

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291067

研究課題名(和文)核内構造ダイナミクスを司る染色体相互作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of chromatin interaction responsible for subnuclear dynamics

## 研究代表者

松永 幸大 (Matsunaga, Sachihiro)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号：40323448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：染色体の特異的領域を、lacO/LacI配列を導入して構築したクロマチン可視化ラインを用いて、生きた細胞内で4次元イメージングにより可視化解析ができた。これにより、固定細胞の細胞核を材料にした従来の解析では得られなかった染色体相互作用の動態情報を取得した。染色体相互作用の制御因子としてクロマチンリモデリング因子RAD54を同定し、核内構造の動態制御メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to reveal the dynamics of chromatin in nuclei. We successfully performed four-dimensional live-cell imaging using lacO/LacI inserted visualization lines. Based on this system, we could get dynamic data of chromatin-interaction in the nucleus of living cells. We identified a chromatin remodeling protein RAD54 as a regulator responsible for chromatin interaction and revealed a part of molecular mechanism in subnuclear chromatin dynamics.

研究分野：生命動態学

キーワード：クロマチン 核内構造

### 1. 研究開始当初の背景

個々の染色体 DNA ごとに高度に区画化された領域から細胞核構造が成り立っていると考えられている。この染色体テリトリー仮説は、固定細胞を用いた蛍光 *in situ* hybridization (FISH)法や次世代シーケンサーによる Hi-C 法(ゲノムをクロスリンクさせて近接した DNA 配列を決定する DNA インタラクトーム解析)により実証されつつある。これにより、染色体は凝縮する前から一定の構造を細胞核中に保ち相互作用することが明らかになった。

### 2. 研究の目的

染色体の特異的領域を、生きた細胞内で 4 次元高精細ライブセルイメージング法を用いて可視化する。これにより、固定細胞の細胞核を材料にした従来の解析では得られなかった染色体相互作用の動態情報を取得する。この情報を基に、染色体相互作用に立脚した核内構造の動態制御メカニズムを明らかにする。また、申請者らが発見した染色体相互作用を制御する因子を突破口に、核内構造ダイナミクスの分子メカニズムを明らかにすることで、染色体相互作用の重要性を明らかにし、核内構造ダイナミクスの意義を明確にする。

### 3. 研究の方法

*IacO/LacI* システムによる染色体特異的領域の可視化ラインを構築し、4 次元ライブセルイメージングにより染色体相互作用の動態情報を得た。次に、主要器官の発生・分化段階ごとに取得した染色体相互作用の動態データを解析した。また、染色体相互作用の制御タンパク質を同定した。

#### (1) *IacO/LacI* システムによる染色体領域特異的可視化ラインの構築

器官や組織を生きたまま染色体特異的領域の DNA を可視化するために、*IacO/LacI* 配列をシロイヌナズナに形質転換した。挿入部位を PCR で同定して各染色体の短腕、長腕部位に挿入されたラインを確立した。ヘテロクロマチン領域への挿入や染色体位置効果によるサイレンシングが起こり、蛍光が生じない可能性があるため、多くのラインを確立して、次世代に安定的に蛍光がイメージングできるラインを選抜した。また、ライブセルイメージングは、申請者が保有する高精細 4D ライブイメージング顕微システムを活用した。

#### (2) 染色体相互作用ライブセルイメージング

構築した染色体領域特異的可視化ラインを使用して、シロイヌナズナの根・葉・茎などの主要器官の発生・分化段階ごとに、*lac* シグナルの動態を高精細 4D ライブイメージングシステムにより解析した。根の分裂領域と伸長領域で *lac* シグナル間の距離が異なり、そ

の距離が振動しながら変化していることが示された。染色体相互作用の時空間特異的な動態情報を取得した。

#### (3) 染色体相互作用制御因子の変異体を用いた解析

シロイヌナズナの変異体を収集し、染色体特異的領域可視化ラインと交雑して、イメージング解析を実施した。この解析を通じて、染色体相互作用の動態周期、速度、局在性など、各パラメーターを制御している因子を同定した。各器官特異的に染色体相互作用を制御している因子の同定も進め、その変異体の表現型から、発生・分化における染色体相互作用の重要性を明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) *IacO/LacI* 配列導入ラインによる相同染色体座の可視化

シロイヌナズナに *IacO/LacI* 配列を導入して構築したクロマチン可視化ラインを用いて、生きている植物細胞における染色体の動きを、蛍光タンパク質を用いて詳細に解析しました。具体的には、クロマチン蛍光タグシステムという染色体の一部を可視化する技術を用いて、相同な染色体座の距離に着目した解析を行いました(図1)。その結果、普通の状態では相同染色体は細胞核内において一定の長さを保って離れていました。しかし、放射線を照射したところ、相同染色体が接近しました。このように、染色体相互作用をライブイメージングで捉えることに成功しました(Hirakawa et al. 2015)。さらに、RAD54 というクロマチンリモデリング因子がなくなった変異体では、放射線を照射しても相同染色体の接近はみられませんでした。従って、*IacO/LacI* 配列導入ラインによる相同染色体座の可視化ラインを用いて、染色体の特定領域の相互作用を制御する因子を特定することができました。



図1: 本研究で使用した染色体の可視化システムについて  
 a. クロマチン蛍光タグシステム、*IacO/LacI*-EGFPシステムの概略図。このシステムが導入された生物では、染色体の一部に蛍光タンパク質が局在するようになるため、その染色体領域が可視化される  
 b. *IacO/LacI*-EGFPシステムが導入されたシロイヌナズナの根。一つの細胞核からは、相同な染色体座に由来する2つのドット状のシグナルが検出される

#### (引用文献)

Hirakawa, T., Katagiri, Y., Ando, T. and Matsunaga, S. (2015) DNA double-strand breaks alter the spatial arrangement of homologous loci in plant cells. *Sci. Rep.*, 5, 11058.

#### (2) クロマチンリモデリング因子 RAD54 の解析

クロマチンリモデリング因子は、クロマチンからヒストンタンパク質の除去やヒストン

修飾の変化を介して、クロマチン動態をダイナミックに変化させます。そこで、RAD54 を緑色蛍光タンパク質 EYFP で標識したシロイヌナズナ形質転換株を作製し、細胞内局在を観察しました。その結果、RAD54 は細胞核に局在しており、DNA 二本鎖切断を誘導する放射線を照射したところ、細胞核内でドット状の構造体を形成しました。この構造体を「RAD54 フォーサイ」と名付けました (Hirakawa et al. 2017)。この RAD54 フォーサイは細胞核内のクロマチン相互作用に重要な役割を果たしていることがわかりました。

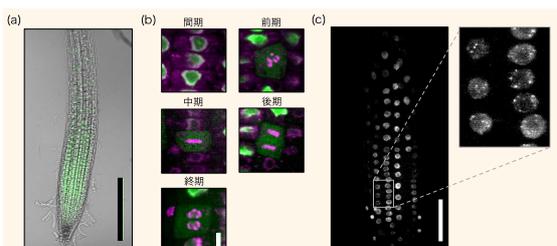


図2. シロイヌナズナRAD54の発現様式と放射線照射後の局在 (a) RAD54は根において特に根端分裂領域で発現している。(b) RAD54は間期細胞核に局在しており、分裂期染色体上には観られない(緑: RAD54、紫: DNA)。(c) 放射線照射によりRAD54は細胞核内でドット状の構造を形成する。スケールバー (a) 300 μm, (b) 5 μm, (c) 50 μm

#### (引用文献)

Hirakawa, T., Hasegawa, J., White, C and Matsunaga, S. (2017) RAD54 forms DNA repair foci in response to DNA damage in living plant cells. *Plant J.*, 90, 372-382.

#### (3) 国内外へのインパクトと今後の展望

放射線を含む環境ストレス応答時に、植物の染色体相互作用が変化することを明らかにした初めての報告例となり国内外にインパクトを与えました。クロマチンリモデリング因子である RAD54 のフォーサイ形成機構を調べることで、DNA 損傷応答におけるクロマチン構造変化や染色体相互作用の制御メカニズムの一端が解明されることが考えられます。RAD54 フォーサイは、検出に特殊な実験手法を必要としないため、植物のストレス応答能を評価する上で有用な指標となることが期待されます。

#### 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 19 件)

(1) Hirakawa, T., Hasegawa, J., White, C and Matsunaga, S. RAD54 forms DNA repair foci in response to DNA damage in living plant cells. *Plant J.*, 査読有, 90, 2017, 372-382.

DOI: 10.1111/tpj.13499

(2) Fujimoto, S. and Matsunaga, S. Chromatin live imaging with genome editing techniques: switching from scissors to a lamp. *Cytologia*, 査読有, 81, 2016,

359-362.

DOI: 10.1508/cytologia.81.359

(3) Takagi, M., Sakamoto, T., Suzuki, R., Nemoto, K., Obayashi, T., Matsunaga, T. M., Hirakawa, T., Kurihara, D., Nariai, Y., Urano, T., Sawasaki, T., Matsunaga, S. Plant Aurora kinases interact with and phosphorylate transcription factors. *J. Plant Res.*, 査読有, 129, 2016, 1165-1178.

DOI: 10.1007/s10265-016-0860-x

(4) Fujimoto, S., Sugano, S. S., Kuwata, K., Osakabe, K. and Matsunaga, S. Visualization of specific repetitive genomic sequences with fluorescent TALEs in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 査読有, 67, 2016, 6101-6110.

DOI: 10.1093/jxb/erw371

(5) Fujimoto, S. and Matsunaga, S. Which is a reliable approach in the generation of artificial minichromosomes, bottom-up or top-down? *Cytologia*, 査読有, 81, 2016, 251-256.

DOI: 10.1508/cytologia.81.251

(6) Fujimoto, S., Matsunaga, S. and Murata, M. Mapping of T-DNA and Ac/Ds by TAIL-PCR to analyze chromosomal rearrangements. *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 1469, 2016, 207-216.

DOI: 10.1007/978-1-4939-4931-1\_17.

(7) Hirakawa, T. and Matsunaga, S. Three dimensional, live-cell imaging of chromosome dynamics in plant nuclei using chromatin tagging systems. *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 1469, 2016, 189-195.

DOI: 10.1007/978-1-4939-4931-1\_15.

(8) Yokoyama, R., Hirakawa, T., Hayashi, S., Sakamoto, T. and Matsunaga, S. Dynamics of plant DNA replication based on PCNA visualization. *Sci. Rep.*, 査読有, 6, 2016, 29657.

DOI: 10.1038/srep29657

(9) Hirakawa, T. and Matsunaga, S. Chromatin tagging systems contribute to live imaging analyses for chromatin dynamics. *Cytologia*, 査読有, 81, 2016, 121-123.

DOI: 10.1508/cytologia.81.121

(10) Matsunaga, S. FISH is in the limelight again as more a cytogenetical technique for metaphase chromosomes. *Cytologia*, 査読有, 81, 2016, 3-6.

DOI: 10.1508/cytologia.81.3

(11) Katagiri, Y., Hasegawa, J., Fujikura, U., Hoshino R., Matsunaga, S. and Tsukaya, H. The coordination of ploidy and cell size differs between cell layers in leaves. *Development*, 査読有, 143, 2016, 1120-1125.

DOI: 10.1242/dev.130021

(12) Sotta, N., Shantikumar, L., Sakamoto, T., Matsunaga, S. and Fujiwara, T. TPR5 is involved in directional cell division and is essential for the maintenance of meristem cell organisation in *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot., 査読有, 67, 2016, 2401-2411.  
DOI: 10.1093/jxb/erw043

(13) Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S. and Matsunaga, S. Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. Plant Cell Physiol., 査読有, 57, 2016, 462-472.  
DOI: 10.1093/pcp/pcw027

(14) Izaguirre-Carbonell, J., Kawakubo, H., Murata, H., Tanabe, A., Takeuchi, T., Kusayanagi, T., Tsukuda, S., Hirakawa, T., Iwabata, K., Kanai, Y., Ohta, K., Miura, M., Sakaguchi, K., Matsunaga, S., Sahara, H., Kamisuki, S., and Sugawara, F. Novel anticancer agent, SQAP, binds to focal adhesion kinase and modulates its activity. Sci. Rep., 査読有, 5, 2015, 15136.  
DOI: 10.1038/srep15136

(15) Oroguchi, T., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Masaki, Y., Fukuda, A., Hashimoto, S., Nakasako, M., Ichikawa, I., Kurumizaka, H., Shimizu, M., Inui, Y., Matsunaga, S., Kato, T., Namba, K., Yamaguchi, K., Kuwata, K., Kameda, H., Fukui, N., Kawata, Y., Kameshima, T., Takayama, Y., Yonekura, K., Yamamoto, M. Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging for biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA. J. Phys. B., 査読有, 48, 2015, 184003.  
DOI: 10.1088/0953-4075/48/18/184003

(16) Hirakawa, T., Katagiri, Y., Ando, T. and Matsunaga, S. DNA double-strand breaks alter the spatial arrangement of homologous loci in plant cells. Sci. Rep., 査読有, 5, 2015, 11058.  
DOI: 10.1038/srep11058.

(17) Takayama, Y., Inui, Y., Sekiguchi, Y., Kobayashi, A., Oroguchi, T., Yamamoto, M., Matsunaga, S., and Nakasako, M. Coherent X-ray diffraction imaging of chloroplasts from Cyanidioschyzon merolae by using X-ray free electron laser. Plant Cell Physiol., 査読有, 56, 2015, 1272-1286.  
DOI: 10.1093/pcp/pcv032

(18) Hasegawa, J., Higaki, T., Hamamura, Y., Kurihara, D., Kutsuna, N., Higashiyama, T., Hasezawa, S. and Matsunaga, S. Increase in invaginated vacuolar membrane structure caused by plant cell expansion by genotoxic stress induced by DNA double-strand breaks. Cytologia, 査読有,

79, 2014, 467-474.

DOI: 10.1508/cytologia.79.467

(19) Sano, Y., Watanabe, W. and Matsunaga, S. Chromophore-assisted laser inactivation - towards a spatiotemporal-functional analysis of proteins, and the ablation of chromatin, organelle and cell function. J. Cell Sci., 査読有, 127, 2014, 1621-1629.

DOI: 10.1242/jcs.144527

[学会発表] (計11件)

(1) Sachihiro Matsunaga, et al. Live imaging of epigenetic modifications in plant cells, International Symposium on Environmental Stress Adaptation & Memory in Plants, 2017年2月27日, 1F Hall, Main Office Building, RIKEN Yokohama Campus (神奈川県横浜市)

(2) Sachihiro Matsunaga, et al. Nuclear Dynamics in Plants, International Symposium on Nuclear Dynamics in Plants (supported by JSPS and MEXT), 2016年11月16日, 東京理科大学野田キャンパス (千葉県野田市)

(3) 松永幸大 他, クロマチン・ライブイメージングへの挑戦, 日本植物学会第80回大会, 2016年9月16日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

(4) 松永幸大 他, ゲノム編集を用いたクロマチン・ライブイメージング, 第57回日本植物生理学会年会, 2016年3月20日, 岩手大学 上田キャンパス (岩手県盛岡市)

(5) 松永幸大 他, 蛍光ライブイメージングと超解像顕微鏡による生命動態学研究の最先端, 第29回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム, 2016年1月11日, 柏の葉カンファレンスセンター (三井ガーデンホテル柏の葉) (千葉県柏市)

(6) 松永幸大 他, DNA損傷応答時の細胞核内における相同染色体座ダイナミクス, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月4日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(7) Sachihiro Matsunaga, et al. Good job, FISH! The time has come for chromatin-visualization with genome editing., 日本遺伝学会第87回大会, 2015年9月25日, 東北大学 川内北キャンパス (宮城県仙台市)

(8) Sachihiro Matsunaga, et al. Studies of dynamic chromatin in plants, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13日, 金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館 (石川県金沢市)

(9) 松永幸大 他, クロマチン・イメージングによる細胞遺伝学の新展開, 日本植物学会第78回大会, 2014年9月13日, 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)

(10) 松永幸大 他, 環境刺激による核内ク

ロマチンのダイナミクス制御, 日本植物学会第78回大会, 2014年9月12日, 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)

(11) Sachihiro Matsunaga, et al. Chromatin dynamics during interphase nuclei in roots of *Arabidopsis thaliana* and tobacco BY-2 cultured cells, Plant Genome Stability and Change 2014, 2014年7月19日, Asilomar Conference Center, Pacific Grove California, USA

[図書] (計8件)

(1) Sakamoto, T., Sakamoto, Y. and Matsunaga, S. Cell division and cell growth. “Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells” edited by Ray Rose. CRC press (Florida, USA), 2016, 86-98.

(2) Noguchi, T., Matsunaga, S. and Hayashi, Y. The endoplasmic reticulum, Golgi apparatuses, and endocytic organelles. “Atlas of Plant Cell Structure” edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 89

(3) Matsunaga, S. Nuclei and chromosomes. “Atlas of Plant Cell Structure” edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 1.

(4) Takagi, M. and Matsunaga, S. Asymmetric cell division forms endodermis and cortex in a root of *Arabidopsis thaliana*. “Atlas of Plant Cell Structure” edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 200-201.

(5) Kurihara, D. and Matsunaga, S. Kinetochore and microtubule dynamics during cell division of tobacco BY-2 cells by live-cell imaging. “Atlas of Plant Cell Structure” Springer, edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 16-17.

(6) Matsunaga, S. and Ito, M. Endomitosis induces a giant polyploidy cell on the leaf epidermis. “Atlas of Plant Cell Structure” edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 22-23.

(7) Matsunaga, S. and Ito, M. Endomitosis induces a giant polyploidy cell on the leaf

epidermis. “Atlas of Plant Cell Structure” edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 22-23.

(8) Hasegawa, J. and Matsunaga, S. Morphology of nucleoli in tobacco BY-2 cultured cells. “Atlas of Plant Cell Structure” edited by Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I. and Hayashi, Y. Springer (Tokyo Heidelberg New York Dordrecht London), 2014, 4-5.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ

<http://www.rs.tus.ac.jp/sachi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松永 幸大 (Matsunaga Sachihiro)  
東京理科大学・理工学部・教授  
研究者番号 : 40323448

### (2) 研究連携者

坂本 卓也 (Sakamoto Takuya)  
東京理科大学・理工学部・助教  
研究者番号 : 40637691