

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21629

研究課題名(和文) ヒストン修飾の超解像ライブイメージング法開発による細胞分化・初期化機構の解明

研究課題名(英文) Development of super-resolution microscopic live imaging method of histone modifications for understanding cell differentiation and reprogramming

研究代表者

岡本 和子 (Okamoto, Kazuko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：40710265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は光活性化位置推定顕微鏡法(PALM法)とFRETを融合させた機能的超解像法を確立し、細胞分化・リプログラミングでの核内のヒストン修飾と位置情報を同時に取得するものである。ヒストン修飾は、細胞状態の遷移に関与することが知られ、細胞分化・リプログラミングにおいてもその重要性が強く示唆されている。本研究課題は、ヒストン修飾と位置情報を実時間・実空間で獲得することを目指した。

研究成果の概要(英文)：In this project, I aimed to develop a methodology, which combines photoactivated localization microscopy (PALM) and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) for obtain information of histone modification and its loci in living nuclei simultaneously. It has strongly suggested that histone modification regulates cellular states. Especially in the field of cell differentiation and reprogramming, the importance of histone modifications comes to be a big issue to understand the process of cell-state transition. The methodology will be a powerful method to clarify the dynamics of histone modification in various biological phenomena.

研究分野：細胞生物学

キーワード：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な遺伝子発現制御機構のなかでもヒストン修飾は重要な位置を占める。ヒストン修飾による遺伝子発現調節が細胞分化・リプログラミング等の多彩な生命現象を制御していることが明らかとなってきた。中でもヒストン修飾(アセチル化・メチル化)はクロマチン構造変化を誘導すると考えられており近傍に存在する遺伝子発現を制御するダイナミックな機構である。近年までに生化学的知見は多く蓄積され続けている。それゆえ、生化学的手法では、得ることのできなかつた、ヒストン修飾の動的変化を観察する技術を開発する必要があった。そこで、超解像顕微鏡法のひとつであるPALM法とヒストン修飾による構造変化をFRET効率変化として捉えることのできるプローブを組み合わせることにより、達成することを試みた。

## 2. 研究の目的

エピジェネティック制御の一つである、ヒストン修飾(アセチル化・メチル化)は、細胞分化・リプログラミング・がん化等への関与が明らかであり、その動態の解明は最重要課題として挙げられる。しかしヒストン修飾を経時的に観察する手段がほぼ皆無であったため、そのダイナミクスは不明のままであった。そこで、1)ヒストン修飾を生細胞において1分子レベル、かつ、ナノメートル精度で実時間観察する新規技術を開発し、ヒストン修飾のダイナミクスを明らかにする。さらに、2) ES・iPS 細胞を用いた分化・リプログラミングにおける、ヒストン修飾による細胞状態制御メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

1)超解像顕微技術(PALM)とFRETを融合させた、機能的超解像技術法を確立する。先行研究によって開発されたFRET プローブ Histac (Sasaki et al., 2009)をPALMに使用できるように改変し、機能評価する。Histac

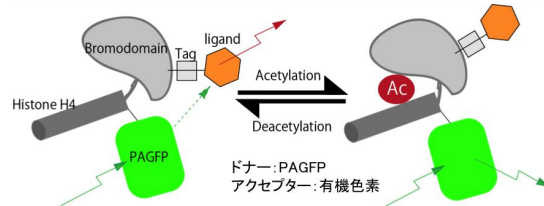
はヒストンH4K5/K8 アセチル化を検出するプローブである。

FRETプローブHistacはドナーとして、GFP, アクセプターとしてVenusを用いて開発されているプローブである。これをPALM法に適應できるように、PA-GFPと量子効率が高い有機系色素を採用した。有機色素は市販されている複数種を試行し、アクセプターフォトリーチ法によって、最も優れたパフォーマンスを示すものを最終決定した。加えて、複数のモデル細胞に改変プローブを一時的に導入することで、有機色素の細胞透過性とその局在を確認した。細胞内においてアセチル化阻害剤によるアセチル化状態の変化を検出することを確認した。またH4K12 アセチル化検出FRETプローブHistac12(Ito et al., Chem Biol (2011))にも同様の改変を行い、評価を行った。

モデル細胞を用いた試験的計測において、またblinkingとswitchingの影響で同一分子を複数回計測することが考えられるが、その点を考慮した最適条件を設定した。

以上により、プローブ・顕微鏡ともに計測法の検討を行い、手法として確立するところとなった。

改変型プローブの模式図



アセチル化前:有機色素のもつ波長の光を発する  
アセチル化後:PAGFPのもつ波長の光を発する

## 2) 細胞分化・リプログラミングにおけるヒストン修飾の核内空間分布および時間変化の計測

ヒストン修飾が、細胞状態の変化を引き起こすことは、既に知られていることであり、なかでも細胞分化・リプログラミング過程における、ヒストン修飾は、ダイナミックに変化することが知られている。これらの未分化細

胞等を用いて、ヒストン修飾と細胞状態遷移との関係性を実測することを目的としている。未分化マウスES細胞に、改変したプローブを一時的に導入したところ、導入効率が著しく悪いながらも、発現を確認することができた。目的としている細胞状態変化を追跡するためには、恒常発現株の作製が望ましく、その作製を試みた。もしプローブの導入によるサイドエフェクトが現れた場合には、恒常発現ではなく一時的な発現にて計測を実行する。

#### 引用文献

Sasaki et al., Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *PNAS* 2009

Ito et al., Real-time imaging of histone H4K12-specific acetylation determines the modes of action of histone deacetylase and bromodomain inhibitors. *Chem Biol* 2011

#### 4. 研究成果

3に示したとおり、顕微鏡システムの構築と、生細胞核内において機能する改変プローブの作製には成功している。しかしながら未分化マウスES細胞に、改変したプローブを一時的に導入したところ、導入効率が著しく悪い。本研究の目的の遂行のためには、長時間の観察と観察細胞数が大きいことが望ましいため、恒常発現株の作製は欠かせない。しかしながら、恒常発現株の作製は現在のところ作製に成功していない。発現細胞を安定して維持することが出来なかったためである。これはプローブ導入によるサイドエフェクトだと考えられる。このような現象は、他の哺乳類モデル細胞を使用した場合にも見られた。よって導入手法を、複数試行し、現在も安定した恒常発現細胞の作製を試みている。また一時的に発現させる場合であれば、モデル細胞において数時間の観察は可能である。

目的の遂行のためには、マウスES細胞やiPS細胞での恒常発現株を樹立することが最も望ましいが、現在は細胞種それぞれに応じた最適導入法の検討を行っている。プローブの導入法が決定し次第、上記未分化細胞のみならず、哺乳類モデル細胞において、広く使用可能なヒストン修飾と核内位置情報の両者を同時獲得する手段となりえる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

ポスター発表

岡本和子 他3名

The mechanism by which cellular heterogeneity propagates heterogeneity in colonies

2016年9月27日

17th International Conference on Systems Biology 「バルセロナ(スペイン)」

口頭発表

岡本和子 他3名

ES細胞のコロニーが、集団として不均一性を保つ仕組み

2016年6月15日

第68回細胞生物学会年会 「京都テルサ」(京都府・京都市)

ポスター発表

岡本和子 他3名

ES細胞初期分化過程にみる細胞個体と細胞集団との関係性を定量する

2015年12月3日

第38回日本分子生物学会年会 「神戸ポートアイランド」(兵庫県・神戸市)

口頭・ポスター発表

岡本和子 他3名

ES細胞初期分化にみる細胞個体と細胞集団との関係性を定量する

2015年7月2日

第67回細胞生物学会年会 「タワーホール船堀」東京都・江戸川区)

ポスター発表

岡本和子 他3名

Quantitative analysis of transition in the heterogeneity of embryonic

stem cells during early  
differentiation

2015年6月2・3日

第48回日本発生生物学会

「つくば国際会議場」(茨城県・つく  
ば市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡本 和子 ( OKAMOTO, Kazuko )

国立研究開発法人理化学研究所・生命シス

テム研究センター・特別研究員

研究者番号：40710265

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )