

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24657142

研究課題名（和文）エピジェネティクス動態—ライブイメージングからの挑戦—

研究課題名（英文）“Visualizing epigenetics” -challenging from Live-cell imaging-

研究代表者

阪上 朝子 (SAKAUE ASAKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・研究員

研究者番号：90462689

研究成果の概要（和文）：

細胞集団的解析“**populational analysis**”が主流であるエピジェネティクス研究領域に、細胞個別的解析“**single cell imaging analysis**”を導入することを目標に、プローブ開発およびイメージングシステムのセットアップを行った。メチル化 DNA への親和性を変化させたプローブ作製を計画し、より細胞毒性の少ないプローブ候補を検討した。候補プローブの多色化を行い、性能評価を行った。Fucci 技術との併用を検討した。4 次元イメージングを高解像度に行うための顕微鏡システムのセットアップを行った。今後は本研究を平成 25 年度・基盤研究 (C) に引継ぎ、さまざまな状態の細胞集団の細胞個々をイメージングしながら、細胞周期スイッチ・分化スイッチ・エピジェネティクススイッチの関連の可視化・解釈を行っていく。

研究成果の概要（英文）：

We developed several genetically encoded probes that monitor DNA methylation states, which we hope will revolutionize our ability to study epigenetic regulation in individual cells. By tuning the affinity of the probe for methylated DNA, we tried to increase the probe response while minimizing the toxicity to recipient cells. Also, we diversified the color of the fluorescent proteins employed in the probe in order to facilitate simultaneous imaging DNA methylation in conjunction with the cell cycle. The microscope system for performing live imaging with a high spatial resolution was built up. We will continue to work on this project in the next Grant-in-Aid for Scientific Research (C) in the H25 fiscal year.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：DNA methylation, single cell imaging analysis, population analysis, Fucci, cellular heterogeneity

## 1. 研究開始当初の背景

近年、エピジェネティクスが生命の根幹に深く関わる事が認識されるようになり、精力的な研究が行われている。エピジェネティクスは主に、ゲノム DNA メチル化、ヒストン修飾などにより担われている。細胞の個性を表現するエピジェネティクスは、生命現象の

諸々のフェーズにおいて重要な役割を果たしていることが分かってきており、そのメカニズムを解明する事は、各々の生命現象の理解に寄与する。また、近年話題の cytosine hydroxymethylation (5hmC) の発見によりメチル化 DNA が数段階のステップを経て脱メチル化され、遺伝子が再活性化される事が明確

に示された(Bhutani et al. Cell. 2011, その他論文、レビュー多数)。DNA のメチル化および脱メチル化がダイナミックに制御されているという理解が進んでいる。エピジェネティクス研究には様々な解析手法が開発され、応用されている。領域特異的な解析方法および、ゲノム網羅的解析方法が主流であり、次世代シーケンサーにより情報が抽出される。現象・状況に応じて特異的にメチル化されるプロモーターの CpG Island を特定するには最適の方法であるが、あくまでも細胞集団からの情報抽出(“populational analysis”)であり、細胞個々の個性情報は失っている。

## 2. 研究の目的

細胞の個性を表現するエピジェネティクスは、発生、分化、リプログラミング、老化、がん化、様々な疾患など諸々のフェーズにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、現在世界中で精力的に研究されている課題のひとつである。本研究では我々が既に開発した細胞周期可視化インディケータ：Fucci 技術に、今後我々が開発するエピジェネティクスプローブを組み合わせる事を計画する。Fucci を恒常的に発現するマウスおよび、当該マウスから樹立する ES 細胞や iPS 細胞を研究材料に、生命現象における未分化状態 vs. 分化状態；すなわち“細胞周期スイッチ”、と同時に“エピジェネティクススイッチ”の相互関係を時空間的に理解することに挑戦する。エピジェネティクス研究において、網羅的解析などで本邦は世界にリードする成果を挙げている。また、ライブイメージング技術および、蛍光タンパク質を利用したプローブ作製は当研究室が得意とする分野であり、これらの技術をエピジェネティクスに応用する事で、新たな切り口からの理解を模索する。また、本邦のエピジェネティクス研究領域へ、プローブおよびタイムラプスライブイメージング技術をフィードバックし貢献する事も目標とする。

## 3. 研究の方法

個々の細胞の個性を描出する(“single cell imaging analysis”)事を目的に、以下の内容で、DNA メチル化、非メチル化を生命現象と同時に可視化する事を旨とする。“single cell imaging analysis”により、細胞 1 個 1 個における未分化性または分化状態を示す“細胞周期スイッチ”と、“エピジェネティクススイッチ”の相互関係を時空間的に理解する。

- (1) 蛍光タンパク質を用いて、遺伝子コード型のメチル化 DNA プローブ、および非メチル化 DNA プローブの開発を行う。細胞制御に影響を与えないプローブの作製を

目指す。

- (2) すでに GFP や YFP を用いて作製されているさまざまな細胞機能プローブと同時に観察するために上記プローブの多色化を行う。
- (3) 我々が 2008 年に報告した細胞周期可視化プローブ Fucci 技術(Sakaue-Sawano et al. Cell, 2008)を利用する。現在作製中の Fucci ノックインマウスを用いて、初期発生、分化、リプログラミングなどの生命現象における細胞周期動態に則しておこる DNA メチル化状態変動を可視化し、相互関係を探索する。
- (4) 遺伝子制御、細胞周期動態、エピジェネティクスなどの間に見られる関連を探る。

## 4. 研究成果

- (1) プローブ作製
  - 理研・CDB・山縣博士らが作製したメチル化 DNA プローブ(EGFP-MBD-nls)(Yamagata et al. Dev. Biol. 2007)の供与を受け、レンチウイルスの系に移し、種々の培養細胞に発現させ、発現パターンや、局在を確認した。
  - 京都大学・岡田博士らが作製した非メチル化 DNA プローブ(MLL-CXXC-EGFP)(Okada et al. Nature. 2010)の供与を受け、上記メチル化 DNA プローブと同様の検討を行った。
  - プローブの性能評価のために以下3つの実験系を確立した。
    - ① 5-メチル化シトシン特異的抗体(anti-5mC)、5-ヒドロキシメチル化シトシン特異的抗体(anti-5hmC)を用いた免疫染色により評価を行う系。
    - ② FRAP/FLIP(Fluorescence recovery after photobleaching/Fluorescence loss during photobleaching)イメージングにより結合親和性を評価する実験系。
    - ③ レンチウイルスの系でプローブを細胞に導入し、長期間観察を行う過程で、プローブの発現量や局在パターン、細胞毒性の有無などを評価する実験系。

以上の実験検討を進めた結果、既存の MBD ドメイン断片は、メチル化 DNA への親和性が高いため、長期間(数日から数週間)の観察を行うと、細胞制御に何らかの影響を与え、細胞にダメージが現れる可能性を示唆するデータを得た。そのため、親和性を変化させたプローブ作製を開始した。用いる MBD 類似ドメイ

ンの探索や変異体の検討を進め、より細胞毒性の少ないプローブ候補を見出している。さらに、DNA のメチル化・非メチル化状態を、プローブ局在の劇的な変化に置き換える事を狙い、プローブの改良を検討中である。また、MLL-CXXC ドメインは、培養細胞においては、特異的結合が観られなかった。用いるべき細胞の探索と同時に親和性を変化させるプローブ作製を視野に検討を進めている。

プローブの性能評価実験のひとつとして、哺乳類人工染色体ベクターを利用したマウス個体作製法を導入することとした。この手法は、従来のトランスジェニックマウス作製よりも短時間でマウス個体を得る事が可能である。ヘテロな細胞集団におけるプローブの振る舞いを観察し、評価していくのに適した系であると考えている。

#### (2) 上記プローブの多色化。

- 検討中の複数のプローブの性能を最大限に発揮する事を考慮し、蛍光タンパク質の中で総合的に性能が高い mVenus (黄緑色蛍光タンパク) をそれぞれに連結し、性能評価を行った。
- 多色化を考慮し、mTurquoise (シアン色蛍光タンパク) を連結したタイプを作製し、性能評価を行った。

以上の検討の結果、プローブ候補のいずれもが、mVenus, mTurquoise タイプにおいても機能することが確かめられた。

#### (3) Fucci 技術との併用

- Fucci2 を恒常的に発現する NMuMG 細胞 (NMuMG/Fucci2) に、mTurquoise タイプのメチル化プローブ候補を遺伝子導入し、stable cell line を作製した (NMuMG/Fucci2/Met#X)。NMuMG/Fucci2/Met#X 細胞を、平面培養と 3 次元培養に供し、メチル化プローブの振る舞いを観察した。現在実験途中であるが、平面培養では見られないメチル化状態の変化が、3 次元培養で観察されている。NMuMG 細胞は contact inhibition が速やかにかかる細胞であり、quiescence phase や senescence phase の検討を行いやすいという性質がある。今後は、細胞動態とメチル化プローブ動態の関連を読み解くことを目的にイメージング実験を重ねていく。
- すでに開発済みの Fucci TG mouse のス

クリーニングを行い、血球系に発現のよいラインを確立した。このマウス (ライン、#474/#610) から骨髓細胞を採取し、破骨細胞分化や、巨核球分化を長時間に渡りタイムラプスイメージングした。Fucci は未分化な細胞集団は赤と緑が混在した状態に、分化した細胞は、強赤に描出するため、Fucci をモニターする事で、細胞個々の分化状態を容易に知ることができる。作製した mTurquoise タイプのエピジェネティクスプローブを導入し、破骨細胞分化一連を長時間イメージングしたところ、多核になっていく過程において、核それぞれのメチル化状態に heterogeneity がある可能性が示唆された。今後さらにイメージング・実験を重ね、真のシグナルを抽出し、多核化と DNA メチル化の関連を説明すべく検討を進める。

- Fucci2 knock in mouse の論文発表を行い実験系の整備を進めた。
- Fucci2 knock in mouse より MEF 細胞を採取し、mTurquoise タイプのメチル化プローブ候補を遺伝子導入し、継代数の少ない MEF と、多い MEF とでのプローブの振る舞いを観察した。現在解析中である。
- Fucci2 knock in mouse より ES 細胞を樹立した。今後、この細胞を特異的分化因子刺激により分化させる培養系を確立し、分化状態と細胞周期の関連を読み解く系のひとつとする。

#### (4) 細胞周期スイッチ・分化スイッチとエピジェネティクススイッチの関連の解釈。

- 1 年計画で申請した本研究の大半は、プローブの性能評価および、改良・開発に費やした。また並行して、4 次元イメージングを高解像度に行うための顕微鏡システムのセットアップを行った。宮脇研にある FV1000 confocal imaging system に、マルチウェル・ステージトップ CO2 インキュベータおよび、生体観察に最適なシリコーン浸対物レンズを導入した。生命現象の一端を多角的に可視化する準備が整ったことになる。しかし、生命現象はエピジェネティクス変化のみならず、種々の現象が複雑にからみあって進行している。今後は、本研究を引き継ぐ形で、基盤(C)へと移行する。細胞の様々な反応を可視化するプローブを作製し、細胞周期 (Fucci) やメチル化状態と絡めながら、生命現象を可視化・理解していくことを目的として鋭意研究をすすめていく。

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4件) (全て査読有)

Visualization of cell cycle in mouse embryos with Fucci2 reporter directed by Rosa26 promoter. Abe T, Sakaue-Sawano A, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Horiuchi T, Nakao K, Miyawaki A, Aizawa S, Fujimori T. **Development**. 2013 Jan 1;140(1):237-46.

Nuclear transferred embryonic stem cell for analysis of B1 B-lymphocyte development. Takase M, Iida R, Maruya M, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Wakayama T, Nishigami S, Fagarasan S, Kanagawa O. **Int Immunol**. 2012 Oct 6.

Mechanism of cancer cell death induced by depletion of an essential replication regulator. Ito S, Ishii A, Kakusho N, Taniyama C, Yamazaki S, Fukatsu R, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Masai H. **PLoS One**. 2012;7(5):e36372.

ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. Dan S, Okamura M, Mukai Y, Yoshimi H, Inoue Y, Hanyu A, Sakaue-Sawano A, Imamura T, Miyawaki A, Yamori T. **Eur J Cancer**. 2012 Apr;48(6):936-43.

[学会発表] (計1件)

Asako Sakaue-Sawano, Hiroshi Hama & Atsushi Miyawaki  
Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell Cycle Progression  
国際幹細胞学会 第10回年次大会 -  
ISSCR 2012 - ポスター発表  
2012年6月13日~16日 神奈川県：横浜

[図書] (計1件)

阪上一沢野 朝子, 小椋陽介, 笹倉靖徳, 宮脇 敦史  
羊土社  
実験医学増刊号(2013) ユビキチンオシレーターによる細胞周期可視化 - 細胞周期を4次元で理解する -  
178-185

[その他]

ホームページ等

<http://cfds.brain.riken.jp/Fucci.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪上 朝子 (SAKAUE ASAKO)

独立行政法人理化学研究所・細胞機能探索技術開発チーム・研究員

研究者番号：90462689

(2)研究分担者

(3)連携研究者