

氏 名 日原 さえら

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1562 号

学位授与の日付 平成24年9月28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 Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility
in Living Mammalian Cells

論文審査委員 主 査 教授 仁木 宏典
教授 五條堀 孝
教授 深川 竜郎
助教 飯田 哲史
主任研究員 佐甲 靖志 理化学研究所

In cell nuclei or mitotic chromosomes, long strings of genomic DNA are organized three-dimensionally to perform genome functions during cellular proliferation, differentiation, and development. The DNA is wrapped around histones, forming a nucleosome structure. The nucleosome had been assumed to be folded into a 30-nm chromatin fiber and other helical folding structures. However, recent studies, including our cryo-microscopy (cryo-EM) and synchrotron X-ray scattering analyses, have shown almost no visible 30-nm chromatin fibers or other regular structures in interphase nuclei and mitotic chromosomes. This suggests that chromosomes consist of irregularly folded nucleosome fibers comprising a polymer melt-like structure. Thus, nucleosome fibers may be constantly moving and rearranging at the local level. These local nucleosome dynamics could be crucial for various genome functions.

I studied the dynamic aspects of nucleosomes in living cells. Because the dynamic chromatin environment in living cells is difficult to study using traditional fluorescence and electron microscopy, I used, with the help of my collaborators, a combination of fluorescence correlation spectroscopy (FCS), single molecule imaging, and Metropolis Monte Carlo computer simulations.

First, to determine the chromatin environment in living cells, I employed FCS using free enhanced green fluorescent proteins (EGFPs). FCS detects the Brownian motion of free EGFPs in a small detection volume based on fluorescence intensity fluctuations and provides the diffusion coefficient (D) of the EGFPs, which indicates how far the molecules can move in a particular time. Thus, D gives useful information on their environment, with a smaller D indicating that the molecule exists in a more crowded environment, and vice versa. I measured D s of EGFP-monomer, -trimer, or -pentamer molecules in interphase chromatin and mitotic chromosomes. Unexpectedly, D in mitotic chromosomes was quite comparable to that in interphase chromatin, thus suggesting that protein mobility in interphase chromatin and that the mitotic chromosome is comparable.

Next, based on the physical parameters obtained via FCS, the chromatin environment *in silico* was reconstructed using the Metropolis Monte Carlo method to simulate EGFP behavior under various chromatin conditions. To simulate the diffusion of EGFP pentamers from the Stokes-Einstein relation, I represented EGFP-pentamer molecules as 13-nm-diameter green balls. Nucleosomes were represented as 10-nm-diameter red balls and fixed in a space at a concentration of 0.1 or 0.5 mM. The 0.5-mM condition corresponded to mitotic chromosomes and likely interphase heterochromatin. In the environment with 0.1-mM red balls under a fixed condition, the green balls moved around quite freely. However, with 0.5-mM fixed red balls, which represented a dense heterochromatin or chromosome environment, green balls could not move far from their starting position and were trapped in a confined space.

Although this simulation suggested that EGFP pentamers in fixed chromatin environments cannot move around freely, it was inconsistent with FCS measurements in the living chromatin environment, in which the apparently free diffusion of EGFP pentamers was observed.

To determine the conditions that could recapitulate the observations *in vivo*, next a simulation with fluctuating red balls was performed. Each red ball acted like “a dog on a leash,” being set in random motion within a certain distance range from the origin. In this dynamic chromatin environment, the green balls appeared to diffuse freely, even with 0.5- μ M red balls. Strikingly, a 20-nm maximum displacement of red balls was sufficient for green balls to diffuse freely in the chromatin environment. This finding suggests that the dynamic fluctuation of nucleosomes facilitates the free diffusion of proteins in a compact chromatin environment, such as that in mitotic chromosomes, as well as dense heterochromatin.

An obvious next question was whether the nucleosome fluctuations predicted by the simulation occur in living cells. Therefore, I performed single-particle imaging of nucleosomes in living cells. I fused photoactivatable (PA)-GFP with histone H4, which is a stable core histone component, and then expressed the fusion protein in cells at a very low level. For single nucleosome imaging, I used highly inclined and laminated optical sheet (HILO) microscopy. Unexpectedly, I found that a very small number of PA-GFP-H4s in the stable cells spontaneously activated without laser activation and could be observed as dots. With this imaging system, I recorded nucleosome signals in interphase chromatin and mitotic chromosomes at a video rate of \sim 30 ms/frame as a movie. The averaged displacements (movements) in 30 ms in interphase chromatin and mitotic chromosomes were 51 and 59 nm, respectively, and showed a similar fluctuation in both interphase and mitotic chromatin. Since the displacements of fluorescent beads on the glass surface or in cross-linked nucleosomes in glutaraldehyde-fixed cells were much smaller than those observed in living cells, I concluded that the majority of the displacement came from the movement of nucleosomes in living cells, and not from the drift of the microscopy system.

Last, I examined whether local nucleosome dynamics drive chromatin accessibility or targeting in dense chromatin regions. To do so, I used immunostaining of condensin in mitotic chromosomes as a model system in dense chromatin regions. Immunostaining signals demonstrated that the antibodies (150 kDa, $>$ 15 nm) targeted the condensin complexes in the chromosome axes. Although I detected antibody signals in the chromosome axes of non-fixed cells, far fewer were observed in glutaraldehyde-fixed cells. This finding is consistent with the previous results and indicates that tight cross-linking of nucleosomes blocks antibody accessibility and targeting.

In this study, I showed that interphase chromatin and dense mitotic chromosomes have comparable protein diffusibility. In both chromatins, I observed a novel local dynamics of individual nucleosomes (\sim 50 nm movement/30 ms) caused by Brownian motion. The

inhibition of this local dynamics by cross-linking impaired diffusibility and targeting efficiency in dense chromatin regions. I propose that this local movement of nucleosomes is the basis for scanning genome information.

染色体は最小基本単位であるヌクレオソーム線維がらせん状に規則正しく折り畳まれて、直径約 30nm のクロマチン線維で構成されているという構造モデルが提唱され、現在広く受け入れられている。このモデルにおいて、分裂期染色体はこの 30nm クロマチン線維がらせん状に巻かれて 100nm の線維をつくり、つぎに 200-250nm、さらには 500-750nm と規則正しいらせん状の階層構造（積み木構造）を形成すると考えられている。しかし、近年、X 線散乱や電子顕微鏡の観察によってヌクレオソーム線維の存在を示す「直径 11nm の構造」は観察できるが、定説の「直径 30nm のクロマチン線維構造」は観察できないことから、実際の染色体には 30nm クロマチン線維構造は無く、ヌクレオソーム線維が細胞の中に不規則に収納された状態で染色体が存在しているというモデルが発表されている。この新モデルによれば、クロマチン線維は従来考えられてきたよりも動的で柔軟性に富むはずである。本論文で日原さえらは、このモデルを実証するために、生きた細胞の染色体を用いて予想されるクロマチン線維の動的な柔軟性を定量的に解析することを目指した。

生きた細胞での染色体環境を観察するため、蛍光相関分光法 (FCS) を新たに用いた。この方法は共焦点顕微鏡で微小領域の蛍光物質を標的とし、その蛍光強度のゆらぎを測定し拡散の程度を定量化するものである。本研究では蛍光物質に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を用いた。FCS では微小領域での観察が可能であるが、それでもヒトの染色体は小さすぎるため、染色体が大きいことで知られるインドキヨンの培養細胞を使うことでこの問題を克服した。各種 EGFP を発現する細胞を作成し、間期核と分裂期染色体内での EGFP の分子運動を比較した。間期核と分裂期の染色体の凝縮度が異なるにも関わらず、この方法で得られた EGFP の拡散係数は、間期核と分裂期の染色体でとそれほど変わらないというものであった ($15\text{-}20\mu\text{m}^2/\text{s}$)。この結果は、分裂期染色体は高度に凝縮していると考えられるが、タンパク質は比較的自由に拡散することを示唆した。次に、観察から得られたパラメーターを用い、計算機シミュレーションで染色体環境の再構成をおこなった。この結果、ヌクレオソームがゆらぐことによって、凝縮度が高い分裂期染色体やヘテロクロマチンにおいても、タンパク質が自由に拡散できることが判明した。これは、FCS で解析の結果を説明し、ヌクレオソームがゆらぐことが重要であることを示唆している。さらに、このヌクレオソームのゆらぎをヌクレオソーム 1 分子の蛍光観察という別の方法でも示すことができた。このヌクレオソームのゆらぎは間期核と分裂期の染色体においてほとんど変わらない。さらに、染色体内のタンパク質をクロスリンクするとこのゆらぎ運動を止めることができ、染色体内のタンパク質の拡散も抑えられた。間期核内では、DNA 情報の検索や転写が盛んに行われている。この時、DNA がある程度の自由度を持って不規則に収納されていれば、個々のヌクレオソームが動ける余地が増え、RNA ポリメラーゼや転写因子の DNA への結合を促進させ遺伝情報の検索に効率が良いという仮説を提唱している。このゆらぎは、分裂期染色体においても保たれていることを本論文で示しており、これは、これまでの概念を覆す発見である。

以上のように、本申請論文の内容は細胞生物学的な観察により染色体中のクロマチンの運動を定量的に解析し、細胞周期の変動に応じて染色体の構造と運動がどのように制御さ

れているのか明らかにしている。動的な柔軟性が間期核だけでなく、分裂期の染色体の構造にも共通して存在することを実験的に示した独創的な研究成果といえ、科学的に高く評価できる。以上の理由から、日原さえらさんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。