

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06594

研究課題名（和文）超解像・1分子イメージングによる転写ハブを介したクロマチンネットワークの動態解析

研究課題名（英文）Single molecule & super resolution imaging of chromatin networking through transcription hubs.

研究代表者

日比野 佳代（Hibino, Kayo）

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教

研究者番号：40435673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生細胞内単一ヌクレオソームイメージング、超解像顕微鏡技術、目的タンパク質の短時間分解除去法（AID法）などを組み合わせ、相分離駆動の液滴様コンパートメントRNA転写装置クラスターがクロマチン構造や動態へ及ぼす影響を調べた。これにより、生きたヒト細胞におけるクロマチン動態と転写制御の関係を明らかにするとともに、相分離生物学分野で多用されている1,6-ヘキサンジオールが細胞内のDNAを凝集させるという予想外の作用を持つことを示した。さらに、エンハンサーとプロモータの相互作用を媒介するコヒージンと転写クラスターがクロマチン構造や動態へ及ぼす影響を調べ、両者の相乗的な役割の一端を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、クロマチンの高次構造を調べる方法としてHi-Cが開発され、世界中に広まっている。本研究は、このHi-C法を利用した世界のトレンドとは一線を画し、新規イメージングを用いてクロマチン高次構造とその動態を転写制御の観点から解明するものである。本研究はHi-C法の研究に対して相補的な情報を得ることができる、世界的にみてもユニークなものである。さらに、本研究で得られるヌクレオソームの動きのデータは、世界中でおこなわれている計算機シミュレーションによるクロマチン動態/転写制御モデリングの基盤データとして利用できる。これにより細胞内環境に即したより精緻なモデリングが可能となり、その波及効果は大きい。

研究成果の概要（英文）：The nucleosome behaviors in living human cells were investigated using single-nucleosome imaging combined with rapid-protein depletion technology (AID system) and super-resolution microscopy. The effects of RNA transcription machinery, considered condensates formed by liquid-liquid phase separation, on chromatin structure and dynamics were investigated. Additionally, we elucidated that 1,6-hexanediol (1,6-HD), frequently used in phase-separation biology, has an unexpected effect; 1,6-HD drastically suppresses chromatin motion and hyper-condenses chromatin in human cells. Finally, the effects of cohesin, which mediates the interaction between enhancer and promoter, and transcription machinery on chromatin structure and dynamics were investigated. It is suggested that both constrain nucleosome motion and synergistically regulate chromatin dynamics.

研究分野：生物物理学

キーワード：ゲノムDNA RNA転写 1分子イメージング 超解像顕微鏡法 クロマチン動態 ヌクレオソーム 単一ヌクレオソームイメージング

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムクロマチンの細胞核内 3 次元構造や動態は、ゲノム機能発現と密接にかかわっている。我々は、様々な転写阻害剤で処理したヒト細胞のゲノムクロマチン動態を、ヒストン 1 分子イメージングにより計測し、クロマチン動態とクロマチン上の活性化型 RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の量に負の相関があることを報告している (Nagashima *et al.*, 2019)。さらに、超解像顕微鏡法により核内のクロマチンの基本構造であるクロマチンドメインが、転写阻害剤 DRB 処理により変化しないことを見出している (Nozaki *et al.*, 2017)。一方、近年、活性化型 RNAPII やメディエーターなどの転写制御因子が動的なクラスターを形成し、これら転写装置クラスターの一部が相分離駆動の液滴様コンパートメントであることが示唆されている (Cho *et al.*, 2018; Chong *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2018; Sabari *et al.*, 2018)。そして、転写クラスター内では、因子間の機能的相互作用が促進され、効率的な転写反応がもたらされると提案されている。本研究では、これらの報告や自身の研究結果を踏まえ、仮説:「巨大な転写装置クラスターをハブとしたグローバルなクロマチンネットワークが存在し、これを介してクロマチン動態と転写が密接に制御されている」(Nagashima *et al.*, 2019) を立て、これを検証する。

2. 研究の目的

超解像顕微鏡技術、単一ヌクレオソームイメージング、目的タンパク質の短時間分解除去法 (AID 法)、計算機シミュレーションなどを組み合わせ、転写クラスターがクロマチン構造や動態へ及ぼす影響を調べ、上述の作業仮説を検証する。これにより、生きた細胞でのクロマチン動態と転写制御の関係を明らかにし、遺伝子発現制御の理解を目指す。

3. 研究の方法

上述の作業仮説を検証するため、様々な細胞操作で転写装置クラスター(ハブ)形成やハブとクロマチンの連結を阻害し、単一ヌクレオソームイメージングを行う。もし、転写装置ハブを介したクロマチンネットワークが存在するならば、ハブ形成や連結因子の阻害でクロマチンの拘束が小さくなり、クロマチン動態の指標であるヌクレオソームの平均二乗変位 (MSD) が大きくなると予想される。実験計画は以下の通りである。

(1) 転写クラスターの可視化およびクロマチン動態の解析:

巨大な転写装置クラスターの構成因子である転写メディエーターに注目し、クラスターの動態を解析する。クラスターの数、大きさ、空間分布やその時間変化を解析し、転写クラスターの動態の基本情報を得る。次に、超解像イメージング (PALM) 法と単一ヌクレオソームイメージングを組み合わせ、転写クラスターとクロマチン構造および動態を同一細胞において計測し、クラスター近傍とそれ以外の領域でクロマチン構造や動態を比較する。

(2) タンパク質迅速分解除去法を用いた転写クラスターの除去とクロマチン動態解析の統合:

タンパク質の短時間分解除去技術 (AID 法) により転写装置クラスターを除去し、その後、クロマチン動態へ及ぼす影響を単一ヌクレオソームイメージングにより計測する。

(3) 転写装置構成因子の阻害下でのクロマチンと転写クラスターの動態解析:

転写クラスターの構成因子である **coactivator** や転写反応を担う **RNAPII** などを阻害剤で転写装置から解離させ、その後、クロマチンの動態や構造を計測する。解析を通して、**研究目的: 転写クラスターの動態とそのクロマチン構造や動態への影響**を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 転写クラスターを可視化し、その動態を生きたヒト細胞内で解析した。転写クラスターの構成因子であるヒトの転写メディエーターのサブユニットに緑色蛍光タンパク質 mClover を融合させ、これを恒常的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株中のメディエータークラスターの数、大きさ、空間分布やその時間変化を解析し、転写クラスターの動態の基本情報を得た。メディエーターは相分離駆動の液滴を形成することが報告されている。そこで液滴を溶かす作用を持つ 1,6-ヘキサンジオール(1,6-HD)により転写クラスターを分散させ、クロマチンの動きを調べた。その結果、メディエータークラスターは消失したが、クロマチンの動きは抑制された。これは予想に反する結果であったが、相分離生物学分野で多用されている 1,6-HD が細胞内の DNA を凝集させる予想外の作用を持つことを示す成果となった(Itoh *et al.*, 2021)。

(2) 転写クラスターの構成因子 coactivator や転写反応を担う RNAPII を、結合阻害剤や分解誘導剤で転写装置から解離させ、その後、間期クロマチンの動態を単一ヌクレオソーム計測した。その結果は上述の作業仮説を強く支持した。

さらに、転写クラスターの構成因子であるメディエーターを短時間で分解除去し、転写クラスターの役割を解析するため、タンパク質の短時間分解除去法(AID 法)を組み込んだ細胞株を樹立した。樹立株では、ヒト HCT116 細胞に、Auxin の添加で分解除去を誘導する mAID タグと蛍光タンパク質 mClover を融合したメディエーター、分解を担う OsTIR1、単一ヌクレオソームイメージングのためのヒストン H2B-Halo、以上 3 者を導入した。融合タンパク質の機能や Auxin による短時間除去を細胞生物学的手法で検証するため、光学顕微鏡を拡張し、効率的な細胞株のスクリーニング環境を整備し、目的の株を得た。得られた株を用いて、転写クラスターを短時間分解除去し、単一ヌクレオソームイメージングを用いて間期クロマチンの動態を計測した。

(3) 分裂期染色体において姉妹染色分体の接着を担うコヒーシンは、間期クロマチンにおいてエンハンサーとプロモータの相互作用を媒介する転写因子のような機能を持つ。また、分裂期染色体の凝縮に必須のコンデンシンが、G2 期においてもクロマチンの組織化に寄与することが報告されている。そこで、クロマチンのネットワーク化因子として、転写クラスターに加え、コヒーシン、コンデンシンの寄与を評価した。

コヒーシンを短時間で分解除去し、クロマチン動態への影響をしらべるため AID 法を用いた。目的の細胞株を作成し、間期細胞からコヒーシンを分解除去したところ、クロマチンの動きが上昇した。次に、転写反応の実態を担う RNAPII を不活化分解する薬剤で細胞を処理すると、こちらもクロマチンの動きが上昇することを確認した。最後に、コヒーシンの分解除去と RNAPII 分解誘導剤による RNAPII の不活化分解処理を同時に行うと、個々に阻害した時と比べ、加算的变化では説明できないほどクロマチンの動きが上昇した。これらの結果は、転写反応の実態を担う RNAPII と転写因子の側面を持つコヒーシンがそれぞれクロマチンをネットワーク化し、その組織化や局所動態の安定化に相乗的に寄与していることを示唆している。そして、この相乗効果は効率的で安定な転写制御を実現していると考えられる。

< 引用文献 >

Itoh Yuji, Iida Shiori, Tamura Sachiko, Nagashima Ryosuke, Shiraki Kentaro, Goto Tatsuhiko, Hibino Kayo, Ide Satoru, Maeshima Kazuhiro, 1,6-hexanediol rapidly immobilizes and condenses chromatin in living human cells, Life Science Alliance 2021, pe202001005

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Itoh Yuji, Iida Shiori, Tamura Sachiko, Nagashima Ryosuke, Shiraki Kentaro, Goto Tatsuhiko, Hibino Kayo, Ide Satoru, Maeshima Kazuhiro	4. 巻 4
2. 論文標題 1,6-hexanediol rapidly immobilizes and condenses chromatin in living human cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202001005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202001005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 8件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hibino, K.
2. 発表標題 Dynamic organization of human mitotic chromosomes
3. 学会等名 Women and Future in Science seminar（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日比野佳代、境祐二、鐘巻将人、前島一博
2. 発表標題 ヒト染色体中でコンデンシンはクロマチンの動きを束縛する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（MBSJ2022）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hibino, K.
2. 発表標題 Single molecule imaging sheds light on the mechanism of the human chromosome condensation.
3. 学会等名 2022 East Asian Single-Molecule Biophysics Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hibino, K., Sakai, Y., Kanemaki, M., Maeshima, K.
2. 発表標題 Single molecule imaging unveils human chromosome condensation
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日比野佳代、境祐二、鐘巻将人、前島一博
2. 発表標題 ヒト染色体凝縮過程の単一ヌクレオソームイメージング
3. 学会等名 第94回日本遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hibino, K., Sakai, Y., Kanemaki, M., Maeshima, K.
2. 発表標題 単一ヌクレオソームイメージングで捉えるヒト染色体凝縮
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hibino, K.
2. 発表標題 Single nucleosome imaging during human chromosome condensation.
3. 学会等名 44th Indian Biophysical Society Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hibino Kayo、Sakai Yuji、Kanemaki Masato、Maeshima Kazuhiro
2. 発表標題 Single molecule imaging unveils the dynamic organization of the human chromosomes.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hibino Kayo、Sakai Yuji、Kanemaki Masato、Maeshima Kazuhiro
2. 発表標題 Single nucleosome imaging sheds light on the dynamic organization of the human chromosomes.
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hibino Kayo、Sakai Yuji、Kanemaki Masato、Maeshima Kazuhiro
2. 発表標題 Single nucleosome imaging sheds light on the dynamic organization of the human chromosomes
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ヘキサンジオールは細胞内のクロマチンの動きを止める
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2021/02/research-highlights_ja/rh20210204.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------