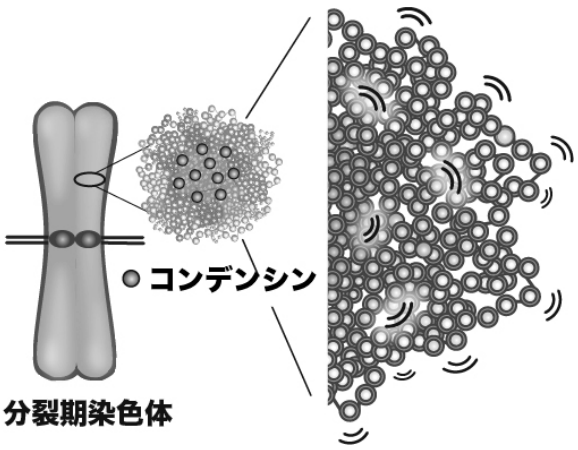
50　ヌクレオソーム動態から捉える分裂期染色体の凝縮過程	前島　一博

【目的】細胞の分裂期染色体の凝縮は、複製されたゲノムクロマチンを姉妹染色分体へと分離する驚異的な自己組織化過程であり、この過程の不具合は染色体異常、さらには細胞のがん化に直結する。この染色体の構築には、巨大なタンパク質複合体コンデンシンⅠ、ⅡやトポイソメラーゼⅡαの関与が知られているが、長いゲノムDNAからどのように染色体が構築されるのか？その原理は依然不明な点が多い。従来の定説によるモデルでは、まず負電荷を持つゲノムDNAが正電荷に富むヒストンに巻かれた構造であるヌクレオソームを作る。そしてヌクレオソームが規則正しく配置された30 nm線維、さらにらせん状に折り畳まれた階層構造を形成するとされてきた。しかし、前島らのクライオ電子顕微鏡や、SPring-8の放射光散乱を用いた解析では、ヒト分裂期染色体には30 nm線維を含めた階層構造が存在せず、ヌクレオソームの線維が不規則に折り畳まれていることが明らかになった。その後、同様な知見は様々な電顕技術を用いて他グループでも確認されている。このように不規則に折り畳まれたクロマチンは、規則的構造に縛られている場合に比べて物理的束縛が少なく、よりダイナミックに動くと予想された。実際、前島らが、生きた分裂期細胞内においてまばらに蛍光標識したヌクレオソーム1分子の動きを斜光照明顕微鏡で観察したところ、個々のヌクレオソームが50 msの短い時間にも数十nmと大きく揺らいでいることが分かった。すなわち分裂期を含め細胞のクロマチンは不規則でダイナミックな構造であることが明らかになった。本研究では、分裂期染色体凝縮過程をヌクレオソーム動態変化として捉え、1分子ヌクレオソームイメージングを用いて、染色体の個々のヌクレオソームの動きの変化を経時的に測定、解析することを目的とする。 さらに、染色体凝縮に必須な因子とされているコンデンシンⅠ、Ⅱの迅速除去操作を組み合わせ、これらの因子が染色体内のヌクレオソームの動きをどのようにコントロールしているのか？新しい観点から染色体構築過程を明らかにする。

【方法】細胞周期の間期のクロマチン、分裂期染色体の個々のヌクレオソームの動態を1分子イメージング技術で可視化した。具体的にはヒトHeLa細胞、あるいはHCT116細胞にHaloTagを融合させたヒストンH2Bを安定的に発現させた。H2B-Haloを少量のHaloTagリガンドTMRで標識し、斜光照明顕微鏡で個々のヌクレオソームをイメージングした。輝点の中心を正確に決定し、ヌクレオソームの動きのトラッキングを行った。トラッキングデータより個々のヌクレオソームがどのくらい拡散するのかを知る指標である平均二乗変位MSDを算出し、動態を解析した。

【結果】イメージングを用いて、間期クロマチンが主に熱ゆらぎによって揺らいでいることを示唆し、この局所的なヌクレオソーム運動が間期を通じてほぼ一定であることを明らかにした。一方、分裂期の染色体のクロマチンは、間期のそれよりも拘束され、動きが抑えられていることが分かった。さらに、コンデンシンはそのクロマチンの拘束を担っていることを示した。

分裂期染色体のヌクレオソームのゆらぎ



50. ヌクレオソーム動態から捉える分裂期染色体の凝縮過程

前島　一博

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 遺伝メカニズム研究系

Key words：ヌクレオソーム，1 分子ヌクレオソームイメージング，分裂期染色体，クロマチン，細胞周期

緒　言

細胞分裂期染色体の凝縮は、複製されたゲノムクロマチンを姉妹染色分体へと分離する驚異的な自己組織化過程であり、この過程の不具合は染色体異常、さらには細胞のがん化に直結する。この染色体の構築には、巨大なタンパク質複合体コンデンシンⅠ、ⅡやトポイソメラーゼⅡαの関与が知られているが［1］、長いゲノム DNA からどのように染色体が構築されるのか？その原理は依然不明な点が多い。従来の定説によるモデルでは、まず負電荷を持つゲノム DNA が正電荷に富むヒストンに巻かれた構造であるヌクレオソームを作る（図 1 上段）。そしてヌクレオソームが規則正しく配置された 30 nm 線維、さらにらせん状に折り畳まれた階層構造を形成するとされてきた（図 1 中段左）。しかし、前島らのクライオ電子顕微鏡や、SPring-8 の放射光散乱を用いた解析では、ヒト分裂期染色体には 30 nm 線維を含めた階層構造が存在せず、ヌクレオソームの線維が不規則に折り畳まれていることが明らかになった（図 1 中段）［2］。その後、同様な知見は様々な電顕技術を用いて他グループでも確認され［3］、本知見は Lewin's Genes Ⅻ、Elsevier Cell Biology など教科書でも紹介されている。このように不規則に折り畳まれたクロマチンは、規則的構造に縛られている場合に比べて物理的束縛が少なく、よりダイナミックに動くと予想された。

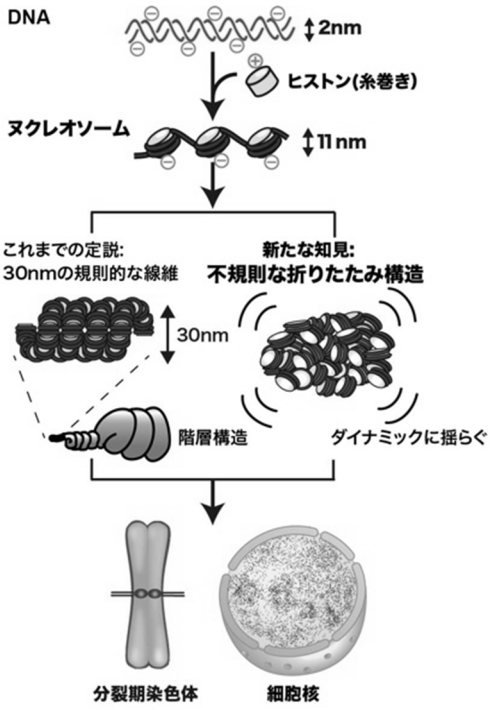


図 1. 新しいクロマチンモデル
クロマチンは規則正しく折り畳まれた状態（左）ではなく、
不規則で流動的な状態（右）である。

実際、前島らが、生きた分裂期細胞内においてまばらに蛍光標識したヌクレオソーム 1 分子の動きを斜光照明顕微鏡で観察したところ（図 2）、個々のヌクレオソームが 50 ms の短い時間にも数十 nm と大きく揺らいでいることが分かった［4］。すなわち分裂期を含め細胞のクロマチンは不規則でダイナミックな構造であることが明らかになった［2］。本研究では、染色体凝縮過程をヌクレオソーム動態変化として捉え、1 分子ヌクレオソームイメージングを用いて、染色体の個々のヌクレオソームの動きの変化を経時的に測定、解析することを目的とする。さらに、染色体凝縮に必須な因子とされているコンデンシンの迅速除去操作を組み合わせ、これらの因子が染色体内のヌクレオソームの動きをどのようにコントロールしているのか？新しい観点から染色体構築過程を明らかにする。

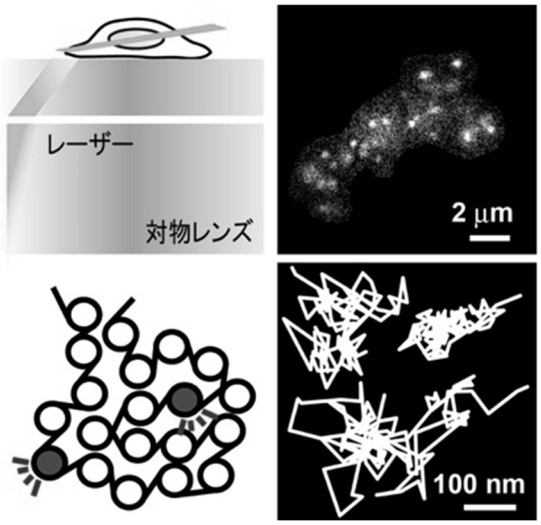


図 2. 1 分子ヌクレオソームイメージング
斜光照明法（左上）で、まばらに蛍光標識したヌクレオソーム（左下）を観察すると個々のヌクレオソームの輝点像（右上）と軌跡（右下）が得られる。

方法および結果

1. 1 分子ヌクレオソームイメージング

細胞間期各ステージのクロマチン、分裂期の染色体の個々のヌクレオソームの動態を 1 分子イメージング技術で可視化させた。具体的にはヒト HeLa、あるいは HCT116 細胞に HaloTag を融合させたヒストン H2B を安定的に発現させた。H2B-Halo を少量の HaloTag リガンド TMR で標識し、斜光照明顕微鏡（図 2）で個々のヌクレオソームのイメージングを行った。輝点の中心を正確に決定し、ヌクレオソームの動きをトラッキングする。トラッキングデータより個々のヌクレオソームがどのくらい拡散するのかを知る指標である平均二乗変位 MSD を算出し、動態を解析した。

2. 同調細胞を用いた各細胞周期ステージにおけるクロマチンの動きの解析

HeLaG1 期細胞は CDK2 阻害剤であるロバスタチンを用いて誘導し、LateS-G2 期同期はチミジンブロックと 8 時間リリースを用いて達成した。細胞の同期はフローサイトメトリーで確認した。ロバスタチン処理により、75%の細胞が G1 期に停止した。一方、チミジンブロックとリリース処理により、94%の細胞が G1 期細胞の 2 倍の DNA 量を持つ S 期後半および G2 期で同期した。LateS-G2 期細胞の核は、G1 期細胞の核よりもはるかに大きく見えた（図 3）。ホルムアルデヒド（FA）固定した G1 および LateS-G2 細胞の核体積を、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて画像化、定量解析した。核体積は、ゲノム DNA の倍増に伴い、G1 期（510 ± 121 μm^3）から LateS-G2 期（1,263±129 μm^3）にかけて 2.47 倍になった。興味深いことに、非同期細胞、G1 期細胞、LateS-G2 期細胞の間で、局所的なクロマチンの動きに大きな違いは見られなかった（図 3）。また、このことから、間期細胞周期において、DNA 量や核体積の増加にかかわらず、局所的なクロマチン運動は変化しないことがわかった［5］。

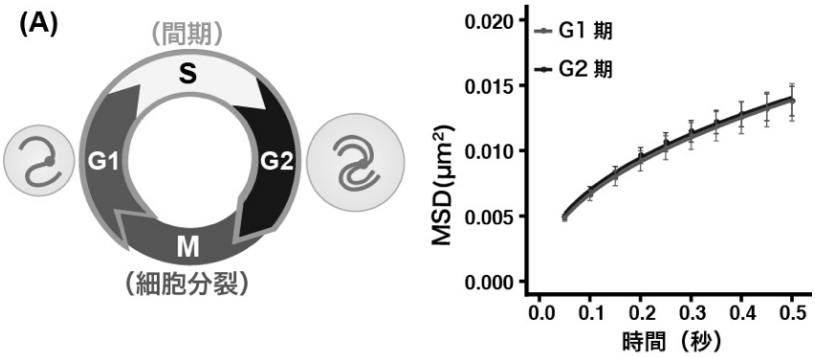


図 3. 間期細胞における 1 分子ヌクレオソームイメージング
細胞周期を G1 と LateS-G2 期に同調した細胞で 1 分子ヌクレオソームイメージングを行った結果、その動きに差が無いことが明らかとなった。

HCT116 細胞の様々な分裂期ステージは CDK1 阻害剤 RO-3306 で G2 に同期した G2 期細胞をリリースし、Prophase、prometaphase、metaphase、anaphase、telophase の細胞をモニターした。分裂期の進行、凝縮が進むにつれて、クロマチンは拘束され、MSD は低下した。そして、telophase で脱凝縮が始まると、その拘束は軽減され、MSD は増加した。では、凝縮過程では何がクロマチンを拘束しているのだろうか。

3. コンデンシン迅速除去細胞を用いた分裂期染色体のクロマチンの動きの解析

コンデンシンは細胞分裂期の染色体形成のキープレイヤーであり［1]、染色体の軸のように局在する。コンデンシンが拘束過程に関わるかどうかを検討した。脊椎動物では、コンデンシンにはⅠとⅡの 2 種類が存在する［1]。まず、ヒト HCT-116 細胞を用いて、Auxin Inducible Degron（AID）システム［6］により metaphase 染色体中の両コンデンシンの迅速な除去を行った。ここでは SMC2 を mAID ドメインと mClover でタグ付けし、H2B-Halo を安定的に発現するヒト HCT116 細胞での除去効率をモニタリングした。オーキシン添加後わずか 30 分で観察された分裂期細胞では SMC2 が除去され、その結果、染色体は異常な形態を示し、以前の報告とよく一致した。コンデンシンⅠとⅡの急速な除去は、ヌクレオソームの動きをほぼ間期レベルまで劇的に増加させた（図 4）。凝縮過程では、より多くのコンデンシンがクロマチンファイバーを捕捉し、ループを作り、クロマチンの動きを拘束していると推定される。

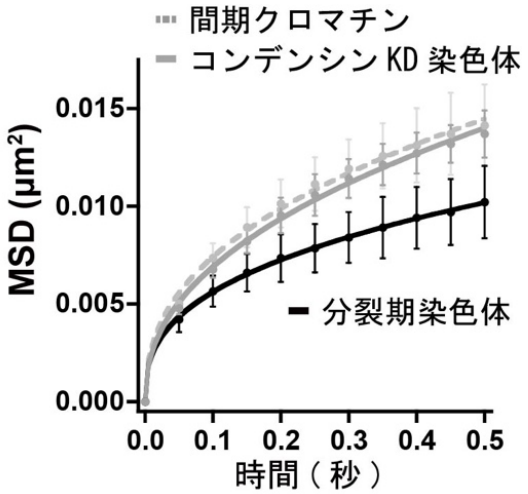


図 4. 分裂期染色体の 1 分子ヌクレオソームイメージング
コンデンシンⅠとⅡの両方を迅速分解除去すると、染色体中のヌクレオソームの動きが上昇し、その動態は間期クロマチンと同程度であることが明らかとなった。

考　察

クロマチンは何によって動いているのだろうか？クロマチンは ATP に依存して長距離を移動することもあるが、一分子ヌクレオソームイメージングで観察された局所的なクロマチンの動きは、ポリマーの熱ゆらぎのみを動力とした計算機シミュレーションでよく再現された［5］。したがって、局所的なクロマチンの動きは、主に熱ゆらぎによって説明できると考えられる。熱ゆらぎによる動きの程度は、クロマチンにかかる拘束、および温度のみによって決まると考えられる。これと一致するように、局所的なクロマチンの動きは、細胞周期の間期を通して一定であることを見出した（図 5）［5］。細胞周期が G1 期、S 期、G2 期と進行するのに伴い、核は 2 倍以上に成長し、DNA は複製によって 2 倍になる。しかし、クロマチンの動きの程度は、このような核内環境の変化に影響されることなく、一定を保ち続けた［5］。さらに、DNA 複製を阻害し、DNA の量を変えずに、核だけを大きくしても、クロマチンの動きは変化しなかった［5］。このようなクロマチンの動きの細胞周期を通じた定常性は、細胞システムの安定性と密接に関わっていると考えられる。局所的なクロマチンの動きの程度は、転写や複製に関わるタンパク質のターゲット DNA 配列への近づきやすさと直接関連すると予想される。クロマチンの動きが一定であることによって、たとえばハウスキーピング遺伝子の転写、DNA の複製が、核の大きさやクロマチン密度に影響されず、常に同じ環境で実行できることが考えられる。

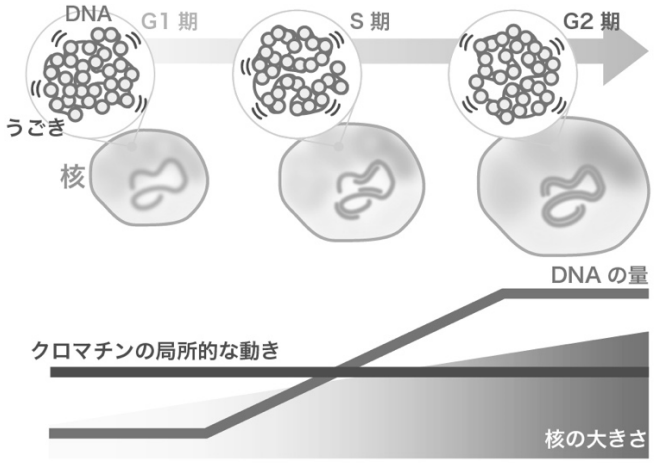


図 5. 間期の局所クロマチンの動き
核のサイズ、DNA の量にかかわらず、クロマチンの局所的な動きは一定であることが明らかとなった。

局所クロマチンの挙動は、生きた細胞における空間的・時間的な染色体構成を反映するはずなので、このイメージングによって、細胞分裂時の染色体凝縮過程について新たな知見を得ることができる。熱ゆらぎによって駆動されていると思われる局所的なヌクレオソーム運動は、間期には一定であるが［5］、細胞分裂時の凝縮過程では、コンデンシンがクロマチンファイバーを捕まえてループを作り、クロマチンを拘束するため、ますます制約が強くなった（図 4）。

最近の高分子物理学の観点からは、クロマチンには粘弾性的な性質があるのではないかと考えられ［7］、測定に用いる時間スケールやサイズスケールによってクロマチンの物性が変化する可能性がある。実際、間期クロマチンは、分単位あるいはそれ以上の時間スケールでは固体状に見え［8］、領域内に占める各染色体のテリトリーや染色体の混合が見られないことからも明らかであった。一方、間期クロマチンは、短いタイムスケールを用いて測定すると、局所的に柔軟で液体的である［5，9］。我々の結果は、細胞分裂期のクロマチンが間期クロマチンよりも拘束されていることを示し、コンデンシンが「クロスリンカー」として働いてクロマチンを拘束していることを示唆した。また、分裂期染色体はハイドロゲルのように振る舞うという概念［10］を支持するデータも得られた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立遺伝学研究所の鐘巻将人教授、理化学研究所の新海創也博士、大浪修一博士である。

文　献

1) Hirano T. Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. Cell. 2016;164(5):847-57. Epub 2016/02/27. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.033. PubMed PMID: 26919425.

2) Maeshima K, Ide S, Babokhov M. Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. Curr Opin Cell Biol. 2019;58:95-104. Epub 20190322. doi: 10.1016/j.ceb.2019.02.003. PubMed PMID: 30908980.

3) Ou HD, Phan S, Deerinck TJ, Thor A, Ellisman MH, O'Shea CC. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. Science. 2017;357(6349):eaag0025. doi: 10.1126/science.aag0025. PubMed PMID: 28751582; PMCID: PMC5646685.

4) Hihara S, Pack CG, Kaizu K, Tani T, Hanafusa T, Nozaki T, Takemoto S, Yoshimi T, Yokota H, Imamoto N, Sako Y, Kinjo M, Takahashi K, Nagai T, Maeshima K. Local nucleosome dynamics facilitate chromatin accessibility in living mammalian cells. Cell Rep. 2012;2(6):1645-56. Epub 20121213. doi: 10.1016/j.celrep.2012.11.008. PubMed PMID: 23246002.

5) Iida S, Shinkai S, Itoh Y, Tamura S, Kanemaki MT, Onami S, Maeshima K. Single-nucleosome imaging reveals steady-state motion of interphase chromatin in living human cells. Science Advances. 2022;8:eabn5626. doi: 10.1126/sciadv.abn5626.

6) Yesbolatova A, Saito Y, Kitamoto N, Makino-Itou H, Ajima R, Nakano R, Nakaoka H, Fukui K, Gamo K, Tominari Y, Takeuchi H, Saga Y, Hayashi KI, Kanemaki MT. The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice. Nat Commun. 2020;11(1):5701. Epub 20201111. doi: 10.1038/s41467-020-19532-z. PubMed PMID: 33177522; PMCID: PMC7659001.

7) Zidovska A. Chromatin: Liquid or Solid? Cell. 2020;183(7):1737-9. Epub 2020/12/29. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.044. PubMed PMID: 33357397.

8) Strickfaden H, Tolsma TO, Sharma A, Underhill DA, Hansen JC, Hendzel MJ. Condensed Chromatin Behaves like a Solid on the Mesoscale In Vitro and in Living Cells. Cell. 2020;183(7):1772-84 e13. Epub 20201215. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.027. PubMed PMID: 33326747.

9) Nozaki T, Imai R, Tanbo M, Nagashima R, Tamura S, Tani T, Joti Y, Tomita M, Hibino K, Kanemaki MT, Wendt KS, Okada Y, Nagai T, Maeshima K. Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. Mol Cell. 2017;67(2):282-93 e7. Epub 20170714. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.018. PubMed PMID: 28712725.

10) Schneider MWG, Gibson BA, Otsuka S, Spicer MFD, Petrovic M, Blaukopf C, Langer CCH, Doolittle LK, Rosen MK, Gerlich DW. A chromatin phase transition protects mitotic chromosomes against microtubule perforation. bioRxiv. 2021:2021.07.05.450834. doi: 10.1101/2021.07.05.450834.