

平成30年6月18日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25252064

研究課題名(和文) FIB/SEMを用いたヌクレオソームトモグラフィーによる染色体内部構造の解明

研究課題名(英文) Analysis of chromosome inner structure by nucleosome tomography using FIB/SEM

研究代表者

福井 希一 (Fukui, Kiichi)

鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授

研究者番号：00311770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,800,000円

研究成果の概要(和文)：3世紀に渡って謎のままである染色体の内部構造について、ヌクレオソームの位置を可視化することにより明らかにすることを試みた。その為、イオンビームを用いて染色体のスライスを作製し、その断面像を画像解析した。その結果、ヌクレオソームの配列に規則性は見出せず、染色体内部でヌクレオソームはほぼランダムに分布していると考えられた。同時に行った染色体軸の解析では、複数のタンパク質の軸が互いに絡み合っていることを見出し、剛性と柔軟性を共に兼ね備えた構造であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chromosome structure has been an enigma through these three centuries. We tried to elucidate the inner structure of the chromosome by visualization of nucleosome positions by slice and view method using focused ion beam/scanning electron microscopy. As a result, random distribution of nucleosomes were revealed through the chromosome and no regular structure was not detected. On the other hand, we analyzed the chromosome scaffold and revealed that the scaffold consisted with helical double stranded structure. This structure accounts the rigid and flexible nature of the chromosome.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：染色体 高次構造 3次元構築 ヒト ヌクレオソーム 染色体スキャフォールド FIB/SEM ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初の平成25年時点においてナノテクノロジーの生命科学分野での利用は一般的とは言い難く、特に試料調製の標準的手法が未だ確立していないという問題があった。

(2) 本研究ではこうした現状を打破し、19世紀半ばに発見された染色体の構造が現在も尚不明であるという点についてナノテクノロジーを用いて解決することを試みたものである。

2. 研究の目的

(1) 染色体異常が重要な意味を持つヒト癌細胞における体細胞分裂中期の染色体を用いてその構造をナノオーダーで明らかにすることを目的とした。

(2) 体細胞分裂中期染色体のヌクレオソーム構造の空間分布に加えて、研究の進展に伴い、もう一つの重要な構造体である染色体スキャフォールドの3次元構造についてもナノオーダーで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 上記の目的を達成するため、通常の生化学的および分子細胞生物学的な方法に加えて、進展著しいナノテクノロジー、特に収束イオンビーム/走査型電子顕微鏡法(以下FIB/SEM)を用いたヌクレオソームの染色体内部空間分布について可視化することを試みた。

(2) 加えて、タンパク質が主成分の染色体スキャフォールドについても同様に種々の染色法を用いて可視化を試み、その3次元構造を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 本研究では先に述べたようにヒト体細胞分裂中期染色体の内部構造をナノレベルで明らかにすることを目的とした。そのためにDNAが主体となるクロマチン線維の染色体内部での3次元構造とコンデンシン、トポイソメラーゼIIなど4種類のタンパク質からなる染色体スキャフォールドという組成が全く異なる2つの主要な構造体の両者について解析を進めた。

(2) 図1はプラチナブルー染色により検出したヌクレオソームの染色体内部における分布状況を厚さ10nmの切片を作製して示したものである。こうした切片を10nmごとに連続して作製することにより、染色体内部でのヌクレオソームの空間分布を可視化することが可能となった。6枚の切片内でのヌクレオソームの空間分布について3次元的に示したものを図2に示す。同じ切片上のヌクレオソームは同じ色で示した。当初は技術的制約により、染色体の全長にわたって解析する事、およびヌクレオソームの上位の構造体であるクロマチン線維の構造を可視

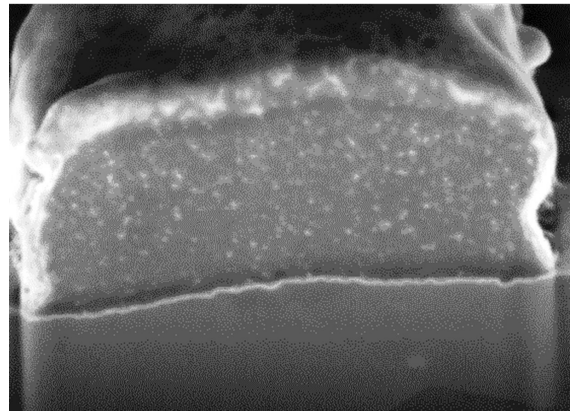


図1. 染色体断面でのヌクレオソームの分布

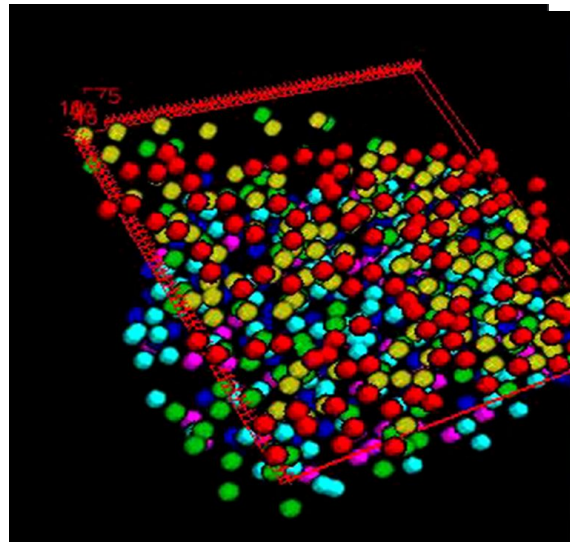


図2. 複数の断面でのヌクレオソームの分布

化することは困難であったが、それらについても平成28年度には可視化することに成功した。現在、染色体の全長にわたるクロマチン線維の空間分布についての論文を投稿準備中である。

(2) 一方、もう一つの重要な染色体内部構造である染色体スキャフォールドに関しては蛍光色素およびナノゴールド粒子で2重標識した抗体を用いてその3次元構造を可視化することに成功した。蛍光分析では通常の光学顕微鏡の分解能を超える3次元構造化照明顕微鏡(SIM)を用いて解析を行った。その結果、SIM観察では染色体スキャフォールド構造の全容を3次元的に把握することに成功し、2本のタンパク質からなる線維が互いに擦りあっていた軸構造を形成していることを明らかにした(図3)。またそれに加えてFIB/SEMを用いて染色体の断面での染色体スキャフォールドの観察を行った。その結果、それぞれの染色分体に2か所ずつの染色体スキャフォールドのシグナルを検出したことにより、染色体スキャフォールドが複数の線維からなる軸構造であることを明らかにした(図4)。

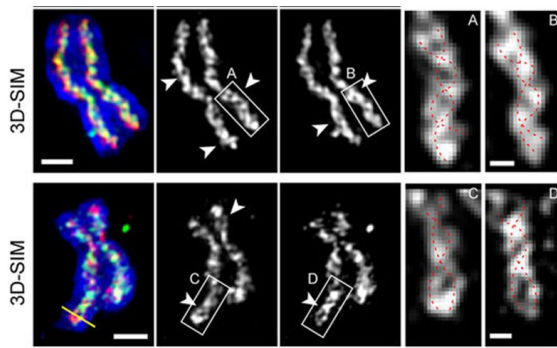


図3 . 2本のタンパク質線維が捩れ合う染色体スカフォールドの構造。

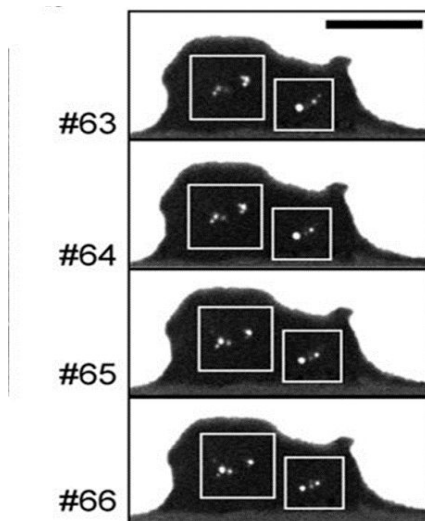


図4 . FIB/SEMでの染色体断面の観察結果。2本の線維からなる染色体スカフォールドが観察された。

<引用文献>

Fukui K. Contribution of nanotechnology to chromosome science. **Chromosome. Sci.** 19, 51-56 (2016)

Poonperm R., et al. Chromosome scaffold is a double-stranded assembly of scaffold proteins. **Scientific Reports** volume 5, Article number: 11916, doi:10.1038/srep11916 (2015)

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 21 件 : 全て査読有)

Ohmido N, Iwata A, Kato S, Wako T, Fukui K, Development of a quantitative pachytene chromosome

map and its unification with somatic chromosome and linkage maps of rice (*Oryza sativa* L.) PLoS ONE 13(4): e0195710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195710> (2018)

Poonperm R, Takata H, Uchiyama S, Fukui K, Interdependency and phosphorylation of KIF4 and condensin I are essential for organization of chromosome scaffold. PLoS ONE 12(8): e0183298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183298> (2017)

Phengchat R, Takata H, Uchiyama S, Fukui K, Calcium depletion destabilizes kinetochore fibres by the removal of CENP-F from the kinetochore. Scientific Reports 7, Article number: 7335 doi:10.1038/s41598-017-07777-6 (2017)

Sasakura S, Yoshida A, Wako T, Kaneyoshi K, Poonperm R, Ogawa S, Kato J, Otsuka J, Takata H, Uchiyama S, Fukui K, Structural analysis of human chromosome by FIB/SEM. Chromosome Science, 19, pp 25-31, DOI <https://doi.org/10.11352/scr.19.25> (2016)

Fukui K. Contribution of nanotechnology to chromosome science. Chromosome Science 19, 51-56, DOI <https://doi.org/10.11352/scr.19.51> (2016)

Phengchat R, Takata H, Morii K, Inada N, Murakoshi H, Uchiyama S, Fukui K, Calcium ions function as a booster of chromosome condensation. Scientific Reports volume 6, Article number: 38281, doi:10.1038/srep38281 (2016)

Harada S, Hiromori Y, Nakamura S, Kawahara K, Fukakusa S, Maruno T,

Noda M, Uchiyama S, Fukui K, Nishikawa J, Nagase H, Kobayashi Y, Yoshida T, Ohkubo T, Nakanishi T, Structural basis for PPAR γ trans-activation by endocrine-disrupting organotin compounds. Scientific Reports volume 5, Article number: 8520, doi:10.1038/srep08520 (2015)

Poonperm R, Takata H, Hamano T, Matsuda A, Uchiyama S, Hiraoka Y, Fukui K, Chromosome scaffold is a double-stranded assembly of scaffold proteins. Scientific Reports volume 5, Article number: 11916, doi:10.1038/srep11916 (2015)

Hamano T, Dwiranti A, Kaneyoshi K, Fukuda S, Kometani R, Nakao M, Takata H, Uchiyama S, Ohmido N, Fukui K, Chromosome interior observation by focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM) using ionic liquid technique. Microsc. Microanal. 20, 1-8, <https://doi.org/10.1017/S143192761401280X> (2014)

他 1 2 件

〔学会発表〕(計 1 5 件)

小川 真一、笹倉 颯馬、兼吉 航平、高田 英明、内山 進、福井 希一 (2016) ヘリウム/ネオンイオン顕微鏡技術によるヒト染色体の観察・加工。第 7 7 回応用物理学会秋季学術講演会。

福井 希一 (2016) ナノテクノロジーを用いた染色体高次構造へのアプローチ。第 8 9 回日本生化学会大会 (招待講演)

Sasakura Soma、Yoshida Akiyo、Kaneyoshi Kohei、Dwiranti Astari、Takata Hideaki、Uchiyama Susumu、Otsuka Yuji、Ogawa Shinichi、Fukui Kiichi (2016) Approach to Chromosome Structure by Ga FIB/SEM and Ne FIB/HIM. MNC 2016: 29th Inter-

national Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)

他 1 2 件

〔図書〕(計 4 件)

福井 希一他監訳、化学同人、Dehlinger 著 ビジュアルバイオテクノロジー、2017、261

Fukui Kiichi et al., Humana Press, Murata M, ed. Chromosome and Genome Engineering in Plants., 2016, 218

福井 希一他訳、養賢堂、バーバラマクリントックの生涯 - 動く遺伝子の発見 -、2016、136

他 1 件

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

5. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 希一 (FUKUI, Kiichi)

鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授

研究者番号: 0 0 3 1 1 7 7 0

(2) 研究分担者

近江戸 伸子 (OHMIDO, Nobuko)

神戸大学・大学院人間発達環境学研究所・教授

研究者番号: 3 0 3 4 3 2 6 3

(3) 研究分担者

若生 俊行 (WAKO, Toshiyuki)

農業・食品産業技術総合研究機構・先端解析研・上席研究員

研究者番号: 8 0 3 7 3 2 5 7

(4)研究分担者

高田 英明 (TAKATA, Hideaki)

産業技術総合研究所・主任研究員

研究者番号：80373257

(5)研究分担者

内山 進 (UCHIYAMA, Susumu)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：90335381