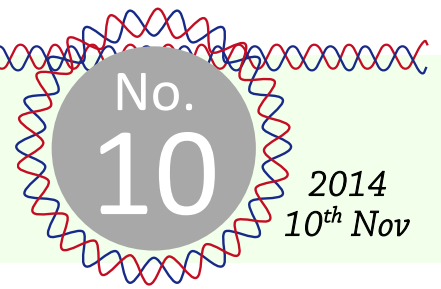


クロマチン動構造

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp>

News Letter



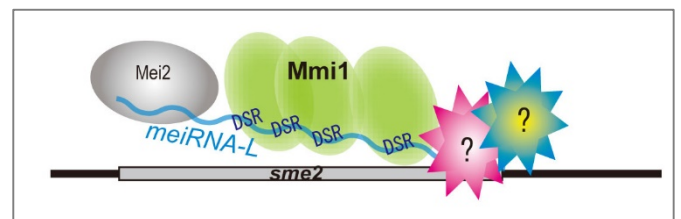
1. 公募班の研究紹介: 大阪大学・平岡 泰、広島大学・田代 聡、島根大学・加藤 太陽
2. アウトリーチ: 「ケンピロー先生がかえってきた！」
3. 成果紹介: ①堀班員らの領域内共同研究による論文が、Chromosome Res 誌に掲載されました。
②木村班員らの領域内共同研究による論文が、PLoS One 誌に掲載されました。
4. 寄稿: ケンブリッジ大学・宮本 圭
5. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

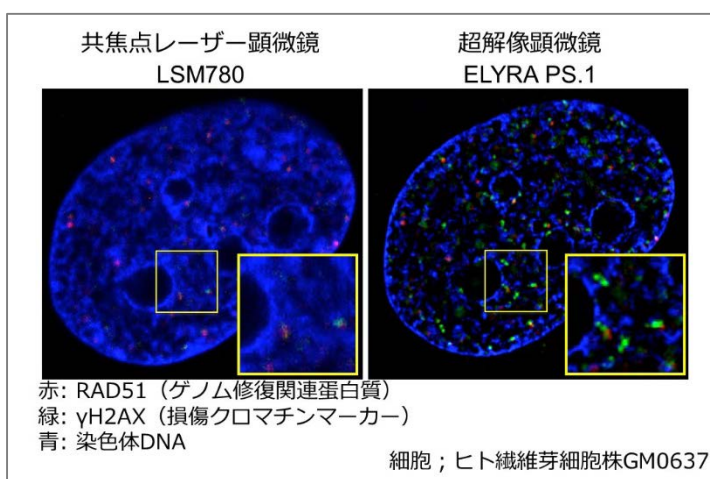
【相同染色体対合に必要な非コード RNA が動的クロマチン構造と相互作用する仕組み】

研究代表者：平岡 泰（大阪大学 生命機能研究科）

相同染色体の対合・組換えは、正常な減数分裂に必須であり、その理解は生殖を行うすべての真核生物に共通に重要である。分裂酵母では、減数分裂期になると、染色体末端テロメアが細胞核の1箇所にクラスターを形成し、テロメアを先頭に核が往復運動を繰り返す。分裂酵母では、このテロメアクラスターと往復運動が相同染色体の対合を促進する。高等動植物では、核全体の往復運動は見られないが、テロメアクラスターとテロメアの核内運動が相同染色体の対合に関わることが確認されている。相同染色体対合過程において、相同染色体と非同源染色体を識別する仕組みがあると予想されるが、その仕組みはわかっていない。分裂酵母において、第2染色体上の特定の遺伝子座（*sme2* 遺伝子座）から減数分裂特異的に長鎖（1500塩基）の非コードRNAが転写され、相同染色体の対合を強く促進することがわかった。この非コードRNAが相同染色体の対合を促進する仕組みを研究し、クロマチン動構造とRNAの相互作用を理解することを目指して研究を進めている。これまでの研究から、この非コードRNA（*meiRNA*）は、polyA付加反応とリンクして *sme2* 遺伝子座に蓄積することがわかってきた（右図）。現在、生化学的・分子生物学的な手法に加え、蛍光顕微鏡による検索を併用して、クロマチンへの蓄積に関わるタンパク質の同定を進めている。



【ゲノム修復における動的クロマチン構造変換】 研究代表者：田代 聡（広島大学 原爆放射医科学研究所）



染色体DNAは、自然放射線や化学物質、あるいはCT検査の医療放射線など様々なストレスを受けている。DNA二本鎖切断(DNA Double strand breaks, DSBs)は、ゲノム情報の改変や細胞死誘導に繋がる最も重篤な染色体DNAの損傷である。DSBsの修復システムの一つである相同組換え修復は、損傷DNAと相同なDNAを鋳型に用いて正確にDNA修復を行うシステムである。このため、損傷DNAは損傷を受けた場所にとどまるのではなく、相同DNAとの組換え反応のために「移動」し、さらに修復のために損傷部位周辺のクロマチン構造が変換される可能性があ

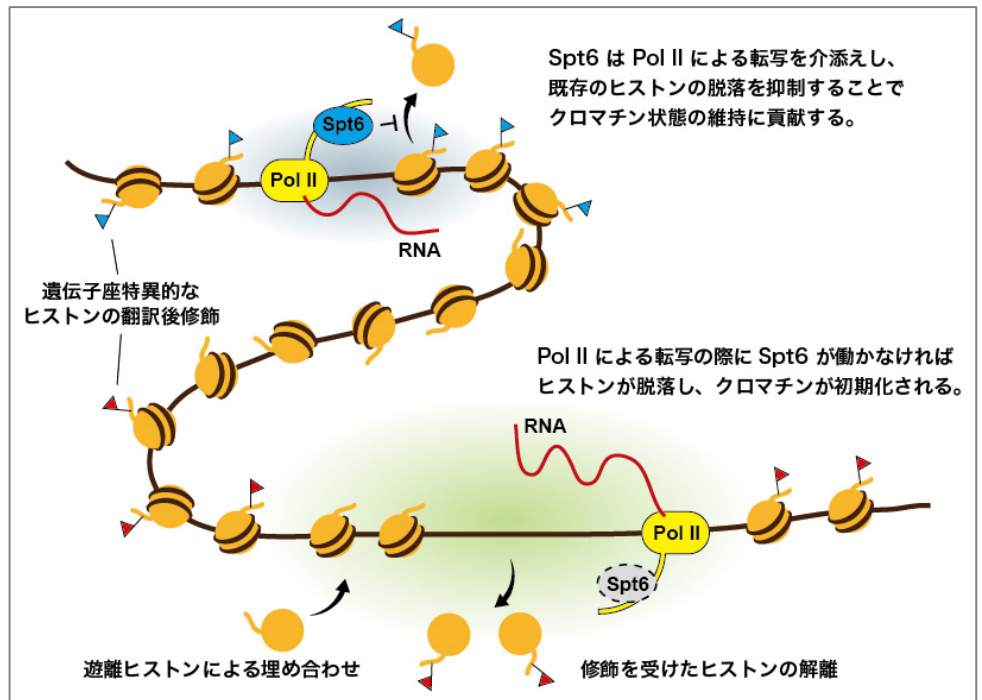
る。私たちは、相同組換え修復で中心的役割を果たす修復タンパク質 RAD51 が、ゲノム損傷部位に集積し核内高次構造体 RAD51 フォーカスを形成することを見いだしている（前頁図）。本研究では、超解像顕微鏡などを用いて、従来の光学顕微鏡では解析不可能であった RAD51 フォーカスや損傷クロマチンの微細構造の解析を行うことにより、相同組換え修復におけるクロマチン構造の動的変化を検討する。

【転写と共役したクロマチン初期化制御の解析】

研究代表者：加藤 太陽（島根大学 医学部）

真核生物は、ヒストンを基盤としたエピジェネティック制御機構を採用している。ヌクレオソームの配置やヒストンの翻訳後修飾によって遺伝子座の性質を長期に特徴づけるためには、DNA とヒストンの物理的接触を維持する必要がある。しかしながら、RNA ポリメラーゼ II（PolII）が転写を実行するためには DNA とヒストンを解離させる必要があるため、それによって長期記憶が失われかねないというジレンマがあった。

我々はこれまでに、PolII による転写を介添えするヒストンシャペロンタンパク質である Spt6 が、転写領域におけるヒストンの解離と交換を抑制することでヘテロクロマチンやユークロマチンにおける遺伝子座特異的なヒストン翻訳後修飾の維持に貢献することを見いだした（右図）。本研究では、エピジェネティック制御機構がヒトに類似しておりゲノムワイドな解析に有利な分裂酵母をモデル生物として、Spt6 の不活性化によって起こる「転写と共役したクロマチンの初期化」の制御機構の解明に取り組んでいる。



2. アウトリーチ

「ケンビロー先生がかえってきた！」

日時：2014年8月23日（土）19：15～21：00 ころ
場所：生駒山麓公園 野外活動センター



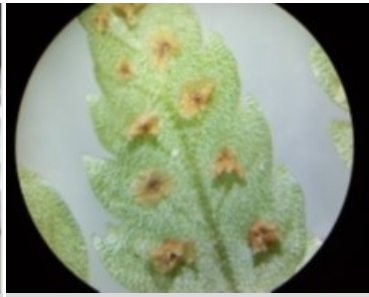
顕微鏡の説明をするケンビロー先生

昨年夏に行った「ケンビロー先生がやってくる！」の活動を今年もやらせていただけることになり、山縣班員扮するケンビロー先生とその研究室メンバーが実体顕微鏡をかついで小学校の学童保育を訪問しました。今年は生駒山でのキャンプイベント中に行ったということもあり、サンプルを集める環境は抜群だったのではないのでしょうか。子どもたちは、配られたディッシュに多種多様なサンプルを集めてきてくれました。花や木の実、石、木片、蟻やゲジゲジなどの虫、なかにはディッシュからはみ出しそうなヒキガエルまで！観察会場に集合し、まずはケンビロー先生から顕微鏡についての説明がありました。いろんな顕微鏡があつていろんな使い方が

あるという話を聞いた後、実際に観察をしました。初めて実体顕微鏡に触れる子どもたちもたくさんいて、拡大されて立体に見えるサンプルに大興奮。自分で集めたサンプルを観察し、写真に撮ってもらったものをスケッチして、とても満足げでした。高学年の子どもたちは顕微鏡の構造に興味津々で、様々な使い方を楽しんでいました。今年は、保護者の方も大勢参加してくださり、わが子と一緒に楽しそうに観察されていてよかったと思います。子どもたちの生き生きした眼差しに、私たちも心洗われる体験ができました。



いろいろなサンプルを集めています



シダの葉の裏側

キャンプの反省会報告書より、子どもたちと保護者の感想：普段できない経験なので、子どももとても喜んでいました。興味深く参加していました。／大人もワクワクする企画でした。貴重な体験をさせて頂いたとケンビロー先生に感謝しています。／子どもたちに一生のうちでも経験できないものだったと思います。

(大阪大学・山縣研 森光子)

3. 成果紹介

① 堀班員らの論文が、Chromosome Research 誌に掲載されました。これは、公募班の佐渡班員との領域内共同研究による成果です。

The CENP-O complex requirement varies among different cell types.

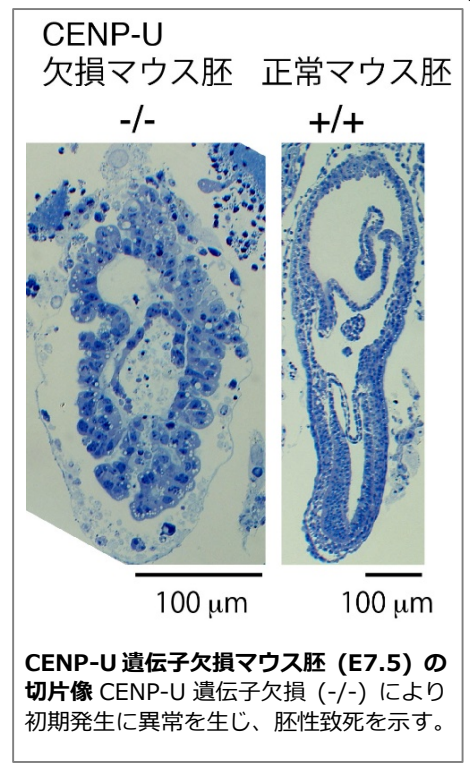
Kagawa N, Hori T, Hoki Y, Hosoya O, Tsutsui K, Saga Y, Sado T, Fukagawa T.

Chromosome Res. 2014 Sep;22(3):293-303.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10577-014-9404-1>

動原体は、遺伝情報を安定に次世代細胞へ維持・継承する過程で重要な役割を担う。この動原体は複数のタンパク質で構成された巨大な構造体であり、17種類のCENPと呼ばれるタンパク質群(CCAN)が中心的な役割をすることが分かっている。これまでの研究から、CCANタンパク質群は機能的に異なるサブグループに分類され、大部分は染色体分配に重要な機能を持ち、細胞の生存にも必須であることが分かっている。ところが、サブグループの一つであるCENP-Oクラス複合体(CENP-O, -P, -Q, -R, -U)は、ニワトリのBリンパ球由来のDT40細胞の生存には必須ではなく、染色体分配における機能には未だ不明な点が多く残されている。今回、マウスを用いた遺伝学的解析によりCENP-Oクラス複合体欠損時に現れる表現型が細胞種によって違うこと、およびその原因を明らかにした。

はじめに、CENP-Oクラス複合体の個体での役割を解析することを目指して、CENP-U遺伝子欠損マウスを作製した。その結果、CENP-U遺伝子欠損により初期発生に障害がおり、マウスでは胚性致死(～E7.5)を示すことが明らかとなった(右図)。さらに、作製したCENP-U遺伝子欠損マウスを利用して、薬剤添加(OHT)により条件的に遺伝子欠損できるマウス胚性幹細胞(mES細胞)およびマウス繊維芽細胞(MEF細胞)を取得した。これら細胞株を利用してOHT添加により遺伝子欠損を引き起こしたところ、mES細胞においては、多数の細胞で染色体分配に異常が観察され、最終的に死滅することが分かった。一方、MEF細胞においては、CENP-U遺伝子欠損を引き起こしても生存可能であることが分かった。細胞分裂時の状態を生細胞観察法等で詳細に解析したところ、致死性を示すmES細胞は、染色体分配に異常を生じて死滅するが、生存可能なDT40細胞やMEF細胞は、mESと同様に分裂期に異常は観察されるが最終的には修正され、正常に染色体分配が進行することが観察された。さらに幾つかの細胞生物学的解析を行なった結果、CENP-Oクラス複合体の染色体分配における機能は細胞種によらず同じであるが、M期チェックポイント活性が細胞種によって異なるため、CENP-U遺伝子欠損に伴う染色体分配異常の修正の精度が異なることが示唆された。そのため、CENP-U遺伝子欠損に伴う表現型が細胞種の違いで一見異なった形で現れると考えられた。



② 木村班員らの論文が、PLoS One 誌に掲載されました。これは、胡桃坂領域代表との共同研究による成果です。

Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging.

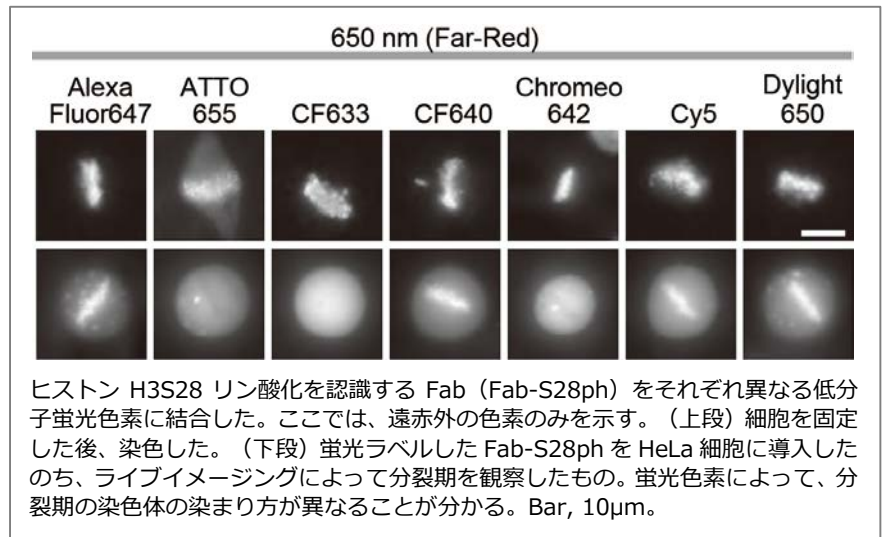
Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H.

PLoS One. 2014 Sep 3;9(9):e106271. doi: 10.1371/journal.pone.0106271.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0106271>

生細胞内の蛋白質蛍光イメージングは、現在の細胞生物学に重要な技術となっている。近年、様々な波長特性を持つ蛍光蛋白質が開発され、任意の蛋白質と融合させたものを細胞に発現させることで、蛋白質の局在変化を追跡できるようになった。しかしながら、蛍光蛋白質は必ずしも万能ではなく、その大きさや光安定性などが問題となる場合もある。一方、低分子蛍光色素を蛋白質に直接結合させて蛍光イメージングを行うことも可能である。低分子蛍光色素は、多様な蛍光特性を持つものが開発されており、蛍光蛋白質以上に選択の幅が広い。

我々は、蛍光色素で標識したヒストン修飾特異的抗原結合断片 (Fab) を細胞に導入することで、内在性ヒストン修飾の動態を生細胞で追跡することを可能にした。しかし、同一の Fab でも色素によってバックグラウンドや細胞質の凝集したシグナルの現れ方に差が生じることが分かり、生細胞観察に適した蛍光色素を選択する必要あると考えられた。そこで、緑、赤、近赤外に蛍光波長を持つ様々な色素をヒストン修飾特異的 Fab と結合させ、その細胞内での特性 (シグナルノイズ比、細胞質の凝集、光安定性) と抗体の抗原結合の親和性に与える影響を系統的に解析した (右図)。その結果、緑色の蛍光波長を持つ色素は概ね抗体の結合能に影響を与えず、細胞内でも非特異的吸着が少ないため、細胞内解析に適していることが明らかになった。しかし、安定性に関しては、赤色の蛍光色素が優れていた。総合的には、それぞれの蛍光波長域の色素の中で、Alexa488 (緑)、Cy3 (赤)、Cy5 または CF640 (近赤外) が、細胞内のイメージングに最も適していると考えられた。



4. 寄稿

Hierarchical molecular events driven by oocyte-specific factors lead to rapid and extensive reprogramming

Jerome Jullien[†], Kei Miyamoto[†], Vincent Pasque[†], George E Allen, Charles R Bradshaw, Nigel J. Garrett, Richard P Halley-Stott, Hiroshi Kimura, Keita Ohsumi and J.B. Gurdon.

[†] These authors contributed equally to this work.

Mol Cell. 2014 Aug 21;55(4):524-36

分化した体細胞を未受精卵子内に核移植することによって、初期化 (リプログラミング) が誘導され、体細胞を未分化な状態へと戻すことが出来ます。卵子によるリプログラミングは、他のリプログラミングの系と比較しても、効率よく、また質の高い未分化細胞の作製につながることを示されてきました。また、卵子内因子が人工多能性細胞 (iPS 細胞) の作製効率を上昇させることもわかっています。すなわち、卵子が持つ「自然の」リプログラミング誘導機構を理解することは、未分化細胞の効率的な作製のために重要な意味を持てきます。

私達は以前、カエルの卵殻胞期の卵子 (卵母細胞) にマウス体細胞を移植することによって、体細胞に転写のリプログラミングを誘導できることを示しました。この実験系は、細胞分裂なしに転写リプログラミングを誘導できるため、解析を単純化し、リプログラミング機構を探るのに適したシステムです。本研究では、この核移植系を用い、卵母細胞

胞内での転写リプログラミングを詳細に、ゲノムワイドレベルで追いました。まず、新規転写物を RNA シークエンシング法によって調べ、約 2000 もの遺伝子が 2 日以内に活性化されることがわかりました。驚くべきことに、翻訳阻害剤の存在下でもほぼ同数の遺伝子の活性化が起きたことから、卵子内に元々存在する因子だけで 300 個もの移植された体細胞核をリプログラムすることになります。そこで、卵内に大量に存在する因子に注目して転写活性化までの 2 日間における体細胞核への卵内因子の取り込みを調べました。その結果、卵特異的なリンカーヒストンに続き、卵内の RNA ポリメラーゼ II、卵特異的な基本転写因子 TBP2 が比較的早くに体細胞核内に取り込まれることがわかりました。従って、卵特異的な転写機構が体細胞の転写機構に取って代わることがわかります。さらに、後に起こる RNA ポリメラーゼ II の活性化(リン酸化)のレベルは体細胞の 8 倍にもものぼり、卵内の効率的な転写リプログラミングが体細胞では起こりえないほどの量の活性化 RNA ポリメラーゼ II によって支持されていることがわかります。さらに、リプログラミングのごく初期の段階で起こるヒストン B4 の取り込みは、ゲノム全体を弛緩させ、他のクロマチン因子による結合を促すための現象と考えられ、最終的には転写機構の会合による、転写開始点から取り除かれることが示唆されました。以上のように、卵母細胞によるリプログラミングは、卵内に大量に存在する因子によって誘導され、体細胞の転写機構が卵内転写機構に取って代わることを明らかにしました。この卵内因子が特異的な機構によって体細胞クロマチンに作用するのか、非特異的に体細胞核内のアクセラ可能な領域に「侵入」していくのかは今後明らかにされるべき興味深い点だと思います。

本研究はケンブリッジ大学ガードン研究室メンバー3人とボスのジョン・ガードンが牽引して行われました。事の発端は、博士課程の学生が核移植した際にほぼ全ての体細胞がリン酸化 RNA ポリメラーゼ II によって染色されたことに刺激を受けて、私を含めたもう一人のポスドクとボスに呼びかけることによって始まりました。一見当たり前のようですが、300 個の体細胞を 1 つの卵母細胞が転写誘導しているので、興味深い現象です。そこから、チームアップしたメンバーが、そこに至る前での過程を明らかにしようと目標をたて、各々の得意分野を集結させました。途中でメンバーが他の研究室に移ることもあり、一時はプロジェクトを終えることは無理かと思いましたが、数年かけて何とか論文にまでたどり着きました。刺激的な共著者に囲まれて、First co-author がうまく機能した例だと思っています。また、本研究のために作製した核移植卵は合計で 5000 個を超えていますが、全ての核移植をボスのジョン・ガードンが行いました。ジョンの研究に取り組む姿勢には、敬服するばかりです。

(ケンブリッジ大学・宮本圭)

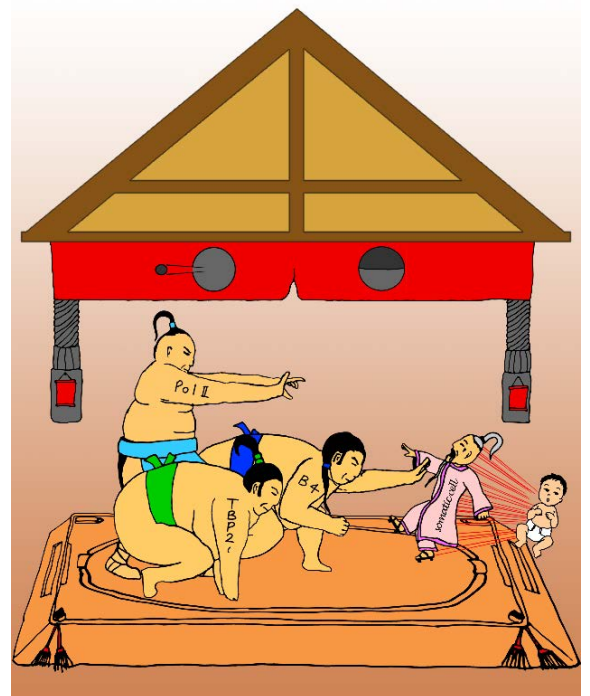


図 1. 卵母細胞に大量に存在する 3 つの因子が体細胞を強制的に「若返らせる」卵内の因子 (B4, TBP2, Pol II) は豊富に存在することからも相撲取りになぞらえている。体細胞 (老人) にとっては非常に過酷な戦いとなり、ほとんどの取り組みに敗北し、強制的に押し戻される。

5. 今後の予定

① The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair)

期間：11 月 17-21 日

場所：御殿場高原ホテル (静岡)

胡桃坂領域代表が組織委員会に参加している他、複数の班員の講演が予定されています。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://3r2014.com/index.html>

② 第 32 回 染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会 (合同開催)

期間：12 月 15-17 日

場所：安芸グランドホテル (広島)

田代班員 (公募班) と齊藤班員 (計画班) がオーガナイザーを務めます。

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/chrnc/>

③ The 4D Nucleome 2014

期間：12月17-20日

場所：安芸グランドホテル（広島）

田代班員（公募班）がオーガナイザー代表を務めるほか、木村班員（計画班）も組織委員会に参画しています。詳しくはこちらをご覧ください。

http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/chrom/en/4d_nucleome_2014.html

④ 本領域の一般公開シンポジウムが開催されます。

「生き物と細胞の設計図 ～DNA・クロマチン・核～」

日時：2015年1月12日（祝）

会場：千里ライフサイエンスセンター（大阪）

セッション1 DNA・クロマチン・核を「見る」方法

- 原子レベルで見る生命の設計図（早稲田大学・胡桃坂仁志）
- ライブセルイメージングでヒト受精卵のDNAを見て不妊を知る（大阪大学・山縣一夫）
- DNA配列解読技術の飛躍的進歩による生命科学の発展（島根大学・加藤太陽）

セッション2 DNA・クロマチン・核のなりたちとはたらき

- 細胞核；ゲノムの環境問題を考えよう（熊本大学・齊藤典子）
- 核に分子を運んで遺伝子を操る（医薬基盤研・安原徳子）
- 小児科医が覗く細胞核構造（群馬大学・滝沢琢己）

セッション3 DNA・クロマチン・核研究の新展開

- DNAでできた糸球を解いてみよう！（東京大学・小穴英廣）
- 試験管の中で染色体を作る～130年来の謎を解くために～（理研・新富圭史）
- 細胞核の中にも男女の違いが！～不活性化X染色体の秘密～（北海道大学・小布施力史）

詳しくはこちらをご覧ください。

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/activities/20141104.html>

一般公開シンポジウム第2弾
生き物と細胞の設計図
～DNA・クロマチン・核～
新学術領域「動的クロマチン構造と機能」

セッション1 「DNA・クロマチン・核を「見る」方法」
■ 原子レベルで見る生命の設計図
胡桃坂仁志（早稲田大学・理工学研究所）
■ ライブセルイメージングでヒト受精卵のDNAを見て不妊を知る
山縣一夫（大阪大学・理化学研究所）
■ DNA配列解読技術の飛躍的進歩による生命科学の発展
加藤太陽（島根大学・理学部）

セッション2 「DNA・クロマチン・核のなりたちとはたらき」
■ 細胞核；ゲノムの環境問題を考えよう
齊藤典子（熊本大学・理化学研究所）
■ 核に分子を運んで遺伝子を操る
安原徳子（医薬基盤研究所）
■ 小児科医が覗く細胞核構造 一遺伝子はどこに配っているの？
滝沢琢己（群馬大学・医学部研究科）

セッション3 「DNA・クロマチン・核研究の新展開」
■ DNAでできた糸球を解いてみよう！
小穴英廣（東京大学・工学部研究科）
■ 試験管の中で染色体を作る～130年来の謎を解くために～
新富圭史（理化学研究所）
■ 細胞核の中にも男女の違いが！～不活性化X染色体の秘密～
小布施力史（北海道大学・先端生命科学研究科）

日時：2015年1月12日（祝）
会場：千里ライフサイエンスセンター
（大阪府守口市千里ニュータウン千里中央）
サイエンスホール（有料駐車場有り）
主催：新学術領域「動的クロマチン構造と機能」
連絡先：山縣一夫（大阪大学）06-6879-8372

参加費無料・事前登録不要・入場随時

編集後記：秋も深まってきましたが、皆様お元気でございましょうか？今号では、先号に引き続き海外で活躍する日本人研究者からの寄稿を掲載しています。今後も、機会があれば「クロマチン動構造」に関係する海外日本人研究者の仕事を紹介していきたいと思っています。それから、昨年好評だった一般公開シンポジウムを今年度もやることになりました（成人の日、場所は前回と同じ千里中央です）。普段の研究の発表とは一味違った話が聞けるので、今から楽しみです。皆様是非ご参加ください。

HiKi