



文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究

「遺伝子制御の基盤となるクロマチンポテンシャル」 2018年度-2022年度

HP: <https://www.nibb.ac.jp/potential>

Twitter: https://twitter.com/CP_Publicity

クロマチン潜在能

News Letter No.16 Jan, 2022

1. 公募研究紹介 (藤芳 暁・柴田 幹大・笹井 理生)
2. 成果紹介
3. その他
4. 今後の予定

1. 公募研究紹介

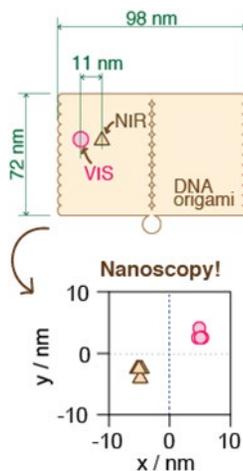
『クロマチン構造の核内観察』

研究代表者：藤芳 暁（東京工業大学・理学院物理学系・助教）

公募研究1期目では、特にクライオ蛍光顕微鏡の機械的安定性の向上を目指し、研究を行ってきました。当初の予想をはるかに上回り、画像ドリフトを数ナノメートル/日に抑えることに成功しました。この顕微鏡を用いて、クライオ1分子ナノスコーピーを実証しました。図はその結果です。大きさ98 nm x 72 nmの平面状のDNAオリガミの上に、可視（VIS）と近赤外（NIR）の蛍光分子を結合させました。これをクライオ蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光分子の位置を分解能5 nmで可視化することに成功しました。

2020年の夏から秋にかけては、新型コロナウイルス感染の影響により、きびしい登校日数制限がかかり、冷媒（液体ヘリウム）を用いた実験を止めざるを得ませんでした。その期間を利用して、厚みのある生体試料を蛍光観察するためのレンズ「可変浸レンズ」を開発し、2021年2月に学術論文が受理されました。このレンズは、2020年に修士を卒業した石田啓太君のアイデアで、領域代表の木村宏先生との共同研究です。

公募研究2期目では、開発したクライオ1分子ナノスコープを用いて、クロマチン構造の核内観察に挑戦します。ハードウェアであるクライオ蛍光顕微鏡は上に書きましたように、完成しています。これを実現するために、新規蛍光プローブの開発に取り組んでいます。

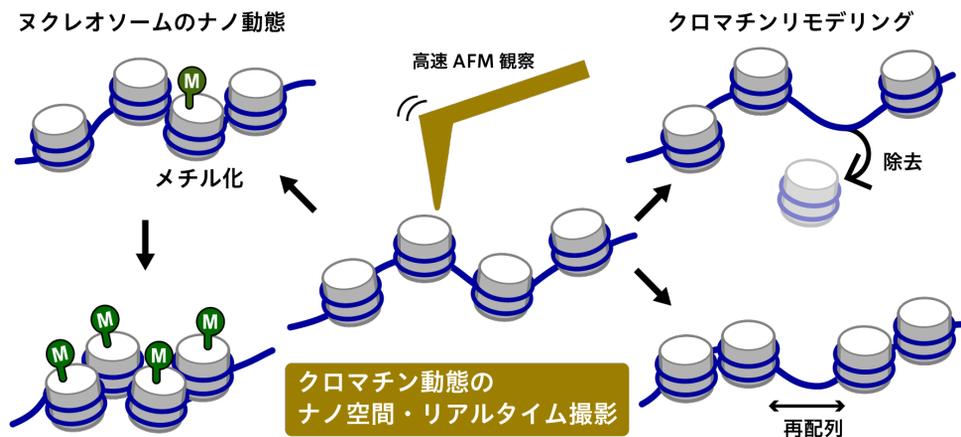


図；クライオ1分子ナノスコーピーの結果。個数で一個のDNAオリガミを画像化しています。（上）試料の概略図。（下）実験結果。丸が可視蛍光性の分子の位置、三角が近赤外蛍光性の分子の位置です。それぞれ4回観察を行ったので、プロットもそれぞれ4点あります。同じ色の点のバラツキが位置精度です。

『クロマチンリモデリングの実時空間イメージング』

研究代表者：柴田 幹大（金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授）

私たちの研究室は、溶液環境にある生体分子のダイナミクスをナノメートルスケール、かつ、100ミリ秒程度の時間分解能で動画撮影できる顕微鏡、高速原子間力顕微鏡（高速AFM）の開発、および、バイオ応用研究を進めてきました。本研究計画では、高速AFMを用い、クロマチン動態の実時空間1分子イメージングを試みます。具体的には、酵素反応を効率よく起こすために、30～37℃で高速AFM観察が行えるよう装置の改良を行い、①3種類のATP依存性クロマチンリモデリング因子（SWI/SNF, SNF2H, CHD7）を用い、クロマチンリモデリングが起こる瞬間のヌクレオソームやクロマチンリモデリング因子の構造変化の動画撮影（クロマチンリモデリングの瞬間を可視化）②ヒストン修飾を受けたヌクレオソームのナノ動態撮影（ヌクレオソームのナノ動態を可視化）③ヒストンメチル化酵素とクロマチンのナノ動態撮影（酵素のナノ動態を可視化）を試みます。さらに、領域内共同研究を積極的に進め、クロマチンポテンシャルに関わる様々な生体分子のナノ動態観察にも挑戦し、クロマチン構造が潜在的に持つ遺伝子発現制御能力「クロマチンポテンシャル」の実体を1分子レベルで可視化することにより、生命活動の根源ともいえる遺伝子発現を分子レベルで明らかにします。

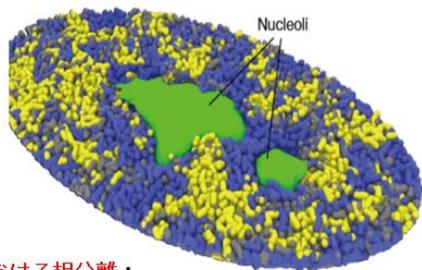


『4Dゲノムアーキテクチャと細胞の転写活性』

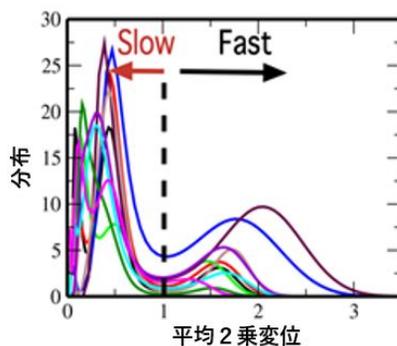
研究代表者：笹井 理生（名古屋大学・大学院工学研究科・教授）

この研究では、4Dゲノムアーキテクチャ、すなわちゲノムの立体構造とその動態を理論的に考えます。細胞の機能とゲノムアーキテクチャとの関係を理解するために、近年、様々な生化学的方法、顕微鏡法が開発され、私たちの知識は大きく前進しましたが、これらの異なったアプローチによる知識を統一して考えるために、ゲノム構造をシミュレートする動力学計算モデルの開発が強く望まれてきました。しかし、これまでの計算モデルでは1細胞Hi-C測定による大量の実験情報を参照する必要があり、細胞の臨機応変な動的変化を調べる有効なモデルは未開発でした。私たちは、クロマチンの局所物性に応じた不均一斥力に着目することでこの困難を克服でき、ゲノム立体構造の高精度計算が可能であることを示しました。すなわち、クロマチン領域間の斥力を原因とする特徴的な不均一運動がクロマチン相分離を誘起し、この相分離が安定したゲノム構造をつくるという考え方です。本研究では、この新規モデルを使ってゲノム立体構造の動的変化を計算し、ゲノム規模におよぶクロマチン動態と転写活性の関係に迫ります。とりわけ、実験グループとの協力によって、生細胞のヌクレオソーム運動を追跡する顕微鏡データをベイズ統計の考え方で解析して、転写阻害によるクロマチン運動の変化をモニターするとともに、ゲノム立体構造計算モデルによる解析と比較して、転写調節機構の謎に迫ります。

ヒトfibroblastの計算ゲノム構造断面



核内における相分離：
Aタイプ(黄)とBタイプ(青)のクロマチン領域、
および核小体(緑)



HeLa細胞におけるヌクレオソーム運動
分布（10細胞データの重ね合わせ）

2. 成果紹介

■加藤太陽公募研究代表らの論文が BMC Bioinformatics誌に掲載されました。

Chemical map-based prediction of nucleosome positioning using the Bioconductor package nuCpos

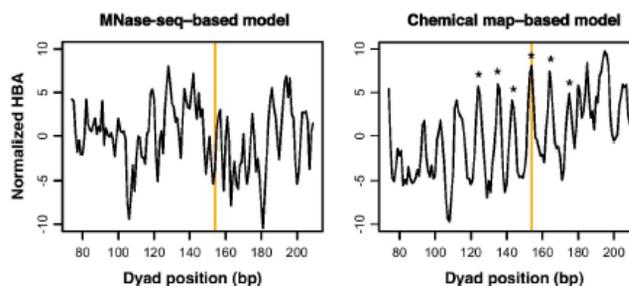
† *Kato H, Shimizu M, Urano T.

BMC Bioinformatics. 2021 Jun 13. doi: <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04240-2>.

<https://link.springer.com/article/10.1186/s12859-021-04240-2>

真核生物のクロマチンを構成するヌクレオソームは、それを構成するヒストンタンパク質の翻訳後修飾を通してだけでなく、その配置によって制御エレメントの露出度を調節するなどして、エピジェネティック制御の根幹に関わる。これまで、細胞内のデータに基づいてヌクレオソーム配置を予測する手法は、切断配列嗜好性の高いマイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) を利用して同定されたヌクレオソームを参考とするものばかりで、より高い解像度を誇るケミカルマッピングは適用されていなかった。

本論文では、ケミカルマッピングで同定されたヌクレオソームの情報で隠れマルコフモデルを教育し、MNaseによるものと予測力を比較した。ケミカルモデルが塩基対解像度でヌクレオソーム配置を予測できたのに対し、MNaseモデルは回転設定 (ヒストンに接するDNAの面) をうまく判断できないだけでなく、MNaseが好むAとTの塩基含量が予測結果に色濃く反映されていた。これを受けて、ヌクレオソームDNAの全長147 bpを20-21 bpの部分配列に分けてヒストンとの相性を探るアプローチを考案した。こうして変異配列上のヌクレオソーム配置をケミカルモデルで予測すると、これまでの試験管内や細胞内でのヌクレオソーム配置の知見と矛盾しない予測結果を得ることができた。本研究で開発したヌクレオソーム配置ソフトウェアnuCposは、R Bioconductorパッケージとして公開されており、任意の配列を対象としたヌクレオソーム配置の予測に利用することができる。



MNaseモデルとケミカルモデルの比較

282 bp の Widom 601 配列を対象として任意の位置を中心とする147 bp の配列の適性を測ると、ケミカルモデルは試験管内の配置がヌクレオソーム形成に適することを示し (縦線)、~10 bp 周期で別の候補配置を示唆する (*)。当該論文 (CC BY 4.0) から転載。

HBA : histone binding affinity



■山崎智弘公募研究代表、山本哲也公募研究代表らの論文がThe EMBO Journal誌に掲載されました。本研究は、領域内共同研究の成果です。

Paraspeckles are constructed as block copolymer micelles

† *Yamazaki T, Yamamoto T, Yoshino H, Souquere S, Nakagawa S, Pierron G,
*Hirose T.

EMBO J. 2021 Jun 15. doi: 10.15252/embj.2020107270.

<https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2020107270>

様々な生物のゲノムからは多量の長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) が合成されており、その作動原理と機能の理解は生物学における重要な課題である。こうしたlncRNAのうち一群のもの（少なくとも数百）が細胞内で相分離を誘導することで細胞内に時空間的に制御された区画である“非膜性構造体”を作っていることが明らかになってきている。RNAは細胞内での相分離誘導において、普遍的かつ重要な役割を持つことから、こうした機能を有するRNAを総称してarchitectural RNA (arcRNA) と名付け、解析を進めている。arcRNAは、誘導する非膜性構造体の性質や機能を決める設計図として働くと考えられるが、そのルールは十分に理解されていない。

本論文では、代表的なarcRNAであるNEAT1_2 lncRNAが誘導するパラスペックルに焦点を当てて、その構築原理を明らかにすることを試みた。パラスペックルは、特徴的な形態や内部コアシェル構造を持つことが知られていた。この形態と内部構造を規定するNEAT1_2 (23 kb) の機能RNAドメインをCRISPR/Cas9による変異体解析により探索し、NEAT1_2の5'と3'にNEAT1_2の末端領域がシェルに存在するために必要であることを明らかにした。この結果に、これまでの知見も合わせて、高分子物理によるパラスペックル形成の理論モデルを構築した。このモデルでは、NEAT1_2と結合するタンパク質の5'と3'末端が親水性ドメイン、中央のアセンブリーに重要な領域 (Yamazaki et al., Mol Cell (2018) 70, 1038) が疎水性ドメインである両親媒性ブロック共重合体*と考えた (*ブロック共重合体：2種類以上の性質が異なる高分子ブロックが連結した高分子の総称) (次ページ図)。水中 (核質) では、5'と3'側を外側に向けたミセル構造をとる。この理論モデルは、パラスペックルの挙動をうまく説明でき、さらに、この理論による予測を実験的に検証した結果、予測通りの挙動を示し、理論モデルの妥当性を示すことができた。

この成果は、RNA-タンパク質複合体 (RNP) が、ブロック共重合体として働き、細胞内で高分子ミセルを形成する、“ミセル化”という新たな細胞内相分離機構を明らかにしたものである。よく研究されている液液相分離 (LLPS) では、典型的には相分離に関わる因子が存在するだけ集まり、表面張力を最小化するため、球状の形態をとるが、このミセル化では、サイズや内部形態などがより厳密に制御された相分離構造体を作られる。

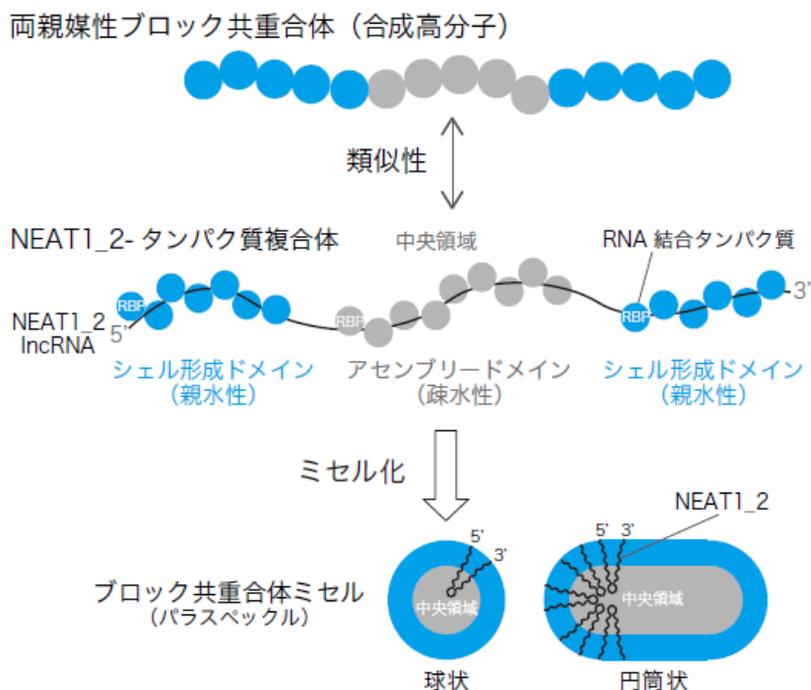


最近、この研究で仮定したシェルを構成するタンパク質を同定してきており、こうした解析から、RNPがブロック共重合体として働くための分子基盤を明らかにできると考えている。今後は、ミセル化が利用されている意義や構造-機能関連の理解、さらには、デザイナーソフトマテリアルとも呼ばれるブロック共重合体の設計指針に基づく、細胞内非膜性構造体の設計につながることを期待できる。

最後に、本研究は、パラスペックルがブロック共重合体ミセルではないかというアイデアにご賛同いただき、理論モデルを構築していただいた山本哲也博士との共同研究なくして成し得なかったものです。その出会いを作っていただいた本領域には、大変感謝いたしております。

以下、プレスリリース情報です。

https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_results/papers/detail/1020



■ 小林慎公募研究代表の論文がBiology Open誌に掲載されました。

Visualization of X chromosome reactivation in mouse primordial germ cells in vivo

† Haramoto Y, Sakata M, *Kobayashi S.

Biol Open. 2021 Apr 15;10(4):bio058602. doi: 10.1242/bio.058602.

<https://journals.biologists.com/bio/article/10/4/bio058602/261692/Visualization-of-X-chromosome-reactivation-in>

胎児が母親の胎内で成長する期間、雌の胎児内では、将来卵子になる生殖細胞が発生する。これら生殖細胞はその発生過程で初期化され、エピジェネティクス制御である「X染色体の再活性化(XCR)」が起こることが知られている。In vitroでES細胞から卵を作製する再構築実験から、PGCの発生には体細胞との相互作用が重要であると考えられているが、in vivoでのPGCと体細胞間の相互作用の詳細はよく分かっていない。

今回、我々はin vivoのPGC発生過程でXCRが起こる環境を明らかにするため、2色の蛍光レポーター遺伝子によりX染色体の活性化状態をモニターできる独自開発の「Momiji」マウスシステム(Kobayashi, S et al. Development 2016)を用いイメージングによる時空間的解析を行った。その結果、Pgk1遺伝子座では、PGCが生殖巣に到着する前にはXCRは検出されず、到着後に初めてXCRが検出されることが分かった。更に胎生10.5-13.5日の間にXCRがほぼ完了することがわかった。この時期、生殖巣の中にはXCRを促進する特異的な部位はなく、PGCは生殖巣に一様に分布する。また、発生が進むにつれて生殖巣の中でPGCがクラスターを形成しながら増殖すると同時にXCRが進行することを明らかにした。XCRが検出されるE11.5-E13.5はTET依存的ヒドロキシメチル化が起きると報告された時期と一致することから、XCRにTET依存的DNA脱メチル化が関与することを示唆する。一方、Pgk1遺伝子座のXCRはHprt遺伝子座のXCRよりも先行して起こり、エピジェネティックな記憶の消去のタイミングは、X連鎖遺伝子の遺伝子座によって異なることを明らかにした。

この成果はin vivoで「X染色体の再活性化」が起こるタイミングと場所をイメージングで捉えることに成功し、生殖細胞が体内で発生する重要な過程の一端を明らかにしたものである。

筆頭著者である原本研究員のインタビュー記事が、Biology Open掲載号の“First Person”に掲載されました。

URL:<https://journals.biologists.com/bio/article/10/4/bio058759/261691/First-person-Yoshikazu-Haramoto>

● Momijiマウス個体を使ったX染色体再活性化細胞の検出

細胞の分化状態	分化	未分化
細胞例	体細胞	生殖細胞
X染色体の状態	不活性化	初期化 → 再活性化
Momijiシステムでの検出	緑 赤	黄

● 生殖細胞(将来の卵子)発生の解析

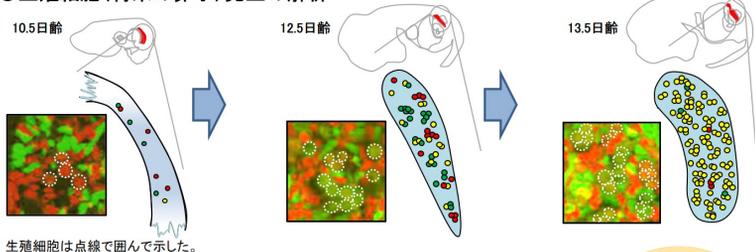


図 「Momiji」マウスシステムを用い、生殖細胞で起こるX染色体再活性化をイメージングで捉えることに成功

3. その他

■ 立和名博昭連携研究員が2021年（令和3年）度、日本癌学会奨励賞を受賞されました。大変おめでとうございます。

https://www.jca.gr.jp/member/award/incitement_award.html



4. 今後の予定

■ **第30回 Hot Spring Harbor Symposium クロマチン潜在能
合同国際シンポジウム/第6回 トランスオミクス
医学研究拠点ネットワーク形成事業シンポジウム
「New Technology Meet Biology」**（当領域研究 共催）

日 時： 2022年1月18日(火)-19日(水)

会 場： オンライン口頭発表+ポスターセッションショー トーク

当領域研究者オーガナイザー： 大川 恭行（九大）、木村 宏（東工大）、斉藤 典子（がん研）

Homepage: <http://hshis30.umin.ne.jp/>

■ **第74回 日本細胞生物学会大会**

日 時： 2022年6月28日(火)-30日(木)

会 場： タワーホール船堀 (<https://www.towerhall.jp/4access/access.html>)

大会長： 今本 尚子（理研）

演題登録受付： 2022年1月下旬～

Homepage : <https://confit.atlas.jp/guide/event/jscb2022/top?lang=ja>

編集後記：新年明けましておめでとうございます。今年は壬寅で、新しいものが誕生するようなイメージだそうです。心穏やかなよい年になりますように！ 原稿を提供くださる先生方、いつも大変ありがとうございます。（NS）
昨年も大変お世話になりました。少しずつ、学会も対面式が増えてきて、少しずつ当たり前だった日常が戻りつつあります。今年もさらに良い年になりますように（TF）