

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570191

研究課題名(和文)1分子蛍光観察手法を用いた分化初期化の単一細胞エピジェネティクス

研究課題名(英文)Detection of single cell epigenetic status using single molecule imaging

研究代表者

藤田 英明(Fujita, Hideaki)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・客員研究員

研究者番号：50318804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は生細胞内1分子蛍光イメージング手法を用い、エピジェネティカル変化の可視化を目指すことである。本研究では、核タンパク質動態変化の一分子観察と、ヒストンアセチル化のレポーターの一分子観察、の二つのアプローチによって達成した。分子動態の変化に関しては、蛍光タンパク質ダイマーの移動度が、iPS細胞とPartial-iPS細胞で変わることを見出した。ヒストンアセチル化レポーターに関してはHistacを改変し、一分子観察を行った。トリコスタチンA処理によってFRET効率が上昇したことから、この改変Histacはエピジェネティカルな変化を捉えることが可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to construct a method to report the epigenetical change using single molecule imaging. I have achieved this by measuring the diffusion property of fluorescent protein within the nucleus, and by using reporter for histone acetylation, Histac. I found that fluorescent protein dimer change its diffusion dynamics by the differentiation status of the cell. Fluorescent protein dimer show higher diffusion in fully reprogramed iPS than in partially reprogrammed iPS. Modified Histac capable of single molecule imaging was constructed by replacing Venus with photo-activatable GFP. ES cell expressing this modified Histac increased FRET efficiency by treatment with trichostatin A, which shows that this modified Histac is capable of reporting the histone acetylation status.

研究分野：生物物理

キーワード：一分子イメージング ES細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

細胞分化は従来、遺伝子発現などのジェネティカルな変化が主な原動力と考えられてきたが、近年エピジェネティカルな変化も重要な役割を果たしていることが明らかにされた。他方、分化の初期化は iPS 細胞開発の経緯から、いかなる遺伝子群が関わっているのかが明らかにされており、ジェネティカルな必要十分条件はいわば最初から「既に解が出た」状態である。その一方、分化の初期化過程におけるエピジェネティカルな変化に関しては精力的に研究が行われ、現在 ES 細胞と iPS 細胞における差についてしきりに議論が行われているところであり、どのような経路をたどって幹細胞様状態へと変遷しているかなどのメカニスティカルな部分に関しては闇の中である。分化の初期化は様々な改善がなされているものの、相変わらず時間がかかり効率が悪く、生細胞イメージングなどの手法によるメカニズム探求を難しくしている。本研究では、エピジェネティカルな変化をイメージングによって捉え、分化の初期化メカニズムを調べる。

2. 研究の目的

分化の過程における経時的なエピジェネティカル変化は様々な系で確認されている。一方、分化の初期化に関しては、実際に初期化される細胞の割合が非常に少数であることと、分化の初期化に長時間かかりいつ初期化されるのかわからないといった問題のため、従来の細胞生物学的手法では研究が難しかった。本研究では生細胞内 1 分子蛍光イメージング手法を用い、分化の初期化過程におけるエピジェネティカル変化の可視化を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではエピジェネティカルな変化をイメージングによって観察するために二つの手法を用いた。

(1) 第一の手法は核内タンパク質の移動度からクロマチン構造を推測する方法である。一般的に未分化の細胞ではクロマチン構造がゆるく可動性が大きいことが示されている。つまり、核内において自由に拡散している分子は未分化細胞では動きが早く、分化している細胞では遅いことが予測される。そこで、核内における蛍光タンパク質の動きを 1 分子で観察することにより、クロマチン構造が推測できる。

(2) 第二の手法は理化学研究所にて開発されたヒストンアセチル化のレポーター Histac を用いる方法である(引用文献)。HRDT のプロモドメイン両端に蛍光体を付与した FRET プローブは、ヒストンのアセチル化状態によって FRET 効率を変化させる。ドナーに光励起 GFP を、アクセプターに有機色

素を用いることにより核内のヒストンアセチル化状態を一分子で観察することが可能になる。

4. 研究成果

(1) 核内タンパク質動態の一分子観察
クロマチンのパッキング状態変化は細胞核内のメッシュワークを変化させ、核内分子動態が分子サイズ依存で変わることが考えられる。そこで、蛍光タンパク質 mKate2 に核内移行シグナルを付与し、その動態が細胞の分化によって変化するかを調べた。mKate2 単量体と mKate2 をタンデムに 2 つ、及び 4 つ繋げたコンストラクトを準備し、iPS 細胞分化状態における動態変化を調べた。未分化の iPS 細胞(図 1 青)及び部分的に初期化された iPS 細胞(引用文献)(Partial-iPS: 図 1 赤)内において mKate モノマー、ダイマー、ヘテロマーの移動度を FRAP によって確認し

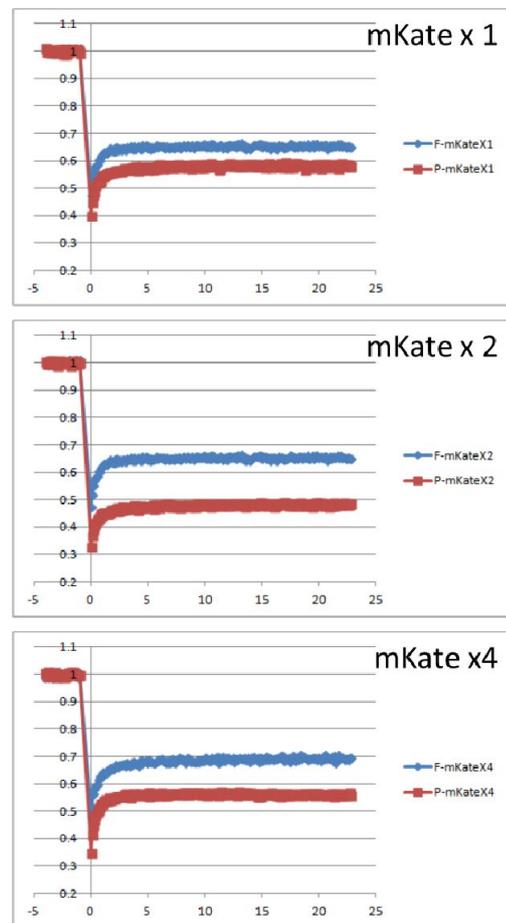


図 1 : iPS 分化状態の差による蛍光タンパク質動態の変化

た(図 1)。上図に示す通り、細胞の分化度によって核内タンパク質動態は変化し、より分化しているほど移動度が低いことがわかった。この移動度の差は mKate2 のダイマーで最も大きく表れることが示された。また、2 量体で発光する tdTomato と 4 量体で発光する DsRed は、

分子量は mKate2 をタンデムに2つ、もしくは4つ繋げたものと大きく変わらないが、その Stokes 半径は大きく異なる。そこで、tdTomato と DsRed をの動きが細胞分化によってどのように変わるかを調べ、mKate2 の結果と比較した(図2)。すると、tdTomato と DsRed は mKate2 が2つ、もしくは4つタンデ

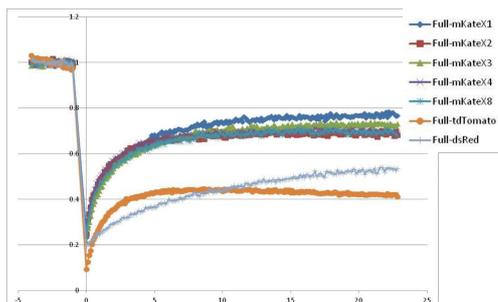


図2：tdTomato と DsRed、mKate2 の比較

ムに繋がっている場合と比べ、移動度は大きく下がることがわかった。

次に、これらのプローブ(mKate、mKate x2、mKate x4、tdTomato、DsRed)の拡散速度をES細胞、iPS細胞、Partial-iPS細胞、及び繊維芽細胞(MEF)の核内にて一分子計測した(図3)。DsRedの拡散は他のプローブと比べて非常に遅く、また、mKate2 x2はその大きさと比べると拡散速度が大きいことがわかった。また、mKate2 x2は細胞の分化度によって拡散速度を大きく変えることから、核内のエピジェネティカルな変化を示している可能性が高いことが示された。

(2)Histacを用いたヒストンアセチル化状態の一分子観察

エピジェネティカルな変化を一分子蛍光観察で捉えるため、理研で開発されたヒストンのアセチル化を観測可能なプローブ Histac(BRDTのプロモドメイン両端にそれぞれ CFP と Venus を融合した FRET プローブ)の Venus を光活性化が可能な photo-activatable-GFP(PAGFP)に、CFP を SNAP-tag に置き換えたプローブを作成した(図4上)。このプローブを恒常的に発現する HEK293T 細胞を作成し、TMRSTAR(SNAP-tag に結合する赤色素)によって染色した。

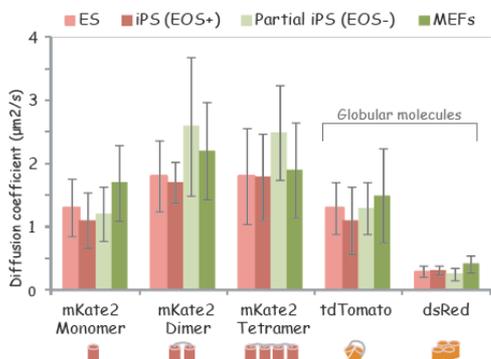


図3：一分子計測によるプローブの拡散速度計測

PAGFP - TMRSTAR 間で FRET が起きていることを確認するため、PAGFP を活性化させたのち、TMRSTAR を褪色させたところ GFP の蛍光が増大することが確認され、作成したプローブ内で FRET が起きていることが確かめられた。この改変した Histac がヒストンアセチル化のプローブとして働いているかどうかを確認するため、細胞を 1µM のトリコスタチン A (TSA) にて3時間処理したところ、FRET 効率の上昇が確認されたことから改変 Histac がヒストンアセチル化のレポーターとして使えることが確かめられた(図4下)。次に、このプローブが1分子観察可能であ

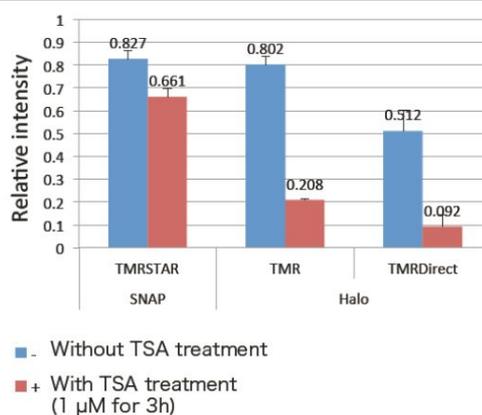
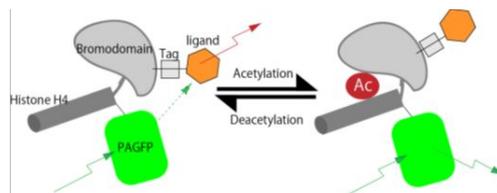


図4：一分子観察用改変 Histac と TSA 処理による FRET 効率の変化

るかを調べるため、染色した改変 Histac 発現 HEK293T 細胞を PALM 顕微鏡により観察したところ(図5)、4000 以上の輝点が単一核中に観察された。GFP の蛍光は TMRSTAR による染色によって有意に落ちることから、FRET が起きていることがわかる。

Single molecule measurement by PALM

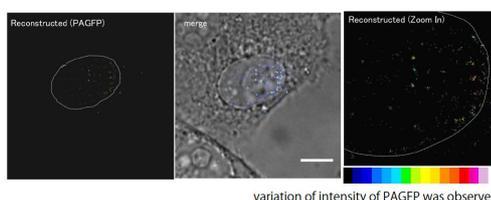


図5：PALM 顕微鏡による改変 Histac の一分子観察

次に、ES細胞分化によるエピジェネティカルな変化を捉えるため、改変 Histac をマウス ES細胞に導入した。TSA 処理によって FRET 効率の上昇が見られたことから、開発したプ

ローブは ES 細胞内においてもヒストンアセチル化状態を観察可能であることが確認された。一方、観察される輝点の数は HEK293T 細胞よりも少なく、核あたり~1000 個程度であった。ES 細胞の未分化状態を安定させるため、培養は LIF に加えて 2 種類の小分子インヒビター (2i : MEK の阻害剤と GSK3 の阻害剤)を加えた状態と、分化後の状態として LIF と 2i を除いた環境下で 1 週間培養したものを用意し、FRET 効率の違いを調べたが有意な差は見られなかった。これは、プローブの発現が弱いことや未分化 分化ではヒストンのアセチル化状態変化が TSA 処理と比べて大きくないことによるものと思われる。

<引用文献>

Sasaki, et al., Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells, PNAS, 2009, 106(38), 16257-62.
A. Hotta, et al., Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency, Nat. Methods, 2009, 6(5), 370-376.

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 10 件) 査読有

Tanaka Y., Fujita H. (2015) Fluid driving system for a micropump by differentiating iPS cells into cardiomyocytes on a tent-like structure. Sens. Actuators B Chem. 210: 267-272.
DOI: 10.1016/j.snb.2014.12.069

Fujita H., Esaki T., Masujima T., Hotta A., Kim S.H., Noji H., Watanabe T.M. (2015) Comprehensive chemical secretory measurement of single cells trapped in a micro-droplet array with mass spectrometry. RSC Adv., 5: 16968-16971.
DOI: 10.1039/c4ra12021c

David B.G., Okamoto K., Kakizuka T., Ichimura T., Watanabe T.M., Fujita H. (2015) Gene dynamics of core transcription factors for pluripotency in embryonic stem cells. J. Biosci. Bioeng., 119 (4): 406-409.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.011

Watanabe T.M., Fujii F., Jin T., Umemoto E., Miyasaka M., Fujita H., Yanagida T. (2013) Four-dimensional spatial nanometry of single particles in living cells using polarized quantum rods. Biophys. J. 105 (3): 555-564.
DOI: 10.1016/j.bpj.2013.07.001

Watanabe T.M., Imada K., Yoshizawa K., Nishiyama M., Kato C., Abe F., Morikawa T.J., Kinoshita M., Fujita H., Yanagida T. (2013) Glycine insertion makes yellow fluorescent protein sensitive to hydrostatic pressure. PLoS One. 8 (8): e73212.
DOI: 10.1371/journal.pone.0073212

Ichimura T., Fujita H., Yoshizawa K., Watanabe T.M. (2012) Engineering strain-sensitive yellow fluorescent protein. Chem. Commun. (Camb) 48(63): 7871-3.
DOI: 10.1039/c2cc32541a

Kawauchi K., Tan W.W., Araki K., Abu Bakar F., Kim M., Fujita H., Hirata H., Sawada Y. (2012) p130Cas-dependent actin remodeling regulates myogenic differentiation. Biochem. J. 445(3): 323-32.
DOI: 10.1042/BJ20112169

Watanabe T.M., Higuchi S., Kawauchi K., Tsukasaki Y., Ichimura T., Fujita H. (2012) Chromatin plasticity as a differentiation index during muscle differentiation of C2C12 myoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 418(4): 742-747.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.091

Higuchi S., Lin Q., Wang J., Lim T.K., Joshi S.B., Anand G.S., Chung M.C., Sheetz M.P., Fujita H. (2013) Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. J. Biosci. Bioeng., 115 (3): 320-325.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.10.004

Watanabe T.M., Tsukasaki Y., Fujita H., Ichimura T., Saitoh T., Akira S., Yanagida T., (2012) Distinct Modulated Pupil Function System for Real-Time Imaging of Living Cells. Plos One., 7(9): e44028.
DOI: 10.1371/journal.pone.0044028

[学会発表](計 10 件)

Machiyama H., Yamaguchi T., Watanabe T.M., Fujita H., SH3 domain of C-Src regulates its dynamic behaviour in the cell membrane, 59th Biophysical Society Annual Meeting, 2015年02月07日~2015年02月11日、Baltimore, USA

Hiroaki Machiyama, Takamitsu Morikawa,

Tomoyuki Yamaguchi, Toshio Yanagida, Tomonobu Watanabe, Hideaki Fujita, Visualization of the molecular-crowding effects in living cell on cellular functions using a FRET-based biosensor、日本生物物理学会年会、2013年10月28日～2013年10月30日、京都国際会館

Tomoyuki Yamaguchi, Hiroaki Machiyama, Shimon Sakaguchi, Hideaki Fujita, Modeling for T cell-mediated immune regulation、日本免疫学会総会、2013年12月11日～2013年12月13日、幕張メッセ

Takamitsu Morikawa, Keiko Yoshizawa, Hideaki Fujita, Katsumi Imada, Takeharu Nagai, Toshio Yanagida, Tomonobu Watanabe, Intracellular measurement of protein-crowding condition by a gene-encoded indicator、日本生物物理学会年会、2013年10月28日～2013年10月30日、京都国際会館

Madoka Suzuki, Keiko Kawauchi, Ee Chu Chai, Shota Yamauchi, Shin'ichi Ishiwata, Hideaki Fujita, Actin filament remodeling in cell-sheet by mechanical stretch、日本生物物理学会年会、2013年10月28日～2013年10月30日、京都国際会館

山本泰徳、井藤彰、河邊佳典、藤田英明、長森英二、上平正道、電気刺激による高機能人工筋組織の作製、日本生物工学会大会、2012年10月23日～2012年10月26日、神戸国際会議場

Watanabe T, Ichimura T, Fujita H, Change in the nucleus plasticity during C2C12 differentiation measured by fluorescent microscope、The 4th EMBO meeting、2012年09月22日～2012年09月25日、Nice, France

市村垂生、藤田英明、慶澤景子、渡邊朋信、力を感じて色が変わる蛍光タンパク質の開発、平成24年度日本分光学会年次講演会、2012年11月27日～2012年11月29日、東京工業大学

吉田宗生、市村垂生、邱亮達、藤田克昌、渡邊朋信、藤田英明、ラマン分光顕微鏡を用いて細胞の分化状態を識別する、第50回日本生物物理学会年会、2012年09月22日～2012年09月24日、名古屋大学東山キャンパス

樋口清香、渡邊朋信、市村垂生、藤田英

明、Soft substrates are effective in establishment of iPS cells without preparation of feeder cells、The 45th Annual Meeting of JSDB and The 64th Annual Meeting of JSCB、2012年05月28日～2012年05月31日、神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 英明 (FUJITA, Hideaki)
理化学研究所・生命システム研究センター・客員研究員
研究者番号：50318804

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし