

## エピジェネティクス研究の新たな解析システムの開発 及び機能解明

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)

|                |  |
|----------------|--|
| <b>概 要</b>     | DNA 配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構として「エピジェネティックな発現制御機構」が存在する。エピジェネティックな発現制御機構の変化が癌をはじめとする様々な後天性疾患に関与することが報告され、近年注目を集めている。我々は、上記、「エピジェネティックな発現制御機構」の分子レベルでのメカニズム解明を目指して研究を行った。本研究では最も単純な真核生物である酵母をモデル生物として用い解析を行い、得られた知見を、マウス・ヒト細胞を用いても同様の制御機構が見られるかを検証するというアプローチ法を用いた。また、独自に開発した「世代を越えたエピジェネティックな発現状態変化を単一細胞レベルで解析するシステム」を用い、カロリー制限によるエピジェネティックな発現状態の変化に関して解析を行った。更に、全遺伝子レベルでの網羅的解析を可能にするため、独自に「自動追跡ソフト」の開発も目指した。 |
| <b>関連キーワード</b> | エピジェネティクス、シングルセル解析、単一細胞追跡ソフト、細胞分化  |

### 研究の背景および目的

2003年、ヒトの全DNA配列が解読され、大方の研究者の予想よりもはるかに少ないたった約23,000個しか遺伝子が存在しないことが明らかとなった。複雑かつ精巧な人間の制御を行うためにはDNA配列に依存しない、異なる制御機構の存在が示唆され、その1つとして近年「エピジェネティクス」が注目を集めている。同じDNA配列から多様な遺伝子発現制御を生み出すエピジェネティックな制御機構は、ヒトなどの分化・発生や疾患のほか、多能性幹細胞「iPS細胞形成」においても重要な役割を担う。しかし、多細胞生物の多様な細胞を生むこの制御の詳細な分子機構が単細胞モデル生物「酵母」の研究により明らかにされて来た事実は、日本ではあまり認識されていない。本研究では、「酵母を用いた分子レベルでの解析(沖)」、「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(水谷)」、「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(吉田)」など、異分野の研究者が融合

し、独自の解析手法を開発し、エピジェネティクスの機能解明を目指すことを目的とした。

生物にとって重要な機能は種を越えて保存されている。酵母は真核生物の中で、最も単純な生き物の1つであるが、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構は酵母でも見られる。本プロジェクトでは、酵母を用いる研究グループ(沖)と、ヒト細胞を用いた研究を行っている研究グループ(水谷)が共同し、種を越えた共通のエピジェネティクスメカニズム解明を目指した。また、沖グループが開発した「単一細胞追跡システム」を、更に改良し、追跡途中で興味深い表現型を示す細胞を抽出し解析するシステムの開発も目指した。更に、現在は、手作業で膨大な時間を費やして解析しているが、独自の解析ソフトを開発(吉田)することにより、研究の飛躍的な発展が期待される。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」の解析システムを開発し、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特徴である。

### 研究の内容および成果

#### 【単一細胞追跡システムを用いた解析(沖)】

我々は、出芽酵母をモデル生物として用い、染色体上で、エピジェネティックな発現状態が変化する領域を同定した。その領域に、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を導入し、1つの細胞から分裂を開始し、世代を越えたエピジェネティックな発現状態の変化を追跡するシステムを確立した。

統計処理を行うことにより、世代を越えたエピジェネティックな発現状態変化には一定の規則性があり、その規則性は遺伝子により制御されており、多種多様なパターンに変化出来る事を明らかにした。

次に外的要因によって、世代を越えたエピジェネティックな発現状態の規則性が変化するかを解

析した。最初に、培地中のグルコース濃度を変化させることによる影響を解析した。解析には、通常のグルコース濃度 2% よりも、増殖速度が半減する 0.25% を使用した。グルコース濃度を低くすると細胞の寿命が延びることは、他のグループから既に報告されている。

0.25% グルコース存在下で単一細胞追跡システムにより解析した結果、分裂することにより変化するエピジェネティックな発現状態に有意な違いが見られた。具体的には発現状態が「OFF」の細胞が「ON」に切り替わりやすくなり、一方で発現状態「ON」の細胞が「OFF」に切り替わりにくくなり、結果的に、発現状態が「ON」の細胞が増加する傾向にあることが明らかとなった。現在までのところ、寿命を伸ばすためには発現状態を「OFF」に維持する必要があり、この「OFF」に維持する機構が破綻すると、細胞死に向かうと考えられていたが、本研究では興味深い事に全く逆の結果が得られた。今後更なる検証により、「エピジェネティックな発現制御機構の変化と老化」の関与に関して分子レベルでのメカニズム解明を目指す。

#### 【マウス Y1 細胞を用いた分化に対する影響解析 (沖、水谷)】

我々は、出芽酵母全遺伝子 6000 個を 1 つ 1 つ解析し、エピジェネティックな発現制御に関与する遺伝子を 55 個分離した。そのうち、16 個の遺伝子がマウスにも存在することが明らかとなった。そこで、分化誘導が可能なマウス Y1 細胞を用いて、RNAi により候補遺伝子の機能を失わせた際の分化誘導に関する影響を解析した。現在までに、3 つの遺伝子に関して解析を行ったが、顕著な違い

は見られなかった。

#### 【解析ソフトの開発 (吉田)】

本システムは、細胞群を明視野および蛍光撮影した時系列画像に対して、分裂を繰り返す各細胞を追跡し、その蛍光特性の自動解析を行う。従来法では、細胞が顕微鏡の被写界深度から外れた際に追跡不可能となる問題が残されており、本研究では z スタックと全焦点画像を利用して本問題の解決を図ると共に、ソフトウェアへの実装を行った。図 1 は、全焦点画像を用いた場合の細胞抽出精度の改善例である。分裂周期約 2 時間の酵母細胞を 5 分間隔で撮影した 105 枚の明視野全焦点画像 (含まれる全細胞数は約 9800) に対し、本手法で細胞抽出処理を行った結果、誤抽出に伴って必要となる手動修正回数は 37 回 (全細胞数の約 0.4%) となり、実用的な精度が得られることを確認した。

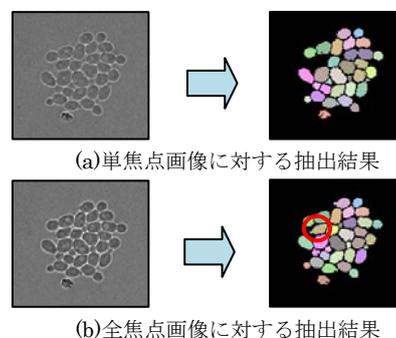


図 1 : 全焦点画像による改善例

### 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. Kamata K, Goswami G, Kashio S, Urano T, Nakagawa R, Uchida H and **Oki M.** (2014) *J. Biochem.*, 155 (3), 159-171.
2. Kamata K, Hatanaka, Goswami G, Shinmyozu K, Nakayama J, Urano T, Hatashita M, Uchida H and **Oki M.** (2013) *Genes to cells*, 9, 823-837.
3. Mano Y, Kobayashi TJ, Nakayama J, Uchida H and **Oki M.** (2013) *PLOS Biology*, Jul;11(7):e1001601.
4. Imamichi, Y., **Mizutani, T.**, Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. (2014) *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 33-42.
5. Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., **Mizutani, T.**, Miyamoto, K., Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y. (2013) *Endocrinology* 154, 2870-80.
6. Matsumura, T., Imamichi, Y., **Mizutani, T.**, Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K. (2013) *FASEB J.* 27, 3198-208.
7. Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K. (2013) *Endocrinology* 154, 1648-60.

8. Imamichi, Y., **Mizutani, T.**, Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. (2013) *Mol. Cell. Endocrinol.* 370, 1-10.
9. Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., **Mizutani, T.**, Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K. (2013) *Mol. Cell. Endocrinol.* 369, 42-51.

#### 「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 25 年 12 月 11 日  
<場所>アカデミーホール (文京キャンパス)

#### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 水谷哲也：基盤研究 (C) ・新たなステロイド合成酵素の同定と高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明・代表・採択
2. 水谷哲也：山口内分泌疾患研究振興財団・新たなステロイドホルモン産生関連因子の同定とその転写制御メカニズムの解明・代表・採択