

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370078

研究課題名(和文)ヌクレオソームイメージングを用いたヒトゲノムクロマチンの細胞内ダイナミクスの解析

研究課題名(英文)Dynamics of human genome DNA in living cells revealed by nucleosome imaging

## 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) 15,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、私たちの行った実験をはじめとするいくつかの研究によって、クロマチンは定説であった規則的な30 nmの構造を持たず、ヌクレオソーム線維が不規則に折りたたまれて構成されていることがわかってきた。この構造ではヌクレオソームは物理的な束縛を受けないため、よりダイナミックな状態であることが予想された。私たちは、ヌクレオソームの1分子イメージングにより、生きた動物細胞においてヌクレオソームが局所的にゆらいていることを発見した。このようなヌクレオソームのゆらぎはタンパク質のクロマチンへのアクセシビリティを向上させ、ゲノム情報が検索される際にきわめて重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genome information, which is three-dimensionally organized within cells as chromatin, is searched and read out by various proteins for diverse cell functions. Although how the protein factors find their targets remains unclear, the dynamic nature of chromatin is likely crucial. To pursue this dynamics, we investigated the movement of each nucleosome in the chromatin. It had been technically challenging to image single nucleosome, because a single cell has numerous nucleosomes ( $\sim 3 \times 10^7$ ). To fluorescently label a small number of nucleosomes, we fused PA-GFP (PhotoActivatable-GFP) to histone H4, and stably expressed the PA-GFP-H4 in the cells. From our analysis of the single nucleosome movement, we found a local fluctuation of individual nucleosomes. This local dynamic movement would be a basis of various genome events.

研究分野：細胞生物学 生物物理学

キーワード：ゲノム 遺伝学 核酸 生物物理

### 1. 研究開始当初の背景

全長2mにもおよぶヒトゲノムDNAは人体の設計図であり、ヒストンに巻かれてヌクレオソーム構造を作り、直径約10 $\mu$ mの細胞核のなかに折り畳まれている。教科書などでは、このヌクレオソーム構造は、折り畳まれて30nmクロマチン線維になり、さらにはらせん状に折り畳まれて階層構造を作るとされてきた。しかしながら私たちは、クライオ電子顕微鏡、X線散乱を用いた構造解析から、ほとんどの細胞には30nmクロマチン線維を含む規則的な階層構造は存在せず、ヌクレオソーム構造がとても不規則な形で、核内や染色体内に収納されていることを見出した。このことは、個々のヌクレオソームが規則的な構造として縛られず、ある範囲でダイナミックに動ける、つまり「ゆらぎ」をもつ可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

このようなヌクレオソームの「ゆらぎ」に基づく動きが、遺伝子の発現、DNA複製、染色体凝縮などのゲノム機能に重要な役割を果たしているのではないだろうか？本研究では、このことを実証するため、生細胞内のヌクレオソーム1分子の動きを直接イメージングする技術を開発し、ヒトゲノムクロマチンの細胞内ダイナミクスを明らかにすることを目的とした。

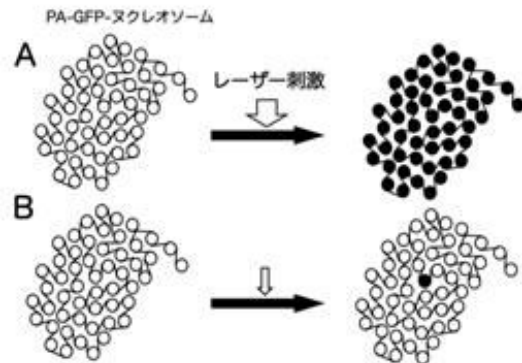
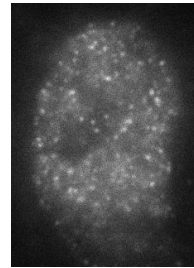


Fig. 1 The method of single nucleosome imaging using PA-GFP

### 3. 研究の方法

ヒトゲノムは $\approx 3 \times 10^9$ 塩基から成りたっている。およそ200bpに1つの割合でヌクレオソームが存在すると仮定すると、ヒト細胞の中には $\approx 3 \times 10^7$ 個にもおよぶヌクレオソームが存在する。ヌクレオソーム1分子をイメージングするためには、まず細胞内のごく少数のヌクレオソームを蛍光ラベルしなければならない。また、蛍光ラベルされたヌクレオソームをどのように観察するのかも問題であった。私たちはこれらの問題を克服するため、PA-GFP (photo-activated GFP)でラベルされたヒストンH4を、細胞内で極めて少量発現させることにした。通常PA-GFPヌクレオ

ソームは蛍光を持たない (Fig. 1A 左)。そして、405-nmレーザー刺激によって活性化され、蛍光を発するようになる (Fig. 1A 右)。通常の条件では、ほとんどすべてのPA-GFPヌクレオソームが活性化してしまい、多量のPA-GFPヌクレオソームが塊として観察されるため、1個1個のヌクレオソームを区別できない。しかしながら、非常に微量のレーザー



を細胞に照射すると、少数のヌクレオソームだけを蛍光ラベルすることが可能となり (Fig. 1B)、1個1個のヌクレオソームが観察できるようになると考えた。具体的な研究手順は以下の通りである。

Fig. 2 Single nucleosome particles in a fixed nucleus

### (1) 低発現 PA-GFP-ヒストン H4 コンストラクトの作製と PA-GFP-H4 安定発現細胞の作製

PA-GFP-H4の低発現のため、通常用いられるCMVなどのウィルスプロモーターではなく、ヒトの内在性の弱いプロモーターを用いることが望ましい。このため、ヒトCdk1プロモーターをもちいて、発現コンストラクトを構築した。そして細胞のゲノムDNAに部位特異的組み換えを用いて、コンストラクトを組み込み、安定発現細胞株を作製した。

### (2) 固定した PA-GFP-H4 安定発現細胞での1分子観察

1分子観察には、徳永らが考案した細胞核内の1分子観察に適した斜光照明の顕微鏡システム (Tokunaga et al., Nat. Methods, 2008)を用いた。はじめに固定したPA-GFP-H4安定発現細胞株を利用して、測定検討を行った。幸運なことに、私たちは、405nmのレーザー刺激を行わなくても、PAGFP-H4の輝点を観察できることを見出した (Fig. 2)。おそらく、多数のPA-GFP-H4のうち、ごく少数は自然偶発的にPA-GFPが活性化したと考えられる。このようにして、固定した細胞を用いて観察条件を決定した。

### 4. 研究成果

### (3) PA-GFP-H4 安定発現細胞のライブ観察

固定細胞で決定した測定条件に基づき、生きた細胞で1分子観察を行った。1個1個のヌクレオソームの動きをトラッキングし、データを集めた (Fig. 3)。

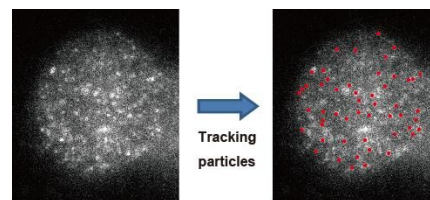


Fig. 3 Single particle tracking

この際、毎秒 30 フレームのビデオレートで撮影し、可能な限りヌクレオソームの速い動きに対応させた。この方法で得られた核内および分裂期染色体内のヌクレオソーム 1 分子の動きを、計算機ソフトである MatLab を用いたソフトウェア PolyparticleTracker でトラッキングし、動いた距離を算出してその分布図を作製した(Fig. 4)。

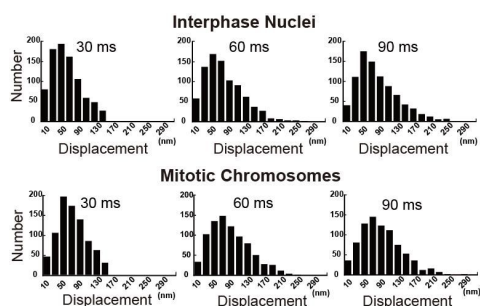


Fig. 4 Single nucleosome movement in living cells

PAGFP-H4 を利用することで、ヌクレオソームのふるまいを、個別にトラッキングすることが可能となった。生細胞の間期クロマチンと分裂期染色体でのヌクレオソームの平均移動距離を Fig. 4 に示した。アルデヒドで強力にヌクレオソームを架橋した場合と比較して、ヌクレオソームの移動距離は非常に大きかった。このことから、検出した生細胞におけるヌクレオソームの動きは、顕微鏡の検出系の揺らぎや測定誤差によるものではないと確認できた。また、生細胞の 30 ミリ秒間でのヌクレオソームの平均移動距離は、50nm 以上であり、30 nm よりも大きかった。これらの結果は、従来存在すると言われていた規則的な 30 nm クロマチン線維が細胞内でほとんど存在しないことを、支持するものと考えている。

このヌクレオソームのゆらぎ (Local movement) は、エネルギーに依存しない動きであるため、細胞の様々な機能にとって非常に重要であると考えられる (Fig. 5)。例えば、このゆらぎを抑制すると、タンパク質のクロマチンへのアクセスビリティやターゲティングが低下する。このようなクロマチンへのアクセスビリティやターゲティングは細胞の基本反応を支えるものであるため、このヌクレオソームのゆらぎは、DNA 修復や複製、遺伝子発現、染色体の形成において、原動力となっていると考えられる。

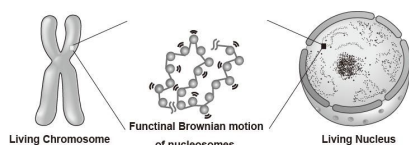


Fig. 5 クロマチンのゆらぎ

## 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 7 件)

1. Nozaki, T., Kaizu, K., Pack, C.G., Tamura, S., Tani, T., Hihara, S., Nagai, T., Takahashi, K., Maeshima, K. Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells. *Nucleus* (2013) 4, 349 - 356

doi: 10.4161/nucl.26053 査読 有り

2. 野崎慎、前島一博「30nm クロマチン線維は存在しない!」*化学と生物* (2013) 51, 177-182 平成 25(2013) 年 3 月 1 日 査読 有り

3. Shang, W.H., Hori, T., Martins, N.M., Toyoda, A., Misu, S., Monma, N., Hiratani, I., Maeshima, K., Ikeo, K., Fujiyama, A., Kimura, H., Earnshaw, W.C., and Fukagawa, T. Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres. *Dev Cell* (2013) 24, 635-48.

doi: 10.1016/j.devcel.2013.02.009. 査読 有り

4. 前島一博, 城地保昌, 西野吉則, 高田英昭, 鎌田福美, 日原さえら「ヒトゲノム DNA の不規則で柔軟な収納原理」*生物物理*(2013) 53, 4-10 平成 25(2013)年 1 月 25 日 査読 有り

5. 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. Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells. *Cell Reports* (2012) 2, 1645-1656.

doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.008 査読 有り

6. Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., Maeshima, K. Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* (2012) 3(5), 404-410.

doi: 10.4161/nucl.21222 査読 有り

7. Nishino, Y, Eltsov, M, Joti, Y, Ito, K, Takata, H, Takahashi, Y, Hihara, S, Frangakis, AS, Imamoto, N, Ishikawa, T, Maeshima, K. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* (2012) 31(7), 1644-53.

doi: 10.1038/emboj.2012.35. 査読 有り

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Kazuhiro Maeshima “Chromatin structure and dynamics in live mammalian cells” 2nd International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, Hiroshima University, Hiroshima, 3/10-3/11, 2014

2. 前島一博「細胞のなかでゆらぐクロマチン」第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ オーガナイザー・講演「遺伝子発現のゆらぎ・学習の動作原理を測る・導く」, 神戸ポートピアホテル、ポートアイランド、神戸、12/04, 2013

3. Kazuhiro Maeshima “Chromatin Structure and Dynamics in Living Mammalian Cells”, Workshop on "modeling of biomolecular systems in cellular environments", Science Seminar House, Kyoto University, Kyoto, 10/31, 2013.

4. Kazuhiro Maeshima “How is nucleosome fiber organized in the cell?”第51回日本生物物理学会シンポジウム、国立京都国際会館、京都10/29/2013

5. 前島一博、野崎慎 「細胞のなかの「ゆらぐ」クロマチン」第65回日本細胞生物学会シンポジウム「少数要素の分子反動的視点から細胞生物学的現象を理解する試み」, ウィンクあいち(愛知県産業労働センター)、名古屋、6/20, 2013

6. Kazuhiro Maeshima, Tadasu Nozaki, Tamomi Tani, Sachiko Tamura, Saera Hihara, Takeharu Nagai, "Flexible and dynamic nucleosome fiber in living mammalian cells" Workshop on the 4D Nucleome: Functional Nuclear Organization in Space and Time, 6/12-15, 2013, Mainz, Germany

7. Kazuhiro Maeshima, Tadasu Nozaki, Tamomi Tani, Sachiko Tamura, Saera Hihara, Takeharu Nagai, "Local structural similarity between interphase chromatin and mitotic chromosomes in living mammalian cells" Gordon Research Conference on Chromosome Dynamics, 5/26-31, 2013, Lucca (Barga), Italy

8. Kazuhiro Maeshima “How is a long strand of DNA organized in the cells?” Lorentz Center Workshop “Genome Mechanics at the Nuclear Scale”, Leiden University, Leiden, Netherlands, 12/10-12/14, 2012

9. Kazuhiro Maeshima “Human genome organization and dynamics” 第50回日本生物物理学会年会 シンポジウム 名古屋大学東山キャンパス、名古屋9/22-9/24, 2012

10. 前島一博「分裂期染色体におけるDNAの収納」日本人類遺伝学会 第19回臨床細胞遺伝学セミナー 東京慈恵会医科大学、東京、8/25, 2012

11. 前島一博 「生きた細胞の動的クロマチン構造」第1回細胞環境の測定とモデリングワークショップ

プ(第4回 JSBi 応用システムバイオロジー研究会) 独立行政法人理化学研究所計算科学研究機構、ポートアイランド、神戸 11/7, 2011

12. Kazuhiro Maeshima Yoshinori Nishino, Yasumasa Joti, Kazuki Ito, Mikhail Eltsov, Tetsuya Ishikawa ”How is a long strand of genomic DNA organized into chromosome?” 第49回日本生物物理学会年会、兵庫県立大学、姫路、兵庫 9/16-9/18, 2011

13. Kazuhiro Maeshima ”Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without the 30-nm chromatin fiber” Gordon Research Conference: Chromosome Dynamics, Mount Snow Resort, VT, USA, 7/10-7/15, 2011

14. Kazuhiro Maeshima “How is a Long Strand of DNA Compacted into a Chromosome?” Albany 2011: 17<sup>th</sup> Conversation, Albany, SUNY, NY, USA, 6/14-6/19, 2011

15. Kazuhiro Maeshima ”Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without the 30-nm chromatin fiber” Bauer Forum, FAS Center for Systems Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA, 6/8, 2011

## 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