

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20180

研究課題名(和文) ナノ転写装置を介したクロマチンの力感知メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidating mechano-sensing mechanisms by transcriptional machineries

研究代表者

牧 功一郎 (Maki, Koichiro)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：90849233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織は、力の負荷に対してその構造を機能的に変化させる。細胞は、メカノセンサ分子を介して機械的な力を感知することが知られているが、力のもとで遺伝子発現が調節される仕組みについては不明な点が多い。本研究では、細胞核内のクロマチンに着目し、力のもとでのクロマチンの構造変化が遺伝子発現に及ぼす効果を理解することを目的とした。クロマチンの構造を理解するにあたり、DNA二本鎖から一本鎖DNAへの解離が鍵を握ると考え、細胞内の一本鎖DNAをin situで観察する実験系の構築を目指し、妥当性の検討が完了した。今後は、力の作用下において、二本鎖DNAから一本鎖DNAの解離が生じるかを検証する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、in situでの一本鎖DNAの観察に世界で初めて成功した。これまで、DNAへの結合性を有した低分子の開発が行われてきたが、細胞内での妥当性の検討がボトルネックとなってきた。本研究では、細胞のsemi-intact化により、核酸への種々の酵素処理を可能とし、開発したイメージング手法における一本鎖DNAの検出の特異性を確認できた。一本鎖DNAと反応するタンパク質群に関して、今後幅広い探索が可能になることから、力のもとで生じるDNAの構造変化を起点としたタンパク質構造体の形成・分解など、細胞の力感知機構を原点的に理解する足掛かりができた。

研究成果の概要(英文)：Living tissues change their structure in response to mechanical loading. Cells are known to sense mechanical forces via mechanosensor molecules, but the mechanism by which gene expression is regulated under force remains unclear. In this study, we focused on chromatin in the cell nucleus to understand the effects of conformational changes in chromatin under force on gene expression. We believe that the separation of double-stranded DNA into single-stranded DNA is the key to understanding chromatin-mediated mechanosensing, and successfully constructed an experimental system to observe single-stranded DNA in the cell. In the future, we plan to verify whether mechanical forces in a cell induce the separation of double-stranded DNA into single-stranded DNA.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス DNA 力学的構造変化

1. 研究開始当初の背景

近年の研究において、真核細胞の核内に存在する巨大なDNA-タンパク質複合体であるクロマチンが、力のもとでその複雑な高次構造をダイナミックに変化させ、遺伝子発現を統合的に制御する力感知メカニズムが提案されている (図1, Maki et al, JCS 2023).

このことから、クロマチンが有するメカノセンサ特性は、体重・運動・衝撃などの力学負荷に対する生体の機能的適応現象の根幹を担う要素であると考えられる。クロマチンに存在するナノ転写装置は遺伝子転写の抑制・促進に多大な影響を及ぼすことから、それらの力のもとでの振る舞いがクロマチンの力感知メカニズムを紐解く鍵となっている可能性があると考えた。

しかしながら、細胞内に無数に存在するナノ転写装置群 (顕微鏡下ではドット状に観察される) の中から着目すべき遺伝子周囲の転写装置を効果的にラベリングする方法論は世界的に見ても提案されていない。そこで、本研究では、細胞・*in vitro* におけるナノ転写装置の再構成を行うことで力感知機構の核心に迫ることが出来るのではないかと考えた。

本研究計画では、クロマチンによる力感知メカニズムの解明を目的とし、その力学的観点からの解明に挑んだ。特に、クロマチンの構造変化と特定の遺伝子発現の変化を結びつけるロジックとして、ナノ転写装置 (特定の遺伝子座に生じるヘテロクロマチンおよびスーパーエンハンサー) の構造変化に着目した。

2. 研究の目的

クロマチンにおいて転写抑制・促進を担うナノ転写装置の細胞内・*in vitro* 再構成、および、DNA 自体の曲率の解析を通じて、クロマチンが力を感じるメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

研究開始当初は、DNA とタンパク質の複合体であるナノ転写装置に着目して研究を進める計画であったが、DNA 二本鎖そのものの構造変化に着目する必要性が明らかとなったため、本研究では、力のもとでの DNA 二本鎖から一本鎖への解離現象に着目した。これまで、遺伝子転写・複製により、細胞核内には豊富に一本鎖 DNA が存在することが知られているが、外部から細胞核に負荷される力も、DNA 二本鎖の解離を誘導する一要因である可能性が示唆されている。しかしながら、細胞内で *in situ* で一本鎖 DNA を観察する手法は存在しておらず、力を介した二本鎖 DNA の解離、ひいては、クロマチンの構造が変化するメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、細胞内で *in situ* で一本鎖 DNA を観察する手法を開発することを第一目標とした。

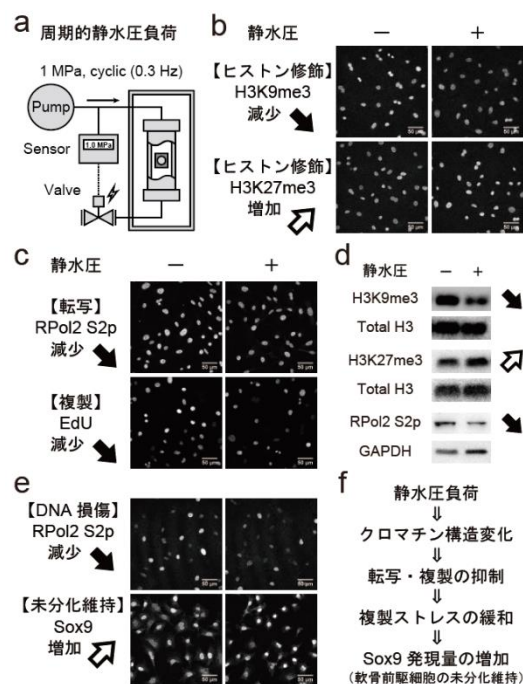


図1 静水圧がクロマチンに与える効果

4. 研究成果

細胞核内に存在する一本鎖 DNA を直接観察するため、一本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光試薬を用いたイメージングを実施した。その結果、細胞核内に局在した蛍光シグナルが観察された。観察された蛍光シグナルの分布は、DAPI で検出される二本鎖 DNA の分布とは大きく異なっており、semi-intact 化した細胞に対する核酸の酵素分解により消失した。また、熱処理により、二本鎖 DNA・一本鎖 DNA の蛍光シグナルはそれぞれ著しく低下・上昇したことから、本手法による一本鎖 DNA イメージングの特異性が確認できた。

次に、一本鎖 DNA の分布に関して超解像顕微鏡により検討した結果、細胞核内の構造体である核小体の周囲に、一本鎖 DNA が集積していることが示された。Semi-intact 化した細胞に対して一本鎖 DNA 特異的な切断酵素を処理した結果、核小体構造は崩壊し、二本鎖 DNA 特異的な切断酵素の処理では核小体構造が保たれたことから、一本鎖 DNA は核小体の構造安定化に寄与することが示された。

二本鎖 DNA と比較して不安定な一本鎖 DNA が核内で維持される仕組みとして、ヒストンタンパク質の一種との凝集体形成も確認できたことから、一本鎖 DNA が細胞核内で凝集体を形成し、核小体などの核内構造体の構造安定化に寄与するメカニズムが示唆された。

さらに、本研究では、本手法の *in vivo* での活用についても検討を進めており、図 2 に示すように、切片化した骨組織においても一本鎖 DNA のイメージングに成功した。一本鎖 DNA は細胞周期依存的に細胞核内で生成させることが知られているが、細胞周期がストップした細胞群においても一本鎖 DNA の存在が確認できたことから、組織に生じる力と DNA 二本鎖の解離の関係について検討を進める予定である。本研究は、細胞核内の一本鎖 DNA の分布を世界で初めて明らかにしたものであり、その力による変化を探ることにより、細胞による力感知機構の本質にせまりたいと考える。現在、論文投稿準備中である。



図 2 組織内一本鎖 DNA のマッピング

また、本技術を、力の作用下における遺伝子発現制御に応用することにより、ゲノム導入による細胞動態の力学的制御が可能になると考えられる。ナノ転写装置の転写抑制・促進の効果を制御することにより、入力する力の大きさや周期に合わせて細胞動態が変化するような機構の開発が予想され、ひいては、機械的な力を利用して細胞の運命決定を誘導する「メカノジェネティクス」分野の創設につながることを期待される。メカノジェネティクスの発展により、老化・疾患により適度な運動ができなくなった場合に機械的入力の変化をフィードバックし下流のシグナル経路の活性を担保する医工学的応用が期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maki Koichiro, Nava Michele M., Villeneuve Clementine, Chang Minki, Furukawa Katsuko S., Ushida Takashi, Wickstrom Sara A.	4. 巻 134
2. 論文標題 Hydrostatic pressure prevents chondrocyte differentiation through heterochromatin remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 247643, 247643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.247643	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichiro Maki, Jumpei Fukute, Takashi Suetake, Taiji Adachi
2. 発表標題 A novel fluorescent technique for single-stranded DNA in cell nucleus: toward understanding biomechanical behaviors of genomic DNA
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧功一郎
2. 発表標題 細胞核内における一本鎖 DNA 凝集体のイメージング
3. 学会等名 第34回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福手淳平、牧功一郎、安達泰治
2. 発表標題 ATP枯渇条件における細胞核内DNAライブイメージング
3. 学会等名 日本バイオレオロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福手淳平、牧功一郎、安達泰治
2. 発表標題 DNA 超らせん形成が核内クロマチンのアクセシビリティに与える効果
3. 学会等名 日本機械学会 第 31 回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
ドイツ	Max Planck Institute	Molecular Biomedicine	
フィンランド	Helsinki Institute of Life Science		