

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14564

研究課題名(和文) どうして「透けて」見えるのか? -透明な動物の作製に向けて-

研究課題名(英文) How to get transparency for generation of transparent animals.

研究代表者

宮成 悠介 (Miyanari, Yusuke)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号：60469608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年の蛍光タンパク質、および発光タンパク質を応用したイメージング技術の発展により、生体内での様々なバイオイメーキングが可能となった。本研究では、透明な生物のモデル生物として、レプトケファルスを対象とし、透明性の分子基盤の解明を目指した。透明性とクロマチン高次構造との相関を探るために、細胞レベルで核の構造を解析した。ここでは、特にヘテロクロマチンの構造に注目するために、細胞をDAPI染色、およびヒストン修飾(H3K9me3など)で染色し、その核内での分布を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、クロマチン高次構造と透明性との相関を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Recent advantages of fluorescent proteins and chemi-luminescent proteins allow us to monitor various biological phenomenon through biological imaging. In this project, we aim to understand molecular mechanisms underlying transparency of Leptocephalus, transparent larva of the eel. We analyzed chromatin structures in cells of its transparent tissues to find out a contribution of chromatin structures onto the transparency. We first focused on heterochromatin structure, which is one of potential nuclear structure to affect reflection of light. We stained cells with DAPI and H3K9me3, a histone marker for heterochromatin and found no significant correlation between the transparency and three dimensional distribution of heterochromatin within nuclear space.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン高次構造

1. 研究開始当初の背景

レプトケファルスは、ウナギ目の魚類に見られる幼生であり、細長く無色透明な体を持つ。これまで、レプトケファルスの生態については研究が進められてきたが(Kawakami Y., PlosOne, 2014)、その体が透明に見えるメカニズムは全く知られていない。物体が透明であるためには、可視光線が物体の色素に吸収されずに透過すること、さらに物体の表面や内部で可視光線が散乱(屈折)しないことが必要となる。レプトケファルスは無色透明であることから、色素は存在せず、光の散乱(屈折)を抑える機構が存在すると考えられる。

生体内における光の散乱の主な原因の一つは「核」である。核は最も大きなオルガネラであり、高密度で凝集したクロマチン構造は光の屈折を引き起こす(Drezek R., J.Biomed.Opt., 2003)。哺乳類の網膜細胞では、特殊なクロマチン構造をとった核が、マイクロレンズとして機能することで光の屈折を抑制している(Solovei I., Cell, 2009)。

本研究では、核を「光の屈折を引き起こす構造体」として捉え、レプトケファルスが「どうして透明に見えるのか?」、その仕組みを明らかにする。

2. 研究の目的

蛍光や発光など「可視光」を利用したバイオイメージング技術の発展により、生体内での様々な生命現象をモニターすることが可能となった。しかし、ほとんどの生体組織は不透明であるため、その深部を観察するのは困難である。ウナギ目の幼生であるレプトケファルスはその体が無色透明であり、組織の深部を容易に観察することができる。その「透明になる仕組み」を理解し、模倣すれば、バイオイメージングに最適化した「透明なモデル動物」を作製することが可能になると考えられる。本研究では、**レプトケファルスが透明に見えるメカニズムを、以下の異なる2つのアプ**

プローチにより明らかにする。

(1) 光の屈折に關与する核内クロマチン構造の解析。

(2) 核の屈折率を均一化させる細胞内因子の同定。

3. 研究の方法

本研究課題では、レプトケファルスの体が透明になるメカニズムを、以下の2つの異なるアプローチにより明らかにする。

(1) 形態学的アプローチ; 光の屈折に關与する核内クロマチン構造の解析。

生体内の様々な細胞種はそれぞれ特異的な核内クロマチン構造を有しており、その特徴はクロマチンが凝集したヘテロクロマチン領域の核内分布パターンに顕著に現れる。多くの細胞種では、ヘテロクロマチン領域が核内でランダムに分散しているが、眼球の網膜上に存在する桿体細胞(Rod cell)は、核の中央部分に大きなヘテロクロマチン領域が分布する。多くの細胞種のようにヘテロクロマチン領域が核内に散在していると、その内部を光が通過する際、光の屈折が起こり、光は直進することなく散乱する。一方、桿体細胞の場合は、ヘテロクロマチンが中央に凝集しているために、屈折が起こりにくく、核に侵入した光が直進する(Solovei I., Cell, 2009)。

本研究では、レプトケファルスのヘテロクロマチン核内分布を解析し、核内クロマチン構造と光の透過性の相関を見いだす。

(2) 生化学的アプローチ; 生体組織の屈折率を一定にする細胞内因子の分離同定。

生体内では様々な物質と水の屈折率の「差」が大きいほど、光は屈折し、散乱する。レプトケファルスの体内には骨や臓器があるにも関わらず、その体は透明に見えることから、その体内の屈折率が一定に保たれていると考えられる。固定した組織標本を透

明化させる技術 (Scale 法など) では、組織標本に屈折率の高い尿素などの溶媒を充填し、組織内の屈折率を一様にする事で、光の散乱が抑えられ組織が透明になる (Hama H., Nat.Neuro.2011)。眼球の水晶体では、クリスタリンというタンパク質が細胞内に高発現することにより、細胞内の屈折率が一様となり、光の散乱が抑えられる (Zampighi GA., PlosOne, 2011)。レプトケファルスの細胞内にも、屈折率を一様にするような因子が存在すると予想される。レプトケファルスの体側から採取した細胞抽出液を生化学的に解析する。

Step 1;

レプトケファルスの体側から採取した細胞抽出液を生化学的に解析する。屈折率に影響を与えるタンパク質の有無を調べるため、細胞抽出液をタンパク質分解酵素で処理し、抽出液の屈折率の変化を解析する。(平成 27 年度)

Step 2; 細胞抽出液を液体カラムクロマトグラフィー (FPLC, 研究所の共用機器として既に所有) によって分画し、目的因子を精製する。ここでは分画された細胞抽出液の屈折率を測定することにより、目的因子を含む画分を絞り込む。目的因子を質量分析計、ペプチドシーケンス機などを用いて解析することで同定する。

4 . 研究成果

(1) 形態学的アプローチ; 光の屈折に關与する核内クロマチン構造の解析

まず、組織標本の作製手順の検討をおこなった。レプトケファルスの組織は 4 %ホルムアルデヒド中で固定すると、組織の自家蛍光が非常に上昇することが明らかとなった。自家蛍光は、主に青、緑の蛍光波長領域に観察され、その後の蛍光染色解析に大きな困難をもたらす。そこで、固定条件の検討、および CUBIC 法などによる透明化

処理をおこなったところ、自家蛍光を十分に除去することに成功した。CUBIC 法では脂質除去の工程があるため、自家蛍光はレプトケファルスの脂質に由来すると考えられる。また、CUBIC 法によって調製したサンプルを用いて蛍光免疫染色をおこなうために、抗体の反応条件を検討した。ここでは、組織中への抗体の浸透度を高めるために、塩濃度および PVP などの反応添加物について検討をおこなうことで、効率的に組織染色することに成功した。

次に、蛍光免疫染色法によってヘテロクロマチンマーカである DAPI, H3K9me3, H3K27me3 の核内局在の解析をおこなった。恒常的なヘテロクロマチンマーカである H3K9me3 について、透明性の高い組織 (表皮など) では、核内にヘテロクロマチン様の構造 (クロモセンター) が集積した状態で局在するのに対し、透明性の低い組織 (心筋、消化器など) はヘテロクロマチン構造が核内に一様に分散した状態で局在していた。このような組織特異的な核内構造の違いは、マウスにおける網膜細胞 (Rod cell) にも同様に観察され、光の屈折率に大きな影響を与えることが既に報告されている。マウス以外では、これまでに同様の報告がなく、非常に興味深い。一方で、もう一つのヘテロクロマチンマーカである H3K27me3 に関しては、そのような特徴的な染色パターンは観察されず、どの組織においても核内が一様に染色された。次に、活性型クロマチンである H3K4me3 について免疫染色をおこなったところ、全ての細胞において H3K9me3 と排他的な染色パターンとなった。

また、DAPI 染色のパターンから核内における核小体が専有する体積の割合を算出したところ、不透明な組織において核小体の体積が著しく大きいことが明らかとなった。

これらの実験結果は、ヘテロクロマチンが集積してできるクロモセーター様構造の核内集積、および核内における核小体の volume が、細胞の屈折率と相関があることを示唆している。クロモセーターや核小体は、周辺のゲノム領域とくらべて屈折率が大きく異なることが知られており、細胞の不透明性を引き起こす原因の1つと考えられるが、その詳細については更なる解析が必要である。

<今後の展開>

レプトケファルスが発生が進むと次第に透明性が失われていくことが知られている。本研究では、発生初期のレプトケファルスのみ解析をおこなったが、今後は発生に伴って、核内構造がどのように変化し、透明性との因果関係を探る予定である。

(2) 生化学的アプローチ; 生体組織の屈折率を一定にする細胞内因子の分離同定。

生化学的解析をおこなうのに十分なレプトケファルス試料を入手することができなかったために(不漁のため)、本プロジェクトでは(1)の解析に注力した。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Unlocking nuclear architectures, Yusuke Miyanari, 第三回 1 分子 1 細胞生物学研究会, :2016 年 9 月 19 日, リゾートイン青の洞窟, 沖縄, 石垣市

Roles of nuclear architectures,

Yusuke Miyanari, Chromatin club, 2016 年 07 月 11-12 日ピラデスト今津(滋賀県, 高島市)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮成 悠介 (Miyanari Yusuke)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号: 60469608