

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18467

研究課題名(和文) 遺伝子核内配置 - 転写同時ライブイメージングを利用した多能性幹細胞不均一性の解明

研究課題名(英文) Analysis of pluripotent stem cell heterogeneity using simultaneous live imaging of gene nuclear localization and transcriptional activity

研究代表者

落合 博(Ochiai, Hiroshi)

広島大学・理学研究科・特任講師

研究者番号：60640753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核内では各染色体が完全に混ざり合うこと無く個々の領域を保ち、DNAや核内タンパク質から成る核内構造体が不均一に分布している。また、特定の遺伝子の発現には、プロモーターと遠方の転写調節領域の相互作用が影響することが知られている。しかし、染色体や核内構造体の空間配置は細胞分裂ごとにランダムに決まり、また間期において動的に揺らいでおり、細胞間で遺伝子発現制御能の多様性を生む要因となり得るが、技術的困難が多く、詳細は不明である。本研究では、内在遺伝子の転写と核内配置の同時可視化システムを確立し、本システムを利用してマウス胚性幹細胞における遺伝子発現量の不均一性の発生メカニズムの解明をめざす。

研究成果の概要(英文)：Within the cell nucleus, individual chromosomes are kept in individual regions without being completely mixed, and nuclear structures composed of DNA and nuclear proteins are distributed non-uniformly. It is also known that the interaction between the promoters and the distant regulatory elements affects the expression of specific genes. However, the spatial arrangement of chromosomes and nuclear structures is randomly determined for each cell division, and is dynamically fluctuating in interphase, which may cause cell-to-cell heterogeneity in gene expression, but there are many technical difficulties. In this study, we try to establish a simultaneous visualization system of endogenous gene transcription and nuclear localization, and elucidate the mechanism of occurrence of gene expression heterogeneity in mouse embryonic stem cells using this system.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン動態 転写 ライブイメージング 染色体 ゲノムDNA 転写発現

1. 研究開始当初の背景

マウス胚性幹(ES)細胞では、同一環境下であるにもかかわらず、多能性維持に極めて重要な転写因子 NANOG を含む複数因子の発現量に細胞間で大きな多様性が認められる。この多様性は、細胞集団内から分化しやすい細胞を誘導するために、積極的に生み出されていると考えられている(Torres-Padilla et al., Development, 2014)。多様性を生む要因には、シグナル因子を介した細胞間相互作用や、遺伝子調節ネットワーク中のネガティブフィードバック構造が挙げられる。一方で研究代表者は、マウス ES 細胞において、Nanog の転写動態を定量化し、1) ON または OFF のプロモーター状態が確率的に遷移し、ON 状態ではほぼ一定の転写速度を示すこと、また 2) この遷移が比較的遅く、NANOG 発現量の不均一性の発生に有意に寄与していることを見出した(Ochiai et al., Sci Rep, 2014)。また興味深いことに、研究代表者は Nanog の存在する 6 番染色体が倍加し、セントロメア付近でつながった特殊な細胞株を偶然樹立し、同一染色体上の Nanog 間では、異なる染色体上のそれらと比較して転写頻度の相関が有意に高いことを見出した。この結果は、同一核内の相同染色体上の遺伝子が別々の制御を受けていること、すなわち細胞核内で転写活性の異なる空間的に不均一な”場”が存在することを示唆している。また、近年、Nanog 遺伝子はマウス ES 細胞特異的に、様々な染色体上の領域と相互作用していることが報告されている(Apostolou et al., Cell Stem Cell, 2013)。細胞核内では個々の染色体がテリトリーを形成しているが、隣接する染色体は細胞ごとに異なっていると考えられている(Nagano et al., Nature, 2014)。このため研究代表者は、細胞核内の不均一性が細胞間の遺伝子発現量の多様性に大きく影響している可能性があると考えた。しかし、間期においてゲノム DNA は動的に揺らいでいるため、上記の可能性を検証する為には特定の内在遺伝子の転写と核内挙動を同時に可視化する必要がある。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では、まず 1) 内在遺伝子の転写と核内配置の同時可視化システムを確立し、2) 本システムを利用して細胞核内の不均一性と遺伝子発現の関係を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 特定の内在遺伝子の転写と核内配置の同時可視化(ROLEX)システムの確立

転写を可視化する技術として MS2 システムが知られている。本システムでは MS2 リピートを任意の遺伝子領域に挿入し、転写された MS2 RNA に特異的に結合する MCP と赤色蛍光

タンパク質(MCP-RFP)との融合タンパク質を発現させることで、生細胞核内の転写部位を経時的に可視化できる(Lionnet et al., EMBO Rep, 2012)。また CRISPR/dCas9-GFP システムを利用した特定 DNA 領域の可視化技術が報告されている(Chen et al., Cell, 2013)。研究代表者は予備実験で、MS2 システムおよび CRISPR/dCas9-GFP システムを併用することで、特定の内在遺伝子の転写と核内配置を同時に可視化できることを確認し、Real-time Observation of Localization and EXpression of endogenous gene (ROLEX) システムと名付けた。今後本技術が転写効率へ与える影響を詳細に検証する。本技術には特定遺伝子領域に MS2 リピートを事前に挿入する必要があるが、研究代表者はこれまでに人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変に関する多くの経験を持っており(Ochiai et al, PNAS, 2011; Watanabe, Ochiai et al., Nat Commun, 2013; Ochiai et al., PNAS, 2014) 問題なく遂行できると考える。

(2) ROLEX システムを利用した特定内在遺伝子の核内挙動と転写ダイナミクスの解析

研究代表者はこれまでに、Nanog, Oct4, Stat3 など複数の遺伝子に MS2 リピートを挿入した株を樹立している。これら遺伝子について、ROLEX システムを利用して核内挙動と転写ダイナミクスを定量的に解析する。また Nanog と Oct4 に関しては染色体内または染色体間で相互作用する領域がすでに報告されている(Apostolou et al., Cell Stem Cell, 2013; Wei et al., Cell Stem Cell, 2013)。そこで、これら相互作用(または非相互作用)領域も同時に可視化し、ゲノム領域の遠距離相互作用ダイナミクスと転写ダイナミクスを解析する。

4. 研究成果

初年度に 1) のシステム、Real-time Observation of Localization and EXpression (ROLEX) システムを確立した(図 1)。

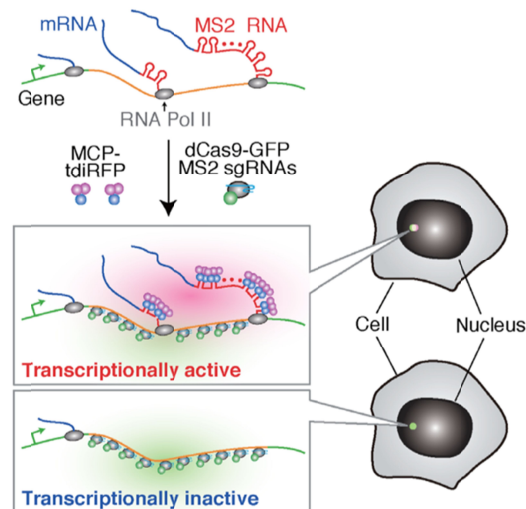


図 1 ROLEX システム (Ochiai et al., NAR, 2015)

まず本系がうまく作動するかどうか確認するために、Nanog 遺伝子領域の片対立遺伝子に MS2 リピートが挿入されたマウス ES 細胞に、dCas9-GFP を薬剤誘導型で発現させ、さらに MCP-iRFP を安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株に MS2 領域を標的とする sgRNA を導入したところ、遺伝子領域が GFP 輝点と核内に確認され、さらに転写活性を示す RFP 輝点が GFP 輝点と重なって検出された。これら輝点が目的の遺伝子領域を示しているかどうか確認するために、RNA-および DNA-FISH を実施し、これらが Nanog 遺伝子領域であることを確認した。dCas9 は遺伝子領域に結合することにより、RNA ポリメラーゼによる転写を阻害することが報告されていた。ただし、本現象は主に大腸菌などの細菌では顕著に見られるものの、哺乳類細胞では sgRNA の位置や配列によって効果が大きく異なることが示されていた。そこで、本研究で使用した MS2 配列を標的とする sgRNA が Nanog の発現に影響があるのか確かめるために、sgRNA を導入した細胞における Nanog タンパク質発現量を確認したところ、大きな発現量の変化が認められないことを確認した。

次に、本システムを利用して、多能性維持に重要な転写因子 Nanog および Oct4 をコードする遺伝子の転写活性と核内での挙動を調べた。その結果、Oct4 遺伝子では転写活性によって核内における流動性に大きな変動は認められなかったものの、Nanog は非転写状態において著しく核内流動性が上昇することがわかった。Nanog プロモーター領域は、上流および下流 30Mb に及ぶ広範囲中の複数の領域と相互作用することがわかっている。これらのことから、Nanog 遺伝子は転写活性状態において、複数の領域と相互作用し、転写活性に必要な因子が相互作用しやすい状態を形成し、その間安定的な転写が起き、さらに低い流動性を示したのではないかと考えられた。一方で、非転写状態ではそのような相互作用が無いために、著しく高い流動性を示した可能性が考えられた。このことから、Nanog 遺伝子の確率的な転写活性化には、Nanog 遺伝子と複数の遠方ゲノム領域との不安定な相互作用が関係していることが示唆された(Ochiai et al, NAR, 2015)。また、これら Nanog と相互作用する領域に密集した Sox2 クラスタを形成することが報告されている。HHMI Janelia Campus の Zhe Liu 博士はこれまでに生きたマウス ES 細胞内で、Sox2 クラスタを可視化する技術を確立している。Zhe Liu 博士と共同で、Nanog の上流転写因子である Sox2 の細胞内クラスタと ROLEX システムを利用して Nanog 遺伝子の転写と核内局在のライブイメージングを行ったところ、Nanog の転写時に Sox2 クラスタが Nanog 領域により近傍に位置する傾向があることがわかった。このことから、Nanog 遺伝子領域の空間的な異質性が発現量に影響

を与えている可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Hiroshi Ochiai, Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 16, 2015, 21137, <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/21128>

Hiroshi Ochiai, Takeshi Sugawara, Takashi Yamamoto, Simultaneous live imaging of the transcription and nuclear position of specific genes, Nucleic Acids Research, 査読有, 43, 2015, e127, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv624>

[学会発表](計 8 件)

落合 博, 特定内在遺伝子の転写活性および核内局在のライブイメージング, 産総研 中国センター シンポジウム ~生命科学の革新的展開~, 2017

Hiroshi Ochiai, Relationship between nuclear dynamics and gene expression noise in pluripotent stem cell, 第 68 回日本細胞生物学会, 2016

Hiroshi Ochiai, Active nuclear dynamics promotes heterochromatin clustering, The 4th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, 2015

Ochiai H., Sugawara T. & Yamamoto T., Simultaneous live imaging of a specific gene's transcription and dynamics, 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 BMB2015, 2015

落合 博, 間期細胞核ダイナミクスとヘテロクロマチン領域の集合, 平成 27 年度遺伝研研究会「クロマチン・細胞核構造の形成とダイナミクスによるゲノム機能制御」, 2015

Hiroshi Ochiai, Simultaneous live imaging of the transcription and nuclear position of specific genes, 2015 TIC (Transcription Imaging Consortium) meeting, Janelia Research Campus (VA), USA, 2015

落合 博, 遺伝子の転写活性と各内局在の同時ライブイメージング, 第七回 光イメ

ーシング若手の会「光塾」, 広島大学, 2015

Hiroshi Ochiai, Simultaneous Live Imaging of the Transcription and Nuclear Position of Specific Genes, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, Awaji, Japan, 2015

〔図書〕(計 1件)

落合 博, 羊土社, 実験医学別冊「論文だけではわからない ゲノム編集成功の秘訣 Q&A TALEN, CRISPR/Cas9 の極意」(山本卓編), 2015, 269 ページ(担当:分担執筆, 範囲:哺乳類培養細胞でのゲノム編集 (p.79-95))

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称:細胞の作製方法および該作製方法で作製された細胞

発明者:落合 博, 山本 卓

権利者:国立大学法人広島大学

種類:特許

番号:特願 2015-080648

出願年月日:2015年04月10日

国内外の別:国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

Researchmap ページ

<https://researchmap.jp/HiroshiOchiai/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

落合 博 (OCHIAI, Hiroshi)

広島大学・大学院理学研究科・特任講師

研究者番号: 60640753

### (2)研究協力者

Zhe Liu

Howard Hughes Medical Institute,

Janelia Research Campus, Group Leader