

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700293

研究課題名(和文) 生物発光・蛍光ライブイメージングによる短周期生物時計の機能の解明

研究課題名(英文) Biological functions of ultradian oscillation revealed by bioluminescence and fluorescence imaging

研究代表者

磯村 彰宏 (Isomura, Akihiro)

京都大学・ウイルス研究所・研究員

研究者番号：70512466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞株C2C12の筋分化モデル系において、生物発光・蛍光レポーターの同時計測を1細胞レベルで行い、筋分化・細胞周期の進行下における転写因子ダイナミクスの詳細を明らかにすることを試みた。その結果、筋芽細胞株C2C12において蛍光・発光イメージング可能な実験系を確立できたが、分化誘導過程における短周期ダイナミクスに顕著な変化は見られなかった。現在、初代培養系での観察を行っているところである。一方で、研究の過程において近赤外蛍光タンパクによる細胞周期の可視化に成功した。また、短周期ダイナミクスを人工的に制御できる系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We thought to visualize genetic oscillation and myogenic differentiation process simultaneously in myoblast cells by combining fluorescence and bioluminescence imaging techniques. We succeeded in the visualization of Hes1 oscillatory dynamics in myogenic differentiation, but we did not find correlation between ultradian dynamics and differentiation states. On the other hand, we also developed infrared fluorescent reporter of cell cycle progression and optogenetic tools to control gene expression dynamics in a precise temporal manner.

研究分野：生物物理学

キーワード：システム生物学

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムの時代になり、遺伝子の同定を中心とした研究から、遺伝子間の相互作用ネットワークのダイナミクスの理解が重要な研究課題となりつつある。これまで、細胞周期や代謝回路、概日時計を始めとしたネットワークのダイナミクスが詳細に研究されてきており、最近では、哺乳動物細胞における 2 ~ 4 時間周期の短周期生物時計が次々と見つかる例がある。例えば、DNA 損傷に応じた p53 の活性の 4 時間周期の振動 (G. Lahav et al. Nature Genetics (2004).) や、免疫応答に関連する腫瘍壊死因子 (TNF) の刺激に応じた NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路の数時間周期の振動 (D. E. Nelson et al. Science (2004).) が挙げられる。しかし、これら複数のネットワークが 1 個の細胞内でどのように共存しているのか、短時間から長時間スケールの情報がどのように統合・処理されているのか、そのダイナミクスの全体像と情報処理のメカニズムはよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、短周期生物時計 Hes1 $\leftrightarrow$  下流の転写因子  $\leftrightarrow$  細胞周期や分化誘導、といった短時間から長時間スケールにまたがる情報の流れを解明することを目的とした研究を行った。特に、筋芽細胞株 C2C12 の筋分化モデル系において、生物発光・蛍光レポーターの同時計測を 1 細胞レベルで行い、筋分化・細胞周期の進行下における転写因子ダイナミクスの詳細を明らかにすることを試みた。そして、短周期生物時計の生物学的役割を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、生物発光レポーターで転写因子のプロモーター活性の時系列変化を 1 細胞レベルで可視化しつつ、蛍光レポーター (Fucci) で細胞周期の進行を同時に可視化することを試みた。また、筋分化で ON になるプロモーター下流に蛍光タンパク質遺伝子を連結し、筋分化の ON/OFF を可視化しつつ

短周期生物時計のダイナミクスを計測・比較することを試みた。

## 4. 研究成果

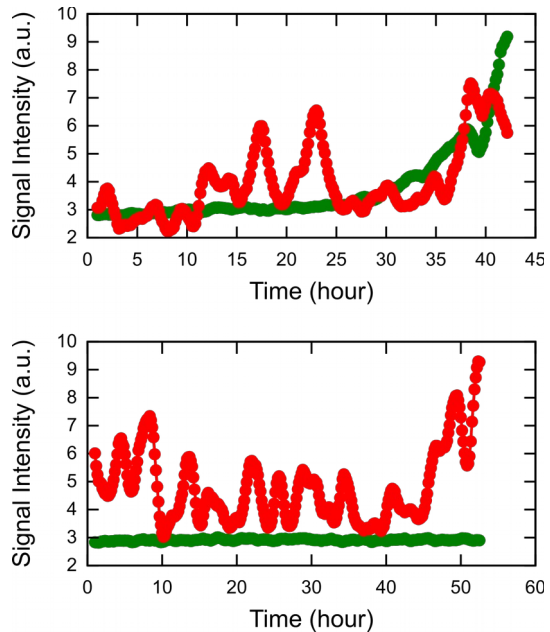


図 1: C2C12 細胞の筋分化過程における Hes1 転写活性のダイナミクス(赤: Hes1 転写活性、緑: Myogenin-Venus)。

細胞周期及び筋分化誘導過程の進行を可視化する蛍光レポーターと、転写因子の短周期ダイナミクスを可視化する発光レポーターを構築した。細胞周期は Fucci(mVenus-hGem) を用いることで S/G2 期を蛍光で可視化し、分化の進行過程については Myogenin プロモーター下流に mVenus を繋げることで筋分化スイッチの ON を可視化することに成功した。C2C12 筋芽細胞で上記のレポーターを組み込んだ安定発現株を樹立し、クローナルラインを単離した。その結果、分化誘導過程における Hes1 短周期リズムの動態変化を測定する系を確立した(図 1)。しかし、分化の誘導前後で振動ダイナミクスに顕著な差異は観察できなかった。また、クローナルラインは分化能を失っているか、分化の誘導効率が低いものが多く、より分化誘導能が高い細胞を材料とした実験の必要性が認識された。

そこでドイツの研究グループとの共同研究において、マウス新生児の初代培養系における筋前駆細胞を用いて短周期リズムの 1 細胞イメージングを行った。その結果、分化前の前

駆細胞において、2~3 時間周期の発現振動を計測できた。現在、論文出版準備中である。

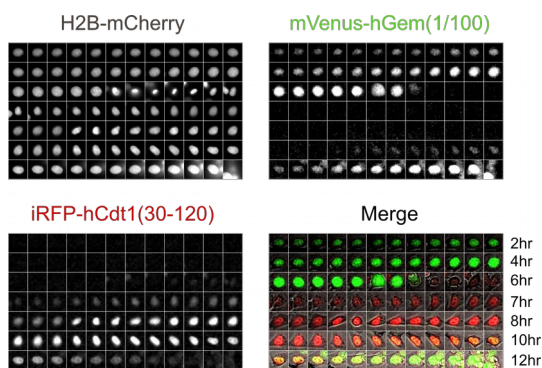


図 2: 近赤外蛍光タンパクによる細胞周期プロープの構築

これらの過程において、新たに近赤外蛍光タンパク質の iRFP を用いた細胞周期プロープの開発を試みた。まず、Fucci の蛍光タンパクを iRFP と置換したコンストラクトの使用を試みたが、核局在と細胞周期特異性を失っており、改良の必要性が生じた。そこで、リンカー配列を工夫したところ、オリジナルの Fucci プロープと同じ挙動を示すコンストラクトが得られた。これにより、蛍光観察の多色化が可能になった。

また、短周期ダイナミクスの生物学的意義を構成的に証明する目的で、任意の遺伝子発現を短時間スケールで制御可能な光遺伝学技術を開発することに成功した(図 3)。この技術をもとに、マウスの神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化を、光照射によって人工的に制御する技術を開発した。この成果は学術論文として掲載された(研究業績 1)。また、短周期ダイナミクスと光遺伝学技術に関するレビュー論文を出版した(研究業績 2)。

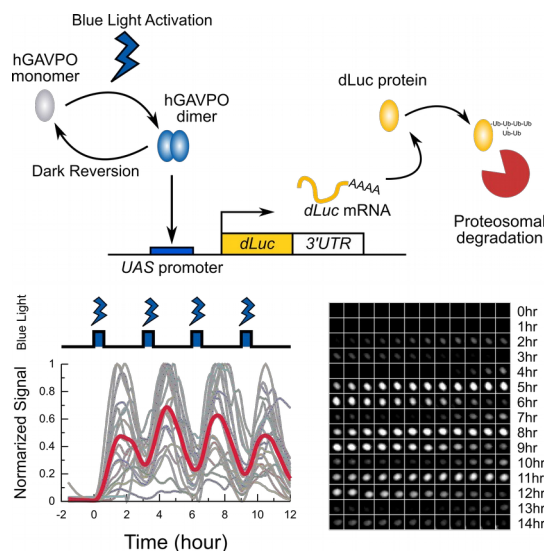


図 3: 遺伝子発現ダイナミクスの光制御。

## 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 3 件)

[1] “Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions”,

A. Isomura and Ryoichiro Kageyama Development 141, 3627 (2014).

[2]”Oscillatory control of determination factors for multipotency versus fate choice in mouse neural progenitors”, Itaru Imayoshi, Akihiro Isomura(筆頭著者と同等の寄与), Yukiko Harima, Kyogo Kawaguchi, Hiroshi Kori, Hitoshi Miyachi, Takahiro K. Fujiwara, Fumiyoshi Ishidate, and Ryoichiro Kageyama Science 342, 1203 (2013).

[3] “Oscillatory gene expression and somitogenesis”, R. Kageyama, Y. Niwa, A. Isomura, A. Gonzalez and Y. Harima WIREs Dev. Biol. 1, 629-641 (2012).

[学会発表](計 2 件)

1. 磯村 彰宏: 光遺伝学による短周期遺伝子発現リズムの引き込み同調, 第 37 回 日本分子生物学会年会 (2014).

2. Akihiro Isomura, Fumiko Ogushi, Hiroshi Kori, Ryoichiro Kageyama: Controlling Natural Genetic Oscillators by Light, The 2015 Winter q-bio meeting (2015).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 幹細胞の増殖と分化の光遺伝学的制御方法

発明者: 影山 龍一郎、磯村 彰宏、今吉 格

権利者: 同上

種類: 発明

番号: PCT/JP2014/074458

出願年月日: 17.09.2014

国内外の別: 国際

○取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

磯村 彰宏 (ISOMURA, Akihiro)

京都大学・ウイルス研究所・研究員

研究者番号: 70512466

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし