

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月26日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770167

研究課題名（和文）試験管内再現系を用いた、クロマチンの構造制御／転写活性制御の解析

研究課題名（英文）Analyses of the regulation of the chromatin structure and transcriptional activity using in vitro reconstitution system

研究代表者

日詰 光治（HIZUME KOHJI）

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：10378846

研究成果の概要（和文）：

クロマチン構造を変化させる因子と、その因子がもたらす具体的な構造変化の相関を明らかにすることを目的とし、以下のことを明らかにした。(1) コアヒストンのアセチル化によりもたらされるヌクレオソーム間の反発力の強化と、リンカーヒストン依存的ファイバーの太さの変化を明らかにした。(2) ヌクレオソームのスライディングや解離の様子を、高速 AFM による動画観察により可視化解析を行った。(3) 複製開始領域を決定する ORC により形成されるクロマチン/ORC 複合体の AFM 可視化解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

In order to reveal the structure induced by specific factors such as histone-tail modifications or chromosomal proteins, we observed the reconstituted chromatin under the various conditions. (1) hyper-acetylation of histone-tails causes stronger repulsive force between nucleosomes and the thinner H1-induced fiber than non-acetylated chromatin. (2) Sliding and dissociation of nucleosomes were observed by fast-AFM. (3) ORC (origin recognition complex) associated with nucleosome and formed larger complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質、核酸の構造・動態・機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子活性制御と相関して論じられてきた“クロマチンの凝縮・弛緩”

ゲノム構造が、凝縮/弛緩という構造変換を通じて、遺伝子活性を制御しているというアイディアは広く受け入れられている。ゲノム構

造変化を検出する手段として、生化学的な実験（細胞核から精製した試料の DNA 消化に対する感度により、凝縮・非凝縮を判別）や、細胞生物学的な実験（DAPI 等による細胞の蛍光染色像による、凝縮個所・非凝縮個所の同定）が行われてきた。その成果として、構造と転写活性とを制御する種々の因子が、同

定されてきた。代表例としては、以下のような知見が挙げられる。

- 過剰にアセチル化したコアヒストンは弛緩したゲノム領域に偏在し、その領域は高い転写活性を有する
- ヒストンタンパク質の次に核内で豊富なタンパク質群である HMG (High Mobility Group) のうち、HMGB や HMGN はヒストン H1 と競合してヌクレオソームに結合し、その領域の転写活性を上昇させる
- ヒストン H1 はヌクレオソームを 30-nm ファイバーへと凝縮させ、転写活性を抑制する
- HP1 は Lys9 メチル化ヒストン H3 に結合し、その領域を凝縮させ、転写活性を抑制する

これら因子がタンパク質-タンパク質相互作用に及ぼす影響や、ヒストン修飾がどのように細胞内で調節されているかという点は、活発な研究対象であり続けている。しかし、次項に述べるとおり、これら因子のクロマチン微細構造構築への影響は不明な点が多く残されている。

(2) 高次クロマチン複合体の“微細構造”

各タンパク質因子やヒストン修飾が誘因する“クロマチン微細構造”とは具体的にどのような構造かを追究する研究も行なわれてきた。電子顕微鏡や AFM による可視化解析によりヌクレオソームにリンカーヒストン H1 が加わって 30-nm ファイバー構造が形成されることが示され、沈降係数測定等の生化学的解析により、アセチル化修飾がヌクレオソーム間の相互作用を低下させることも示された。しかし、HP1 や HMG ファミリータンパク質を含む高次クロマチン複合体の構造解析は皆無であるなど、微細構造解析は未だ断片的であると言える。細胞核内のクロマチンは複雑な制御を受けており個々の因子の影響を特定するのが困難である。また、微細構造解析を行なうために細胞核内から特定のクロマチン領域を単離精製することも困難である。そのため、高次クロマチン複合体の微細構造については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究の研究代表者は、“クロマチン高次構造を理解するには、細胞核内で起きている現象を単純化したモデル実験系（人工再構成実験系）の確立が不可欠である”との信念のもとに、高次クロマチン再構成系の開発にこれまで一貫して取り組んできた。その結果、100 kb の長鎖 DNA にヌクレオソームを再構成し AFM により観察する手法を確立した。更に、このヌクレオソームファイバーを基本材料

とし、種々の染色体タンパク質が形成する特異的な構造の検出に成功してきた。リンカーヒストン H1 は均一な幅(30 nm)をもつ fiber 構造を形成するのに対し、ヌクレオソーム結合能を有する転写調節因子 PC4(positive coactivator 4) は直径 50-200 nm の不均一なヌクレオソーム凝集を形成した。また、M 期染色体凝縮に必須な Topo II は、ヒストン H1 存在下でのみクロマチン凝集能を示し、30 nm fiber が絡み合うような“ループ構造”を形成した。

しかし、これら再構成産物は未だ核内クロマチン構造の一断面でしかない。核内において転写活性調節を広範囲の領域で司っているヒストンテール修飾や染色体結合タンパク質を含む再構成系を構築し、その構造変化をもとに遺伝子活性制御という機能変化を考察することによって、はじめてゲノムの核内での姿を再現・理解できる“生理的意義を持つ再構成系”を構築できると考えるに至った。

本研究の目的は、転写活性化型の弛緩したクロマチンあるいは不活性化型の凝縮したクロマチンを試験管内再構成すること、および、その構造を AFM により明らかにすることである。

3. 研究の方法

主に、AFM を用いた観察を通じて、種々の環境下でのクロマチンの高次構造を明らかにする。とりわけ、細胞内で遺伝子機能を担っていると考えられるヒストン修飾（アセチル化やメチル化）を導入したコアヒストンを用いたクロマチンファイバーや、細胞内で広く遺伝子活性制御を行っているタンパク量の豊富な染色体結合タンパク質を添加したクロマチンファイバーの観察を行う。

また、沈降係数測定や、MNase などの DNA 消化酵素による部分分解といった生化学実験を AFM 観察と並行して行い、各因子がもたらしたクロマチン構造変化の同定を目指す。

加えて、細胞内から特定の状態のクロマチン（アセチル化誘導したクロマチンファイバーや、特定の染色体結合タンパク質を含む染色体領域のクロマチンファイバー）を精製し、その観察を通じて、再構成実験で得られた知見の評価を行う。

4. 研究成果

(1) クロマチンの動態観察手法の確立
凝縮型・弛緩型クロマチンの比較に応用可能な新技法として、クロマチンの動態をナノスケールで経時観察する手法の確立を行った。すなわち、下記雑誌論文③に発表したとおり、高速 AFM によるヌクレオソームの動画撮影に

成功し、ヌクレオソームの DNA 上でのスライディングや、ヌクレオソームが DNA 上から脱落する様子を、分子イメージングすることに成功した (図 1)。この動画撮影は、2 frame / second で取得されたものであり、ヌクレオソームの動的性質を追跡するうえで、前例のない新規な解析例である。

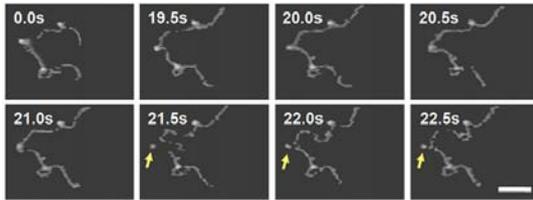


図 1. 高速 AFM により観察した再構成クロマチンファイバー。矢印に示したヌクレオソームが観察 21.5 秒経過時に DNA から解離する様子が観察された。スケールバーは 100 nm。

(2) AFM による分子認識イメージング法の応用

AFM は、探針により試料表面を走査することにより、その凹凸を検知し画像化する。これによりナノスケールの微細構造を検出することができるが、複数のタンパク因子を含む高次クロマチン構造を解析する上で、観察された物体がどの因子であるかを特定することは困難である。これを解決する手段として、AFM の探針の先端に特定のタンパク質を認識する抗体を接着して、これを用いて AFM 観察を行い、特異的タンパク質の AFM 像内での位置を特定する手法が挙げられる。その技術の確立を目指し、Actinin-4 タンパク質を、抗 Actinin-4 抗体により修飾した AFM 探針により観察し、AFM 画像内でのその位置を特定することに成功した (図 2 及び 3)。本研究結

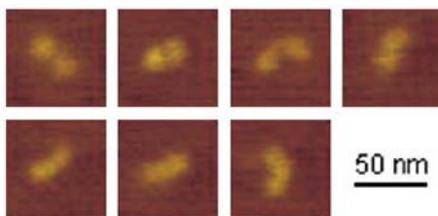


図 2. 通常の AFM により観察した Actinin-4 の分子像。コイルドコイル領域を有するため、細長い分子形状を持つ。

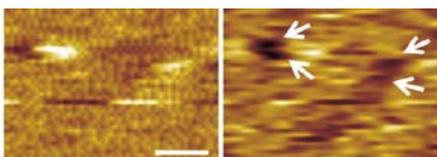


図 3. 抗 Actinin-4 抗体により修飾した探針を用いて観察した Actinin-4 の topo 像 (高さ情報、左図) と、trec 像 (抗体認識情報、右図)。スケールバーは 50 nm。

果を下記雑誌論文①において発表した。

(3) ヒストンテールのアセチル化による、クロマチン構造変化の解析

“転写活性化型クロマチン”として最も良く知られているヒストンテールが高度にアセチル化されているクロマチンの、AFM による解析を行った。

ヒストンアセチル化酵素である p300 によりアセチル化修飾を促したヒトのコアヒストンを用いてクロマチンを再構成した。その結果、(i)アセチル化ヒストンを用いても、非アセチル化ヒストンと比較して同等のヌクレオソーム形成効率が得られた。しかし、ヌクレオソーム間の距離はアセチル化型クロマチンの方が大きく、ヌクレオソーム間の反発力がアセチル化型の方が大きいことが示唆された。(ii)アセチル化型クロマチンを用いた場合においても、リンカーヒストン H1 の添加により、いわゆる 30 nm fiber と呼ばれる高次構造は形成された。しかし、非アセチル化型クロマチンを用いた場合よりもファイバーの幅は小さく、より凝集度の低いファイバーが検出された。(iii)薬剤処理 (トリコスタチン A) によりヒストンのアセチル化誘導を行った HeLa 細胞の核を精製し、高塩処理によりクロマチンファイバーを核外に展開させ、その AFM 観察を行った。その結果、アセチル化を誘導させた試料において、より多くの、かつ比較的細いファイバーが検出された (図 4)。

以上の結果から、高度なアセチル化により、ヒストンの電荷が変化し、その結果凝集度の低いクロマチンが形成されるというモデルを提唱し、下記雑誌論文④において発表した。

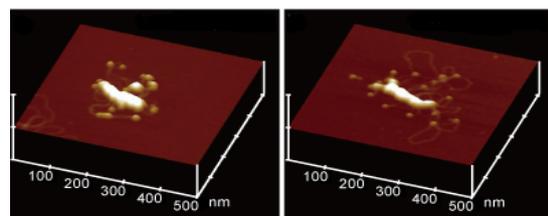


図 4. アセチル化ヒストン (右) と非アセチル化ヒストン (左) を用いて再構成したクロマチンファイバーの AFM 像。H1 を加えることにより形成されるファイバー構造は、アセチル化クロマチンの方が細く観察された。

また、これをさらに発展させる研究として、ヒストンの電荷に依存したクロマチン凝集度変化の解析を行った。すなわち、高等真核生物とはコアヒストンのアミノ酸配列の保存性が低い分裂酵母コアヒストンを用いたクロマチン再構成を行い、その構造を AFM により可視解析した。その結果、分裂酵母コアヒストンを用いたクロマチンファイバー

は、高度にアセチル化された HeLa コアヒストンを用いたクロマチンと類似した構造として観察された。分裂酵母コアヒストンの電荷は、高度にアセチル化された HeLa コアヒストンとほぼ同一であり、上記の電荷に依存したクロマチン構造変化のモデルを裏付ける結果が得られた。(雑誌論文②)

(4) DNA 複製の開始制御に関与する因子により形成されるクロマチン構造の解析
 遺伝子の転写活性が高いクロマチン領域は複製開始の時期が他の領域と比較して早期であるなど、遺伝子活性と DNA 複製との相関性についてはこれまでの多くの報告がなされている。本研究では、遺伝子活性と相関したクロマチン構造の研究のアプローチとして、「クロマチン構造と DNA 複製制御」に焦点を絞った研究も行った。

真核生物の複製はゲノム上の複数の位置から開始されるが、その開始領域の DNA 配列が特定されている実験生物は出芽酵母だけである。本研究では、出芽酵母の ARS を含む DNA 上にクロマチン再構成を行い、複製開始領域結合因子である ORC (Origin Recognition Complex) を加え、生化学的解析および原子間力顕微鏡による観察を行なった。その結果、DNA を用いるよりもクロマチンを用いた方が、ORC と ARS の DNA 配列特異的な結合が促進される様子が検出された。また、ORC を加えることにより ARS 付近のヌクレオソームのポジショニングが影響を受けること、さらに、ORC は、リンカー DNA とヌクレオソームとの二つの結合を両立して安定に ARS 上に結合することが示唆された (図 5)。

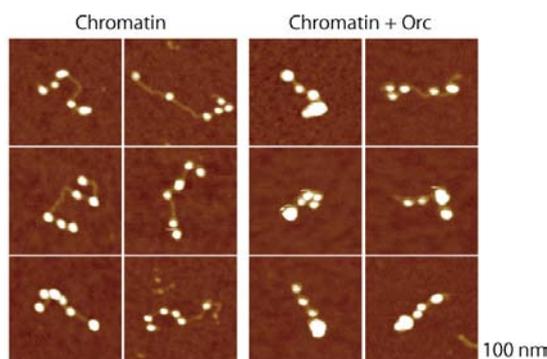


図 5. 複製開始領域の配列を含む 1.4 kb の DNA 断片上に再構成したクロマチン(左)と、ORC を添加したクロマチン(右)の AFM 像。ORC 添加により、ヌクレオソーム/ORC と考えられる大きな複合体が観察された。

前記のように、複製開始領域の DNA 配列のモチーフが酵母以外で見つからなかったことから、“クロマチン構造が複製開始点の決定に影響を及ぼしている”というモデルはこれまでに提唱されていたが、本研究において

初めて、クロマチンが ORC と ARS との結合の特異性と安定性に寄与するという実験的証明が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Takahashi, H., Hizume, K., Kumeta, M., S, H.Y., and Takeyasu, K. (2009). Single-molecule anatomy by atomic force microscopy and recognition imaging. Arch Histol Cytol 72, 217-225. (査読あり)
- ② Prieto, E., Hizume, K., Takeyasu, K., and Yoshimura, S.H. (2009). Structural properties of yeast chromatin fiber examined by AFM and in vitro reconstitution system. Proceedings of 2009 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 145-149. (査読なし)
- ③ Suzuki, Y., Higuchi, Y., Hizume, K., Yokokawa, M., Yoshimura, S.H., Yoshikawa, K., and Takeyasu, K. (2010). Molecular dynamics of DNA and nucleosomes in solution studied by fast-scanning atomic force microscopy. Ultramicroscopy 110, 682-688. (査読あり)
- ④ Hizume, K., Araki, S., Hata, K., Prieto, E., Kundu, T.K., Yoshikawa, K., and Takeyasu, K. (2011). Nano-scale analyses of the chromatin decompaction induced by histone acetylation. Arch Histol Cytol 73, 149-163. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Prieto, E., Hizume, K., Takeyasu, K., and Yoshimura, S.H. (2009). Structural properties of yeast chromatin fiber examined by AFM and in vitro reconstitution system. 2009 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science 平成 21 年 11 月 10 日 (名古屋大学)
- ② 日詰光治、矢倉勝、荒木弘之、Analysis of the interaction between chromatin and the origin recognition complex using atomic force microscopy. 日本分子生物学会第 34 回年会 平成 23 年 12 月 15 日 (パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日詰 光治 (HIZUME KOHJI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号：10378846

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし