

異分野融合による多方面からのエピジェネティクスの解明

研究代表者： 沖 昌也（工学研究科・准教授）

共同研究者： 吉田 俊之（工学研究科・教授）、水谷 哲也（医学部・准教授）

概 要	
	近年、発生・分化の過程のみならず、様々な生命現象及び疾患との関与も報告され、DNA 配列に依存しない「エピジェネティックな遺伝子発現調節機構」に関する研究が注目されている。本共同研究では、「酵母を用いた分子レベルでの解析」、「酵母で得られた知見をもとに、多細胞生物での分化誘導システムの実験系を用いた解析」、「新たなスクリーニングを行う上で必須となるデータ解析をオートメーション化するシステムの開発」など、異なる分野の研究者が融合し、独自の手法によりエピジェネティクスの機能解明を目指すことを目的に研究を行った。その結果、酵母で分離されたエピジェネティクス制御遺伝子が生物種を越えて幅広く存在すること、そのうちの1つ Fub1p のヒトホモログが酵母と同様の機能を持つことを明らかにした。データ解析のオートメーション化も、まだ幾つかの問題点が残されているが、実際に使用出来るようになり、解析に要する時間が大幅に短縮可能となった。
関連キーワード	エピジェネティクス, 酵母, 細胞分化, 単一細胞追跡ソフト, クロマチン

研究の背景および目的

生物にとって重要な機能は種を越えて保存されている。しかし、DNA 複製、修復、組換え等多細胞生物の多様な制御機構の詳細な分子レベルでのメカニズムが、真核生物の中で、最も単純な生き物の1つである「酵母」の研究から明らかにされてきたという事実はあまり認識されていない。我々が注目しているエピジェネティクス現象も例外ではない。この現象の特徴は、全く同一の DNA 配列を持つ個々の細胞間での遺伝子の発現状態が状況に応じて変化し、子孫にも同様の発現状態が記憶され遺伝されていくことである。

我々は、現在までに、独自のスクリーニング法により、エピジェネティックな現象に関わる因子を酵母全遺伝子約 6000 個 1つ1つに関して解析し、55 個分離した(Oki M et al., (2004) Mol. Cell. Biol.)。興味深いことに、ヒストン修飾因子に代表されるようにほとんどの因子が種を越えて保存されていた。これらのヒトホモログが、組織特異的な発現調節や分化に伴う発現調節に対してどのような役割を果たしているのかアプローチし、多細胞生物における新たなエピジェネティックな現象の発見とそのメカニズムを本共同研究により明らかにしていく。特に水谷グループが確立した幹細胞から性腺や副腎様の細胞へと分化誘導するシステムを用い、どのようなエピジェネティックな調

節により分化が支配されているか明らかにしていく。

また、沖グループは DNA 上でエピジェネティックに遺伝子の発現調節が起こる領域を同定し、この領域にレポーター遺伝子 EGFP を導入することにより単一細胞の世代を超えた発現状態の変化を蛍光顕微鏡下で追跡するシステムを確立した。この解析から、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構は現在までの一方向性しか持たないという報告とは異なりリバーシブルにも起こりうることを初めて明らかにした。この結果は、生物の持つ、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構の可能性を大きく広げ、ゲノムワイドな解析を行うことにより、新たな発見が期待される。しかし、現状での「単一細胞追跡システム」は、1つ1つ手作業での作業であり、膨大な時間を費やしてしまい、大量のデータを処理することは出来ない。そこで、本共同研究により独自の解析ソフトを開発し、大幅な解析時間の短縮により、ゲノムワイドな解析を可能とすることを目的とした。

上記のように、異なる研究分野の研究者が協力し合って、独自の視点から「エピジェネティクス」のメカニズム解明を目指すことが本プロジェクトの最大の目的であり、特色である。

研究の内容および成果

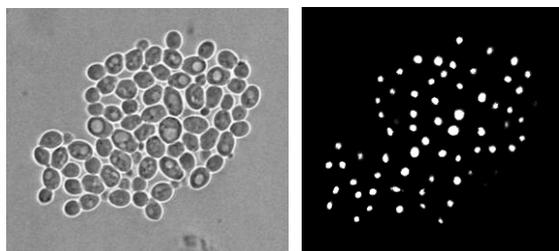
【1】解析ソフトの開発

我々は、酵母染色体上でエピジェネティックに遺伝子の発現状態が変化する領域を同定し、その領域に蛍光タンパク質を挿入することにより、分裂を繰り返した際の単一細胞の発現状態の変化を

追跡するシステムを確立した。

図1 (a) は、酵母細胞を通常光で撮影した画像（明視野画像）、同 (b) は (a) を蛍光撮影した画像の例である。このような画像を時系列として撮影し、分裂を繰り返す各細胞の蛍光輝度の変化を

追跡し解析することにより、世代を越えたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構に関する様々な情報が得られる。

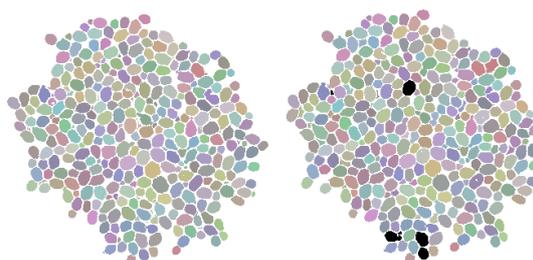


(a) 明視野画像 (b) 蛍光画像

図1：細胞画像の例

申請者らは、このような解析を計算機上で自動処理することを目指し、細胞を領域分割・時間的にトラッキングすると共に蛍光輝度を自動抽出するソフトウェアの開発に取り組んできた。しかしながら、これまでの手法ではトラッキングの精度が不十分で、エラーの手動修正に要する労力が大きく、効率性に問題が残されていた。そこで本年度は、細胞のトラッキング精度を改善し、また、生物学の研究者にとって使いやすい解析支援システムを構築することを目的とした。

過去の手法では、明視野画像の撮影間隔が短い場合には画像間での各細胞の移動量は十分小さいと仮定し、前フレーム上での注目細胞と重なりが最も大きい細胞領域を後フレーム上で求めることを基本としてトラッキングを実現していたが、十分な精度を得るには至っていない。そこで本研究では、2つの細胞に対する重心距離、面積の差、周長の差の重み和を一致度と定義し、この一致度に対してアニーリング処理を導入して対応関係を順次求めることで、トラッキングの精度改善を図った。また、各細胞の移動量はコロニー内部では小さく、外周部では比較的大きく移動する可能性が高いこと、細胞の分裂後の成長速度等を補助情報として利用し、さらに精度の向上を目指した。



(a) 前フレーム (b) 後フレームに対する結果

図2：本手法によりトラッキングを行った結果

図2は実験結果で、単一細胞から10時間ほど分裂を繰り返して300個程度に成長した細胞群に対して、時間間隔3分で撮影した2枚の画像を利用した。図2(a)は、前フレームを領域分割して着色した結果、(b)はその後フレームに対してトラッキング処理を行った結果である。(b)において、トラッキングに誤りが生じているのは黒印を付けた4つの細胞のみで、正しくトラッキングされた割合(精度)は98.5%となった。過去の手法では、平均して80%程度の精度しかなく、一致度とアニーリングの導入により、トラッキング精度が大きく改善されることを確認した。

現在、本トラッキング手法を開発中のソフトウェアに移植する作業を進めている。また、本ソフトウェアを実際に使用するのは生物学系の研究者で、計算機に精通していない利用者にとっても扱いやすいシステムを目指し、システム構築を行っている。

【2】ヒトホモログの機能解析

出芽酵母を用いて分離した55個のエピジェネティクス制御遺伝子のヒトホモログを探索した。現在、cDNAライブラリーを用い候補遺伝子をクローニング中であるため、全ての機能的相補は確認していないが、分離した遺伝子ほとんどにホモログが存在することが明らかとなった。また、RNAiにより、分化誘導に対する影響を解析したが、現在のところ顕著な影響は観察されていない。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

1. Hatanaka A, Chen B, Sun JQ, Mano Y, Funakoshi M, Kobayashi H, Ju Y, **Mizutani T**, Shinmyouzu K, Nakayama J, Miyamoto K, Uchida H, **Oki M**. (2011) *Genes Genet.Syst.* **86**, 305-314.
2. Sun JQ, Hatanaka A, **Oki M**. (2011) *Genes Genet.Syst.*, **86**, 73-81.
3. Doubayashi D, Ootake T, Maeda Y, **Oki M**, Tokunaga Y, Sakurai A, Nagaosa Y, Mikami B, Uchida H. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1662-1667.
4. Yazawa T, Kawabe S, Inaoka Y, Okada R, **Mizutani T**, Imamichi Y, Ju Y, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Umezawa A, Miyamoto K. (2011) *Mol. Cell. Endocrinol.* **336**, 127-132
5. Miyamoto K, Yazawa T, **Mizutani T**, Imamichi Y, Kawabe S, Ju Y, Umezawa A (2011) Stem

- cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.* **336**, 123-126
6. 尾形尚敏, 水野真城, 仲野豊, **吉田俊之** (2012) *映像情報メディア学会技術報告*, VOL.36, No. 8, pp. 68-72,
 7. **水谷哲也**, 宮本 薫 (2011) *日本生殖内分泌学会雑誌* **16**, 27-29
 8. **水谷哲也**, 宮本 薫(2011) *生化学* **83**, 388-391

「本研究に関わる講演」

1. **吉田俊之**, **沖昌也** 「細胞画像の遺伝子学的解析を支援するソフトウェア」新技術説明会 JST ホール 2011年8月23日(東京)

「特記事項」

1. 研究交流を目的に合同セミナーを行った。
<日時>平成23年12月7日
<場所>医学部(松岡キャンパス)