

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24613003

研究課題名(和文) マウス細胞初期化過程における遺伝子空間配置のエピジェネティクス制御への関与

研究課題名(英文) Spatial positioning of related genes during mouse reprogramming for epigenetic regulation

研究代表者

田辺 秀之 (Tanabe, Hideyuki)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授

研究者番号：50261178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞核における核内染色体テリトリー、遺伝子領域の空間配置の視点から iPS 細胞形成のメカニズムを探り、マウス細胞初期化過程においてどのような特性が見られるかを明らかにすることを目指した。マウス繊維芽細胞、iPS細胞、受精卵、2、4、8、モルラー期細胞を用いて、iPS細胞形成に関わる4因子Oct3/4、Sox2、Klf4、c-MycとNanogを合わせた5つの遺伝子領域、及びそれらを含む染色体テリトリー領域について、3D-FISH法により3次元核内空間配置の基本的な特性について検討した。サンプル細胞数の不足のため、現時点で全貌が明らかにできていないが、引き続き解析を進めて考察する。

研究成果の概要(英文)：In this study from the viewpoint of spatial positioning of chromosome territories and genomic regions within the nucleus I would try to find the molecular mechanism of why the iPS cells are established and to investigate gene kissing of reprogramming related genes by 3D-FISH techniques using the DNA probes with Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, and Nanog, and their chromosomal paints onto mice cell nuclei. Basic characteristics of spatial arrangements have not yet been carried out due to shortage of available cells, however, when overcoming technical problems, I would perform the analyses and discuss the issues.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：染色体テリトリー 3D-FISH 遺伝子空間配置 核内配置 マウスiPS細胞 リプログラミング ゲノム配置

## 1. 研究開始当初の背景

(1)染色体テリトリー:真核生物における細胞核内の染色体は無秩序に入り混じった状態ではなく、個々の染色体ごとに高度に区画化された「染色体テリトリー」として一定の空間配置を占めており、その核内空間配置はゲノム機能発現やゲノム進化と重要な関わり合いを持つ。染色体テリトリーの3次元核内配置を決定付けるパラメータとして、個々の染色体の物理サイズ、遺伝子密度、GC含量、遺伝子発現状態などが知られているが、細胞周期や核形態の影響を受けたり、細胞の種類や生物種間、発生、分化段階で異なる特性を持っており、その核内配置の特性と生物学的意義については未知な部分が多く残されている。研究代表者らは、3D-FISH法により霊長類やニワトリ細胞核における染色体テリトリーの3次元核内配置の特性を明らかにしてきた(Tanabe *et al.*, 2002, 2005, 2010)。

(2)放射状核内配置と相対核内配置:前者は、核の中心付近から核膜周辺部にかけて、放射状のどの領域に分布するかを表す核内配置。例えばヒトリンパ球細胞核において、ほぼ同サイズのヒト18番および19番染色体に着目すると、遺伝子密度の低い18番染色体は核の周辺部に、遺伝子密度の高い19番染色体は核の中心付近に局在している。また、ニワトリ細胞では、マクロ染色体(サイズが大きく遺伝子密度が低い)が核の周辺部に、マイクロ染色体(サイズが小さく遺伝子密度が高い)が核の中心付近に局在し、これらのトポロジーは進化的に保存されている。これに対し、後者の相対核内配置は個々の染色体テリトリーの相対的な核内配置を指す。ゲノム進化における転座染色体や腫瘍細胞における染色体再編成は、相対核内配置が互いに隣接した場合に高率に引き起こされることが報告されている。特定のDNA領域同士の物理的な接触により、遺伝子の活性化、不活性化が制御されている現象はよく知られており、染色体テリトリー間の接触「Chromosome Kissing」や遺伝子領域間における「Gene Kissing」という現象として様々な視点から報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、多分化能を有するiPS細胞に着目し、細胞初期化過程における染色体・遺伝子領域がどのようなゲノム動態・空間配置を示すのかを明らかにし、iPS細胞の形成時および受精卵と初期胚発生時におけるエピジェネティクス制御の仕組みを探ることである。具体的には、マウス受精卵・初期胚の細胞を単離するとともに、マウスiPS

細胞の作成を実施し、iPS細胞の形成前後において、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanogの各遺伝子領域および各遺伝子領域が存在する染色体テリトリー領域(17、3、4、15、6番染色体)について、3D-FISH法により核内空間配置解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1)マウス受精卵、初期胚細胞の調整、マウスiPS細胞の作成

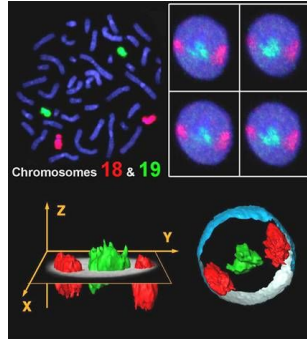
各種マウス細胞の調整を実施; マウス繊維芽細胞、マウスiPS細胞、マウスES細胞、マウス卵細胞(未受精卵)、マウス受精卵(受精直後、2、4、8、16細胞期)、核移植したマウス受精卵、を用いる。尚、~の細胞調整に関しては、連携研究者の三谷教授の指導の下に標本を作成(近畿大学で標本作成し、固定の後、総研大葉山へ輸送)。また、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc遺伝子をSU100を用いた遺伝子導入実験によりマウスiPS細胞の形成、樹立を試みる。

(2)染色体標本の調整、2D-FISH法によるメタフェイズ(分裂中期像)解析

iPS細胞の各クローンおよび観察対象とする各種細胞の染色体構成の性状を調べるために、2D-FISH法によるメタフェイズ染色体解析を実施する。メタフェイズスライド標本(プレパラート)は、コルセミド処理した培養細胞を回収し、低張処理の後、メタノール/酢酸による固定処理を行い、細胞懸濁液をスライドガラス上に展開して作成する。作成したプレパラートはフリーザーにて使用時まで保存する。必要に応じて、Q/Gバンド法を実施し、核型バンド分析を行い、染色体構成の性状を調べる。FISH用のDNAプローブは、Dr. Michael Speicher (Univ. Wien)より供与していただいたマウス各染色体特異的ペインティングプローブ、並びにゲノムリソースセンターから入手したBAC DNAクローンを用いる。Nick translation または DOP-PCR 法によりハプテン (Bio, Dig, DNP) で標識し、蛍光抗体を用いて検出する。複数のプローブを異なる蛍光色素で検出可能なように組み合わせ、メタフェイズ染色体上に2D-FISHを行い、蛍光抗体法でシグナルを検出し、写真撮影、画像解析を行う。3D-FISH法に用いる前段階として、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanogの各遺伝子領域(17B1、3A3、4B3、15D1、6F2)のBACクローンとそれぞれの遺伝子が存在する染色体テリトリー領域(17、3、4、15、6番染色体)のFISH用プローブを精製し、複数のペイント、複数のBAC DNA、ペインティングとBACプローブの各種組み合わせなどを調整して、2D-FISH法により各プローブの検出条件を検討する。

(3)3D-FISH法による染色体テリトリー及びBAC DNAの相対核内配置解析

3次元核構造を維持した細胞固定法(パラホルムアルデヒド固定)により3Dスライド標本を調整する。各種プローブを組み合わせ、



3D スライド標本上にハイブリダイゼーションを行う。蛍光プローブは2D-FISH法と同様に蛍光抗体法でシグナルを検出する。3次元画像を取得するために、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510META) を使用し、各プローブセットごとに20~30個の細胞核の画像データをスキャンし、その画像スタックを集積し、データをファイリングする。各画像スタックを元に画像解析プログラム処理により3次元画像再構築を行うとともに、相対核内配置解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1)マウス受精卵、初期胚細胞の調整、マウスiPS細胞の作成

SU100を用いたOct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc遺伝子の遺伝子導入法によりiPS細胞の樹立を試みたが、正常なコロニー形態を示す株が樹立できなかった。そこで別途iPS細胞を入手して解析に使用するとともに、マウス未受精卵およびIVFによる受精卵、2、4、8、16細胞期の初期胚細胞を得て、解析に供した。

(2)染色体標本の調整、2D-FISH法によるメタフェイズ(分裂中期像)解析

Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanogの各遺伝子領域(17B1、3A3、4B3、15D1、6F2)のBAC-DNAとそれぞれの遺伝子が存在する染色体テリトリー領域(17、3、4、15、6番染色体)のFISH用DNAプローブを精製し、Bio、Dig、DNPのハプテンで標識した。各プローブセットでのマウスCot-1 DNAの混合比を調節することによりハイブリダイゼーションの条件を検討し、正常マウスEmbryonic Fibroblast (MEF)由来のメタフェイズ染色体標本上への2D-FISH法により、目的とする遺伝子領域にシグナルが観察された。

(3)3D-FISH法による染色体テリトリー及びBAC DNAの相対核内配置解析

2D-FISH法と同様に蛍光抗体法でシグナルを検出し、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510META) により画像データをスキャンして、画像スタックを集積し、3次元画像構築、空間配置解析を行った。まず正常マウス繊維芽細胞株における3D-FISH法による観察から、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanogの5つの遺伝子領域間では互いに空間的な距離を置き、Gene Kissingは観察されなかった。これらの遺伝子領域が存在する染色体テリトリー間でのChromosome Kissingについても同様に観察されなかった。次にマウス受精卵(受精直後)、2細胞期、4細胞期、8細胞期、モルラー細胞期の細胞について、3次元構造を維持した固定法を施し、シングルセルレベルで注意深く取り扱いながら3D細胞核標本作製した。通常の3D-FISH法のプロトコールでは、細胞の脱落(逸失)が起こり、良好なシグナルを得ることができなかった。今後は手技的な開発をベースとして進め、細胞初期化に伴うゲノム動態・遺伝子空間配置の特性を明らかにしていく。特に

iPS細胞形成時にどのようなGene Kissingが生じているかを確かめることはリプログラミングの仕組みやiPS細胞形成メカニズムを探る上で重要であり、今後も解析を進める予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 5件)

Hideyuki Tanabe: Role of spatial positioning of chromosome territories: Evolutionary views and characteristics in cancer cells. International Symposium on Bio-imaging and Gene Targeting Sciences in Okayama (Invited speaker), Okayama University, February 2015, Okayama, Japan

田辺秀之: 染色体テリトリー・遺伝子領域の細胞核内空間配置解析: 一細胞生物学のさきがけ・シンポジウムシリーズ 2 すばる望遠鏡から顕微鏡へ: 次世代三次元補償光学系を用いた生体イメージング・光操作に向けて、2014年8月、国立天文台(三鷹) 東京

田辺秀之: 細胞核内における遺伝子・染色体テリトリー・ゲノム配置の特性について第40回臨床細胞分子遺伝研究会 特別講演(招待講演)2013年2月、兵庫医科大学、西宮

田辺秀之: 細胞核における染色体・遺伝子領域の空間配置解析について 第151回染色体研究会 特別講演(招待講演)2012年9月、東京医科大学、東京

田辺秀之: 染色体テリトリーのダイナミクス: 細胞核内におけるゲノム配置の特性 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会 ワークショップ講演(招待講演)2012年8月、大阪国際会議場、大阪

〔図書〕(計 1件)

田辺秀之: 私のメンター Thomas Cremer - 105年前の「染色体テリトリー」を現代へ紡ぐ FISH法の創始者・実験医学 Vol.32 No.11 (7月号)、1805-1809 (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田辺 秀之 (TANABE HIDEYUKI)

総合研究大学院大学・先端科学研究科・准教授

研究者番号: 50261178

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
三谷 匡 (MITANI TASUKU)  
近畿大学・先端科学技術研究所・教授  
研究者番号：10322265