

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14655

研究課題名(和文) 核内クロマチン構造のフラクタル次元と核内温度の同時イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Simultaneous imaging of chromatin fractal dimensions and temperature in living cell nucleus

研究代表者

新海 創也 (Shinkai, Soya)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：60547058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの全長2メートルのDNAはわずか10マイクロメートルのサイズの核の中に収納されています。それが空間的にどれくらい凝縮しているかを定量化するため、我々は核内クロマチンのフラクタル次元という数理的な指標を計測・イメージングすることに挑戦しました。その計測原理は、クロマチン上に二種類の蛍光色素を導入して、その間にクロマチン構造のフラクタル次元に依存したエネルギー移動を生じさせることです。我々はこの原理を使ってクロマチン構造のフラクタル次元をイメージングすることに成功しました。

研究成果の概要(英文)：Each human cell contains total 2 meter of genomic DNA in a cell nucleus with a 10-micro-meter diameter. How chromatin fibers spatially condense is unclear. In this study, we tried to spatially quantify fractal dimensions, which are mathematical barometers for any structures, of chromatin fibers in living cells. The method is based on energy transfer between two fluorescent probes on fractal structures. The efficiency depends on fractal dimensions. Therefore, we made cells with two fluorescent probes on chromatin fibers. Finally, we developed an imaging method to spatially quantify fractal dimensions of chromatin fibers.

研究分野：生物物理

キーワード：クロマチン構造 フラクタル次元 蛍光寿命イメージング 染色体構造

1. 研究開始当初の背景

ヒトの細胞では、わずか容量1ピコリットルの核の中に全長2mものDNAが3次的に折り畳まれて収納されている。近年の高解像度の染色体構造捕獲法(染色体上の遺伝子配置と空間的近接頻度を次世代シーケンサーを用いて網羅的に調べる方法)によって、100 kb-1 Mbの長さから構成されるクロマチンドメイン(topologically associating domain, TAD)の存在が明らかになってきた [1]。TAD内では複数の遺伝子座が頻繁に、さらに協調的に相互作用し、TADは遺伝子発現制御の構造ユニットであると考えられている。しかしながら、その構造情報や核内空間分布はよくわかっていない。

研究代表者は、高分子理論の観点からTADの大きさと凝縮・弛緩状態の抽象的尺度としてのフラクタル次元を用いてTADのモデル化を行っている。その結果、HeLa細胞のクロマチン動態の解析からTADの構造情報を得られることがわかってきた [2]: TADの平均的な直径は100-300 nmであり、核の中心部と核膜近傍のフラクタル次元を比較すると、核膜近傍のTADの方がより凝縮した状態であることが明らかになった。フラクタル次元で定量化される核内クロマチンの凝縮・弛緩状態は、転写などの活性度合いと関連すると推測される。

さらに、蛍光寿命イメージング顕微法(fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM)を用いた生細胞内の温度分布の結果によると、核内は細胞質と比較して平均1°C高温である [3]。しかも、研究代表者らの予備実験の結果、核内では空間的に非一様な温度分布が形成されていること観測している。

また先行研究として、フラクタル次元ではないが、FLIM計測によってクロマチン上のFRET効率が計測されている [4]。

2. 研究の目的

核内でのクロマチンの凝縮・弛緩状態と温度の空間分布を同時にイメージングすることによって、温度によるクロマチン状態の影響や、クロマチン状態によって局所的に温度を調整するような核内制御機構の存在が示唆される可能性がある。本研究課題では、蛍光寿命イメージング顕微法を駆使して、核内クロマチン構造のフラクタル次元イメージング技術を確認する。さらに、核内温度との同時イメージング技術も開発し、核内クロマチンの凝縮・弛緩状態と温度との相関関係の解明に取り組むことを目指す。

3. 研究の方法

先行研究 [4] を参考に、二種類の蛍光タンパク質間での蛍光共鳴エネルギー移動が起きた際の蛍光寿命の変化を計測することで、核内クロマチン構造のフラクタル次元イメージングを行う。細胞分化におけるクロマチン状態の生

物学的意義を探る応用研究も考慮して、マウス ES 細胞をモデル細胞に、H2B-GFP と H2B-RFP が核内に共発現する細胞株を作成する。時間相関単一光子計数法に基づく蛍光寿命減衰カーブを取得し、非線形フィッティングからフラクタル次元を導出することで、フラクタル次元画像データを作成する。この技術が確立したうえで、核内温度との同時イメージング技術を開発する。蛍光性ポリマー温度センサーを核内に導入し、1波長励起・2チャンネル検出系を構築することで、同時イメージングを行う。二つの画像データに対して、ウェーブレット解析による特徴抽出やデータマッピングの技法を駆使した相関解析を行う。

4. 研究成果

(1) 3F (FLIM-FRET Fractal) イメージング法の確立

①先行研究 [4] では HeLa 細胞のヒストンタンパク質に二種類の蛍光タンパク質を導入することで、その蛍光タンパク質間のエネルギー移動 (FRET) を評価していた。しかしながら、我々はマウス ES 細胞に対して、同じように二種類の蛍光タンパク質でヒストンタンパク質のラベル化を試みたものの、FRETが生じるような細胞株を樹立することができなかった。

そこで我々は先行研究 [4] とは異なる方法でクロマチンファイバー上にて FRET が生じる系の構築を試みた。具体的には、ヒストンタンパク質が緑色の蛍光タンパク質でラベル化された安定株に対して、赤色の蛍光色素を使って核酸を染めた。その結果、クロマチンファイバー上で、FRET が高効率で生じることがわかった。

②時間ドメインでの FLIM 計測の生データは膨大なデータ量になることを避けるために、効率的にバイナリ化されたデータとなっている。各ピクセルでの蛍光寿命減衰カーブを評価するためには、そのバイナリ形式データを適切なファイル形式に変換する必要があり、我々はフラクタル次元を求めるためのデータ変換方法を確立することに成功した。

③各ピクセルの変換されたデータに対して、フラクタル次元を評価するためのプログラムを開発した。非線形フィッティングにおけるフィットからのずれを評価すると、我々の開発した方法はバイアスのない評価であることが判明した。

(2) フラクタル次元で定量化されたクロマチン状態の重要性

①先行研究 [4] では FRET 効率という指標のみでクロマチン状態を評価していたが、それはアクセプターの濃度とフラクタル次元に依存する。そのため、我々が開発した 3F イメージング法は、フラクタル次元という構造情報の

みを評価することができるという利点がある。

②予備的な結果であるが、各ピクセルでの蛍光強度とフラクタル次元の関係を調べると、両者に強い相関はない、という結果を得た。すなわち、クロマチンの存在量が多いからといって、必ずしもそこが非常に強く凝縮しているというわけではない。よって、従来のヘテロ・ユークロマチンが凝縮度合いによって分類されてきたことと矛盾する結果となった。最近では、液-液相分離の概念を使ったクロマチンを分類する新しい潮流があり、我々の予備的な結果は、従来のヘテロ・ユークロマチンの分類へ新しい視点を提供する可能性がある。この点に関しては、より詳細な解析のための実験系の構築が必要である。

③データ解析の結果得られたフラクタル次元の値が3を超える場合がある。空間3次元内で3を超えることは無意味のようであるが、ゲノムワイドな染色体構造捕獲法によるコンタクト確率のスケールリング則の評価からも、3を超える場合があることがわかっている。異なる手法で、同じような結果が示唆されていることは、実効的にフラクタル次元が3を超えるメカニズムが存在する可能性がある。その候補は、ダイナミックなクロマチン間の相互作用である。この点は、シミュレーションを含めたより詳細な解析を進めている。

(3) 今後の展望

核内クロマチンのフラクタル次元の生物学的意義を理解する必要がある。そのためには、例えば、よく知られている薬剤処理によって、クロマチン状態がどのように変化するかであったり、細胞周期ごとに、特に、分裂期の凝縮状態を定量化していく必要がある。また、マウスES細胞を分化誘導することで、分化した細胞のクロマチン状態の変化を調べる必要がある。

予定外に核内クロマチンのフラクタル次元を計測するための実験系の構築に時間がかかってしまった。そのため、温度との同時計測をすることが今後の課題である。一方で、赤外線レーザーを用いて、局所的に温度を上げることができる。この場合のクロマチン状態の変化を定量化する必要がある。

<引用文献>

- [1] Nora et al., Nature, 2012; Dixon et al., Nature, 2012.
- [2] Shinkai et al., PLoS Comput Biol, 2016.
- [3] Okabe et al., Nature Communications, 2012.
- [4] Lleres et al., JCB, 2009.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Shinkai S, Nozaki T, Maeshima K,

Togashi Y, Bridging the dynamics and organization of chromatin domains by mathematical modeling, Nucleus, 査読有, 2017, 353-359.

DOI:10.1080/19491034.2017.1313937

- ② Shinkai S, Nozaki T, Maeshima K, Togashi Y, Dynamic Nucleosome Movement Provides Structural Information of Topological Chromatin Domains in Living Human Cells, PLoS Comput Biol, 査読有, 12巻, 2016, e1005136.
DOI:10.1371/journal.pcbi.1005136

[学会発表] (計8件)

- ① Soya Shinkai, Bridging the gap between th dynamics and organization of chromatin domains by mathematical modeling, Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young researchers - Resonance Bio - Academia Sinica - 4D Cell -, 国際学会, 2017年
- ② 新海創也, 数理で解き明かすクロマチン動態と構造の関係, 理研公開シンポジウム「観る・測る・解く」4次元細胞計測の現状と未来, 2017年
- ③ 新海創也, クロマチン動態と構造をつなぐ数理, 生命動態の分子メカニズムと数理, 招待講演, 2017年3月17-18日, 理化学研究所 QBiC, 大阪府
- ④ Soya Shinkai, Bridging the dynamics and organization of chromatin domains by mathematical modeling, 5th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, 国際学会, 2017年3月7-9日, 東広島市
- ⑤ 新海創也, 細胞内温度を記述する術を我々は手にしているか?, 第1回 Biothermology Workshop, 招待講演, 2016年12月10-11日, 基礎生物学研究所, 岡崎市
- ⑥ Soya Shinkai, Tadasu Nozaki, Kazuhiro Maeshima, Yuichi Togashi, Dynamic nucleosome movement provides structural information of topological chromatin domains in living human cells, 2016 Workshop on DNA Reactions and DNA/Chromosome Dynamics, 国際学会, ポスター発表, 2016年9月11-16日, Marine Biological Laboratory, USA
- ⑦ 新海創也, 野崎慎, 前島一博, 富樫祐一, 核内クロマチン動態とクロマチンドメイ

ン構造をつなぐモデルのデザインと実験との融合, CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域第6回数教理デザイン道場, ポスター発表, 2016年6月13-14日, 三島市

- ⑧ 新海創也, 染色体の動的階層性, 細胞システムの動態と論理 VIII, 招待講演, 2016年4月14-15日, 理化学研究所, 和光市

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新海 創也 (SHINKAI, Soya)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号: 60547058

(2) 研究分担者

菅原 武志 (SUGAWARA, Takeshi)
広島大学・理学研究科・研究員
研究者番号: 60713005

(3) 連携研究者

岡部 弘基 (OKABE, Kohki)
東京大学・薬学系研究科・助教
研究者番号: 20455398

落合 博 (OCHIAI, Hiroshi)
広島大学・理学研究科・特任講師
研究者番号: 60640753

(4) 研究協力者

武田 駿介 (TAKEDA, Shunsuke)