

研究終了報告書

「シミュレーションによる染色体の動態解明と実測との比較」

研究期間：2020 年 11 月～2024 年 5 月

研究者：炭竈 享司

1. 研究のねらい

染色体は遺伝情報を担う生命に欠かせない物質である。染色体の構造は、細胞周期によって大きく変化する。その動的な構造変化を解明するため、Hi-C 等の新規の実験手法や理論・シミュレーションのモデルが開発され続けているが、未だにマイクロメートル以下の構造の詳細は分かっていない。本研究では、1. 高分子モデルを用いたシミュレーションの新規モデルを開発し、2. 種々の実験との比較により開発したモデルを検証することにより、より確からしい染色体モデルを構築することを本研究の目的とした。

高分子シミュレーションにより、染色体テリトリーの再現 (Di Stefano et al., *Sci. Rep.* 6, 35985, 2016)、コンデンシンやトポイソメラーゼ II、セントロメアのモデリングによる分裂機の X 字の染色体構造の再現 (Goloborodko et al., *eLife* 5, e14864, 2016)、ヘテロクロマチンのモデリングによる間期の液液相分離した染色体構造が再現されている (Falk et al., *Nature* 570, 395, 2019)。しかし、それらの研究は別々のものであり、例えば、ヘテロクロマチンのモデルを提案した論文では、コンデンシンは考慮されていない。現実の染色体にはそれらが同時に発現していることを考えれば、不完全なモデルだと思われる。そこで、私のアイデアは、「染色体の構造を決める複数の因子(コンデンシンやヘテロクロマチン)を同時に含んだモデルを作れば、より現実的で正確な染色体のモデルが作れる」というものである。染色体には、それらの他にコヒーシンやインスレータ等の染色体構造を決める重要な因子もあり、それらも同時に含んだモデルの作成を進める。

また、実験による裏付けのないシミュレーションは、アニメや CG との区別が付かない。そこで、種々の実験との比較により、モデルの検証を行う必要がある。比較する実験は以下の 3 種類とする。

1. 染色体の 3 次元構造については、研究者の属する金沢大学ナノ生命科学研究所で開発された 3 次元版の原子間力顕微鏡 (3D-AFM) による計測と比較する。染色体の 3D-AFM 計測については本研究の申請時に開始されたばかりであった。2. 染色体のループ構造については Hi-C 実験と比較する。3. 染色体の動きやすさについては蛍光顕微鏡観察と比較する。これらの比較により、開発したモデルを検証する。

2. 研究成果

(1) 概要

Goloborodko らにより開発されたコンデンシンとトポイソメラーゼ II、セントロメアを含む高分子モデルにコヒーシンを加えたモデルを開発した。その結果、彼らのものよりさらに光学顕微鏡や AFM 像に近い染色体構造が得られるようになった。ヘテロクロマチンのモデル化は現在も進行中であるが、Hi-C からヘテロクロマチン・ユークロマチンを分類する直感的な新手法を開発した。その結果、ヘテロクロマチンよりもユークロマチンの方がコンタクトが多いという染色体構造の新たな知見を得ることに成功した。モデルの開発は実験との比較による検証が

不可欠である。そこで3D-AFM計測との比較を可能とする新たなシミュレーション手法の開発も行なった。3D-AFM計測が既に行われている生体高分子(アクチン繊維)について、理論予測と実測の比較を行い、開発したシミュレーション手法が妥当であることを示した。また、3D-AFM像は走査速度に大きく依存し、高分子の動きの約10倍で走査する時に最も明瞭なAFM像が得られることを解明した。この知見は実測に生かされ、その結果、染色体の3D-AFM計測が現実のものとなった。

(2) 詳細

研究テーマ「染色体モデルの開発」

目的: コヒーシン、コンデンシンやヘテロクロマチンを同時に含む染色体シミュレーションのモデルを開発し、ヒストン修飾についても可能な限り挑戦する。

成果: Goloborodko らによるコンデンシンとトポイソメラーゼ II、セントロメアのモデルを含む高分子シミュレーションにコヒーシンとヘテロクロマチンを足していく方針でモデル開発を進めた。現状では、Goloborodko らのモデルを再現し、さらにコヒーシンのモデルを加えることで姉妹染色体が横に並ぶようになり、より光学顕微鏡像に近い染色体構造が得られている(図1)。ただし、開発したモデルの染色体構造には、大きなループが染色体軸から多く飛び出ている問題がある。また、進行している染色体の3D-AFMの実測との比較によると、現状のモデルの染色体構造からは染色体軸と多数のループ構造が3D-AFM像に見えると理論予測されるが、実測ではそのような構造は見えず、塊のような構造が見えていた。ヘテロクロマチンのモデルの導入は染色体の繊維を塊にする相互作用が含まれるため、ヘテロクロマチンをモデル化することでループ構造が減少して塊の構造が増え、より現実に近いモデルが得られると強く期待される状況になっている。

ヘテロクロマチンのモデル化には、どこがヘテロクロマチン領域か?という情報をインプットとしてモデルに入れる必要があり、ヘテロクロマチン領域の推測にはHi-Cデータを用いることを検討した。しかし、その際、Hi-Cからヘテロクロマチン・ユークロマチンを分類する従来の手法の原理が明快でないことに気づき、分類の原理を再構築することにした。その結果、単純な直感的手法でHi-Cからヘテロクロマチン・ユーク

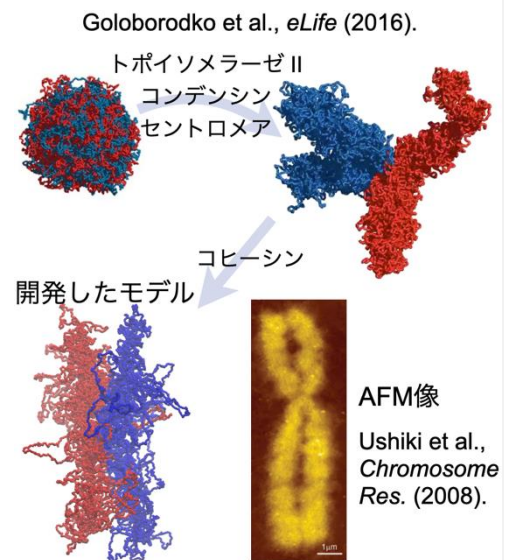


図1: 染色体のモデル開発

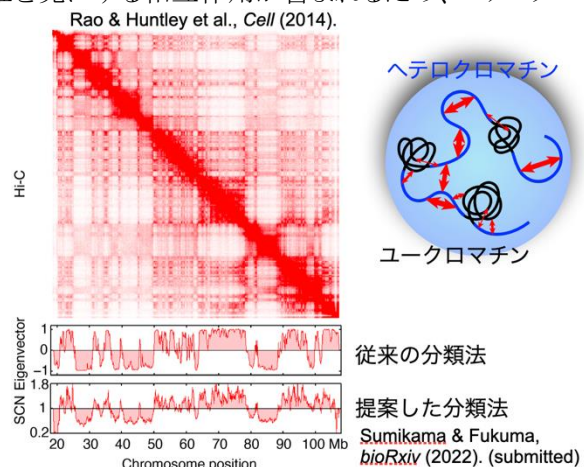


図2: Hi-Cからのヘテロクロマチン・ユークロマチンの新規分類法と染色体構造

ロマチンを分類できることを発見した(図2左)。従来の分類法では数ヶ月かかるような高解像度(1 kb)の Hi-C データであっても、提案した分類法では数分で処理できる。新たな分類法での分類結果と従来のそれはピアソン相関係数が約 0.7 であり、ほぼ遜色がないと言える。また、ヒストンマークとの比較により、10 kb、100 kb の高解像度の Hi-C を解析する場合、従来の分類法よりも若干優れていることが明らかになった。さらに重要なことは、新たな分類法に基づく解析は、ユークロマチンの方がヘテロクロマチンよりもコンタクトが多いという明快な証拠を与える。これは一見ヘテロクロマチンの定義に反するようにも感じられるが、ヘテロクロマチンは塊になっており他のクロマチンがアクセスしにくい、一方、ユークロマチンは他のクロマチンがアクセスして相互作用しやすくなっていることを示している(図2右)。このような染色体構造に関する新知見を得ることに成功した。この成果は研究成果リストに挙げるプレプリントとして報告しており、ヒストンマークとの比較を含んだ原稿を準備中である。

Hi-C からの分類法に寄り道してしまったため、ヘテロクロマチンとヒストン修飾のモデル化については進展していない。

研究テーマ「3D-AFM 像の理論予測手法の確立」

目的: モデルの検証には実験との比較が不可欠である。本研究では 1. 3D-AFM 像との比較、2. Hi-C との比較、3. 蛍光顕微鏡によって得られた平均自乗変位(MSD)との比較、によるモデルの検証を検討した。比較のためには、シミュレーション結果から比較すべき実験結果を予測する必要がある、そのためには予測手法を確立する必要がある。2.と 3.については難しいものではなく、さきがけ申請時に既に確立していた。そこで、1.についての予測手法を確立した。

成果: AFM 探針による走査は、走査そのものが染色体に幾らかの仕事をしてしまうため、非平衡過程となる。そこで、非平衡過程での仕事(W)を自由エネルギー変化(ΔG)に結びつけることの出来る Jarzynski 等式($\exp(-\Delta G/k_B T) = \langle \exp(-W/k_B T) \rangle$)を用いて AFM での走査による自由エネルギー変化を計算し、自由エネルギーの微分から AFM で計測される力に変換した。従来の生体分子の AFM 像のシミュレーションは単純な幾何学に基づくものであり、このような力を計算する手法による AFM 像のシミュレーションは初めてのものであった。これを論文として出版した。また、従来の計算法との違いやどのように計算手法を使い分けるか、特に生体高分子での新規手法の重要性についての短い総説も出版した。

シミュレーションに用いた高分子構造と理論予測した 3D-AFM 像を比較すると、染色体を

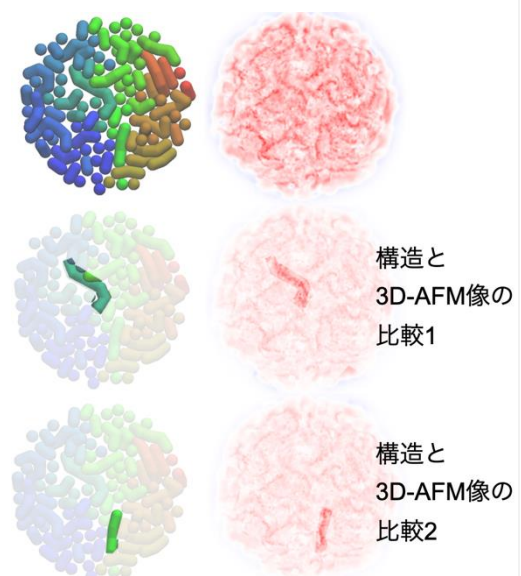


図3: 染色体を模した高分子構造(左)と理論予測された3D-AFM像(右)

模した高分子の紐状構造は、全てではないがその一部が確かに紐状の像として 3D-AFM 計測では解像されることが分かった(図 3)。さらに、予測される AFM 像は走査速度に大きく依存すること、またその原理も解明した。走査速度が遅い場合、AFM で十分な精度で計測できるほどの力が働かず、計測できない。逆に、走査速度が速過ぎる場合、AFM 探針が染色体に衝突して強過ぎる力が働いたり、走査によって染色体が壊れてしまい、計測できない。したがって中間の速度、具体的には高分子の動く速さの 10 倍程度で走査する場合に最も明瞭な像が得られることも解明した。この知見を生かすことで、弊研究所での染色体の 3D-AFM の実測が進展した。現実の染色体の 3D-AFM 計測とシミュレーションの知見を生かした解析についての論文も準備中である。

また、シミュレーションの正しさを検証するため、既に 3D-AFM 像の得られていた生体高分子であるアクチン繊維について、実測と理論予測の比較を行った(図 4)。実測に酷似した縦に長く伸びた三角の像がシミュレーションからも得られたため、

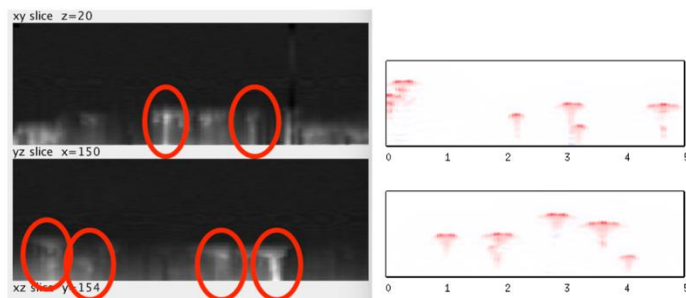


図4：アクチン繊維の3D-AFMの実測（左）と理論予想（右）

開発したシミュレーション手法は妥当なものと考えられる。この結果は既に論文に報告しているが、さらなる検証として液中に張り渡した 1 本のカーボンナノチューブが 3D-AFM 像にどのように解像されるか？という実験とシミュレーションの比較研究に関する論文も査読中である。

Jarzynski 等式を用いた新規 3D-AFM 像の計算手法の開発についての論文は、カヴァーアティクルに採択され、Nature index にも取り上げられている。

3. 今後の展開

未完である染色体のモデル開発、具体的にはヘテロクロマチンのモデル化を急ぐ。モデルが完成次第、Hi-C や 3D-AFM 像、MSD を計算し、モデルの妥当性を検証する方針であったが、Hi-C と 3D-AFM の実験結果を再現するモデルのパラメータを機械学習によって予測する方針に転換した。これにより、妥当性を検証するステップを省くことができ、研究を加速させられる。インスレータは、染色体ループの根本でそれ以上のループ形成を阻害して TADs 構造を作っている分子と考えられているようであるから、そのモデル化の影響は、3D-AFM 像へは非常に小さく、MSD へも大きくないと考えられる。そこで、Hi-C に無視できない影響がある場合に、そのモデル化を検討する。これらには 1-2 年が必要と想定している。

ヒストン修飾はエピジェネティックな染色体構造の基盤であり、そのモデル化は将来の社会実装に繋げるには重要と考えられるが、検証のための実験との比較が困難と考えられる問題点がある。これは将来的な課題として、引き続き検討したい。

従来よりも直感的で染色体の構造情報にも迫ることの出来る Hi-C からのヘテロクロマチン・ユークロマチンの分類法の開発は、さらに一層の今後の発展が期待される。例えば、Hi-C に最適な制限酵素の探索も可能になりつつあり、CREST 平谷グループとの共同研究に発展しつつある。これには 1 年程度が必要と想定している。

さらに、平谷グループでは複製タイミングでの Hi-C の変化が観測されており、これに応じてどのようにヘテロクロマチン・ユークロマチン構造が変化しているのかを調べることを検討したい。まずは Hi-C を解析して、複製タイミングでのヘテロクロマチン・ユークロマチン領域の変化を定量する。また、ヘテロクロマチン・ユークロマチン領域の変化をシミュレーションのモデルに入れば、複製タイミングでどのように染色体の 3 次元構造が変化したかをシミュレート可能である。これによって、複製タイミングでの染色体の 3 次元構造の変化を可視化する。これには 2-3 年程度が必要と想定している。

4. 自己評価

研究目標の達成状況は、「染色体モデルの開発」については、コヒーシンのモデル化は終わり、ヘテロクロマチンのモデル化まで進めば新しい染色体のモデルが完成する状況である。ヘテロクロマチンのモデル化までは終えられなかったが、一方で、Hi-C からの新たなヘテロクロマチン・ユークロマチンの分類法を考案できたため、概ね順調に進んだと考えている。「3D-AFM 計測との比較手法の確立」については、理論予測の手法を考案しただけでなく、実測との比較による理論の検証まで行ない論文も出版しているため、満足に終了したと考えている。さらに、染色体とは離れるが、3D-AFM 像の新規シミュレーション手法は、生体高分子への適用を超えて、カーボンナノチューブを用いた実験系へ応用され、実験結果を原子レベルで理解することが可能となった。また、3D-AFM 像の新規シミュレーション手法の開発は、現在の高速 AFM よりも約 5 桁も速い運動情報を構造情報と同時に計測する理論の着想につながり、この提案により科研費基盤 B を受給中である。さががけ研究からの大きな発展が続いており、感謝したい。

研究の進め方については、研究実施体制はさががけのため該当せず、研究費の執行状況については、概ね遅滞なく執行しており、概ね順調であったと思う。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、Hi-C からの新たなヘテロクロマチン・ユークロマチンの分類法からは、染色体の構造だけでなく、動きやすさやアクセスしやすに関する情報を得ることもできる。染色体の根源的理解は科学の基盤であり、ユークロマチンの方がコンタクトが多いという情報は、いずれ大学の教科書に書かれても良いほどの大きな波及効果があると考えている。一方、技術に関しては、どのような新たな技術が生まれるのかは今未知数であるが、私の理解では、より根源的な科学が発展する(深掘りされる)ほど、その後時間はかかるかもしれないが、より大きな技術革新が起きている場合が多いと考えている。社会や経済への波及効果はさらにその後の問題であろうが、染色体構造の情報は癌を含む様々な病気のオーダーメイド医療の根幹となるだろう。また、個人の将来発生しうる病気もその人の染色体構造と関係があると考えられるため、発生しうる病気の予測にも繋がり、その場合、安価な予防的医療を進めることで医療費の抑制にも繋がると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. 炭竈享司, Filippo Federici Canova, David Z. Gao, Marcos Penedo, 宮澤佳甫, Adam S.

Foster, 福間剛士 “Computed three-dimensional atomic force microscopy images of biopolymers using the Jarzynski equality” Journal of Physical Chemistry Letters (2022) 13, 5365-5371
3D-AFM は溶液中で動いている染色体等の生体高分子の 3 次元構造を計測し得る技術の一つである。しかし、柔らかく動いている生体分子がどのような 3D-AFM 像として見えるのかは自明ではなかった。この論文では、そのような分子の 3D-AFM を理論予測するシミュレーション手法を開発することで、分子の動きの約 10 倍で走査する場合に紐状の 3D-AFM 像として映し出されることを解明した。さらに、アクチン繊維について実験とシミュレーションを比較することで、開発したシミュレーション手法の妥当性を検証した。
2. 炭竈享司 “Computation of topographic and three-dimensional atomic force microscopy images of biopolymers by calculating forces” Biophysical Reviews (2023) 15, 2059-2064
従来の 3D-AFM の計算手法と論文 1 で開発した手法がどのように違うかを、計測にかかる時間と試料の分子運動の速度の関係から解説した。従来あまり顧みられていない AFM の計測原理に関わる問題だが、AFM 像には分子の速度情報が隠れており、特に高速 AFM を含む生体分子の AFM 計測では顕著である点を指摘した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数：0 件

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表 (招待講演のみ)

- (1) 炭竈享司 “Computational and theoretical studies in collaboration with experiments to elucidate biological phenomena” International Conference on Theoretical and High Performance Computational Chemistry 2024 2024 年 4 月 21 日
- (2) 炭竈享司 “AFM image computations by force calculation and combined studies of AFM and MD simulations” The First International Symposium of Nano Life Science: Nano Biotechnology, Biosensor, Computation (NanoBiocom2023) 2023 年 9 月 18 日
- (3) 炭竈享司 “Chromosome modeling by polymer simulation and comparison with 3D-AFM measurements” 第5回ゲノム生物物理学セミナー 2023 年 8 月 28 日
- (4) 炭竈享司 “Simulations vs. experiments – three case studies” Sci-Mix in Kanazawa 2022: Change the World by Green Innovation and Science 2022 年 10 月 7 日
- (5) 炭竈享司 “Computation of three-dimensional atomic force microscopy images” Computational Biophysics of Atomic Force Microscopy – A Lecture-based Workshop 2022 年 9 月 20 日
- (6) 炭竈享司 “Simulation: Computational Microscope” 2nd WPI NanoLSI-iCeMS Joint Symposium on Nanometrology and Advanced Materials 2022 年 1 月 13 日

その他の招待講演 4 件、口頭発表 3 件、ポスター発表 7 件

プレスリリース

(1)「3次元原子間力顕微鏡像の新たなシミュレーション手法を開発 ～ 生体分子の3次元構造を予測して映し出す～」

<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/highlights/22425/>

その他2件

<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/highlights/28186/>

<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/highlights/16711/>