛍光は緑色で表示している。Hoechstは核を染色する蛍光色素であり、マゼンタ色で表示している。Overlay画像では、Hoechstとハイブリッドプローブの蛍光が重なっている部位は白く表示している。Scale bar: 20 $\mu$ m。(b) 5-azadC処理によるハイブリッドプローブの蛍光への影響。Scale bar: 20 $\mu$ m。(c) 細胞分裂過程におけるメチル化DNAの動態の可視化。Scale bar: 5 $\mu$ m。

その後、YOCNBを添加して顕微鏡観察を行ったところ、蛍光シグナルが大きく減少することが分かった(図5b)。以上の結果から、5-azadC未処理のPYP3R-MBD発現細胞の核内に観測された蛍光シグナルは、メチル化DNAの局在を示していることが示された。すなわち、細胞内でYOCNBはPYP3R-MBDと結合することでハイブリッドプローブを形成し、メチル化DNAに結合して蛍光シグナルを発したといえる。

更に、5-azadCの添加濃度に応じて、蛍光シグナルが減少することが分かった。興味深いことに、5-azadCで処理した細胞を破碎し抗体を用いてメチル化DNAを定量すると、イメージングで得られた蛍光シグナルの強度と相関することが分かった。すなわち、イメージング画像から、メチル化DNAの局在だけではなく、DNAのメチル化レベルを判別できることが分かったわけである。このことは、細胞が分裂、分化、もしくは異常化する過程で、細胞核のDNAがどこでどれだけメチル化されるかを、生きた細胞で経時的かつリアルタイムで明らかにできることを意味しており、極めて有用な情報となる。前述したように、メチル化DNAの生細胞蛍光イメージングには蛍光タンパク質とMBDを融合させたタンパク質プローブが用いられてきた。そこで、ハイブリッドプローブとの性能比較を目的として、タ

ンパク質プローブの蛍光シグナルが5-azadCの処理によって、どのように変化するかを検証した。まず、蛍光タンパク質の一種であるEGFPとMBDを融合させたEGFP-MBDの遺伝子を、ハイブリッドプローブの時と同様にNIH3T3細胞に導入し発現させた。その結果、ハイブリッドプローブと同様に、核内から複数の蛍光輝点を確認された。一方、5-azadC処理を行った細胞で同様のイメージングを行ったところ、ハイブリッドプローブとは異なり、核内の蛍光は消失しなかった。これらの結果から、タンパク質プローブでは、蛍光シグナルが必ずしもメチル化DNAの局在を反映しないと考えられ、ハイブリッドプローブの優位性が確認された。

最後に、細胞分裂中におけるメチル化DNAの動態を可視化できるかを検証した。細胞分裂過程を可視化するには比較的長時間の細胞の観測が必要となり、YOCNBの添加やPYP3R-MBDの遺伝子発現そのものが、細胞に毒性を示すことは問題である。そこで、細胞の生存・増殖率を指標として、細胞毒性を検証したところ、YOCNBやPYP3R-MBDによる影響は確認されなかった。そこで、通常のイメージング実験と同様に、PYP3R-MBD遺伝子をNIH3T3細胞に導入し、YOCNBを添加後、細胞分裂過程における蛍光シグナルの経時変化を観測した。その結果、最初に確認された複数の蛍光輝点が徐々に細胞中央に凝縮し、やがて、それらが分離し、細胞分裂が起こる様子が観測された(図5c)。このように、ハイブリッドプローブを用いることで、メチル化DNAのダイナミックな動きをイメージングできた。

### おわりに

本研究では、合成蛍光色素とタンパク質からなるハイブリッドプローブを細胞内で構築することで、メチル化DNAを生きた細胞内で蛍光イメージングすることに成功した。更に、その蛍光シグナルは、DNAメチル化レベルと相関するため、定量的な評価が可能である。また、ダイナミックなメチル化DNAの動態を比較的長時間に渡って観測できることも明らかにした。このハイブリッドプローブの強みは、合成分子とタンパク質の利点を活用することができることにある。合成分子は、メチル化DNAを認識するような特異性を持つように設計するのは困難であるが、DNAに結合すると光る、というよ

うなスイッチ機能には長けている。これに対し、タンパク質の場合、このようなスイッチ機能をデザインするのは容易なことではないが、標的分子に対して高い特異性を持つようなものが天然にあり、それをそのまま利用できる。このように、合成分子のスイッチ機能とタンパク質の特異性を併せ持つハイブリッドプローブによって、これまで精密に見ることができなかった生体分子や生命現象が可視化できるようになる。更に言えば、ハイブリッドプローブの応用は、メチル化DNA以外のものも標的分子となりえる。例えば、メチル化RNAがその一例である。近年、RNAのメチル化も生体機能制御において極めて重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。今回のMBDをメチル化RNA結合タンパク質に変えれば、RNAのメチル化もイメージングできるようになると期待される。このように、ハイブリッドプローブの設計概念は、他の生体分子にも拡張可能であり、様々な生命現象を可視化するうえで、今後の益々の発展が期待される。

### 参考文献

- 1) Rothbart, S. B.; Strahl, B. D. Interpreting the Language of Histone and DNA Modifications. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014, 1839, 627-643.
- 2) Schübeler, D. Function and Information Content of DNA Methylation. *Nature* 2015, 517, 321-326.
- 3) Ptak, C.; Petronis, A. Epigenetics and Complex Disease: from Etiology to New Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2008, 48, 257-276.
- 4) Zhao, L.; Duan, Y. T.; Lu, P.; Zhang, Z. J.; Zheng, X. K.; Wang, J. L.; Feng, W. S. Epigenetic Targets and Their Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 2018, 18, 2395-2419.
- 5) Chatterjee, A.; Rodger, E. J.; Morison, I. M.; Eccles, M. R.; Stockwell, P. A. Tools and Strategies for Analysis of Genome-Wide and Gene-Specific DNA Methylation Patterns. *Methods Mol. Biol.* 2017, 1537, 249-277.
- 6) Yamagata, K. DNA Methylation Profiling Using Live-Cell Imaging. *Methods* 2010, 52, 259-266.
- 7) Hori, Y.; Otomura, N.; Nishida, A.; Nishiura, M.;

- Umeno, M.; Suetake, I.; Kikuchi, K. Synthetic-Molecule/Protein Hybrid Probe with Fluorogenic Switch for Live-Cell Imaging of DNA Methylation. *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 1686–1690.
- 8) Hori, Y.; Kikuchi, K. Protein Labeling with Fluorogenic Probes for No-Wash Live-Cell Imaging of Proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17, 644–650.
- 9) Hori, Y.; Nakaki, K.; Sato, M.; Mizukami, S.; Kikuchi, K. Development of Protein-Labeling Probes with a Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association for No-Wash Live-Cell Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 5611–5614.
- 10) Hirayama, S.; Hori, Y.; Benedek, Z.; Suzuki, T.; Kikuchi, K. Fluorogenic Probes Reveal a Role of GLUT4 N-Glycosylation in Intracellular Trafficking. *Nat. Chem. Biol.* 2016, 12, 853–859.
- 11) Furstenberg, A.; Deligeorgiev, T. G.; Gadjev, N. I.; Vasilev, A. A.; Vauthey, E. Structure-Fluorescence Contrast Relationship in Cyanine DNA Intercalators: Toward Rational Dye Design. *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 8600–8609.
- 12) Stresemann, C.; Lyko, F. Modes of Action of the DNA Methyltransferase Inhibitors Azacytidine and Decitabine. *Int. J. Cancer* 2008, 123, 8–13.

