

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657001

研究課題名(和文) セミンタクト細胞リシール法を駆使した糖尿病態のエピジェネティクス変化可視化解析

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic alternation in diabetic model cells

研究代表者

加納 ふみ (Kano, Fumi)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：10361594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質交換法セミンタクト細胞リシール法により、糖尿病モデル細胞を構築した。DNAメチル化のマーカーであるMeCP2の局在解析により、糖尿病モデル細胞ではMeCP2が核内に拡散しエピジェネティクスが改変されている可能性が示唆された。遺伝子発現変動解析からも、糖尿病モデル細胞特異的に発現上昇・減少する遺伝子群を抽出することができ、糖尿病態とエピジェネティクス変化が関連しうる因子探索法のプロトタイプを構築することができた。

研究成果の概要(英文)：The diabetic model cells were constructed by using a cell-resealing technique, which enables the exchange of cytosol in the cells. We observed that GFP-conjugated MeCP2, a methylated DNA binding protein, diffused throughout cytosol in diabetic model cells, which suggested the possibility that the epigenetics could be modified in diabetic model cells. In addition, microarray analysis was carried out to find the genes, which were up- or down-regulated in diabetic model cells, and revealed that expression of several genes were changed only by the introduction of diabetic liver cytosol into the cells. Although DNA methylation of the candidate genes is being examined now, this system could be a prototype for extracting the candidate genes, which could show the epigenetic alternation in a correlation with diabetic condition.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：病態モデル細胞 エピジェネティクス セミンタクト細胞リシール法

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、DNA メチル化やヒストン修飾によって生起する遺伝子配列変化の伴わない遺伝子発現制御機構である。分化や病態発現においては遺伝子配列に変化が起らないものも多いが、その発現制御を説明しうる機構として、エピジェネティクスは大きな注目を集めている。ゲノムシークエンス技術、質量分析法やクロマチン免疫沈降法(Chip 法)の発達により、エピジェネティクス制御の主要機構であるゲノム上のDNA メチル化サイトの網羅的解析法やヒストン修飾解析法、そしてエピジェネティクス関連分子の網羅的解析が進んでいるものの、エピジェネティクス制御因子の細胞内(核内)での実際の機能を解析・検定する方法は殆ど開発されていない。

本研究で基盤となる技術が、我々が長年開発してきた細胞型試験管「セミインタクト細胞」とそのリシール細胞技術である。セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシン O (streptolysin O: SLO)などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞のことである。セミインタクト細胞ではオルガネラや細胞骨格のトポロジーを保持させたまま、細胞質を流出させることができる。ここに(細胞を一個の試験管に見立てて)新たに外部より細胞質成分と ATP 再生系などを添加し、細胞質に依存的な細胞内のイベントを再構成し、その中で生起する生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる。よって、正常細胞をセミインタクト細胞にし、そこに病態細胞から調製した「病態細胞質」を導入することにより「病態モデルセミインタクト細胞」が作成でき、その中で病態特有に生起する生命現象を、細胞質依存的に分析的に再構成することができる。

当研究室ではこのセミインタクト細胞アッセイ系を用いて、細胞周期依存的オルガネラ形態変化、小胞輸送過程などを可視化再構成し、その過程の制御因子の同定・検定を行ってきた実績がある。さらに最近、セミインタクト細胞の形質膜に形成された孔を閉じインタクト細胞に戻す「リシール細胞技術」を確立した。これはセミインタクト細胞にCaCl<sub>2</sub> 及び細胞質を加えることでエンドサイトーシスやエキソサイトーシスの膜動過程依存的に SLO によって形成された孔が除去され、形質膜が修復される機構を利用している。可視化したクロマチン動態を可視化することにより、今まで細胞レベルで詳細に検証されてこなかったエピジェネティクス制御の時間的・空間的作用機序を詳細に検証することが可能となり、本研究はエピジェネティクス領域における細胞レベルでの新規解析技術としての意義を持つと考える。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)われわれが独自に開発してきた「セミインタクト細胞リシール法」と GFP イメージングを中心とした「可視化技術」をカップルさせ、エピジェネティクス制御因子の単一細胞内(核内)動態の解析・機能検定系を構築する。次に、(2)そのエピジェネティクス変化可視化系を駆使して、核内で糖尿病態進行とともに変化するエピジェネティクス制御因子の攪乱とその制御タンパク質ネットワークを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、「セミインタクト細胞リシール法」と GFP イメージング技術を駆使し、糖尿病モデルマウス組織から調製した「糖尿病細胞質」をセミインタクト細胞に封入したリシール細胞(糖尿病モデル細胞)を作成し、その核内で生起する DNA メチル化結合タンパク質やヒストンなどのエピジェネティクス制御因子の動態可視化解析を行い、糖尿病態進行に伴って変化するエピジェネティクス制御攪乱機構を明らかにする。

(1)ヒストンタンパク質をプローブにしたクロマチン動態可視化系の構築:

本研究ではまず、クロマチン結合タンパク質ダイナミクスを可視化できる細胞株を樹立する。クロマチン結合性の可視化プローブとしては、リンカーヒストン・H1 やヘテロクロマチン結合タンパク質・HP1、メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP や、転写活性化時にクロマチンに集積するとされるヒストン H3.3 の GFP 融合タンパク質を用いる。

(2)メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 の結合タンパク質の網羅的同定:

DNA のメチル化制御は、ヒストン修飾に加えエピジェネティクス変化の最も主要な制御機構である。そこで本研究では、DNA メチル化結合タンパク質のマウス MeCP2 全長をベイトとした酵母ツーハイブリッド法を行い MeCP2 に結合するタンパク質を網羅的に同定する。

(3)セミインタクト細胞リシール法を駆使したエピジェネティクス変化可視化解析系の構築:

(1)で得られた可視化用細胞株に対して SLO を作用させ、セミインタクトにする。ここに様々な条件下の細胞から調製した細胞質を導入してリシールし、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。各プローブタンパク質(GFP 融合タンパク質)のクロマチン結合能の変化を、蛍光退色回復法(FRAP 法)や蛍光相関分光法(FCS)によって定量的に検出する。

(4)セミインタクト細胞リシール法を駆使した「糖尿病モデル細胞」の作成とその中でエピジェネティクス変化可視化解析:

(3)で構築したセミンタクト細胞リシール法を用いた「エピジェネティクス変化可視化解析法」を用い、入手可能な幾種類かの糖尿病モデルマウスの肝臓・脂肪組織から調製した「糖尿病態細胞質」のエピジェネティクス改変能を wild type マウスのそれらと比較検討する。具体的には、糖尿病態細胞質を導入したリシール細胞を「糖尿病モデル細胞」とし、正常マウスから調製した正常細胞質を導入した「正常モデル細胞」をコントロールとして、それぞれのエピジェネティクス変化を(1)の可視化プローブを用いて可視化し、比較検討する。次に、検出された糖尿病細胞質依存的な MeCP2-GFP 動態変化に対し、(2)で得られた MeCP2 結合タンパク質の関与を検定する。検定するタンパク質に対する阻害抗体やドミナントネガティブ型リコンビナントタンパク質を加えた条件下で、糖尿病細胞質によって誘起される MeCP2-GFP ダイナミクスへの影響を評価する。

(5)セミンタクト細胞リシール法をもとに作成した「糖尿病モデル細胞」を用いた糖尿病態進行に関わるエピジェネティクス制御機構の解明:

前項実験で得た「糖尿病態細胞質」によるエピジェネティクス変化が、実際に mRNA やタンパク質の発現を実際に誘起しているかどうかをセミンタクト細胞リシール実験により検定する。増殖してきたリシール細胞(リシール細胞の増殖能は既に確認済み)に対しゲノム DNA を抽出し、糖尿病に関与することが報告されている因子群のプロモーター領域の DNA メチル化状態を、メチル化感受性制限酵素法や bisulfite 法により調べる。以上の実験から、糖尿病態細胞質依存的に発現変動を受けうるプロモーター領域を特定し、糖尿病細胞質によってエピジェネティクスに影響を受ける遺伝子群を明らかにする。さらに(4)で同定した MeCP2-GFP 動態制御因子のエピジェネティクス変化への関与を検証する。具体的には(4)で使用した阻害抗体やドミナントネガティブ型リコンビナントタンパク質を加えてリシールした細胞で、同定したプロモーターの DNA メチル化状態の変化を検討する。これにより、糖尿病環境下でのクロマチン結合タンパク質の動態変化とエピジェネティクス変化をつなぐ分子メカニズムの解明を行う。

#### 4. 研究成果

はじめに、ヒストンタンパク質やメチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 の GFP 融合タンパク質の恒常発現細胞株の確立を試み、MeCP2-GFP を恒常的に発現するマウス乳腺上皮由来 Eph4 細胞株 Eph4-MeCP2-GFP の樹立に成功した。次に、SL0 による形質膜穿孔やリシールの条件検討を行い、Eph4-MeCP2-GFP のリシール細胞構築の最適条件を決定した。さ

らに、Eph4-MeCP2-GFP 細胞をセミンタクトにし、そこに正常あるいは糖尿病モデルマウス (db/db マウス) 肝臓由来の細胞質を ATP 再生系やグルコースとともに添加して細胞質を置換し、細胞内環境を正常あるいは糖尿病肝臓の状態へと擬似的に改変した。形質膜の孔を塞ぐ(リシールすることにより)インタクト細胞に戻し、MeCP2-GFP の動態変化を観察した。その結果、糖尿病細胞質依存的に MeCP2 が核内で分散することを見いだした。このことは細胞内環境を糖尿病肝臓状態へと改変された「糖尿病モデル細胞」では、ゲノム DNA メチル化状態に変化があることを示唆している。

次に酵母ツーハイブリッド法で MeCP2 結合タンパク質を探索することにより、糖尿病モデル細胞での MeCP2-GFP 動態変化に関与する候補因子の探索を行った。しかし、これまでにいくつかの MeCP2 結合候補タンパク質 (mRNA 結合タンパク質やヒストンシャペロンなど)を同定することができていたものの、細胞内での MeCP2 との結合能やその機能解析の実験結果はネガティブなものであった。そこで、糖尿病モデル細胞のマイクロアレイ解析を行い、糖尿病モデル細胞中で特異的に発現変動する遺伝子群を抽出し、その中から糖尿病細胞質依存的にエピジェネティクス改変されうる遺伝子群の絞り込みやエピジェネティクス改変因子の抽出および機能解析する方針へと方向転換することとした。このとき導入する細胞質が肝臓由来であることを考慮し、リシールする細胞をラット肝臓由来培養細胞 H4IIEC 細胞とすることとした。そこで、まず H4IIEC 細胞でのリシール条件の最適化を行った後に、正常あるいは糖尿病マウス肝臓細胞質を導入することで正常あるいは糖尿病モデル肝細胞を構築した。次に正常あるいは糖尿病肝臓細胞質導入しリシール後 1、6、12、24 時間後で total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を外注した。遺伝子発現変動解析の結果、正常モデル肝細胞と比較して糖尿病モデル肝細胞で発現上昇する遺伝子群 5、74、87、16 種類、発現減少する遺伝子群 7、5、11、4 種類を同定できた。さらに、エピジェネティクス改変関連因子の発現変動を調べたところ、DNA メチル化酵素 Dnmt1 のタンパク質発現量は細胞質導入後 9 時間まで減少しその後再び増加すること、かつ糖尿病モデル肝細胞では減少程度が正常モデル細胞に比べ少ないことを見いだしている。この結果は糖尿病細胞質導入によってエピジェネティクス変化が誘起されることを示唆するものである。

糖尿病モデル肝細胞で発現上昇する遺伝子群のうちある 1 つの遺伝子について、Western Blot や定量的 PCR 法により糖尿病モデル肝細胞で確かに発現が上昇することを実験的に確認した。さらに、糖尿病マウス肝臓でも実際に正常に比べ発現が増えている

ことを Western Blot により検出した。そこでエピジェネティクスに変動があることが期待されたためバイサルファイト法により DNA メチル化状態を検証したが、正常と糖尿病との差はなく、むしろリシール処理により全体的に脱メチル化が若干亢進されることを見いだした。今後はその他の遺伝子ゲノムの糖尿病モデル肝細胞およびマウス組織での DNA メチル化状態の検証を進めることとし、本研究では糖尿病態とエピジェネティクス変化をつなぐ因子探索法のプロトタイプを構築することができた。

#### 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 8 件)

Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K., Murata, M. (2013) PPAR  $\alpha$ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. Nature Communications. 4. Article number: 2262. doi:10.1038/ncomms3262. 査読あり

Kano, F., Murata, M. (2013) The Semi-Intact Cell System and Methods for Cell Resealing: a Novel Systems Biology Tool to Elucidate Protein Networks with Spatio-Temporal Information. Advances in Systems Biology. 2(1): 6-14. 査読あり

Kano, F., Nakatsu, D., Noguchi, Y., Yamamoto, A., Murata, M. (2012) A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Perturbation of Endocytic Pathways under Diabetic Conditions. PLoS ONE. 7(8):e44127. 査読あり

加納ふみ, 村田昌之 (2012) 哺乳動物細胞ゴルジ体の細胞周期依存的ディスアッセンブリー、生体の科学、63 巻 5 号、404-407. 査読なし

菅原太一、加納ふみ, 村田昌之 (2012) 新しい機能を問われ出した小胞体-ゴルジ体中間区画 (ER-Golgi intermediate compartment: ERGIC)、生体の科学、63 巻 5 号、424-425. 査読なし

村田昌之、加納ふみ (2012) セミンタクト細胞リシール法を用いた「病態モデル細胞」作製とその疾患研究への応用、化学と生物、Vol.50 (No.7) pp510-517. 査読なし

Sugawara, T., Nakatsu, D., Kii, H., Maiya, N., Adachi, A., Yamamoto, A., Kano, F., Murata, M. (2012) PKC $\delta$  and

$\delta$  regulate the morphological integrity of the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) but not the anterograde and retrograde transports via the Golgi apparatus. Biochem. Biophys. Acta (Molecular Cell Research), 1823(4):861-875. 査読あり

Murata, M., Kano, F. (2012) Semi-intact cell system: Application to the analysis of membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and of cell cycle-dependent changes in the morphology of these organelles. in Crosstalk and Integration of Membrane Trafficking Pathways. (Weigert, R. ed.) INTECH (ISBN 978-953-51-0515-2) 査読なし

[学会発表](計 5 件)

加納ふみ, 村田昌之. セミンタクト細胞リシール法を用いた病態モデル細胞の創成. 第 65 回日本細胞生物学会大会. シンポジウム「細胞への蛋白質導入技術と蛋白質イメージング技術」2013 年 6 月 19 日. ウィンクあいち. 依頼講演. 堀内雄太、加納ふみ, 野口誉之、村田昌之. セミンタクト細胞リシール技術を用いた糖尿病モデル細胞の構築: 病態依存的なエンドサイトーシス攪乱. 第 65 回日本細胞生物学会大会 (名古屋) 2013 年 6 月 19 日.

Fumi Kano, Daiki Nakatsu, Yoshiyuki Noguchi, Yuta Horiuchi, Masayuki Murata. Disease model cell system: a novel proteomics tool to elucidate protein networks with spatio-temporal information. The 12th Human Proteome Organization Congress, Yokohama, Japan, September 16, 2013.

野口 誉之, 堀内 雄太, 中津 大貴, 加納ふみ, 村田 昌之. セミンタクト細胞リシール技術を用いた糖尿病モデル細胞の構築. 第 51 回日本生物物理学会年会. 2013 年 10 月 29 日. 京都国際会議場.

Masayuki Murata, Fumi Kano. A Resealed-Cell System for Analyzing Pathogenic Intracellular Events: Insight into Signal Transduction Cascade in Hyperlipidemic or Diabetic Cells. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012) Nov. 27, 2012. Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加納 ふみ (KANO, Fumi)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：10361594