

生細胞内におけるヒトゲノムのダイナミクス
Dynamics of human genome DNA in living cells
(日本細胞生物学会推薦)

代表研究者 国立遺伝学研究所 前島一博 National Institute of Genetics Kazuhiro Maeshima

協同研究者 北海道大学 永井健治 Hokkaido University Takeharu Nagai

国立遺伝学研究所 花房 朋 National Institute of Genetics Tomo Hnafusa

国立遺伝学研究所 日原 さえら National Institute of Genetics Saera Hihara

Summary

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. Based on this, to pursue this, it is important to know genome dynamics. To approach this basic dynamics, we tried to investigate the movement of each nucleosome in the chromatin. However, this had been technically challenging to image single nucleosome, because of a single cell having numerous nucleosomes ($\approx 3 \times 10^7$). To overcome this problem, we fluorescently label a small number of nucleosomes, and we fused using PA-GFP (PhotoActivatable-GFP) to histone H4, and stably expressed the PA-GFP-H4 in the cells. We established the system for a single nucleosome imaging. From our analysis of the single nucleosome movement, we found a novel ATP-independent local dynamics of individual nucleosomes. This dynamic local movement without energy would be a basis of various genome events.

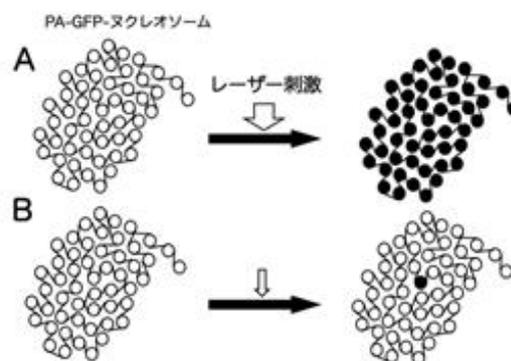
研究目的

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 μm 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 30 nm クロマチン線維になり、さらに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、分裂期染色体には 30 nm クロマチン線維を含む規則的な階層構造は存在せず、このヌクレオソーム構造がとても不規則な形で、核内や染色体内に折り畳まれて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可能性を示唆する。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。

研究経過と考察

ヒトゲノムは 3×10^9 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も問題である。



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)。通常の場合では、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. 1 The method of single nucleosome imaging using PA-GFP

(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方が望ましい。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。また、一過性発現させた細胞での観察はとても簡便である一方、発現量を一定にすることが困難であり、再現性にも乏しい。このため、細胞のゲノムに部位特

異的組み換えを用いて、コンストラクトを組み込むことで、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、1 分子の観察のための測定検討を行った。幸運なことに、我々の私たちは 1 分子照射システム下では、405 nm のレーザー刺激を行

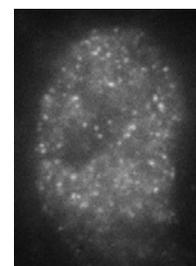


Fig. 2 Single nucleosome particles in a fixed nucleus

わなくとも、PAGFP-H4 の輝点を観察できることを見出したすることができた (Fig. 2)。おそらく、多数の PA-GFP-H4 のうち、ごく少数は偶発的に 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。

(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、データを集める (Fig. 3)。この際、毎秒 30 枚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る。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 を用いてトラッキングし、動いた距離を算出し、てその分布図を作製した (Fig. 4)。

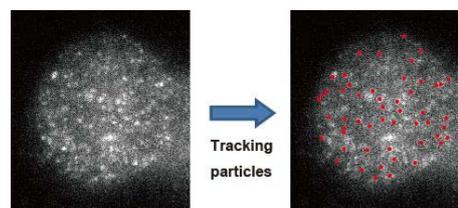


Fig. 3 Single particle tracking

PAGFP-H4 を利用することで、細胞内に多く $\approx 3 \times 10^7$ 個に存在する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核と染色体でのヌクレオソームの平均移動距離は (を Fig. 4 に示した。)、グルタルアルデヒドで強力にヌクレオソームを固定架橋した細胞場合 (Fig. 5 上) 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 active な動きがみられる。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 msec 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 以上でありよりも大きかった。このことからこれらの結果は、分裂期染色体や核内に存在すると言われていた、規則的な 30 nm クロマチン繊維

線維が細胞内でほとんど存在しないことを、生細胞でも証明したことになる。支持するものと考えている。

また、興味深いことに、グルタルアルデヒドよりも弱い固定架橋であるホルムアルデヒド固定では、生細胞と変わらない比でも遜色ないほどの移動距離の分布がみられた(Fig. 5 下)。このことは、個々ヌクレオソームの個々の動きは、ATPに依存せず、ブラウン運動による「ゆらぎ」のものであると考えられる。

このヌクレオソームのゆらぎ(は Local movement)は、非エネルギーに依存しない動的な動きであるため、細胞生物にの様々な機能にとって非常に有効に働くであろう重要であると考えられる(Fig. 6)。例えば、私たちはこの動きを我々は、新しい概念であるヌクレオソームの Local movement と提唱している(Fig. 6)。このゆらぎ Local movement を抑制すると存在しないことは、タンパク質などのクロマチンへのアクセシビリティやターゲットが、低下することを我々は別の実験により、示している。このようなクロマチンへのアクセシビリティやターゲットは細胞の基本反応を支えるものであるため、よって、このヌクレオソームのゆらぎ動きは、染色体の形成、さまざまなタンパク質がクロマチンにアクセスすることが要求される、DNAの修復や複製、遺伝子発現の点において、原動力となっていると考えられるで有利になる。

また、分裂期においては、このヌクレオソームのゆらぎが、コンデンシンなどの染色体の軸となるタンパク質の出入りに重要であるため、構造維持、そして染色体凝縮の原動力と考えられる。

私たちは今後もこのブラウン運動によるヌクレオソームの動きゆらぎの重要性を、さらに突き詰め追求していく予定である。

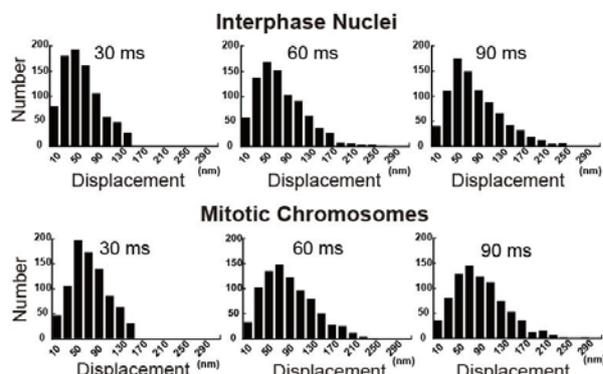


Fig. 4 Movement single nucleosomes in living cells

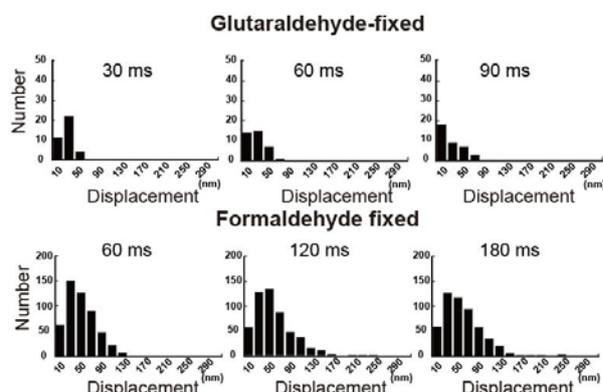


Fig. 5 Movement single nucleosomes in glutaraldehyde-fixed and formaldehyde fixed cells

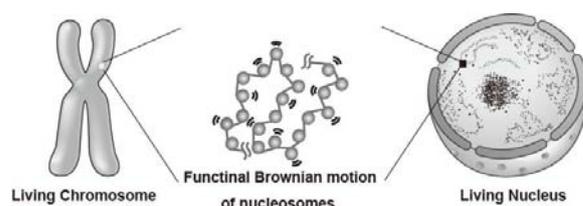


Fig. 6 Local nucleosome movement

研究発表

口頭発表

1. 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

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

2. Kazuhiro Maeshima

”Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without the 30-nm chromatin fiber” Seminar at The Rockefeller University, NY, USA, 6/20, 2011

3. 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

4. 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 姫路 9/16-9/18, 2011

5. 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(第 4 回 JSBi 応用システムバイオロジー研究会) 神戸 11/7, 2011

誌上発表

1.

Maeshima, K. Hihara, S. and Eltsov, M.

Chromatin structure : does the 30-nm fibre exist in vivo? *Current Opinion in Cell Biology* (2010), 22, 291-297.

2. Maeshima, K. Hihara, S. Takata, H. New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (2010) 75, 439-444

3.1. Takata, H. and Maeshima, K. Irregular folding of nucleosomes in the cell (Commentary)

Physics of Life Reviews (2011) 8, 51-52

42. Nishino, Y, Eltsov, M, Joti, Y, Ito, K, Takata, H, Takahashi, Y, Hihara, S, Frangakis, AS, Imamoto, N, Ishikawa, T, Maeshima, K.
EMBO J. (2012) in press.