

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24年 6月 8日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21602002

研究課題名（和文）霊長類 iPS 細胞における染色体テリトリーの 3 次元核内配置からみた比較進化学的解析

研究課題名（英文）Comparative evolutionary studies on three-dimensionally positioning of the chromosome territories in the primate iPS cell nuclei

研究代表者 田辺 秀之（TANABE HIDEYUKI）

総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授

研究者番号：50261178

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞核における核内染色体テリトリー、遺伝子領域の空間配置の視点から iPS 細胞形成のメカニズムを探り、ヒトと霊長類の種間比較によって、ヒトへの進化過程でどのような特異性が見られるかを明らかにすることを目指した。ヒトと大型類人猿 3 種（チンパンジー、ゴリラ、オランウータン）由来の繊維芽細胞を用いて、iPS 細胞形成に関わる 4 因子 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc と Nanog を合わせた 5 つの遺伝子領域、およびそれらを含む染色体テリトリー領域について、3D-FISH 法により 3 次元核内空間配置の基本的な特性を明らかにした。霊長類 iPS 細胞における遺伝子配置データは、サンプル細胞数の不足のため、現時点で全貌が明らかにできていないが、十分なサンプル数が得られ次第、解析を進めて考察する。

研究成果の概要（英文）：

In this study from the viewpoint of spatial positioning of chromosome territories and genomic regions within the nucleus I would try to find the molecular mechanism of why the iPS cells are established and to identify what the human specific characteristics have been appeared during the course of primate evolution by comparative analysis in human and great apes. Analysis by 3D-FISH technique using the DNA probes with Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, and Nanog, and their chromosomal paints onto human, chimpanzee, gorilla, and orangutan fibroblast cell nuclei, basic characteristics of spatial arrangements have been revealed but analysis has not yet been carried out due to shortage of primate iPS cells. When accumulating iPS cells, I would perform the analyses and discuss the issues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：幹細胞医・生物学

科研費の分科・細目：幹細胞医・生物学（時限付き分科細目表）

キーワード：染色体テリトリー・3D-FISH 法・核内配置・細胞分化・遺伝子ポジショニング・霊長類 iPS 細胞・ゲノム配置

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1)染色体テリトリー：細胞核内の染色体は無秩序に入り混じった状態ではなく、個々の染色体ごとに高度に区画化された「染色体テリトリー」として一定の空間配置を占めており、その構造的な特性や核内動態が、ゲノム機能発現やゲノム進化と重要な関わり合いを持つ。染色体テリトリーの3次元核内配置を決定付けるパラメータとして、個々の染色体の物理サイズ、遺伝子密度やGC含量、複製時期、遺伝子発現状態などが挙げられているが、細胞周期や核形態の影響を受けたり、細胞の種類や生物種間、発生、分化段階で異なる特性を持つことが報告されており、その核内配置の特性と生物学的意義については未知な部分が多く残されている。研究代表者らは、3D-FISH法により霊長類リンパ球細胞核における染色体テリトリーの3次元核内配置のゲノム構造上の特性を明らかにしてきた (Tanabe *et al.*, 2002, 2005)。

(2)放射状核内配置と相対核内配置：前者は、核の中心付近から核膜周辺部にかけて、放射状のどの領域に分布するかを考える場合の核内配置。例えばヒトリンパ球細胞核において、ほぼ同サイズのヒト18番及び19番染色体に着目すると、遺伝子密度の低い18番染色体は核の周辺部に、遺伝子密度の高い19番染色体は核の中心付近に局在している。また、ニワトリ細胞では、遺伝子密度が低く、サイズの大きいマクロ染色体が核の周辺部に局在し、遺伝子密度が高く、サイズの小さいマイクロ染色体が核の中心付近に局在し、これらのトポロジーは進化的に保存されている。これに対し、後者は個々の染色体テリトリーの相対的な核内配置を指す。腫瘍細胞やゲノム進化における転座などの染色体再編成は、相対核内配置が互いに隣接した場合に高率に引き起こされるのではないかと考えられている。特定のDNA領域同士の物理的な隣接、接触によって、遺伝子の活性化、不活性化の制御がなされている現象は古くから知られており、染色体テリトリー間の接触「Chromosome Kissing」や遺伝子領域間における「Gene Kissing」という現象として様々な視点から報告されている。

2. 研究の目的

多分化能を有するiPS細胞は再生医学研究の中核的存在であり、様々な側面からその形成メカニズムの解明が進められているが、細胞核内における染色体・遺伝子ポジショニングからのアプローチは依然未解明である。本研究では、細胞核における核内染色体・遺伝

子ポジショニングの視点からiPS細胞形成のメカニズムを探り、ヒトと霊長類の種間比較を行うことによって、ヒトへの進化過程でどのような特異性が見られるかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ヒトを含む霊長類細胞の細胞培養

霊長類リンパ芽球様細胞株、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン由来の繊維芽細胞株（東京大学、石田貴文先生のご協力のもとに供与）、Vero、IMR-90、TIGシリーズを用いた。

(2)Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 遺伝子の導入実験とiPS細胞の形成、樹立

①SU100を用いた遺伝子導入法

②センダイウイルスベクターによる遺伝子導入法 (CytoTune-iPS システム)

(3)染色体標本の調整、2D-FISH法によるメタフェイズ（分裂中期像）解析

コルセミド処理した細胞を回収し、低張処理の後、メタノール/酢酸による固定処理を行い、細胞懸濁液をスライドガラス上に展開して作成する。作成したプレパラートはフリーザーにて使用時まで保存する。プレパラートにQ/Gバンド法を実施し、写真撮影、核型バンド分析を行い、染色体構成の性状を調べる。複数のプローブを異なる蛍光色素で検出可能なように組み合わせ、メタフェイズ染色体上に2D-FISHを行い、蛍光抗体法でシグナルを検出し、写真撮影、画像解析を行う。

(4)3D-FISH法による染色体3次元核内配置解析

各種細胞株を培養し、予めBrdU（プロモデオキシウリジン）を培地に加えて標識を行い、3次元核構造を維持した細胞固定法（パラホルムアルデヒド固定）により3Dスライド標本を調整する。2D-FISH法により確認済みである各種プローブを組み合わせ、3Dスライド標本上にハイブリダイゼーションを行う。蛍光プローブは2D-FISH法と同様に蛍光抗体法でシグナルを検出する。3次元画像を取得するために、共焦点レーザースキャン顕微鏡

(Carl Zeiss LSM510META)を使用し、各プローブセットごとに20~30個の細胞核の画像データをスキャンして、その画像イメージスタックを集積し、データをファイリングする。各画像イメージスタックをもとに画像解析プログラム処理によって3次元画像再構築を行うとともに、放射状および相対核内配置解析を行う。

4. 研究成果

(1)ヒトを含む霊長類細胞の細胞培養

ヒトを含む霊長類各種細胞株を培養し、メタフェイズ染色体標本および3次元核構造を

維持した細胞固定法（パラホルムアルデヒド固定）により 3D スライド標本を調整し、それぞれ 2D-/3D -FISH 法に用いた。

(2) Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 遺伝子の導入実験と iPS 細胞の形成、樹立

SU100 を用いた遺伝子導入法により、iPS 細胞の樹立を試みたが、樹立できなかった。しかしながら、センダイウイルスベクターによる遺伝子導入法 (CytoTune-iPS システム) を用いた結果、チンパンジー由来で 2 つ、ゴリラ由来で 3 つ、オランウータン由来で 1 つの iPS 細胞の親コロニーが得られた。各コロニーを植え継いで、一部の細胞塊より 3D 細胞核スライド標本の作製を行い、3D-FISH 法による解析に供した。親コロニーの細胞数がまだ十分でなかったために、現時点では解析が進められていないが、十分なサンプル数が得られ次第、解析を進める。

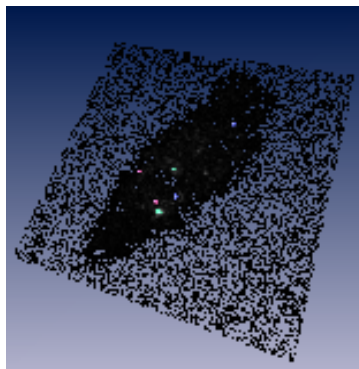
(3) 染色体標本の調整、2D-FISH 法によるメタフェイズ (分裂中期像) 解析

ヒト Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog の各遺伝子領域 (6p21.33, 3q26.33, 9q31.2, 8q24.21, 12p13.31) の BAC-DNA とそれぞれの遺伝子が存在する腕特異的染色体テリトリー領域 (6p, 3q, 9q, 8q, 12p) を DNA プローブとして調整し、Bio, Dig, DNP のハプテンで標識した。ハイブリダイゼーションの条件を検討し、ヒト正常細胞 IMR-90, TIG シリーズにより、全てのプローブで目的とする遺伝子領域にシグナルが観察されることを確認した。

(4) 3D-FISH 法による染色体 3 次元核内配置解析

2D-FISH 法と同様に蛍光抗体法でシグナルを検出し、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510META) により画像データをスキャンして、画像イメージスタックを集積し、3 次元画像構築、空間配置解析を行った。ヒトおよび大型類人猿由来の繊維芽細胞株において、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog の 5 つの遺伝子領域間では互いに空間的な距離を置き、Gene Kissing

は観察されなかった (上図; ゴリラ繊維芽細胞株)。

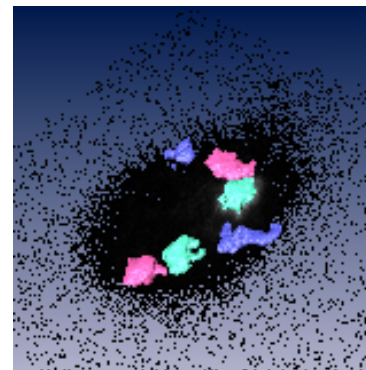


R: Oct3/4-Dig; Cy3
G: Nanog-DNP; Alexa488
B: c-Myc-Bio; Cy5

しかし、5 つの遺伝子領域が存在する染色体

テリトリー間での Chromosome Kissing は頻繁に観察され、特に 6p と 3q 領域間および 3q と 9q 領域間では比較的高い頻度で観察された (下図; ゴリラ繊維芽細胞株)。このことより、染色体テリトリー相互の Chromosome

Kissing が生じていることで、Gene Kissing が潜在的に生じやすい状況を生み出している可能性が考えられた。



R: #6p-DNP; Alexa488

G: #3q-Dig; Cy3

B: #9q-Bio; Cy5

遺伝子導入による iPS 細胞形成時にどのような Gene Kissing が生じているかを確かめることは iPS 細胞形成メカニズムを探る上で重要であり、今後も解析を進める予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 田辺秀之、細胞核と染色体構造の動態：核内空間配置に関する分子基盤について、第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会、2011 年 5 月 19 日、KKR ホテル熊本
- ② Hideyuki Tanabe, Takafumi Ishida, Hirohisa Hirai, Chromosome kissing due to 3D-repositioning of chromosome territories leading to primate karyotypic evolution, The 63rd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, June 27th to 28th, 2011, Hokkaido University Clark Memorial Student Center
- ③ Hideyuki Tanabe、Role of spatial positioning of chromosome territories in the genome evolution, SMBE 2011 Kyoto Conference (Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution), July 28th, 2011, Kyoto University Clock Tower Centennial Hall
- ④ Hideyuki Tanabe、3D-repositioning of chromosome territories leading to primate karyotypic evolution、

International Primatological Society
XXIII Congress Kyoto 2010, September 16th,
2010, Kyoto University Clock Tower
Centennial Hall

⑤田辺秀之、核内染色体テリトリーの放射状
核内配置の特性について、(財)染色体学
会 第60回年会、2009年11月12日、くに
びきメッセ (島根県松江市)

⑥Hideyuki Tanabe, Kissing of chromosome
territories leading to chromosomal
translocation and genomic evolution、
第32回日本分子生物学会年会、2009年12
月10日、パシフィコ横浜

[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

<http://www.esb.soken.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 秀之 (TANABE HIDEYUKI)

総合研究大学院大学・先導科学研究科

研究者番号: 50261178

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

平井 啓久 (HIRAI HIROHISA)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号: 10128308