

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770113

研究課題名(和文) 間期核クロマチンの超分解能多色イメージング

研究課題名(英文) Super-resolution, multicolor imaging of chromatin structures in the interphase nucleus

研究代表者

松田 厚志 (Matsuda, Atsushi)

独立行政法人情報通信研究機構・未来ICT研究所バイオICT研究室・研究員

研究者番号：20585723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムは、ユークロマチンとヘテロクロマチンに分かれる。ユークロマチンは脱凝縮しており、ヘテロクロマチンは凝縮していると考えられている。超分解能顕微鏡により分裂酵母の間期核クロマチン構造を解析した結果、サブテロメア領域のヘテロクロマチンが脱凝縮している一方、高度に凝縮した約50kbの領域が隣接しているという、通説とは全く異なるクロマチン構造を見出した。このクロマチン領域の凝縮は、HP1ホモログなど既知のヘテロクロマチン形成とは異なる遺伝経路により支配されていた。

研究成果の概要(英文)：Fission yeast has been a classical model organism for gene silencing. However, little is known about its chromatin structure due to the small size of the genome. Here we used super-resolution fluorescence microscopy to observe condensation levels of interphase chromatin in fission yeast. Unexpectedly silent chromatin is less condensed than the rest of euchromatin in fission yeast. Furthermore, the subtelomeric silent regions are flanked by highly condensed, but non-silencing chromatin body, which we named as knob. The regions of knob span for about 50 kb devoid of methylated histones. Knob condensation was independent from HP1 homolog swi6. The unusual chromatin structure indicates that gene silencing in fission yeast is not a direct consequence of chromatin condensation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：クロマチン 高分解能顕微鏡観察

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムは、機能と構造の異なるドメインからなり、ユークロマチンとヘテロクロマチンに大きく分けられると言われている。ユークロマチンでは遺伝子発現が行われており、ヘテロクロマチンでは転写が起こらないと考えられている。近年、ヒストン修飾やタンパク質結合部位に関する全ゲノムのデータが使用可能になり、これまで以上に詳細かつ機能的にゲノムを区分するクロマチンの種類が予想されている。ショウジョウバエやヒト細胞では、機能の異なる5種類以上のクロマチンが存在すると考えられている。

一方、100kb におよぶドメインレベルの広域な遺伝子群の転写調節は、クロマチン高次構造や凝縮率の変化と対応していると考えられている。マウス細胞などでは、転写活性のないヘテロクロマチンが凝縮している様子が明確に観察されている。一方、ユークロマチンを形成するゲノムドメインの間にどれほどの凝縮率の差があるのかは不明である。したがって、近年急速に明らかになりつつあるゲノムの一次元的情報と核内での三次元構造を結びつける手法が急務である。

クロマチンの構造は 10-200nm と言われているが、これは光の回折限界よりも微細なために通常の光学顕微鏡で観察できない。そのため電子顕微鏡が使用されてきたが、固定、乾燥、染色などの問題から、生理的な条件でのクロマチン構造は未だにほとんど理解されていない。

近年、超分解能の蛍光顕微鏡法が開発され、研究状況に変化が訪れた。超分解能蛍光顕微鏡は、様々な手法により約 250nm の回折限界を回避して、最終的に 20-100nm の超分解能を実現する。主な手法には、3DSIM、PALM、STED などがあり、それぞれに長所と短所がある。申請者は、3DSIM 法が 3 次元的に分解能が向上することから核の観察に向いていること、また、多色イメージングが可能である点に注目し、3DSIM を用いて多色で核観察を行うため、3DSIM の分解能に対応した高精度の色合わせ技術を開発した。異なるチャンネルの画像は、サンプルの屈折率により多少のずれが生じるが、申請者の考案した画像取得法と計算法を用いれば、観察しているサンプルでの位置ずれを正確に知ることが可能となり、高精度な共局在計測を行うことができる。

申請者は、ゲノムドメインの凝縮率を計測するためのモデル生物として、分裂酵母を選択した。分裂酵母の微小な核（直径約 2 $\mu$ m）が顕微鏡観察に適していることに

加え、高い遺伝子密度（0.5 遺伝子/kb）のため、ゲノムのほとんどがユークロマチンで、ヘテロクロマチンも簡単に見分けられるからである。上記の特徴から、ヒストン修飾などゲノムの一次元的特徴と顕微鏡で観察できる三次元的構造の対応が容易である。

## 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、2-5x10<sup>6</sup> 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 MgCl<sub>2</sub>、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、0.2 $\mu$ g/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 (1.5 $\mu$ l) の溶液をカバーグラスで封入した。

### (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、 $n_1$ : 油浸オイルの屈折率、 $n_2$ : 標本の屈折率、 $s$ : 対物レンズの動作距離、 $z$ : カバーク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、1.514-1.516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

3DSIMにより、分裂酵母の間期核のヒストン修飾により定義される様々なゲノムドメインの凝縮率を計測した。凝縮率は、上記の正確な色合わせ技術を用い、DAPIのシグナル強度との重なりで計測した。図1Aに結果の一部を示すとおり、クロマチン構造はクローズドとオープンに二つに分けられた。クローズドは、意外にもH3K36me3、H3K9Ac、H3K4me2などのユークロマチン領域から構成されていた。一方、オープンな、H3K4me3やRNA polymerase IIなど、ユークロマチンの中でも現在転写されている領域だった。このことから、ユークロマチンは一様にオープンではなく、転写され

ている領域だけが脱凝縮してオープンになり、それ以外は比較的凝縮していることが明らかになった。

オープンな領域には意外にも、ヘテロクロマチンと定義されてきたサイレンシング領域が含まれていた(図1A、H3K9me3、Cnp1-GFP、Taz1-GFP)。DNA濃度の計測としてDAPIでなく、ヒストンを用いても結果は同様であった。この生物では、サイレンシング領域は脱凝縮していることが示された。

さらに、サブテロメアのサイレンシング領域は、高度に凝縮した領域が隣接していることが分かった(図1B)。この凝縮クロマチン体は記載が無かったため、「ノブ」と名付けた。ノブは、ほとんどのヒストン修飾抗体で染色されなかった(図1C)。ヒストン修飾の少ない領域を、利用可能な全ゲノムChIPデータと見比べたところ、サブテロメア内側の50kb程度に、これまでユークロマチンと考えられていたが、ヒストン修飾が少ない領域が存在することが分かった(図1D)。lacOアレイを挿入して、この領域がノブであることを確認した。

ノブ形成に必要な遺伝子を調査したところ、サイレンシングに必須の遺伝子であるHP1ホモログのswi6やH3K9のメチル化酵素のclr4などを欠損しても凝縮に変化がなかった。したがってノブは、既知のクロマチン凝縮とは全く異なる新規の遺伝的経路により、間期にクロマチン凝縮を起こすと考えられる。

#### 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 3件)

- ① 松田厚志、平野泰弘、原口徳子(2014) 超高分解蛍光顕微鏡法 光アライアンス 2014年3月号(pp31-35) (査読無)
- ② Maho Hamasaki, Nobumichi Furuta, Atsushi Matsuda, Akiko Nezu, Akitsugu Yamamoto, Naonobu Fujita, Hiroko Oomori, Takeshi Noda, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Tamotsu Yoshimori and Atsuo Amano (2013) Autophagosomes form at ER – mitochondria contact sites. Nature 495: 389-393. (査読有) doi:10.1038/nature11910
- ③ 松田厚志、平野泰弘、平岡泰 (2012) 核内構造観察のための超分解能蛍光イメージング技術、細胞工学 Vol 31 863-869 (査読無)

[学会発表] (計 14件)

- ① 丁大橋、松田厚志、原口徳子、平岡泰 分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の3D-SIM解析

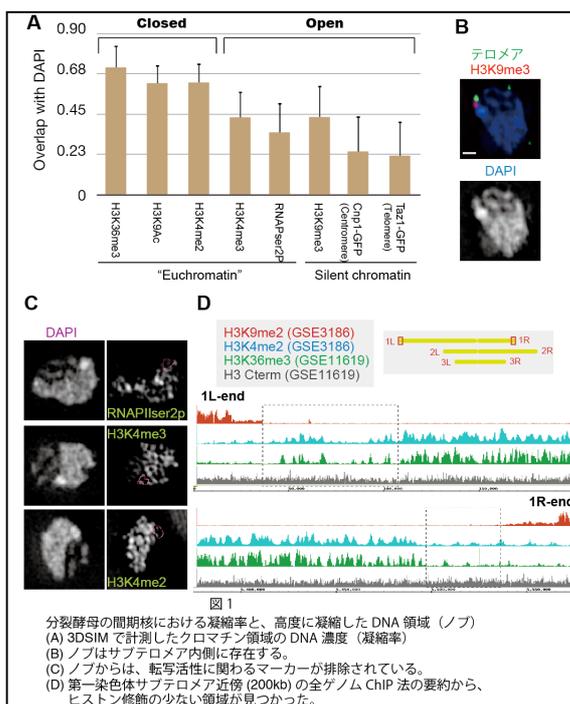


図1

「ゲノムを支える非コードDNA領域の機能」公開シンポジウム インターメアによる染色体制御機構 (2014年1月8日-9日) 東京大学山上会館、東京都

② 丁大橋、松田厚志、原口徳子、平岡泰 分裂酵母減数分裂期前期染色体構造の3D-SIM 解析

第31回染色体ワークショップ・第12回核ダイナミクス研究会(2013年11月25日-27日) ホテルおかだ、神奈川県足柄下郡

③ Atsushi Matsuda

Trouble shooting 3DSIM in the Fourier space Structured Illumination: Biomedical Applications and Future Developments meeting

(21-22 October 2013) Wellcome Trust offices, London, United Kingdom

④ Atsushi Matsuda, Hiroshi Kimura, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka

Super-resolution microscopic measurements of chromatin compaction in fission yeast reveal uncoupling of condensed chromatin from silent loci

EMBO Nuclear Structure and Dynamics meeting (2-6 October 2013)

L'Isle-sur-la-Sorgue, France

⑤ 松田厚志

超分解能顕微鏡 3DSIM により見るクロマチン構造

広島大学セミナー (2013年9月17日) 広島大学、広島県広島市

⑥ 松田厚志

高分解能顕微鏡

第21回細胞生物学ワークショップ (2013年8月8日) 未来 ICT 研究所、兵庫県神戸市

⑦ 松田厚志

デノイジング

第21回細胞生物学ワークショップ (2013年8月7日) 未来 ICT 研究所、兵庫県神戸市

⑧ Da-Qiao Ding, Atsushi Matsuda, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka

Fine structures of meiosis-specific chromosome and homologous chromosome pairing in *S. pombe*

*Pombe* 2013 (7th International Fission Yeast Meeting) (29 June 2013) University of London, London, UK

⑨ Atsushi Matsuda

The Reconstruction process of structured illumination microscopy

Superresolution Microscopy Workshop - Seeing Biology at the Nanoscale (19 June, 2013) IMB, Biopolice, Singapore, Singapore (招待講演)

⑩ Atsushi Matsuda

Practical Localization microscopy on noisy biological samples

Superresolution Microscopy Workshop - Seeing Biology at the Nanoscale (18 June, 2013) IMB, Biopolice, Singapore, Singapore (招待講演)

⑪ 松田厚志、木村宏、平岡泰、原口徳子 分裂酵母の間期核クロマチンの凝縮率

第30回染色体ワークショップ・第11回

核ダイナミクス研究会 (2012年12月21日) 兵庫県立 淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市

⑫ 丁大橋、松田厚志、原口徳子、平岡泰 分裂酵母減数分裂期染色体構造の相同染色体対合における役割

第35回日本分子生物学会年会 (2012年12月13日) 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡県福岡市 (招待講演)

⑬ 松田厚志

Deep STORM

第4回「光塾」(2012年8月26日) 北海道大学、北海道札幌市 (招待講演)

⑭ Atsushi Matsuda, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi

Live and precise 3D registration of multicolor 3D structured illumination microscopy unveils higher-order structural organization of fission yeast chromatin

Focus on Microscopy 2012 (April 2, 2012) SUNTEC Singapore International Convention & Exhibition Centre, Singapore, Singapore

[その他]

ホームページ等

[http://www2.nict.go.jp/advanced\\_ict/bio/w131103/CellMagic/](http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/)

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/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・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：