

平成30年6月26日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0149

研究課題名(和文) 核内染色体テリトリーの自己組織化と染色体ゲノム進化

研究課題名(英文) Self-organization of chromosome territories within the cell nucleus with regard to chromosome evolution

研究代表者

田辺 秀之 (Tanabe, Hideyuki)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・准教授

研究者番号：50261178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核内の「染色体テリトリー」がどのような仕組みで核内空間に配置されているのか、テナガザル科における核型高速進化の現象に着目し、進化的転座切断部位(ECBs)の放射状核内配置を3D-FISH法により解析し、検討を行った。ECBsが核内空間にランダムで一様に分布する場合は、自己組織化・ランダム分布モデル、特定の放射状ゾーンで顕著に転座が生じている場合は、制御因子誘導モデルと呼ぶことができるが、実験結果より、前者の「自己組織化・ランダム分布モデル」が適用されるものと考えられた。RバンドとGバンド領域の放射状分布がわずかに異なること、反復配列のシグナル強度が核中心付近で増強している傾向が見出された。

研究成果の概要(英文)：Individual chromosomes are occupied as chromosome territories (CTs) within the cell nucleus. How are CTs spatially localized? To explore this question, I focused on the gibbons showing the highest speed of karyotypic evolution in mammals, which have over 90 evolutionary conserved breakpoints (ECBs) between human and gibbons. Spatial radial arrangement of ECBs was analyzed by 3D-FISH technique onto the human and agile gibbon cell nuclei. In a case where ECBs are randomly and uniformly distributed in the nuclear space, it can be called as self-organization, random distribution model, whereas in cases where remarkable translocation occurs in a specific radial zone, it can be called a control factor induction model. Based on the results, I concluded that the former "self-organization, random distribution model" could be applied. Several data of radial distribution of repetitive sequences suggested radial arrangements have reflected the different distributed number of repetitive elements.

研究分野：分子細胞遺伝学

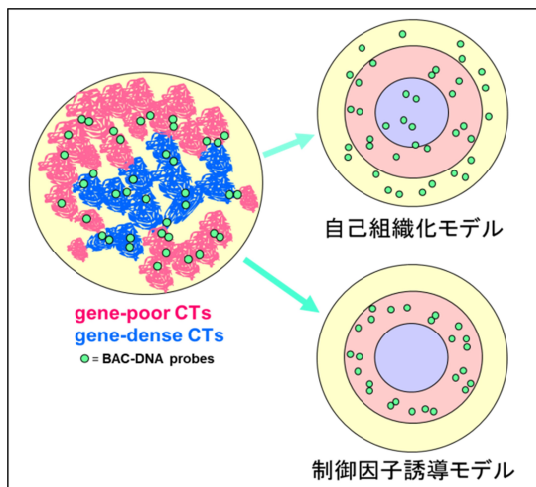
キーワード：染色体テリトリー 染色体 FISH法 3D-FISH法 核内配置 テナガザル科 自己組織化 核型進化

1. 研究開始当初の背景

本研究では、細胞核内での染色体が進化的にどのように形成され、核内空間にどのような仕組みで配置されているのか、自己組織化現象も視野に入れた構成的アプローチによって、システムとしての「染色体テリトリー」の創成と核内配置の仕組みを探ることを目指している。真核細胞の染色体は無秩序に入り混じった状態ではなく、個々の染色体ごとに高度に区画化された「染色体テリトリー (Chromosome Territory; CT)」として一定の空間配置を占めており、その構造的な特性や核内動態は、遺伝子発現や染色体ゲノム進化と深く関わり合いを持っている。CT の 3 次元核内配置を決定付けるパラメータとして、個々の染色体の物理サイズ、遺伝子密度、GC 含量、遺伝子発現状態などが挙げられているが、核形態の影響を受けたり、細胞の種類や生物種間、発生・分化段階で異なる特性を持つことが知られており、未知な部分が多く残されている。

2. 研究の目的

研究対象として、霊長類の染色体進化、テナガザル科で見られる「ゲノムシャッフリング (核型高速進化) 現象」に着目した。ヒトを基準にした染色体再編成部位は、大型類人猿や旧世界ザルでは 10 数ヶ所にすぎないが、テナガザル科全般にわたり、最高で 92 ヶ所もの転座部位が報告されている。キタホオジロテナガザル (*Nomascus leucogenys*) のゲノム解読の結果、テナガザル科に特有のレトロトランスポゾン LAVA が転座切断部位 (Evolutionary Conserved Breakpoints; ECBs) に見出され、核型高速進化に寄与する可能性が示唆された (Carbone *et. al.*, 2014)。そこで、テナガザル細胞株を用いた 3D-FISH 法により、転座切断点領域 ECBs の BAC-DNA を多数収集して、核中心から核膜周辺部にかけての放射状ゾーンを 3D-FISH 法により調べることにした。ECBs が核内空間的にランダムで一様に分布する場合は、**自己組織化モデル**、これに対し、特定の放射状ゾーンにおいて染色体領域間での組み合わせで顕著に転座が生じている場



合は、何らかの制御因子が関与することが考えられ、**制御因子誘導モデル**と呼ぶことができる。両モデルのどちらが観察値と合うかを検証し、染色体テリトリーの空間配置の仕組みについて総合的な考察を行う。

3. 研究の方法

1) ヒトおよびテナガザル培養細胞株の培養
ヒトおよびアジルテナガザル由来の EBV 株化リンパ芽球様細胞株を一定期間培養して実験に供する。

2) 染色体標本の調整・2D-FISH 法によるメタフェイズ (分裂中期像) 解析

観察対象とする細胞株の染色体構成の性状および BAC-DNA の局在が正しいことを確認するために、2D-FISH 法によるメタフェイズ染色体解析を実施する。メタフェイズスライド標本 (プレパラート) は、コルセミド処理した培養細胞を回収し、低張処理の後、メタノール/酢酸による固定処理を行い、細胞懸濁液をスライドガラス上に展開して作成する。作成したプレパラートはフリーザーにて使用時まで保存する。必要に応じて、Q/G バンド法を実施し、核型バンド分析を行い、染色体構成の性状を調べる。FISH 用 DNA プローブはヒト各染色体特異的のペインティングプローブ並びに USCS にて FISH マップの確認が成されている BAC-DNA クローンを選定して用いる。DOP-PCR 法または Nick translation によりハプテン (Bio, Dig, DNP) で標識し蛍光抗体を用いて検出する。複数のプローブを異なる蛍光色素で検出可能なように組み合わせ、メタフェイズ染色体上に 2D-FISH を行い、蛍光シグナルを検出し、写真撮影、画像解析を行う。

3) 3D-FISH 法による BAC-DNA の放射状核内配置解析

3 次元核構造を維持した細胞固定法 (パラホルムアルデヒド固定) により 3D スライド標本を調整する。各種プローブを組み合わせ、3D スライド標本上にハイブリダイゼーションを行う。蛍光プローブは 2D-FISH 法と同様に蛍光抗体法でシグナルを検出する。3 次元画像を取得するために、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM510META) を使用し、各プローブセットごとに 20~30 個の細胞核の画像データをスキャンし、その画像スタックを集積し、データをファイリングする。各画像スタックを元に画像解析プログラム処理により 3 次元画像再構築を行うとともに、放射状核内配置解析を行う。

4) 細胞核計測ソフトウェアによる各種物理距離の計測、統計処理

各 BAC-DNA プローブにより得られた 3D 画像イメージスタックを用いて、細胞核計測ソフトウェア (CyberNet 社) および Imaris (Carl Zeiss) を用いて各種物理距離の計測を行い (核中心からの距離および核膜からの距離) 統計処理 (U-test) を実施する。

5) モデルの検証と全体の統括

各 BAC-DNA プローブを用いた 3D-FISH 法により、核中心からの距離および核膜からの距離の平均値を算出して、それぞれの放射状核内配置ゾーンを特定する。これらのゾーンに偏りが見られるかを U-test および関連する統計処理により検討を行い、**自己組織化モデル**、もしくは、**制御因子誘導モデル**のどちらが適合するのかを検証する。また、BAC-DNA プローブのみならず、Alu、LINE1、satellite DNA、ヒト Periphery + Interior プローブを使用した 3D-FISH 法によるデータも合わせて検討する。全体のデータを統合し、染色体テリトリーの空間配置の仕組みについて総合的に考察する。

4. 研究成果

1) 2D-FISH 法によるメタフェイズ解析

ヒトおよびアジルテナガザル由来の LCL 細胞株よりメタフェイズ染色体標本を作成し、それぞれ正常の核型を示すことを確認した。また標識した合計 36 箇所 (R バンド、G バンド由来のものが 18 箇所ずつ) の各 BAC-DNA クローンとそれぞれ対応するヒト染色体ペインティングプローブを組み合わせ、2D-FISH 法を行った。その結果、全ての各 BAC-DNA クローンは目的とする遺伝子領域にシグナルが観察され、各染色体上の正しい位置にマップされることが確認できた (図 1)。

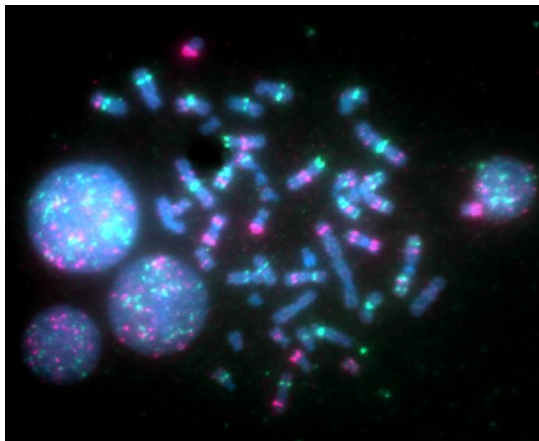


図 1 36 箇所の BAC-DNA をハイブリしたヒト染色体像 (R バンド由来; 緑、G バンド由来; マゼンタ、DAPI 対比染色; 青)

2) 3D-FISH 法による BAC-DNA の放射状核内配置解析
ヒトおよびアジルテナガザル由来の LCL 細胞株より 3D 細胞核標本を作成し、2D-FISH 法で確認した 36 箇所の ECBs に対応する BAC-DNA をプローブとした 3D-FISH 法により比較検討を行った。その結果、ECBs は特定な放射状核内配置ゾーンに分布することではなく、核内空間に一樣に分布する傾向が見られた。ECBs が核内空間にランダムで一樣に分布する場合は、自己組織化・ランダム分布モデル、これに対し、特定の放射状ゾーンにおいて染色体領域間の組

み合わせで顕著に転座が生じている場合は、何らかの制御因子が関与することが考えられ、制御因子誘導モデルと呼ぶことができるが、実験結果より、前者の「**自己組織化・ランダム分布モデル**」が適用されるものと考えられた。また、ヒトとアジルテナガザル細胞核内の ECBs 全体の分布域を比較すると、アジルテナガザルの方がより核中心に密集して分布する傾向が見られた (図 2)。さらに ECBs のうち、R バンドと G バンド由来の領域の分布を比べると、R バンド由来の領域がわずかに核中心近くに分布する傾向が見られた。

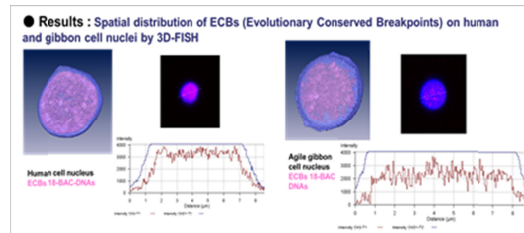


図 2 18 BAC-DNA をハイブリした 3D 細胞核像 (左; ヒト、右; アジルテナガザル) 各種反復配列 (Alu、LINE1、centromeric alpha-satellite DNA) を用いた放射状核内配置の解析より、Alu は核中心付近に、LINE1 は核周辺部で FISH シグナル強度のピークが見られた。また、alpha-satellite DNA (Cen) をプローブとしてヒトとアジル細胞核に 3D-FISH した場合、ヒト Cen をハイブリした場合は両者とも核内に一樣に分布していたが、アジル Cen をハイブリした場合は両者とも核中心付近に強いシグナル分布が示され、ヒトとアジルテナガザルの Cen の放射状核内配置にわずかに違いが見られることが示唆された (図 3)。これは、アジルテナガザルにおいて反復配列の増幅が核中心付近で生じている、もしくは核膜周辺部では塩基置換速度が上昇している可能性が考えられ、今後も引き続き検討を進めている。

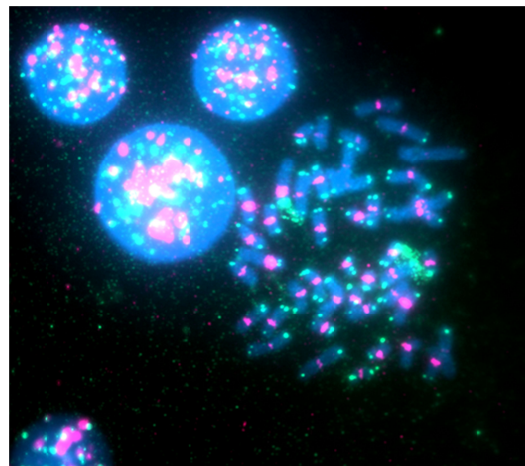


図 3 アジルテナガザル細胞核および染色体像 (アジル Cen; マゼンタ、テロメア; 緑、DAPI 対比染色; 青)

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Koga A, Tanabe H, Hirai Y, Imai H, Imamura M, Oishi T, Stanyon R, Hirohisa Hirai H (2017) Co-opted megasatellite DNA drives evolution of secondary night vision in Azara's owl monkey. **Genome Biology and Evolution**, 9: 1963-1970. doi: 10.1093/gbe/evx142
査読有り
- 2) 田辺秀之、中家雅隆、三谷 匡 (2017) 3D-FISH 法の新たな展開 マウス初期胚への応用. **生体の科学**, 68, 237-242. doi.org/10.11477/mf.2425200619
査読無し
- 3) Nakaya M, Tanabe H, Takamatsu S, Hosokawa M, Mitani T (2017) Visualization of the spatial arrangement of nuclear organization using three-dimensional fluorescence in situ hybridization in early mouse embryos: A new "EASI-FISH chamber glass" for mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, 63, 167-174. doi: 10.1262/jrd.2016-172
査読有り
- 4) Omori S, Tanabe H, Banno K, Tsuji A, Nawa N, Hirata K, Kawatani K, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K (2017) A pair of maternal chromosomes derived from meiotic nondisjunction in trisomy 21 affects nuclear architecture and transcriptional regulation. **Scientific Reports**, 7: 764. 査読有り
doi: 10.1038/s41598-017-00714-7
- 5) Hara Y, Adachi K, Kagohashi S, Yamagata K, Tanabe H, Kikuchi S, Okumura S, Kimura A (2016) Scaling relationship between intra-nuclear DNA density and chromosomal condensation in metazoan and plant. **Chromosome Science**, 19, 43-49. 査読有り
doi.org/10.11352/scr.19.43
〔学会発表〕(計 10 件)
- 1) 田辺秀之：染色体テリトリー・クロマチン・DNA 構造の細胞核内における空間配置の特性について **第 40 回日本分子生物学会年会・生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ワークショップ(1PW19)ヒト染色体：維持と進化と疾患の新知見**, 2017 年 12 月、神戸ポートアイランド、神戸
- 2) Nakaya M, Tanabe H, Takamatsu S, Hosokawa M, Mitani T: A New "EASI-FISH chamber glass" for use by 3D-FISH technique: Visualization of nuclear spatial organization in early mouse embryos. **4D Nucleome 2017: Cell Nucleus in Space and Time**, May 2017, Jagiellonian University, Kraków, Poland
- 3) Tanabe H: Evolutionary consideration for the radial distribution of chromosome territories in human gibbon cell nuclei. **4D Nucleome 2017: Cell Nucleus in Space and Time**, May 2017, Jagiellonian University, Kraków, Poland
- 4) 田辺秀之：核内ゲノム空間配置からみたテナガザルにおける核型高速進化 .第 34 回染色体ワークショップ第 15 回核ダイナミクス研究会、2017 年 1 月、かずさアカデミアホール、千葉
- 5) Tanabe H: Spatial organization of chromosome territories and repetitive DNA sequences in human and gibbon cell nuclei. **QBiC Symposium 2016 "Decoding Organisms by Quantitative Cell Profiling"**, September 2016, Senri Life Science Center, Osaka, Japan
- 6) Tanabe H, Koga A, Ishida T, Hirai H: Genomic wastelands (RCRO) have been evolved and spatially dispersed within the cell nucleus in chimpanzee and gorilla. **Joint meeting of the International Primatological Society and the American Society of Primatologists 2016**, August 2016, Navy Pier, Chicago, USA
- 7) 田辺秀之：ヒトおよびテナガザルにおける染色体テリトリー・反復配列 DNA の細胞核内空間配置について：進化的視点よりの考察 . 第 68 回 日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月、京都テルサ、京都
- 8) Tanabe H: Global radial distribution of chromosome territories and its characteristics in relation to nuclear architecture. **BIT's 6th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2016** (Invited speaker), April 2016, Dalian International Conference Center, Dalian, China
- 9) Tanabe H: Global distribution of chromosome territories and nuclear architecture. **Invited Lecture, Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics**, July 2015, Hiroshima University, Hiroshima, Japan
- 10) Tanabe H: Role of spatial positioning of territories: Evolutionary chromosome views and characteristics. **The 5th Asian Chromosome Colloquium (ACC5), Symposium 8-1: Genome and Chromosome Architecture (GCA) 1** (Invited speaker), April 2015, KU Home, Kasetsart University, Bangkok, Thailand
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕特になし
- 出願状況 (計 0 件)
- 名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.esb.soken.ac.jp/research/index.html#hideyuki_tanabe

6．研究組織

(1)研究代表者

田辺 秀之 (TANABE, Hideyuki)
総合研究大学院大学・先導科学研究科・
准教授
研究者番号：50261178

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()