

H3K27me3、Lamin A/C、DNAの局在の3D超解像イメージング

細胞のゲノムDNAに巻きつかれるヒストン分子は、メチル化、アセチル化などの化学修飾を受け、遺伝子発現の制御に影響を与える。従って、増殖細胞において、分裂を経た細胞が元の細胞と同じ形質を現すには、DNA複製時に、DNAの状態だけでなく、ヒストンの化学修飾状態についても正確に複製されることが必要と考えられる。しかし、その分子メカニズムに関しては未解明な点が多い。

本アプリケーションノートでは、北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室の及川司博士（分子生物学）により、がん抑制遺伝子産物p53の欠失時に、ヌクレオソーム構造（ヒストン分子にDNAが巻きついた構造）の複製期において、細胞核内メチル化ヒストンH3K27me3、核膜分子Lamin A/C、DNAがどのような位置関係にあるかを、超解像顕微鏡N-SIMを用いてイメージングした例を紹介する。

細胞核内メチル化ヒストンの動態解析

DNAとヒストン複合体からなるヌクレオソーム構造の複製には、親鎖由来ヒストンの再利用と、これを鋳型とした新規合成ヒストンへの化学修飾が必要であると考えられる。転写抑制性ヒストン修飾（27番目のリジン残基にメチル基を3つ持つヒストンH3：H3K27me3）の維持や遷移には、Polycomb groupタンパク複合体（PRC2）の活性サブユニットであるEZH2と、がん抑制遺伝子産物p53との競合的な制御が関与することを、及川博士は解明した（Oikawa et al., *Sci. Rep.* 2018）。また、その分子メカニズムの詳細について解析する過程で、複製期に細胞質で新規に合成され、核膜を通過して核内に輸送されるヒストンH3.1バリエーションが核内で他のヒストン分子と複合体を形成する際に、p53とEZH2による競合が起こることが示唆された。博士は、複製期のヒストンメチル化動態を明らかにすることで、細胞分裂に伴う細胞形質の維持と遷移のメカニズム解明を目指している。

N-SIMを用いた細胞内共局在の3D超解像イメージング

p53を欠失すると、複製期にH3K27me3が核膜付近に偏在することは、共焦点観察像により判明している。このときH3K27me3が核膜をはさんで細胞質側、核内部側のどちら側にあるのか、また核内部側であればLamin A/Cと接しているのか、DNAと共局在しているのかを解明するため、3次元超解像観察の可能なN-SIMを使用し、H3K27me3、核膜分子Lamin A/C、DNAの正確な位置関係を取得した。

DNAと共局在しないH3K27me3を可視化

取得した超解像画像により、p53を欠失すると複製期にH3K27me3は核膜裏打ち分子Lamin A/Cと核の内側で近

接する一方、DNAとは共局在しない部分があることが認められた（図1）。

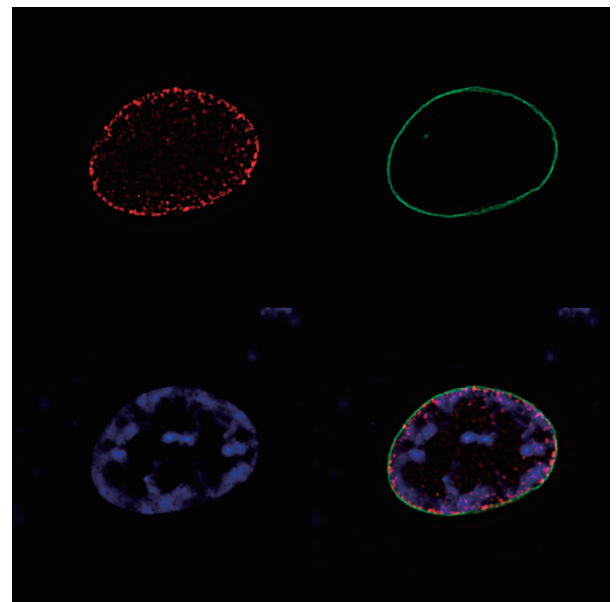


図1. p53をRNAiによりノックダウンした、野生型p53を持つヒト肺がん細胞株A549のN-SIM画像

赤：H3K27me3、緑：Lamin A/C、青：DNA

抗体：anti-H3K27me3 (Cell Signaling, rabbit monoclonal, #9733), anti-Lamin A/C (Cell Signaling, mouse monoclonal, #4777), anti-Lamin B1 (Santa Cruz, mouse monoclonal, #365214), TO-PRO-3 Iodide (for DNA stain, Thermo Fisher Scientific, #T3605)

測定条件：PFA固定サンプルを免疫染色後、Prolong Diamond (Thermo Fisher Scientific)により包埋

対物レンズ倍率：100X、取得モード：3D-SIMモード（Zスタック）

画像ご提供：北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室 及川司先生（北海道大学ニコンイメージングセンターにて画像取得）

これにより、核膜に偏在するH3K27me3の実態として、以下の可能性が示唆された。

(1) 複製期に細胞質で合成されたヒストンH3.1バリエントが核膜を通過し、核内部でヌクレオソームを形成する以前にK27-トリメチル化されたものである。

(2) 複製期に分解され、再編成される途上のヌクレオソームに含まれるH3K27me3が、なんらかの理由で核膜付近にトラップされたものである。

その後、Proximity ligation assay (PLA) とN-SIMを組み合わせることで解析を行い、H3K27me3とLamin A/Cの近接が、別の核膜裏打ち分子Lamin B1上で起きていることを確認した(図2)。

核膜に偏在するH3K27me3の実態に迫る

さらに、H3K27me3およびこれと複合体を形成する他のヒストン分子、並びにEZH2の分子的近接を、PLAを用いて可視化し、N-SIMで核膜との位置関係を解析した結果、核膜のH3K27me3の少なくとも一部は他のヒストン分子と複合体を形成せず、異所的にEZH2によるメチル化を受けていることが示唆された。これにより、核膜に偏在するH3K27me3の実態として、上記(1)である可能性が示唆された。

本研究を実施する上で、核膜近傍という微小領域における分子の位置関係や近接状態を知るためには、最低でも数百ナノメートルの分解能が必要であった。N-SIMにより、共焦点顕微鏡と同様の簡易な手順で試料の調製から観察までが可能でありながら、XY方向だけでなくZ方向にも数百ナノメートルの高分解能が得られた。

製品情報

超解像顕微鏡 N-SIM S

構造化照明顕微鏡法(SIM)により、従来の光学顕微鏡の約2倍の解像度で標本の微細構造を取得可能。広視野設計により、神経細胞などの広域画像も高スループットで取得できます。

- ・ 水平解像度：115 nm (3D-SIM モード)、86 nm (TIRF-SIM モード)
- ・ Z軸方向解像度：269 nm (3D-SIM モード)
- ・ 視野サイズ：最大66 μm \times 66 μm (100X対物レンズ使用時)

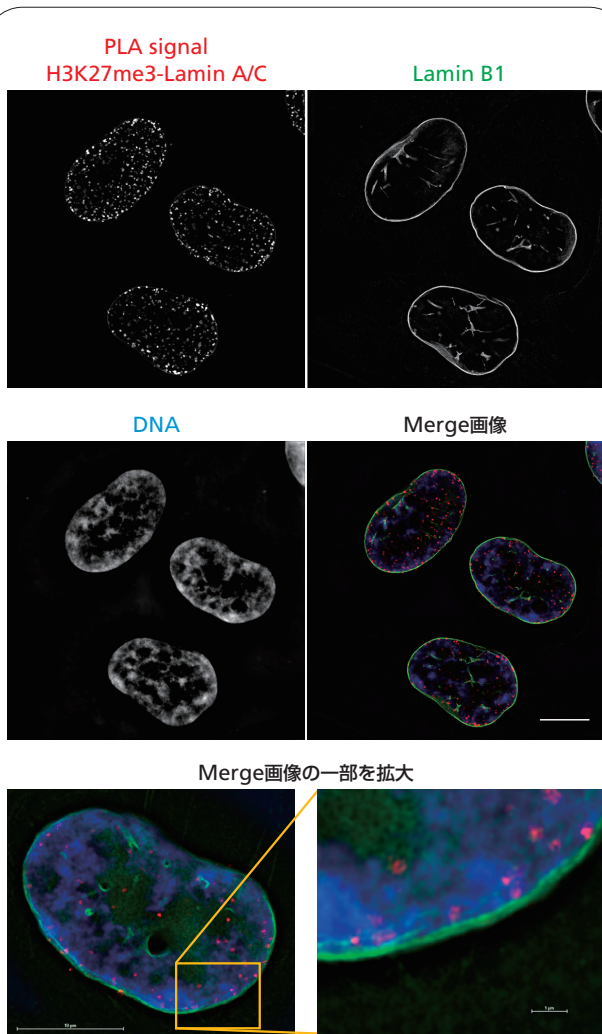
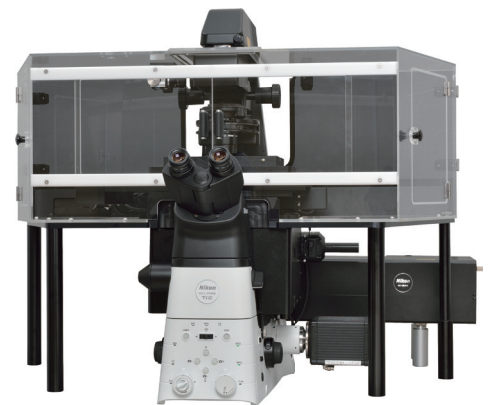


図2. p53欠失ヒト肺がん細胞株H1299

抗体：anti-H3K27me3 (Cell Signaling, rabbit monoclonal, #9733), anti-Lamin A/C (Cell Signaling, mouse monoclonal, #4777), anti-Lamin B1 (Santa Cruz, mouse monoclonal, #365214), TO-PRO-3 Iodide (for DNA stain, Thermo Fisher Scientific, #T3605)

測定条件：PFA固定サンプルを免疫染色後、Prolong Diamond (Thermo Fisher Scientific)により包埋

対物レンズ倍率：100X、取得モード：3D-SIMモード (Zスタック)

画像ご提供：北海道大学大学院医学研究院分子生物学教室 及川司先生 (北海道大学ニコンイメージングセンターにて画像取得)