

研究報告書

「階層的なクロマチン高次構造のライブイメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 宮成 悠介

1. 研究のねらい

ゲノム DNA はクロマチンとして折り畳まれ、それぞれの染色体はテリトリーを形成し、直径数 μm の核内にコンパクトに収納されている。クロマチン繊維は核内でランダムに存在するのではなく、階層的に組織化された構造をとる。その立体的なクロマチン高次構造は、転写や複製などの様々な核内現象に深く関与している。例えば、遺伝子の転写制御領域であるエンハンサーとプロモーターがループ状の立体構造を形成することで互いに相互作用し、その転写活性が調節される。近年の次世代シーケンス技術の発展により、クロマチン高次構造の網羅的解析が可能となり、細胞種特異的な核内ゲノム構造の存在が明らかとなってきた。一方、その解析には膨大な数の細胞 ($\sim 10^7$ 個) が必要であり、得られた結果は細胞集団の“平均値”でしかない。しかしながら、核内ゲノム構造は転写反応と同様に“動的”に変化するものであり、個々の細胞間での核内ゲノム構造は不均一である。

申請者は、ES 細胞などを使って”幹細胞の不均一性”に関する研究を進めてきた。これまでに、核内ゲノム構造が動的に変化することによって遺伝子発現の揺らぎが引き起こされ、その結果として ES 細胞の不均一性が生み出されることを明らかにした(Miyanari Y, Nature, 2012)。さらに、目的ゲノム配列の核内局在をライブイメージングする技術(TGV 法)を新たに開発することで、一細胞レベルでの核内ゲノム分布の動的変化を解析することに成功した(Miyanari Y, Nature Struc.Mol.Biol, 2013, Methods, 2014, Meth.Mol.Biol, 2016)。しかしながら、この技術ではクロマチン間の相互作用など「ローカルなクロマチン高次構造」を一細胞レベルで検出することはできない。

本研究課題では、クロマチン高次構造のイメージングする新たな技術を開発することで、転写などのゲノム機能を新たな視点から理解するシーズを構築することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

研究テーマ A: オープンクロマチン構造をイメージングする技術の開発

ATAC-seq 技術の応用展開をおこなうことで、オープンクロマチン構造をイメージングする技術の開発をおこなった。ATAC-seq 法は、バクテリア由来のトランスポゼース Tn5 と次世代シーケンサーと組み合わせることによって、ゲノム中のオープンクロマチン領域を網羅的に同定する技術である。本研究では、Tn5 を蛍光標識することによって、核内のオープンクロマチン構造をイメージングする技術「in situ ATAC 法」を開発した。in situ ATAC 法を用いることによって、オープンクロマチンの核内 3D 局在を解析することが可能となり、本技術開発を基盤として、更に以下の研究をおこなった。

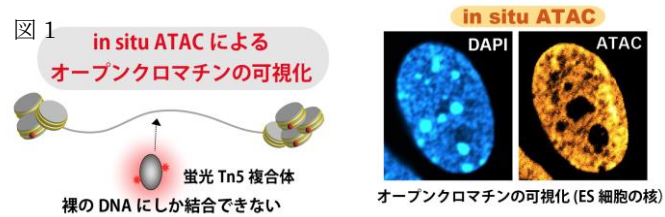
研究テーマ B; 細胞周期過程におけるクロマチン高次構造変化の解析

細胞周期におけるクロマチン高次構造が変化していく様子を詳細に解析し、細胞周期特異的なクロマチン状態を明らかにした。分裂期染色体は凝集したクロマチン構造をとることが知られていたが、これまでその詳細なクロマチン構造に関しては明らかにされていなかった。本研究において、分裂期染色体におけるオープンクロマチン構造、特に染色体表面における特殊なクロマチン構造が初めて明らかとなった。

(2) 詳細

研究テーマ A; オープンクロマチン構造をイメージングする技術の開発

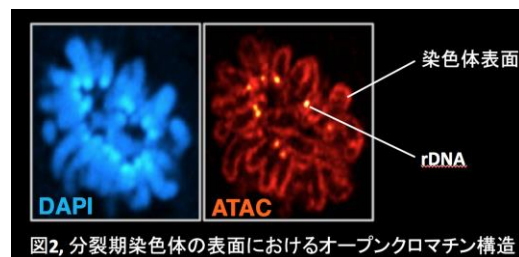
核内のオープンクロマチン構造をイメージングするためにトランスポゼース Tn5 を用いた。Tn5 は特異的なアダプターDNA配列と複合体を形成し、オープンクロマチン領域に特異的に結合



合することが知られている。ここでは、蛍光色素を導入したアダプターDNA を用いることで核内のオープンクロマチン構造を可視化する in situ ATAC 法を開発した(図 1)。in situ ATAC 法では、免疫染色などと異なり、クロマチンの「構造」をイメージングすることができる点で非常にパワフルである。一方、2017 年に同じコンセプトの技術(ATAC-seq 法、Nature Methods)が報告された。しかしながら、In situ ATAC 法では、ATAC-seq 法に比べて、10 倍高くオープンクロマチンを検出することができるため、その利点は大きい(論文投稿準備中)。

研究テーマ B; 細胞周期におけるクロマチン高次構造変化の解析

細胞周期におけるオープンクロマチン構造のダイナミクスを解析したところ、細胞周期を通してオープンクロマチン量がダイナミックに変化することが明らかとなった。分裂期染色体ではクロマチンが凝集しているため、オープンクロマチンは一時的に低下する。一方で、驚くべきことに、分裂期染色体の表面ではオープンクロマチン構造が維持されていることが明らかとなった(図2)。ATAC-seq 解析により、分裂期のオープンクロマチン領域を解析したところ、間期のオープンクロマチン領域とほぼ同じであったことから、転写活性が高くクロマチンアクセシビリティの高いゲノム領域は分裂期において染色体表面に局在する傾向にあることが初めて明らかとなった。これらの結果は、高感度な in situ ATAC により明らかとなった研究結果であり、従来の ATAC-seq 法では検出できなかったクロマチン構造であり、非常に興味深い(研究テーマ A と合わせて論文投稿準備中)。



3. 今後の展開

これまでクロマチン高次構造の解析は、次世代シーケンサーを用いた解析が主流であったため、核内の3次元空間内においてゲノム DNA がどのような構造をとり、そのダイナミクスを解析することは不可能であった。in situ ATAC 法の開発により、クロマチン高次構造のイメージングが可能となり、核内 3D 空間内におけるオープンクロマチン構造の局在が、どのように転写などのゲノム機能の制御に関与しているかを明らかにすることができる(論文投稿準備中)。我々の開発した ATAC 技術は高感度なイメージングによる画像解析と、次世代シーケンサーによる詳細なクロマチン高次構造の解析を、同じサンプルを用いて1細胞レベルで解析できることから、そのポテンシャルは非常に高い。既に、我々は本技術を用いることで、これまで明らかになっていなかった生命現象を明らかにしつつあり、新たなクロマチン構造ダイナミクスという新たな研究分野構築のための基盤技術として、期待できる。更に、オープンクロマチンの構築は遺伝子の転写活性と密接に関連しており、発生生物学研究、癌研究、幹細胞研究など様々な研究分野において、大きな波及効果を見込める。

また、in situ ATAC 法は、スクリーニングのアッセイ系としても非常に有用であり、クロマチン高次構造を制御する因子の同定および機能解析を現在おこなっている。オープンクロマチン構造の制御は、抗がん剤などの医薬品のターゲットとしても注目されており、in situ ATAC 法を用いたドラッグスクリーニングも可能であると考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

- 研究目的の達成状況

さきがけ研究期間では、ライブイメージングではなく膜透過処理した細胞のクロマチン構造イメージングの技術(in situ ATAC 法)の開発を重点的におこなった。当初目的としていた、クロマチン構造の「ライブイメージング」技術の開発は、これまでのところ達成されていない。現在、in situ ATAC 法を改良することにより、生きた細胞内でのオープンクロマチン構造のイメージング技術の開発を進めている。一方、本研究で開発した in situ ATAC 法(論文投稿準備中)を基盤とした、解析により全く新しい生命現象を明らかにしつつあり、本技術開発によるインパクトは非常に大きいと考えられる。

- 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

現在、独立したラボとして研究を遂行しており、さきがけ研究では1名の大学院生、および1名の研究支援員と共に研究をおこなってきた。さきがけ研究費は、研究に必要な顕微鏡システムの購入などに、適切に執行された。

- 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

クロマチン高次構造をイメージングするという新たな取組は、今後のクロマチン研究分野において大きな潮流を生み出す起爆剤となり得る。また、本研究で開発された技術は、クロマチン研究分野に限らず、遺伝子発現の変化を伴った生命現象に広く応用が可能であり、癌研究、幹細胞研究、発生生物学研究、細胞生物学など様々な研究分野に波及効果をもたらすと予想される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックおよび1期生成果評価会での総括・AD間での議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

クロマチン構造の“ライブ”イメージングという当初の目標設定は、非常に尖ったものでした。これは現在のところ達成されていませんが、固定1細胞の高精度クロマチン構造イメージング技術の開発を重点的に進め、既存の「ATAC-seq法」よりもはるかに検出精度、感度の高い「in situ ATAC法」を確立しました。これをベースとして細胞周期におけるオープンクロマチン構造のダイナミクスを解析し、分裂期のオープンクロマチン領域は間期のオープンクロマチン領域とほぼ同じであり、アクセシビリティの高いゲノム領域は分裂期において染色体表面に局在する傾向にあることを世界で初めて明らかにしました。これはここで開発に成功した高感度「in situ ATAC法」により明らかとなった研究結果であり、従来の「ATAC-seq法」では検出できなかったクロマチン構造です。十分な研究成果であり、インパクトのある論文へ早く進めることを期待します。

自らの研究に加えて、領域会議での積極的かつポイントを押さえたコメントや議論によって、さがけ1細胞解析研究領域をオープンで建設的な議論する集団とすることに大いに貢献しました。

文部科学大臣賞若手科学者賞を始め多数の表彰を受けており、また、クロマチンイメージングに関する多数の講演に招待されています。さがけ研究を契機に国内外の研究者との提携関係も作り、活躍の場を広げています。今後の発展が大いに期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

該当なし。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(招待講演)

- | タイトル | 発表先 |
|--|--|
| 1. クロマチンイメージングより迫るリプログラミング機構 | エピジェネティクス研究会、
学術総合センター(東京) 2015年5月25日 |
| 2. クロマチンイメージングより迫るリプログラミング機構 | 細胞生物学会、
タワーホール船堀(東京)、 2015年6月30日 |
| 3. Uncovering roles of chromatin structures in reprogramming process | 9 th Internal Symposium on Nanomedicine, Mie University 2015年11月30日 |
| 4. Imaging of Nuclear Architecture | Epigenetics and Chromatin, 1st HMGU-Japan Mini |

Symposium, Munich (Germany) 2017年9月4-5日

5. クロマチン高次構造の理解に向けて フロンティア生命化学研究会, 神奈川、
2018年1月5-6日

主要な受賞

1. 文部科学大臣表彰・若手科学者賞 クロマチン構造に着目した幹細胞研究
2016年4月20日
2. 竹中奨励賞 核内クロマチン動態を制御する因子の同定 2015年10月28日

著作物

1. ナノバイオメディシン (近代科学社) 2017 宇理須 恒雄 編 (共著者として参加)
2. Journal of Japanese Biochemical Society 88(4): 521-524 (2016), 栗原美寿々、宮成悠介