

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06212

研究課題名(和文) 生細胞における超高分解度DNA多色イメージングによる分裂期染色体構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of chromosome structure by DNA multi-color imaging using super-resolution microscopy in living cells

研究代表者

高田 英昭 (Hideaki, Takata)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20455207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,220,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では分裂期染色体構造構築機構を明らかにするために、FLIM-FRETや超解像度顕微鏡法を用いて染色体構成因子の機能解析を進めるとともに、ゲノム編集技術を応用したCRISPR/dCas9システムによる生細胞内での配列特異的DNA可視化を行った。その結果、カルシウムイオンが分裂期において核膜崩壊後の染色体凝縮や染色体動態に必要であることを示した。また、染色体の骨格構造を形成する蛋白質の一つであるKIF4AがCdk1によりリン酸化されることで、コンデンシンI複合体を染色体にリクルートし、染色体凝縮を進めることを示した。細胞老化や細胞の癌化に伴うクロマチン構造の変化を検出することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、分裂期における染色体凝縮には蛋白質だけでなくカルシウムイオンの働きも必要であることを示した。このため、細胞内カルシウムイオン制御に関わる遺伝子異常が染色体異常につながる可能性が考えられる。また、KIF4AのCdk1によるリン酸化が染色体凝縮を開始するカギの一つであることを示し、分裂期初期の染色体凝縮機構の解明が進んだ。さらに、本研究で構築したCRISPR/dCas9システムを活用することで、細胞状態変化に伴うクロマチン構造変化と遺伝子発現変化との関連を調べることで、将来的に生命現象の理解や疾患モニタリングへの応用等が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of chromosome condensation during mitosis, chromatin imaging techniques including FLIM-FRET, super-resolution microscopy, and CRISPR/dCas9 system were employed. As a result, the function of a divalent cation, calcium ion, was revealed as a booster of chromosome condensation after nuclear envelope breakdown. In addition to the calcium ion, KIF4A which is localized at chromosome scaffold, an axial structure observed in the center of sister chromatids, is required for chromosome condensation during early mitosis. The phosphorylation site of KIF4A by Cdk1 was identified, and the phosphorylation was found to be required for the interaction with condensin I complex, which is also localized at chromosome scaffold and induces chromosome condensation by chromatin loop formation. The changes in chromatin structure in cancer cells and senescence cells were also detected using a CRISPR/dCas9 system.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体 クロマチン イメージング カルシウム リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体は、複製された長い DNA を、均等かつ安全に 2 つの娘細胞に分配するために真核生物が獲得した構造体である。染色体の構造の欠陥は生物にとっては致命的であり、ゲノム情報を正しく伝えることができなくなる。したがって、染色体構造の解明は医学分野への利用に直接つながる生命科学の重要な課題である。

直径 2 nm の DNA はまず塩基性のタンパク質ヒストンに巻かれ、ヌクレオソームとよばれる構造体を形成し、非ヒストンタンパク質と結合したクロマチンとして核内に納められている(図1)。分裂期に入ると、クロマチンがさらにコンパクトに折り畳まれ染色体構造を形成する(図1)。これまで、電子顕微鏡を用いた染色体の観察結果等に基づき、ヌクレオソーム繊維は規則正しく折り畳まれたクロマチン構造を形成すると考えられており、生物学の教科書にも直径 30 nm のクロマチン構造を経て染色体が形成されるモデルが掲載されている。一方で、クライオ電子顕微鏡や X 線を用いて、より生体内環境に近い条件で染色体構造を観察すると、ヌクレオソーム繊維は不規則に折り畳まれて存在しているという従来の説とは異なった結果が観察されている。このように、染色体の構造については実験条件により異なる結果が得られており、未だ統一した見解は得られていない。染色体構造解明を遅らせている要因の一つは細胞内で染色体の凝縮及びその構造の可視化が困難である点にあり、これらを可視化する技術開発の必要性は高い。

近年の顕微鏡技術の性能の向上は目覚しく、従来の蛍光顕微鏡では実現不可能であった 200 nm 以上の解像度を持つ超解像度顕微鏡技術がいくつも開発されてきており、2014 年度のノーベル化学賞はこの超解像度顕微鏡技術の基礎を築いた 3 研究者に授与された。一方で、近接する 2 本の DNA 鎖の配列を調べる Hi-C 法と呼ばれる手法を用いて、核内あるいは染色体内の DNA 配列の位置関係を網羅的に解析してクロマチン構造の変化を調べる研究も増加している。分裂期染色体の凝縮は、間期から分裂期に移行する際にクロマチンの高次構造が変化することで達成されるため、染色体凝縮時の DNA 位置関係の変化を捉えることは染色体凝縮メカニズムの解明に大きく寄与すると期待できる。

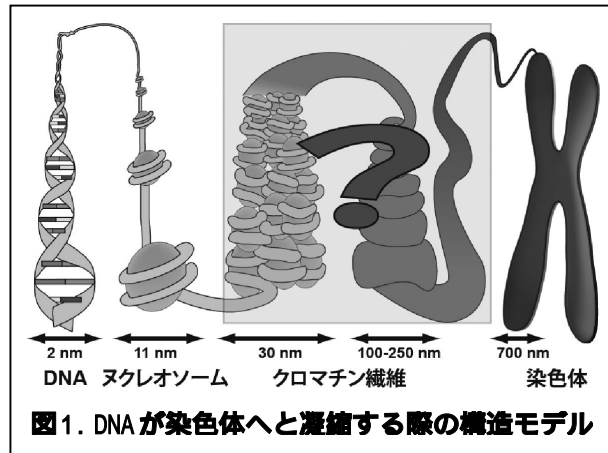


図1. DNA が染色体へと凝縮する際の構造モデル

2. 研究の目的

本研究では、染色体構造を可視化する技術を用いた染色体凝縮因子の機能解析を進め、染色体凝縮メカニズムの解明を行うことを目的とする。具体的には、fluorescence lifetime imaging microscopy-Förster resonance energy transfer (FLIM-FRET) を利用し、染色体の凝縮状態を定量的に評価することで、染色体凝縮への関与が示唆されている 2 価陽イオンの細胞内での機能を検証する。また、染色体構造構築に重要な働きを持つ染色体スキャフォールド構造の機能解析を進める。染色体スキャフォールド構造は、染色体腕の中心に形成される軸状の構造で、クロマチンをループ状に束ねることで染色体凝縮および形態形成に寄与することが示唆されている。その機能解析は、2013 年に発表された細胞内で特定のゲノム配列をターゲティングすることができる Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) システムを用いる。これにより、生きた細胞内で異なる 2 つの異なる DNA 配列を超解像で可視化するシステムを構築することで、分裂期でのダイナミックな DNA 配列の位置関係の変化を捉える。

3. 研究の方法

本研究では、FLIM-FRET を用いたクロマチン凝縮状態の定量評価システムと CRISPR/dCas9 を用いた DNA 相互作用可視化システムという 2 つのシステムを構築することで染色体凝縮メカニズムの解明を進めた。

3-1 .FLIM-FRET を用いたクロマチン凝縮状態の定量評価システムの構築

異なる蛍光分子間の距離が接近すると、励起されたドナー蛍光分子のエネルギーがアクセプター蛍光分子に異動する FRET と呼ばれる現象が生じる。FRET が生じると、ドナー蛍光分子の蛍光寿命が減少する。このため、ドナー蛍光分子の蛍光寿命を FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) で測定することで、分子間距離の変化を高感度に検出することが可能になる。そこで、クロマチン

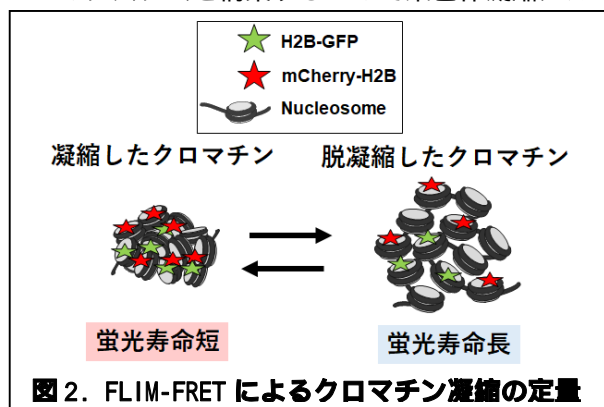


図2. FLIM-FRET によるクロマチン凝縮の定量

の凝縮状態を定量評価するために、DNA に結合するヒストン H2B の C 末端に GFP を融合した蛋白質、および H2B の N 末端に mCherry を融合した蛋白質を発現するベクターを作製し、同時に HeLa 細胞にトランスフェクションした。2 種類の蛍光蛋白質の発現を細胞内で確認後、GFP の蛍光寿命を FLIM で測定することでクロマチンの凝縮状態の定量的な評価系を構築した(図 2)。この評価系を用いて、細胞周期を通じたクロマチン凝縮状態の変化、および細胞内 2 価陽イオン濃度を变化させたときのクロマチン凝縮状態の変化を調べた。

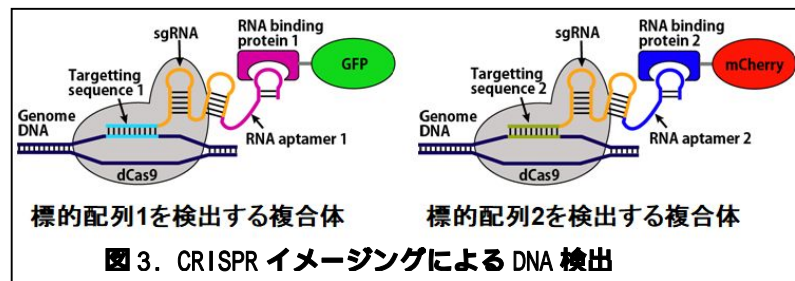
3 - 2 . KIF4A リン酸化部位変異体の作製

染色体スキャフォールド構造を形成する蛋白質の一つである KIF4A の 1186 番目のセリン残基が分裂期にリン酸化されることが以前の研究で明らかとなった。このため、このセリン残基をアラニン残基に置換した KIF4A S1186A の発現ベクターを作製し、内在性 KIF4A をノックダウンした HeLa 細胞内で KIF4A S1186A を発現させることで KIF4A リン酸化の機能解析を行った。

3 - 3 . CRISPR/dCas9 を用いた DNA 相互作用可視化システムの構築

ヒト細胞内で特定の DNA 配列の挙動を解析するために、ヌクレアーゼ活性を欠損した Cas9 (dCas9) を用いて、single guide RNA (sgRNA) を介して標的 DNA 配列の可視化を行った。sgRNA の 3' 末端に特定のモチーフ (RNA アプタマー) を付加し、そのモチーフを認識する蛍光標識蛋白質を共発現させることで標的配列を可視化した (CRISPR イメージング)。RNA アプタマーと蛍光標識蛋白質の組み合わせは、MS2/MCP-RFP、PP7/PCP-GFP、BoxB/N22-RFP を用いた。生細胞で 2 箇所のゲノム DNA を配列特異的に同時に可視化するために、a) dCas9 発現ベクター、b)

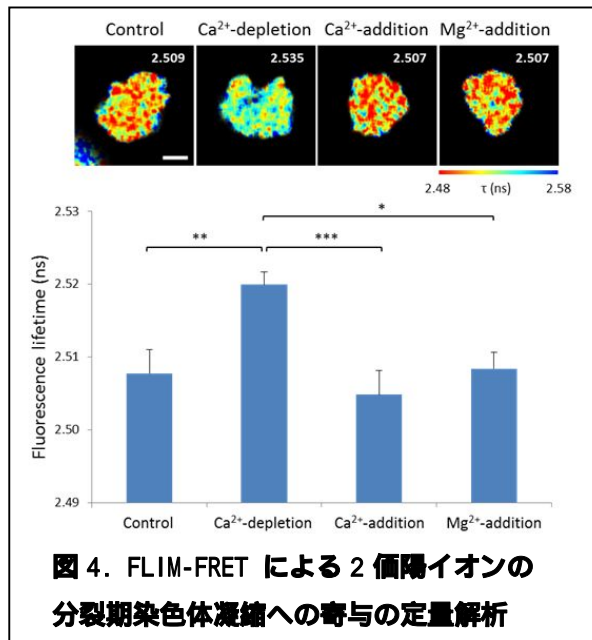
sgRNA- RNA アプタマー発現ベクター、c) 蛍光タグ RNA 結合蛋白質発現ベクターの 3 種類のベクターを同時に細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後、蛍光シグナルを蛍光顕微鏡下で観察し、標的 DNA の挙動を解析した。



4 . 研究成果

4 - 1 . FLIM-FRET による 2 価陽イオンの染色体凝縮への寄与の解明

2 価陽イオンが分裂期のクロマチン凝縮に寄与することは *in vitro* の実験により示されているが、細胞内での働きについてはクロマチンの凝縮状態を高感度かつ定量的に検出することが困難であるため議論が続いている。そこで、本研究では、細胞内のカルシウムイオン濃度を減少させた細胞におけるクロマチン凝縮の変化を FLIM-FRET により解析した。Nocodazole で分裂期に同調した細胞内のカルシウムイオン濃度を、カルシウムイオンをキレートする BAPTA とカルシウムイオンの細胞膜透過性を高める ionomycin で処理することで枯渇させた場合、通常のカルシウムイオン濃度の細胞と比べて GFP の蛍光寿命が増加したことから、カルシウムイオンが分裂期染色体のクロマチン凝縮を維持するために必要であることが明らかになった (図 4)。また、カルシウムイオン濃度が減少した細胞に、カルシウムイオンを再び添加した場合だけでなく、同じ 2 価陽イオンであるマグネシウムイオンを添加した場合にも減少した蛍光寿命の回復が観察された (図 4)。このことから、分裂期染色体のクロマチン凝縮には 2 価陽イオンの種類ではなく、電荷が重要であることが示唆された。また、分裂期の進行に伴うクロマチン凝縮状態の変化を解析したところ、カルシウムイオン濃度が減少した細胞では、核膜崩壊後の染色体凝縮が遅れることが明らかになった。以上の結果から、2 価陽イオンは核膜崩壊後の染色体凝縮を促進する働きがあることが示された。



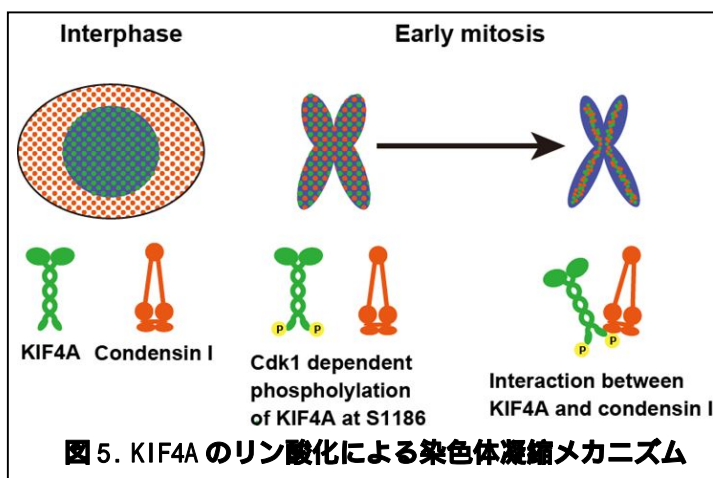
4 - 2 . カルシウムイオンによる動原体-微小管相互作用制御機構の解明

カルシウムイオン濃度が減少した細胞では、上記の染色体凝縮の低下に加えて染色体の整列

異常も観察された。細胞を低温でインキュベートすることで、微小管の重合を阻害し、動原体微小管の安定性を調べた結果、カルシウムイオン濃度が減少した細胞における動原体微小管の安定性の低下が観察された。このため、カルシウムイオンが動原体と微小管間の結合に関与する可能性がある。そこで、カルシウムイオン濃度が減少した細胞において動原体蛋白質の局在を解析したところ、動原体の Fibrous corona を形成に関与する CENP-F の動原体への局在が減少することが明らかになった。一方、カルシウムイオンが減少した細胞でも微小管の重合には大きな影響は観察されなかった。以上の結果から、細胞内カルシウムイオン濃度の減少により、CENP-F が動原体から減少し、微小管を安定して染色体に結合させることができなくなり、微小管の不安定化ならびに染色体の整列異常が引き起こされると考えられる。

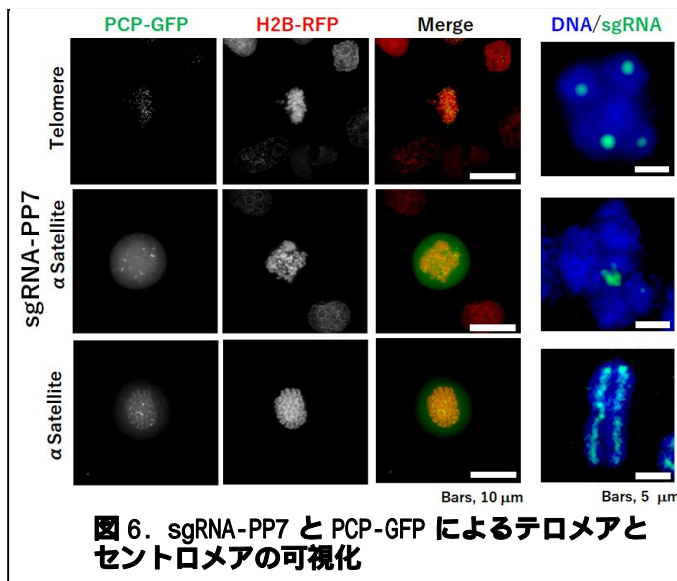
4 - 3 . 染色体構造構築における KIF4A リン酸化の機能解析

KIF4A の 1186 番目のセリン残基のリン酸化の分裂期における機能を明らかにするために、セリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (KIF4A S1186A) を GFP と融合し局在解析を行った。その結果、野生型 KIF4A は分裂期に染色体と分裂溝への局在が観察されたが、変異型 KIF4A は染色体への局在のみが消失した。また、変異型 KIF4A を発現する細胞では、染色体の形態異常の割合が増加した。この染色体の形態異常は、KIF4A を RNAi によりノックダウンした場合にも観察される。KIF4A は染色体スキャフォールド構造寄与することが示唆されているが、KIF4A 変異体を発現する細胞では、別のスキャフォールド因子であるコンデンシン I 複合体の局在も染色体から消失することが明らかになった。この結果から、KIF4A のリン酸化がコンデンシン I との相互作用を制御している可能性が考えられる。そのため、免疫沈降を行うことで両者の相互作用を確認したところ、野生型の KIF4A で検出されるコンデンシン I との相互作用が、変異体では消失することが確認できた。さらに、KIF4A S1186 のリン酸化は分裂期に活性化される代表的なキナーゼである Cdk1 が行うことを同定した。KIF4A が持つモーター活性が、コンデンシン I を染色体スキャフォールドヘリクルートするために必要であることが報告されているため、分裂期の開始時に Cdk1 が KIF4A をリン酸化し、コンデンシン I と相互作用して染色体スキャフォールド構造を構築することで、正しい染色体凝縮が進むと考えられる。



4 - 4 . CRISPR イメージングによる生細胞内の DNA 可視化

細胞内での DNA 可視化に必要なベクター (dCas9 発現ベクター、sgRNA- RNA アプタマー発現ベクター、蛍光タグ RNA 結合蛋白質発現ベクター) をヒト培養細胞 (HeLa 細胞) へトランスフェクションをし、標的配列のシグナルを細胞内で検出した。標的配列にはリピート配列であるテロメア (TTAGGG) とセントロメアの サテライトを標的とする sgRNA を作製して用いた。複数の標的配列を区別して検出するために、sgRNA に付加する RNA aptamer と蛍光標識 RNA 結合蛋白質の組み合わせは MS2/MCP-RFP、PP7/PCP-GFP、BoxB/N22-RFP の 3 種類を検討したが、このうち配列特異的なシグナルを確認できたのは PP7/PCP-GFP の組み合わせのみであった。他の組み合わせでは、蛍光蛋白質のシグナルが細胞質や核小体で強く検出され、配列特異的なシグナルは確認できなかった。また、PP7/PCP-GFP の組み合わせを用いた場合、標的配列がテロメアリピートの場合は予想されるように分裂期染色体のテロメアからのみシグナルが検出されたが、サテライト配列を標的とした場合、セントロメアに加えて高い頻度で染色体スキャフォールド構造からのシグナルも検出された (図 6)。染色体スキャフォールドのシグナルは sgRNA-



RNA アプタマー発現ベクターと蛍光タグ RNA 結合蛋白質発現ベクターのみを細胞にトランスフェクションした場合(dCas9 をトランスフェクションしない)にも観察されることから、PP7-RNA モチーフに由来する非特異的シグナルと考えられる。事実、sgRNA に RNA アプタマーを付加したイメージングでは dCas9 に依存しない非特異的シグナルが増加することが報告されている (Hong et al., 2018)。このため、RNA アプタマーと蛍光標識 RNA 結合蛋白質の組み合わせによるクロマチン相互作用の多色イメージングは困難と考え、dCas9 に 3xGFP を付加することで配列特異的な DNA 可視化を行った。その結果、 サテライト配列を標的とした場合にもセントロメア由来のシグナルのみが検出され、染色体スキャフォールドからのシグナルは検出されなかった。本結果は、RNA アプタマーを用いたゲノム編集関連技術が off-target 効果を生み出す可能性を示す新たな事例である。

セントロメアを検出するために サテライト配列を標的とする sgRNA と dCas9-3xGFP を細胞にトランスフェクションすると、核型が正常な細胞である HFF1 細胞や hTERT-RPE1 細胞では 6-8 個の輝点が観察されるのに対し、癌細胞である HeLa 細胞ではその数が 10 個以上に増加することが観察された (図 7)。このことから、hTERT-RPE1 細胞では特定の染色体のセントロメアが検出されており、細胞の癌化に伴う染色体数異常により観察される輝点が増加すると考えられる。そこで、マルチカラー-FISH 解析と CRISPR イメージングによるセントロメアの検出を同時に実施することで、検出されたセントロメアのシグナルが何番染色体に由来するかを調べた結果、1 番、12 番、19 番染色体からのシグナルが 50%以上の細胞から検出され、本研究で用いた sgRNA では特定の染色体のセントロメアが高頻度で検出されることが明らかとなった。また、細胞老化のモデル細胞である TIG-1 細胞では、細胞老化に伴うセントロメア領域におけるクロマチンの凝縮異常(セントロメア領域の伸長)が観察されており、細胞老化のイメージングに本研究で構築した実験系を利用できることが示唆された。

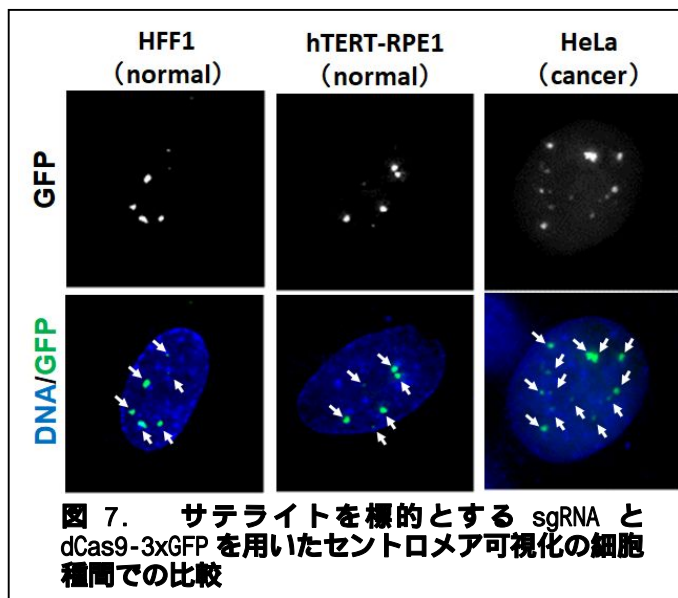


図 7. サテライトを標的とする sgRNA と dCas9-3xGFP を用いたセントロメア可視化の細胞種間での比較

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Takata, H*, Madung, M., Katoh, K., Fukui, K. (2018) Cdk1-dependent phosphorylation of KIF4A at S1186 triggers lateral chromosome compaction during early mitosis. PLoS One 13, e0209614. doi: 10.1371/journal.pone.0209614. * Corresponding author. 査読有

Poonperm, R.*, **Takata, H.*#**, Uchiyama, S., Fukui, K. (2017) Interdependency and phosphorylation of KIF4 and condensin I are essential for organization of chromosome scaffold. PLoS One, 12, e0183298. doi: 10.1371/journal.pone.0183298. * equally contribution, # Corresponding author, 査読有

Phengchat, R., **Takata, H.***, Uchiyama, S., and Fukui, K. (2017) Calcium depletion destabilises kinetochore fibres by the removal of CENP-F from the kinetochore. Sci. Rep. 7, 7335. doi: 10.1038/s41598-017-07777-6. * Corresponding author. 査読有

Phengchat, R., **Takata, H.***, Morii, K., Inada, N., Murakoshi, H., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2016) Calcium ions function as a booster of chromosome condensation. Sci. Rep. 6, 38281. doi: 10.1038/srep38281. * Corresponding author. 査読有

[学会発表](計 8 件)

高田英昭, Chromosome structural analysis using imaging techniques, 13th India-Japan Bilateral Conference (招待講演)(国際学会) 2018 年

高田英昭, Chromosomal proteins required for authentic chromosome morphology, 2nd e-ASIA Symposium on Functional Nano-Biology (招待講演)(国際学会) 2018 年

高田英昭, 超解像イメージングにより明らかとなった新たな染色体構造, 第 27 回日本バイオイメージング学会学術集会, 2018 年

高田英昭, Studies on the condensation mechanism of mitotic chromosomes and its biological significance, 6th Asia-Pacific Chromosome Colloquium (国際学会) 2018 年

高田英昭、Imaging of chromatin condensation by FLIM-FRET reveals new calcium functions during mitosis、Workshop in The First RCB Bioimaging School (招待講演) (国際学会)、2018年

高田英昭、高感度 DNA 凝縮評価システムにより明らかとなったカルシウムイオンの新たな機能、関西バイオ医療研究会 (招待講演)、2018年

高田英昭、分裂期染色体におけるカルシウムイオンの機能解析、染色体学会第68回年会、2017年

高田英昭、FLIM-FRET を用いた染色体凝縮における二価陽イオンの機能解析、第69回日本細胞生物学会大会、2017年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。