

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：63801

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23115005

研究課題名（和文）遺伝子発現の少数性生物学 - 少数分子による情報探索原理の解明 -

研究課題名（英文）Small number issues in the genome biology

研究代表者

前島 一博（Maeshima, Kazuhiro）

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号：00392118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 81,300,000円

研究成果の概要（和文）：「少数ゲノム DNAが細胞内でどのように収納され、どのように読み出されるのか？」にアプローチすることを目的とした。先ず、定説のような規則正しいクロマチン線維は存在せず、ヌクレオソームが不規則に細胞内に収められていることを突き止めた。さらに、ヌクレオソーム1分子観察により細胞の中でヌクレオソームがダイナミックに揺らいでいることを見出した。そして、計算機シミュレーションを組み合わせ、この揺らぎのおかげで、タンパク質が細胞の核内や染色体の中をより自由に動くことができ、ゲノムDNAとアクセスしやすくなることが示唆された。少数のゲノムDNAの情報検索原理の一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：How are the two copies of genomic DNA organized and read out in the cell? Although the chromatin had been long assumed to be folded into the 30-nm chromatin fiber and further helical folding structures, we demonstrated that chromatin essentially irregularly folded without the chromatin fiber. Consistent with this notion, using single nucleosome imaging, we uncovered local nucleosome fluctuation in live mammalian cells. Our in vivo/in silico results suggested that local nucleosome dynamics facilitate chromatin accessibility and play an important role in the scanning of genome information, which is critical for many “target searching” biological processes.

研究分野：細胞生物学 生物物理学

キーワード：核酸 ゲノム 生体分子

1. 研究開始当初の背景

私達の体は約 60 兆個の細胞からできている。その細胞のわずか容量 1 ピコリットルの核の中に、全長 2m のゲノム DNA が折り畳まれている。このゲノム DNA は 2 セットあるため、同じ遺伝子が基本的に「2 個」存在する。核の微小空間において、2 セットのゲノム DNA はどのように収納されるのか？さらには、少数の遺伝子がどのように検索され、どのように読み出されるのだろうか？このような問題は、「少数性の生物学」の最も基本的な事例だと思われた。

2. 研究の目的

本研究計画では少数分子による情報検索原理を「ゲノムの足場の構造と動き」と、ターゲットを探す「転写因子の動き」の両面から明らかにすることを目的とした。具体的には、生細胞内の個々のヌクレオソーム（ゲノムの足場）と転写因子の動きを 1 分子レベルで直接イメージングする技術を開発し検証する。さらに、計算機シミュレーションを組み合わせ、核内の動的な環境をモデル化し、既存データを加えて、今までほとんど研究がなされてこなかったゲノムの情報検索の原理の解明にアプローチした。

3. 研究の方法

「ゲノムの足場の構造」を調べるため、クライオ電子顕微鏡や X 線構造解析を用いた。さらに「ゲノムの足場の動き」などの解析のため、1 分子ヌクレオソームイメージングやモンテカルロシミュレーションを用いて研究を進めた。

4. 研究成果

まず、ヒトゲノム DNA は一体どのように折り畳まれて、細胞核や染色体に収納されているのであろうか？教科書などでは、まず DNA はヒストンに巻かれ、ヌクレオソームと呼ばれる構造体になり、さらに折り畳まれて直径

約 30nm のクロマチン線維になるとされてきた (図 1 左)。しかしながら、代表者前島らのクライオ電子顕微鏡や X 線構造解析を用いた研究によって、ヒトの間期核・分裂期染色体には 30nm 線維を含めて階層構造が存在せず、直径 11nm のヌクレオソームの線維が不規則に折り畳まれているという、「ゲノムの足場の構造」に関して、従来のモデルをくつがえす知見が得られた (図 1 右) (論文 1,2,10,11)。研究分担者谷口らの新しいゲノム解析手法による結果もこの知見を支持している。

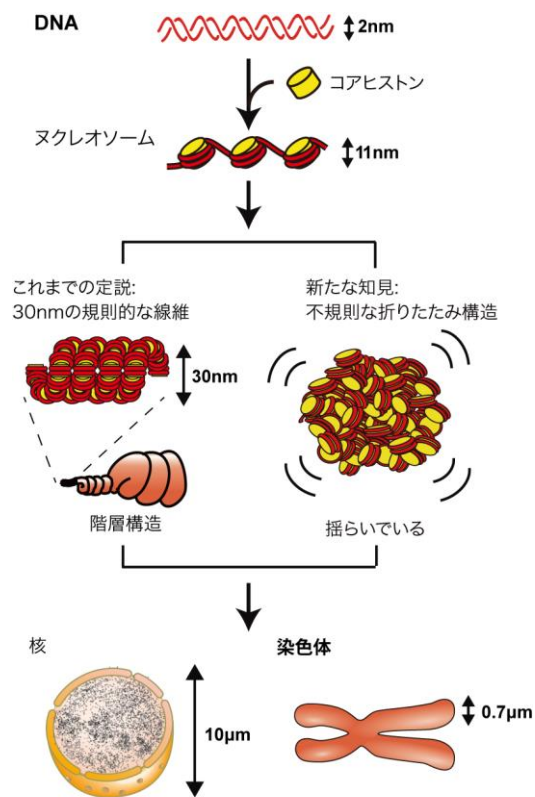


図 1

次に「ゲノムの足場の動き」を調べるため、領域代表永井らと 1 分子イメージングを用いて、ヌクレオソームの 1 個 1 個の動態を解析した。

コアヒストン H4 と光活性化型緑色蛍光タンパク質 PAGFP を融合させ、HeLa 細胞に内在性の H4 の 5% 以下の量を発現させた。PAGFP はごく少数のタンパク質が自発的に活性化する性質をもつ。代表者らは、この自発的に活性化した PAGFP-H4 を斜光照明顕微

鏡で観察した (図 2A,B). 斜光照明顕微鏡を用いて、自発的に活性化した PAGFP-H4 を観察することで、一度に発光する H4 を一細胞あたり数十~百個程度というごく限られた数に減らし、ヌクレオソーム一つ一つを区別してみることに成功した (図 2C).

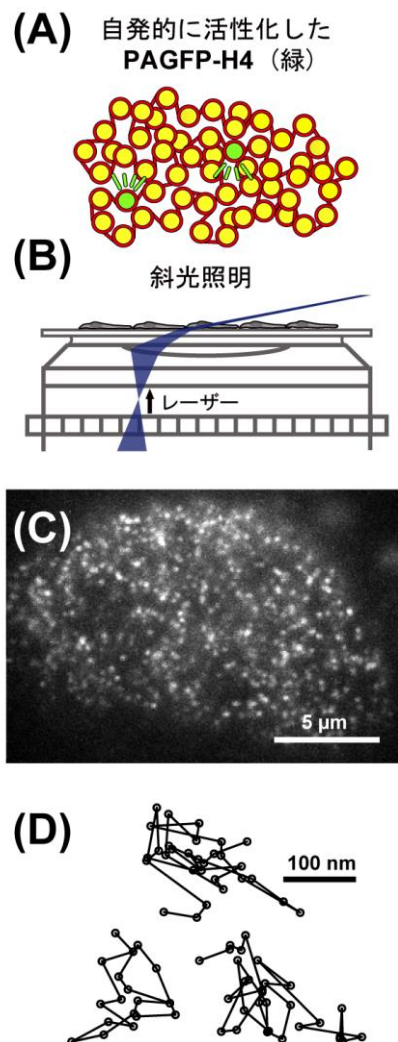


図 2

代表者らは、自発的に活性化したヌクレオソームを光褪色するまで検出し、その後、画像処理により 1 分子由来の輝点の重心座標を検出した。この自発的な活性化と検出の過程を、全ての PAGFP-H4 分子を測定するまで繰り返し、全ての画像の輝点の重心画像を重ね合わせると、顕微鏡システムの位置決定精度を見かけの空間分解能とする超解像顕微鏡 (この場合は PALM) 像を得ることができた。同一分子の輝点の重心座標を時間フレーム間で

つなげると単一ヌクレオソームの運動軌跡となる (図 2D). 運動軌跡から、ヌクレオソームの単位時間当たりの移動距離の分布 (図 3A) や平均二乗変位 (MSD) (図 3B) を算出することができた。これらの解析により、ヌクレオソームの空間分布とそのゆらぎをゲノムワイドで計測することが可能となった。

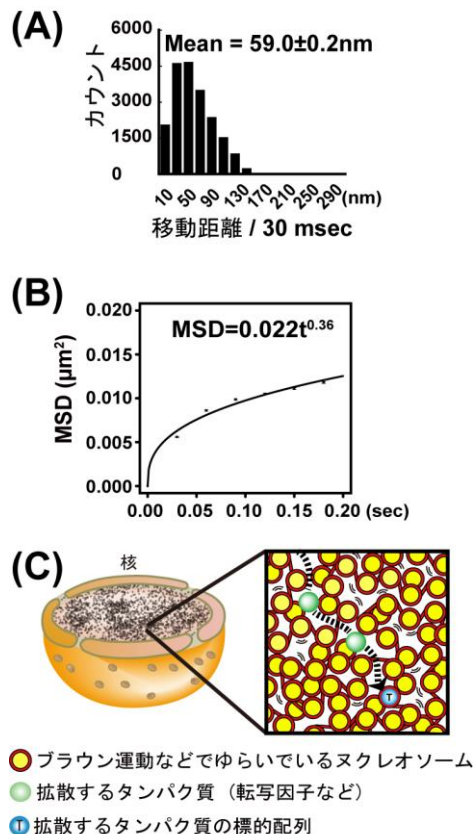


図 3

興味深いことに、ヌクレオソームのゆらぎは、間期クロマチンでも分裂期染色体でも同じようにみられた (~50 nm/30 ms). 一方、ガラス表面に固定した GFP の見かけ上のゆらぎは 12.8 ± 0.2 nm/30 ms であり、生細胞で観察した PAGFP-H4 の動きに比べて非常に小さい。顕微鏡システムに起因する動きは、ヌクレオソームの動きと比較してごくわずかであった。ヌクレオソームのゆらぎをさらに解析するため、PAGFP-H4 の MSD を指数関数で近似すると $MSD = 0.022t^{0.36}$ という異常拡散モデルで説明できた (図 3B). これは、ヌクレオソームの運動はある領域内に制限さ

れていることを示唆している。ヌクレオソームのゆらぎは、生物学的にどんな意味をもつのであろうか？ 連携研究者高橋らとの共同研究によって、ヌクレオソームダイナミクス
のモンテカルロシミュレーションは、このヌクレオソームのゆらぎが転写因子などのタンパク質の運動を促進していることが示唆された (図 3C) (論文 3,6,8,9)。本研究計画において、ヌクレオソームの「揺らぎ」がタンパク質分子によるゲノム DNA の情報検索を助けていることが明らかになり、少数のゲノム DNA の情報検索原理の理解が進んだ。

さらに取得したデータから多数の輝点の中心を決定し、ヌクレオソームの分布を算出した。その結果、これまで困難であった生細胞におけるクロマチン超解像図の作成に成功した。これによって、回折限界 (200 nm) を超えるクロマチン像の観察が可能となった (図 4 左)。得られたクロマチンの超解像図は、ヌクレオソームが一様ではなく、偏って存在していた (図 4 左)。得られたヌクレオソームの空間的偏りを統計的に示すために、Radial distribution function と呼ばれる統計手法を用いることを用いた。その結果、ヌクレオソームは核内において、一様 (ランダム) ではなく、偏った分布を持つことが示された。これらのことから、ヌクレオソームの塊であるクロマチンドメインが生細胞においても存在することが明らかになった (図 4 右)。

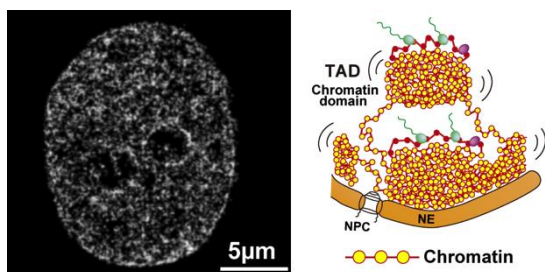


図 4

巨大な転写因子はクロマチンドメインの内部に入っていくことができないと考えられ

るので、表面におしだされたゲノムの標的配列のみと結合することができると予想される (論文 4) (図 4 右)。ゲノムの足場のダイナミックな性質は、転写プロセスの原動力になっていると思われる。ゲノムの DNA の情報読み出し機構に対する新たな知見が得られた。

さらにターゲットを探す「転写因子の動き」を明らかにするため、数種の転写因子を蛍光ラベルした HeLa 細胞を樹立した。そして斜光照明顕微鏡 (図 2B) を用いて可視化し、転写因子の動態を観察できるようになった。

また分担研究者谷口らは新規顕微鏡を開発し、酵母の 1 細胞レベルの遺伝子発現の揺らぎを観察した (論文 5, 特許出願)。

本研究計画の遂行中、少数ゲノムの新たな分離メカニズムも明らかになった。細胞は分裂する際、複製された 2 コピーのゲノム DNA を姉妹染色体として凝縮させ、厳密に娘細胞に分配する必要がある。本領域の終盤、この過程が不連続に起こることを明らかにした (論文 3)。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 77 件)

1, [Maeshima, K.](#), Rogge, R., Tamura, S., Joti, Y., Hikima, T., Szerlong, H., Krause, C., Herman, J., DeLuca, J., Ishikawa, T., Hansen, J.C. (2016) "Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers." *EMBO Journal* 35, 1115–1132. DOI: 10.15252/embj.201592660 査読有り

2, [Maeshima, K.](#), Ide, S., Hibino, K., Sasai, M. (2016) "Liquid-like behavior of chromatin." *Current Opinion in Genetics and Development*, 37:36-45. DOI: 10.1016/j.gde.2015.11.006 査読有り

3, Liang, Z., Zickler, D., Prentiss, M., Chang, F.S., Witz, G., [Maeshima, K.](#), Kleckner, N. (2015) "Chromosomes progress to metaphase in multiple discrete steps via global compaction/expansion (stress) cycles." *Cell*, DOI:161:1124-1137. 査読有り

4, Maeshima, K., Kaizu, K., Tamura, S., Nozaki, T., Kokubo, T., Takahashi, K. (2015) "The physical size of transcription factors is key to transcriptional regulation in the chromatin domains." *Journal of Physics: condensed matters*, 27, 064116 (10pp)

DOI:10.1088/0953-8984/27/6/064116

査読有り

5, Taniguchi, Y. (2015) Genome-wide analysis on protein and mRNA copy numbers in single *Escherichia coli* cells with single-molecule sensitivity. *Methods in Molecular Biology* 1346, 55-67 DOI:10.1007/978-1-4939-2987-0_5

査読有り

6, Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014) "Chromatin as dynamic 10-nm fibers." *Chromosoma*, 123:225-237.

DOI: 10.1007/s00412-014-0460-2 査読有り

7, Kawamoto, Y., Bando, T., Kamada, F., Li, Y., Hashiya, K., Maeshima, K., and Sugiyama, H. (2013) "Development of a New Method for Synthesis of Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes Targeting Human Telomeres." *Journal of the American Chemical Society*, 135:16468-16477.

DOI : 10.1021/ja406737n 査読有り

8, Nozaki, T., Kaizu, K., Pack, C.G., Tamura, S., Tani, T., Hihara, S., Nagai, T., Takahashi, K., Maeshima, K. (2013) "Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells." *Nucleus*, 4:349 – 356. DOI : 10.4161/nucl.26053

査読有り

9, Hihara, S., Pack, C.G., Kaizu, K., Tani, T., Hanafusa, T., Nozaki, T., Takemoto, S., Yoshimi, T., Yokota, H., Imamoto, N., Sako, Y., Kinjo, M., Takahashi, K., Nagai, T., Maeshima, K. (2012) "Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells." *Cell Reports*, 2:1645-1656. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.008>

査読有り

10, Nishino, Y, Eltsov, M, Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., Maeshima, K. (2012) "Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure." *EMBO Journal*, 31:1644-53. DOI: 10.1038/emboj.2012.35 査読有り

11, Maeshima, K., Hihara, S. Takata, H. (2011) "New insight into the mitotic chromosome structure : irregular folding of nucleosome fibres?" *Cold Spring Harbor Symposia on*

Quantitative Biology, 75:439-444.

DOI:10.1101/sqb.2010.75.034 査読有り

〔学会発表〕 (計 63 件)

1, Kazuhiro Maeshima

"Chromatin Structure and Dynamics in Live Mammalian Cells"

2nd Symposium on Complex Biodynamics & Networks, Tsuruoka, Yamagata, May 11-13, 2015

2, Kazuhiro Maeshima

"Chromatin fluctuation in live mammalian cells" Royal Society workshop "Chromosome Dynamics: Computational Models and Experimental Data", Chicheley Hall, UK, Nov. 18-20, 2014

3, Kazuhiro Maeshima

"Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells"

Workshop on the 4D Nucleome: Functional Nuclear Organization in Space and Time, Mainz, Germany, June, 12-15, 2013

4, Kazuhiro Maeshima

"How is a long strand of DNA organized in the cells?"

Lorentz Center Workshop "Genome Mechanics at the Nuclear Scale", Leiden, Netherlands, Dec. 10-14, 2012

5, Kazuhiro Maeshima

"How is a Long Strand of DNA Compacted into a Chromosome?"

Albany 2011: 17th Conversation, SUNY, NY, USA, June 14-19, 2011

〔図書〕 (計 6 件)

1, 前島一博,

教科書の染色体構造が変わる？！

はっきりわかる現代サイエンスの常識事典, pp.80-81, 成美堂出版(2014). (分担執筆)

2, 前島一博,

DNA 収納のなぞ : DNA は細胞内でどのように折り畳まれているのか？

遺伝子が語る生命 38 億年の謎——なぜ、ゾウはネズミより長生きか？ pp.134-144, 悠書館(2014). (分担執筆)

3, 前島一博,

不規則な収納が生む自由—DNA 収納の基本を問い直す—,

生命誌年刊号「変わる」, pp.111-117, 新曜社(2014). (分担執筆)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 顕微鏡、焦準器具、流体保持器具、及

び光学ユニット
発明者：谷口雄一、西村和哉
権利者：独立行政法人理化学研究所
特願2013-79956、
PCT/JP2014/059883
出願年月日：2013年4月5日
国内外の別：国内

〔その他〕

1, 2016/4/13 静岡新聞 朝刊「DNA の収納塩濃度で変化」Yahoo ニュースなどに転載

2, 2014/5/11 読売新聞 朝刊「DNA の集まり実は乱雑？」

3, 2013/12/2 読売新聞 朝刊「DNA 凝縮するほど 損傷受けず 放射線治療に応用」

4, 2013/10/10 時事通信 配信「放射線による損傷防ぐ役割も＝DNA の密集—国立遺伝研など」(Yahoo ニュース, ニコニコニュースなどに転載)

5, 2013/10/10 静岡第一テレビ (日本テレビ系列) 「おごとワイド- 国立遺伝学研究所 放射線から DNA を守る仕組みとは？」

6, 2013/10/10 静岡新聞「DNA密集で放射線の損傷減 がん治療の向上へ道 三島・国立遺伝研」

7, 2013/1/28 新聞赤旗「DNA の収納 実は「いい加減」」

8, 2012/12/14 マイナビニュース「生命の設計図であるゲノム DNA は細胞の中で小刻みに動いていた -遺伝研など」

9, 2012/2/28 マイナビニュース「DNA は染色体の中はかなりいい加減・不規則に収められていた -遺伝研が発見」

10, 2012/2/20 日本経済新聞 「染色体の束ね方実はいいかげん」
日経産業新聞 「染色体の束ね方不規則」

11, 2012/2/18 共同通信「ぐしゃっと集まり染色体に —生命設計図の定説覆す」

12, 2015/8/4 職業インタビュー
平成 27 年度 静岡県立御殿場南高校 1 年生インターンシップ (職場体験)「DNA の単離, 切断, 電気泳動」(国立遺伝研)

13, 2014/8/21-2014/8/22 職業体験
平成 26 年度 静岡県立韮山高校 1 年生インターンシップ (職場体験)「DNA の単離, 切断, 電気泳動」の実習 (国立遺伝研)

14, 2014/8/25 市民講座
平成 26 年度岡山県高等学校理科研修講座(生物)「DNA は細胞のなかにもどのように収納されているのか？」(岡山県総合教育センター)

15, 2013/11/2 市民講座
国立遺伝学研究所 公開講演会 2013「細胞の中の DNA~生命の設計図 DNA のふしぎ」(秋葉原コンベンションホール)

16, 2013/8/19-2013/8/21 職業体験
静岡雙葉中学校 3 年生の職業体験 (インターンシップ)として, DNA を扱った. (国立遺伝学研究所)

17, 2012/8/27 出前授業
インターンシップ 講演会「細胞のなかの DNA」(静岡県立富士高等学校)

18, 2012/4/7 市民講座
2012 年度国立遺伝学研究所一般公開 講演会「細胞の中の核と染色体 ~生命の設計図 DNA のふしぎ~」(国立遺伝学研究所講堂)

19, 2011/12/11 出前授業
SGT 講演「DNA のふしぎ」(静岡学園 中学・高校)

研究室ホームページ
<https://www.nig.ac.jp/labs/MacroMol/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
前島 一博(MAESHIMA KAZUHIRO)
国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授
研究者番号：00392118

(2)研究分担者
谷口 雄一 (TANIGUCHI YUUICHI)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー
研究者番号：90556276

(3)連携研究者
高橋 恒一 (TAKAHASHI KOUICHI)
国立研究開発法人理化学研・究所生命システム研究センター・チームリーダー
研究者番号：20514508

(4)連携研究者
吉村 成弘 (YOSHIMURA NARIHIRO)
京都大学・生命科学研究所・准教授
研究者番号：90346106