慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	高解像手法を用いた生細胞におけるクロマチンドメインの解析
Sub Title	
Author	野崎, 慎(Nozaki, Tadasu)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2012
Jtitle	生命と情報 No.19 (2012.) ,p.45- 50
JaLC DOI	
Abstract	真核生物において, クロマチン構造は転写, 複製, 細胞周期など, 様々な細胞機能に関わる重要な要素である。ヒトゲノムDNAの長さは2mに達することが知られており, 直径10μmの核や太さ700nmの染色体にどのように梱包されているのかということは長くの間議論されてきた。クロマチンの構造モデルとして, 30nmクロマチン線維モデルが支持されてきたが, 近年のX線構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた研究により, 一般的に30nmクロマチン線維構造は存在しないことが示された。そして, 新しいクロマチン構造のモデルとして, 不規則にクロマチンが凝集し, クロマチンドメインと呼ばれる塊を形成するirregular foldingモデルが提唱されている。これらの研究結果を踏まえ, クロマチン構造を明らかにするために, 本研究では薄層斜光照明法を用いて生細胞内におけるヌクレオソームの観察を行った。まず, 間期の核においてヌクレオソームの分布を観察したところ, その分布はランダムではなく, 空間的な偏りを持つことが示された。さらに, 分裂期においても同様の結果を得ることができた。 このヌクレオソームの空間的な偏りはヌクレオソームが凝集して存在し, クロマチンドメインを形成していることを示している。更なる詳細な解析を行った結果, 間期と分裂期においてクロマチンドメインの大きさはあまり変化せず, その代わりにドメイン間の距離が変化していることが示された。これらの結果から, クロマチンドメインは保持されつつ, ドメイン間の距離が変化することによって間期から分裂期へのクロマチン凝縮が起きる染色体形成の新しいモデルを提案した。生細胞における1分子レベルの大規模なヌクレオソーム観察は初めてであり, これからのクロマチン研究に貢献することが期待される。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2012年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000019-0045

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

高解像手法を用いた生細胞におけるクロマチンドメインの解析

政策・メディア研究科 修士課程2年
野崎 慎

要旨

真核生物において，クロマチン構造は転写，複製，細胞周期など，様々な細胞機能に関わる重要な要素である．ヒトゲノムDNAの長さは2 mに達することが知られており，直径10 μmの核や太さ700 nmの染色体にどのように梱包されているのかということは長くの間議論されてきた．クロマチンの構造モデルとして，30 nmクロマチン線維モデルが支持されてきたが，近年のX線構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた研究により，一般的に30 nmクロマチン線維構造は存在しないことが示された．そして，新しいクロマチン構造のモデルとして，不規則にクロマチンが凝集し，クロマチンドメインと呼ばれる塊を形成するirregular foldingモデルが提唱されている．これらの研究結果を踏まえ，クロマチン構造を明らかにするために，本研究では薄層斜光照明法を用いて生細胞内におけるヌクレオソームの観察を行った．まず，間期の核においてヌクレオソームの分布を観察したところ，その分布はランダムではなく，空間的な偏りを持つことが示された．さらに，分裂期においても同様の結果を得ることができた．このヌクレオソームの空間的な偏りはヌクレオソームが凝集して存在し，クロマチンドメインを形成していることを示している．更なる詳細な解析を行った結果，間期と分裂期においてクロマチンドメインの大きさはあまり変化せず，その代わりにドメイン間の距離が変化していることが示された．これらの結果から，クロマチンドメインは保持されつつ，ドメイン間の距離が変化することによって間期から分裂期へのクロマチン凝縮が起きる染色体形成の新しいモデルを提案した．生細胞における1分子レベルの大規模なヌクレオソーム観察は初めてであり，これからのクロマチン研究に貢献することが期待される．

[キーワード]
クロマチン構造，クロマチンドメイン，ヌクレオソーム，染色体，イメージング

1. 序論

生命が誕生してから38億年の間，生命の設計図であるゲノムは受け継がれてきた．ほとんどの生物の場合，ゲノムの本態はDNAである．我々ヒトの体は約60兆個の細胞からできており，これらの細胞はもともと1個の細胞，受精卵に由来する．2の46乗が約70兆であることから，1個の細胞が約46回分裂すると我々の体の細胞数に匹敵することが推測される．そして，1個のヒト細胞には全長約2 mにも達するゲノムDNAが収められている．この巨大な分子を間期においては直径10-20 μmの核に，分裂期においては直径700 nmの染色体に折り畳まなければならない．DNAは太さ2 nmの"ヒモ"であるが，このような巨大な"ヒモ"をどのようにして小さな核や染色体に折り畳んでいるのだろうか．

DNAは核酸の一種であり，負に帯電されている．そのためお互いが反発し合いそのまま密にまとめることは困難である．そこで，正に帯電している塩基性のヒストンと呼ばれるタンパク質に巻き付くことで，この反発を多少打ち消すことができる．真核生物においては，このヒストンタンパク質の周りにDNAが巻き付くことにより，ヌクレオソームという線維構造を形成する．ヌクレオソームは，"beads on a string"とも呼ばれ，糸巻きに似たヒストンの周りにヒモのようなDNAが巻き付いているような構造を形成する．このヒストンタンパク質はH2A，H2B，H3，H4といった4種類のタンパク質が2個ずつそれぞれ集まることによって形成される．このヒストンに150 bpのDNAが巻き付くことで直径約11 nmのヌクレオソーム線維を形成し，リンカーと呼ばれる約50 bpのDNA配列を挟みながら周期的な構造を形成している [1]．このヒストンタンパク質のヒストンテールという部分に起きるメチル化やアセチル化などの修飾は，エピジェネティクスと呼ばれる塩基配列の変化を伴わずに，後天的な修飾によって制御を行う一群に関わっている．

更なる高次構造を考えたとき，核内や染色体内でヌクレオソームはどのように束ねられているのだろうか．ヌクレオソームや結合タンパク質の集合によって形成されるのがクロマチン構造である．このクロマチンがどのような構造であるかということは長くの間議論が続けられてきた．ゲノムDNAは生命における情報リソースであるが，そのリソースを活用するためには，情報を読み出す必要がある．転写因子や複製開始タンパク質がゲノムDNA上の情報をどのように探索し，読み出すのだろうか．これは，クロマチン構造が，転写や複製などの細胞内における主要なプロセスと密接に関連していることを示している．このため，クロマチン構造を明らかにすることは，様々な生命研究のために重要なことである．

分裂においてゲノムDNAは複製し，2倍になる必要がある．複製された長いDNAを2個の細胞に分配するためには，DNAの絡み合いを防ぎ，分離時における物理的な衝撃に耐える必要がある．そのため，DNAがコンパクトに凝縮されることなく分配してしまうと，DNAが絡まったり，切れたりしてしまう．この分裂期において，ゲノムDNAが凝縮することにより現れる構造体が分裂期染色体である．染色体を表す"chromosome"という名はギリシャ語に由来し，英語では"color body"を意味する．その名の通り，染色体は細胞内において非常によく染色され，観察することが容易である．しかし，このような分裂期染色体がどのようにして形成されるのかというのは未だ明らかではない．間期では，このような棒状の染色体構造を観ることはできないが，分裂期においては明確に観ることができる．このようなクロマチン構造の動的な変化はどのようにして起きるのだろうか．そもそも，間期におけるクロマチン構造と分裂期染色体におけるクロマチン構造は大きく異なっているのだろうか．このようなことから，染色体構造は100年以上にわたり生物学者たちの興味を集めてきた．間期のクロマチン構造と分裂期染色体のクロマチン構造の相違を明らかにすることが，分裂期染色体形成の謎を解く足がかりになると考えられる．

上述したようにクロマチン構造は，真核生物における転写，複製，分化，分裂などの細胞機能と関わりが深く，その理解は重要である．30年以上の間，クロマチン構造は30 nmクロマチン線維というモデルが定説化していたが，2000年代後半からの取り組みにより，新しいモデルが構築されつつある．このクロマチン構造の見直しにより，分裂期染色体形成の本質を明らかにできるの

ではないかという期待が高まっている．本研究では，生細胞におけるクロマチン構造について，1ヌクレオソームレベルの観察によって明らかにする．そして，間期から分裂期への移行の際に起きるクロマチンの動的な構造変化に関する新しいモデルを提案する．

現在，クロマチン構造に関する認識が大きく変わりつつある．従来のクロマチン線維モデルが，30 nm線維構造を基としているのに対し，新しいirregular foldingモデルやフラクタルグロビュールモデルはクロマチンドメインやグロビュールと呼ばれるヌクレオソームが不規則に集合して形成される塊 (小球) を基にしている．このような構造は生細胞内において観察可能なのだろうか．生細胞においてこれらのヌクレオソームの塊が観察された例は無い．また，irregular foldingモデルのような新しいモデルから分裂期染色体形成の新しいモデルを組み立てられるだろうか．このような興味意識を根底において，本研究は行われている．

クロマチンは固定などの操作によって構造が変化するため，生細胞で観察を行う必要がある．これまでのクロマチン観察の難点としては，適切なスケール (50-200 nm) において観察する手法が存在しなかったことが挙げられる．例えば電子顕微鏡は~30 nmのスケールにおける観察に適しており，一般的な蛍光イメージングは>200 nmのスケールにおける観察に適しているため，50-200 nmのスケールにおける観察は一般的に難しい [2]．しかし，最近の研究ではPALMやSTORM，STEDと呼ばれる超解像顕微鏡法が開発され，50-200 nmのスケールにおいても観察が可能となっている [3-7]．しかし，超高解像顕微鏡法で一般的に用いられている全反射照明法は観察を行いたい物体の空間内における位置により，観察が困難である場合がある．このような制約のため，上記したような方法はクロマチンの観察には不向きであり，特に分裂期染色体の観察は非常に困難である [2,8]．これまでに，固定した細胞におけるヌクレオソームについて，超解像顕微鏡法を用いて観察を試みた研究はあるが，生細胞において大規模に観察した例はまだ無い [9,10]．また，分裂期染色体形成に関わる問題を解決するためには，間期と分裂期の両方においてクロマチンを観察し，どのようなクロマチン構造の変化が起きているかを明らかにする必要がある．本研究では，生細胞におけるクロマチンの観察を行うために，間期と分裂期における1ヌクレオソームレベルの観察から推察する．そして，間期と分裂期におけるクロマチンの動的な構造変化の関係性を探る．そのために，本研究ではまずインドホエジカという生物種の細胞において，PA-GFP (photo activated GFP) と呼ばれる蛍光タンパク質を結合したヒストンを発現させる．そして，薄層斜光照明法と呼ばれる全反射照明法とは異なる照明方法を用いることによって間期と分裂期におけるヌクレオソームの分布決定を行い，クロマチンドメイン構造に関する解析を行う．

2.手法と対象

3. 結果

本研究は国立遺伝学研究所との共同研究であり，まだデータが非公開のため，方法と結果の掲載を控えさせていただく．

4. 議論

クロマチン構造の理解は真核生物の様々な細胞機能理解のために重要である．本研究では斜光照明法を利用することで，これまで不可能であった生細胞におけるヌクレオソームの観察に成功した．そしてDM細胞の間期と分裂期，HeLa細胞の間期におけるヌクレオソームの分布を観察し，クロマチン構造の推定を行った．まず，DM細胞の間期の核内では，ヌクレオソームは半径~70 nmの領域において，空間的に偏りを持つ分布を示していることがRDF解析により示された．これはそれぞれのヌクレオソーム周辺70 nmにおいてヌクレオソーム同士が密に存在していることを意味する．この結果により，クロマチンドメインやフラクタルグロビュールと呼ばれる先行研究で示唆されていたようなヌクレオソームの集合によって形成される塊を，生細胞において初めて観察することに成功した [11,12]．また，それらクロマチンドメインの大きさと頻度に関する分布はベキ乗分布に従うことが示された．そして，このヌクレオソームの分布に関する性質は，間期だ

けではなく分裂期においても観察することができた．分裂期では，ヌクレオソームは染色体内において，半径~80 nmの領域で偏りを持つ分布であることがRDF解析により示された．このことから，分裂期においても，クロマチンドメインのようなヌクレオソームの集合体が染色体内に存在すると考えられる．また，クロマチンドメインの大きさとその頻度に関する分布は間期と同様に，分裂期でもベキ乗分布に従うことが示された．このヌクレオソームの空間的な偏りに関する傾向はインドホエジカのみならず，ヒトHeLa細胞でも観られたことから (data not shown)，種特有の性質ではなく，高等真核生物共通の性質であると考えられる．

序論において，間期と分裂期におけるクロマチン構造の違いを問題提起した．本研究では，間期と分裂期におけるヌクレオソームの分布について比較し，その分布は局所的には非常に類似していることを示した．これは局所的な領域において，間期と分裂期におけるクロマチン構造の間にあまり違いがないことを示している．過去のクライオ電子顕微鏡を用いた研究では，分裂期染色体と核内におけるクロマチン構造が類似していることが示唆されている [13,14]．この研究結果と本研究の結果は一致する．しかし，分裂期と間期のマクロなスケールにおいては，その構造は大きく異なる．間期と分裂期において，クロマチンドメイン自体の大きさはあまり変化しないことが示されたが，クロマチンドメイン間の距離の比較により，ドメイン間の距離が変化していることが示された．

分裂期染色体構造の問題は長くの間研究されてきたが，これまで分裂期染色体形成に関する決定的なモデルは存在していない．そのため，本研究で得られた結果から過去に提唱されていた階層的クロマチンモデルに代わる新しいモデルを提唱する [15-18]．本論文で新しく提案する染色体凝縮のモデルは，クロマチンドメイン自体はあまり変化せず，ドメイン間の距離が短くなることにより，染色体が形成されるモデルである．染色体内においては，コンデンシンというタンパク質が軸状に形成され，その周りをヌクレオソームが取り囲んでいることが知られている [8]．このことからコンデンシンを軸にし，その周りにクロマチンドメインが寄り集まることで棒状の染色体を形成すると考えられる．このモデルは従来の階層構造モデルとは異なり，規則的な構造は持たない．また，間期において既にクロマチンドメインが存在し，それらが凝縮することによって高次の染色体構造をつくり，染色体内においてもクロマチンドメイン自体は保持されると考えられる(図1)．このモデルでは，クロマチン内では従来考えられていたよりも凝縮時に大きな変化が起きていないことを意味している．また，本研究では間期と分裂期におけるクロマチンドメインのサイズと頻度はベキ乗分布に従うことが示された．これは小さいドメインほど多く，大きいドメインほど少ないことを示している．この結果により，ベキ乗分布に従うクロマチンドメインの収納における体積は，染色体形成時に最小化されると考えられる．このことからも，ベキ乗に従うクロマチンドメインは間期から存在し，それらが凝集することによって密度が高い染色体が形成されると考えられる．

過去の研究において，クロマチンドメインは機能的ドメインと空間的ドメインについて考えられてきた．しかし，それらの多くはサイズがとても大きい．フラクタルグロビュールに関しては，Hi-C自体が1 Mb程度の解像度しか持たないため，核内におけるヌクレオソームの充填率を30 %で考えた場合，最小で半径150 nmの小球となってしまう [11,19]．またKalhorらは，クロマチングロビュールに関わるゲノムDNAの平均的な長さは6.8 Mbと推定しており，この小球の空間的な大きさは半径が約290 nmとなる [19]．これは染色体の直径が700 nmであることを踏まえるととても大きい．このことからも，彼らが示しているのは，本研究で示したクロマチンドメインの更なる集合のような高次の構造であると考えられる．また従来のChIP-Seq解析から示されるようなドメインのサイズは，その決定方法における閾値の設定によって大きく変化することから比較が難しい [20,21]．本研究で示したドメインのサイズは半径が~80 nm付近までの大きさであったが，これをゲノムサイズに変換すると約140 kbになる．ヒトのゲノムサイズを3 Gb，遺伝子数を20000個と見積もると，約150 kbに一つの割合で遺伝子が登場する．このことからも，今回示したクロマチンドメイ

ンは1個から数個程度の遺伝子を含むゲノムDNAが凝集することによって形成された塊であると考えられる．このようにゲノム上の領域と直接比較を行うことはまだ困難な状態ではあるが，解決して空間的領域とゲノム上の領域の関係性を明らかにしたい．

本研究において，生細胞でもヌクレオソームの分布に偏りがあることを示すことができた．これからの研究の進展として，今回提唱した分裂期染色体形成のモデルの是非について更なる調査を行う必要がある．また上記したが，クロマチンドメインと機能的特徴の関係性が注目されている．このようなクロマチン構造と遺伝子発現機能の関連が強い領域として，ヘテロクロマチンとユークロマチンが挙げられる．古くから，ヌクレオソームが凝集している領域であるヘテロクロマチンや，ヌクレオソームが緩んでいる領域であるユークロマチンは転写活性や不活性化と強く関わっていることが知られている．このような領域のクロマチン構造はどのようになっているのだろうか．斜光照明法を用いて，1ヌクレオソームレベルによって観察することでその違いを示すことができると考えている．また，クロマチンの構造と，様々な細胞機能は密接に関係している．例えば，核内において転写因子がどのように振る舞い，ゲノム上の遺伝情報を探索するのかということは大きな問題である．今回得られたヌクレオソームの空間的なデータを手がかりに，クロマチン構造と遺伝情報探索の関係を明らかにしていきたい．

5. 謝辞

研究の遂行にあたって，多くの人からのサポートを受け，本論文は完成することができた．カリフォルニア大学サンディエゴ校の斎藤輪太郎講師，慶應義塾大学の荒川和晴講師，内藤泰宏准教授，河野暢明博士，小川隆氏，玉木聡志氏，池上慶太氏，浜島聖文氏，飯野慧子氏，大下和希氏，森田啓介氏，新土優樹氏，国立遺伝学研究所の前島一博教授，平谷伊智朗助教，日原さえら博士，田村佐和子氏，鎌田福美氏には日常の生活から研究まで多くのサポートをいただいた．上記した以外にも本当に多くの人たちの支えによって本論文は成り立っている．最後に，このようなすばらしい研究の場を提供していただいた慶應義塾大学の冨田勝教授に感謝を述べる．

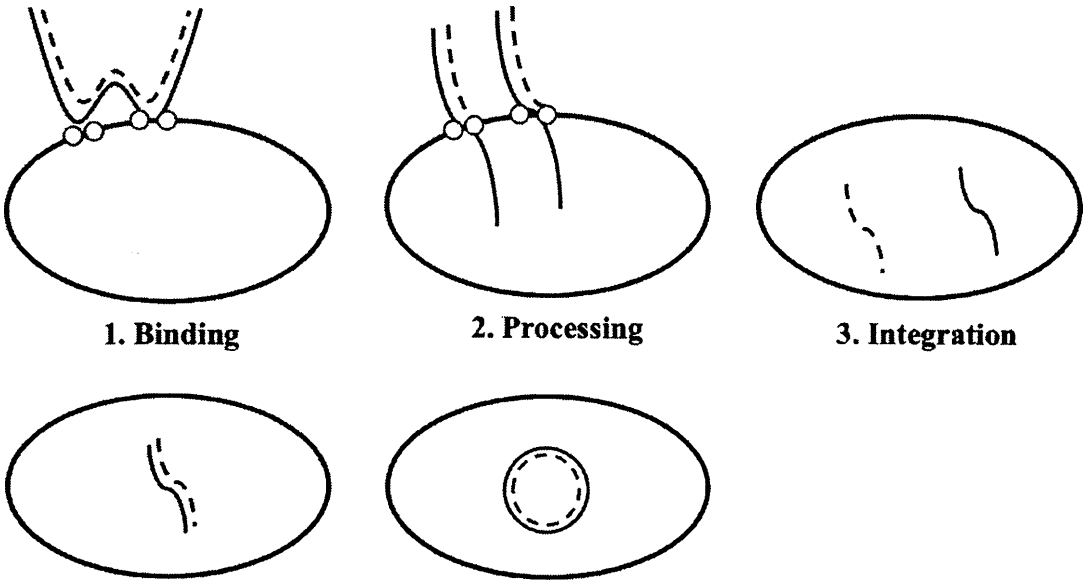

図1: 染色体凝縮に関する新しいモデル

間期から分裂期に移行する際に起きる染色体凝縮の新しいモデルを示した．一つ一つの丸はクロマチンドメインを示している．間期ではそれぞれが離れて存在しているが，分裂期においてはコンデンシンを中心として，クロマチンドメインが寄り集まって凝縮することで棒状の染色体が形成される．

参考文献

1. Kornberg, R. D. & Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell 98, 285-294 (1999).
2. Flors, C. & Earnshaw, W. C. Super-resolution fluorescence microscopy as a tool to study the nanoscale organization of chromosomes. Curr Opin Chem Biol 15, 838-844 (2011).
3. Betzig, E. et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science 313, 1642-1645 (2006).
4. Hess, S. T., Girirajan, T. P. & Mason, M. D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. Biophys J 91, 4258-4272 (2006).
5. Egner, A. et al. Fluorescence nanoscopy in whole cells by asynchronous localization of photoswitching emitters. Biophys J 93, 3285-3290 (2007).
6. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods 3, 793-795 (2006).
7. Hell, S. W. Far-field optical nanoscopy. Science 316, 1153-1158, doi:316/5828/1153 [pii]
8. 10.1126/science.1137395 (2007).
9. Ohta, S., Wood, L., Bukowski-Wills, J. C., Rappsilber, J. & Earnshaw, W. C. Building mitotic chromosomes. Curr Opin Cell Biol 23, 114-121 (2011).
10. Markaki, Y. et al. Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: a topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 75, 475-492 (2010).
11. Matsuda, A. et al. Condensed mitotic chromosome structure at nanometer resolution using PALM and EGFP- histones. PLoS One 5, e12768 (2010).
12. Lieberman-Aiden, E. et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. Science 326, 289-293 (2009).
13. Nishino, Y. et al. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. EMBO J 31, 1644-1653 (2012).
14. Bouchet-Marquis, C., Dubochet, J. & Fakan, S. Cryoelectron microscopy of vitrified sections: a new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. Histochem Cell Biol 125, 43-51 (2006).
15. Fakan, S. & van Driel, R. The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. Semin Cell Dev Biol 18, 676-681 (2007).
16. Sedat, J. & Manuelidis, L. A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 42 Pt 1, 331-350 (1978).
17. Belmont, A. S., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W. & Agard, D. A. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. Chromosoma 98, 129-143 (1989).
18. Belmont, A. S., Sedat, J. W. & Agard, D. A. A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. J Cell Biol 105, 77-92 (1987).
19. Moser, S. C. & Swedlow, J. R. How to be a mitotic chromosome. Chromosome Res 19, 307-319 (2011).
20. Kalhor, R., Tjong, H., Jayathilaka, N., Alber, F. & Chen, L. Genome architectures revealed by tethered chromosome conformation capture and population-based modeling. Nat Biotechnol 30, 90-98 (2012).
21. Filion, G. J. et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. Cell 143, 212-224 (2010).
22. Ernst, J. et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. Nature 473, 43-49 (2011).