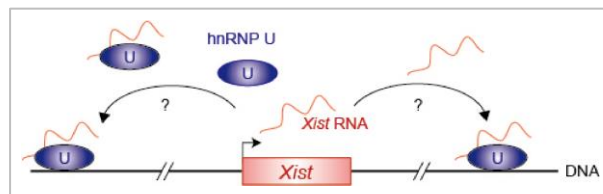


1. 公募班の研究紹介: 近畿大学・佐渡 敬、熊本大学・斉藤 寿仁、長崎大学・甲斐 雅亮
2. 成果紹介: ①胡桃坂領域代表と原田班員らの領域内共同研究による論文が、PLOS One 誌に掲載されました。
②木村班員らの領域内共同研究による論文が、Nature 誌に掲載されました。
3. 寄稿: フリードリッヒ・ミーシャー生物医学研究所 (スイス)・堀籠 智洋
4. 今後の予定

1. 公募班の研究紹介

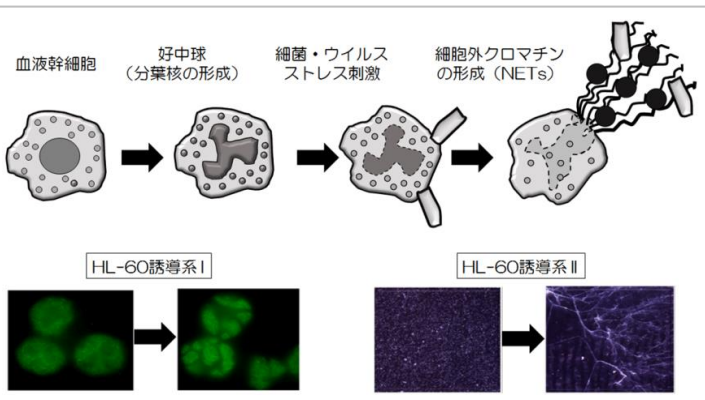
【長鎖ノンコーディングRNAのクロマチンターゲティング】研究代表者: 佐渡 敬 (近畿大学 農学部)

エピジェネティック制御因子と相互作用する一部の長鎖ノンコーディング (lncRNA) は、特定のゲノム領域を標的とし、その領域のクロマチン修飾の確立に重要な役割を果たす。したがって、lncRNA のクロマチンターゲティング機構は、エピジェネティクス制御の分子基盤を理解するために必要な課題の一つといえる。本研究では、哺乳類のメスの細胞で X 染色体を覆い、そのヘテロクロマチン化を引き起こす Xist RNA とその局在制御に関与すると考えられる hnRNP U をモデルとして、lncRNA のクロマチンターゲティングについてマウス胚を用いた解析を行う。hnRNP U の条件的機能欠損マウスを作製し、適当な cre 発現マウスと交配して得られる胚で hnRNP U が Xist RNA とクロマチンの相互作用に果たす役割と効果を明らかにする。まずは、完全機能欠損アレルのホモ接合体の胚において、hnRNP U の欠損が Xist RNA の局在制御と X 染色体のクロマチン制御に及ぼす影響について調べる。また、初期発生を経て確立された X 染色体の不活性化状態の維持に hnRNP U が関わるかについても調べる。さらに、他の lncRNA によるクロマチン制御にも hnRNP U が関与しているか検討し、hnRNP U を介した lncRNA のクロマチンターゲティングの普遍性、あるいは特異性について考察する。



【血液細胞分化におけるクロマチン動構造の研究】研究代表者: 斉藤 寿仁 (熊本大学 自然科学研究科)

ヒト末梢血中の白血球の約 50% を占める好中球は、分化の過程で核が 3~4 つに分葉化する。核の分葉化は好中球の分化・成熟度合いを表すと考えられている。2004 年に Brinkmann と Zychlinsky らは好中球が細胞外クロマチン Neutrophil Extracellular Traps (NETs) を形成し細菌を捕獲することを報告し、好中球が外部から侵入してきた細菌を貪食し死滅させる免疫応答の他に、細胞外クロマチンを介して免疫に関与する可能性を指摘した。しかしながら、分葉核から NETs に至るクロマチン動構造や細胞外クロマチンによる免疫

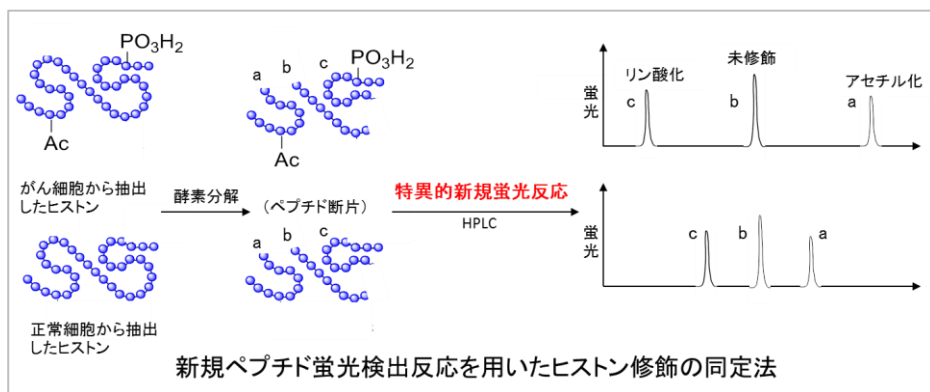


応答の制御については不明な点が多い。研究代表者らは、白血球由来の細胞株 HL-60 を用い、分葉核と NETs 類似の構造体を誘導することに成功している (下図)。現在、この独自の実験系を用いて核とクロマチン動構造制御に関わる因子群を解析している。本研究を通じて、好中球の分化と NETs 形成の分子制御に迫ることで、自己免疫疾患や敗血症、血栓形成の予防、診断そして治療などの保健医療分野の発展に貢献できれば幸いである。

【新規エピゲノム分析によるクロマチン変異の解析】

研究代表者：甲斐 雅亮（長崎大学 医歯薬学総合研究科）

DNA 配列の変化を伴わないクロマチン変異は、細胞のがん化に深く関与している。クロマチン変異は、メチル化、アセチル化、リン酸化などのヒストン修飾とメチル化 DNA 修飾に大別され、これらの修飾パターンは、正常細胞とがん細胞では異なることが報告されている。修飾変異の違いを分析する装置として HPLC が汎用されているが、検出には UV が使用されている。一方、蛍光検出は、UV 検出と比較して、検出感度や特異性が優れており、これまでに我々は、ペプチドに特異的な蛍光検出反応(Sci.Rep.,4:4950|2014 等)、修飾アミノ酸残基を蛍光検出できるアミノ酸配列決定法、各種核酸塩基の特異的な蛍光検出反応などを開発してきた。現在、これらの手法を応用し、がん細胞及び正常細胞由来のヒストンを酵素分解後、各ペプチド断片の HPLC による蛍光分離パターンの相違を解析している。これにより、修飾アミノ酸配列の同定を容易にできるヒストン修飾解析技術を開発する。さらに、染色体を各核酸塩基に分解後、それらに特異的な蛍光検出反応を行うことによって、がん細胞内遺伝子のメチル化シトシンを定量評価する解析技術の開発も行っている。



片の HPLC による蛍光分離パターンの相違を解析している。これにより、修飾アミノ酸配列の同定を容易にできるヒストン修飾解析技術を開発する。さらに、染色体を各核酸塩基に分解後、それらに特異的な蛍光検出反応を行うことによって、がん細胞内遺伝子のメチル化シトシンを定量評価する解析技術の開発も行っている。

2. 成果紹介

①胡桃坂領域代表と原田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。

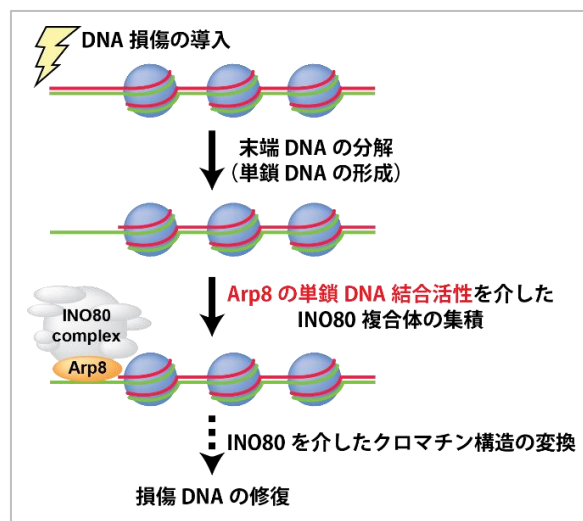
DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair.

Osakabe A, Takahashi Y, Murakami H, Otawa K, Tachiwana H, Oma Y, Nishijima H, Shibahara KI, Kurumizaka H, Harata M.

Published: October 09, 2014

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0108354>

遺伝情報を担うゲノム DNA は、DNA 複製時のエラーや放射線や紫外線等の様々な内外的要因によって損傷を受ける。このようなゲノム DNA の損傷が蓄積すると細胞死や細胞のがん化などに繋がるため、生物にはこれらの損傷を修復する機構を獲得している。一方、真核生物におけるゲノム DNA は核内タンパク質群とクロマチンを形成し、細胞核内に収納される。そのため、損傷を受けたクロマチン中のゲノム DNA を修復するために、クロマチンの構造がダイナミックに変化することが必要とされる。クロマチンリモデリング因子は、ATP 加水分解活性を利用してクロマチンの構造を変化させ、DNA 修復、転写、複製などの核内における DNA 機能発現を制御する。特に、酵母からヒトまで広く保存されているクロマチンリモデリング因子である INO80 複合体は、アクチンやアクチン関連因子群 (Actin-related-protein: Arp) などの 15 種類以上のサブユニットによって構成され、遺伝子発現の制御や DNA 修復に関与することが示されている。先行研究により、INO80 複合体は構成因子のひとつである Arp8 を介して DNA 二重鎖切断部位に集積することが報告された。しかし、Arp8 の DNA 切断部位への集積機構がこれまで不明であった。そこで本論文では、DNA 損傷修復における Arp8 の機能を明らかにする



ために、リコンビナントタンパク質として精製した Arp8 を用いて生化学的解析を行った。その結果、Arp8 は DNA 結合活性を有し、特に DNA 二重鎖切断損傷修復の過程で形成される単鎖 DNA に優先的に結合することを見出した。次に、先行研究により Arp8 が ATP と結合することが示されていることから、ATP が Arp8 の DNA 結合活性に与える影響を解析した。その結果、ATP の添加によって Arp8 の二重鎖 DNA への結合活性が顕著に低下した。一方、興味深いことに Arp8 の単鎖 DNA への結合活性については ATP を添加しても大きな影響を受けなかった。さらに、Arp8 をテトラサイクリン添加によってノックアウトできるヒト Nalm-6 B 細胞株を樹立し、細胞生物学的解析を行った。その結果、Arp8 を欠損した細胞は DNA 二重鎖損傷を導入するアフィディコリンおよびカンプトテシンに対して感受性を示し、DNA 損傷修復に異常が生じていることが明らかになった。以上より、DNA 二重鎖切断損傷修復において、Arp8 は DNA 修復時の過程で生じる単鎖 DNA に対する結合活性を通して INO80 複合体を損傷部位ヘリクルートし、INO80 複合体によるクロマチン構造変換を介した損傷修復機構に関与することが示唆された (図)。今後の研究により、DNA 損傷修復時における他の INO80 構成因子や修復関連因子群と Arp8 の DNA 結合活性との関連性が解明されれば、INO80 関連遺伝子の変異が原因となる慢性腎臓病などの疾病のメカニズムの理解に繋がることが期待される。

②木村班員らの論文が、Nature 誌に掲載されました。これは、徳永班員、大川班員との領域内共同研究による成果です。日経産業新聞、科学新聞、日経バイオテク ONLINE、Nature Reviews Molecular Cell Biology などに取り上げられました。

Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells

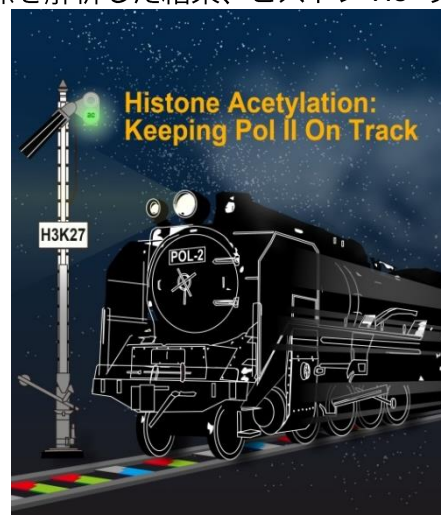
Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H.

Nature. 2014 Dec 11;516(7530):272-275

<http://www.nature.com/nature/journal/v516/n7530/full/nature13714.html>

真核細胞では、ヒストンの翻訳後修飾が遺伝子発現制御に重要な役割を果たすことがわかってきた。しかし、ヒストン修飾が、個々の細胞でどのように転写制御に働くのかは、ほとんど分かっていない。特に、特定の修飾が転写の能動的な調節因子であるのか、あるいは単に受動的な副産物であるのかを区別するのは、非常に困難である。それは、ほとんどの解析が、固定された細胞集団を用いていることや時間分解能が限られているからである。従って、単一生細胞において、より高い時間分解能で、ヒストン修飾と RNA ポリメラーゼ II (RNAP2) の動態を追跡する方法が必要となる。

我々は、蛍光標識した修飾特異的抗原結合断片を用いた生細胞解析法 (Fab-based live endogenous modification labeling; FabLEM) を開発し、ヒストン修飾の生細胞動態を解析してきた。今回、この系を活性化型 RNAP2 の指標となるリン酸化修飾に適用し、ステロイドホルモンで誘導される遺伝子の転写活性化の速度を計測した。また、ヒストン修飾レベルの変動と転写活性化の関係を解析した結果、ヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K27ac) のレベルが高い細胞では、転写因子のクロマチンへの結合が促進されることに加え、RNAP2 の転写開始から伸長への移行が促進されることが明らかになった。さらに、人工的に H3K27ac レベルを低下させた場合、転写の開始よりも伸長の反応に大きな影響が見られた。また、これらの生細胞解析の結果は、クロマチン免疫沈降と塩基配列解析 (ChIP-seq) によっても支持された。従って、H3K27ac は、おそらくクロマチンの脱凝縮を介して転写因子の結合を促進させる役割と RNAP2 の転写開始から伸長への移行を促進する役割を持つと考えられた。このように、単一の生細胞を用いた転写とヒストン修飾動態の解析により、今後の個々の細胞レベルでの遺伝子発現制御機構の解明が進むと期待できる。



3. 寄稿

接眼レンズ越しに見る細胞生物学 フリードリッヒ・ミーシャー 生物医学研究所 堀籠 智洋

SWR1 and INO80 Chromatin Remodelers Contribute to DNA Double-Strand Break Perinuclear Anchorage Site Choice.

Chihiro Horigome, Yukako Oma, Tatsunori Konishi, Roger Schmid, Isabella Marcomini, Michael Hauer, Vincent Dion, Masahiko Harata and Susan M. Gasser

Mol Cell. 2014 Aug 21;55(4):626-39

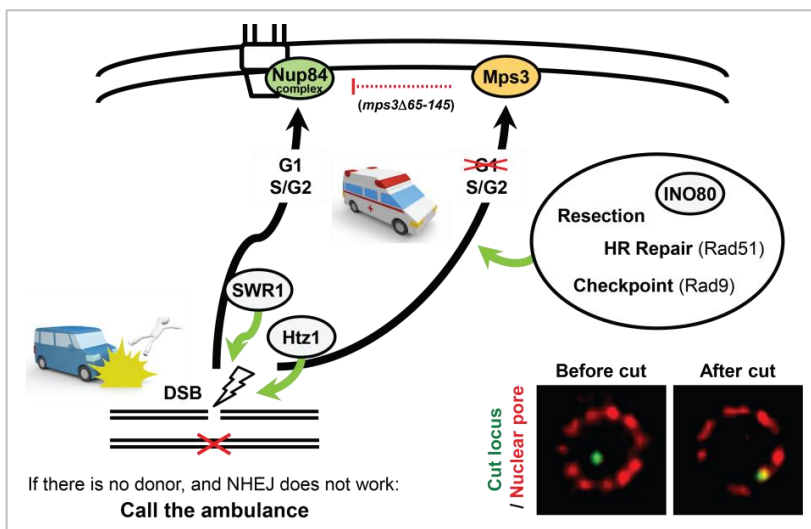
生きた細胞の顕微鏡観察は、場所、動き、量、形、色など実に多くの情報を与えてくれる。もちろん論文として共有可能なデータに仕上げるためには、これらの情報から必要な要素を抽出して、定量的に扱う必要がある。筆者はポスドクとしてスイスに移って以来、二本鎖切断を受けた DNA の場所と動きを制御する機構について注目した解析を進めている。

DNA 二本鎖切断 (DNA double strand break: 以下 DSB と表記する) は、核内において動的空間的に制御されている。出芽酵母において、DSB が引き起こされるとクロマチンの移動性がローカル (切断部位)、グローバル (非切断部位) に増大する (Dion et al. 2012, Nat Cell Biol; Mine-Hattab and Rothstein 2012, Nat Cell Biol; Seeber et al. 2013, Genes Dev)。また、持続的に引き起こされる DSB や崩壊した複製フォークが、核膜に移動して核膜孔 Nup84 複合体および核内膜 SUN ドメインタンパク質 Mps3 と結合することが示されている (Nagai et al. 2008, Science; Oza et al. 2009, Genes Dev; Kalocsay et al. 2009 Mol Cell; Oza et al. 2010, Cell Cycle)。興味深いことに、全ての DSB が核膜に移動するのではないことも分かっている。核膜移動には一定の条件がある。例えば、同一染色体上に相同組み換えに利用可能な配列がある場合は核膜への移動は起こらない。一方、相同配列が他の染色体上にある場合は移動が起こる。つまり、持続的に引き起こされ、修復が困難な DSB のみが核膜へ移動するようなのである。

この度発表した論文で我々は、SWR1 および INO80 クロマチンリモデリング複合体が核膜における DSB 結合部位の決定に影響を及ぼすことを明らかにした。定量的顕微鏡解析およびクロマチン免疫沈降法を組み合わせることにより、核膜孔への DSB の移動は細胞周期を通して観察されること、一方、Mps3 との結合は G1 期を除く細胞周期に特異的な現象であることを示した。Mps3 との結合は INO80 複合体および Rad51 に依存したが、SWR1 複合体によるヒストンバリエント Htz1 の DSB 部位への組み込みは、核膜孔および Mps3、両方の経路に必須であった (図参照)。核膜を構成する核膜孔と Mps3 は、DSB 修復において異なった経路で役割を果たしており、非正統的な組み換えである uSCR を協調的に抑制した。Mps3 との結合は DSB を他のクロマチン領域から隔離し、組み換えを抑制する。一方、核膜孔は SUMO 依存的ユビキチンリガーゼ Six5/Six8 と結合し、核膜縁のプロテアソームと共にエピスタティックな相互作用を示すことから、SUMO 化とその代謝を介して修復に機能している可能性がある。本研究は FMI、スーザン・ガッサー研究室そして東北大学、原田研究室の共同研究として行われた。共同研究では、HO エンドヌクレアーゼによる切断を誘導するための条件設定の段階から、綿密に情報をすり合わせて進めさせていただいた。本論文を日本・スイス国交樹立 150 周年にあたる 2014 年、両国の共同研究の成果として発表できたことは望外の喜びだ。

最近、自戒も含めて気になっていることがある。CCD カメラの普及により、我々細胞生物学者の接眼レンズを覗く機会が減ってはいないだろうか。顕微鏡の接眼レンズの代わりにディスプレイを凝視する研究者が増えたように思う。デジタルイメージを用いることによりデータの取得、保存、解析が容易になったが、カメラ越しの“観察”への移行によ

って失われたものも大きい。定量的解析手法が飛躍的に進んだ一方、豊穡な情報と示唆に富んだ「観察」がおろそかになっているのではないか。顕微鏡観察を基礎として、核小体形成領域 (nucleolus organizer region: NOR) の存在を提唱したバーバラ・マクリントックの言葉が思い出される。『私が細胞を見る時は、細胞のなかへ降りていき、そして周りを見回すのです』(エブリン・フォックス・ケラー『動く遺伝子』)。接眼レンズを覗いて、細胞のなかへ降りて行きたい。DNA 二本鎖切断が核内を動き回る様が見え、損傷修復の音まで聞こえてくるのだろうか。



4. 今後の予定

① 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～」

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/outreach/20150112.html>

日時：2015年1月12日(祝) 13:00～17:30(開場 12:30)

会場：千里ライフサイエンスセンター(大阪)

※参加申し込み・事前登録不要

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・斉藤典子)
- 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でできた糸絨を解いてみよう!(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)

② 本領域の国際シンポジウムが開催されます。

“Chromatin Structure, Dynamics, and Function”

<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/activities/20150823.html>

日時：2015年8月23-26日

会場：淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

※参加申し込み・演題登録などの詳細についてはウェブサイトでお知らせします。

Invited speakers:

Frederic Berger (GMI, Austria)
Kerstin Bystricky (Univ. Toulouse, France)
Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)
Roland Foisner (MFPL, Austria)
Peter Fraser (Babraham Inst., UK)
Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)
Anthony Imbalzano (Univ. Mass, USA)
Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)
Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)
Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)
Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)

International Symposium on
**Chromatin Structure, Dynamics,
and Function**
August 23-26, 2015

Registration and abstract deadline: Jun 30, 2015
<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>
Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
<http://www.yumebutai.org/english/index.html>

Organizers
Hitoshi Kurumizaka (Waseda Univ.)
Hiroshi Kimura (Tokyo Tech.)
Tokuko Haraguchi (NICT)

Overseas Invited Speakers
Frederic Berger (GMI, Austria)
Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)
Roland Foisner (MFPL, Austria)
Peter Fraser (Babraham Inst., UK)
Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)
Anthony Imbalzano (Univ. Massachusetts, USA)
Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)
Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)
Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)
Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)

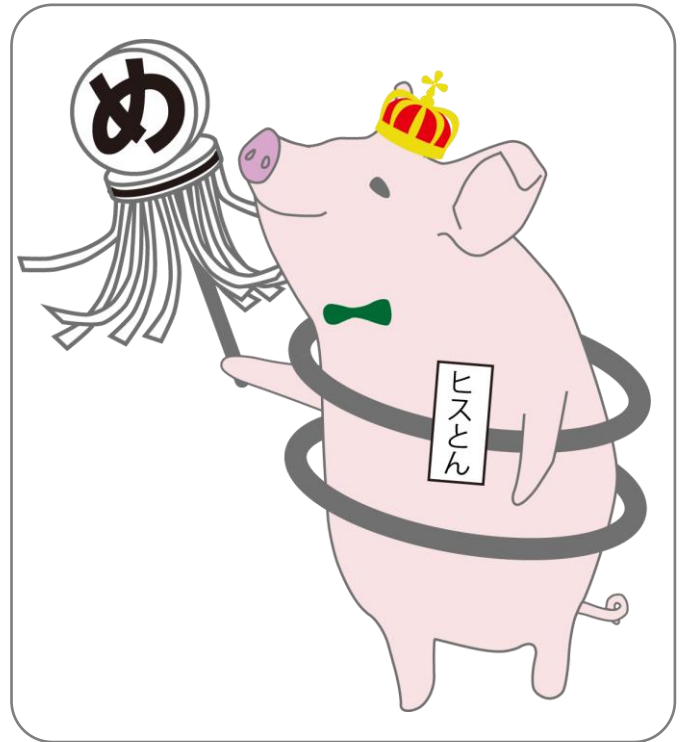
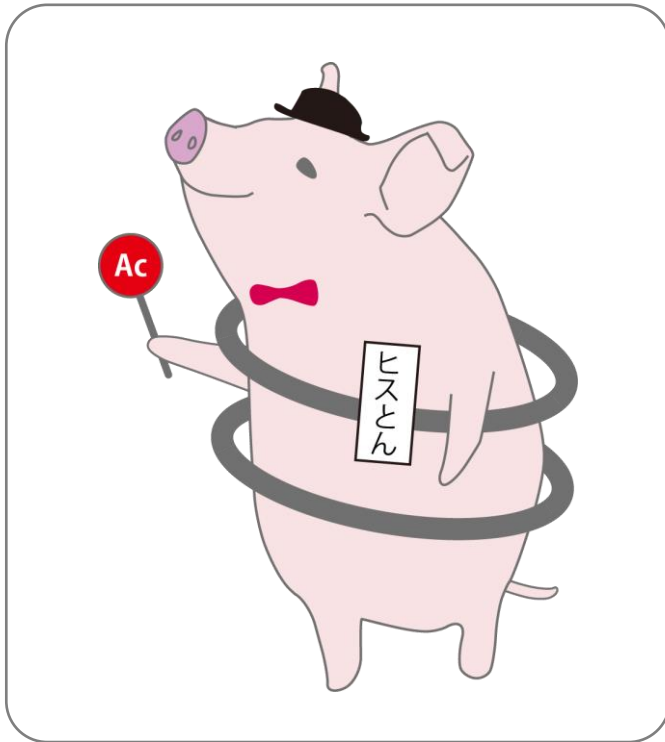
Supported by
Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Chromatin Structure,
Dynamics, and Function" from the MEXT of Japan
National Institute of Information and Communications Technology (NICT), Japan

編集後記：寒さが身に沁みる今日この頃ですが、いかがお過ごしでしょうか。私は年末年始も容赦なく宿題がてんご盛りの中、いつの間にか年が明けていて焦りました。みなさま風邪などひかれないうち、ご自愛ください。今年もどうぞよろしくお願いいたします。

HIKI

間違い探し

左右の絵で違うところはどこでしょう？



答えは本研究領域のホームページで！

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