

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18770131

研究課題名（和文）再構成クロマチンファイバーと核内骨格との相互作用の解析

研究課題名（英文） Analyses of interaction between the reconstituted chromatin fiber and the nuclear matrix.

研究代表者 日詰 光治 (Hizume Kohji)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：10378846

## 研究成果の概要：

遺伝情報を担う DNA 分子を含むクロマチンファイバーが、細胞核内部の骨格構造とどのように相互作用しているのかを明らかにするため、その構造を試験管内で人工的に再構築し、原子間力顕微鏡による観察を行った。その結果、核内骨格の構成因子である topo II タンパク質を加えることで、クロマチンファイバーがたぐり寄せられるように集合し、ループ状構造を形成することを明らかにした。また、クロマチンのアセチル化修飾を引き金に、クロマチンファイバーが弛緩して細くなり、更に、核内骨格から遊離し易い（自由度の高い）状態へと変化することを示唆する実験結果を得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	210,000	3,910,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

## 1. 研究開始当初の背景

核内の染色体高次構造を理解するうえで、微細構造の可視化解析は、欠かすことが出来ない直接的なアプローチである。研究開始当初まで、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いた研究で、“細胞核から単離した染色体”あるいは“再構成したヌクレオソーム”の構造解析は行なわれてきた。しかし、高次な染色体構造は単離・精製の過程で形を失いやすく、

再構成することも不可能であったため、その構造的性質や構築メカニズムは、解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

間期核における染色体高次構造構築の原理を明らかにすることを目指す。とりわけ、核内骨格構造に着目し、マトリックスやラミナとクロマチンとが相互作用して形成される

高次複合体の形成メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) トポ II は、核内足場画分に含まれることが知られているが、染色体構造に対する分子機能に関しては全く解明されていない。ATP を加水分解する活性を有し、そのエネルギーで DNA のトポロジーを変化させる酵素活性を持つが、この活性が核内足場としての機能に必要なのかも不明である。よって以下のような実験から、トポ II-クロマチンの相互作用様式の解明を目指す。

- (a) 再構成クロマチンファイバーにトポ II を加え、原子間力顕微鏡観察からその構造変化を明らかにする。(現在再構成に成功している 30 nm fiber よりも高次な構造の構築を目指す)
- (b) ATP 存在下/非存在下で、クロマチンとトポ II を混合し、その影響を調査する。
- (c) ゲノム高次構造再構成における DNA 配列特異性を調査するため MAR 配列 (matrix attachment region) を含む DNA を用いた再構成実験をおこなう。

(2) クロマチンは、コアヒストンのテール領域の転写後修飾 (アセチル化・リン酸化・メチル化) によっても、クロマチン高次構造は影響を受けるとされている。よって、テールの除去やアセチル化などの修飾を施したクロマチンを用いてその高次構造を調査し、さらに核内骨格を含めた高次構造への影響を調査する。

(3) 再構成実験から得られた成果を評価するため、細胞核内のクロマチン構造を原子間力顕微鏡により観察する手段を確立する。とりわけ、核内骨格とクロマチンの接着メカニズムを解明する手法の開発を目指す。

### 4. 研究成果

(1) 再構成クロマチンに対して核局在タンパク質 PC4 を加えた実験 (図 1) から、PC4 がクロマチン凝集能を有することを示し、発表論文①として発表した。PC4 は、転写活性制御を行なう因子であることが既に示されていたが、さらにクロマチンの凝集・非凝集を制御する因子でもあることを示した。本研究課題である、核内骨格とクロマチンの相互作用を調査する上で、クロマチンの凝集度に応じてその相互作用が変化するか否かを調査することは重要である。PC4 を用いて、転写不活性型の凝集型クロマチンを人為的に作成する実験系を確立したことは、本研究を推進する上で意義深いと思われる。

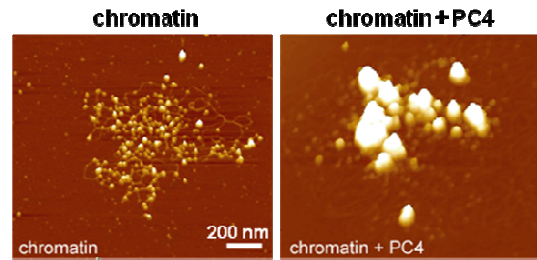


図 1. 106-kb のプラスミド上に再構成したヌクレオソームファイバー (左) と、PC4 の添加により形成されたヌクレオソームの凝集 (右) の原子間力顕微鏡観察像

(2) 核マトリクスタンパク質である SP120 を精製し、原子間力顕微鏡により観察した。また、抗 SP120 抗体を先端に結合させた探針を用いた原子間力顕微鏡観察を行ない、観察された構造が SP120 であることを確認した。更に、単離した細胞核を PML body を抗体染色し、原子間力顕微鏡と蛍光顕微鏡同時観察を行ない、その重ね合わせ画像の取得に成功した。(発表論文③)

(3) 試験管内再構成したクロマチンにトポ II を加え AFM で観察することにより、トポ II タンパク質にはクロマチンを凝縮させる活性が有ることを示し、その活性は、ヒストン H1 依存のかつ ATP 非依存であることを明らかにした (発表論文②、図 2)。再構成されたヒストン H1 依存性 30 ナノメートルファイバーが、トポ II の添加により、互いに絡まり合うように結合し、“クロマチンファイバーのループ状構造” が形成された。

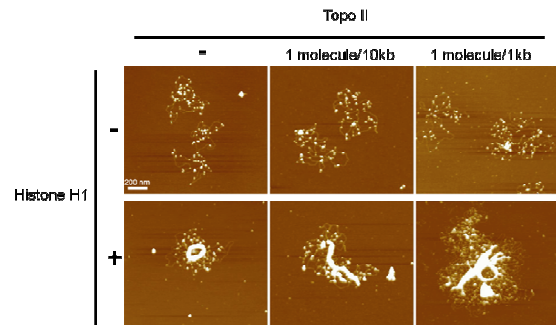


図 2 26-kb のプラスミド上に再構成したヌクレオソームファイバー (左上) および H1 添加により形成させた 30-nm ファイバー (左下)。トポ II タンパク質の添加に従い、30-nm ファイバーは凝集を形成するが (中下・右下)、ヌクレオソームファイバーは凝集を形成しない (中上・右上)

(4) テールを除去したテールレスヌクレオソームファイバーを試験管内再構成し、そのヌクレオソーム間の距離からヌクレオソーム間相互作用の強度を調査した。その結果、通常のヒストンよりもテールレスヒストンはヌクレオソーム間相互作用が比較的弱く

なっていることが検出された。

また、テールレスヒストンを用いた再構成実験では、リンカーヒストン H1 を加えても 30 nm ファイバーが形成されなかった。(図 3 左上) これらの結果は、ヒストンテールの荷電が直接的にクロマチン高次構造の形成に影響を及ぼすことを示唆している。(発表論文④)

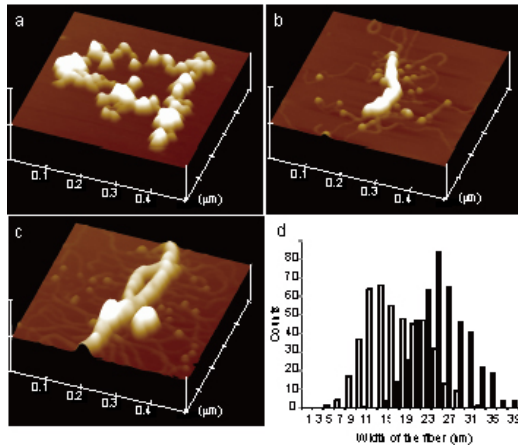


図 3. テールレスヒストン (左上)、アセチル化ヒストン (右上)、および通常のヒストンを用いて再構成したヌクレオソームファイバーに H1 を添加して再構成された構造の原子間力顕微鏡像。通常のヒストン再構成では 30-nm 幅のファイバーが形成されるが、アセチル化ヒストン再構成ではファイバー幅が 20-nm になり、さらにテールを除去した再構成ではファイバー構造は形成されなかった。右下は、測定されたアセチル化クロマチンファイバー (白棒) と通常のクロマチンファイバー (黒棒) の幅のヒストグラム。

(5) クロマチンは核内に安定に“固定”されていること、および、ヒストンテールの過剰なアセチル化がその“固定”からクロマチンを解放することが示唆された。すなわち、高塩溶液による溶解処理後も細胞核内にクロマチンは強固に結合しているが、ヒストンテールの過剰なアセチル化を誘導した細胞核からはクロマチンファイバーが容易に溶出しやすくなった。また、クロマチンファイバーの幅がアセチル化により細くなる様子も検出された。(投稿中)

#### 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 4 件)

- ① Das, C. \*, Hizume, K. \*, Batta, K., Kumar, B. R., Gadad, S. S., Ganguly, S., Lorain, S., Verreault, A., Sadhale, P. P., Takeyasu, K., et al. (2006). Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein,

induces chromatin condensation. **Mol Cell Biol** 26, 8303-8315. 査読有り (\*は共同筆頭著者)

- ② Hirano, Y., Takahashi, H., Kumeta, M., Hizume, K., Hirai, Y., Otsuka, S., Yoshimura, S. H., and Takeyasu, K. (2008). Nuclear architecture and chromatin dynamics revealed by atomic force microscopy in combination with biochemistry and cell biology. **Pflugers Arch** 456, 139-153. 査読有り
- ③ Hizume, K., Araki, S., Yoshikawa, K., and Takeyasu, K. (2007). Topoisomerase II, scaffold component, promotes chromatin compaction in vitro in a linker-histone H1-dependent manner. **Nucleic Acids Res** 35, 2787-2799. 査読有り
- ④ Hizume, K., Nakai, T., Araki, S., Prieto, E., Yoshikawa, K., and Takeyasu, K. (2009). Removal of histone tails from nucleosome dissects the physical mechanisms of salt-induced aggregation, linker histone H1-induced compaction and 30-nm fiber formation of the nucleosome array. **Ultramicroscopy** In Press, doi:10.1016/j.ultramicro.2009.1003.1014. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hizume K., Takeyasu K. Nucleosome dynamics in vitro studied by atomic force microscopy. 16th International Microscopy Congress at Sapporo (Sept. 2006) (シンポジウム口演)
- ② Hizume K., Araki S, Yoshikawa K, Takeyasu K and Yoshimura SH Nano-Scale Observation of Higher-Order Genome Structure Reconstituted from DNA and Chromosome Proteins. 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (Nov. 2008) (シンポジウム口演)
- ③ Hizume K., Nakai T, Araki S, Prieto E, Yoshikawa K, Takeyasu K. An insight into nucleosome-packing mechanisms obtained from chromatin reconstitution and nano-technology. The 48th annual meeting of the American Society for Cell Biology at San Francisco

(Dec. 2008) (ポスター発表)

[図書] (計3件)

- ① T.K Kundu, Dipak D 編 “Chromatin and Disease” Springer 社出版  
(分担) Page 3-28. : “ Structural organization of dynamic chromatin.”  
Hizume K, Yoshimura SH, Kumeta M, Takeyasu K.  
(2007年4月)
- ② Fukui K, Ushiki T 編 “Chromosome Nano-science and Technology” CRC Pr I Llc 社出版  
(分担) Page 117-134 : “Mechanisms of higher-order chromatin folding revealed by AFM observation of in vitro reconstituted chromatin.” Hizume K, Kobori T, Yoshimura S.H, Takeyasu K.  
(2007年10月)
- ③ Tamas S. Nemeth. 編 “Biopolymer Research Trends” Nova Science Publishers 社出版  
(分担) Page107-135 : “Biochemical and biophysical basis of genome folding mechanisms.” Kobori T, Hizume K, Ohniwa R.L, Yoshimura S.H, Takeyasu K.  
(2008年6月)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日詰 光治 (HIZUME KOHJI)  
京都大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：10378846

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし