

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15036

研究課題名(和文) 老化に伴う脳内エピゲノム変化の超解像イメージングを用いた可視化解析

研究課題名(英文) Super-resolution imaging analysis of epigenetic states in the brain cells during aging

研究代表者

稲生 大輔(Daisuke, Ino)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40721981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オープンクロマチンは核の中でもゲノムがゆるんだ状態で遺伝情報が読み取られやすくなっている領域であり、細胞の状態や機能を反映していると考えられる。そこで、申請者は“オープンクロマチン領域”を可視化する新規タンパク質型プローブ ChrocodiLEの開発を行った。ChrocodiLEを発現する動物(マウス、線虫、ハエ)の作製も行い、それぞれChrocodiLEを発現する個体を得られた。すなわち、ChrocodiLEは培養細胞のみならず、幅広い組織・個体におけるオープンクロマチン構造を可視化するための有用な新規ツールであると強く考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年次世代シーケンサーを用いたATAC-seqなどの方法により、オープンクロマチン領域の解析が活発に行われてきているが、生きた細胞内でのオープンクロマチン構造を解析できるツールは今まで存在しなかった。ChrocodiLEは本課題を解決するための世界初のツールである。特にChrocodiLEを発現する動物の作製に成功しているが、これらを疾患モデルと組み合わせることで、本研究分野のさらなる進展が期待できる。これらを活用することで、クロマチンの異常と病気の関連において、既存の手法では見えてこなかった現象が明らかになってくるであろう。

研究成果の概要(英文)：Owing to the extensive researches, it has been revealed that formation of “open chromatin”, a region where genomic DNA becomes loose and highly-accessible to the gene regulatory elements, is likely to be a key process to achieve the regulated gene expression. Thus, the technologies to study the 3D-organization of open chromatin have been developing. However, compared with the spatial information, the temporal information of open chromatin still remains limited, likely due to the lack of the suitable technology. In this work, we developed a new genetically-encoded fluorescent probe named ChrocodiLE, which enables us to visualize open chromatin dynamics in living cells. We generated ChrocodiLE-expressing animals (mice, nematodes, and flies). We believe that ChrocodiLE-expressing animals will be extremely helpful in studying the dynamics of open chromatin in a variety of cellular processes.

研究分野：神経科学

キーワード：イメージング ゲノム 脳

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、超解像イメージング法を用いた一細胞ゲノム解析により、老化に伴って、脳内のどの細胞において、どのようなエピゲノムの変化が起こるかを明らかにすることを目的とする。脳の老化においては、変性が観察される神経細胞が主に着目されてきたが、これまで脇役と考えられてきたアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、NG2 グリアといったグリア細胞の関与も示唆されてきている。また、海馬歯状回など一部の脳領域においては、神経幹細胞が維持され一生に渡って神経細胞が新生することが知られているが、この神経新生と老化との関連も示唆されている。本研究では、これらの細胞老化に伴ったゲノム状態の変化を解明することを最終目標とした。

近年、ゲノム状態を知るための方法として、ゲノム中の緩んだ領域 (オープンクロマチン) を網羅的に解析する手法が精力的に行われている。特に 2015 年に発表された ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing) はその簡便さ故、現在本分野におけるスタンダードとなりつつある。しかしながら、本手法は細胞を破碎し回収したサンプルにより解析が行われる故、細胞の破壊により引き起こされうるアーティファクトから逃れられない上、生きた細胞内で時々刻々と進む動態変化を解析することが困難である。よって、本分野においては、生きた細胞内においてオープンクロマチンを解析することができる新しい世代の方法の開発が強く求められている。

## 2. 研究の目的

上記の研究分野における背景を踏まえ、本研究では、生細胞においてオープンクロマチンを可視化するための蛍光プローブの開発を目指すことにした。特に疾患モデルへの応用を将来的な視野に入れ、培養細胞への応用のみならず、本蛍光プローブを発現した動物の作製まで目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) オープンクロマチン可視化蛍光プローブ ChrocodiLE の作製
- (2) 培養細胞におけるオープンクロマチンのライブイメージング
- (3) ChrocodiLE 発現個体の作製
- (4) 脳組織透明化による網羅的な核構造の解析

## 4. 研究成果

- (1) オープンクロマチン可視化蛍光プローブ ChrocodiLE の作製

高親和性 DNA 結合タンパク質をベースに様々な変異を導入し、蛍光タンパク質を融合させたプローブを作製した。細胞に発現させた時の核の様相がワニ柄に見えたことなどから、我々は本プローブを ChrocodiLE と命名した。マーカー染色による評価などから、ChrocodiLE は、ほどけた領域に選択的に結合する性質を持っていることが分かった。さらに ChIP-seq を行い、ChrocodiLE のゲノム上での結合部位を解析したところ、既知のオープンクロマチンマーカーの結合部位と極めて高い相関を示すことが分かった。

(2) 培養細胞におけるオープンクロマチンのライブイメージング

ChrocodiLE を発現した HeLa 細胞を薬物により刺激し、刺激に応答した DNA の構造変化を観察した。また、高速超解像ライブイメージングを適用したところ、動的な部位と静的な部位が存在することが分かった。

(3) ChrocodiLE 発現個体の作製

老化や精神疾患のようなエピゲノムやクロマチンリモデリングの異常が関連する現象への応用を目指し、ChrocodiLE 発現個体の作製を行った。これまでに、マウス、線虫、ハエの作製に成功している。

(4) 脳組織透明化による網羅的な核構造の解析

透明化した脳組織を核染色し、共焦点顕微鏡により 3 次元的に広視野撮影を行う手法を最適化した。今後 ChrocodiLE 発現個体を繁殖させ、本手法を適用した解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Daisuke Ino, Kazuho Ikeda, Yasushi Okada   |
| 2. 発表標題<br>Development of a new fluorescent probe for visualization of open chromatin structure in living cells |
| 3. 学会等名<br>WCP2018 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>稲生大輔, 池田一穂, 岡田康志   |
| 2. 発表標題<br>Development of a new fluorescent probe for visualization of open chromatin structure in living cells |
| 3. 学会等名<br>第70回日本細胞生物学会大会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>稲生 大輔   |
| 2. 発表標題<br>Development of new fluorescent probes for imaging of prosocial signaling in the brain |
| 3. 学会等名<br>第93回 日本薬理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

|                                 |              |               |
|---------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>特願2019-074004       | 発明者<br>2019  | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2019-074004 | 出願年<br>2019年 | 国内・外国の別<br>国内 |

|                                     |              |               |
|-------------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>PCT/JP2020/ 15966       | 発明者<br>2020  | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、PCT/JP2020/ 15966 | 出願年<br>2020年 | 国内・外国の別<br>外国 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室のホームページ  
<http://ana1.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

Research map  
<https://researchmap.jp/daisukeino>

において成果を随時更新する。

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|