

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域
「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」
研究課題
「超解像 3 次元ライブイメージングによる
ゲノム DNA の構造、エピゲノム状態、
転写因子動態の経時的計測と操作」

研究終了報告書

研究期間 2015年10月～2021年3月

研究代表者:岡田 康志
(国立研究開発法人 理化学研究所
生命機能科学研究センター
チームリーダー)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究では、超解像 3 次元ライブイメージング技術を用いて、生きた細胞の核の中でゲノム DNA の折り畳み状態や、ヒストン、転写因子などの一分子レベルでの動態を経時的に観察し、ゲノム DNA の折り畳み状態すなわちエピゲノム状態や転写制御を理解することを中心的な目標として進めてきた。

そのために、超解像ライブイメージングのための顕微鏡とプローブ開発などの技術開発を主とする技術開発グループ(岡田)、生きた細胞の核内での超解像・一分子イメージングを行いゲノム DNA やヒストン、転写因子の動態計測を行う動態計測グループ(前島)、計測結果のモデル化やシミュレーションによる解析を行う数理グループ(笹井)の3グループで本研究チームを構成している。

技術開発グループでは、超解像顕微鏡や一分子イメージングのための顕微鏡を開発・改良してきた。時間分解能 5 ミリ秒の世界最高速の超解像顕微鏡の感度を 5 倍に向上させる技術改良成果は速やかに市販化され、高速一分子イメージングを可能にする輪帯 TIRF 顕微鏡は他の研究室にも導入されるなど、その成果は本研究チームを超えて活用されている。また、顕微鏡のハードウェアの開発だけでなく、超解像・一分子イメージングのための蛍光色素の開発や、エピゲノム状態を可視化する蛍光プローブ、転写状態可視化のための超高輝度発蛍光性 RNA プローブや内在性 RNA の可視化・操作のためのプローブなどのプローブ開発も進んでおり、知財化すると共に、本研究チーム内外に配布し、利活用を進めている。

動態計測グループでは、これらの技術を応用してライブイメージングを実施し、その結果を以下に述べる数理グループと解析することによって、テロメアの超解像イメージングに成功し、がん組織と非がん組織のテロメア長の違いを可視化するなどの応用的な成果から、核内ゲノム DNA の折り畳み構造動態などの基礎的な成果まで幅広い成果を上げることが出来た。後者については、ライブイメージングによる動態計測と下記の数理グループによるモデル化と定量解析を通じて、クロマチンがドメイン構造をとることが証明され、その形成機構を示唆する結果が得られた。さらに、クロマチンドメインが転写複合体の液滴構造を介してネットワークを形成し、転写制御が行われるなど、クロマチンの構造動態と転写制御の関係が示され、エピゲノム状態と転写制御の理解が大きく進展した。

この成果を支えたのが、数理グループによるクロマチンの分子動力学計算である。従来、Hi-C 法など NGS 法によって、核酸配列空間でのゲノム DNA の立体構造が調べられてきた。しかし、これは多数の細胞の集団平均を示す静的な構造である。一方、ライブイメージングにより得られるのは、生きた細胞の核内でのクロマチンの局所における構造動態である。この両者を統合的に理解するためには、クロマチンの局所物性からゲノム DNA 立体構造を説明(予測)する数理モデルが必要となる。

そこで、数理グループでは、分子動力学計算手法を応用して、クロマチンの局所物性からゲノム DNA 立体構造を生成する計算手法(ゲノム動力学計算モデル)を開発し、多数回の計算により得られた構造を平均化することで細胞集団の平均構造と一細胞イメージングデータの関係を解析することを可能とした。このようなモデル化を通じて、クロマチン構造動態と転写因子動態という異なる時間スケールの動態を統合する数理モデルの開発を進め、Hi-C データなどのオミクス計測結果と動態計測グループのライブイメージングデータを統合することで、上記の成果を得ることが出来た。

このように、計測技術開発、動態計測、数理解析の3つのグループが有機的に連携することで、チーム全体としての成果を上げることが出来た。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. Nozaki, T., Imai, R., Tanbo, M., Nagashima, R., Tamura, S., Tani, T., Joti, Y., Tomita, M., Hibino, K., Wendt, K.S., Okada, Y., Nagai, T., Maeshima, K. (2017) Dynamic organization of chromatin domains revealed by super-resolution live-cell imaging. *Mol Cell*. 67, 282-293.

概要：標識ヒストンを用いた核内ゲノム DNA の超解像ライブイメージングを行い、ヒストンの核内分布を詳細に解析することにより、生細胞内に存在するクロマチンドメイン構造の同定に成功した。今後は、遺伝情報がどのように検索され、読み出されるのかについての理解がさらに進むとともに、DNA の折りたたみの変化で起きるさまざまな細胞の異常や関連疾患の理解につながることを期待される。

2. Nagashima, R., Hibino, K., Ashwin, S.S., Babokhov, M., Fujishiro, S., Imai, R., Nozaki, T., Tamura, S., Tani, T., Kimura, H., Shribak, M., Kanemaki, M.T., Sasai, M., Maeshima, K. (2019) Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks via active RNA polymerase II. *J Cell Biol*. 218, 1511-1530.

概要：一般に、ゲノム DNA の遺伝情報が読み出される転写が起きる際、DNA を含む高次構造であるヌクレオソームは緩くなり、よりダイナミックに動くと考えられてきた。しかし本研究で調べたところ、転写を阻害すると DNA の動きが逆に活発化することが明らかになった。さらに、転写の際に DNA 上で働く RNA ポリメラーゼ II や他の転写因子が塊（ハブ）を作って DNA の動きを抑える様子が示された。この結果は、ハブを作ることでゲノム DNA は連結されてネットワーク化し、DNA の動きを抑え、効率的に転写を行う可能性を示唆するものである。JCB 誌の Year in Cell Biology 2019 に選ばれた。

3. Ide, T., Ochi, H., Imai, R., Maeshima, K. (2020) Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation. *Sci Adv*. 6, eabb5953

概要：細胞の核内には核小体に代表されるような膜のない構造体が相分離によって作られる。しかし、細胞内の環境で実際どのように相分離が起きているのか、それが生理機能にどのように寄与しているのかについては不明であった。本研究では、超解像蛍光顕微鏡を用いることで、リボソーム RNA 合成に関わる RNA ポリメラーゼ I (RNAPI) や、転写因子 UBF を通してリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の振る舞いを観察し、相分離に伴うリボソーム RNA 遺伝子の転写抑制の新しいメカニズムが明らかにした。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. Sasaki, A., Ide, I., Kawamoto, Y., Bando, T., Murata, Y., Shimura, M., Yamada, K., Hirata, A., Nokihara, K., Hirata, T., Sugiyama, H., Maeshima, K. (2016) Visualization in Tissue Sections Using Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes. *Sci Rep*. 6, 29261

概要：染色体テロメア配列を認識するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドを用いて、ヒトのがん病理標本におけるテロメア短縮を簡便かつ迅速に検出することに成功した。この PI ポリアミドを用いると 1 細胞レベルでテロメア長を定量的に測定でき、免疫染色との併用も可能である。従来のテロメア標識法に代わる新たな標識法として、基礎研究のみならず老化やがん化などの臨床研究への応用も期待される。

2. 有吉哲郎、岡田康志「蛍光発生核酸分子、及び標的 RNA の蛍光標識方法」
特願 2018-226743, PCT/JP2019/47228

概要: 緑色蛍光タンパク質 GFP は、広く活用される基盤的技術である。同様に、“緑色蛍光 RNA”が開発されれば、RNA の発現動態、局在解析、機能解析など広汎な応用が期待される。しかし、既存の緑色蛍光 RNA は輝度が低く、動物細胞内での mRNA のイメージングは不可能であった。本開発では 300 倍の高輝度化に成功し、神経細胞などでの mRNA 一分子のイメージングに成功するなど、今後の活用が期待される。

3. 稲生大輔、池田一穂、岡田康志「DNA 結合タンパク質、及びゲノム DNA 立体構造の標識方法」、特願 2018-226743, PCT/JP2019/47228

概要:これまで、細胞の核内でエピゲノム状態を可視化する方法として、抗体染色と ATAC-seq 法が知られていた。いずれもライブイメージングへの適用は困難であり、生きた細胞の中での経時変化の観察を行うことが出来るエピゲノム状態可視化プローブが待望されていた。本開発では、オープンクロマチンに特異的に結合する蛍光タンパク質プローブを開発し、生きた細胞内だけでなく、個体レベルでの観察やシークエンス解析にも応用できることが示された。

<代表的な論文>

1. Nozaki, T., Imai, R., Tanbo, M., Nagashima, R., Tamura, S., Tani, T., Joti, Y., Tomita, M., Hibino, K., Wendt, K.S., Okada, Y., Nagai, T., Maeshima, K. (2017) Dynamic organization of chromatin domains revealed by super-resolution live-cell imaging. *Mol Cell*. 67, 282-293.

概要:標識ヒストンを用いた核内ゲノム DNA の超解像ライブイメージングを行い、ヒストンの核内分布を詳細に解析することにより、生細胞内に存在するクロマチンドメイン構造の同定に成功した。今後は、遺伝情報がどのように検索され、読み出されるのかについての理解がさらに進むとともに、DNA の折りたたみの変化で起きるさまざまな細胞の異常や関連疾患の理解につながることを期待される。

2. Nagashima, R., Hibino, K., Ashwin, S.S., Babokhov, M., Fujishiro, S., Imai, R., Nozaki, T., Tamura, S., Tani, T., Kimura, H., Shribak, M., Kanemaki, M.T., Sasai, M., Maeshima, K. (2019) Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks via active RNA polymerase II. *J Cell Biol*. 218, 1511-1530.

概要:一般に、ゲノム DNA の遺伝情報が読み出される転写が起きる際、DNA を含む高次構造であるヌクレオソームは緩くなり、よりダイナミックに動くと考えられてきた。しかし本研究で調べたところ、転写を阻害すると DNA の動きが逆に活発化することが明らかになった。さらに、転写の際に DNA 上で働く RNA ポリメラーゼ II や他の転写因子が塊(ハブ)を作って DNA の動きを抑える様子が示された。この結果は、ハブを作ることでゲノム DNA は連結されてネットワーク化し、DNA の動きを抑え、効率的に転写を行う可能性を示唆するものである。JCB 誌の Year in Cell Biology 2019 に選ばれた。

3. Ashwin, S.S., Nozaki, T., Maeshima, K., Sasai, M. (2019) Organization of fast and slow chromatin revealed by single-nucleosome dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116: 19939–19944.

概要:超解像・一分子ライブイメージングによる動態計測結果を理論的に解析するために、ベイズ統計による画像ノイズ削減の手法を応用した解析手法を開発した。これを用いて、一分子ヌクレオソームイメージングデータを統計的に分析し、動態に基づく新しいクロマチン分類に成功した。更に、この分類に基づく解析によって、クロマチンの運動に相关单位が存在することを見出し、クロマチン動態のドメイン構造を立証した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 岡田グループ

研究代表者:岡田康志(理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー)

研究項目

・SuperTALE プローブおよび超解像ライブイメージングの開発と応用

② 前島グループ

主たる共同研究者:前島一博 (国立遺伝学研究所 遺伝メカニズム研究系 教授)

研究項目

・ゲノム折り畳み・転写動態のイメージングと転写モデルの検証

③ 笹井グループ

主たる共同研究者:笹井 理生(名古屋大学工学研究科 教授)

研究項目

・ゲノム構造シミュレーションのための計算技術の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

岡田グループ

CREST領域内連携

- 渡邊(京大)に輪帯TIRF顕微鏡の技術供与
 - 大川(九大)と、ChrocodiLEへのChiL-seq の応用について共同研究を実施中
- ##### 一細胞さきがけとの連携
- 藤芳(東工大)と、クライオ超解像顕微鏡の生体試料への応用について共同研究
 - 城口(理研)と、イメージングと一細胞解析の融合について共同研究
 - 神谷(東大)と、新規蛍光分子の超解像顕微鏡への応用に関する共同研究
 - 多喜(名大)と、超解像顕微鏡・一分子イメージングに適した新規蛍光色素の開発と応用について共同研究

その他国内での連携

- 理研所内横断プロジェクト「エピゲノム操作」(代表:眞貝洋一)に参画
- 山本陽一郎(理研)、東條有伸(東大)、田宮元(東北大)、赤塚純(日本医大)らと「医療人工知能におけるブラックボックスの解明」(科研費挑戦的研究(開拓)、代表:山本陽一郎)に参画。

前島グループ

CREST領域内連携

- 大川チーム(木村宏)と転写とクロマチンダイナミクスに関する共同研究

国際連携

- 米国MBL 谷知己とクロマチン超解像イメージングに関する共同研究
- オランダErasmus MC Kerstin S. Wendtとクロマチンドメインにおけるコヒーシンの関与に関する共同研究
- 米国MBL Michael Shribakと細胞内密度イメージングに関する共同研究
- 米国コロラド州立大Jeffrey C. Hansenとのクロマチン構造に関する共同研究

笹井グループ

国内連携

- ゲノム動力学計算モデルについて、平野達也主任研究員(理研)と共同研究

国際連携

- 転写動態の定量モデルについてJin Wang教授(ニューヨーク州立大)と共同研究