

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32657

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15760

研究課題名（和文）1分子レベルでのクロマチン構造の動的変化の解析技術の開発

研究課題名（英文）Single-molecule imaging of dynamic behavior in chromatin structure

研究代表者

高橋 俊介（Takahashi, Shunsuke）

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号：50778967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、1分子レベルでのクロマチン構造の再構築とその動的変化の解析系を開発を目指し、研究を遂行した。1分子レベルでのクロマチン再構成の予備実験として、試験管内でのクロマチン再構成を試みた結果、ミクロコッカスヌクレアーゼアッセイによりクロマチン構造の再構成が示された。次に1分子イメージングでは、開発した顕微鏡コアユニットを用いて、分子コーミング法に基づき1分子レベルでのクロマチン形成DNAを直接観察することができた。今後の展開として、開発した顕微鏡コアユニットに全反射照明ユニットを実装しながらクロマチン形成DNAの形成条件を最適化することで、その動的構造変動の解析を実施していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、（1）試験管内でのクロマチン構造の再構成、（2）開発した顕微鏡コアユニットによるDNA1分子の蛍光イメージング、（3）クロマチン形成DNAの1分子蛍光イメージングについて成果を得られたと考えている。これらの成果は、クロマチン構造の再構築やその動的変化がゲノム安定化維持に果たす役割を明らかにするための技術が開発される要素技術となったと考えている。

研究成果の概要（英文）：This study was undertaken with the aim of developing a system to reconstruct chromatin structure at the single-molecule level and to analyze its dynamic changes. The chromatin structure was shown to be reconstituted by the micrococcal nuclease assay. Next, chromatin-forming DNA was directly observed at the single-molecule level based on the molecular combing method using the developed microscope core unit. In the future, the dynamic structural variation of chromatin-forming DNA will be analyzed by optimizing the formation conditions of chromatin-forming DNA.

研究分野：合成生物学

キーワード：1分子蛍光イメージング DNA マイクロ流体デバイス 微細加工 クロマチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物の染色体 DNA はクロマチンとよばれる高次構造をとる。これまでの研究で、クロマチン構造は状況に応じて局所的に折り畳みや弛緩が生じ、それに伴い遺伝子発現や染色体機能を制御していると考えられている。これらの研究の多くはクロマチン構造を再構成した閉環状 DNA を用いて解析することが可能な転写反応の制御に関する研究に集中している (引用文献 1)。しかし、クロマチン構造が動的に変化しながら反応を開始・進行させる複製への影響についてはクロマチン構造の変化を捉えるための有用な解析系が確立されていないことから、未だに限られた知見しかない。そのため、クロマチン構造の弛緩や折り畳みでどの程度の超らせん密度が生じると、その歪みの解放に伴いどの種類の非 B 型の DNA 構造が誘導され、それらが DNA 複製にどのような影響を与えるのか? といった問題は、本研究課題の核心をなす学術的「問い」として存在している。

2. 研究の目的

(1) 上記の問題を解決するため、本研究では、これまでの試験管内実験などの研究手法では解析することが難しい、1 分子レベルでのクロマチン構造の再構築系技術の開発やその動的変化の解析技術を開発することを目的として実施した。

(2) 本研究のようなアプローチは、現在も主流である試験管内実験による多分子レベルの解析から 1 分子レベルの解析へとパラダイムシフトを提示するものであり、分子生物学の新たな展開において重要な技術となると考えている。

3. 研究の方法

(1) 試験管内でのクロマチン再構成実験

試験管内でのクロマチン再構成はクロマチン再構成キットに従い実施した (Active Motif 社製)。簡潔に述べると、4 種類のコアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) とクロマチン形成因子 (ヒストンシヤペロン因子) を含む高塩緩衝液を調製し、氷上で 15 分間インキュベートした。その後、調製産物に低塩緩衝液を加えて後、さらにクロマチン形成因子 (ATP 要求性クロマチンリモデリング因子)、ATP、超らせん DNA、ATP 再生酵素群を加え、27°C、4 時間インキュベートすることで、試験管内でクロマチン構造を再構成させた。クロマチン形成 DNA はマイクロコッカスヌクレアーゼアッセイによってヌクレオソーム構造単位へ切断した。切断産物は、フェノールクロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって精製した後に、アガロースゲル電気泳動によって評価した。

(2) アミノシラン処理ガラス基板の調製

アミノシラン処理をしたガラス基板は、大重ら (引用文献 2) の報告に従って調製した。ガラス基板 (24 x 60 mm、松波ガラス) は、1% アルカリ洗剤 (富士フィルム和光純薬) に室温で一晩浸し、脱イオン水で洗浄した。その後、ガラス基板を 30% の過酸化水素に 3 時間以上浸漬し、脱イオン水で洗浄した後、乾かした。ガラス基板表面を洗浄した後、ガラス基板を原液エタノール中の 10% の 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (ナカライテスク) を含む原液エタノールに室温で 2 時間浸漬し、脱イオン水で洗浄した後、乾かした後 100°C で一晩ベークした。

(3) アミノシラン処理ガラス基板上へのクロマチン形成 DNA の固定化

再構成されたクロマチン構造における 1 分子蛍光イメージングでは、3-(1) の試験管内でのクロマチン再構成実験手順に従い、バクテリオファージラムダ DNA にクロマチン構造を再構成させた。分子コーミング (液滴移動) 法によってアミノシラン処理をしたガラス基板にクロマチン形成 DNA を固定させた。その後、1 分子蛍光イメージングによって観察した。

(4) 顕微鏡セットアップと解析

タンパク質-DNA 複合体は、青色 LED 蛍光ユニット (OptoSigma) と 100 x 1.3 (NA) 油浸対物レンズ (オリンパス) を備えたコアユニット顕微鏡 (OptoSigma) を用いて観察された。励起波長と発光波長は、488 nm のフィルターセット (EX448-63、DM494、EM526-52; OptoSigma) を用いた。SYTOX Green (励起、504nm; 発光、523nm; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) および mClover3 (励起、506nm; 発光、518nm) で染色した λ DNA の画像を冷却 CMOS カメラ (CS-67M、ビットラン) で捉え、画像記録インターフェース (BPU-30、ビットラン) で記録した。それぞれの単一 DNA 分子の長さは、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 試験管内でのクロマチン再構成実験

1 分子レベルでのクロマチン再構成の予備実験として、試験管内でのクロマチン構造の再構

成を実施した。4種類のコアヒストンとクロマチン形成因子 NAP-1 や ATP 要求性クロマチンリモデリング因子を用いて、試験管内で超らせん状態下での環状 DNA に対してクロマチン構造を再構成させた。形成クロマチンは、マイクロコッカスヌクレアーゼによって切断された (図1)。結果、クロマチン非形成 DNA では、マイクロコッカスヌクレアーゼによって、100 bp 以下の短い DNA 断片へと切断された (図1のレーン1)。一方、クロマチン形成 DNA では、マイクロコッカスヌクレアーゼの切断によって、断片化された DNA ラダーが示された (図1のレーン2)。これは、マイクロコッカスヌクレアーゼによって、クロマチン形成 DNA におけるヌクレオソームの DNA 領域は切断されず、ヌクレオソーム間のリンカーDNAが切断されたためである。ヌクレオソーム1単位あたり、185 bp の DNA 巻き付いたため、185 bp を1単位としたDNA断片化のラダーが確認された。以上結果、試験管内で、クロマチン構造の再構成を実証することができた。

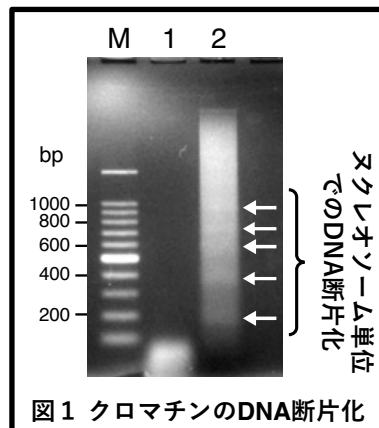


図1 クロマチンのDNA断片化

(2) 試験管内でのクロマチン再構成実験

本研究では、1分子レベルでのDNA分子及びクロマチンの動的挙動を捉えるため、1分子イメージングに適した独自の顕微鏡ユニットシステムを開発した (図2A)。開発した顕微鏡ユニットは、標的対象物に適した検出システムへと改良することができるため、1分子イメージングという特殊な系において適合する。開発した顕微鏡ユニットが安定的に働くことを評価するため、マイクロ流体デバイスを用いて、蛍光標識したバクテリオファージラムダ DNA (45-kb) の動的挙動を観察したところ、安定的にラムダ DNA 1分子が直接観察された (図2B)。以上から、1分子レベルでのクロマチン形成 DNA の蛍光イメージングの準備が整った。

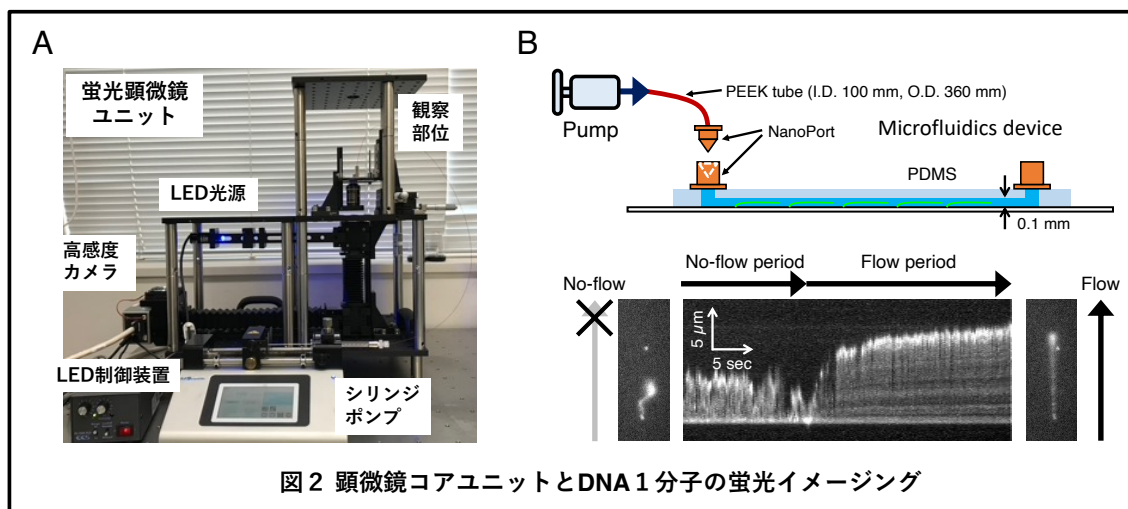


図2 顕微鏡コアユニットとDNA 1分子の蛍光イメージング

(3) クロマチン再構成の1分子蛍光イメージング

次に試験管内でクロマチン形成 DNA において、1分子レベルでの蛍光イメージングを実施した。水溶液中のDNA分子はブラウン運動によって、縮まるよう振舞う。縮んだ状態のDNA分子は蛍光標識したとき、輝点として観察されるため、1分子レベルでのクロマチン形成DNAを捉えることが難しい。そこで本研究では、ガラス表面に正電荷を帯びたアミノシラン処理ガラスを用いて、分子コーミング法によりクロマチン形成DNAを伸長させた。結果、クロマチン非形成である、裸のDNAでは、長さが16 μm程度の伸長DNAが観察された (図3左)。一方、クロマチン形成DNAでは、長さが3 μm程度のDNAや輝点のDNAが観察された (図3右)。クロマチン形成DNAの長さがクロマチン非形成DNAの長さよりも5倍程度短いことから、DNAがクロマチン形成によってコンパクトに折り畳まれたことが示された。以上の結果、1分子レベルでのクロマチン形成DNAの直接観察ができた。

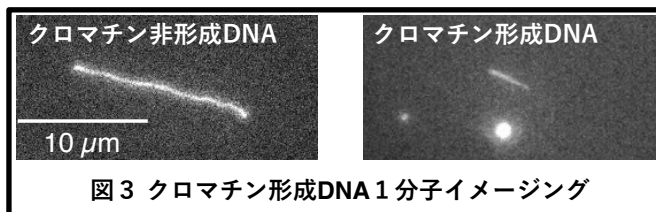


図3 クロマチン形成DNA 1分子イメージング

(4) まとめ

本研究では、試験管内でのクロマチン構造の再構成及び開発した独自顕微鏡を用いて1分子レベルでのクロマチン構造を直接観察に成功した。今後の展開では、伸長状態を維持したクロマチン形成DNAの形成条件を最適化することで、その動的構造変動の解析を実施する。また、1分

子イメージングでは背景光により対象物が観察できない問題が生じたため、今後、全反射照明ユニットを独自顕微鏡に実装することで、この問題を解決する。

<引用文献>

1. Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), 669-681.
2. Oshige, M., Yamaguchi, K., Matsuura, S., Kurita, H., Mizuno, A., & Katsura, S. (2010). A new DNA combing method for biochemical analysis. *Analytical biochemistry*, 400(1), 145-147.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 高橋俊介	4. 巻 6
2. 論文標題 DNA に焦点を当てた1分子蛍光イメージング解析法の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1153-1158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋俊介	4. 巻 54
2. 論文標題 DNA分子の物理的形態操作技術と1分子蛍光イメージングへの応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 638-641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Shunsuke, Oshige Masahiko, Katsura Shinji, Nagahara Yukitoshi	4. 巻 662
2. 論文標題 A new fluorescence labeling method for molecular analysis of double-stranded DNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115000 ~ 115000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2022.115000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vavricka Christopher J., Takahashi Shunsuke, Watanabe Naoki, Takenaka Musashi, Matsuda Mami, Yoshida Takanobu, Suzuki Ryo, Kiyota Hiromasa, Li Jianyong, Minami Hiromichi, Ishii Jun, Tsuge Kenji, Araki Michihiro, Kondo Akihiko, Hasunuma Tomohisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Machine learning discovery of missing links that mediate alternative branches to plant alkaloids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28883-8	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 該当する

1. 著者名 Shunsuke Takahashi, Masahiko Oshige and Shinji Katsura	4. 巻 26(4)
2. 論文標題 DNA Manipulation and Single-Molecule Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26041050	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋俊介、長原礼宗
2. 発表標題 DNA結合タンパク質を利用した核酸染色法の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 日本生物物理学会 共催
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊介、大重真彦、桂進司、長原礼宗
2. 発表標題 DNA及びDNA代謝酵素の1分子イメージング技術の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋俊介、長原礼宗、栗田弘史、松浦俊一、水野武、水野彰、大重真彦、桂進司
2. 発表標題 DNA-タンパク質の動的相互作用解析のための1分子DNAイメージング技術の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

合成生物学研究室
https://www.b.dendai.ac.jp/~synthe_bio/home.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
---------	---------