

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14515

研究課題名(和文)力による核内遺伝子動態の制御

研究課題名(英文)Elucidating the force-based mechanisms regulating nuclear structure and function

研究代表者

島本 勇太(Shimamoto, Yuta)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：80409656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、機械刺激に対する細胞の応答と機能調節のメカニズムを、核の力学特性に着目して明らかにすることを目的とした。細胞に作用する力が核の構造と機能を変調することが広く知られていたが、核への物理的アクセスの難しさから、核が力に対していかに応答するかの分子メカニズムは不明であった。これを解決するため、ガラスマイクロニードルを基礎とした微小力学操作顕微鏡を開発し、HeLa細胞をモデルに力に対する核の変形応答特性を定量的に決定した。さらに生化学摂動実験を組み合わせることで、核に作用する力にクロマチンが応答すること、そしてこの応答がDNAの切断やヒストンのアセチル化によって有意に減少することが示された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on elucidating the physical and molecular basis underlying nuclear mechanical response, with an ultimate goal to understand cell's mechanotransduction mechanisms. It had long been recognized that mechanical force acting on a cell can transmit across the cytoplasm and alter the structure and function of the nucleus. However, it was largely unknown how the nucleus resists and responds to the force, due primarily to the lack of a suitable assay. To address this, we developed a microneedle-based micromanipulation setup and quantitatively examined the mechanical response of human cell nuclei, such as those of HeLa cells. Combining biochemical perturbation assays, our measurements revealed that chromatin can respond to stretching force that acts on the nucleus, and that the chromatin's response to force is significantly suppressed upon digestion of DNA or acetylation of histones.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：細胞核 機械計測 クロマチン マイクロマニピュレーション 力学特性 ヒストン DNA

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、収縮や遊走、接着を初めとするさまざまな力学過程において環境から受ける機械刺激に適切に応答、対抗しながら機能している。いくつかの先行研究により、細胞に作用する力は細胞質を通じて遺伝情報の保持と制御の中核である核に到達し、核の構造を圧縮・伸長、さらには内部のクロマチン動態に変調を来して細胞の遺伝子発現活性を調節することが報告されていた。また、核に生じる異常変形はがん化や細胞死と関連する重要な形質であることが広く知られており、従って核が力学的ストレスに対してその構造と機能を維持するメカニズムの解明は、関連分野の重要な課題となっていた。しかしながら、核の力学応答特性を直接解析する手法はこれまで限られており、従って背後の物理的・分子的なメカニズムはほとんど分かっていなかった。

核の構造・機能的安定性は、核膜を裏打ちするラミンを基礎とした殻状の構造によって支えられているという理解が広く確立されていた。一方、ガラスキャピラリーや原子間力顕微鏡を用いたいくつかの生物物理実験により、核内のクロマチンがその凝集状態に応じて核の硬さを制御していることが示唆されていた。さらに、核から単離した短いクロマチン繊維は伸長変形に対して弾力的な抵抗力を発生することが報告されていた。しかしながら、細胞内のクロマチンは核の中で不規則に折りたたまれた複雑な構造をしていること、さらにクロマチンは核全体に一樣に分布するのではなく、'染色体テリトリー'と呼ばれる離散的な領域を占めていることが最近の研究から明らかにされていた。このようなクロマチンの複雑な高次構造がいかに核の力学応答と関連しているかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、核が備えた機械特性と力学情報変換のしくみを理解するため、定量的かつ直接的な核のマイクロマニピュレーション技術確立し、これを用いて核の変形応答と背後の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、DNA を構造の基礎とし転写と深く関連するクロマチンの凝集状態が、核に作用する力に対していかに応答するか注目してこの現象を明らかにすることを具体的な研究目標とした。

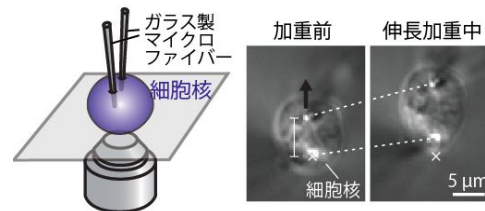
### 3. 研究の方法

核の力学応答特性を定量的に決定するため、研究代表者が以前に開発した紡錘体のマイクロマニピュレーション装置 (Shimamoto and Kapoor, *Nat Protoc*, 2012) を応用した力学解析システムを構築した (図 1)。このシステムは、硬さが校正された 2 本の微小ガラスファイバーとそのそれぞれを保持するマイクロマニピュレーター、60 倍の対物レン

ズ、そして高解像 CCD カメラを基本に構成される。実験は、顕微鏡下で 2 本のガラスファイバーを操作しながら核を捕捉し、異なる力の大きさで核に繰り返し圧縮・伸長刺激を与えることにより行った。これにより応力-歪み関係を取得し、核の硬さと粘弾性応答特性を定量的に決定した。

計測は、研究代表者が精通するアフリカツメガエル卵抽出液内で cell-free 形成された核を用いて確立し、それに引き続きヒト培養細胞から精製した単離核について詳細に解析を行った。さらに生細胞内にガラスファイバーを挿入することで核の *in situ* 力学計測を実現し、その生理的関連性を検証した。

クロマチンの核メカニクスに対する寄与を解析するため、単離核を異なるマグネシウム濃度の溶液に露出することでその凝集状態を制御した。さらに、DNA 切断酵素である HaeIII、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である Trichostatin A を用いて特異的な撓動を与えた。これらの撓動が細胞核とクロマチンの分子組成に与える影響は、SDS-PAGE やウェスタンブロットングを初めとする確立された生化学手法によって評価した。



**図 1 本研究で作成した核の微小力学操作・物性解析システム** 直径 1 ミクロン程の微小ガラスファイバーを用いて倒立顕微鏡下に置いた単一の細胞核を捕捉し、ファイバー間の距離を変えることで核に変形刺激を与えることができる。核に作用する力は、あらかじめ校正されたファイバー先端の硬さと屈曲変位から見積もることができる。右の写真はこの装置を用いて HeLa 細胞から単離された核に伸長刺激を与えている様子。

### 4. 研究成果

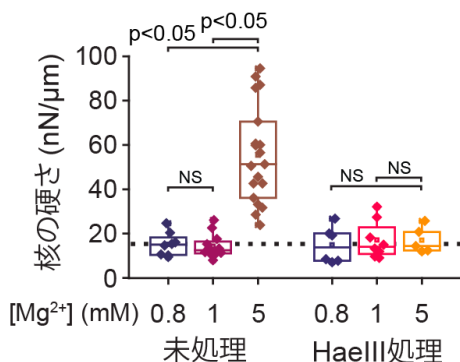
#### 4-1. 核の力学応答特性の決定

上記の顕微計測システムを用いて、ヒト培養細胞 (HeLa) から単離した核にさまざまな大きさで力の伸長刺激を与えたところ、核に生じる変形は力の大きさに比例して増大し、特に小さな変形領域 ( $\sim 1-2 \mu\text{m}$ ) においては高い弾性を示すことが明らかとなった。核の硬さは  $10-50 \text{ nN}/\mu\text{m}$  の範囲に広く分布し、その値は細胞質の硬さに比べて 10 倍程度も大きなものであった。また、比較的大きな変形 ( $> 2 \mu\text{m}$ ) に対して核は可塑的な応答を示すことが明らかとなった。

#### 4-2. 核の力学特性とクロマチン凝集状態の関係

核内クロマチンの凝集状態が核の力学特性にいかに関係しているかを明らかにするため、マグネシウム濃度に対する核の硬さ依存性を解析した。マグネシウムは負に帯電したクロマチン繊維に相互作用してクロマチンを高い凝集状態に移行させることが知られている。その結果、1 mM 以上のマグネシウム濃度において核の硬さは急激に上昇し、それとは逆に 1 mM 以下でその硬さはほとんど変化しなかった（図2）。この結果により、クロマチンが核内で高度に凝集することで核の硬さが上昇することが示唆された。

マグネシウムはクロマチン以外の核因子にも変化を与える可能性が考えられた。そこで、制限酵素 HaeIII によって DNA を切断したところ、単離核の硬さが有意に減少することが観察された。興味深いことに、この変化は 1 mM 以上のマグネシウム濃度においてのみ観察され、一方 1 mM 以下のマグネシウム濃度において HaeIII の効果はほとんど現れなかった（図2）。一方、HaeIII 処理によって核の構造因子やクロマチンの分子組成に大きな変化は見られなかった。以上の結果から、クロマチンが凝集することで核に作用する力に応答することが明らかとなった。

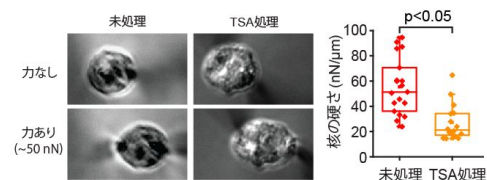


**図2 マグネシウム濃度と DNA 切断に依存した核の硬さ変化** ささまざまなマグネシウム濃度溶液に HeLa 細胞の単離核を露出して計測された核の硬さ。それぞれのプロットは同じ条件で異なる核から計測されたデータを示す。5mM のマグネシウム濃度で急激な核の硬化が見られた(茶色のバー)。一方、この変化は HaeIII によって核内の DNA を酵素的に切断することによって消失した。さらに、DNA 切断によってマグネシウム濃度に依存的な核の硬さ要素が明らかになった(黒点線)。

#### 4-3. クロマチン構造に対する分子摂動の力学的効果

クロマチンの高次構造は細胞の転写状態によって変化し、特に DNA 結合タンパク質であるヒストンのアセチル化に応じて脱凝集側に傾くことが知られている。そこでヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である Trichostatin A で細胞を処理し、単離核を精製後その硬さを計測したところ、ヒストンのアセチル化によって核の硬さが 3 倍以上減

少することが明らかとなった(図3)。これと同等の変化は、生細胞内の核をマイクロニードルで直接マイクロマニピュレーションすることによっても確かめられた。一方、Trichostatin A 処理によって核の構造因子やクロマチンの分子組成に大きな変化は生じなかった。以上の結果から、転写制御と関連するクロマチンの高次構造変化が核の力学特性と直接的に関係していることが明らかとなった。



**図3 ヒストンアセチル化による核の硬さ変化** ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である Trichostatin A (TSA) で HeLa 細胞を処理後、核を単離精製してマイクロファイバーの計測装置で伸長実験を行った。写真は阻害剤なし(左)とあり(右)でそれぞれ加重前(上) 50nN 程度の加重中(下)の核の明視野像。TSA 処理後の核は処理しなかったものに比べて有意にその硬さが減少することがわかった。

#### 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 1 件)

1. Nucleosome-nucleosome interactions via histone tails and linker DNA regulate nuclear rigidity. Shimamoto Y, Tamura S, Masumoto H, Maeshima K. *Mol Biol Cell* (2017)、査読有、pii: mbc.E16-11-0783. doi: 10.1091/mbc.E16-11-0783

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Nucleosome-nucleosome interactions via histone tails and linker DNA regulate nuclear rigidity. Shimamoto Y, Tamura S, Masumoto H, Maeshima K. Microsymposium Talk, American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec 3, 2016

2. 「クロマチン脱凝集が細胞核の硬さに与える効果」島本勇太、田村佐知子、前島一博、日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会、ウインクあいち、2017 年 1 月 19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島本 勇太 (SHIMAMOTO, Yuta)  
国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授  
研究者番号：80409656

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

前島 一博 (MAESHIMA, Kazuhiro)  
国立遺伝学研究所・生体高分子研究室・教授

田村佐知子 (TAMURA, Sachiko)  
国立遺伝学研究所・生体高分子研究室・テクニシャン

増本博司 (MASUMOTO, Hiroshi)  
長崎大学医学部・講師