

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14514

研究課題名(和文) 特定の遺伝子座に結合したDNA結合蛋白を生体内で可視化する。

研究課題名(英文) Visualization of DNA binding proteins bound to specific loci in vivo

研究代表者

澤 斉 (Sawa, Hitoshi)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号：80222024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：線虫 *C. elegans* を使い、単一細胞内の特定遺伝子座 (*egl-18*) のクロマチン状態を可視化を行った。この遺伝子のプロモーター領域を含むレポーターコンストラクトと *lacO* 配列を数百コピー持つレポーターアレイシステムを作成し、*lacI::GFP* を用いて、細胞分化に伴うアレイの核内位置の変化を計測することで、分化の進行に応じた特定遺伝子の単一細胞レベルでの核内動態を観察することを可能とした。次にこのアレイに対して、修飾ヒストンの抗体で免疫染色を行い、この遺伝子座に蓄積するヒストンマークの変化を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Using *C. elegans*, we tried to visualize chromatin status of a specific gene (*egl-18*). We established a reporter array containing hundreds copies of the gene promoter and the *lacO* sequence, and measured changes of nuclear positions of the array during cell differentiation using *lacI::GFP*, enabling us to visualize dynamics of a single gene locus during development. In addition, by immunostaining using anti-modified histone antibodies, we succeeded to visualize dynamic changes of histone marks on this gene during development.

研究分野：発生生物学

キーワード：エピジェネティクス *C. elegans* イメージング Wnt 非対称細胞分裂 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック制御機構の研究は ChIP-seq 法により飛躍的に進歩した。この方法では大量の細胞集団をすりつぶす必要があり、細胞集団平均のエピジェネティック状態が得られる。しかし、生体組織を構成する細胞一つ一つは分化の程度や遺伝子発現のレベルにばらつきがあり、それぞれの遺伝子座のエピジェネティック状態にも細胞ごとのばらつきが生じているはずである。細胞集団を使う限り、単一細胞レベルの解像度で調べることは大変難しい。また、遺伝子発現には遺伝子の核内位置情報も重要であると考えられているが、すりつぶしてしまうとそのような情報は失われてしまう。したがって、生体内で細胞一つ一つにおける特定遺伝子座のエピジェネティック状態を可視化できる方法が求められるが、そのような汎用的な方法はいまだ存在していない。

2. 研究の目的

細胞集団を用いた生化学的解析の弱点を補完するため、本研究では、単一細胞の特定遺伝子座のクロマチン状態を可視化し、発生過程における変遷を生体内で調べる手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

細胞の一つ一つが同定可能であり、細胞系譜が完全にわかっている線虫 *C. elegans* を使った。単一細胞の特定遺伝子座のクロマチン状態を可視化するためには、エピジェネティック因子の検出と任意の遺伝子座の可視化の両方が必要となる。そこで、エピジェネティック因子の検出方法として、ヒストンマークなどに対する抗体を用いた免疫染色を選んだ。本研究では、遺伝子座の可視化に注目して以下の3つの実験を行った。

(1) 線虫胚を用いた多重コピーアレイの作成とその可視化

線虫の細胞は、外来遺伝子を核内でミニ染色体として保持する性質がある。この性質を利用し、注目する遺伝子のプロモーター領域 (開始コドンから 1k~5k bp) を含むレポーターコンストラクトと lacO 配列を共に線虫に導入し、紫外線を照射することで、レポーターと lacO を~数百コピー持つミニ染色体をゲノムに組み込んだ (レポーターアレイ) 系統を作成した。この系統のレポーターは基本的に内在性発現と同様の発現パターンを示す。さらに、この系統と、緑色蛍光タンパク質 GFP や赤色蛍光タンパク質 mKate2 などタグ付けされた LacI (lacO 配列結合タンパク質) を発現する系統と掛け合わせることで、この種々の遺伝子のレポーターアレイの核内位置を可視化することができた。

(2) 発生過程における特定遺伝子座の核内位置の変化

線虫の表皮幹細胞は非対称に分裂し、表皮と表皮幹細胞を生み出す。その際、表皮幹細胞では、*egl-18*/GATA 転写因子遺伝子発現が維持されるが、表皮ではその発現は抑制される。この遺伝子の発現には POP-1/TCF の非対称的な転写活性が原因であることが知られており (Gorrepati et al., 2013)、表皮幹細胞では POP-1/TCF が活性化し *egl-18* 遺伝子を発現させるが、表皮細胞では POP-1/TCF は不活性であり、*egl-18* 遺伝子を発現しない。この時に、*egl-18* レポーターアレイ系統を用いて、TCF/POP-1 の活性化の前後で、アレイの核内位置の変化を計測した。分裂前の表皮幹細胞では、アレイは核表層から離れた場所に位置しやすく、細胞分裂終期では、表皮細胞と表皮幹細胞の両方のアレイは核表層から離れて位置する。分化した表皮細胞では、アレイは核表層に位置するが、幹細胞では核内部

に位置したままである。このような表皮分化の進行に応じた特定遺伝子の単一細胞レベルでの核内動態を観察することが可能となった。

(3) 単一細胞での特定遺伝子座のエピジェネティック状態の可視化

通常、特定遺伝子のレポーターは2コピーしかゲノム中に存在しないため、レポーターを占めるエピジェネティック状態を免疫染色などでの可視化を試みても、核全体にシグナルがあり、注目する特定の遺伝子座のシグナルと背景のシグナルとを区別することは難しい。しかし、レポーターアレイは非常に近接したゲノム領域に注目する配列が数百コピー含むため、シグナルが数百倍増幅され、背景シグナルとの差を検出できると考えられる。このことを検証するために、(1)で確立した系統に対して、活性化ヒストンマークである H3K27ac や抑制性ヒストンマークである H3K27me3 など免疫染色を行い、レポーターアレイに蓄積するヒストンマークの定量を試みた。

egl-18 遺伝子は胚性期においても表皮幹細胞前駆体で発現が維持され、ほかの表皮細胞前駆体では発現が抑制される。この時期において、*egl-18* を発現する幹細胞前駆細胞では、*egl-18* レポーターアレイ上に H3K27ac の蓄積が見られるのに対し、発現しない表皮前駆細胞では H3K27ac に対して排他的である様子を検出することができた。逆に H3K27me3 は、幹細胞前駆細胞での *egl-18* レポーターアレイ蓄積が表皮前駆細胞に比べて有為に少ない様子を確認できた。したがって、レポーターアレイとヒストンマークに対する免疫染色を組み合わせることで、特定の遺伝子座のエピジェネティック状態を可視化することが可能となった。

4 . 研究成果

特定の遺伝子座の数千塩基のプロモーター領域を占めるエピジェネティック状態は上述の方法を使うことで、単一細胞レベルで可視化できる事がわかった。この方法は、更に詳細な領域のエピジェネティック状態を可視化する方法やライブイメージング解析への足がかりになるだろう。私たちは、現在、この多重レポーターアレイシステムと CRISPR-Cas9 を利用したゲノムタギングシステム (Chen et al., 2013) を組み合わせ、発生中の線虫胚で更に詳細な領域におけるエピジェネティック状態の検出を試みている。また、蛍光タンパク質によってタグ付けされた特定ヒストン修飾の抗体軽鎖 (Sato et al., 2013) と組み合わせることによって、細胞分化にしたがって特定遺伝子座のエピジェネティック状態がどのように変化していくのかを追跡しようと試みている。

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2件)(査読有)

1 The Mediator Kinase Module Restrains Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Represses Vulval Cell Fate Specification in *Caenorhabditis elegans*. Grants, J.M., Ying, L.T., Yoda, A., You, C.C., Okano, H., Sawa, H., Taubert S. *Genetics* 202(2), 583-599(2016)
DOI:10.1534 / genetics.115.180265

2 Power law relationship between cell cycle duration and cell volume in the early embryonic development of *Caenorhabditis elegans*. Arata, Y., Takagi, H., Sako, Y., and Sawa, H. *Front. Physiol.* 5, 529 (2015)
DOI:10.3389 / fphys.2014.00529

〔学会発表〕(計1件)

1 澤 斉

C.elegans 発生時における POP-1/TCF 標的遺伝子の核内位置の変化

第 67 回日本細胞生物学会大会 タワーホール船堀 2015 年 7 月 2 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MultiOrg/Multicellular/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

澤 斉 (SAWA,Hitoshi)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究セン

ター・教授

研究者番号：80222024