

# Epigenetic inheritance between generations at individual-cell level revealed by single-cell-based direct observation

一細胞直接観察法を用いた後天的獲得情報の世代間伝承の研究

若本 祐一

細胞の表現型はゲノム上の遺伝情報だけでは決定されず、細胞が過去の履歴に依存して蓄えた後天的獲得情報（エピジェネティック情報）によっても影響を受けると考えられる。この後天的獲得情報がどのように記憶され、子孫細胞へと世代を跨いで伝承していくかを明らかにするためには、個々の細胞の表現型の世代間での関係を細胞間相互作用まで含む厳密な環境制御下で明らかにする必要がある。これを可能にする細胞観察法を「1細胞直接観察法」と呼び、本研究ではまず、この1細胞直接観察法を実現する新規細胞観察系「オンチップ1細胞培養システム」を開発し、更にこの装置を用いて、大腸菌をモデルとした一遺伝型の細胞に生じる表現型揺らぎと世代間での後天的情報伝承の有無の検証、及び拡散性シグナル因子を通じた細胞間コミュニケーションによる獲得情報保持の検証を行った。

## 1. オンチップ1細胞培養システムの開発

細胞の表現型を1細胞レベルで世代を跨いで観察・比較する為に、新たに「オンチップ1細胞培養システム」を開発した。このシステムは4つの主要部位からなる。1つ目は顕微鏡用カバーガラス上に微細加工技術を用いて作製したマイクロチャンバーで、これは細胞を1細胞単位でその内部に閉じ込め観察する為に用いる（図1）。2つ目は細胞の非接触ハンドリングを行う光ピンセットで、これを用いることでマイクロチャンバー内での直接接触による細胞間相互作用を制御することができる。3つ目は培養液循環部で、これはマイクロチャンバー内の培養液を任意の種類のもので循環させることで細胞周囲の環境を厳密に制御するものである。4つ目は画像取得ユニットで、細胞の顕微画像をCCDカメラを通してDVカセットに録画する。

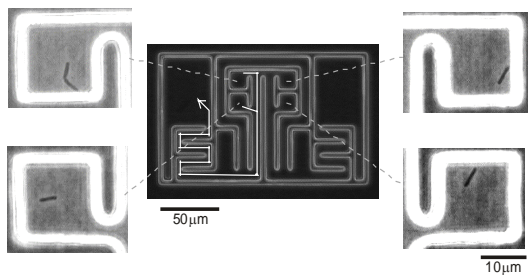


図1 マイクロチャンバーとその内部の細胞

このシステムを用いて実際に細胞観察を行ったところ、大腸菌1細胞の直系子孫細胞4細胞を

同時に 10 世代以上一定環境下で直接観察できることが分かった。この方法により厳密な環境制御下で 1 細胞の表現型を世代間で比較することが初めて可能となった。

## 2. 一定環境下における細胞表現型の揺らぎと世代間相関の計測

上記 1 において開発したオンチップ 1 細胞培養システムを用い、同一遺伝型を有する大腸菌の一定環境下での表現型揺らぎの大きさと、各細胞の状態の子孫細胞への伝承の有無について検討した。その結果、大腸菌の分裂間隔時間、各世代開始時の細胞長（初期長さ）は一定環境下であってもそれぞれ 33%、26%(C.V.)のばらつきを含むことが分かった。個々の細胞の 10 世代分の状態推移をこれら 2 つの指標を用いて調べたところ、各細胞の状態は世代間で大きくばらつくものの、10 世代分の平均は細胞間で等しいことが分かった（図 2）。

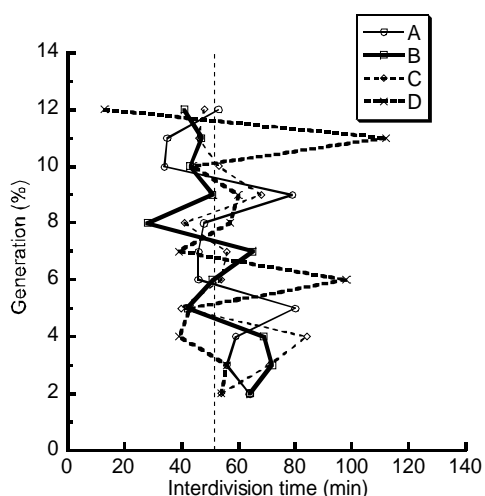


図2 分裂間隔時間の世代間推移

細胞状態の世代間相関を調べると分裂間隔時間では隣り合う世代間で相関はなく( $r=-0.09$ )、初期長さには正の相関( $r=0.45$ )が見られた。これにより、長さ情報は隣り合う世代で伝承する傾向があることが分かった。

更にこれら 2 つの指標の相関を調べると両者の間には負の相関( $r=-0.49$ )があり、初期長さを元に分裂間隔時間を緩やかに調節し大きな揺らぎに対して平均値を維持するフィードバック機構が働いていることが示唆された。

## 3. 伸長表現型の後天的遺伝

上記 2 の観察において一定環境下で約 5%の頻度で現れた伸長表現型を持つ大腸菌に注目し、その状態の世代間推移を観察した。その結果、通常の表現型を持つ細胞が一度伸長表現型を獲得すると、不等分裂を繰り返しながら獲得した表現型を子孫細胞の一つの系列に後天的に伝承することが分かった（図 3）。

細胞長と分裂位置の関係を調べると、分裂時の長さが  $10\mu\text{m}$  以下では等分裂、それ以上では不等分裂が起こることが分かった。これは、分裂位置決定に対して細胞長の閾値が存在することを示し、その閾値を越えると細胞は新たな表現型を獲得し、それを伝承し始めることを示している。

この現象を可能にする細胞内分子機構を考える為に、分裂位置決定に関わる MinCDE タンパク質の細胞内振動ダイナミクスを様々な長さの細胞に対してシミュレートしたところ、 $7.5\mu\text{m}$  前後で振動モードが単振動から倍振動

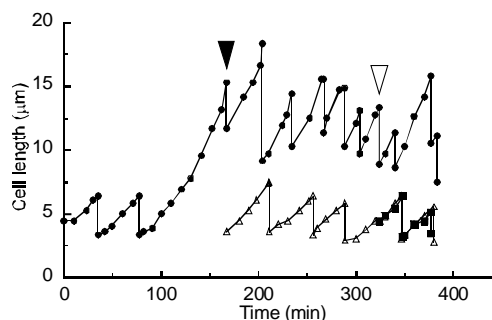


図3 伸長表現型の出現と伝承

へと変わることが分かり、実験で観察された伸長細胞の不等分裂はこれらタンパク質の振動ダイナミクスに依存していることが示唆された。

以上の結果は、細胞長という細胞形状の情報が表現型を決定し、一方でそれ自身も安定に伝承することを示しており、1細胞レベルでの後天的獲得情報の世代間伝承の存在を1細胞直接観察により初めて証明した。

#### 4. 拡散性シグナルによる細胞間コミュニケーションの影響

細胞の表現型決定に寄与する後天的情報は細胞内だけでなく、ある特定の相互作用状態を細胞間で作り出すことにより保持される可能性も考えられる。そこで、大腸菌の静止期環境に保持された拡散性シグナル因子による相互作用形式を対数増殖期の細胞に与え、細胞間コミュニケーションによる情報保持の有無を検討した。

その結果、静止期環境中のシグナル因子は栄養非依存的に細胞の成長を10分以内に停止させることが分かった(図4)。シグナル因子の濃度を下げて細胞に与えた場合、濃度に応じた抑制された成長速度を維持することから、細胞は現在置かれた環境中のシグナル因子の濃度に従って成長速度を調節していると考えられる。このことは、シグナル因子の濃度という情報が成長速度決定に大きく寄与することを示しており、拡散性シグナル因子による細胞間コミュニケーションが後天的情報を保持することを示している。

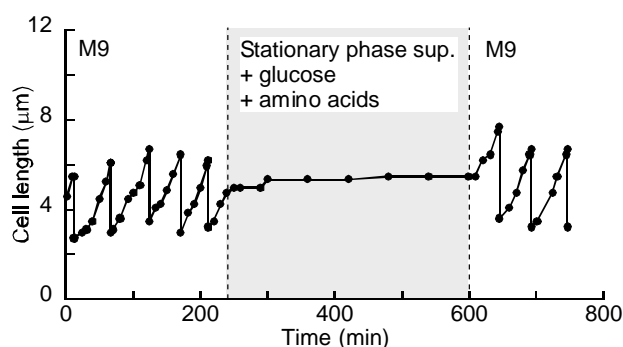


図4 対数増殖期にある細胞の静止期環境への応答

#### 5. マルコフ連鎖解析による後天的遺伝拘束度の定量的評価

細胞の表現型が後天的遺伝にどの程度拘束されているかを定量的に評価するため、マルコフ連鎖解析により、情報論的冗長度を用いて評価する方法を示した。この方法により上記3の実験で得られた分裂間隔時間と初期長さの拘束度を評価すると、それぞれ0.03、0.10となり、初期長さのほうが3倍程度拘束度が大きいことが分かった。

以上本研究では、大腸菌において後天的獲得情報が世代間で伝承する過程を1細胞レベルで初めて明らかにした。また、同一遺伝型を有する細胞が一定環境下で示す表現型揺らぎの大きさを初めて定量的に計測し、更に細胞間コミュニケーションによる情報保持の存在を示した。これらの結果は1細胞直接観察法により初めて得られるものであり、この構成的な実験手法は1細胞レベルでの獲得情報の伝承機構を明らかにする為には必須となると考えられる。