

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20200006

研究課題名（和文）細胞分化における遺伝子発現のゆらぎとその制御

研究課題名（英文）Gene expression noise during cell differentiation and its regulation

研究代表者

山本 卓 (YAMAMOTO TAKASHI)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90244102

研究成果の概要（和文）：

細胞分化過程での遺伝子発現を定量的にとらえるために、人工酵素ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用いたレポーター遺伝子のゲノム標的遺伝子への挿入システムの確立を行った。この方法を用いて、ウニ胚一次間充織細胞の分化遺伝子である *HpEts* 遺伝子の発現レベルを、発生過程を通して1細胞レベルで定量化し、分化に伴って細胞間の発現のゆらぎが増大することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In order to analyze the gene expression level during cell differentiation quantitatively, we established the reporter-knockin system into specific site of genome using engineered zinc-finger nucleases (ZFNs). Using this technology, we inserted reporter genes into target sites within the sea urchin *Ets* (*HpEts*) gene, which is expressed in presumptive primary mesenchyme cells (PMCs) and PMCs, and monitored the expression at one cell level during development, and found that gene expression noise increased during PMC differentiation in sea urchin development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	22,400,000	6,720,000	29,120,000

研究分野：ゲノム科学、発生生物学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：ゆらぎ、細胞分化、発生・分化、遺伝子、ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する多種多数の細胞は、発生過程での特異的な遺伝子発現によって生み出される。この特異的な発現は、細胞分裂で受け継がれる調節因子の非対称的な分配やシグナル因子を介した細胞間相互作用によって段階的に決定されていく。このため、多細胞生物での細胞分化を理解するためには、分化過程での遺伝子発現ダイナミクスと細胞の形態的・機能的変化など現象との相関

から、分化に特徴的な発現ダイナミクスを明らかにする必要がある。一方、遺伝子発現など細胞内の化学反応には、個々の細胞ごとに確率的な「ゆらぎ」が存在することが知られている。多細胞生物には細胞内のゆらぎに加えて、細胞間の化学反応に対するゆらぎが存在すると考えられる。これらのゆらぎの元で調和のとれた発生や柔軟な環境応答を実行する多細胞生物には、ゆらぎを細胞内および

細胞間レベルで調節する機構が備わっていると考えられる。しかしながら、多細胞生物の細胞分化過程においてゆらぎがどのように制御されているのか、その機構についてはこれまで明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、多細胞生物の細胞分化過程での発現ダイナミクスを細胞レベルで解析することにより、遺伝子発現のゆらぎが細胞運命の決定に与える影響や役割を明らかにすることを目的とする。さらに、細胞間相互作用がゆらぎに与える効果を定量的に解析することにより、個々の細胞のゆらぎが細胞集団として統合されて細胞運命が決定される理論的フレームワークを解明する

## 3. 研究の方法

1) 発生過程における遺伝子発現のゆらぎの解析・・・本項目では、単細胞生物で見られる遺伝子発現のゆらぎが多細胞生物の発生過程において存在するかどうかを、1細胞レベルでの遺伝子発現ダイナミクスの測定することにより調べる。発現ダイナミクスを定量的に解析するために、*GFP* 遺伝子をウニゲノム DNA 中の特定の位置へ、1コピー導入する方法を開発する。*GFP* 遺伝子を導入するゲノム DNA 中の位置を決定し、特異的に切断する zinc-finger nuclease (ZFN) を設計する。ZFN が特異的配列を認識して DNA 2本鎖を切断するかどうかを培養細胞において確認した後、設計した *ZFN mRNA* を *GFP* ドナーベクターと共にウニ受精卵に顕微注射し、*HpEts* 遺伝子領域に *GFP* 遺伝子を導入する。これらの操作により、*GFP* タンパク質が *HpTb* プロモーターの制御のもと中胚葉細胞に特異的に発現する初期胚を作り出す。さらに、1細胞単位で発生過程の蛍光量を測定し、発現のゆらぎが存在するかどうか調べる。

2) 細胞応答のゆらぎと細胞間相互作用に基づく細胞運命決定の解析・・・本項目では、アクチビンによって導かれる細胞応答ゆらぎを、細胞集団中の個々の細胞における *Gooseoid(Gsc)* 遺伝子発現の変化として計測することを試みる。アクチビン応答領域を持つ *Gsc* プロモーターにルシフェラーゼ (*Luc*) 遺伝子を連結したレポーター遺伝子作製し、カエル胚に導入する。切り出した細胞を解離後、接着培養し、レポーターの発光を検出する。

3) 多能性幹細胞における遺伝子発現のゆらぎの解析・・・本項目では、多能性幹細胞及び癌幹細胞におけるホルモン感受性を、核内受容体の発現ダイナミクスを解析することにより、そのゆらぎと分化や転移能の関係を解析することを目指す。そのために、レポーター遺伝子と核内受容体の融合コンストラ

クトを作製・導入し、安定発現株の樹立を行う。さらに、分化誘導過程でのレポーター遺伝子の発現を経時的に定量化する。

## 4. 研究成果

1) 発生過程における遺伝子発現のゆらぎの解析・・・ウニ胚の発生遺伝子 (*HpEts*, *HpHesC*) を標的とする zinc-finger nuclease (ZFN) を大腸菌の one-hybrid システムおよび培養細胞の SSA アッセイによって選別した。作製した *ZFN mRNA* をウニ受精卵に導入し、標的遺伝子の塩基配列を解析したところ、標的配列への欠失あるいは挿入の変異が確認された。しかしながら、変異導入時期は受精後 8 時間であり、変異はモザイク状に導入されることがわかった。

次に、*HpEts* 遺伝子に対する *ZFN mRNA* とレポーター遺伝子を共導入し、RT-PCR によってゲノムの標的遺伝子中にレポーター遺伝子が挿入されているかどうかを調べた。その結果、受精後 24 時間において変異導入が確認できたものの、導入効率は低いことがわかった。そこで、導入効率を上昇させる方法として、非相同末端修復経路に関わる DNA リガーゼ 4 のドミナントネガティブ mRNA の共導入を試みた。その結果、受精後 4 時間でレポーター遺伝子の挿入が観察され、効率の改善に成功した。

確立した ZFN 利用したレポーター遺伝子挿入システムを用いて、ウニゲノムの *HpEts* 遺伝子座へ *GFP* 遺伝子をノックインし、胚発生過程における 1細胞レベルでの蛍光量測定および発現ダイナミクスを解析した(下図)。その結果、一次間充織細胞の分化に伴って、*HpEts* 遺伝子の発現のばらつきが大きくなっていくことが明らかになった。また、標的遺伝子座へのレポーター遺伝子導入効率をあげるシステム改善を行い、導入胚の約 20% で蛍光遺伝子を発現させることに成功した。

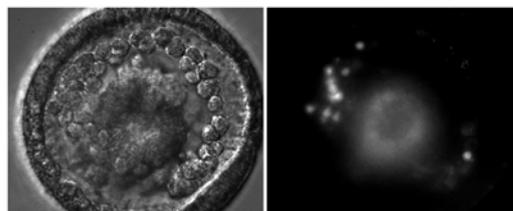


図. ZFN を介したレポーター遺伝子の挿入。間充織細胞の核に蛍光が見られる。

2) 細胞応答のゆらぎと細胞間相互作用に基づく細胞運命決定の解析・・・細胞運命の決定過程における“細胞応答のゆらぎ”を調べるために、動的な遺伝子発現の *in vivo* 観察系を構築した。具体的には、中胚葉誘導因子・アクチビンに応答する *Mix2* 遺伝子プロモータ

ーにルシフェラーゼ (*Luc*) 遺伝子を連結したプラスミドをツメガエル胚の外胚葉細胞に導入した。アクチビン刺激後、*Luc* とルシフェリンの反応による発光イメージを、3~5分間隔で取得し、*Mix2* 遺伝子の発現状態を約 5 時間 (胞胚期から後期原腸胚期に相当) にわたってライブ観察することに成功した。細胞の接着条件の調節や阻害剤を利用して細胞形態の安定化を行なった。その結果、経時的な発現定量解析が可能になり、個々の細胞での発現ピークの違いなどが検出できるようになった。

3) 多能性幹細胞における遺伝子発現のゆらぎの解析・・・核内受容体の発現をモニターするレポーター構築を組み込んだ EC 細胞を単離・継代することによって複数の安定発現細胞株の樹立に成功した。作製したレンチノイン酸応答レポーター遺伝子発現構築を安定的に発現する EC 細胞株を用い、細胞塊中での細胞分化とレンチノイン酸応答レポーター遺伝子発現の相関を解析した。その結果、レンチノイン酸による分化誘導過程での発現のばらつきは観察されず、本システムではゆらぎを検出することができなかった。

#### 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 15 件)

- 1.Ochiai H, Fujita K, Suzuki K, Nishikawa M, Shibata T, Sakamoto N, Yamamoto T. Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. *Genes to Cells*, 査読有, 15(8), 875-885, 2010
- 2.Fujita K, Takechi E, Sakamoto N, Sumiyoshi N, Izumi S, Miyamoto T, Matsuura, S, Akasaka K, Yamamoto T. HpSulf, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development. *Mechanisms of Development*, 査読有, 127(3-4), 235-245, 2010
- 3.Fujita K, Teramura N, Hattori S, Irie S, Mitsunaga-Nakatsubo K, Akimoto T, Sakamoto N, Yamamoto T, Akasaka K. Mammalian arylsulfatase A functions as a novel component of the extracellular-matrix. *Connective Tissue Research*, 査読有, 51(5), 388-396, 2010
- 4.Yajima M, Umeda R, Fuchikami T, Kataoka M, Sakamoto N, Yamamoto T, Akasaka K. Implication of HpEts in gene regulatory networks responsible for specification of sea urchin skeletogenic primary mesenchyme cells. 査読有, *Zoological Science*, 27(8), 638-646, 2010
- 5.Okamitsu Y, Yamamoto T, Fujii, T., Ochiai, H. and Sakamoto, N. Dicer is required for the normal development of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zoological Science*, 査読有, 27(6), 477 -486, 2010
- 6.Nishikawa M, Shibata T. Nonadaptive fluctuation in an adaptive sensory system: bacterial chemoreceptor. *PLoS One*, 査読有, 5(6), e11224, 2010
- 7.Karasawa K, Sakamoto N, Fujita K, Ochiai H, Fujii T, Akasaka K, Yamamoto T. Suppressor of Hairless (Su(H)) is required for foregut development in the sea urchin embryo. *Zoological Science*, 査読有, 26(10), 686-690, 2009
- 8.Fujii T, Sakamoto N, Ochiai H, Fujita K, Okamitsu Y, Sumiyoshi N, Minokawa T, Yamamoto T. Role of the nanos homolog during sea urchin development. *Developmental Dynamics*, 査読有, 238(10), 2511-2521, 2009
- 9.Ochiai H, Sakamoto N, Suzuki K, Akasaka K, Yamamoto T. The Ars insulator facilitates I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in the sea urchin embryo. *Developmental Dynamics*, 査読有, 237(9), 2475-2482, 2008
- 10.Hanai K, Furuhashi H, Yamamoto T, Akasaka K and Hirose S RSF Governs Silent Chromatin Formation via Histone H2Av Replacement. *PLoS genetics*, 査読有, 4(2), e1000011, 2008
- 11.Ochiai H, Sakamoto N, Momiyama A, Akasaka K, Yamamoto T. Analysis of cis-regulatory elements controlling spatio-temporal expression of T-brain gene in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Mechanisms of Development*, 査読有, 125(1-2), 2-17, 2008
- 12.Motoi N, Suzuki K, Hirota R, Johnson P, Oofusa K, Kikuchi Y, Yoshizato K. Identification and characterization of nucleoplasmin 3 as a histone-binding protein in embryonic stem cells. *Development, Growth and Differentiation*, 査読有, 50(5), 307-320, 2008
- 13.Shibata T, Ueda M. Noise generation, amplification and propagation in chemotactic signaling systems of living cells. *BioSystems*, 査読有, 93(1-2), 126-132, 2008
- 14.Ishihara S, Shibata T. Mutual interaction in network motifs robustly sharpens gene expression in developmental processes *Journal of Theoretical Biology*, 査読有, 252(1), 131-144, 2008
- 15.Nishikawa M, Takagi H, Shibata T, Iwane AH, Yanagida T. Fluctuation analysis of mechanochemical coupling depending on the type of biomolecular motors, *Physical Review Letter*, 査読有, 101(12), 128103, 2008

〔学会発表〕(計 41 件)

- 1.日高大佑, 人工酵素 ZFN タンパク質の発現と機能解析, 日本動物学会中国四国支部・広島県例会, 2011 年 3 月 5 日, 東広島
- 2.竹林-鈴木公子, 胚発生初期に背腹と頭尾のパターン形成が連動するしくみ, 日本動物学会中国四国支部・広島県例会, 2011 年 3 月 5 日, 東広島
- 3.Yamamoto Takashi, Targeted gene modification via non-homologous end-joining-mediated and homology-directed repairs of ZFN-induced DNA double-stranded breaks, 1st international symposium on Genome damage and Non-cancerous diseased, March 3, 2011, Hiroshima.
- 4.Watanabe Takahito, Targeted manipulation of genes with zinc finger nucleases in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, 第 33 回日本分子生物学会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸
- 5.Ochiai Hiroshi, Genetic manipulation in sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. 第 33 回日本分子生物学会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸
- 6.Takebayashi-Suzuki Kimiko, A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis, The 16th International Society of Differentiation Conference, November 15, 2010, Nara
- 7.吉田隆也, バフンウニ初期発生における HpNanos mRNA の翻訳調節機構の解析, 第 81 回日本動物学会, 2010 年 9 月 23 日, 東京
- 8.Takebayashi-Suzuki Kimiko, Self-organization of chemotactic signaling system for spontaneous motion of Eukaryotic cells. 13th International *Xenopus* Conference, September 12, 2010, Calgary, Canada
- 9.Ochiai Hiroshi, Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases, Society for Developmental Biologist 69th Annual meeting, August 8, 2010, New Mexico, USA
- 10.落合博, Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases, 第 43 回日本発生生物学会, 2010 年 6 月 20 日, 京都
- 11.竹林-鈴木公子, A mechanism coordinating the establishment of the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during early *Xenopus* embryogenesis, 第 43 回日本発生生物学会, 2010 年 6 月 20 日, 京都
- 12.西川正俊, 適応反応のゆらぎと応答, 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 II」, 2010 年 4 月 8 日, 埼玉
- 13.竹林-鈴木公子, 胚発生初期に背腹と頭尾のパターン形成が調和するしくみ, 日本動物学会中国四国支部・広島県例会, 2010 年 3 月 13 日, 東広島
- 14.藤田和将, Mammalian arylsulfatase A as a novel component of the extracellular matrix, 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
- 15.山下香, Cloning and analysis of Dnmt3 homolog of sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*), 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
- 16.山口真央, Cloning and analysis of Scc1 homolog of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* (HpScc1), 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 10 日, 横浜
- 17.西川正俊, Bacterial chemotaxis is enhanced by nonadaptive fluctuation in sensory system, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, 徳島
- 18.難波利典, What determines the accuracy of bacterial chemotaxis? 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, 徳島
- 19.竹林-鈴木公子, XOct-25 下流因子による BMP 応答の制御と外胚葉のパターニング, 第 3 回日本ツメガエル研究集会, 2009 年 10 月 6 日, 広島
- 20.Nishikawa Masatoshi, Nonadaptive fluctuation in adaptive sensory system of bacterial chemotaxis, International Symposium on Complex Systems Biology, September 29, 2009, Tokyo
- 21.藤井孝吉, バフンウニ胚における Nanos の機能, 第 79 回日本動物学会, 2009 年 9 月 19 日, 静岡
- 22.藤田和将, バフンウニ Sulf は骨片形成における VEGF シグナルの調節に関与する, 第 79 回日本動物学会, 2009 年 9 月 19 日, 静岡
- 23.柴田達夫, Stochastic signal transduction of bacterial chemotaxis, 第 19 回日本数理生物学会年会・企画シンポジウム, 2009 年 9 月 9 日, 東京
- 24.山本卓, 多細胞生物の発生過程における遺伝子発現のゆらぎ, 数理生命科学の形成と発展, 2009 年 9 月 3 日, 東広島
- 25.西川正俊, バクテリアの適応反応で生じるノイズと走化性, 数理生命科学の形成と発展, 2009 年 9 月 3 日, 東広島
- 26.西川正俊, Nonadaptive fluctuation in adaptive sensory system of bacterial chemotaxis, 数理生命科学の形成と発展, 2009 年 9 月 3 日, 東広島
- 27.竹林-鈴木公子, BMP 阻害と FGF シグナルの協調による後方神経形成機構, 第 42 回日本発生生物学会大会, 2009 年 5 月 30 日, 新潟
- 28.西川正俊, バクテリアの適応反応で生じるノイズと走化性, 理研シンポジウム・細胞システムの動態と論理, 2009 年 4 月 9 日, 埼玉
- 29.Nishikawa Masatoshi, Relationship between the noise in adaptation reaction and the

chemotactic performance in bacterium, Gordon Research Conference on Gradient Sensing & Directed Cell Migration, April 2, 2009, Galveston, Texas, USA

30. 落合博, 多細胞生物における細胞間の遺伝子発現のゆらぎ, 定量生物学の会第1回年会, 2009年1月10日, 東京
31. 柴田達夫, 生物学にとっての理論、理論にとっての生命現象, 定量生物学の会第1回年会, 2009年1月10日, 東京
32. 西川正俊, バクテリアの走化性とセンシングのノイズ, 定量生物学の会第1回年会, 2009年1月10日, 東京
33. 西川正俊, 細胞性粘菌の走化性シグナル伝達系における自己組織化現象の蛍光イメージ解析と理論的解析, 数理生物学会年会, 2008年9月16日, 京都
34. 岡光憂佳, バフンウニ初期発生におけるDicerホモログの機能解析, 第79回日本動物学会大会, 2008年9月5日, 福岡
35. 住吉範子, バフンウニ Vasa (HpVasa) 遺伝子の発現と機能, 第79回日本動物学会大会, 2008年9月5日, 福岡
36. 柴田達夫, 走化性情報処理のゆらぎと協同性, 第60回日本細胞生物学会大会, 2008年6月29日, 横浜
37. Shibata Tatsuo, Self-organization in chemotactic signal transduction of eukaryotic cell, International Workshop on Bio-Soft Matter, June 9, 2008, Tokyo
38. Ochiai Hiroshi, *Ars* insulator facilitates the meganuclease-mediated transgenesis in the sea urchin embryo, 41st Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists, May 28, 2008, Tokushima
39. Miyamoto Tatsuo, Identification and characterization of a novel candidate gene that regulates competence of ectodermal cells to BMP-mediated embryonic induction, 41st Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists, May 28, 2008, Tokushima
40. Fujii Takayoshi, Analysis of the mechanism underlying the localized function of HpNanos at archenteron tip, 41st Annual meeting for the Japanese society of developmental biologists, May 28, 2008, Tokushima
41. Ochiai Hiroshi, Analysis of cis-regulatory elements controlling spatio-temporal expression of T-brain gene of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, Developmental Biology of the sea urchin XVIII, April 25, 2008, Woods Hole, MA, USA

[図書] (計2件)

1. 鈴木厚, オーム社, 骨形成タンパク質のシグナル伝達と形態形成における役割, in

press, 2011

2. Ueda Masahiro, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, *Single Molecule Dynamics in Life Science*, 346, 2008

[その他]

ホームページ等

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 卓 (YAMAMOTO TAKASHI)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 90244102

### (2) 研究分担者

鈴木 厚 (SUZUKI ATSUSHI)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 20314726

西川 正俊 (NISHIKAWA MASATOSHI)  
理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・研究員  
研究者番号: 30444516

### (3) 連携研究者

鈴木 賢一 (SUZUKI KENICHI)  
広島大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号: 90363043  
(H20 研究分担者)

柴田 達夫 (SHIBATA TATSUO)  
広島大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 10359888  
(H20→H21 研究分担者)