

氏 名 永島 峻甫

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2085 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin  
networks via active RNA polymerase II

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之  
教授 井ノ上 逸朗  
教授 鐘巻 将人  
教授 齋藤 都暁  
教授 山口 雄輝 東京工業大学  
生命理工学院

(様式3)

## 博士論文の要旨

氏名 永島 峻甫

論文題目 Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks  
via active RNA polymerase II

In our body, 2 m of genomic DNA, which encodes genetic information, is packaged in the cell nucleus with a diameter of  $\sim 10 \mu\text{m}$ . The long stranded DNA is wrapped around histone octamers to form nucleosomes and three-dimensionally organized in the cells as chromatin. In the process of information output (gene transcription), which specifies cellular function and subsequent fates, both chromatin organization and dynamics play a critical role in governing accessibility to genomic information. Generally, people think that transcribed chromatin regions are more open and dynamic. Contrary this general view, however, we previously revealed that transcriptional inhibition by an inhibitor 5, 6-Dichloro-1- $\beta$ -D -ribofuranosyl benzimidazole (DRB) treatment globally upregulated the chromatin movements in whole nucleus in living human cells. This suggested that transcriptional process globally constrained the chromatin dynamics. In this thesis, I investigated the mechanism how the chromatin dynamics is globally constrained by transcription. For this purpose, I performed single nucleosome imaging under several transcriptional conditions using several methods including inhibitor treatments of RNA polymerase II (RNAPII) and other transcriptional processes, RNAPII rapid depletion, and serum starvation to enter the cells into quiescent (G0) state.

To measure the chromatin dynamics, I established human RPE-1 cell line stably expressing histone H2B tagged with Halotag protein and performed single nucleosome imaging. At first, to examine the role of the transcriptional process in constraint of chromatin motion, I treated the RPE-1 cells with DRB or  $\alpha$ -amanitin ( $\alpha$ -AM). Both

inhibitors are known to reduce active RNAPII from chromatin. Indeed both inhibitors treatments significantly reduced the amount of active RNAPII and globally upregulated chromatin dynamics, as consistent with our previous report. Based on these results I hypothesized that active RNAPIIs on chromatin restricted the chromatin dynamics.

To test this hypothesis, I examined the effect of another inhibitor, actinomycin D (ActD), which induces stalling of active RNAPII on chromatin. While ActD treatment reduced global RNA synthesis in the cells, the amounts of active RNAPII marks in the treated cells were similar or slightly higher than those of untreated control cells, suggesting more active RNAPIIs on the chromatin. As contrasted with the DRB and  $\alpha$ -AM results, ActD treatment decreased the chromatin dynamics and induced more chromatin constraints. This result supported that active RNAPII complexes on chromatin constrained the chromatin movements.

To demonstrate the involvement of RNAPII in the constraints of chromatin movements more directly, I generated DLD-1 cells that enable me to perform rapid and specific degradation of RPB1, the largest subunit of RNAPII, by an auxin-inducible degron (AID) system. The DLD-1 cells were also expressed H2B-HaloTag. In the established cells, RPB1 was rapidly depleted within one hour after auxin addition and the chromatin dynamics was significantly increased. This result strengthened my hypothesis that RNAPII directly constrains chromatin movements.

Furthermore, to investigate chromatin constraints by active RNAPII in a more physiological state, I induced the RPE-1 cells into a transcriptionally less active G0 state by serum removal from the culture medium. G0 entry was confirmed by loss of the proliferation markers Ki67 or Topoisomerase II $\alpha$  in the treated cells. I showed the G0-induced cells increased the chromatin dynamics and decreased active RNAPIIs, as

compared with untreated control cells. In addition, one day after serum restoration into medium, the cells became Ki67 positive and suppressed chromatin movements. Concurring with this chromatin dynamics decreased, active RNAPII marks were restored in the serum re-added cells. Taken together, these results revealed chromatin constraints by active RNAPII in physiological context.

Using single nucleosome imaging, I investigated genome-wide chromatin dynamics in a whole nucleus of living cells, and demonstrated the constraints on chromatin movements via active RNAPII. What is the underlying molecular mechanism for globally constraining chromatin motion? Related to this issue, it has been long proposed that stable clusters of RNAPII work as transcription factories and immobilize chromatin to be transcribed. Recent studies have also shown that active RNAPII and P-TEFb complex consisting of Cyclin T1 (CYCT1) and CDK9 kinase, which interact with RNAPII, form clusters in living cells. Based on available and obtained data, I considered the following model: Transcription complex/clusters including active RNAPII weakly connect multiple chromatin domains for a loose spatial genome chromatin network. Chromatin is thus globally stabilized or constrained by the loose network. In this model, P-TEFb clusters work as “hubs” and active RNAPIIs working on the cluster work as “glues” for the multiple weak interactions in the network. Consistent with this, knockdown of CDK9 by siRNA upregulated chromatin movements upon reduction of CDK9 protein levels in the RPE-1 cells.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 永島 峻甫

Title  
論文題目 Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks via active RNA polymerase II

永島さんは、核内でのクロマチンの動きと転写の関係について研究を行った。まず、ヒト RPE-1 細胞において、ヒストン H2B に融合した Halo タグを介した染色と薄層斜光顕微鏡法により、クロマチン内の H2B のゆらぎ (Mean square displacement (MSD)) を 1 分子レベルで測定する系を確立した。そして、以下の解析から染色体に結合した RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) がクロマチンの動きを制約していると結論している。

最初に転写阻害剤 DRB、 $\alpha$ -アマニチン、アクチノマイシン D のクロマチンの動きへの効果を調べた。DRB は、RNAPII をリン酸化する CDK9 を阻害して転写伸長を抑え、RNAPII の染色体からの解離を促進する。 $\alpha$ -アマニチンは、RNAPII の触媒サブユニットの活性中心近傍に結合し、このサブユニットの分解を促進する。DRB 又は  $\alpha$ -アマニチン処理により MSD は大きくなり、クロマチンの動きが大きくなることが分かった。一方、転写中の RNAPII を DNA 上で停止させるアクチノマイシン D では MSD はむしろ小さくなり、クロマチンの動きは減少していた。次に、オーキシシンにより人為的にタンパク質分解を誘導するオーキシシンドグロン系を用いて、RNAPII の触媒サブユニットを分解した。その結果、MSD は増加し、クロマチンの動きが大きくなったことが分かった。さらに、G0 期に誘導された細胞では、転写時に観察される RNAPII のリン酸化が抑えられ、クロマチンの動きも増加することが分かった。G0 期細胞に血清を添加すると、クロマチンの動きは再び抑えられた。

以上の結果は、転写そのものではなく RNAPII の染色体への結合がクロマチンの動きを制約していることを示唆している。永島さんは最後に、このクロマチンの動きの変化が起こすモデルを提案している。RNAPII は会合する P-TEFb とともにクラスタリングすることが知られている。クラスタリングした RNAPII-P-TEFb がハブとなってクロマチンドメイン同士がゆるいネットワークを形成し、クロマチンの動きに制約を与えているというモデルである。CDK9 とサイクリン T1 から成る P-TEFb のサイクリン T1 が液-液相分離によりクラスタリングすることが報告されているが、CDK9 を DRB により阻害した結果に加え、siRNA により CDK9 量を抑えた場合にも、クロマチンの動きが大きくなることを示しており、このモデルを支持する。

以上のように本論文は、クロマチンの動きが RNA ポリメラーゼ II との結合により制約されるという新たな知見を示し、染色体研究の進展に大きな寄与をするものと考えられる。従って、本論文は学位授与の要件を十分満たすものと審査員一同判断した。