

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（生命動態システム科学推進拠点事業）
2. 補助事業課題名：核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点形成
3. 研究開発代表者：国立大学法人広島大学 教授 楯 真一
4. 研究開発の成果

### ① クロマチン繊維の複数点蛍光染色技術の確立

CRISPR/dCas9を用いて*Nanog*遺伝子を標的として対立遺伝子ごとに異なる蛍光標識を導入するマウスES細胞株を樹立した。このES細胞を用いて、父方由来、母方由来の*Nanog*遺伝子の動態の違いを区別して計測した。TALENを用いた標識では目的とする標識が困難であったが、dCas9を用いることで計画した複数点蛍光標識が実現できた。

### ② 複数の細胞を用いてクロマチン繊維の動態を広範囲に観測する技術の確立

- ・分裂酵母染色体中に *lacO* 遺伝子を導入し、*lacI*-GFP を発現する細胞株を93株作成した。81の遺伝子座の動態データの取得を終え、遺伝子座動態解析のためのデータトラッキングを終えた。
- ・カリックスアレン(Clx)を用い蛍光標識化合物3種類を合成した。ヒストンテール特異的に結合する Clx の数1つ、2つ、4つもつ蛍光標識色素を合成してマイクロインジェクションあるいはリポフェクションにより HeLa 細胞あるいはマウス ES 細胞に導入した。Clx を1つおよび2つもつ色素は核への局在は良好であったが、核内では核小体の局在しクロマチンを染めるに至らなかった。Clx を4つもつ合成色素は細胞質に留まり核内に移行しなかった。
- ・ヒト細胞を用いて、紫外線損傷誘導により損傷部にリクルートされる Rad51 の損傷部周辺の局在を超高解像顕微鏡で計測した。クロマチン間に「線状」に局在する Rad51 と損傷部の位置関係を詳細に解析して、損傷部が Rad51 の部位周辺に集積する可能性を明らかにした。修復にもファクトリー的な機能空間がある可能性が考えられる。

### ③ 多色蛍光標識したクロマチン繊維の3次元動態イメージ観測技術の確立

- ・別々に集積される個々の遺伝子座の動態データを重ね合わせて、遺伝子依存的な核内局在・動態を解析するための内部基準として、スピンドル極体 (SPB) と核小体の重心が良好に使えることを確認し、93株の分裂酵母に対して標的遺伝子座に加えてSPBと核小体を同時に標識できるように細胞株を改変した。81個の異なる遺伝子座の動態データを上記の内部基準をもとに計算機上でマージして、核内で相対的な3次元動態の比較を可能とした。
- ・上記で確立したマウスES細胞中の*Nanog*遺伝子を対立遺伝子ごとに異なる蛍光色標識する細胞を用いて、同じ核内にある対立遺伝子の動態が分化状態に応じて変化する様子を追跡した。

### ④ クロマチン動態を表現する数理モデルの構築

- ・分子動態に伴うエネルギー散逸過程の理論の検証を目的として、ATP依存的に運動するタンパク質を対象として、ATPを消費して動くタンパク質の蛍光点動態データの解析を進めた。
- ・分裂酵母の60箇所以上の遺伝子座動態データを再現するためのクロマチン動態モデルを構築した。Hi-Cデータをもとに構築された分裂酵母の3次元構造をもとにして、粗視化モデルを構築した。Hi-Cデータからは構造を決定できないrDNAを蛍光像を再現するように核内で局在させて基本となる構造モデルを構築した。動力学計算により核内の動態をシミュレーションすることを可能とした。90箇所以上の遺伝子座を対象として、網羅的に計測が進められている分裂酵母のもつ各遺伝子座の動態観測データを再現するために必要なシミュレーションパラメーター調整を順次進めてゆく。
- ・*Nanog*遺伝子座の動態と転写活性の相関をつなぐ数理モデルの構築を終えた。特定の遺伝子の転写活性のためにリクルートされるタンパク質複合体形成による局所の排除体積の変化が周辺部のクロマチン構造・動態へ摂動を与えることを反映したクロマチン構造・動態シミュレーションを可能とした。また、計算手法的には、プロモーター上でのタンパク質の構造変化や複合体へのリモデル因子リクルート過程をシミュレーション中に反映できるように時間遅れ反応拡散法的式による計算を取り入れた。

⑤ クロマチン動態と遺伝子発現との相関解析

・マウスES細胞中の対立遺伝子上にある、それぞれの*Nanog*遺伝子座動態と転写活性強度の相関を計測した。各対立遺伝子から発現されるmRNAは、それぞれ異なる蛍光タンパク質で標識されて別々に定量された。この結果、*Nanog*遺伝子では、転写活性が高いほど遺伝子座の動態が低下するという相関を明らかにした。転写ファクトリーのような制約されたスペースに遺伝子座が取り込まれることで転写が行われると考えられる。

・分裂酵母の特定の遺伝子座から発現されるmRNAにMS2結合配列を挿入し、蛍光標識したMS2で検出する。酵母遺伝子改変用の挿入遺伝子のデザインと組換え遺伝子の構築を行った。

⑥ クロマチン動態変化と遺伝子発現のクロストーク解析

クロマチン上の特定の部位にタンパク質が結合することで、周辺のクロマチン構造・動態が摂動をうけることにより、遺伝子発現(転写)とクロマチン構造および動態がクロストークする。ポリマーモデルをもとにして、クロマチン構造・動態と転写のクロストークを表現できるモデルを構築した。

⑦ プロジェクトの総合的推進

・国際スクレオームコンソーシアム形成にむけた欧米グループとの連携：平成27年度予定されていたヨーロッパでのコンソーシアム会議は、会議担当国(ポーランド)での予算獲得ができず1年延期となった。ただし、拠点国際シンポジウム(下記)にコンソーシアムメンバーのグループから2名の研究者が参加するなど、コンソーシアムメンバーとの情報交換を行い研究の方向性を確認するなどの交流はできた。

・成果報告会を兼ねた国際シンポジウム：12月7-9日の日程で、広島市内のアステールプラザで70名以上の参加者を得て、第4回目となる拠点主催の国際シンポジウムを開催した。会議から6名の招待講演者を招いて、ポスターセッションを含む活発な会議が行われた。平成27年度は、本研究拠点の主要テーマであるクロマチン構造・動態モデル化に関連する研究を進めている理論系の研究者を中心に講演を組んだ。

・プロジェクト全体の連携のため、拠点メンバーと運営委員による報告会・連絡会を毎週開催する：毎週月曜日の連絡会と金曜日の成果報告会・Journal Clubを年間を通して実施した。拠点運営の中では、このスケジュールが定着している。

・先端物質科学研究科との連携にむけた学生交流、合同セミナーなどの取組を進める：理学研究科の学生が、先端物質科学研究科の研究室で酵母遺伝子動態の網羅解析に参加するなど、部局を超えた学生の連携が実現した。講義・拠点研究会をとおして先端物質科学研究科の学生が活発に研究拠点主催の行事に参加するようになった。

・融合領域研究を進める理学研究科および先端物質科学研究科の博士課程後期在籍の外国人留学生・女子大学院生をRAとして雇用する：1名の留学生と1名の女子大学院生をRAとして雇用した。

・博士後期課程を修了する女子大学院生を対象として、本拠点での融合領域研究に寄与することを条件に、拠点研究者として雇用(一年任期)する制度を設ける：当該制度設置して、平成27年10月に学位を取った博士課程後期女子大学院生を、拠点研究者として雇用した。

・学部学生および大学院生を対象とした融合領域研究のためのサマースクールを開催する：平成27年9月1日-4日の4日間のサマースクールを開講した。細胞の扱いかたから、顕微鏡データの取得などの実験から解析までの講義と実習を含むコースを行った。学部生3名を含む9名の参加があった。うち学外から4名の参加を得た。一名は上海交通大学の大学院生であり、活発なスクールが実施できた。

・融合領域研究を進める博士課程後期大学院生に対して研究費を支援する。(提案型研究)：4名の博士課程後期学生に対して、融合領域研究に30万円の支援を行った。支援を受けた大学院生は、夏の合宿研究会と年度末の発表会で成果報告を行った。

・日本-台湾応用数学学生交流事業への大学院生派遣など交流行事：今回は台湾・成功大学が主催して学生交流会が開催された。拠点研究者を含む11名(学生4名)が参加して、博士課程前期の学生1名が優秀発表賞を受賞した。