

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05614

研究課題名(和文)染色体構造動態の核内長距離相互作用をふまえた描像の確立

研究課題名(英文)Chromatin dynamics with intranuclear long range interactions

研究代表者

粟津 暁紀(Awazu, Akinori)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授

研究者番号：00448234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1. 核膜の変形と核膜及び核内染色体間に働く核質を介した流体力学相互作用を考慮する事で、分裂酵母の減数分裂期に生じる核のホーステイル運動の物理的に妥当なモデルを構築し、そのシミュレーションにより相同染色体の対合形成のメカニズムを明らかにした。2. クロマチンループ形成タンパク質等の結合無しにゲノム区画化を実現する、ヌクレオソーム排他配列群(NENLISと名付けた)の、インスレーター活性機序を数理モデルで明らかにし、またそのような配列がヒトゲノム中に20000カ所以上存在する事を見出した。3. その他、ヌクレオソームの動態、RNAseqによる遺伝子発現揺らぎの解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 本研究ではまず、染色体の核内構造動態に対し、細胞骨格等の作用により核膜が大きく変形する場合、核質の流動を無視することが物理的に妥当でない事を示し、妥当なモデルを用いて分裂酵母減数分裂期の相同組み替えのメカニズムを明らかにした。このような長距離に作用する流体力学相互作用は、従来無視されてきたが、本研究はそれらを再考すべきである事を示している。2. 従来ゲノムの区画化するインスレーターとして、クロマチンループを形成するCTCF結合配列等が着目されてきたが、実際にはNENLISのようなそれ以外の機序で起こるインスレーターも多数存在する事が示され、転写制御研究の次のページが開かれた。

研究成果の概要(英文)：1. Considering the deformation of the nuclear envelope and the hydrodynamic interaction between the nuclear envelope and the intranuclear chromosomes through the nucleoplasm, it is possible to obtain a physically valid nuclear horsetail movement during meiosis of fission yeast. A model was constructed and the simulation revealed the mechanism of pairing formation of homologous chromosomes. 2. We elucidate the mechanism of insulator activation of a group of nucleosome exclusive sequences (named NENLIS), which realizes genome compartmentalization without binding of chromatin loop-forming protein, by a mathematical model, and such sequences are found in the human genome. It has been found that there are more than 20,000 places in. 3. In addition, we analyzed nucleosome dynamics and gene expression fluctuations by RNAseq.

研究分野：生物物理

キーワード：染色体動態 転写制御 インスレーター In silico 解析 数理モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命の活動は柔軟な転写制御に支えられており、真核生物核内染色体の構造と動態はその転写動態を大きく左右している。近年幾つかのモデル生物の核内染色体の詳細な平均構造が、急速な Hi-C 実験とそのデータに基づく構造推定シミュレーション技術の進歩により、明らかにされている(Dixon, et al., Nature 2012 等)。同時に、顕微鏡技術の進歩に伴いライブイメージングによる遺伝子座の動態可視化が進められ、染色体の局所部位の異常拡散的挙動や遺伝子座の転写活性と拡散性の関係などが見出されてきた(Ochiai, et al., Nuc. Ac. Res. 2015 等)。しかしそのような構造の形成や動態のメカニズム、及びその遺伝子制御における意義を明らかにするには、さらに踏み込んで観察されている現象を、一つミクロな階層の化学・力学的過程から捉え、その繋がりを明らかにするのが重要であり、数理的考察はその段階で重要な役割を演じる。そしてこの段階で、その過程の全容解明に向け、現象を記述・再現する力学モデルを構築すべき段階に入ってきたと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、適切な遺伝子制御、及びそれを可能とする染色体構造化とその変化、という様々なスケールでのゲノム動態のメカニズムを明らかにする事である。特にこれまであまり注目されてこなかった、1) 細胞核自身の細胞骨格の作用によるダイナミックな変形、及びそれによって物理的に必然的に生じるであろう、核質を介した核膜-染色体間及び染色体間の長距離的な流体力学的相互作用の存在、2) 非コード DNA 領域による、~ kbp 程度という長距離離れたエンハンサー(サイレンサー)とプロモーター間相互作用の適切な制御による、細胞種ごとの遺伝子活性・抑制機序、3) クロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームの形成・再構成における、各ヌクレオソーム内で広範囲にその安定性を制御するヒストンテイルの作用、といった、遺伝子制御における核内の局所ミクロスケールから大域的スケールに及び各空間スケールでの現象に対し、特にそこにある「長距離相互作用」の役割を明らかにするため、研究を行った。

### 3. 研究の方法

これまで得られてきた Hi-C 実験やライブイメージング観察データに基づく数理モデルの構築によるメカニズムの考察、ミクロな物理的・生化学的な要請を満たすような細胞核及び核内染色体の数理モデル構築とその実験結果との比較、さらに公共データベース上で公開されている ChIP-seq 及び MNase-seq、Hi-C 等の、ゲノムワイドなゲノム状態のデータの横断的な解析による、機能性ゲノム領域の推定、といった手法を用い、真核生物の遺伝子制御を支えるゲノムの構造・動態を明らかにする。

まず、染色体数が3本、染色体の総長がヒトの1/250程度と、一見最も単純な染色体構造を持つように考えられるが、実際のところ高等生物と同様の染色体テリトリーや Topologically associated domain と同様の構造も内包する、真核単細胞生物である分裂酵母の核及び染色体動態に対し、核膜の変形と核質による流体力学相互作用を考慮した核内染色体動態のモデル化を行い、ライブイメージング等の実験結果と比較した。また、染色体の局所非コード DNA 領域に置ける転写制御機序の解析においては、その領域を含む周辺のクロマチン領域の物理的性質を実験結果よりモデル化し、その機序を明らかにすると同時に、ゲノムワイドなデータ解析により、そのようなクロマチン領域のゲノム内分布と機能性の普遍性を考察した。更に、ヌクレオソームの動態については、全原子分子動力学法を用いた解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 分裂酵母の減数分裂期における、核のホーステイル運動に伴う相同染色体対合形成の数理モデルによるシミュレーション:

核内染色体動態における核膜の変形及び核質の流体力学的効果の影響について、分裂酵母の核膜・核内染色体に体する数理モデルを構築し、考察した。具体的には、まず減数分裂期の分裂酵母で見られる、細胞核が大きく伸張・変形しながら細胞の両端間を往復する「ホーステイル運動」が核内の染色体に及ぼす影響、特に減数分裂において最も重要な核内イベントである相同染色体同士「対合形成」に及ぼす影響を、世界で初めて核質による流体力学相互作用を考慮した、核膜及び核内染色体の存在する物理的状況をよりリアルに捉えたモデルの構成と、シミュレーションにより考察した。その結果、ライブイメージング観察で見られるものと同様の、核が長細く大変形する「ホーステイル運動」が再現され(図1)、また運動の間に、相同染色体同士の対合が非相同染色体間の長さの違いによる相分離の結果生じる事、その非相同染色体間の相分離が、核のホーステイル運動の際に生じる、細胞両端におけるターン(急な進行方向転換)に対する、染色体毎の追従性の違いによって生じる事が見出された(Takao, et al., JPSJ 2019)。

#### (2) ヌクレオソーム排他的クロマチンループ非形成型インスレーター配列(NENLIS)によるゲノム区画化機序と、ヒトゲノム中での分布及び機能性:

様々な真核生物の核内で、染色体は独立した遺伝子性魚を行うクロマチンドメインに区画化されている事が知られており、そのような核内染色体の長距離的な構造制御を担うゲノム領域と

して知られる DNA 配列は、インスレーター配列と呼ばれている。そのようなインスレーター配列の典型として、例えばヒトでは、これまでに CTCF と呼ばれるクロマチンループを形成できるタンパクが結合できる配列等が知られている。その一方で本研究では、そのようなタンパク質の結合のしない、ヌクレオソーム排他的で物理的に「硬い(変形し難い)」と考えられる配列が、そのままの「裸の DNA」のままインスレーター機能を持ちうる事を、実験的試験に基づいて構成した局所クロマチン構造の数値モデルのシミュレーションにより見出した(図 2 左)。さらに、ヒトゲノム中における、このような機序で機能しているインスレーター配列の存在と機能性を明らかにするため、ヒト培養細胞(GM12878)における MNas-seq データ、ChIP-seq データ、Hi-C データを網羅的にデータ横断的に解析した(図 2 右)。その結果、これまでにこのような機序で働くインスレーターの存在が、出芽酵母やウニ等のごく少数示唆されていたが、今回の解析からヒトゲノム中にも 5000 箇所以上、このような機序で働くインスレーター配列が存在する可能性が示唆された(Matsushima, et al., JCPB 2019)。

(3) ヌクレオソームの安定性、特にヌクレオソーム再構成過程における構造安定性の解析：核内クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソーム構造の安定性について、H2A, H2B, H3, H4 それぞれ 2 個づつからなるヒストン 8 量体と DNA の結合した、カノニカルなヌクレオソームと、H2A, H2B が一つづつ外れたヒストン 6 量体、及び H3, H4 が一つづつ外れた 6 量体と DNA が結合した、ヘキサゴナルなヌクレオソーム、それぞれをシミュレーションし、その構造の安定性と揺らぎの性質を解析し、その生化学的意義を考察した。その結果、H2A, H2B がはずれたヘキサゴナルなヌクレオソームでは、カノニカルなヌクレオソームでそれらのヒストンと結合している DNA 部位が大きな揺らぎを示した。この場合、カノニカルなヌクレオソームで H2A, H2B が存在する場所は十分な空隙があるため、仮にこのヌクレオソームに H2A, H2B が接近してきた際、カノニカルなヌクレオソームを再構成する事が可能であると考えられた。H3, H4 がはずれたヘキサゴナルなヌクレオソームでは、カノニカルなヌクレオソームでそれらのヒストンと結合している DNA 部位の揺らぎが、H2A, H2B のヒストンテイルとの相互作用により押さえられる事が分かった。同時に、この DNA とヒストンテイルの相互作用は、カノニカルなヌクレオソームでは起こりえない相互作用であるため、このヌクレオソームに再び H3, H4 が結合しカノニカルなヌクレオソームを再構成する事は困難であろうと予想された。この事実は、核内で H2A, H2B の解離が頻繁に起こるのに対し、H3, H4 の解離がレアにしか起こらない事について、生化学的構造の再構成能の視点より、解釈が可能になる事を示唆している。(Kameda, et al., Front. Mol. Bio. 2019)

(4) その他の研究成果：

ウニ初期胚の核内構造と遺伝子発現の関係に関する実験とデータ解析を、主に卵割時に転写が強く活性化される初期型ヒストン遺伝子の核内位置とその発生ステージとの関係に注目し、蛍光 in situ hybridization (FISH) を用いて進めた。そしてヒストン遺伝子の発現が活発な細胞増殖期で、ヒストン遺伝子同士が核の中央に互いに接近する事、また発生が進み細胞分裂を頻繁に行わない形態形成期(原腸陥入開始の頃以後)では核内にランダムに分布する事を見出し、生物の発生・成長に必要な遺伝子発現が遺伝子座同士の実効的な長距離相互作用により制御されている事を見出した。(Matsushita, et al., JCS 2017)

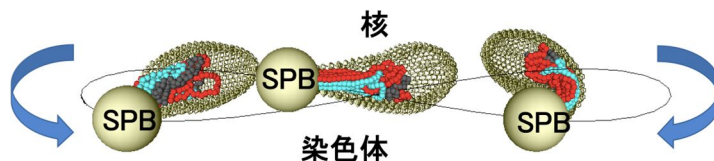


図 1：分裂酵母減数分裂の核の大変形を伴う「ホーステイル運動」のシミュレーションの様子

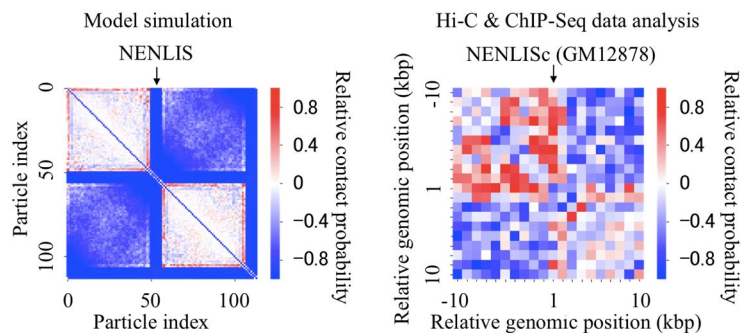


図 2：NENLIS の上流・下流ゲノム領域の接触頻度分布。

(左) 数値モデルの結果。(右) ヒトゲノムデータ解析結果の例

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsushima Yuki, Sakamoto Naoaki, Awazu Akinori	4. 巻 123
2. 論文標題 Insulator Activities of Nucleosome-Excluding DNA Sequences without Bound Chromatin Looping Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b10518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takao Kazutaka, Takamiya Kazunori, Ding Da-Qiao, Haraguchi Tokuko, Hiraoka Yasushi, Nishimori Hiraku, Awazu Akinori	4. 巻 88
2. 論文標題 Torsional Turning Motion of Chromosomes as an Accelerating Force to Align Homologous Chromosomes during Meiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 23801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.7566/JPSJ.88.023801">https://doi.org/10.7566/JPSJ.88.023801</a>	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 -
1. 著者名 Awazu Akinori, Tanabe Takahiro, Kamitani Mari, Tezuka Ayumi, Nagano Atsushi J.	4. 巻 8
2. 論文標題 Broad distribution spectrum from Gaussian to power law appears in stochastic variations in RNA-seq data	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 83391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26735-4	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 -
1. 著者名 Masaya Matsushita, Hiroshi Ochiai, Ken-ichi T. Suzuki, Sayaka Hayashi, Takashi Yamamoto, Akinori Awazu, Naoaki Sakamoto	4. 巻 130
2. 論文標題 Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during development of sea urchin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 4097-4107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1242/jcs.206862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kameda Takeru, Awazu Akinori, Togashi Yuichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Histone Tail Dynamics in Partially Disassembled Nucleosomes During Chromatin Remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00133">https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00133</a>	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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高尾 和孝, 西森 拓, 粟津 暁紀
2. 発表標題 核膜変形と核内流体を考慮した分裂酵母染色体動態の物理モデル
3. 学会等名 第56回生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島 佑樹, 西森 拓, 坂本 尚昭, 粟津 暁紀
2. 発表標題 ヌクレオソーム排他的領域のインスレーター機能の解析
3. 学会等名 第56回生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下 将也, 落合 博, 鈴木 賢一, 林 紗弥香, 杉山 文香, 山本 卓, 粟津 暁紀, 坂本 尚昭
2. 発表標題 Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during development of sea urchin
3. 学会等名 第56回生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 雄揮, 伊藤 寛朗, 千田 久通, 西森 拓, 上野 勝, 栗津 暁紀
2. 発表標題 数理モデルとライブイメージングデータを用いた分裂酵母間期核内構造の解析
3. 学会等名 第56回生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬 湧大, 西森 拓, 栗津 暁紀
2. 発表標題 遅発性アルツハイマー病に関連する新規ゲノム領域の網羅的探索
3. 学会等名 第56回生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高尾 和孝, 西森 拓, 栗津 暁紀
2. 発表標題 核膜変形と核内流体を考慮した分裂酵母減数分裂期染色体のモデル
3. 学会等名 日本物理学会 第73回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高尾 和孝, 西森 拓, 栗津 暁紀
2. 発表標題 核膜変形と核内流体を考慮した分裂酵母減数分裂期染色体のモデル
3. 学会等名 日本物理学会 第73回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akinori Awazu
2. 発表標題 Chromatin segregation induced by nuclear envelope dynamical deformities
3. 学会等名 THE 3 RD HIROSHIMA INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUTURE SCIENCE “FRONTIERS IN BIOIMAGING BASED LIFE SCIENCE” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akinori Awazu
2. 発表標題 Insulator Activities of Nucleosome-Excluding DNA Sequences Without Chromatin Loop Form
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	上野 勝 (Ueno Masaru) (90293597)	広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授  (15401)	
研究協力者	坂本 尚昭 (Sakamoto Naoaki) (00332338)	広島大学・統合生命科学研究科・准教授  (15401)	