

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20114007

研究課題名（和文） 発生・分化におけるクロマチン高次構造の解析

研究課題名（英文） Analysis of chromatin structure changes during differentiation.

研究代表者

末盛 博文（SUEMORI HIROFUMI）

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：90261198

研究成果の概要（和文）：

初期発生の過程での細胞分化における高次遺伝子発現制御機構の解明を目的とし、多能性幹細胞の分化誘導技術を駆使し分化過程でのクロマチン構造の変化の可視化を可能に出来るシステムの開発を進めた。またマウス受精卵の卵割過程をライブセルイメージング技術を用いて観察し、発生メカニズムの解明を行った。これらの研究成果は論文発表のほか新聞紙上に取り上げられるなど注目されている。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate molecular mechanisms of gene expression regulation in cell differentiation during early development of mammals, we tried to establish new visualizing system of changes in chromatin structure in combination with directed induction of differentiation from human pluripotent stem cells. We also analyzed early cleavage stage embryo by using live cell imaging system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	19,000,000	5,700,000	24,700,000
21年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
22年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
23年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
24年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
総計	87,000,000	26,100,000	113,100,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：細胞分化、多能性幹細胞、遺伝子発現、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

発生分化における遺伝子発現の時空間的変化がゲノムのDNA塩基配列情報だけではなく、クロマチン構造や染色体の高次構造の変化によっても制御されると考えられ始めていた。このような核内高次構造が作り出す「場」とその変化が、哺乳動物の発生分化においてどのような機能を有するのかを、遺伝子発現制御機構としての観点から解析をお

こなうことが必要とされていた。このころから急速にすすんできた、高精度の分化誘導技術を応用し、クロマチン高次構造とその機能が細胞分化過程でどのように変化しているのかを明らかにすることが出来るようになって期待されており、このような核内高次構造が形成する「場」が遺伝情報の機能発現にどのように関与しているのかは、それまでの研究でもほとんど解明されていなかった、あ

らたな学術領域の形成が期待されていた。

2. 研究の目的

遺伝子発現がゲノムのDNA塩基配列情報だけではなく、ヒストンのメチル化アセチル化などの修飾によるクロマチン構造、さらにはより広範な染色体領域の高次構造の変化によっても制御されていることが明らかにされている。これらは、本領域での中心課題である遺伝情報場の一つの側面と言えるものであり、このようなクロマチン高次構造が核内に作り出す「場」とその変化は、哺乳動物の発生分化においても遺伝子発現制御機構として重要な機能を果たしていると考えられる。初期発生の過程での細胞分化における遺伝情報「場」の機能を明らかにするために、ES細胞を用いて、クロマチン高次構造とその機能を解析する。申請者は、これまでにES細胞での遺伝子発現プロファイル解析や、ゲノムワイドのDNAメチル化状態の解析を行い、本研究に必要となる基礎データを蓄積している。また、これに基づきヒストン修飾に関連した遺伝子の未分化性維持における機能を明らかにしている。またES細胞から特定の胚葉への分化を効率よく制御する方法を確立している。このような成果をベースとして、クロマチン高次構造が細胞分化の過程でどのように変化し、どのように機能しているかを明らかにすることを目的とする。本研究は、領域の他の研究者との緊密な連携のもと実施し、最終的には、遺伝子発現制御機構という枠組みを越えて、「クロマチン高次構造それ自体が、情報の伝達や機能発現に関与する」という概念の創出をめざすことを目的とした。

3. 研究の方法

クロマチン高次構造の構築に関連する、ヒストンのメチル化、アセチル化状態などを未分化細胞と分化細胞で比較し、さらに遺伝子発現プロファイルやゲノムDNAのメチル化状態とつぎあわせることで、実際にクロマチン高次構造が遺伝子発現制御に機能していると予測されるゲノム領域を抽出する。そのようなヒストン修飾とゲノム領域について、細胞分化過程での動態を解析し、その機能を分析する。

また、細胞分化の過程でヒストン修飾の核内での局在がどのように変化しているか、また個々の染色体が核内でどのような領域を占有しているかを、生細胞イメージング技術や1分子イメージング技術を応用して解析できれば、クロマチン高次構造の空間配置とその経時変化を従来にない時空間分解能で明らかにできると期待される。新たに山縣を分担者に加え、ヒストン修飾やヒストンバリエーションなど遺伝情報場の構築に関与する因子の発生・分化に伴う挙動の変化を、初期胚を用いてライブイメージングの手法で察・解

析を行う。

4. 研究成果

その機能が細胞分化過程でどのように変化しているのかを明らかにするため、ヒストン修飾やクロマチン構造の構築などに関連する因子の発現変化をより鋭敏に検出することが必要である。このような分化過程での遺伝情報場の変化を解析するため、まず特定の種類の細胞を効率よく分化誘導する方法を確立した(図1)。これにより未分化ヒトES細胞から、中胚葉の特定領域を精度良く分化誘導することが可能になった。さらに、このヒトES細胞から中胚葉性細胞への細胞分化を効率よく誘導するシステムを利用し、この過程でクロマチン高次構造の構築に関連していると考えられるクロマチンリモデリングやヒストン修飾に関わる遺伝子の発現を詳細に解析した。マイクロレイ解析とあわせて、約200のクロマチン高次構造の構築に関連する遺伝子についてリアルタイムPCRを行った。これにより精度良く関連する遺伝子の発現を解析することができた。解析した遺伝子の中から、その発現が分化誘導前後や分化時間の経過に伴い変化するものを抽出した。研究開始当初は相当数の遺伝子に発現変化が見られると見ていたが、実際には両方の解析で2倍以上の発現変動が認められた遺伝子は比較的少数であった。特異的分化誘導方を利用して単離したクロマチンリモデリング因子など核内構造の変化に関連すると考えられる遺伝子群について、その機能の解析をすすめている。また、特定のクロマチン構造に関連すると考えられるヒストンバリエーションについて、その局在を生細胞で観察するために、GFP等の蛍光蛋白質との融合蛋白質を発現するベクターを構築、ES細胞に導入しこのヒストンバリエーションの挙動をライブイメージングできると考えられる細胞系を確立した。

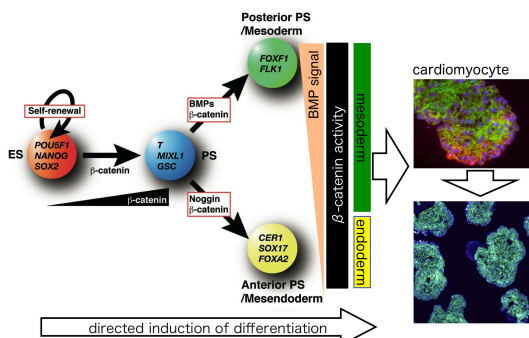


図1

研究期間の前半までに実施した核内構造の変化に関連すると考えられる遺伝子群について、siRNAを用いた阻害実験により、未分化細胞の維持および細胞分化に及ぼす影響

について解析をおこなうとともに、クロマチン構造の生細胞での観察するためにヒストンバリエーション蛍光蛋白質を導入したES細胞を作成している。この系を用いて、細胞分化過程での変化をより詳細に解析するためにすでに高効率での分化誘導に成功している、心筋分化系をモデルに解析を進めた。より精度良く心筋分化をモニタリングするため心筋分化初期より発現する心筋マーカー遺伝子に蛍光蛋白をノックイン (KI) した細胞を用いることとした。KI細胞はこれまでに開発した分化誘導法により効率良く心筋に分化するとともにその動態を蛍光観察により追跡することが可能となった(図2)。このシステムを用いてクロマチンリモデリング因子について siRNA などを用いた阻害や強制発現による機能解析を進めることができ

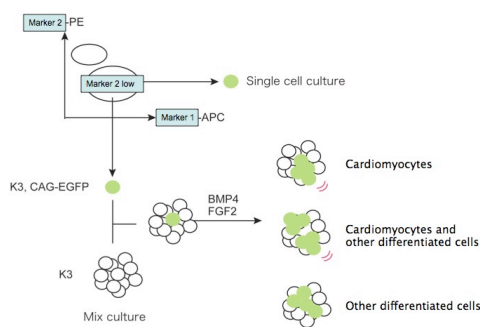


図 2

ると考えられる。

また研究分担者の山縣は以下のような成果をあげた。

着床前初期胚発生では、さまざまな現象が適切な場所・タイミングで起き、かつそれらが互いに原因と結果という関係で厳密につながることではじめて胚が最終的な個体発生へ至ると考えられる。われわれはこれまで独自に開発したライブセルイメージング技術を用いて、高齢マウス由来胚や体細胞クローン胚など、種々の摂動を与えた胚について、特に卵割過程に着目しながら観察してきた。その経験から、意外にも初期胚は上述のような現象すべてが画一的かつ決定論的に進んでいくわけではなく、その摂動に対する応答はロバストであり、かつ胚ごとに実に「ばらばら」であるという印象を持つにいたった。そこで本研究では、まずは核内外をとりまくさまざまな現象について、体細胞クローンなどの摂動に対する応答を単一胚ごとに定量化する系を確立する。その後、相関解析などの統計的手法を用いて、非摂動胚との相違について平均値や分散に着目しながら記述し、そこから新たな知見を得ることを目的としている。

2011年度は、初期胚発生における核内現象の一つとして、体細胞クローン胚でのリプログラミングに着目し、特にヒストン修飾変化を

定量化する試みを行った。プローブには、本領域公募班の一人である大阪大学木村宏博士らの作製したアセチル化ヒストン H3K9 や H3K27 に特異的に結合する Fab 抗体に蛍光ラベルを付与したものをを用いた。これらを受精卵にインジェクションしてそのグローバルな変化を4次元的に観察したところ、クローン胚では H3K9 ではなく H3K27 のアセチル化が通常胚と大きく異なっており、それが2細胞期までの間にリプログラミングされることが明らかとなった (Hayashi-takanaka, et al., 2011, Nuc Acid Res)。

2012年度は、初期胚の卵割時に見られる染色体分配過程に着目した。ヒストン H2B-mRFP1 をプローブに用いて体細胞クローン胚染色体分配過程を観察したところ、通常胚に比べて明らかに高い異常率を示した。驚いたことに、全体の80%近くの胚が、8細胞期までの間に一度は分配異常を呈した。移植の結果、これらの胚からは1匹もクローンマウスが産まれなかったことから、卵割時の染色体分配異常こそが体細胞クローンの低い成功率の主な原因であることが示された (Mizutani, et al., 2012, Dev Biol, 下記新聞記事1参照)。これ以外に、木村宏博士と協力して新たな蛍光顕微鏡システムの開発を行った。具体的には、水銀ランプやレーザーなどの蛍光ユニットを用いずに蛍光観察を可能にする顕微鏡コンデンサーを開発し、それと木村らの開発した高輝度蛍光プローブを組み合わせることで、透過光を用いてダメージなく胚の蛍光観察や操作を可能にした (Yamagata, et al., 2012, PLoS ONE, 下記新聞記事2参照)。

また、理化学研究所の清末博士らとの共同研究により、ニポウディスク式共焦点ユニットに二光子レーザーを導入することで、生体の深部においても空間・時間分解能の高い観察ができる顕微鏡システムの開発を行った。これにより、厚みのあるマウス初期胚においても、紡錘体上を移動する EB1 タンパク質の移動についてビデオレートでの観察に成功した (Shimozawa, et al., 2013, PNAS)。

最近、H2B-mRFP1 の mRNA を注入して得られたマウス初期胚の4次元画像情報から核領域を検出し、その大きさや数の時間変化を自動的に抽出するアルゴリズムを作った。このアルゴリズムを用いて、異なる系統のマウスや高齢マウスの胚について核数の時間変化 (発生速度) を定量化し、その相違を比較解析した。その結果、ハイブリッド系統である BDF1 に比べて近交系である C57BL6 の方が平均的に発生速度が遅くなっているのに加えて、個体間のばらつきが大きくなっていった。また、高齢雌マウス由来胚においても若齢に比べて同様の現象が見られた。興味深いことに、いずれの摂動を与えても、一部の胚については非摂動胚と同等の発生速度を示すものがあ

った。以上の成果については、現在論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 41 件)

1) The role of NF- κ B signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells.

Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, Takato T, Isagawa T, Nagae G, Suemori H, Aburatani H, Hishikawa K.

PLoS One. 2013;8(2):e56399. doi: 10.1371/journal.pone.0056399. 査読有

2) Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging.

Shimozawa T, Yamagata K, Kondo T, Hayashi S, Shitamukai A, Konno D, Matsuzaki F, Takayama J, Onami S, Nakayama H, Kosugi Y, Watanabe TM, Fujita K, Mimori-Kiyosue Y. Proc Natl Acad Sci U S A, (2013) 110:3399-404. 査読有

3) Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells.

Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E.

Nat Commun. 2012;3:1236. doi: 10.1038/ncomms2231. 査読有

4) The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells.

Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H, Dunn NR. Genes Dev. 2012 Nov 15; 26(22):2471-6. doi: 10.1101/gad.201772.112. 査読有

5) Dynamic link between histone H3 acetylation and an increase in the functional characteristics of human ESC/iPSC-derived cardiomyocytes.

Otsuji TG, Kurose Y, Suemori H, Tada M, Nakatsuji N.

PLoS One. 2012;7(9):e45010. doi: 10.1371/journal.pone.0045010. 査読有

6) Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification

labeling. Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, Kimura H. Nucleic Acids Res, (2011) 39:6475-88. 査読有

7) Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation.

Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H.

Hum Mol Genet. 2011 Jul 15;20(14):2710-21. 査読有

8) Efficient and Accurate Homologous Recombination in hESCs and hiPSCs Using Helper-dependent Adenoviral Vectors.

Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y, Suzuki K, Sakurai K, Shimoji M, Aiba K, Wada T, Tooi N, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K.

Mol Ther. 2011 Dec 6. doi: 10.1038/mt.2011.266. 査読有

9) Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage.

The International Stem Cell Initiative, Nat Biotechnol. 2011 Nov 27;29(12):1132-1144. doi:10.1038/nbt.2051. 査読有

10) In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers.

Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Ikai I, Uemoto S, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N.

Cell Tissue Res. 2010 Mar;339(3):505-12. doi: 10.1007/s00441-009-0906-7. 査読有

11) Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by β -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs.

Yamauchi K, Sumi T, Minami I, Otsuji T.G, Kawase E, Nakatsuji N, Suemori H.

Genes to Cells. 2010 Dec;15(12):1216-27. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.10.007. 査読有

12) Adipogenic differentiation of human

induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells.

Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K, Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S, Nakao K.

FEBS Lett. 2009 Mar 18;583(6):1029-33. doi: 10.1016/j.febslet.2009.02.031 査読有

13) In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells.

Yamauchi K, Hasegawa K, Chuma S, Nakatsuji N, Suemori H.

PLoS ONE. 2009;4(4):e5338. doi: 10.1371/journal.pone.0005338. 査読有

[学会発表] (計 36 件)

1) ラミニン E8 フラグメントを用いたヒト ES/iPS 細胞の単一分散培養法

宮崎隆道, 二木杉子, 末盛博文, 谿口征雅, 山田雅司, 川崎美和, 林麻利亜, 熊谷英明, 中辻憲夫, 関口清俊, 川瀬栄八郎

第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3/21-3/23 (横浜)

2) Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones.

山縣一夫

The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013, Quantitative Bioimaging 2013 年 3 月 17~19 日(岡崎)

3) Recombinant E8 fragments of human laminin isoforms support the efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells under defined and xeno-free condition.

Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Hirofumi Suemori, Yukimasa

Taniguchi, Masashi Yamada, Miwa Kawasaki, Maria Hayashi, Hideaki

Kumagai, Norio Nakatsuji, Kiyotoshi Sekiguchi, Eihachiro Kawase

ISSCR2012 (国際幹細胞学会 第 10 回年次大会)、2012 年 6 月 13 日-16 日

(横浜)

4) 割時の染色体分配異常に起因する

山縣一夫

第 30 回日本受精着床学会総会 2012 年 8 月

30~31 日 (大阪) (招待講演)

5) 哺乳動物初期胚の質を定量的に見る (Quantification of embryo quality)

山縣一夫

第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会 2012 年 6 月 29~31 日(神戸) (招待講演)

6) ライブセルイメージングによる初期胚発生核ダイナミクスの可視化 (Visualization of nuclear dynamics of preimplantation development by live-cell imaging.)

山縣一夫

第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 2012 年 5 月 14~15 日(東京) (招待講演)

7) 哺乳動物初期胚の質を定量化してみる

山縣一夫

第 4 回定量生物学の会 2012 年 1 月 9 日(名古屋) (招待講演)

8) Dissection of the early cardiac developmental process from human embryonic stem cells using a model system that recapitulates the embryogenesis.

Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori

International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting 2011 (6/15-18, Toronto, Canada)

9) SnoN represses mesendodermal genes in human ES cells.

Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Akila Sadasivam, Jennica Tan Ee Kim, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Norris Ray Dunn

Stem Cell Society Singapore (SCSS) Symposium 2011 (11/17 - 18, Singapore)

10) ヒト ES 細胞から definitive endoderm への高率な誘導方法の構築

武内大輝、中辻憲夫、末盛博文

第 34 回日本分子生物学会年会 2011 (12/13-16、横浜)

11) Genetic and Epigenetic Landscape of Mouse Preimplantation Development Revealed by Live-cell Imaging.

山縣一夫

2nd World Congress of Reproductive Biology 2011 年 10 月 11 日 (オーストラリア, クイーンズランド州) (招待講演)

12) ライブセルイメージングを用いた初期胚のクリティ評価

山縣一夫

勝川 ART 研究会 2011 年 6 月 22 日 (春日井) (招待講演)

13) 単一胚ライブセルイメージングによる初期胚発生核ダイナミクスの可視化

山縣一夫

第 11 回日本蛋白質科学会年会 2011 年 6 月 8 日 (吹田市) (招待講演)

14) Cardiomyocytes develop from anterior primitive streak cells induced by β -catenin activation and the blockage of BMP signaling in hESCs.

Kaori Yamauchi, Tomoyuki Sumi, Itsunari Minami, Tomomi G Otsuji, Eihachiro Kawase, Norio Nakatsuji, and Hirofumi Suemori
9th ISSCR Meeting 2010(6/16-19 San Francisco, USA)

15) ヒト ES 細胞からの原条形成過程におけるクロマチン修飾因子の発現解析

末盛博文

第 33 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2010 (12/7-10 神戸)

16) Recombinant human laminin isoforms are effective in culture of human embryonic stem cells.

Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Kouichi Hasegawa, Miwa Kawasaki, Noriko Sanzen, Maria Hayashi, Eihachiro Kawase, Kiyotoshi Sekiguchi, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori

International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting 2009 (7/8-11, Barcelona, Spain)

17) Optimization Of Vector Design For Lentiviral Gene Transfer Into Human Embryonic Stem Cells.

Emi Aizawa, Kaoru Mitsui, Keiichiro Suzuki, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, and Ko Mitani

American Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting. 2009 (5/27-30, San Diego USA)

〔図書〕(計 2 件)

1) 糸井史陽、山縣一夫 産科と婦人科 78 巻 8 号 960-965 (2011) (株) 診断と治療社

2) 高田圭、末盛博文 再生医療の最前線 2010「再生医療に適した ES 細胞培養システム」実験医学 28, 204-208. (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 顕微鏡および光透過ユニット
発明者: 若山照彦、山縣一夫、今井雄一郎、田村恵裕

権利者: 独立行政法人理化学研究所、オリンパス株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2011-286996

出願年月日: 2011 年 12 月 27 日

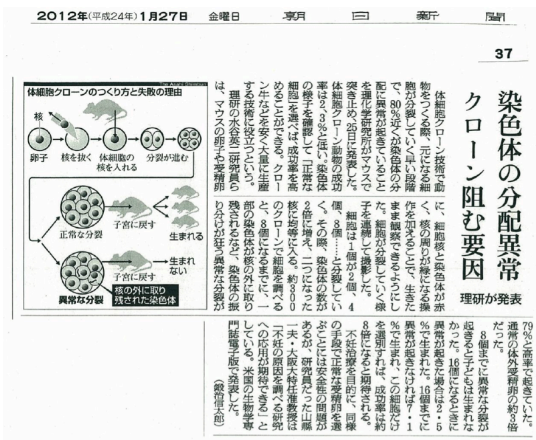
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

報道関連: 山縣らは、マウス体細胞クローンの低い成功率の原因が、初期胚における卵割時の染色体分配異常に起因することを発見した。この研究成果は、将来高効率なクローン動物作製につながるだけでなく、不妊症解明の基礎的知見として重要であると判断したため、新聞発表を行った(下、新聞記事 1)。朝日新聞以外にも、毎日新聞と読売新聞の全国版、神戸新聞、茨城新聞等の地方新聞や各種専門新聞に同様の記事が掲載された。



6. 研究組織

(1) 研究代表者

末盛 博文 (SUEMORI HIROFUMI)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号: 90261198

(2) 研究分担者

山縣 一夫 (YAMAGATA KAZUO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号: 10361312

(3) 連携研究者