

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440095

研究課題名(和文) デグロンを利用した蛍光性プローブによる細胞運命決定の可視化

研究課題名(英文) Visualization of cell fates using degron based fluorescence probes.

研究代表者

阪上 朝子 (SAKAUE, ASAKO)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90462689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞社会のなかで生命現象はどのような時空間パターンで起こるのか？その包括的理解を目標に掲げ2013年度より当研究課題に取り組んできた。レインボー-Fucci、細胞ストレス、糖代謝動態など、細胞個々について状態を可視化し運命を予言するプローブの開発とその性能評価を進めてきた。その過程で、細胞の多様な個性を再認識する機会がたびたびあり「一細胞リアルタイムイメージング」の必要性を痛感した。今後の研究課題では、主にfloxマウスの作製と解析を通して、生命現象の時空間パターンをより生理学的な文脈で理解することを目指す。

研究成果の概要(英文)：To understand the spatio-temporal dynamics of cellular functions in complex multi-cellular systems, we have developed a variety of fluorescent indicators for live cell imaging. The indicators include a Fucci probe that resolves a cell cycle into 7 fractions (CC (Cell-Cycle) Rainbow), oxidative stress probes, and carbohydrate metabolism probes. Practical use of these probes gave us opportunities to realize “cell heterogeneity” and appreciate “cell personality” in many cell culture systems. Our forthcoming studies will focus on generation of flox mouse lines of the probes that allow us to better understand the spatio-temporal regulations of cellular functions in a more physiological context.

研究分野：生物学

キーワード：多細胞社会 生命現象可視化 デグロン 蛍光タンパク Fucci

1. 研究開始当初の背景

多細胞社会における生命現象を時空間的に理解する

個体発生や再生における形態形成、幹細胞の維持や分化、老化、がん細胞の浸潤・転移・腫瘍化、初期化など、多細胞社会における生命現象は多岐にわたる。近年、これらの現象を分子レベルで解明する研究が盛んになり、例えば、細胞周期を制御する内的・外的要因が明らかになってきた。ところが、細胞周期の進行がどのような時空間パターンで展開するのかについて包括的にアプローチする研究がほとんど無かった。DNA複製を検出する従来手法(BrdU, EdU)や古典的手法($[^3\text{H}]$ -thymidine)に対し、最近では蛍光イメージング技術の進歩と共に様々なライブイメージング的手法が登場している。しかしいずれも高解像度のイメージング技術を必要とし、データ解析も安易ではない。我々が開発した **Fucci** 技術(Sakaue-Sawano, Cell. 2008)は、ユビキタスプロモーターによりその遺伝子発現をドライブさせるタイプのもので、個体や培養細胞で容易に細胞周期を可視化する技術として世界標準になりつつある。

蛍光イメージング技術は、生命現象における細胞運命決定の制御機構を解明するのに貢献すると期待されている。また我々のアドバイザー・宮脇らによるカルシウムインディケータ **cameleon** (Miyawaki, Nature. 1997)に端を発する蛍光タンパク質性 **FRET** 型プローブは、あらゆる生命現象に応用されようとしている。新規蛍光プローブの作製、および、それらを組み込んだライブイメージング技術を実践的に開発する過程で、我々はこれまでに、浸潤・転移におけるがん細胞の細胞周期特異性(G_1/S 遷移期)を生体で捉えること

(Sakaue-Sawano, Cell. 2008)、増殖因子(EGF)に応答する **Ras** 活性化の細胞周期特異性(G_1 期)を解くこと(Sakaue-Sawano, Cell. 2008)、マウス脳における神経幹細胞の増殖モードを3次元的に捉えること(Hama, Nat. Neuroscience. 2011)、**Fucci** 蛍光シグナル強度定量法により **postmitotic phase, quiescent G_0 期**を描出すること(Sakaue-Sawano, CSH Press. 2011)などに成功している。

2. 研究の目的

多細胞社会のなかで、生命現象の進行はどのような時空間パターンで起こるのか？本研究では、我々が2008年に報告した細胞周期可視化プローブ:**Fucci**のノウハウを応用し、**E3 ユビキチンリガーゼ-デグロンプローブ開発**を行う。**E3 ユビキチンリガーゼ**は、細胞の恒常性維持に必須の酵素タンパク質である。これらの基質を材料に作製される機能プローブは、個々の細胞の中で起こる生命基本現象を可視化する。存在が明らかになった **E3 ユビキチンリガーゼ**の種類は500を越え、本研究で提案する技術開発を広く適用することで、多様な細胞個性を描出することができる^{と期待される}。特に、細胞が運命を決定する過程を追跡し、その必然性を、細胞が属する細胞社会に関連させて議論することを目標にする。

3. 研究の方法

(1) **Fucci** プローブ開発のノウハウを、**E3 ユビキチンリガーゼ-デグロンプローブ**開発に適用する。

理想的 **Fucci** プローブ；レインボー**Fucci**を開発する。**Fucci**は細胞周期の G_1 期と $S/G_2/M$ 期にある細胞核を異なる2色で標識する蛍光プローブである

(Sakaue-Sawano, Cell. 2008) (第1世代 Fucci および第2世代 Fucci)。現在 G₁, S, G₂ 期を異なる 2~3 色で区別する第3、4 世代 Fucci プロープの開発を進めている。しかしながら、より理想的なプロープは、G₁, S, G₂, M 期に加えて、G₀/quiescent 期を区別できるレインボーFucci である。G₀/quiescent 期特異的に機能するタンパク質のデグロンを利用し、プロープ完成に向けて開発を進める。

* プロープ開発で1番気を使うのが、調節領域(デグロン領域)の抽出とプロープ発現量のコントロールである。目的とするユビキチンリガーゼの endogenous レベルの分解能力が十分に発揮されるプロープを選別していく。

環境依存的に活性化する E3 ユビキチンリガーゼの動態を蛍光シグナルに置き換える。Fucci は、APC^{Cdh1} と SCF^{Skp2} の2種類のデグロン、Geminin(1/110), Cdt1(30/120)をプロープの骨格として利用している。哺乳類における E3 ユビキチンリガーゼは、細胞の恒常性維持に必須の酵素タンパク質群である。RING finger type, HECT type, U-box type の3種類から構成され、その数は500種類を超える(Weissman AM, Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Dikic I, Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 その他レビュー多数)。まずは、低酸素環境[CUL2^{VHL}-HIF1-alpha]、ストレス環境[CUL3^{Keap1}-Nrf2]などを可視化する E3 ユビキチンリガーゼ-デグロンプロープ を作製する。ユビキタスプロモーターでドライブさせたプロープ候補を低侵襲性に細胞に導入し(Lenti virus system を採用)、single cell

imaging analysis(細胞個別的解析)により性能評価を行う。

エピジェネティクス動態を可視化するプロープを実用化にむけ改良を進める。

(2) 運命決定スイッチを可視化する実験系を確立する。

正常細胞(コントロール細胞)として種々のヒト初代培養細胞を導入する。

がん幹細胞の探索を視野に、MCF細胞を導入する。MCF細胞は、Fred R. Millerらにより造腫瘍性の異なる種々のセルラインが確立されている(Breast Cancer Research and Treatment. 2006)。

開発中である flox タイプの Fucci マウスなどを導入する。組織特異的なプロープ発現を実行し、イメージングの解像度をあげる。

上記細胞株や、マウス由来初代培養細胞を in vitro 3次元培養法に適用する。さらに、種々の増殖因子などの刺激や環境変化などにより、多細胞社会における細胞個々の heterogeneity を維持する環境を in vitro において整備する。

(3) プロープの性能向上

複数の現象を多角的に理解するために、

プロープの多色化やプロープの局在操作などを行う。

ユビキチンリガーゼ-デグロンの候補を広範囲にわたり探索する。DNAバンクから候補遺伝子の提供を受け、プロープ作製から性能評価までをシステムチックに行う。

(4) 非侵襲性かつ恒常的に発現する細胞の

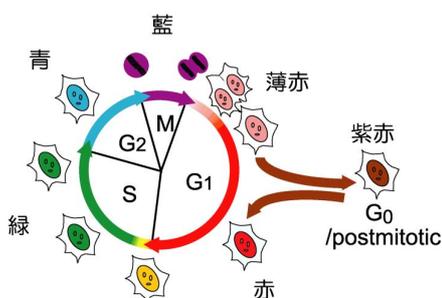
作製

in vitro 3次元培養法を適用し、培養環境をコントロールしながら、個々の反応の **heterogeneity** を可視化する。集団の中で幹細胞の性質を示す細胞を時空間的に描出する。

4. 研究成果

多細胞社会のなかで生命現象はどのような時空間パターンで起こるのか？その包括的理解を目標に2013年度より研究を進めてきた。詳細について以下にまとめる。当研究課題の成果は、平成28年度より交付をうける新学術領域・公募研究へ繋げていく予定である。

(1) レインボーFucci の一つ、G0 を同定する Fucci プローブを共同研究で開発し論文発表した(Oki T, Sci Rep. 2014)。



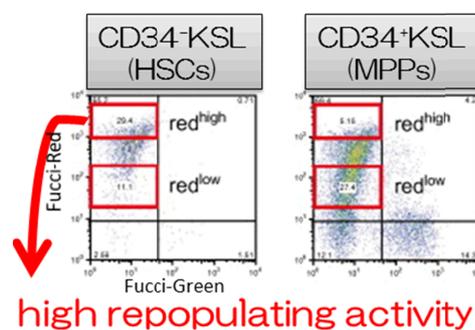
(2) レインボーFucci の一つ、Fucci3.2 の応用研究を進める過程で、培養がん細胞において細胞周期進行特異的に発現・機能する候補遺伝子を突き止めた。

(3) 第4世代Fucci, Fucci4の性能評価について、培養細胞を用いて完了した。また Fucci4 の flox マウスの作製を完了した。今後は、全身性 Cre および組織特異的 Cre マウスとの交配により得られる胎児や個体を材料にして、細胞周期と DNA ダメージとの相関を解析していく。

(4) 低酸素環境[CUL2^{VHL}-HIF1-alpha]+スト

レス環境[CUL3^{Keap1}-Nrf2]+ 細胞周期を同時に可視化するための tricistronic 発現系を構築した。HeLa, NMuMG, MCH10A, 293T 細胞で恒常発現細胞株を確立した。対数増殖期におけるストレス感知が細胞種によって異なること、また同じ細胞種でも、培養の密度や空間次元によって異なることが明らかになった。こうした知見をさらに個体レベルで解析するために、flox マウスの作製を計画する(次の科研費課題に引き継ぐ)。

(5) Fucci マウスを用いて造血幹細胞の repopulating 活性を飛躍的に上げる分画を同定することに成功した(Yo.M, BBRC 2015)。



(6) 定性的観察が可能なエピジェネティクスプローブを完成させ、DNA メチル化を抑える薬物に対する培養細胞個々の反応をタイムラプスイメージングで観察することに成功した。

(7) 糖代謝のフローを可視化するプローブの作製を完了した。

(8) 運命決定スイッチを可視化する実験系として、in vivo imaging に適したマウスライン flox-Fucci2aR の作製を共同研究で進め、論文発表を行った(Mort RL, Cell Cycle, 2014)。

(9) in vitro 3次元培養法の検討において、顕微鏡システムのセットアップを行い、上記で作製した種々のプローブ恒常発現細胞株のイメージングおよび解析を進めた。

細胞個々の状態および運命を可視化するプローブの作製、性能評価を進めながら、細胞個性の多様性を再認識する機会がたびたびあり、一細胞リアルタイムイメージングの必要性を痛感した。当初の研究課題については、培養細胞レベルの研究内容がすべて完了した段階で終了とし、今後の研究課題では、主に flox マウスの作製と解析を行いながら、生命現象の時空間パターンをより生理学的な文脈で理解することを目標に据える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Pineda G, Lennon KM, Delos Santos NP, Lambert-Fliszar F, Riso GL, Lazzari E, Marra MA, Morris S, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Jamieson CH. [Tracking of Normal and Malignant Progenitor Cell Cycle Transit in a Defined Niche](#). Sci Rep. 2016 Apr 4;6:23885. doi: 10.1038/srep23885. 査読有

Takegahara N, Kim H, Mizuno H, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Tomura M, Kanagawa O, Ishii M, Choi Y. [Involvement of Receptor Activator of Nuclear Factor- \$\kappa\$ B Ligand \(RANKL\)-induced Incomplete Cytokinesis in the Polyploidization of Osteoclasts](#). J Biol Chem. 2016 Feb 12;291(7):3439-54. doi: 10.1074/jbc.M115.677427. 査読有

Motiur Rahman M, Takeshita S, Matsuoka K, Kaneko K, Naoe Y, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Ikeda K. [Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: Cell density as a determinant of osteoclast formation](#). Bone. 2015 Dec;81:392-9. doi: 10.1016/j.bone.2015.08.008. 査読有

Kinjyo I, Qin J, Tan SY, Wellard CJ, Mrass P,

Ritchie W, Doi A, Cavanagh LL, Tomura M, [Sakaue-Sawano A](#), Kanagawa O, Miyawaki A, Hodgkin PD, Weninger W. [Real-time tracking of cell cycle progression during CD8+ effector and memory T-cell differentiation](#). Nat Commun. 2015 Feb 24;6:6301. doi: 10.1038/ncomms7301. 査読有

Yo M, [Sakaue-Sawano A](#), Noda S, Miyawaki A, Miyoshi H. [Fucci-guided purification of hematopoietic stem cells with high repopulating activity](#). Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 30;457(1):7-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.074. 査読有

Mort RL, Ford MJ, [Sakaue-Sawano A](#), Lindstrom NO, Casadio A, Douglas AT, Keighren MA, Hohenstein P, Miyawaki A, Jackson JJ. [Fucci2a: a bicistronic cell cycle reporter that allows Cre mediated tissue specific expression in mice](#). Cell Cycle. 2014;13(17):2681-96. doi: 10.4161/15384101.2015.945381. 査読有

Fukuhara S, Zhang J, Yuge S, Ando K, Wakayama Y, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Mochizuki N. [Visualizing the cell-cycle progression of endothelial cells in zebrafish](#). Dev Biol. 2014 Sep 1;393(1):10-23. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.06.015. 査読有

[Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A. [Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progressions with fucci technology](#). Cold Spring Harb Protoc. 2014 May 1;2014(5). pii: pdb.prot080408. doi: 10.1101/pdb.prot080408. 査読有

Oki T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, [Sakaue-Sawano A](#), Niida A, Miyano S, Aburatani H, Kiyonari H, Miyawaki A, Kitamura T. [A novel cell-cycle-indicator](#),

[mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition.](#) Sci Rep. 2014 Feb 6;4:4012. doi: 10.1038/srep04012. 査読有

Nonomura K, Yamaguchi Y, Hamachi M, Koike M, Uchiyama Y, Nakazato K, Mochizuki A, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Yoshida H, Kuida K, Miura M. [Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen-producing cells.](#) Dev Cell. 2013 Dec 23;27(6):621-34. doi:

10.1016/j.devcel.2013.11.015. 査読有

[Sakaue-Sawano A](#), Hoshida T, Yo M, Takahashi R, Ohtawa K, Arai T, Takahashi E, Noda S, Miyoshi H, Miyawaki A. [Visualizing developmentally programmed endoreplication in mammals using ubiquitin oscillators.](#)

Development. 2013 Nov;140(22):4624-32. doi: 10.1242/dev.099226. 査読有

Tomura M, [Sakaue-Sawano A](#), Mori Y, Takase-Utsugi M, Hata A, Ohtawa K, Kanagawa O, Miyawaki A. [Contrasting quiescent G0 phase with mitotic cell cycling in the mouse immune system.](#) PLoS One. 2013 Sep 16;8(9):e73801. doi: 10.1371/journal.pone.0073801. 査読有

Nishimura K, Oki T, Kitaura J, Kuninaka S, Saya H, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Kitamura T. [APC\(CDH1\) targets MgcRacGAP for destruction in the late M phase.](#) PLoS One. 2013 May 16;8(5):e63001. doi: 10.1371/journal.pone.0063001. 査読有

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

10.1242/dev.084111. 査読有

Takase M, Iida R, Maruya M, [Sakaue-Sawano A](#), Miyawaki A, Wakayama T, Nishigami S, Fagarasan S, Kanagawa O.

[Nuclear transferred embryonic stem cells for analysis of B1 B-lymphocyte development.](#) Int Immunol. 2013 Mar;25(3):145-56. doi: 10.1093/intimm/dxs095. 査読有

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔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—沢野 朝子 (Sakaue-Sawano Asako)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：90462689