

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 6 月 13 日現在

機関番号：82636

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22870042

研究課題名（和文） 超高分解能蛍光顕微鏡技術を用いた間期細胞核のクロマチン高次構造の解析

研究課題名（英文） Analysis on the higher-order chromatin structure in the interphase nucleus using super-resolution fluorescence microscopy

研究代表者

松田 厚志 (MATSUDA ATSUSHI)

(独) 情報通信研究機構・未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室・専攻研究員

研究者番号：20585723

研究成果の概要（和文）：超分解能蛍光顕微鏡手法の3DSIMによる生細胞観察手法を開発し、生きた分裂酵母のクロマチンを直接観察した。生きた分裂酵母の間期クロマチンは、100-150nmの径を持つ比較的大きな繊維状の高次構造を形成していた。ヒストン修飾の抗体染色を行い、ヒストン修飾とDNA繊維を多色3DSIM観察し、重なりを定量化した。その結果、転写部位のみが脱凝縮して凝縮したクロマチン繊維から突出していることを見出した。

研究成果の概要（英文）： I developed a method for live observation using super-resolution microscopy, 3DSIM, and applied on live fission yeast. The interphase chromatin in live fission yeast formed fibrous structures with a diameter of 100-150 nm. Chromatin in fixed fission yeast nuclei was stained with antibodies against modified histones and observed with 3DSIM, then the level of overlap with the DNA mass was quantitatively analyzed. The results showed that regions associated with ongoing transcription were de-condensed and extended from fibrous structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：クロマチン、分裂酵母、超分解能蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報である DNA は、生体内では約 200bp ごとにヒストン 8 量体（ヌクレオソーム）に巻かれることにより、密に凝集した形で細胞核に格納されている。DNA 配列を遺伝情報の一次構造とするならば、ヌクレオソームは、遺伝情報の二次構造といえる。試験管内での再構成では、リンカーヒストンの取り込みに応じて様々な凝縮度を持つ 30nm 繊維が形成される。これは、遺伝情報の三次構造といわれる。DNA 上のヌクレオソーム密度の変化や、30nm 繊維の凝縮度合いにより、遺伝子の転写が制御されていると示唆されている。さらに電子顕微鏡観察により、細胞核内にはより大きな繊維構造（60-200nm 繊維）が観察されており、クロマチンは更なる高次構造を持つと考えられている。このような凝縮度の変化や、高次構造の変化は、転写

維が形成される。これは、遺伝情報の三次構造といわれる。DNA 上のヌクレオソーム密度の変化や、30nm 繊維の凝縮度合いにより、遺伝子の転写が制御されていると示唆されている。さらに電子顕微鏡観察により、細胞核内にはより大きな繊維構造（60-200nm 繊維）が観察されており、クロマチンは更なる高次構造を持つと考えられている。このような凝縮度の変化や、高次構造の変化は、転写

領域の形成、ヘテロクロマチン形成、有糸分裂時の凝縮した染色体の形成など、様々な核やクロマチンの機能と直結した動的構造であると考えられている。

しかし、間期細胞核内のクロマチンは高密度に収納されており、その繊維を可視化するための適当なイメージング技術が欠落していたため、直接的観察は困難であった。電子顕微鏡による繊維構造の観察がなされているが、観察に必要な強力な化学固定や、脱水によるクロマチン構造の変形があり、報告された構造は様々である。したがって、クロマチン高次構造変化の直接観察には、生体分子を傷つけず、高分解能であり、さらに標識特異性の高い顕微鏡技術が不可欠である。

近年、光の解析限界を超える超分解能蛍光顕微鏡技術が報告された。この技術は、これまで欠落していた分解能領域を埋める新しい技術と考えられる。従来の蛍光顕微鏡の分解能は 250nm 程度が限界とされてきたが、新しい技術を用いれば、20-100nm の分解能で生体物質を標識特異的に観察することが可能である。超分解能蛍光顕微鏡技術の一つである 3D structured illumination microscopy (3DSIM) は、三次元干渉波からなる縞模様の励起光 (structured illumination) を用い、本来観察不可能な高周波要素を計算により再構築する。生体分子に損傷の少ない超分解能蛍光顕微鏡技術を用いて、これまでブラックボックスとされていた間期細胞核内のクロマチン構造の本来の姿を直接観察することが可能になったと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の具体的目的は、(1) 真核生物の間期細胞核におけるクロマチン繊維の構造的な特徴を明らかにする (2) 遺伝子発現の多い領域などと、顕微鏡で見られた繊維との関連を明らかにすることである。この二つの観察とその解析により、これまで推測されてきた遺伝子発現と高次構造制御の構造的関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 生物試料

観察に使用した分裂酵母は、Edinburgh minimal medium 中で 26°C の振盪培養をした。観察には、2-5x10⁶ cells/ml の密度に達した細胞を用いた。野生型に 972h-を用いた。

(2) 固定と抗体染色

固定液には、4%ホルムアルデヒド、80mM HEPES-K、35mM HEPES-Na、2mM EDTA、0.5mM EGTA、0.5mM spermidine、0.2mM spermine、15mM 2-mercaptethanol を混合した物を用いた。細胞は 10-20 分間固定した後、PEMS 溶液

(80mM PIPES、1mM EDTA、1mM MgCl₂、1.2M sorbitol、pH 6.8) により 3 回洗浄した。各洗浄では、緩やかな攪拌を 5 分間行った。Zymolyase 処理 (36°C 30 分) により細胞壁を消化後、1%TritonX-100 と PEMS 混合液により、10 分間の細胞膜溶解を行った。PEMS で 3 回洗浄した後、通常の抗体染色を行った。使用した抗体は、木村宏 (大阪大学) より供与されたモノクローナル抗体を使用した。抗体染色の後、0.2μg/ml の DAPI により細胞核を染色し、Glycerol や Prolong Gold (Invitrogen) などのマウント剤を加えた。観察中に細胞が動かないように少量 (1.5μl) の溶液をカバーガラスで封入した。

(3) イメージング方法

3DSIM、および STORM イメージングには、OMX 顕微鏡 (Applied Precision Inc.) を用いた。使用する油浸オイルの算出のため、以下の式を用いた。

$$\theta_0 = \arcsin\left(\frac{NA}{n_0}\right) \quad (1)$$

$$\theta_2 = \arcsin\left(\frac{NA}{n_2}\right) \quad (2)$$

$$\theta_1 = \arctan\left(\frac{\tan\theta_0 \tan\theta_2 (s-z)}{\tan(\theta_2)s - z \tan\theta_0}\right) \quad (3)$$

$$n1 = \frac{NA}{\sin(\theta_1)} \quad (4)$$

(NA: 3DSIM に用いるレーザー光の角度から予想される開口数、 n_0 : レンズの屈折率、 $n1$: 油浸オイルの屈折率、 $n2$: 標本の屈折率、 s : 対物レンズの動作距離、 z : カバーガラス表面から目的の焦点面への距離)

式 4 に従い、固定細胞の 3DSIM には、1.516-1.518 の、ライブ 3DSIM には 1.520 の油浸オイルを用いた。

(4) 画像解析方法

3DSIM の再構築には SoftWoRX (Applied Precision) を用いた。多色画像の位置合わせには、カスタムプログラムを作成した。多色画像をフーリエ変換し、位相だけを取り出して逆フーリエ変換することにより像の外形のみを抽出し、この情報を用いて相互相関関数などを用いて、外形が合致する最適な位置を計算した。STORM の再構築には、申請者の作成したソフトウェアを用いた。

4. 研究成果

(1) ライブ 3DSIM 法の開発

OMX 顕微鏡を用いた 3DSIM では、100 倍の油浸対物レンズが必須である。培養液中に存在する細胞には、屈折率の差によるレンズの収差により 3DSIM 法を用いることができない。そこで、収差の補正に必要な油浸オイルの屈折率を算出した (研究の方法を参照)。分裂酵母の核は直径 2μm と小さいため、カメラの

使用チップ領域を最小限に抑えることにより、画像取得時間を6.8秒にまで縮めることに成功した。

クロマチンの動きは緩やかなので、この速度で観察可能である。この方法により観察した生きた分裂酵母の細胞核には、明確な繊維構造が観察された(図1)。このように観察された細胞は、その後正常に細胞分裂を行うことが可能であることから、観察された構造は、生理的条件下の細胞に存在すると考えられる。

以上の結果から、分裂酵母のDNAは、約100から150nmの比較的大きな繊維構造を形成していることが初めて明確に証明された。

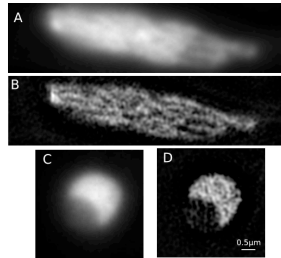


図1 生きた分裂酵母のクロマチン
(A) 減数分裂前期の核の通常の顕微鏡像
(B) Aの3DSIM像 (C) 間期核の通常の顕微鏡像 (D) Cの3DSIM像

(2) 細胞固定法の開発

生細胞に観察された繊維構造をより詳細に解析するためには、固定細胞を用いた抗体染色による観察が不可欠である。しかし、染色体構造は、化学固定により変形する可能性があるため、生きた細胞に見られた構造を基準として、化学固定したDNA構造を比較した。その結果、通常用いられる化学固定法では、繊維構造が肥大化することが明らかになった。そこで、二つの手法を組み合わせた化学固定液を作成した。一つは、化学固定時に架橋されるアミノ基の減少によるpHの低下を高濃度の緩衝液により抑制することで化学固定が瞬時に行われる手法であり、もう一つは、二価陽イオンにより活性化されるタンパク質やDNAの分解酵素の活性をキレート剤により抑え、多価陽イオンを代替として用いた手法である。この化学固定液により、生細胞とほぼ同様の構造を再現することが可能になった。

(3) 多色画像の位置合わせ手法の開発

OMX顕微鏡は波長毎に結像するカメラが異なるので、多色の画像を取得すると位置や角度、倍率などが異なってしまう。このため、高い分解能の多色画像を取得しても、それぞれの相関を正確に知ることが難しかった。そこで、3DSIMで観察した多色の画像を、nm単位の精度で正確に重ね合わせるプログラムを作成した。蛍光ビーズで計測した結果、精度はXY軸方向で4-8nm、Z軸方向では30nmであった。

(4) 間期細胞核DNAの様々な凝縮率

間期細胞核のヘテロクロマチンとセントロメア領域を抗体染色により可視化し、3DSIMの多色画像を用いてDNAの凝縮率を比較した。その結果、ヘテロクロマチンの領域は、100-150nm繊維状構造の一部に過ぎず、それ以外の領域と比較して特別に高い凝縮率は

認められなかった。一方、セントロメア領域は、繊維状構造の外部に位置していた。このことから、核内DNAには、繊維状構造の外部に存在する脱凝縮した領域と、繊維構造を形成する凝縮した領域が存在することが明らかとなった。

(5) ユークロマチンの転写領域が脱凝縮している

ユークロマチンを形成するヒストンには、転写の状態に関連した多様な化学修飾が知られている。その化学修飾に対する特異的抗体により、ヒストン修飾と凝縮率の比較を行った。その結果、転写と関係のあると考えられていたH3K36me3やH3K9Acなどのヒストン化学修飾が凝縮した領域に多く見られることが分かった。これらの修飾を受けたヒストンの約60%は凝縮した繊維状構造の内部に見られた。一方、H3K4me3で修飾されたヒストンは、凝縮した繊維状構造の外部に位置する物が多く、内部に見られた割合は約40%であった。また、転写を行うRNA polymerase IIの抗体で染色したところ、転写している領域はH3K4me3と同様に凝縮した繊維状構造の外部に位置する物が多く、内部に見られたのは約40%であった。従って、これまでユークロマチンのマーカーはすべて転写と関わり、脱凝縮していると考えられていたが、H3K36me3やH3K9Acは染色体の凝縮に関わりが強く、H3K4me3やRNA polymerase IIは、弛緩に関わりが強いことが明らかになった。

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5件)

- ① Kapusta A, Matsuda A, Marmignon A, Ku M, Silve A, Meyer E, Forney JD, Malinsky S, Bétermier M. (2011) Highly precise and developmentally programmed genome assembly in *Paramecium* requires ligase IV-dependent end joining. *PLoS Genet.* 7(4):e1002049 (査読あり、Co-first author) DOI:10.1371/journal.pgen.1002049
- ② Yasushi Hiraoka, Hiromi Maekawa, Haruhiko Asakawa, Yuji Chikashige, Tomoko Kojidani, Hiroko Osakada, Atsushi Matsuda, and Tokuko Haraguchi (2011) Inner Nuclear Membrane Protein Ima1 is Dispensable for Intranuclear Positioning of Centromeres. *Genes to Cells.* 16(10): 1000-1011. (査読あり) DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01544.x
- ③ Matsuda, A., Shieh, A., Chalker, D., and

Forney, J. D., (2010). The Conjugation-Specific Die5 Protein Is Required for Development of the Somatic Nucleus in both *Paramecium* and *Tetrahymena*. *Eukaryotic Cell*, 9(7): 1087-1099. (査読あり)
DOI: 10.1128/EC.00379-09

- ④ Carlton PM, Boulanger J, Kervrann C, Sibarita JB, Salamero J, Gordon-Messer S, Bressan D, Haber JE, Haase S, Shao L, Winoto L, Matsuda A, Kner P, Uzawa S, Gustafsson M, Kam Z, Agard DA, Sedat JW. (2010). Fast live simultaneous multiwavelength four-dimensional optical microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(37): 16016-16022. (査読あり)
DOI: 10.1073/pnas.1004037107
- ⑤ Matsuda A, Shao, L., Boulanger, J., Kervrann, C., Carlton, P. M., Kner, P., Agard, D., and Sedat, J. W., (2010). Condensed mitotic chromosome structure at nanometer resolution using PALM and EGFP- Histones. *PLoS one* 5:e12768. (査読あり)
DOI:10.1371/journal.pone.0012768

[学会発表] (計 15 件)

- ① Atsushi Matsuda
Localization microscopy with conventional GFP and noisy biological samples
Superresolution Microscopy Workshop (28 March 2012) Biopolis, Singapore (Invited)
- ② Atsushi Matsuda
Five-dimensional super-resolution imaging with OMX
Superresolution Microscopy Workshop (28 March 2012) Biopolis, Singapore (Invited)
- ③ 松田厚志, 平岡泰, 原口徳子
超分解能蛍光顕微鏡により観察する分裂酵母のクロマチン
第 29 回染色体ワークショップ (2012 年 1 月 25 日) ホテルニュー水戸屋、宮城県
- ④ 松田厚志
超分解能蛍光顕微鏡 3DSIM により見る間期核クロマチン
神戸大学重点研究チーム学術講演会 (2012 年 1 月 10 日) 神戸大学、兵庫県 (招待講演)
- ⑤ 松田厚志, 平岡泰, 原口 徳子
Spatial organization of fission yeast chromatin observed with super-resolution fluorescent

microscopy
第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 16 日) パシフィコ横浜、神奈川県

- ⑥ 松田厚志
高分解能顕微鏡
第 17 回細胞生物学ワークショップ (2011 年 8 月 12 日) 情報通信研究機構、兵庫県
- ⑦ 松田厚志
回析限界を超えた蛍光顕微鏡により見る細胞核内クロマチン
第 37 回レーザー顕微鏡研究会 (2011 年 7 月 6 日) 理化学研究所、埼玉県 (招待講演)
- ⑧ Atsushi Matsuda, John W. Sedat, David A. Agard, Yasushi Hiraoka and Tokuko Haraguchi
Interphase chromatin structure observed with superresolution microscopy
International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (24 January, 2011)
The Westin Awaji Island, Japan
- ⑨ Hiromi Maekawa, Haruhiko Asakawa, Yuji Chikashige, Atsushi Matsuda, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka
Inner nuclear membrane proteins in the fission yeast
International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (24 January, 2011)
The Westin Awaji Island, Japan
- ⑩ 松田厚志, 平岡泰, 原口徳子
超分解能 3DSIM により観察される間期細胞核内クロマチン繊維
第 28 回染色体ワークショップ (2011 年 1 月 12 日) 山代温泉 瑠璃光 (コンベンションホール)、石川県
- ⑪ 松田厚志
GFP とデノイジングを用いた PALM
第 2 回光塾 (2010 年 12 月 11 日) 大阪大学、大阪府
- ⑫ 松田厚志
超分解能顕微鏡で見る細胞核構造
視る生物学 5-植物を視る光の新技术- (2010 年 11 月 25 日)、NAIST ミレニアムホール、奈良県
- ⑬ 松田厚志
時空間分解能向上によるクロマチンイメージングの新展開
第 48 回日本生物物理学会年会 (2010 年 9 月 21 日) 東北大学、宮城県
- ⑭ 松田厚志

高分解能顕微鏡
第15回細胞生物学ワークショップ(2010年8月18日)未来ICT研究センター、兵庫県

⑮ 松田厚志、Lin Shao, David A. Agard、
John W Sedat

超高分解能蛍光顕微鏡技術によりクロマチン高次構造を直接的に観察する

第9回核ダイナミクス研究会(2010年5月27日)ラフォーレ修善寺、静岡県

[その他]

ホームページ等

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hirao/ka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 厚志 (MATSUDA ATSUSHI)

(独) 情報通信研究機構・未来ICT研究所

バイオICT研究室・専攻研究員

研究者番号：20585723

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：