

転写制御に関わる染色体の動的構造モデリング:
DNA ループからゲノム構造まで

徳田 直子

目次

第1章 序	4
第2章 エンハンサー阻害活性における DNA ループの役割	6
2.1 序論	6
2.2 シミュレーション手法	10
2.2.1 粗視化 DNA モデルの構築	10
2.2.2 モンテカルロシミュレーション	13
2.3 シミュレーション結果と考察	15
2.3.1 エンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる構造のもとでの エンハンサーとプロモーターの接近確率	15
2.3.2 エンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる構造において 遺伝子の発現が抑制される理由	18
2.4 まとめと議論	22
第3章 出芽酵母の染色体構造データに基づくランジュバン動力学シミュレーション	24
3.1 序論	24
3.2 シミュレーション手法	27
3.2.1 核内における出芽酵母の染色体の平均構造の粗視化	27
3.2.2 ランジュバン動力学シミュレーション	27
3.2.3 粗視化染色体モデルに対するポテンシャルエネルギー関数	28
3.2.4 シミュレーションの詳細	35
3.3 シミュレーション結果と考察	38
3.3.1 核内構造および揺らぎを考慮した出芽酵母の核内染色体の様子	38
3.3.2 染色体内・染色体間に働く特異的相互作用の強さについての考察	39
3.3.3 核膜から制約を受けた染色体のブラウン運動	41
3.3.4 染色体の特徴のある領域の核内におけるトラジェクトリー	42
3.3.5 テロメアの核膜との相互作用は、染色体構造を保つのに必要である	43
3.4 まとめと議論	46
第4章 まとめ及び展望	48
謝辞	51
付録 A 自由エネルギー F のモンテカルロ法による計算の仕方	52
付録 B シミュレーションにおける諸設定	54

付録 C 出芽酵母のクロマチン繊維の持続長	56
付録 D Andronescu 博士からの追加情報	58
付録 E 出芽酵母の核内構造	59
付録 F 4C 法で推測された構造において核膜付近に位置している染色体の領域	65
付録 G 各染色体におけるセントロメア及びテロメアのゲノム位置	66
付録 H 4C 法で推測された構造データにおけるセグメント長	70
付録 I 遺伝子の染色体上での位置 (<i>URA3</i> , <i>HXK1</i>)	71
付録	52
引用文献	72

第1章 序

ヒトゲノムの解読完了宣言が出された2003年から数年を経た“いま”という時代は、ゲノム研究がとてもおもしろく、そして新しい発見が生まれやすい時期にあると考えられる(1)。そのように考えられる理由はいくつか挙げられる。1つ目の理由は、ゲノムプロジェクトで解読された生物の1次元的な塩基配列が、核内ではどのような3次元構造をとっているのかを推測できる手法が開発されたことである(2)。例えば、近年、DuanらはChromosome Conformation Capture-on-Chip(4C)法に基づいて出芽酵母の間期核内における16本すべての染色体平均構造モデルを提案した(3)。そのモデルは、4C法によりゲノム全体にわたって染色体上の2点間の接近頻度を測定し、その接近頻度から得られた2点間距離をよく再現するように構築された染色体平均構造である。この平均構造からは、各染色体はランダムに分布しているのではなくある特定の領域に偏って分布していることが示唆された。また、核内の染色体のセントロメアは紡錘極体付近に分布し、テロメアは紡錘極体とは向かい合う側に分布していることも示唆された。2つ目の理由は、Tanizawaらによって、分裂酵母の核内における染色体の構造が、遺伝子の発現調節領域における塩基配列の情報や遺伝子の発現調節のはたらきと関連していることが示唆されたことである(4)。具体的には、近年“転写ファクトリー”(5, 6)として知られている核内の転写が活発におこなわれている領域の形成にプロモーターの塩基配列の並び方が関連していることが示唆された。3つ目の理由は、計算機を用いることで、大量の実験データを解析することや核内におけるすべての染色体のモデリングおよびシミュレーションが可能となり、ゲノムの情報と染色体の構造とその機能との関係をゲノム全体についても調べることが可能となったことである。

真核生物の遺伝子の発現は、時期特異的にまた組織特異的に調節されている。そのような遺伝子の発現制御は、エンハンサーやインスレーターと呼ばれる遺伝子発現調節領域が担っていることが知られている。エンハンサーは遺伝子の発現を活性化する機能を持つ調節領域であり、エンハンサーが機能する際には、RNA合成開始点を示すプロモーター配列に転写因子を介して接近していることが知られている(7, 8)。一方、インスレーターはヘテロクロマチンの拡大を妨げ、ゲノムの機能領域を区画化する“位置効果バリア”のはたらきと、エンハンサーとプロモーターの間に位置しているときにエンハンサーの機能を阻害し、遺伝子の発現を抑制する“エンハンサー阻害活性”のはたらきをもつことが知られている。このインスレーターの2つ目のはたらきである“エンハンサー阻害活性”のしくみは未だ明らかになってはいない。例えば、インスレーターは、エンハンサーとプロモーターの位置に対して配置している場所や数に依存し、遺伝子の発現を抑制したり活性化したりすることが知られているが、これらの区別が生じるメカニズムは明らかとなっていない。また、近年、エンハンサー、プロモーター、*tet* オペレーターあるいは*lac* オペレーターの配置を人為的に制御したDNAを用いることで、*tet* オペレーターあるいは*lac* オペレーターがインスレーターと同じようにエンハンサーの機能を阻害することが示された(9, 10)。これらの配置において、遺伝子の発現が抑制される理由として、DNAの構造の安定性が遺伝子の発

現調節のしくみに関与している可能が考えられるが、これまでその可能性について詳しく検討されたことはなかった。そこで、第2章では、*tet* オペレーターあるいは *lac* オペレーターによって、一遺伝子の発現が抑制される DNA の数千塩基対の領域に着目し、“エンハンサー阻害活性”のしくみを DNA 鎖の統計力学的な視点から考察した。すなわち、インスレーターのもつ2つの役割である遺伝子の発現の抑制と活性化の機能を DNA 鎖の構造の安定性という視点から統一的に説明することを試みた。

次に、着目する空間的なスケールを数 μm まで広げてみると、核内の染色体は混ざり合うことなく各染色体はそれぞれの領域に偏って分布していることが示唆されている(3, 4)。このような核内における平均的に片寄りのある分布は“染色体テリトリー”と呼ばれている。一方、核内の染色体は熱揺らぎや化学反応による非平衡揺らぎにさらされた環境下であり、染色体はその平均構造の周りに大きく揺らいでいることが実験によって示されている(11, 12)。そのため、例えば、遺伝子の発現調節や DNA 修復のような核内における染色体が関わる機能を理解するためには、核内における染色体の静的な側面と動的な側面をともに考慮することが重要である。また、従来の実験では核内の一部の染色体の分布あるいは動きを追跡することに限られており、核内すべての染色体の揺らぎに関する情報を直接得ることはできない。そこで、第3章では、Duan ら(3)によって報告された核内における平均的な染色体構造の周りの揺らぎを考慮した染色体動力学モデルを構築し、以下のような問題に対するアプローチを試みた。(1) 核内における染色体の静的な描像と動的な描像を統一するモデルの構築に重要な相互作用はどのようなものであるのか。(2) 染色体の揺らぎを表現する染色体内・染色体間の相互作用の強さはどの程度であるのか。(3) 揺らぎにさらされた環境下にある染色体はどのような相互作用によって“染色体テリトリー”を形成しているのか。

これら2つの章で展開される研究はともに、生物学的な現象に対して物理学的な視点と計算機シミュレーションという手法を用いてアプローチするものである。このようなアプローチは一般に、以下のような意味で生物学的な立場からの研究を補完する役割を担うことができると考えられる。(1) 分子生物学的手法や遺伝学的手法による研究によって、重要な遺伝子を同定することができるが、現在のところ構造については限られた情報しか得ることができない。これに対して、分子シミュレーションによって得られる構造アンサンブルは、粗視化によって分解能をある程度犠牲にしているとはいえ、構造とその揺らぎについて分子全体の情報を与えることができる。(2) 物理学的な視点からは、熱揺らぎのエネルギースケールと、分子内・分子間相互作用のエネルギースケールの相対的な関係は重要である。実験的に相互作用のエネルギースケールを直接測定することは難しいが、シミュレーションにおいては、相互作用のエネルギースケールをどの大きさにしたときに最もよく実験結果を再現できるかを調べることにより、相互作用のエネルギースケールの情報を得ることができる。こうして得られる熱揺らぎと相互作用の相対的な関係は、分子のふるまいに直接影響するため、生物学的現象の理解の助けとなる。

第2章 エンハンサー阻害活性におけるDNAループの役割

2.1 序論

酵母からヒトまでさまざまな真核細胞の核内では、多数の遺伝子の転写が時期特異的に、また組織特異的に制御されている。そのような転写制御において、遺伝子の発現を活性化する機能を持っている DNA 上の領域はエンハンサーと呼ばれている (13)。このエンハンサーは、プロモーター領域から離れた位置からでも遺伝子の発現を活性化し、エンハンサーとプロモーターの間隔は数十 kbp あるいはそれ以上に及ぶこともある。すなわち、真核生物の多数の遺伝子の転写はいくつかのプロモーターとエンハンサーが混在している染色体上で時期特異的にまた組織特異的に制御されている。インスレーターは、そのようなプロモーターとエンハンサーが混在している状況からエンハンサー・プロモーター相互作用の秩序を作り出す遺伝子発現調節領域である (14–18)。インスレーターはエンハンサーとプロモーターの間に位置しているときにエンハンサーの機能を阻害して遺伝子の発現を抑制する“エンハンサー阻害活性”のはたらきと、ヘテロクロマチンの拡大を妨げ、ゲノムの機能領域を区画化する“位置効果バリア”のはたらきをもっている (19)。本研究では、これらのインスレーターのはたらきのうち1つ目の“エンハンサー阻害活性”のはたらきに注目する。

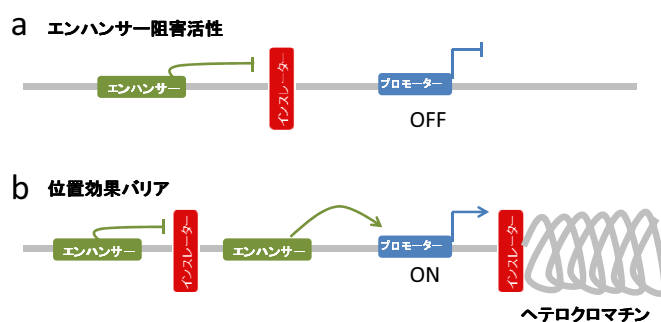


図 2.1: 遺伝子発現調節領域, インスレーターの主な機能. (a) エンハンサーとプロモーターの間に位置しているときには、ターゲットとなる遺伝子の発現を抑制する. (b) ヘテロクロマチンの拡大を妨げ、遺伝子の発現が抑制される効果を和らげる.

インスレーターによるエンハンサー阻害活性の仕組みを説明するモデルとして、トラッキングモデル (別名, プロモーターデコイモデル) やインスレーターペア形成モデル (別名, 構造モデル) などが提案されている (図 2.2 および文献 (20) 参照). トラッキングモデルは、エンハンサーの機能が阻害される原因は、エンハンサーからプロモーターへ DNA 上

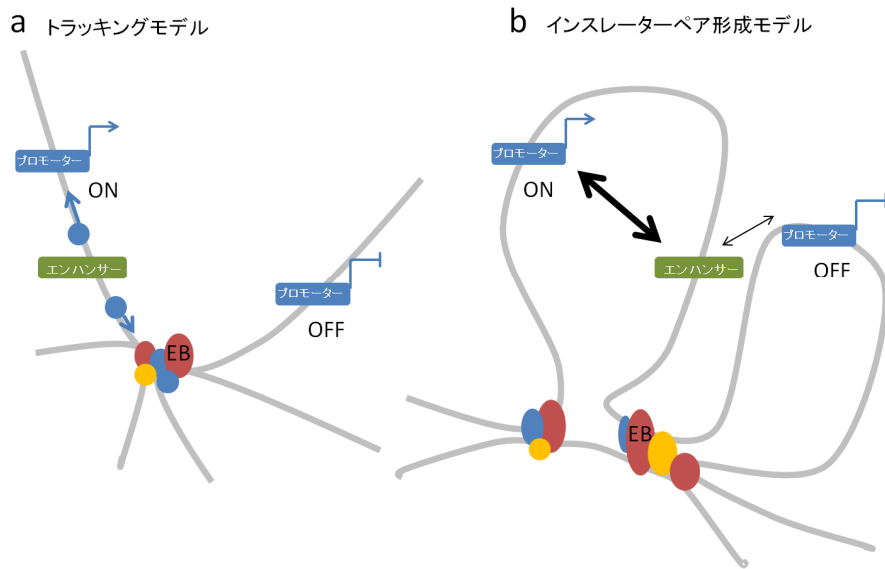


図 2.2: (a) トラッキングモデル. (b) インスレーターペア形成モデル. 黒色の矢印は、エンハンサーとプロモーターの相互作用を表す. このモデルでは、同一のループ内にあるエンハンサーとプロモーターの接近頻度は同一のループ内でないエンハンサーとプロモーターの接近頻度より高くなることを仮定している. 黒色の矢印の太さはその接近頻度の大きさを表す. EB: エンハンサー阻害活性蛋白質. 文献 (20) の図を改変.

をそって移動する転写因子や RNA ポリメラーゼ II がインスレーターによりトラップされてしまうことであると説明する (21, 22). もう一方のインスレーターペア形成モデルは、エンハンサーの機能が抑制される原因はインスレーターが対を形成することにより、エンハンサーとプロモーターの接近のしやすさが変わることでであると説明する (23–26). 最近では、インスレーターペア形成モデルを支持するデータが多く報告されている (27–29). 例えば、Bondarenko らの実験で (9), 図 2.3a のように、プロモーターの両側に *lac* オペレーターが配置されたプラスミドを用い、*lac* リプレッサー蛋白質により DNA ループが引き起こされる状況のもとで、DNA ループ内における遺伝子が発現するかどうかを調べた. その結果、エンハンサーとプロモーターの間に位置している *lac* オペレーターが他の *lac* オペレーター領域とリプレッサー蛋白質を介して対を形成する構造をつくるときのみ、*lac* オペレーターはインスレーターの機能と同じように遺伝子の発現を抑制できることを示した. このことは、プロモーターとエンハンサーが同一のループ内に入らないという DNA の構造、すなわち、プロモーターをエンハンサーからトポロジカルに隔てるという DNA の構造が、遺伝子の発現の抑制に十分な条件であることを示している. さらに、Bondarenko らの試験管内の実験 (9) で示されたことが生体内でも起こっていることを示したのが彼らの実験 (10) である. Ameres らは、全長が約 6 kbp の線状 DNA に、図 2.4(a) に示すような、エンハンサー、プロモーターおよびインスレーター類似配列領域としての *tet* オペレーターを配置した系を HeLa 細胞内に導入し、Tet リプレッサー蛋白質を介して *tet* オペレーターが対を形成する状況のもとで、着目する遺伝子が発現するかどうかを調べた. その結果、Bondarenko らの実験結果 (9) と同じように、エンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる

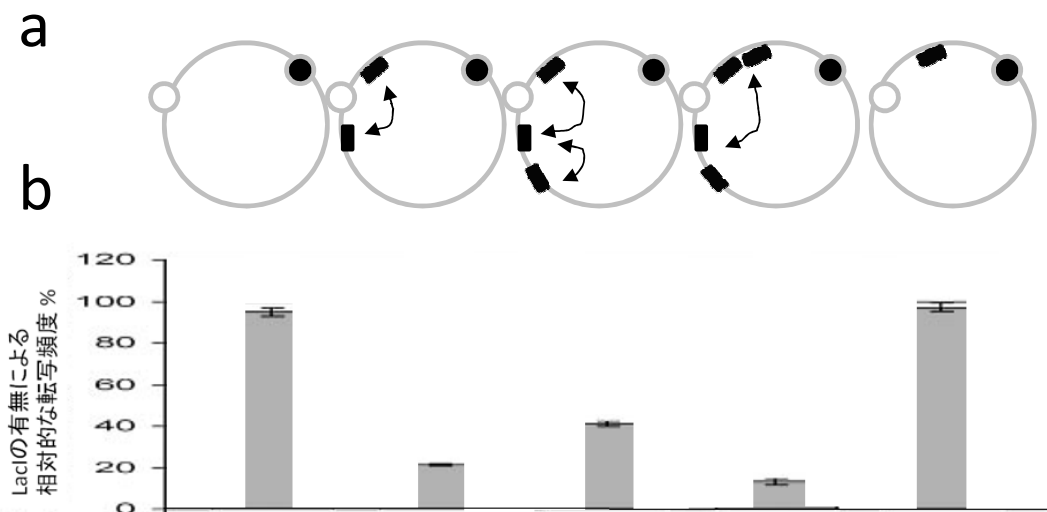


図 2.3: 遺伝子の発現を抑制するためには、エンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる必要があることを *in vitro* で示した Bondarenko らの実験. (a) *lac* オペレータ (四角), エンハンサー (黒丸), プロモーター (白丸) を配置したプラスミド. エンハンサーはプロモーターから 2.5 kbp 離れた位置に挿入されている. *lac* オペレータ間の矢印は, *lac* リプレッサー蛋白質によって DNA ループが引き起こされるとされると思われる相互作用を表す. (b) *lac* リプレッサー蛋白質がない条件下に対して, *lac* リプレッサー蛋白質がある条件下における相対的な転写量を示す. 文献 (9) より改作して転載.

構造のもとでは, そのような構造が引き起こされない状況に比べて, 遺伝子の発現が抑制されることが示された (図 2.4(b) 参照). 彼らは, エンハンサーがプロモーターからトポロジカルに隔てられていない二つの可能性についても検討している. 一つ目の可能性は, Tet リプレッサーが, エンハンサーの片側の *tet* オペレーター領域とのみ結合している場合である (インターナルコンタクトモデル). 二つ目の可能性は, ホモ二量体の Tet リプレッサー蛋白質の片側だけが, *tet* オペレーター領域に結合している可能性である (ビーズストリングモデル). 彼らは Tet リプレッサー蛋白質が *tet* オペレーター領域に結合しているときの DNA 鎖をいくつかの位置で切断した断片を電気泳動することで, Tet リプレッサー蛋白質がエンハンサーの両側の *tet* オペレーター領域に結合していることを確認し, この可能性を排除している. また彼らは, 実際にホモ二量体の Tet リプレッサー蛋白質の片側だけが *tet* オペレーター領域に結合する蛋白質を用いて, そのような条件下では, 遺伝子の発現はあまり抑制されないことを確認し, この可能性も排除している. これらのことから, Ameres らは, Tet リプレッサー蛋白質が, エンハンサーの両側に結合し, エンハンサーをループ状に閉じ込めるような構造を引き起こしているときに, ターゲット遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした. Ameres らの実験 (10) においては, *tet* オペレーターと Tet リプレッサー, また Bondarenko らの実験 (9) においては, *lac* オペレーターと *lac* リプレッサーという “のりしろ” と “のり” を用いて, 彼らはエンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる構造を引き起こす *tet* オペレーター領域や *lac* オペレーター領域がインスレーターと同様の機能を持つことを示した. しかしながら, そのような構造のもとで遺伝子の

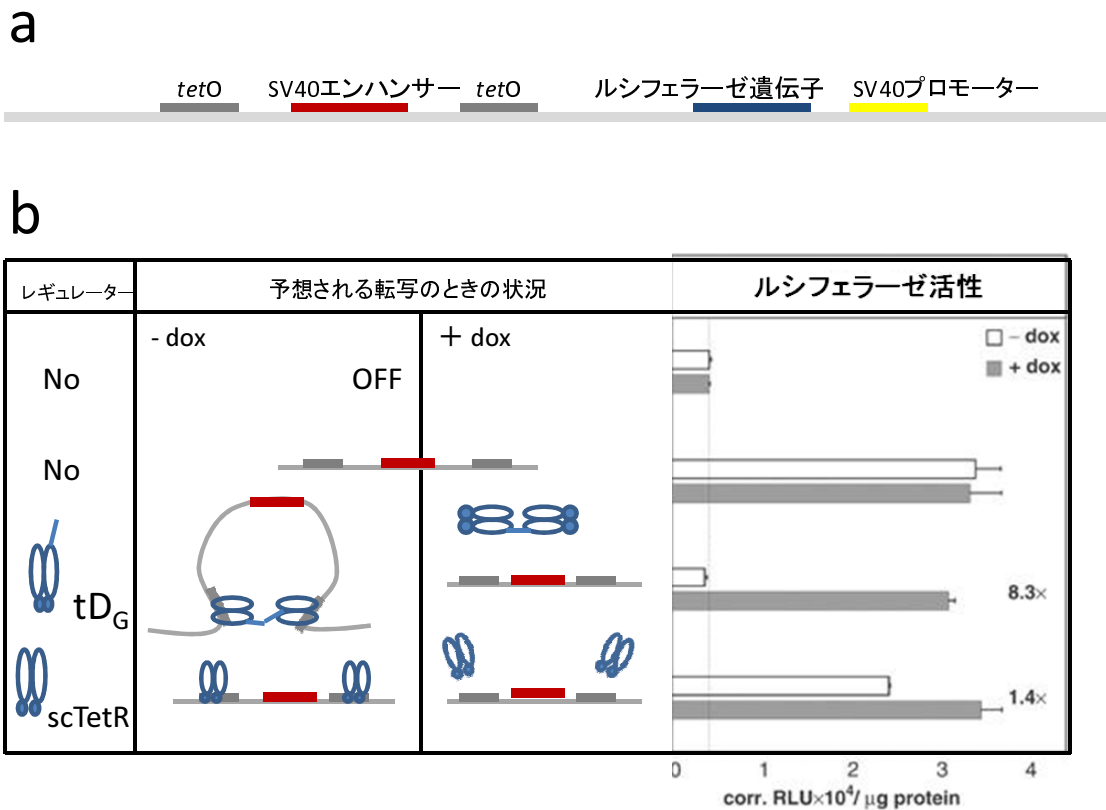


図 2.4: (a) SV40 プロモーター から 2 kbp 離れた位置にある SV40 エンハンサー領域 (237bp) の両側に, *tet* オペレーター領域 (270bp) が位置するように設計した線状 DNA. (b) 右の欄は, (a) で示した線状 DNA を HeLa 細胞内に導入したときにドキシサイクリン (dox) がある条件下とない条件下にみられるルシフェラーゼ活性の値を示す. ドキシサイクリンは, Tet リプレッサー蛋白質に結合して, Tet リプレッサー蛋白質が *tet* オペレーターに結合する能力を失わせる. 左の欄は, ドキシサイクリンがある条件下とない条件下における Tet リプレッサー蛋白質によって引き起こされる DNA 構造の想像図. 文献 (10) より改作して転載.

発現が抑制される分子機構については明らかにされていない. 本章で説明する研究の目的は, Ameres ら (10) の実験系に類似した粗視化 DNA モデルを DNA の物性に基づいて構築し, DNA 高分子鎖の統計力学的な性質を調べることにより, インスレーターの作用メカニズムを明らかにすることである.

2.2 シミュレーション手法

この節では、まず最初に、Ameres ら (10) が実験に用いた DNA を表現する粗視化 DNA モデルをどのように構築したのかについて述べ、その後、本研究で用いたシミュレーション手法についてまとめる。

2.2.1 粗視化 DNA モデルの構築

本研究では、図 2.5 のような、Ameres らの実験 (10) で用いられている全長約 6 kbp の DNA の粗視化モデルを構築した。Ameres ら (10) の実験で用いられた DNA においては、SV40 プロモーターから 2.0 kbp 離れた場所に 237 bp の SV40 エンハンサーがあり、その両側に 270 bp の *tet* オペレーターが挿入されている。そして、Tet リプレッサーのホモダイマーが *tet* オペレーターに結合することにより、エンハンサーが DNA ループ内に閉じ込められる構造を引き起こすように、塩基配列の順序が設計されている。

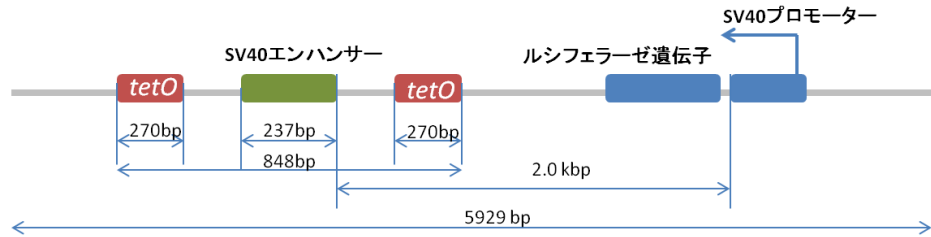


図 2.5: Ameres らの実験 (10) で用いられている約 6 kbp の線状 DNA におけるエンハンサー、プロモーター及び *tet* オペレーター領域の配置。

エンハンサーが DNA ループ内にある状況のもとで、なぜ遺伝子の発現が抑制されるのかについて統計力学的な視点から調べるために、本研究では、ミミズ鎖・ビーズ併用モデル (Combined wormlike chain and bead model)(30–32) に基づき、新たに 2 つの相互作用を導入した粗視化 DNA モデルを構築した。

このモデルでは、全長約 6 kbp の DNA を間隔 30 bp でビーズがつながった鎖として表現する。図 2.6 のように、これらのビーズがつながった鎖を DNA の物性を持つ高分子鎖として表現するために、以下のエネルギー関数を用いた。

$$E = E_s + E_b + E_{\text{rep}} + E_e + E_{\text{loop}} + E_{\text{ep}} \quad (2.1)$$

ここで、 E_s は結合伸縮エネルギー、 E_b は弾性曲げエネルギー、 E_{rep} は排除体積効果を表す斥力エネルギー、 E_e はセグメント間の静電エネルギー、 E_{loop} はインスレーター類似配列間の相互作用、 E_{ep} は転写複合体形成エネルギーを表す。式 (2.1) の各項を以下に順に説明する。

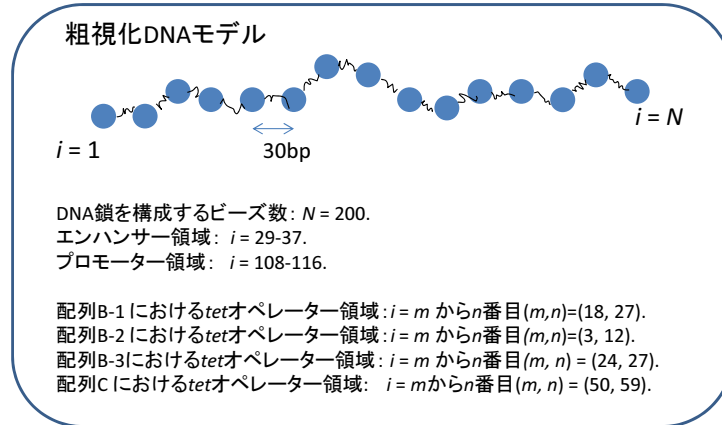


図 2.6: 全長が約 6 kbp の DNA を、ばねで連結されているビーズから構成される高分子鎖として表した、粗視化 DNA モデル. 30 bp の DNA 鎖を 1 つのセグメントとして表現することにより、約 6 kbp の DNA 鎖全体を 200 ビーズで表現した. また、エンハンサー、プロモーター及び tet オペレーターに対応するビーズ番号が図中に示されている.

DNA の物性を表現するビーズ間相互作用

(a) 結合伸縮エネルギー

まず、第 1 項の結合伸縮エネルギーは、DNA を隣接しているビーズが自然長 l_0 を持つばねで連結されている鎖として表現したときのエネルギー関数である.

$$E_s = \frac{h}{2} \sum_{i=1}^{N-1} (l_i - l_0)^2 \quad (2.2)$$

ここで、 h はばね定数を表し、 l_i は i 番目のビーズと $i + 1$ 番目のビーズの間にある i 番目のセグメントの長さを表す. このエネルギー関数に含まれるばね変数の値は、Huang らの先行研究 (33) において用いられている値 $h = 100k_B T / l_0^2$ を用いた. ここで、 k_B はボルツマン定数を表す. また、シミュレーションを行う際の DNA の周りの溶媒環境は、温度 $T = 298$ K, $[\text{Na}^+] = 0.2$ M の状況を想定している. このような溶媒環境のもとでの DNA の持続長は約 50 nm であることが知られており (34)、結合伸縮エネルギーにおける自然長 l_0 は、この持続長を 5 分割した 10 nm としている.

(b) 弾性曲げエネルギー

第 2 項の弾性曲げエネルギーは、半屈曲性高分子鎖である DNA の堅さを表す.

$$E_b = \frac{g}{2} \sum_{i=1}^{N-2} \theta_i^2 \quad (2.3)$$

ここで定数 g は曲げ剛性定数であり、 θ_i は、 i 番目のセグメントと $i + 1$ 番目のセグメントとの角変位を表す. このエネルギー関数に含まれるパラメータ g は、Huang らの先行研究 (33) において用いられている値 $g = 4.81 k_B T$ を用いた.

(c) 排除体積効果を表す斥力エネルギー

第 3 項は高分子鎖の排除体積相互作用を表す.

$$E_{\text{rep}} = K_{\text{rep}} \sum_{j>i+1} \left(\frac{r_{\text{rep}}}{r_{i,j}} \right)^{12} \quad (2.4)$$

ここで $r_{i,j}$ は i 番目と j 番目のビーズ間の距離を表す. パラメータ K_{rep} と r_{rep} は, Liu and Chan の論文 (35) で用いられている値 $K_{\text{rep}} = 1.0 k_{\text{B}}T$, $r_{\text{rep}} = 2.0 \text{ nm}$ を用いた.

(d) セグメント間の静電相互作用エネルギー

第 4 項はカウンターイオンによって遮蔽されたセグメント間の相互作用エネルギーを表す.

$$E_e = \frac{\nu^2 l_0^2}{D} \sum_{j>i+1} \frac{\exp(-\kappa r_{i,j})}{r_{i,j}} \quad (2.5)$$

ここで ν は, DNA の有効線電荷密度を表す. 本研究においては, DNA 鎖の周りの環境が 1 価の塩濃度で 0.2 M のときの, Vologodskii and Cozzarelli (36) らの見積りの値 $\nu = 9.94 e/\text{nm}$ を用いた (ただし e は電子の素電荷を表す). また D は水の誘電率を表す ($D = 80$). κ はデバイ長の逆数であり, デバイ長は $r_D = 1/\kappa = \sqrt{(Dk_{\text{B}}T)/(8\pi e^2 c_s)}$ で表される (37). ここで c_s は 1 価イオンのモル濃度である. 本研究においては, DNA 鎖の周りの環境を 1 価イオンから成る塩濃度 0.2 M, $T = 298 \text{ K}$ と仮定しているため, デバイ長は $r_D = 0.69 \text{ nm}$ と計算される.

DNA の特定の部位にのみ働く相互作用

Ameres らの実験 (10) で用いられた DNA に対応するシミュレーション系を構築するために, これらのエネルギー関数に加えさらに 2 つの相互作用を導入した. 1 つ目は, インスレーター類似配列間に働く相互作用で, 2 つ目は, エンハンサーとプロモーターに対応する部位間に働く相互作用である.

(e) インスレーター類似配列間の相互作用

以下のエネルギー関数は, インスレーター類似配列部位を構成するビーズ間に働く相互作用を示す.

$$\begin{aligned} E_{\text{loop}} &= \frac{a}{2} \sum_{i=m}^n (r_{i,j} - b)^2 \quad \text{when } r_{i,j} \geq b \\ &= 0 \quad \text{when } r_{i,j} < b \end{aligned} \quad (2.6)$$

ここで, インスレーター類似配列の領域を構成するビーズ番号を i, j と示す. また, インスレーター類似配列間の自然長 b は, エンハンサーとプロモーター領域が空間的に接近し, 遺伝子を読み取る際に形成される蛋白質複合体の典型的なサイズ $b = 10 \text{ nm}$ (38, 39) を用いた. また, インスレーター類似配列間に働くばね定数の値は, シミュレーションの間に得られるすべての構造においてインスレーター類似配列間が離れない程度の相互作用の強さで

ある $a = 100 k_B T / l_0^2$ を用いた.

(f) 転写複合体形成のエネルギー (エンハンサー・プロモーター相互作用)

ミミズ鎖・ビーズ併用モデルに, 新たに導入した 2 つめのエネルギー関数は, エンハンサーに対応する領域とプロモーターに対応する領域の間に働く相互作用である. この相互作用を導入したのは, 真核生物のある遺伝子が読み取られる際には, エンハンサー領域がプロモーター領域に転写因子を介して空間的に接近していることが実験的に示されているためである (7, 40).

$$\begin{aligned} E_{ep} &= - \sum_{i=k}^l \mu r_{i,j} \quad \text{when } r_{i,j} \leq 10 \text{ nm} \\ &= 0 \quad \text{when } r_{i,j} > 10 \text{ nm} \end{aligned} \quad (2.7)$$

ここで, エンハンサー領域を構成するビーズ i を $29 \leq i \leq 37$ に対応づけ, それらのビーズに対応して相互作用するプロモーターのビーズ j は $j = 145 - i$ とした. このときエンハンサー領域のサイズは, Ameres らの実験系 (10) とほぼ同じ 240 bp となっている. また, この相互作用の強さを表す μ の値は, 配置 A において, エンハンサーとプロモーターが離れている構造と接近している構造が同じ割合で出現する値 ($\mu/k_B T = 0.356 \text{ nm}^{-1}$) に設定した. このような相互作用のもとでは, エンハンサー領域 ($29 \leq i \leq 37$) がプロモーター領域 ($108 \leq i \leq 116$) に 10 nm 程度まで接近すると, 転写複合体形成エネルギー E_{ep} は $\sim 32 k_B T$ 下がることになる. この値は, 転写因子が DNA に結合する際の典型的な結合エネルギー 10-15 kcal/mol (17-25 $k_B T$) (41) とオーダーが一致している. このことから, エンハンサー領域とプロモーター領域間に働く相互作用の強さは, 転写因子がエンハンサーやプロモーターに結合する際に働く相互作用の強さと同程度であり, もっともらしいと考えられる.

2.2.2 モンテカルロシミュレーション

熱平衡状態を計算機の中でシミュレートする手法として, 主にモンテカルロ法と分子動力学法があるが (42), 本研究では, 前者のモンテカルロ法により, 熱平衡状態における構造アンサンブルを得て解析を行った. ここでは, モンテカルロ法でのシミュレーションアルゴリズム及びモンテカルロ法における構造変化の試行についてまとめる.

メトロポリス・モンテカルロ法のアルゴリズム

メトロポリス法に従い, DNA の構造を以下の手順に従って連続的に変化させた.

- (1) DNA 高分子鎖を初期構造に配置する. 本研究ではジグザグにビーズを連ねた構造を初期構造とした. 具体的には偶数番目のビーズ i の座標はナノメートル単位で $r_i = (10i/\sqrt{2}, 0, 0)$ とし, 奇数番目のビーズ i の座標は $r_i = (10i/\sqrt{2}, 10/\sqrt{2}, 0)$ とした.
- (2) DNA 高分子鎖の構造変化の試行を行い, 試行後の構造と試行前の構造の系全体のエネルギー差 ($\Delta E = E_{\text{new}} - E_{\text{old}}$) を計算する.

- (3) $\Delta E \leq 0$ であれば試行後の構造を採用する. $\Delta E > 0$ であれば, 確率 $P_{\text{acc}} = \exp [(-\Delta E)/k_B T]$ で試行後の構造を採用し, 確率 $1 - P_{\text{acc}}$ で試行を棄却し試行前の構造のままで続行する.
- (4) 以下, (2)-(3) の繰り返しによって構造を次々と変化させていく.

モンテカルロ試行の構造変化方法

メトロポリス法のアルゴリズムの手順 (2) の箇所に記述した, 鎖を構成するビーズへの構造変化の試行の方法 (ムーブセット) について記述する. ムーブセットは, 2 通りのタイプを用いた. 一つ目のムーブセットは, 局所構造変化であり, 図 2.7 a にあるように, すべてのビーズからランダムに i 番目のビーズを選択し, そのビーズの座標に $\Delta \mathbf{r}$ を加える. 具体的には 0 から 1 までの一様乱数を η_1, η_2, η_3 と選択し, $\Delta \mathbf{r} = (dr \times \eta_1, dr \times \eta_2, dr \times \eta_3)$ とした. ただし $dr = 1 \text{ nm}$ である. 二つ目のムーブセットは, 大域的構造変化であり, 図 2.7 b にあるように, まず, すべてのビーズからランダムに i 番目のビーズを選択し, その後, i 番目以降のビーズの座標をオイラー角 (θ, ϕ, ψ) だけ回転させる. この 2 通りの変化の加え方は, Jian and Vologodskii らの方法 (37) の方法に従っている.

また, 本研究局所構造変化の試行の割合を 40 %, 大域的構造変化の試行の割合を 60 % に設定した. この大域的構造変化の試行の割合は, メトロポリス判定において試行が採用される更新率が適度な値になるように決めればよいが, 本研究における更新率は配置 A の構造において約 40 % であるように定めた.

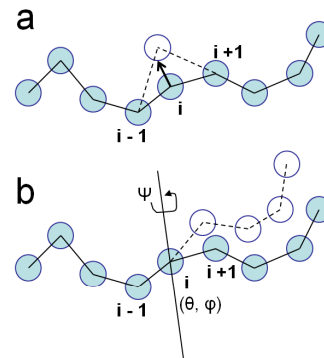


図 2.7: モンテカルロ計算に用いられる 2 つのタイプの試行変化. (a) 局所構造変化, (b) 大域的構造変化

2.3 シミュレーション結果と考察

私たちは, Ameres らの実験 (10) における DNA 鎖に対応した粗視化 DNA モデルを計算機上に構築し, その構造アンサンブルが持つ統計的な性質と実験で報告されている遺伝子の発現量の間の関係を調べることにより, エンハンサー阻害活性における DNA ループの役割について考察した.

2.3.1 エンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる構造のもとでのエンハンサーとプロモーターの接近確率

本研究では, 図 2.8 にあるような Ameres らの実験 (10) に対応している配置 B-1 を含む 5 つのシミュレーション系を構築した. 配置 A においては, インスレーター類似配列は DNA に挿入されていない. 配置 B-1 においては, インスレーター類似配列は $18 \leq i \leq 27$ の範囲のビーズ i 及び $j = 66 - i$ で表されるビーズ j の 2ヶ所である. 配置 B-2 においては, インスレーター類似配列は $3 \leq i \leq 12$ の範囲のビーズ i 及び $j = 66 - i$ で表されるビーズ j の 2ヶ所である. 配置 B-3 においては, インスレーター類似配列は $24 \leq i \leq 27$ の範囲のビーズ i 及び $j = 66 - i$ で表されるビーズ j の 2ヶ所である. 配置 C においては, インスレーター類似配列は $50 \leq i \leq 59$ の範囲のビーズ i 及び $j = 129 - i$ で表されるビーズ j の 2ヶ所に配置している.

図 2.9 に, 配列 A, 配列 B-1, 配列 B-2 についてのシミュレーションで得られたエンハンサー領域とプロモーター領域の接近確率 P_{prox} を示す. この接近確率 P_{prox} は式 (2.8) で定義されるエンハンサー・プロモーター間の平均距離 \bar{r} が 10 nm 以内である確率として定義される.

$$\bar{r} = \frac{1}{9} \sum_{i=29}^{37} \langle r_{i,145-i} \rangle \quad (2.8)$$

エンハンサーとプロモーターの接近の基準を $\bar{r} < 10$ nm とした理由は, 遺伝子が読み取られる際に形成される典型的な蛋白質複合体サイズが 10 nm 程度であるため (38, 39), 遺伝子が転写されるときエンハンサーとプロモーターの平均距離はこの程度の距離であると仮定したからである. 配置 A に対する配置 B-1 における接近確率の比は $P_{\text{prox}}(\text{B-1})/P_{\text{prox}}(\text{A}) \approx 0.033$ となった. つまり, 配置 B-1 におけるエンハンサー領域とプロモーター領域との接近確率は配置 A に対して著しく減少することがわかった. この結果は, エンハンサー・プロモーター相互作用に含まれるパラメーター μ を $0.3 \text{ nm}^{-1} < \mu/k_{\text{B}}T < 0.4 \text{ nm}^{-1}$ の範囲で変えても定性的には変わらない. また, この計算結果は Ameres らの実験結果 (10) と整合性がある. つまり, Ameres らの実験 (10) における, 遺伝子の発現が抑制される状況では, DNA ループ内に閉じ込められたエンハンサーは, 空間的にプロモーターに接近しづらい状況にあり, そのために転写因子をプロモーター領域に寄せ集めるといったエンハンサーの機能が阻害されていることが推測される. ただし, どのような場合でも DNA ループ内に閉じ込められたエンハンサーは, 空間的にプロモーターに接近しづらい状況にある, というわけではない. そのことがわかるのが, 図 2.9 の配置 B-2 の結果である. この結果は $P_{\text{prox}}(\text{B-2})/P_{\text{prox}}(\text{A}) \approx 0.748$ であり, エンハンサーが DNA ループの中にあっても,

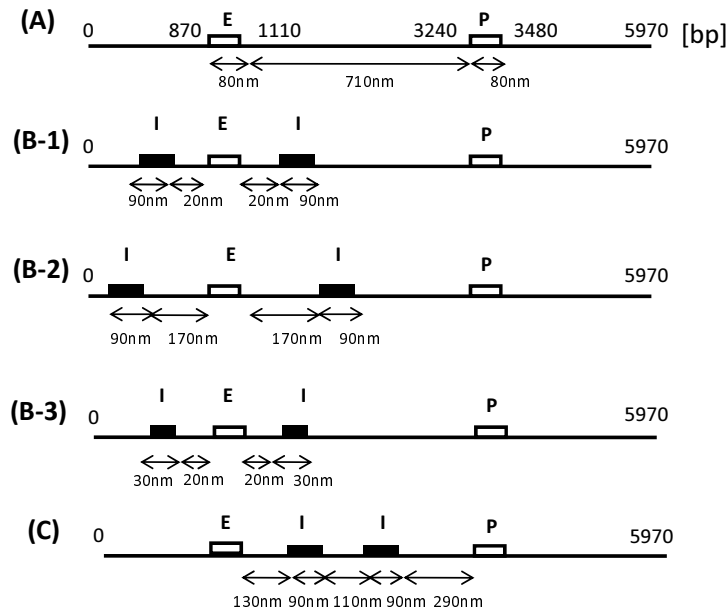


図 2.8: 粗視化 DNA モデルにおけるエンハンサー、プロモーター、インスレーター類似配列の並びおよび長さを変えた各配置 (配置 A から配置 C) を示す. 配置 A はインスレーター類似配列がないモデルである. 配置 B-1 は Ameres らの実験系 (10) と同様に, インスレーター類似配列がエンハンサーに対応する領域の両側に配置されているモデルである. 配置 B-2 は Ameres らの実験系 (10) より離れた位置に, インスレーター類似配列がエンハンサーに対応する領域の両側に配置されているモデルである. 配置 B-3 はエンハンサーに対応する領域の両側に Ameres らの実験系 (10) より短い長さのインスレーター類似配列が配置されているモデルである. 配置 C はエンハンサーに対応する領域とプロモーターに対応する領域の間にインスレーター類似配列が配置されているモデルである.

インスレーター類似配列間がペアを形成することで引き起こされる DNA ループのサイズが $8.4 \times l_p$ と DNA の持続長 ($l_p=50$ nm) より数倍以上長い場合には, エンハンサーはプロモーターに接近することができることを示している. この計算結果から, Ameres らの実験と同様な実験において, エンハンサーの両側に位置している *tet* オペレーター間の距離をこのシミュレーション系と同じ距離に変えた場合には, *tet* オペレーターはエンハンサーの機能をあまり阻害しないという結果が得られることが予測される.

図 2.10 では, 配置 B-3, 配置 C についてのエンハンサー領域とプロモーター領域との接近確率のシミュレーション結果を示す. 配置 B-3 においては, インスレーター類似配列間がペアを形成することで引き起こされる DNA ループのサイズは, Ameres らの実験系 (10) に用いられている長さと同様であるが, インスレーターに対応する領域の長さは 30 nm と短くなっている. このように, インスレーターに対応する領域を短くしても, エンハンサーを含む DNA ループサイズが, $2.4 \times l_p$ と DNA の持続長 l_p とあまり大差がない場合には, 接近確率は低くなる. この結果は, Ameres らの実験系 (10) の *tet* オペレーター領

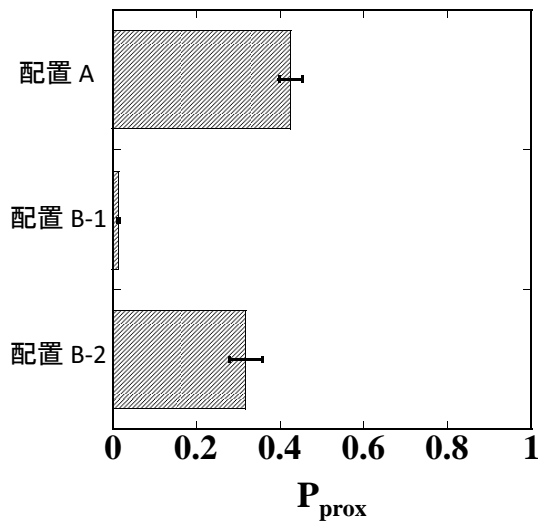


図 2.9: 配置 A, B-1, B-2 におけるエンハンサー領域とプロモーター領域の接近確率 P_{prox} を表す.

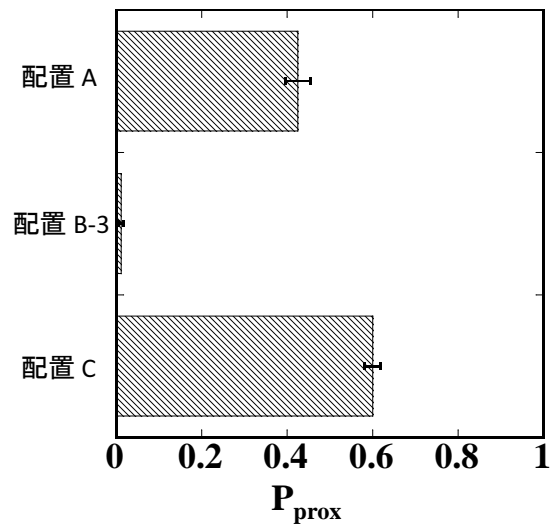


図 2.10: 配置 A, B-3, C におけるエンハンサー領域とプロモーター領域の接近確率 P_{prox} を表す.

域を短くしても, *tet* オペレーターが, エンハンサー阻害活性を示すことを意味するが, 実際の細胞内では, エンハンサー阻害活性を示すには, ある程度のインスレーター類似配列領域が必要であると考えられる. これは, あまりに短すぎる領域では, DNA の構造に制約を加えるための “のりしろ” にならないと考えられるからである. また, 配列 C の接近確率が配列 A の値より大きくなることが示された結果は (図 2.10 参照), Cai and Shen (24) や Muravyova ら (25) の実験データとつじつまが合っている. インスレーターは, エンハンサーとプロモーターの間に一つだけ存在する場合にはエンハンサーの機能を阻害することがあり, そうした実験結果を説明するモデルとして, トラッキングモデルやインスレーターペア形成モデルが提案されていた. しかし, Cai and Shen (24) や Muravyova ら (25) はエンハンサーとプロモーターの間に二つインスレーターを配置した実験系を構築し, そのような系ではインスレーターはエンハンサーの機能を阻害しないことを示した. この彼らの実験データは, トラッキングモデルでは説明がつかないことから, インスレーターのモデルとして, インスレーターペア形成モデルが真実に近いことが示唆された. しかしながら, これらの実験では, インプットの情報 (インスレーターをエンハンサーとプロモーターの位置に対していろいろ配置を変えた DNA) とアウトプットの情報 (ショウジョウバエの初期胚における遺伝子発現パターン) しか知ることができず, その過程における染色体の分子構造については知ることができなかった. しかし, 本研究では, 配列 C のように (図 2.8 参照) インスレーター類似配列がエンハンサーとプロモーターの間に二つ配置され, それらがペアを形成した構造のもとでは (図 2.14(c) 参照), エンハンサー領域とプロモーター領域の接近確率はインスレーター類似配列が配置されていない配列 A の値よりも高くなることが示された. これらの結果はインスレーターペア形成モデルを支持する結果である.

2.3.2 エンハンサーをプロモーターからトポロジカルに隔てる構造において 遺伝子の発現が抑制される理由

次に、図 2.9 や図 2.10 のように、エンハンサーとプロモーターの位置に対してインスレーター類似配列の配置を変えた場合に、エンハンサー領域とプロモーター領域の接近確率が変わる理由について議論したい。そのため、エンハンサー・プロモーター平均距離 \bar{r} を変数とする自由エネルギープロファイルの計算およびその自由エネルギーをエネルギーとエントロピーに分解する計算をおこなった。図 2.11 に自由エネルギープロファイルを示す。(具体的な自由エネルギープロファイルの計算方法は、付録 A を参照。) 色の違いは図 2.8 にある配列の違いを表す。また、ここでの自由エネルギーの値は相対的な値の違いのみが重要なため、 $10 \text{ nm} \leq \bar{r} < 11 \text{ nm}$ の自由エネルギーの値を基準値として各配置についての自由エネルギーの値をそろえている。図 2.11 における自由エネルギープロファイルから、いずれの配置の場合も 2 か所に安定な状態があることがわかる。一つ目は、配置 A, B-1, B-2 においては、 $\bar{r} = r_{\text{sep}} \approx 260 \text{ nm}$ 、配置 C においては $\bar{r} = r_{\text{sep}} \approx 190 \text{ nm}$ の構造である。また二つ目は、すべての配置において、エンハンサーとプロモーター領域が接近している $\bar{r} = r_{\text{jux}} \approx 10 \text{ nm}$ の構造である。この 2 つの状態の間の自由エネルギー差 $\Delta F(r_{\text{sep}}) = F(r_{\text{sep}}) - F(r_{\text{jux}})$ は、配置 A の場合には $3.95 k_B T$ 、配列 B-1 の場合には $0.75 k_B T$ 、配列 C の場合には $4.70 k_B T$ であった。これらのシミュレーション結果は、配置 B-1 は配置 A と比べて、エンハンサーとプロモーターの平均距離が 260 nm の構造から、 10 nm の構造への遷移が起こりづらい状況にあることを示している。その逆に、配置 C は配置 A に比べて、遷移が起こりやすい状況であることを示している。

次に、自由エネルギープロファイルと同じ横軸である \bar{r} を用いて、自由エネルギーをエネルギーとエントロピーに分解した結果を、図 2.12 と図 2.13 に示す。この結果から、配置 B-1 では $\Delta E(r_{\text{sep}}) = E(r_{\text{sep}}) - E(r_{\text{jux}})$ が配置 A, B-2, C に比べて小さいことがわかる。つまりこの結果は、配置 B-1 の場合には配置 A, B-2, C に比べて、エンハンサーとプロモーターが離れている構造から、接近している構造へと移る際のエネルギー変化が小さいことを意味する。一方、エントロピーの差には配置による違いは見られない。このことから、配置 B-1 が配置 A に比べて、エンハンサーとプロモーターの平均距離が 260 nm の構造から平均距離が 10 nm の構造へと遷移が起こりにくい状況にある理由は、エントロピーの効果ではなく、エネルギーの効果であることがわかる。次に、配列 B-1 の DNA 鎖のどこの領域のエネルギーが他の配列に比べて高くなっているのかを調べるために、各 DNA 領域における角変位の平均値を計算した。図 2.15 には、配置 A, B-1, B-2, C におけるエンハンサーとプロモーターが接近している構造のときの平均角変位を DNA 鎖にそって計算した結果を示す。この結果から、配置 B-1 におけるエンハンサーとプロモーターが接近している構造は、エンハンサー領域とプロモーター領域の角変位の値が、他の領域に比べて高くなっているのがわかる。つまり、これらの領域が曲げられることにより (図 2.14 のスナップショット参照)、配置 B-1 におけるエンハンサーとプロモーターが接近している構造のエネルギーが高くなっている。以上のシミュレーション結果から、Ameres らの実験 (10) においてエンハンサーがプロモーターからトポロジカルに隔てられた配置 B-1 のときに遺伝子発現が抑制されていた原因は、インスレーター類似配列のない配置 A のときと比較して、エンハンサーとプロモーターの接近した構造がエネルギー的に不安定になるためであることがわかった。

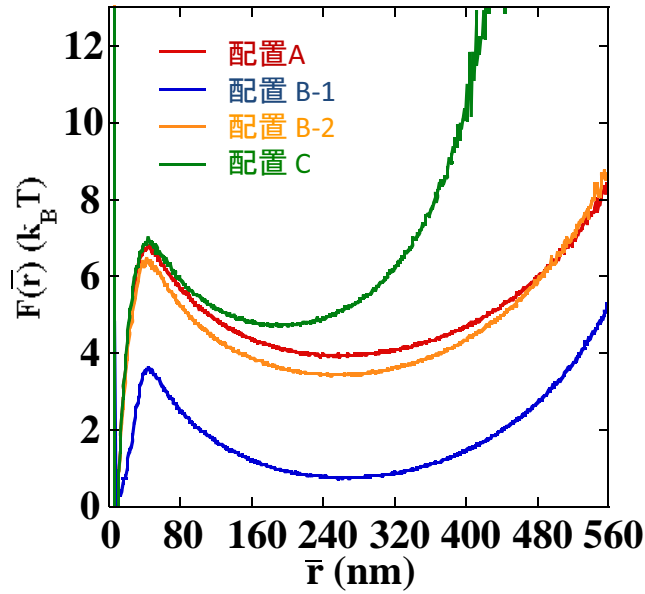


図 2.11: エンハンサー領域とプロモーター領域間の平均距離 \bar{r} を横軸にとった自由エネルギープロファイルを表す。エンハンサー領域とプロモーター領域が空間的に接近している構造 $\bar{r}=r_{\text{jux}} \sim 10\text{nm}$ のときの $F(\bar{r})$ を基準値として、各配置において自由エネルギー値をそろえている。配置 A は赤色、配置 B-1 は青色、配置 B-2 はオレンジ色、配置 C は緑色で示す。

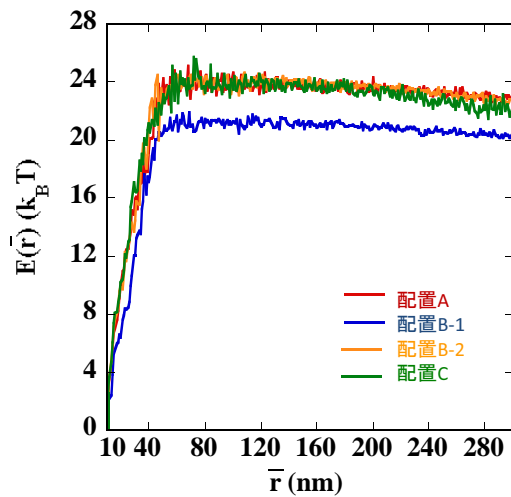


図 2.12: エンハンサー領域とプロモーター領域間の平均距離を変数に持つエネルギープロファイル。エンハンサー領域とプロモーター領域が空間的に接近している構造 $\bar{r}=r_{\text{jux}} \sim 10\text{nm}$ のときの $E(\bar{r})$ を基準値として、各配置において値をそろえている。配置 A は赤色、配置 B-1 は青色、配置 B-2 はオレンジ色、配置 C は緑色で表示している。

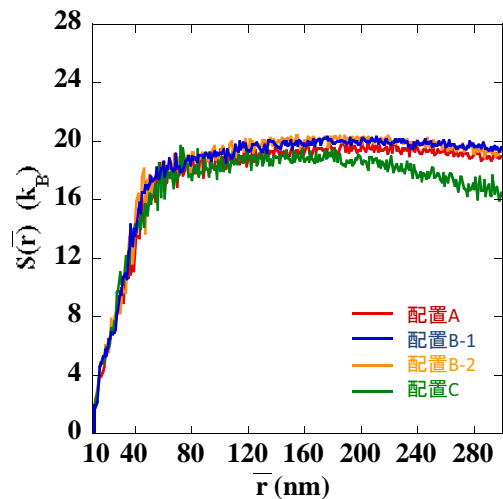


図 2.13: エンハンサー領域とプロモーター領域間の平均距離を変数に持つエントロピープロファイル。エンハンサー領域とプロモーター領域が空間的に接近している構造 $\bar{r}=r_{\text{jux}} \sim 10\text{nm}$ のときの $S(\bar{r})$ を基準値として、各配置において値をそろえている。配置 A は赤色、配置 B-1 は青色、配置 B-2 はオレンジ色、配置 C は緑色で表示している。

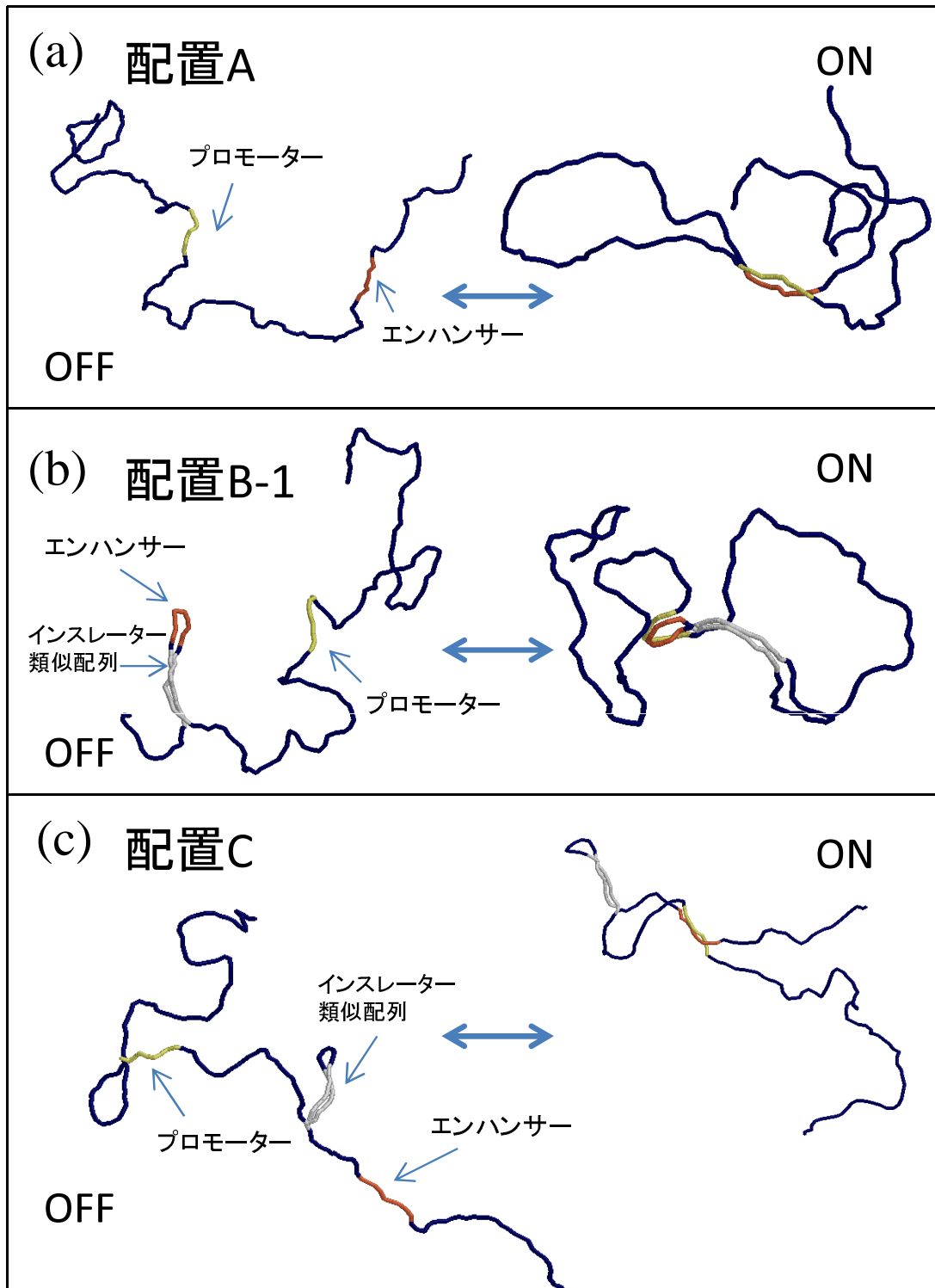


図 2.14: モンテカルロシミュレーションにおけるスナップショット. 全長が約 6 kbp の DNA 鎖を示している. エンハンサー領域 (240bp) は赤色, プロモーター領域 (240bp) は黄色で表されている. また, インスレーターに対応する領域 (270bp) は, 灰色で表されている. 図の左側は, エンハンサー領域とプロモーター領域が離れているときの構造を, 図の右側は, エンハンサー領域とプロモーター領域が接近しているときの構造を示す.

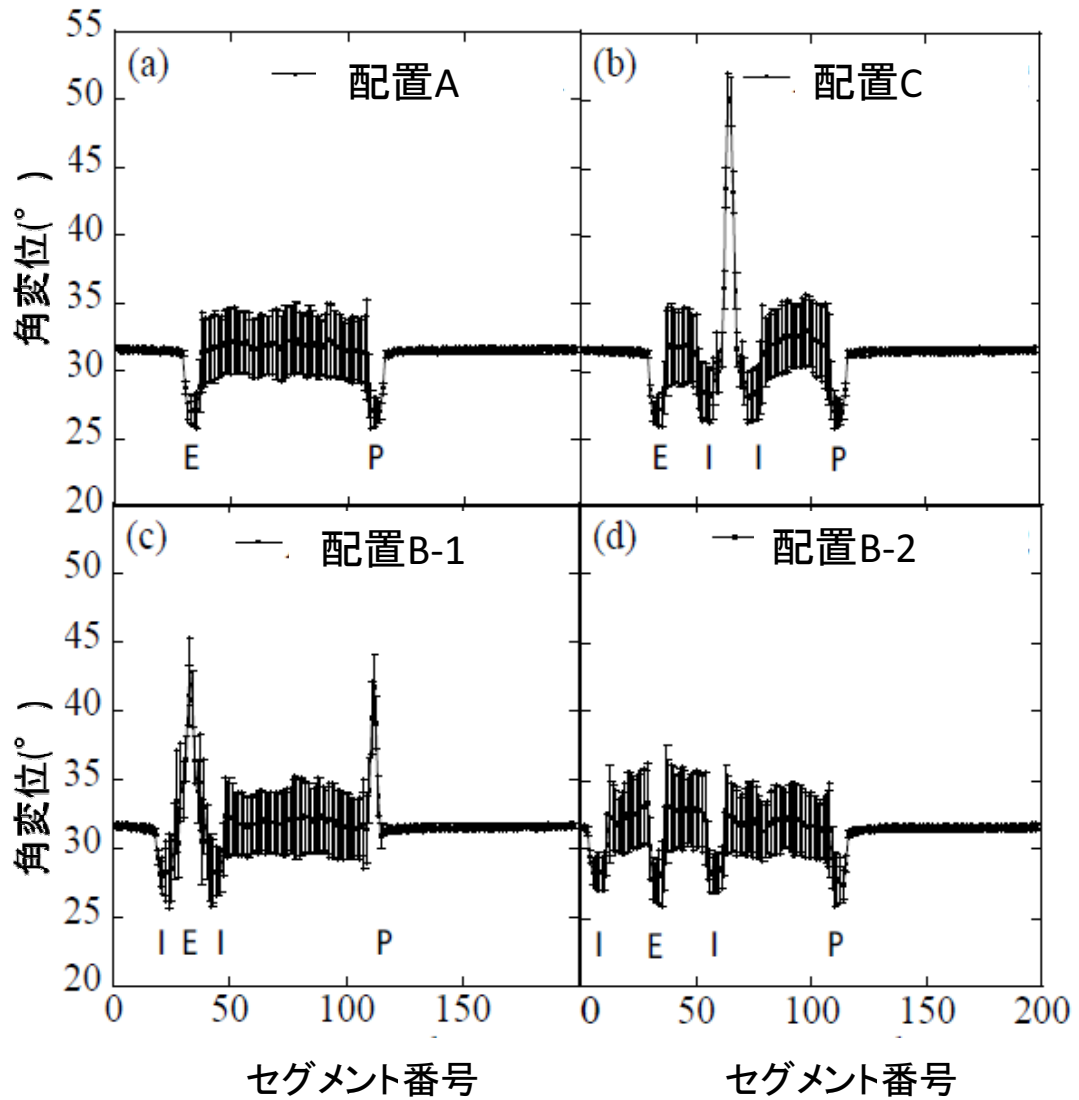


図 2.15: エンハンサーとプロモーターが接近しているときの構造における平均角変位 θ_i の分布. ここで, i はセグメント番号を示す. 図には, シミュレーションから得られた 100 個のサンプルを用いて計算した, 平均値および標準偏差を示している. また, エンハンサー領域を “E”, プロモーター領域を “P”, インスレーター類似配列に対応する領域を “I” と表示している.

2.4 まとめと議論

本研究では、インスレーターがエンハンサー阻害活性を示すメカニズムを明らかにすることを目的し、全長が約 6 kbp の DNA に対応する粗視化 DNA モデルを構築し、実験がおこなわれた条件に対応したパラメータを用いてモンテカルロシミュレーションをおこなった。具体的には、粗視化された DNA をミミズ鎖ビーズ併用モデル (Combined wormlike chain and bead model)(30–32) によって表し、この DNA 鎖に、遺伝子の発現を調節するエンハンサー、プロモーターそしてインスレーター類似配列に対応する領域を実験系と類似した位置に配置した。そして、エンハンサーがプロモーターからトポロジカルに隔てられている条件下でのエンハンサーとプロモーターの接近確率を計算した。その結果、エンハンサーが DNA ループ内に閉じ込められてプロモーターから隔てられている構造のもとでは、エンハンサーが DNA ループ内に閉じ込められていない構造の条件下に比べて、エンハンサーのプロモーターへの接近確率は著しく減少することがわかった。また、接近確率が減少する原因は、DNA 鎖のエントロピーの効果ではなくエネルギーの効果であることがわかった。つまり、エンハンサーがプロモーターからトポロジカルに隔てられている構造のもとでは、エンハンサーがプロモーターに接近するとき DNA はエネルギー的に高いひずんだ構造をとることになり、接近が難しくなるため、遺伝子の発現を活性化する働きが抑制されることがわかった。また、図 2.15 の配置 B-2 のシミュレーション結果からは、実験系に用いられている *tet* オペレーター間の距離を DNA の持続長 ($l_p \sim 50$ nm) の 8 倍程度に長くした場合には、*tet* オペレーターのない配置 A と同じような DNA 角変位の分布を持つことから、エンハンサーはプロモーター領域に接近することができ、エンハンサーの機能は阻害されないことが予想される。つまり、本研究から、エンハンサー阻害活性を示すインスレーターが機能するためには、インスレーターの配置や数が重要なのではなく、インスレーターによって構造変化が引き起こされた後の構造のもとで、エンハンサーとプロモーターが接近する際に形成される DNA 構造が不安定になることが重要であることがわかった。

DNA が数十 bp のように短いときには、より現実的な静電相互作用の表現を用いる必要があるが (43)、本研究では、全長が約 6 kbp の DNA を粗視化して扱っているため、このモデルにおける DNA セグメント間の静電相互作用を、Debye-Hückel 型のポテンシャルとして近似している。このような近似を用いた粗視化 DNA モデルからでも、例えば、以下のことが予想される。実験において、イオン濃度を上げることにより、DNA 鎖の電荷をより強く遮蔽するような条件を作り出すことができれば、Ameres らの実験系で遺伝子の発現が抑制されていた配置 B-1 のエンハンサー阻害活性の程度は低くなることが予想される。というのは、粗視化 DNA モデルにおいて、DNA セグメント間に働く静電相互作用を除いたモデルでは、配置 A のエンハンサーとプロモーターの接近確率 $P_{\text{prox}}(A)$ はおよそ 0.9、配置 B-1 の接近確率 $P_{\text{prox}}(B-1)$ はおよそ 0.55 と、静電相互作用を用いているモデルに比べて、配置 A、B-1 の接近確率が互いに近くなる結果が得られたからである。この結果は、DNA の負の電荷が遮蔽されて DNA セグメント間に働く斥力の静電相互作用が働かなくなる状況下では、DNA 鎖の持続長が短くなり DNA 鎖が柔らかくなることに起因している。

細胞内における DNA 鎖は、細胞内にある生体分子や細胞内構造などで混み合った環境下であり、そのような環境は、エンハンサーがプロモーターに作用するプロセスに影響を及ぼす可能性がある (44)。このような効果は、本研究のモデルでは、エンハンサー領域とプロ

モーター領域の間に導入したエンハンサー・プロモーター相互作用の強さに影響を及ぼすと考えられる。この相互作用を表す式 (2.7) の μ の値はエンハンサーに対応するビーズとプロモーターに対応するビーズ間に働く相互作用の強さを表し、通常細胞内の環境下では $\mu/k_B T \sim 0.35 \text{ nm}^{-1}$ と仮定し、この相互作用のもとでエンハンサーとプロモーター領域間の接近確率を計算した。これに対して、相互作用の強さを $0.3 \text{ nm}^{-1} < \mu/k_B T < 0.4 \text{ nm}^{-1}$ の範囲で変えても $P_{\text{prox}}(\text{B-1})/P_{\text{prox}}(\text{A})$ の定性的な振る舞いは、 $0 < P_{\text{prox}}(\text{B-1})/P_{\text{prox}}(\text{A}) < 0.16$ と大きくは変化しなかった。したがって、エンハンサーの働きは細胞内の混み合いの程度がある程度変化しても安定であることが推測されるが、このことについては、今後の実験的検証が必要である。

本研究は、Ameres らの実験 (10) で用いられた線状 DNA をモデル化し、DNA 鎖のある領域を他の領域からトポロジカルに隔てるループという局所的な制約のある条件下で、自由エネルギーランドスケープをエネルギー的な寄与とエントロピー的な寄与に分解し、エンハンサー阻害活性が、DNA 鎖のエントロピーの効果ではなくエネルギー的な効果により引き起こされている示す結果を得た。このことは、原核生物の DNA の転写、複製および修復における DNA のトポロジーの問題では、DNA の局所的構造変化を考えることが重要であったことを連想させる (45)。真核生物の核内における DNA は、ヒストン蛋白質に巻きついていたり、核膜と相互作用をしているなど、本研究に用いた DNA の粗視化モデルよりもっと複雑ではあるが、それでもなお、そのものに由来する効果を検討するうえでは、本研究のような粗視化 DNA モデルを用いたシミュレーションは有効であると思われる。今後さらにモデルを拡張して染色体レベルの長さの DNA 鎖あるいは染色体の物性を持つ高分子鎖の構造アンサンブルを考えることにより、エンハンサー阻害活性が引き起こされている転写制御のしくみの理解がより深まらるであろうと思われる。

第3章 出芽酵母の染色体構造データに基づくランジュバン動力学シミュレーション

3.1 序論

真核生物のゲノムは、単に1次元の情報配列であるだけでなく、核内に収められて3次元的な構造を形成している。そのゲノムの構造はいくつかの階層から成り立っている(13)。まず、すべての遺伝子つまりゲノムは、直径が約2 nmのDNA分子に刻まれている。そして、その負に帯電したDNAは正に帯電したヒストン蛋白質の周りを1.65回転巻きつき、ヌクレオソームを形成し、それらが連なり、直径11 nmのヌクレオソーム繊維となる。in vitroではヌクレオソームはさらに凝縮した直径30 nmのクロマチン繊維を形成するが、核内でもin vitroと同じように30 nm繊維が形成されているかどうかについては、最近疑問が投げかけられている(46)。いずれにせよ、このクロマチン繊維が染色体を形成している。しかし、近年になるまで、真核生物の核内における染色体全体の3次元構造は明らかになっていなかった。しかし、2002年にDekkerらの報告したChromosome Conformation Capture(3C)法(7)を基にしたChromosome Conformation Capture-on-Chip(4C)法や(47, 48)、Hi-C法(49)などの技術により、2010年には、真核細胞のモデル生物である出芽酵母や分裂酵母の核内染色体の平均構造の3次元モデルが提案された(3, 4)。さらに、現時点では解像度は低いが、ヒトの核内における染色体の配置も明らかになりつつある(49)。

このように近年明らかとなりつつある核内における染色体の3次元構造やゲノムの核内配置は、遺伝子の転写制御を理解するうえでは重要な情報であると考えられる(50–52)。なぜなら、ある遺伝子の発現の活性化や抑制においては、遺伝子やその発現調節領域を含む染色体が大きく構造変化することが報告されているためである。具体的には、遺伝子の発現を活性化する機能を持つエンハンサーは、数十 kbp あるいはそれ以上離れた位置から、プロモーター領域に転写因子などを介して空間的に接近し、その遺伝子の発現を活性化している(7, 8, 53)。また、インスレーターは、染色体のループ構造を伴い遺伝子の発現を抑制する機能を持つことが報告されている(27, 29)。さらに、着目する核内の範囲を数 μm に拡大した場合には、“転写ファクトリー”と呼ばれるRNAポリメラーゼIIが集中し、転写が活発に行われているホットスポットがあることが知られている(5, 54)。その領域では、“染色体テリトリー”(55)の境界部分にはみ出した遺伝子が集まり、活発に転写されていると考えられている(6, 56, 57)。

一方、こうした遺伝子の発現調節を担う染色体は、核内において大きな構造揺らぎを伴っていることが知られている。例えば、真核細胞のモデル生物である出芽酵母の間期における染色体は、10秒間に0.5 μm 程度も核内を大きく動いていることが、Gasserらによって報告されている(11, 12)。また、核内の染色体の末端であるテロメアの一部は、蛋白質を介して核膜と相互作用をしており(58)、核膜から制約を受けたブラウン運動をしていることが知られている(59)。これらのことから、遺伝子の発現調節を理解するうえでは、染色体の

静的な側面とともに動的な側面も考慮することが重要であると考えられる。

このような目的意識をもとで、本研究においては、染色体のダイナミクスを計算機シミュレーションによって扱うことにより、これらの問題について議論する。そのための一つのアプローチとして、染色体を特異的な相互作用がない高分子鎖として捉え、モデル化する方法がある。例えば、Rosa ら (60) は、ミミズ鎖 (wormlike chain) モデルを発展させた粗視化染色体モデルを用い、染色体間の接近頻度が、染色体間の距離に反比例することを示している。同様な結果は、染色体を特異的な相互作用のない鎖と仮定した“フラクタルグロビュールモデル” (61) を用いたシミュレーションからも得られている (49)。

また、もう一つのアプローチとして、実験データに基づいて、染色体を特異的な相互作用のある高分子鎖として捉えモデル化する方法がある。例えば、酵母の核内では、出芽酵母の間期染色体のセントロメアとテロメアは核内で反対側に位置する“ラブル配向”を形成しているが (3, 62)、そのような構造は、染色体と核内構造との間に相互作用が働いている結果引き起こされると考えることができる。具体的には、各染色体のセントロメアは核膜にある紡錘極体と微小管を通して相互作用し、紡錘極体付近に分布している (62, 63)。また、各染色体のテロメアは、特異的にテロメアに結合する蛋白質を介して核膜と相互作用をしており (58)、核膜付近に分布している確率が高い (64)。さらに、出芽酵母のリボソーム DNA 領域は第 12 番染色体に位置し、その領域は核膜と相互作用をしながら核小体の中にあることが報告されている (65, 66)。これらの事実を考慮すれば、間期における出芽酵母の染色体はランダムに分布しているのではなく、各染色体は核内構造との相互作用を通して“ラブル配向”の構造を保っていると考えられる。

これらの 2 つの視点を融合したモデルを構築することにより、出芽酵母の“ラブル配向”とよばれる染色体構造は、核内でどのように保たれているのか、また核内の染色体は熱揺らぎにさらされ、核内構造から制約を受けながら動いている中で、遺伝子の発現はどのように調節されているのかといった問題に取り組むことが可能となる。そこで、本研究では、2 つの視点を融合した出芽酵母の核内におけるすべての間期染色体の 3 次元構造のモデルの構築を行った。核内における染色体の構造モデリングは、高分子鎖としての性質と鎖内および鎖間に働く特異的な相互作用が重要であるという意味で、蛋白質のフォールディング研究に類似していることが指摘されている (67)。そのため、本研究における染色体構造のモデリングにおいても、蛋白質のフォールディング研究で培われた郷相互作用というアイデアを応用する (68)。

蛋白質のフォールディング研究で用いられる郷相互作用は、アミノ酸残基間の距離が天然構造におけるアミノ酸残基間の距離に近づくとエネルギーが下がることを仮定した相互作用であり、アミノ酸間の特異的な相互作用を表現している。この相互作用と温度とのバランスで、シミュレーションにおける構造の揺らぎの大きさが変化する (69, 70)。例えば、相互作用の強さと比べて、温度が低いときには蛋白質は天然構造に折り畳む。一方、相互作用の強さと比べて、温度が高いときには、蛋白質は天然構造に折り畳まないが、このような条件下ではシミュレーションにより天然構造のまわりで大きく揺らいだ構造のアンサンブルを得ることができ、アンサンブルの性質を実験データと比較することができる (68, 70)。このような蛋白質フォールディング研究からの知見を参考に考えると、平均的な染色体構造まわりの揺らぎを調べるためには、郷相互作用を導入したモデリングが有用だと考えられる。

そこで、本研究では Duan らの染色体の平均構造のモデルを、蛋白質フォールディングに

おける天然構造に対応させて考え、それをもとに定義される郷相互作用によって、染色体内および染色体間に働く特異的な相互作用を表現することにした。そしてこの相互作用の存在する条件のもとで、すべての染色体のランジュバン動力学シミュレーションを行い、その構造の揺らぎの性質について調べた。その結果、染色体の揺らぎを反映した核内におけるテロメア間の距離の分布を再現するための必要な染色体内および染色体間に働く特異的な相互作用の強さの程度を推測することができた。また、核内におけるテロメア間の距離の分布を説明するためには、テロメアやリボソーム DNA などの特異的な領域が核膜と相互作用することが重要であることが明らかとなった。これらの結果は、“染色体テリトリー”の形成においても同様に重要であると考えられる。

3.2 シミュレーション手法

この節では、出芽酵母の間期における 16 本すべての染色体の動力学モデルの構築と、シミュレーション手法について記述する。

3.2.1 核内における出芽酵母の染色体の平均構造の粗視化

出芽酵母の間期における染色体は、核内で核膜などから制約を受けたブラウン運動をしていることが実験的に確かめられている (59, 71)。そのため、本研究ではそのようなブラウン運動をしている染色体を表現するために、ランジュバン動力学シミュレーションモデルの構築をおこなった。まず、間期における一倍体出芽酵母の 16 本の染色体を、ばねで連結されたビーズから成る高分子鎖として捉えモデル化した。具体的には、16 本すべての染色体をモデル化するために、4460 ビーズを用いた (付録 B 参照)。これらのビーズ間隔、つまり粗視化されたモデルの解像度は 3 kbp である。そのように粗視化の度合いを決定した理由は、主に二つある。まず、一つ目の理由について説明する。モデルの粗視化に伴い、Duan らの論文 (3) で提供されている 4C 法に基づくゲノムを構成するビーズ間の実験データ (Supplementary Table 5,6) が、どの程度失われてしまうのかを調べた。その結果、1 セグメント 500 bp の場合は、ほとんどデータは失われず、1 セグメント 3 kbp の場合は、数 % のデータのロスに収まっているのに対し、1 セグメント 10 kbp の場合は、各染色体によって差はあるが、平均して 33 % の実験データが失われるということがわかった。このことから、実験データのロスが数 % 程度である 1 セグメント 3 kbp 程度がよいと考えられる。二つ目の理由は、第 2 章と同様に DNA の粗視化モデルの構築の際と同じように、ビーズ間隔は染色体の持続長を数分割した長さがよいと考えられるからである。具体的には、出芽酵母の間期における染色体の持続長は、Bystricky らにより 170-220 nm と見積もられていることから (72)、本研究における粗視化染色体モデルの持続長は約 210 nm と仮定する (付録 C 参照)。そして、その値を 9 分割した長さを、クロマチン繊維の繊維軸方向のパッキング密度 130 bp/nm (72) を用いて kbp 単位に換算すると、ビーズ間隔は約 3 kbp となる。これらの理由から、酵母の 16 本の染色体を、Duan らが 4C 法に基づいて推測した染色体データから 1 セグメントが 3 kbp になるように、ビーズの座標を抽出し、粗視化染色体モデルを構築した。ここでもとにした染色体データとは、Duan らの文献 (3) の Supplementary Information にある Protein Data Bank 型のファイルではなく、彼らの研究室のホームページに公開している “Text file with genomic positions and 3D coordinates” のデータを指す。これより後の節において、このファイルのデータを “1D-3D file” と呼ぶことにする (付録 D 参照)。

3.2.2 ランジュバン動力学シミュレーション

染色体は核内で核膜などから制約を受けたブラウン運動をしていることから (59, 71)、染色体を構成しているビーズの動きを表現するために、ランジュバンの運動方程式を数値的に解いた。ランジュバン方程式は、

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}_i^\mu}{dt^2} = - \frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i^\mu} U - \zeta \frac{d \mathbf{r}_i^\mu}{dt} + \mathbf{w}_i^\mu \quad (3.1)$$

と書ける. この式は, ニュートンの運動方程式の力の項に, ビーズが周囲から受ける粘性抵抗抗力とランダムな力が加わった確率微分方程式である. この式での \mathbf{r}_i^μ は, 1 から 16 までのうち第 μ 番目の染色体を構成する i 番目のビーズの位置座標を表す. m は, その着目するビーズの質量を, ζ は, 着目するビーズが周囲から受ける粘性係数を表す. また, ランダム力である \mathbf{w}_i^μ は, ガウスのな白色のノイズであると仮定する. つまりこのランダム力は, $\langle \mathbf{w}_i^\mu \rangle = 0$, $\langle \mathbf{w}_{i\alpha}^\mu(t) \mathbf{w}_{j\beta}^\nu(t') \rangle = 2\zeta T \delta(t-t') \delta_{ij} \delta_{\mu\nu} \delta_{\alpha\beta}$, となる平均値および相関関数をもつと仮定する. ここでの α と β は, それぞれベクトルの x, y, z 成分のうち 1 つを指し示す変数である. なお, この出芽酵母の間期染色体の動きは ATP 濃度によって変わることが, 実験から知られており (11, 12), 核内の染色体のブラウン運動は非平衡状態における運動であると考えられる. そのため, ランジュバン方程式における T は通常の意味の温度ではないが, ランダムな力の程度を表すパラメータとして, 以下では用いることにする.

3.2.3 粗視化染色体モデルに対するポテンシャルエネルギー関数

出芽酵母の間期染色体を表現する際のランジュバン方程式に含まれるポテンシャルは以下の 5 つの項から成り立っている.

$$U = U_{\text{FENE}} + U_{\text{bend}} + U_{\text{LJ}} + U_{\text{Go}} + U_{\text{nucleus}} \quad (3.2)$$

最初の 3 項は, Kremer-Grest 模型 (73) に基づく高分子鎖を表現するエネルギー関数で, 第 4 項は, 染色体内および染色体間に働く郷相互作用のエネルギー関数, 第 5 項は, 酵母の染色体が核内にあることを表現するエネルギー関数である. 具体的な各エネルギー関数およびそのポテンシャルに含まれるパラメーターの値について, 以下で記述する.

高分子鎖としての酵母の染色体を表現するエネルギー関数

私たちは, 酵母の間期における染色体を直径が 30 nm の “ひも” として粗視化し, そのひもを Kremer-Grest 模型に基づく高分子鎖としてモデル化をした. Kremer-Grest 模型は, Rosa ら (60) により直径 30 nm のクロマチン繊維の高分子鎖を表現するモデルとしても用いられており, ばねポテンシャル, 弾性曲げポテンシャルおよび排除体積相互作用ポテンシャルから成り立っている.

ばねポテンシャル

$$U_{\text{spring}} = \sum_{\mu} \sum_i \left[U_{\text{r}}(r_i^\mu) + \theta(r_i^\mu) U_{\text{FENE}}(r_i^\mu) + (1 - \theta(r_i^\mu)) U_{\text{l}}(r_i^\mu) \right], \quad (3.3)$$

このポテンシャルは, 隣接するビーズ間に働く相互作用を表す. ここでの r_i^μ は $|\mathbf{r}_i^\mu - \mathbf{r}_{i+1}^\mu|$ を表し, $\theta(r_i^\mu)$ は $r_i^\mu < R'_0$ のときには 1, $r_i^\mu \geq R'_0$ のときには 0 であるような r_i^μ の関数である. 具体的な R'_0 の値は後に記述する. また, 式 (3.3) における Finitely Extensible

Nonlinear Elastic(FENE) ポテンシャル U_{FENE} は, 隣接するビーズが伸びきらないばねで連結されていることを表し (60, 73, 74), 具体的な関数形は,

$$U_{\text{FENE}}(r_i^\mu) = -\frac{1}{2}kR_0^2 \log \left(1 - \left(\frac{r_i^\mu}{R_0} \right)^2 \right) \quad (3.4)$$

である. また, 式 (3.3) における U_r は, 隣接するビーズ間に働く排除体積相互作用を表す.

$$\begin{aligned} U_r(r_i^\mu) &= 4\epsilon \left(\left(\frac{a}{r_i^\mu} \right)^2 - \left(\frac{a}{r_i^\mu} \right) + \frac{1}{4} \right), \text{ for } r_i^\mu \leq 2a \\ &= 0, \text{ for } r_i^\mu > 2a \end{aligned} \quad (3.5)$$

また, 式 (3.3) における $U_l = (0.93k/\sigma^3)(r_i^\mu)^5$ という関数で表される.

r_i^μ の値が R_0 に近づくと, FENE ポテンシャルは急激に無限大に大きくなるため, ランジュバン動力学計算が不安定になりやすい. そのため, r_i^μ の値が, R_0 の手前の R_0' において, U_l のポテンシャルに切り替わるように関数 $\theta(r_i^\mu)$ を導入した. ばねポテンシャルに含まれるパラメータは, $\sigma = 30.0$ nm, $R_0 = 1.15\sigma$, $R_0' = \sigma$, $k = 6.0\epsilon/\sigma^2$, $\epsilon = 1.0k_B T$ を用いた. R_0 の値は, Rosa らの先行研究 (60) と同じような方法で決めた. 具体的には, 彼らは, FENE ポテンシャルに含まれる R_0 の値を, $1.5 \times$ (セグメント長) としている. 本研究におけるモデルの 1 セグメントの長さは 3 kbp としており, この値は染色体の平均線密度 $\rho = 130$ bp/nm の値を用いて長さに換算すると, 23 nm となる (72). そのため, $R_0 = 1.5 \times 23$ nm とした. また R_0' は, R_0 より小さい値として $R_0' = 30$ nm を用いた. 次に, $k = 6.0 k_B T/\sigma^2$ の値は, 以下のように定めた. 具体的には, 最急降下法で得られた構造を初期構造として分子動力学計算を行った結果, 得られた第 4 染色体の平均セグメント長が, 染色体平均線密度, 130 bp/nm になるような変数の値 k を選択した. 粗視化モデルでは, 1 セグメントを 3 kbp としているので, 平均セグメント長が, 約 23 nm になる変数 k の値を選択した. 弾性曲げポテンシャルに含まれる k_θ を $1.0 k_B T$ と固定した条件下において, 3 通りの k の値に対応した平均セグメント長 $\langle l \rangle$, セグメント長の最大値 l_{max} , セグメント長の最小値 l_{min} の値はそれぞれ,

$$k = 1.0 k_B T/\sigma^2 \text{ のとき, } \langle l \rangle = 30.89 \text{ nm, } l_{\text{max}} = 36.10 \text{ nm, } l_{\text{min}} = 23.47 \text{ nm.}$$

$$k = 3.0 k_B T/\sigma^2 \text{ のとき, } \langle l \rangle = 26.19 \text{ nm, } l_{\text{max}} = 30.21 \text{ nm, } l_{\text{min}} = 18.11 \text{ nm.}$$

$$k = 6.0 k_B T/\sigma^2 \text{ のとき, } \langle l \rangle = 23.42 \text{ nm, } l_{\text{max}} = 26.71 \text{ nm, } l_{\text{min}} = 16.35 \text{ nm.}$$

となり, これらの結果から $k = 6.0 k_B T/\sigma^2$ を選択した.

弾性曲げポテンシャル

弾性曲げポテンシャル $U_{\text{bend}} = \sum_\mu \sum_i U_b(\theta_i^\mu)$ は, クロマチン繊維の硬さを表現するポテンシャルである. ここで θ_i^μ は, ベクトル $\mathbf{r}_i^\mu - \mathbf{r}_{i-1}^\mu$ とベクトル $\mathbf{r}_{i+1}^\mu - \mathbf{r}_i^\mu$ とのなす角度を表す. クロマチン繊維は, いくつかのヌクレオソームから成り立っていることを考えると, 局所的に繊維は曲がりやすかったり, よじれやすかったりする可能性がある (75, 76). そこで, そのことを考慮した Rosa らが提案しているキルクを許す曲げポテンシャルを用いた (60, 77).

$$\begin{aligned}
U_b(\theta_i^\mu) &= k_\theta(1 - \cos \theta_i^\mu), \text{ for } 0.1 \leq \cos \theta_i^\mu \leq 1 \\
&= 0.9k_\theta, \text{ for } -1 \leq \cos \theta_i^\mu < 0.1
\end{aligned} \tag{3.6}$$

ここでは, $k_\theta = 2.0 k_B T$ としている.

この値は, 最急降下法で得られた構造を初期構造としてランジュバン動力学計算を行った結果, 得られた第 4 染色体の θ の平均値が $26.2^\circ \leq \langle \theta \rangle \leq 29.8^\circ$ の範囲になるように定めた. この見積もりは, この範囲を決める際には, 染色体の持続長の最大値が 220 nm, 最小値が 170 nm であるという Bystricky らによる見積もり (72) に対して, 高分子鎖の持続長 P と 1 セグメントの長さ b と θ の分散 $\langle \theta^2 \rangle$ が

$$P = \frac{2b}{\langle \theta^2 \rangle} \tag{3.7}$$

という関係にあること (34) を用いて, $\langle \theta \rangle$ の最小値と最大値をそれぞれ 26.2° および 29.8° と見積もった.

k_θ の値を決める際には, FENE ポテンシャルに含まれる k の値を $6.0 k_B T / \sigma^2$ と固定した条件において, k_θ の値を変化させながらランジュバン動力学シミュレーションを行い, 第 4 染色体における θ の平均値 $\langle \theta \rangle$ を計算した. 以下にその結果を示す. ここで θ_{\max} は角変位の最大値, θ_{\min} は角変位の最小値を表す.

$$k_\theta = 1.0 k_B T \text{ のとき, } \langle \theta \rangle = 32.08^\circ, \theta_{\max} = 120.53^\circ, \theta_{\min} = 13.86^\circ.$$

(このときの平均セグメント長は $\langle l \rangle = 23.42$ nm)

$$k_\theta = 2.0 k_B T \text{ のとき, } \langle \theta \rangle = 27.56^\circ, \theta_{\max} = 121.81^\circ, \theta_{\min} = 12.47^\circ.$$

(このときの平均セグメント長は $\langle l \rangle = 23.36$ nm)

$$k_\theta = 3.0 k_B T \text{ のとき, } \langle \theta \rangle = 24.92^\circ, \theta_{\max} = 118.24^\circ, \theta_{\min} = 11.60^\circ.$$

(このときの平均セグメント長は $\langle l \rangle = 23.33$ nm)

これらの結果の比較に基づいて, $\langle \theta \rangle$ の値が $26.2^\circ \leq \langle \theta \rangle \leq 29.8^\circ$ の範囲にある $k_\theta = 2.0 k_B T$ を選択した.

排除体積相互作用ポテンシャル

$$U_{LJ} = \sum_{\mu > \nu} \sum_{i, j} U_{LJ}(\mu, i; \nu, j) + \sum_{\mu} \sum_{j \geq i+2} U_{LJ}(\mu, i; \mu, j) \tag{3.8}$$

このポテンシャルは, すべてのビーズ対の間に働き, 染色体を構成する“ひも”がすり抜けない効果を表すものである. 第 1 項は染色体間のビーズ対に働く相互作用を表し, 第 2 項は染色体内のビーズ対に働く相互作用を表す. 第 1 項の相互作用の関数形は, Rosa ら (60) と同じように, 以下のような Lennard-Jones 型を用いた.

$$\begin{aligned}
U_{LJ}(\mu, i; \nu, j) &= 4\epsilon \left(\left(\frac{a}{r_{ij}^{\mu\nu}} \right)^{12} - \left(\frac{a}{r_{ij}^{\mu\nu}} \right)^6 + \frac{1}{4} \right), \text{ for } r_{ij}^{\mu\nu} \leq 2^{\frac{1}{6}} a \\
&= 0, \text{ for } r_{ij}^{\mu\nu} > 2^{\frac{1}{6}} a
\end{aligned} \tag{3.9}$$

ここで, $r_{ij}^{\mu\nu}$ は $|\mathbf{r}_i^\mu - \mathbf{r}_j^\nu|$ を表し, a の値はクロマチン繊維の直径を表す. この粗視化染色体モデルでは $a = 30 \text{ nm}$ を用いた. ただし, Duan らの “1D-3D file” のデータでは, 染色体が 30 nm 以内に接近している箇所がある (3). これは, クロマチン繊維は局所的に折れ曲がっている箇所あるいはほどけている箇所である可能性があり, こうした箇所の存在をモデルに反映させるべきである. そこで, Duan らの構造においてビーズの間の距離が 30 nm 未満のビーズに関しては, a の値はその距離を用いている. さらに, 最急降下法による計算を行い, その結果 30 nm 以内に接近した箇所が増えた場合には, その箇所の距離を a とおいた. また, ϵ は Rosa ら (60) と同じ値である $1.0 k_B T$ を用いている.

染色体内および染色体間に働く郷相互作用のエネルギー関数

郷相互作用ポテンシャル

本研究では, 染色体の物性を表現する Kremer-Grest 模型に加えて, さらに染色体内および染色体間に働く郷相互作用を導入した. この相互作用は, Duan らが報告した 4C 法に基づく染色体の構造が核内において平均的にはとりやすい構造であるという仮定のもとに導入された相互作用である. つまり, この相互作用は, μ 番目の染色体の i 番目のビーズと ν 番目の染色体の j 番目のビーズが 4C 法のデータに基づく距離 $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ に近づいたときに, それらのビーズ間のエネルギーが下がり, そのような距離を持つ構造を安定化するように働く. この相互作用の由来を特定することは難しいと思われるが, 核小体や核膜などの核内構造と各染色体のさまざまな領域が相互作用をした結果, Duan らが報告しているような構造が核内で平均的に保たれると考えられる. この相互作用の関数形は,

$$U_{\text{Go}} = \sum_{\mu > \nu} \sum_{i, j} U_{\text{Go}}(\mu, i; \nu, j) + \sum_{\mu} \sum_{j > i} U_{\text{Go}}(\mu, i; \mu, j) \quad (3.10)$$

ただし

$$U_{\text{Go}}(\mu, i; \nu, j) = -\frac{\xi}{\sqrt{2\pi(c\sigma_{ij}^{\mu\nu})^2}} \exp\left(-\frac{(r_{ij}^{\mu\nu} - \sigma_{ij}^{\mu\nu})^2}{2(10c\sigma_{ij}^{\mu\nu})^2}\right) \quad (3.11)$$

と表わされる. 蛋白質のフォールディング研究で一般的に用いられている Lennard-Jones 型ではなく Gaussian 型を用いた (70). このような関数形は, 例えば文献 (78–80) のような蛋白質のフォールディング研究で用いられている. 本研究において, Gaussian 型を用いた理由は主に 2 つある. 一つ目の理由はここでは蛋白質フォールディングの場合とは異なり, 遠距離に離れたビーズ間にも郷相互作用が働いていることである. もう一つの理由は, 1 セグメントの長さを実際には 3 kbp という長さを持った高分子鎖に対応しており, 最近接であるビーズどうしであっても, さらに近づきあうことが許されることである. また $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ は次のような手続きで求めた. まず, Duan らの論文 (3) における Supplementary Table 5, 6 にある RE フラグメント (制限酵素によって得られる DNA 断片の中間の位置, Duan らの Supplementary Information(SI) の p. 11 参照) の位置を, Duan らと同様に, フラグメントの最も近くにあるビーズ位置に対応させた (Duan ら (3) の SI p.17 参照). その後, Supplementary Table 5, 6 にあるゲノム間の接近頻度 (sequence frequency) のデータを,

Supplementary Figure 17にある接近頻度と距離 (nm) の関係式を用いて距離 (nm) に変換し、この距離を $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ とした。ただし、このモデルでは、3 kbp を 1 セグメントとする粗視化を行っているため、異なる RE フラグメントであっても、同じビーズ位置 (ゲノム位置) の情報として取り扱う場合があり、そのような場合には、距離の値 ($\sigma_{ij}^{\mu\nu}$) の異なる、同一のビーズ (i, j) ペアが出てきてしまう。その際には、 j 番目のビーズ位置の変換に伴う差 (bp) が最も小さい j 番目とそのペアになっている i 番目のビーズ (i, j) ペアの $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ を代表値とした。郷相互作用に含まれる変数については、 ξ/T を 0.1, 1, 10, 100 の値に対し、 c を 0.01, 1, 10 の値について調べた。

酵母の染色体が核内にあることを表現するエネルギー関数

酵母の染色体は、核小体や核膜などから制約を受けて核内に分布している。そのため、私たちはそのような効果を以下の 3 つのエネルギー関数によって表現した。

$$U_{\text{nucleus}} = U_{\text{cen}} + U_{\text{nucleolus}} + U_{\text{envelope}} \quad (3.12)$$

第一項は、染色体のセントロメアと紡錘極体との相互作用を表す。第二項は、核内の染色体と核小体との相互作用を表す。第三項は、染色体と核膜との相互作用を表す。いずれの相互作用の関数形やパラメータの値も知られていないものでないので、実験で測定されている染色体の振る舞いのデータと照らし合わせながらパラメータの値を定めた。モデルにおいて考慮した核内構造の概略図を図 3.1 に示す。

セントロメアと紡錘極体との相互作用

セントロメアと紡錘極体との相互作用は、微小管を表現したばねポテンシャルを用いた。

$$U_{\text{cen}} = \sum_{\mu} \frac{h}{2} \left(\frac{l^{\mu} - l_0^{\mu}}{s} \right)^2 \quad (3.13)$$

ここで、 l^{μ} は μ 番目の染色体のセントロメアに対応するビーズ座標 ($x_{\mu}, y_{\mu}, z_{\mu}$) と紡錘極体との距離を表す。紡錘極体の核内における座標の値は、蛍光タグがつけられた紡錘極体の核膜からの平均距離は 13 nm と見積もられていること (62) からナノメートル単位で (1000, 1000, 10) とした。また、 l_0^{μ} は Duan らが提案している構造 (3) における μ 番目の染色体のセントロメアと紡錘極体との距離を表す。

また、 $s = 100$ nm のもとで、ポテンシャルに含まれるばね係数の値 h は、 $0.3 k_B T$ を用いた。ポテンシャルに含まれる l_0^{μ} の値は、粗視化した “1D-3D file” における構造のデータを基に計算して得られた以下の値を用いた。

$$\begin{aligned} l_0^1 &= 169.01 \text{ nm}, & l_0^2 &= 373.57 \text{ nm}, & l_0^3 &= 474.36 \text{ nm}, & l_0^4 &= 368.48 \text{ nm}, \\ l_0^5 &= 310.03 \text{ nm}, & l_0^6 &= 313.02 \text{ nm}, & l_0^7 &= 416.72 \text{ nm}, & l_0^8 &= 514.32 \text{ nm}, \\ l_0^9 &= 273.12 \text{ nm}, & l_0^{10} &= 230.83 \text{ nm}, & l_0^{11} &= 355.93 \text{ nm}, & l_0^{12} &= 210.84 \text{ nm}, \\ l_0^{13} &= 427.05 \text{ nm}, & l_0^{14} &= 216.07 \text{ nm}, & l_0^{15} &= 303.03 \text{ nm}, & l_0^{16} &= 397.25 \text{ nm}. \end{aligned}$$

セントロメアと紡錘極体との相互作用に含まれるばね係数は以下のように定めた。具体的には、 h の値を、 $3 \times 10, 3, 3 \times 10^{-1}, 3 \times 10^{-2} k_B T$ とオーダを変えたシミュレーションを

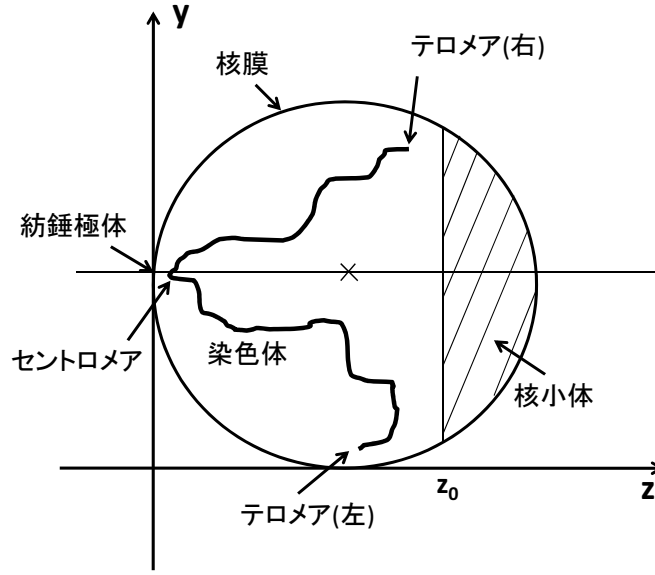


図 3.1: モデルの概略図. 細胞核を半径 $1\mu\text{m}$ の球として表現. そのときの中心座標はナノメートル単位で $(1000, 1000, 1000)$. 核小体は, 図における斜線領域として表現. 紡錘極体の位置はナノメートル単位で $(1000, 1000, 10)$. 図は, 16本の染色体のうち第10染色体の核内での配置を模式的に示す.

行い, もっとも実験で測定されているセントロメアの確率密度分布 (62) に近い結果が得られる値である $h=0.3 k_B T$ を選択した.

核小体と染色体との相互作用

出芽酵母のリボソーム DNA (rDNA) は第12番染色体に位置し, この領域は核膜と相互作用をしながら核小体の中にあることが知られている (65, 66). そこで, モデルにおいてもこのような状況を表現するために, 核小体領域の内にある rDNA 領域と核小体との間に相互作用を導入した. 具体的には, モデルにおける rDNA 領域は, Duan らのモデルと同じように 450 kbp から 1815 kbp の領域とした (付録 E 参照). この領域が図 3.1 の斜線で示す核小体領域の内に留まるよう, また rDNA 領域以外は核小体領域の内に入ることが起こりにくくなるような相互作用で表現した. 核小体と染色体との相互作用は,

$$\begin{aligned}
 U_{\text{nucleolus}} &= \sum_{\mu} \sum_{i \notin \text{rDNA}} U_{\text{nucl}}(z_i^{\mu}) \\
 &+ \sum_{i \in \text{rDNA}} U_{\text{nucl}}^{\text{rDNA}}(z_i^{12}),
 \end{aligned} \tag{3.14}$$

ただし

$$\begin{aligned}
 U_{\text{nucl}}(z_i^{\mu}) &= \frac{h_{\text{nucl}}}{2} \left(\frac{z_i^{\mu} - z_0}{s} \right)^2, \text{ for } z_i^{\mu} \geq z_0 \\
 &= 0, \text{ for } z_i^{\mu} < z_0, \text{ with } \mu \neq 12
 \end{aligned} \tag{3.15}$$

および

$$\begin{aligned} U_{\text{nucl}}^{\text{rDNA}}(z_i^{12}) &= \frac{h_{\text{nucl}}}{2} \left(\frac{z_i^{12} - z_0}{s} \right)^2, \text{ for } z_i^{12} < z_0 \\ &= 0, \text{ for } z_i^{12} \geq z_0 \end{aligned} \quad (3.16)$$

である。ここで、 z_i^μ は \mathbf{r}_i^μ の z 成分を表す。また、核小体は固い構造ではなく比較的染色体の出入りが行われやすいことが予想されたので、そのようなことが許容される関数形およびパラメーターの値を用いた。具体的には、 $h_{\text{nucl}} = 0.2 k_B T$ 、 $z_0 = 1170 \text{ nm}$ を用いた。ばね定数の値 h_{nucl} は、 $2, 2 \times 10^{-1}, 1 \times 10^{-1}, 2 \times 10^{-2} k_B T$ の値のもとでシミュレーションを行った結果、もっとも実験で測定されている rDNA 領域の確率密度分布のデータ (62) に近い分布が得られる値である $h_{\text{nucl}} = 0.2 k_B T$ を選択した。また、 $z_0 = 1170 \text{ nm}$ という値は、核小体モデルの体積が、Berger らの論文 (62) で見積もられている rDNA 領域の体積程度になるように定めた。

核膜と染色体との相互作用

染色体のサブテロメア領域は、核膜と相互作用をすることで、遺伝子の発現調節に影響を及ぼしていると思われる (81, 82)。そのため、粗視化染色体モデルに、核膜と染色体との相互作用を、以下のように導入した。

$$\begin{aligned} U_{\text{envelope}} &= \sum_{\mu} \sum_i \left(\eta(\mu, i) U_{\text{attr}}(R_i^\mu) \right. \\ &\quad \left. + (1 - \eta(\mu, i)) U_{\text{rep}}(R_i^\mu) \right), \end{aligned} \quad (3.17)$$

ここで、 $R_i^\mu = |\mathbf{r}_i^\mu - \mathbf{r}_{\text{center}}|$ である。また、核膜と相互作用をする染色体の特異性は、 $\eta(\mu, i)$ のパラメーターで表現している。つまり、 $\eta(\mu, i) = 1$ のときは、 μ 番目の染色体の i 番目のビーズは核膜と引力の相互作用をする。一方、 $\eta(\mu, i) = 0$ のときは、 μ 番目の染色体の i 番目のビーズは核膜と斥力の相互作用をする。この斥力の相互作用は、染色体を構成しているビーズは核内に収まるようにするために導入した項である。具体的には、酵母の細胞核の半径は約 $1 \mu\text{m}$ であることが報告されており (11, 62)、モデルにおいてもそのような球を細胞核と仮定した。そして、図 3.1 の座標系において、ナノメートル単位で (1000, 1000, 1000) を細胞核の中心点と仮定し、染色体を構成するすべてのビーズが、この半径約 $1 \mu\text{m}$ の球の中に納まるように (図 E.1 参照)、染色体と核膜との斥力の相互作用を導入した。すなわち

$$\begin{aligned} U_{\text{attr}}(R_i^\mu) &= 2\epsilon \left(\left(\frac{R_i^\mu - R_0}{u - R_0} \right)^{12} - \left(\frac{R_i^\mu - R_0}{u - R_0} \right)^6 \right) \\ &\quad \text{for } R_i^\mu > R_0 \\ &= 0, \text{ for } R_i^\mu \leq R_0 \end{aligned} \quad (3.18)$$

および

$$\begin{aligned} U_{\text{repul}}(R_i^\mu) &= 2\epsilon \left(\frac{R_i^\mu - R_0}{u - R_0} \right)^{12}, \text{ for } R_i^\mu > R_0 \\ &= 0, \text{ for } R_i^\mu \leq R_0 \end{aligned} \quad (3.19)$$

とした。ここで、 $R_0=800$ nm, $u=1000$ nm, $\epsilon=1.0 k_B T$ である。それらの値は、シミュレーション結果と実験で測定されている第 6 染色体の右側のテロメアの核膜からの距離の時間発展を示すデータ (58) を比較し、もっとも実験データに近い結果を与える値として求めたものである。

シミュレーションにおいては、染色体と核膜との相互作用について以下の 4 通りの場合を考え、それぞれの場合における計算を行った。その理由は、真核生物のテロメアはテロメアに特異的に結合する蛋白質を介して、核膜に引き寄せられ、テロメアは核膜付近に位置していることが多い (83, 84)。しかし、そのような核膜との相互作用が、テロメア領域に特異的に起こるものなのかどうかや、核膜と相互作用をする染色体領域がほかに存在する場合にも染色体構造は保たれるのか、といった問題は、現時点における実験データからは判断できない。そこで、染色体と核膜との相互作用が以下の 4 通りのそれぞれの場合について、シミュレーションを行い、それらの結果を実験データと比較した。その結果については次章に示す。

- モデル 1: 染色体を構成するすべてのビーズが核膜と引力の相互作用をしない場合。
- モデル 2: 染色体を構成するすべてのビーズが核膜と引力の相互作用をする場合。
- モデル 3: テロメアに対応するビーズと rDNA 領域に対応するビーズが、核膜と引力の相互作用をする場合。
- モデル 4: Duan らの構造において、核膜と接触しているビーズ (付録 F 参照) とテロメアに対応するビーズと rDNA 領域に対応するビーズが、核膜と引力の相互作用をする場合。

このときの、染色体モデルにおけるセントロメアおよびテロメアのゲノム上での位置は、付録 G に表示した文献値とデータベース (Saccharomyces Genome Database) の値と、Duan らのデータ値 (genomic_positions_3d_coordinate.txt) とを照らし合わせてきめた。セントロメアに関しては、Duan らのモデルにおけるセントロメアの位置とほぼ同じ値を用いた。一方のテロメアに関しては、文献値・データベースにある値に基づき、テロメアの長さに比例して、テロメアに対応するビーズ領域を定めた。具体的な粗視化染色体モデルにおけるセントロメアおよびテロメアのゲノム上での位置は付録 G に示す。

3.2.4 シミュレーションの詳細

シミュレーションを行う前に、式 (3.2) のポテンシャルのもとで最急降下法による計算を行いエネルギーを下げた。最急降下法による計算を行う際の初期構造は、“Text file with genomic positions and 3D coordinates” (1D-3D file) のデータを基に、1 セグメントが 3 kbp になるようにビーズを間引いたデータを用いた。ただし両端付近のセグメントは、3

kbp から少しずれている (付録 H 参照). また, 最急降下法による計算の結果, 染色体を構成するビーズ間の距離が 30 nm 未満に接近しているビーズに関しては, 排除体積相互作用に含まれる a の値として 30 nm ではなく, 最急降下法で得られた値を用いた.

Duan らの報告した核内における染色体構造は, 4C 法のデータから求めた制約をある程度満たすいくつかの構造のうちの一つである. 私たちは, 次の章で示すように, ランジュバン動力学シミュレーションを行うことで Duan らの平均構造とは異なるさまざまな構造のアンサンブルを得ることができた.

シミュレーションにおいては, $m = T = k_B = 1$ という単位系を用いた. この単位系を用いると, 時間 t は長さ L の次元を持ち, 粘性係数 ζ は L^{-1} の次元を持つ. このような単位系において, ランジュバンの方程式を $\Delta t = 0.01$ の間隔で離散化し, 速度ベルレ法に基づき数値的に解いた. このときの, 粘性係数 $\zeta = 10^{-5}$ という値は, 実際の核内の溶媒環境のデータに基づくものではなく, 限られた計算時間内で, 効率よくサンプリングができるような値に設定した値である. このような粘性係数の値を用いて得られた染色体の動きを, テロメアの核内での平均二乗移動距離の実験データと比較することでシミュレーションにおける 1 ステップの時間を見積もった. シミュレーションにおいて, 最初の 10^4 ステップは, 系の平衡化のために用いた. そして解析には, 5×10^4 ステップあるいは 1.1×10^5 ステップまでの計算データを用いている.

ランジュバン動力学計算に用いた初期構造

ランジュバン動力学計算を行う際の初期構造は, 最急降下法により式 (3.2) の U を下げた構造を用いている. 最急降下法では, 以下に示す鎖を構成するビーズの平均移動度 $\overline{\Delta d}$ という量を定義し, その量が 1 セグメント (23nm) の 0.01 %未満に十分収束していることを判定条件とした収束判定をおこなった. 図 3.2 は, 鎖を構成するビーズの $\overline{\Delta d}$ のステップ依存性のデータを示す.

ただし, $\overline{\Delta d}$ は以下のように計算した. ステップ前の i 番目のビーズ座標を $(x_i(t), y_i(t), z_i(t))$, ステップ後の i 番目のビーズ座標を $(x_i(t + \Delta t), y_i(t + \Delta t), z_i(t + \Delta t))$ とする. このとき, i 番目のビーズの 1 ステップにおける移動量は

$$\Delta d_i = \sqrt{(x_i(t + \Delta t) - x_i(t))^2 + (y_i(t + \Delta t) - y_i(t))^2 + (z_i(t + \Delta t) - z_i(t))^2}$$

となり, 鎖全体のビーズの平均移動量はビーズ数 N を用いて以下のように表される.

$$\overline{\Delta d} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \Delta d_i$$

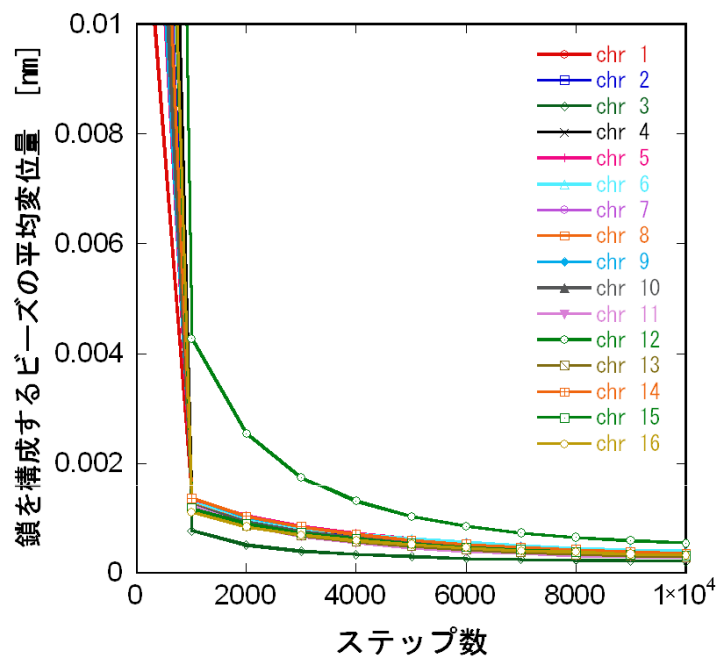


図 3.2: 各染色体の鎖を構成するビーズの平均移動量のシミュレーションステップ数依存性. 染色体番号の違いを色の違いで表す.

3.3 シミュレーション結果と考察

この節ではまず最初に、私たちが構築した染色体の動力学シミュレーションモデルから得られた核内すべての染色体の様子を示す。次に、核内の染色体の揺らぎを表現する染色体内・染色体間における相互作用の強さについて考察を行い、最後に、染色体の揺らぎを表現し得る相互作用の条件下におけるシミュレーション結果を示す。

3.3.1 核内構造および揺らぎを考慮した出芽酵母の核内染色体の様子

図 3.3 に核内構造および揺らぎを考慮した染色体動力学シミュレーションモデルから得られたシミュレーションのスナップショットを示す。このスナップショットから 2 つのことがわかる。一つ目は、核内構造および揺らぎを考慮したモデルにおける 16 本の染色体構造は、Duan らの平均構造に比べ、全体的に紡錘極体側に押された構造をとっていることである。このような構造は、モデルにおける核小体領域の大きさを、Duan らの平均構造モデルで用いられている $0.11 \mu\text{m}^3$ という値より、より実験に基づいた値にしたことから引き起こされている。具体的には、私たちの構築したモデルにおける核小体領域の大きさは、Berger らの実験 (62) において見積もられている $0.53 \mu\text{m}^3$ の値を用いている。二つ目にわかることは、染色体のテリトリーの境界が Duan らの平均構造モデルに比べるとはっきりと現れていないことである。この結果は、染色体の構造揺らぎを染色体モデルに考慮していることに起因している。

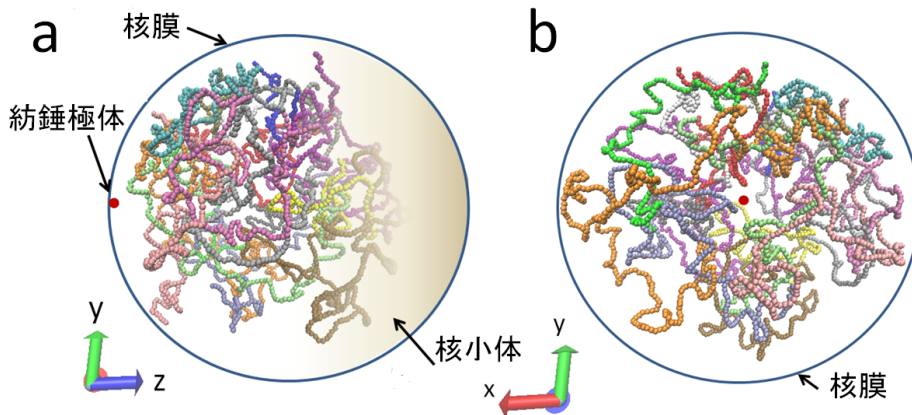


図 3.3: 出芽酵母の核内染色体すべてのランジュバン動力学シミュレーションのスナップショット。色の違いは、染色体番号 (1-16) の違いを表す。具体的には、第 1 染色体 (青)、第 2 染色体 (赤)、第 3 染色体 (灰色)、第 4 染色体 (オレンジ)、第 5 染色体 (黄色)、第 6 染色体 (黄褐色)、第 7 染色体 (銀色)、第 8 染色体 (緑)、第 9 染色体 (白)、第 10 染色体 (桃色)、第 11 染色体 (青緑色)、第 12 染色体 (紫色)、第 13 染色体 (ライム色)、第 14 染色体 (モーブ色)、第 15 染色体 (黄土色)、第 16 染色体 (淡青色)。赤点は、紡錘極体の位置を表す。また、核膜のおよその位置を青色で示す。(a) は図 3.1 と同じ軸から見た場合のスナップショットを示す。(b) は (a) と同じ構造を紡錘極体側から見た図である。また (a)(b) いずれも、郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さに関連するパラメータを $\xi/T=10$ とし、また、核膜と染色体との相互作用は、モデル 3(テロメアに対応する領域と rDNA 領域に対応する領域のみ核膜と引力相互作用をすることを仮定したモデル。) を用いたときのスナップショットを示す。

3.3.2 染色体内・染色体間に働く特異的相互作用の強さについての考察

次に、染色体内・染色体間に働く特異的な相互作用の強さが、染色体の揺らぎを引き起こす因子となっているランダム力の大きさに比べてどの程度であるのかについて考える。

核内における染色体の揺らぎの一つの指標として、染色体の末端領域に位置しているテロメア間の距離の分布が挙げられる。本研究では、染色体内・染色体間に働く特異的な相互作用の強さを変えたシミュレーションを行い、それらのうち Bystricky ら (85) によって測定されたテロメア間の距離の分布を最もよく再現するものを決定することにより、これらの特異的相互作用の強さの程度を見積もった。Bystricky らが測定を行なったテロメアの対の組み合わせの範囲では、郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さに関連するパラメータの値が $\xi/T = 10$ から $\xi/T = 100$ のオーダーのときに、テロメア間の距離の分布を再現できていることが観察される。ただ、第 5 染色体のテロメア間の距離の分布に関しては、計算から得られた分布のピーク値は、実験で得られている値より 2 倍ほど高くなっており、シミュレーション結果は実験データを再現できているとはいえない。このことは、第 5 染色体のテロメアは、核膜への結合と解離をくり返し核内をダイナミックに動いているために、現時点でのシミュレーションの計算時間が足りていないことが原因であると思われる。そのため、現時点よりシミュレーション時間を十分に確保し、分布を得るのに十分なサンプル数を用いることで、この問題は改善されると思われる。一方、郷相互作用に含まれるパラメータの値が $\xi/T = 1$ のときは、シミュレーションで得られる分布は、実験で得られる分布からずれることがわかった。例えば、 $\xi/T = 1$ のときの計算から得られた分布は、第 14 染色体のテロメア間の距離の分布 (図 3.4d) を再現することはできない。また $\xi/T = 100$ のときの計算から得られた分布は、第 6 染色体のテロメア間の距離の分布 (図 3.4b) と大きくずれてしまう。このことは、第 6 染色体の右側のテロメアが実際には核膜付近にあるにも関わらず (3, 85)、染色体内・染色体間の相互作用が強すぎることににより、核膜から離れてしまうことに起因していると思われる。しかし、第 5 染色体の左側のテロメアと第 14 染色体の右側のテロメア間の距離の分布に関しては、郷相互作用に含まれるパラメータの値が $\xi/T = 100$ のときに最もよく実験データと一致する。以上のことから、核内における染色体の揺らぎを表現するためには、郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さに関連するパラメータの値が $\xi/T = 10$ から $\xi/T = 100$ のオーダー程度のときであることがわかった。

次に、これらのパラメータの値が、染色体を構成するビーズの動きとしてどのくらいの大きさの揺らぎに対応するのかについて考える。ここで、ボルツマン定数 k_B を 1 とする。1 自由度あたりの熱揺らぎのエネルギーのオーダーはおよそ $1 T$ である。また、生体内でミリ秒程度の時間スケールで起こる現象に対応したエネルギースケールは、およそ $20 T$ であるため、熱揺らぎのエネルギースケールの上限がおよそこのあたりであると推測される。したがって、郷相互作用のポテンシャルの深さと熱揺らぎの大きさの比は、 $\xi/(Tc\sigma_{ij}^{\mu\nu}\sqrt{2\pi})$ とすると、この比の値が 1 より小さい程度では、染色体を構成しているビーズは郷相互作用による拘束が弱く大きく揺らぐことになる。また、この比の値が 1 より大きく 20 より小さい程度の場合には、相互作用と揺らぎが同程度であり、染色体を構成しているビーズは相互作用の影響を受けながら大きく揺らぐことになる。また、この比の値が 20 より大きい程度の場合には、相互作用が大きく、染色体を構成しているビーズの揺らぎは小さくなる。

では次に、具体的な数値を用いて染色体を構成しているビーズ対の距離 $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ によってビーズの揺らぎの大きさがどのように変わるかを考える。郷相互作用に含まれるパラメーター

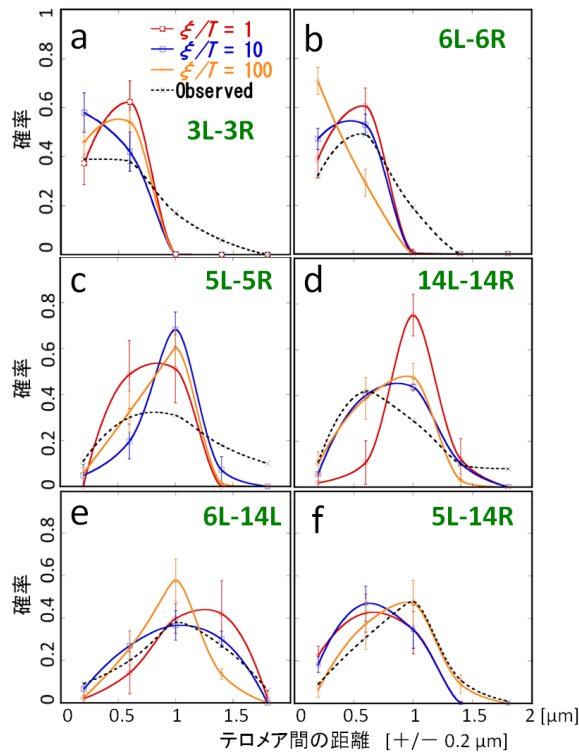


図 3.4: テロメア間の距離分布が染色体内および染色体間に働く相互作用 (郷相互作用) の強さにどのように依存するかを示す結果. シミュレーションは $\xi/T = 1$ (赤色), $\xi/T = 10$ (青色), $\xi/T = 100$ (オレンジ色) の分布を示す. Bystricky らの実験データ (85) は点線で示す. (a) 第 3 染色体のテロメア間の距離分布. (b) 第 6 染色体のテロメア間の距離分布. (c) 第 5 染色体のテロメア間の距離分布. (d) 第 14 染色体のテロメア間の距離分布. (e) 第 6 染色体の左側のテロメアと第 14 染色体の左側のテロメアの距離分布. (f) 第 5 染色体の左側のテロメアと第 14 染色体の右側のテロメアの距離分布. これらの分布は, 染色体と核膜との相互作用がモデル 3 (テロメアに対応する領域と rDNA 領域に対応する領域のみ核膜と引力相互作用をすることを仮定したモデル.) における結果である. また, 分布は $0.4\mu\text{m}$ のピンにおける確率を計算し, それらのデータ点を補間して表示している.

の値が $c=0.1$, $\xi/T=10$ のときには, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 40 nm より大きい程度であれば, ビーズは郷相互作用からの拘束を受けずに大きく揺らいでいる. また, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 2 nm から 40 nm 程度であれば, 相互作用の影響を受けながら大きく揺らぐことになる. また, ビーズ対の距離 $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 2 nm より小さい程度であれば, ビーズは郷相互作用から強い拘束を受けて揺らぎは小さい. ビーズの直径が 30 nm であることを考えると, 郷相互作用の強さが $c=0.1$, $\xi/T=10$ のときには, 平均構造において互いに接近しているビーズ対は相互作用から拘束を受けているが, そのほかのビーズは相互作用による拘束を受けずに大きく揺らいでいることが予想される.

これに対して, 第 14 染色体のテロメア間の距離の実験データを説明することができない $c=0.1$, $\xi/T=1$ のときには, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 4 nm より大きい程度であれば, ビーズは郷相互作用からの拘束を受けずに大きく揺らいでいる. また, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 0.2 nm から 4 nm 程度であれば, 相互作用の影響を受けながら大きく揺らぐことになる. また, ビーズ対の距離 $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 0.2 nm より小さい程度であれば, ビーズは郷相互作用から強い拘束を受けて揺らぎは小さい. つ

まり, $c=0.1$, $\xi/T=1$ のときにはすべてのビーズは郷相互作用からの拘束を受けずに大きく揺らいでいる.

また, 第 6 染色体のテロメア間の距離の実験データを説明することはできないが, ほかの分布を再現することができる $c=0.1$, $\xi/T=100$ の相互作用の強さのときには, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 400 nm より大きい程度であれば, ビーズは郷相互作用からの拘束を受けずに大きく揺らいでいる. また, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 20 nm から 400 nm 程度であれば, 相互作用の影響を受けながら大きく揺らぐことになる. また, $\sigma_{ij}^{\mu\nu}$ が 20 nm より小さい程度であれば, ビーズは郷相互作用から強い拘束を受けて揺らぎが小さい. つまり, ビーズが接触しているところではビーズは揺らがないが, 核の半径の 1/2 程度の範囲では相互作用の影響を受けながら大きく揺らぐ. また, 核の半径の 1/2 よりビーズ対の距離が長い場合にはビーズは相互作用から拘束を受けずに大きく揺らいでいることが予想される.

3.3.3 核膜から制約を受けた染色体のブラウン運動

次に, 染色体の揺らぎを表現する染色体内・染色体間に働く特異的相互作用の強さのもとで, 染色体が実験で知られているような核膜から制約を受けたブラウン運動をしていることを確認した. 具体的には, 第 5, 6 染色体の左右のテロメアの核膜からの距離を計算し, シミュレーションで得られた染色体のテロメアの運動が, 実験で見られているテロメアの運動 (58, 85) に類似していることを確認した (図 3.5 参照).

計算結果からは, 第 5 染色体の右側のテロメアは核膜から離れた領域を運動している一方, 第 6 染色体の右側のテロメアは核膜付近に位置し, 核膜についたり離れたりにしていることがわかる. さらに, 染色体内・染色体間に働く特異的相互作用の強さを変えた場合に, テロメアのブラウン運動の様子が変わるかどうかを調べた. 図 3.6 に, その相互作用の強さを変えた場合に見られる第 5 染色体の動径方向の平均二乗移動距離 msd_R の値を示す. ただし, $\text{msd}_R(\Delta\tau)$ は式 (3.20) のように, 観測時間の $\Delta\tau$ 後にテロメアの核の中心からの距離の変位の二乗の値を表す (図 3.7 を参照).

$$\text{msd}_R(\Delta\tau) = \left\langle (R_i^\mu(\tau + \Delta\tau) - R_i^\mu(\tau))^2 \right\rangle_\tau \quad (3.20)$$

ここで $\langle \dots \rangle_\tau$ はトラジェクトリーにそって観測時間幅 $\Delta\tau$ ずらして計算した平均である. 着目する粒子がブラウン運動をしている場合には, この平均二乗移動距離 $\text{msd}_R(t)$ の値が, 観測時間幅 $\Delta\tau$ に比例することから, 郷相互作用の強さが, $\xi/T = 10$ のときには, 第 5 染色体のテロメアは, ブラウン運動をしていることがわかる. 一方, 相互作用の強さが, $\xi/T = 100$ のときには, 図 3.6 の点線のように, ブラウン運動ではない動きをすることがわかる. これは実験結果に反するため (85), 核内の染色体の運動を表現するための郷相互作用の強さは, $\xi/T = 10$ 程度がよいことがわかる. 次に, この動径方向のテロメアの平均二乗移動距離のシミュレーション結果と, Bystricky らが測定した平均二乗移動距離のデータの傾きを比較することで, シミュレーションにおける 1 ステップの実時間への対応づけをおこなった. 具体的には, 郷相互作用の強さが $\xi/T = 10$ のもとで, 第 5 染色体の左側のテロメアの実験データと計算結果を比較する場合は, シミュレーション上の時間は 2.63×10^{-3} 秒/ステップである.

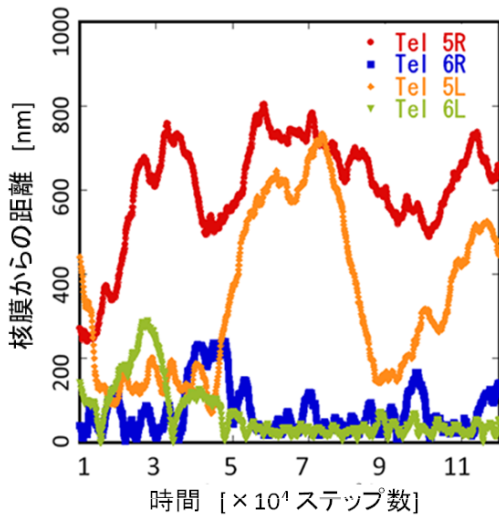


図 3.5: 粗視化染色体モデルにおけるテロメア領域に対応するビーズが、核膜から制約を受けながら運動をしていることが再現できていることを示すシミュレーション結果。各テロメアの核膜からの距離の時間発展のシミュレーションにおいて、第 5 染色体の右側のテロメアのデータを赤色で、第 6 染色体の右側のテロメアのデータを青色で、第 5 染色体の左側のテロメアのデータをオレンジ色で、第 6 染色体の左側のテロメアのデータを黄緑色で示す。これらは、いずれも郷相互作用のポテンシャルの深さに関連するパラメータ $\xi/T=10$ の値のもとでの計算である。また、染色体と核膜との相互作用はモデル 3(テロメアに対応する領域と rDNA 領域に対応する領域のみ核膜と引力相互作用をすることを仮定したモデル。)である。

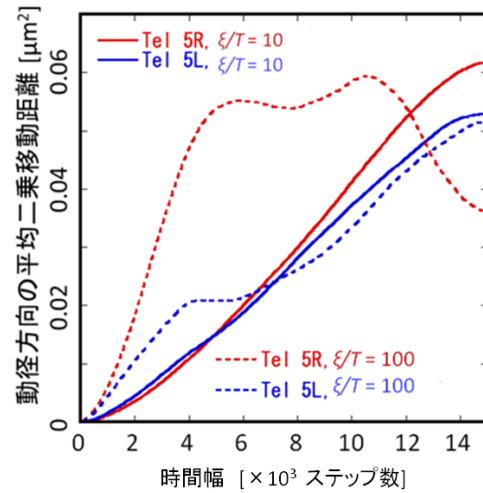


図 3.6: 第 5 染色体の左右のテロメアの動径方向の平均二乗移動距離の測定の時間幅依存性。実線は、郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さに関連するパラメータが $\xi/T=10$ における計算結果を示す。赤色の実線は、第 5 染色体の右側のテロメアを表し、青色の実線は、第 5 染色体の左側のテロメアを表す。また、点線は、郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さに関連するパラメータが $\xi/T=100$ における計算結果を示す。赤色の点線は、第 5 染色体の右側のテロメアを表し、青色の点線は、第 5 染色体の左側のテロメアを表す。

また、第 5 染色体の右側のテロメアの実験データと計算結果を比較する場合は、シミュレーション上の時間は 4.47×10^{-3} 秒/ステップである。このように、見積もりに用いる実験のデータが異なることにより、シミュレーションにおける 1 ステップの実時間への見積もりは変わるが、図 3.5 のシミュレーション上の 11×10^4 ステップは、現実における時間の 290 490 秒に対応すると見積もられる。

3.3.4 染色体の特徴のある領域の核内におけるトラジェクトリー

テロメア領域のほかにも染色体の特徴のある領域として、セントロメアやリボソーム DNA 領域が挙げられる。これらの領域が、ブラウン運動をしながら核内をどのように動いているのかを示した結果を図 3.8 に示す。セントロメアは紡錘極

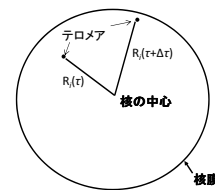


図 3.7: 時刻 $\tau + \Delta\tau$ の核の中心からテロメアまでの距離を $R_i(\tau + \Delta\tau)$ 、時刻 τ の距離を $R_i(\tau)$ と図のように表す。

体付近に広く運動し (図 3.8a 参照), rDNA 領域はモデルにおける核小体の領域内に広がっていることがわかる (図 3.8b 参照). 図 3.8c には, 第 5, 6, 7 染色体のテロメアの核内でのトラジェクトリーを示す. この結果からは具体的には以下のことがわかる. 第 5 染色体の左側のテロメア (青色) は, 核内で核の半径ほども動いている一方で, 第 6 染色体の左側のテロメアは, 実験データ (85) が示すように核膜付近に位置していることがわかる. 第 7 染色体の左側のテロメアは, Berger らの実験 (62) では, 核膜付近に分布している確率が高くなっているが, 一方のシミュレーションのトラジェクトリーでは, やや核の内側にいる. これは, 実験では数千個の細胞のサンプルのデータを用いて解析しているが, 図示しているのは特定の乱数を用いたある一つのトラジェクトリーであるためであり, 十分なサンプル数と計算時間を確保すれば, 核内における各領域の確率密度分布を, Berger らの実験データと定量的に比較することや, まだ実験的に調べられていない領域の核内における確率密度分布を計算することは可能であると思われる. 図 3.8d には, 3 つの遺伝子, *URA3*, *HXK1*, *SNR17A* のトラジェクトリーを示す. 遺伝子 *URA3* は, 第 5 染色体のセントロメア付近に位置し, 遺伝子 *HXK1* は, 第 6 染色体のテロメア付近に位置している. また, 遺伝子 *SNR17A* は, 第 15 染色体のセントロメアとテロメアとの間に位置している (付録 I 参照). このように, 染色体の特徴のある領域の核内におけるトラジェクトリーは, Berger らの実験 (62) で測定されている結果と矛盾していないことを確認した.

3.3.5 テロメアの核膜との相互作用は, 染色体構造を保つのに必要である

Berger らの実験 (62) や Duan らの核内の平均的な染色体構造データ (3) は, 染色体の特徴的な領域は核内にランダムに分布しているのではなく, 核内のある領域に偏って分布していることを示している. しかし, このような染色体のテリトリーの形成は, どのような要因によって引き起こされているのか, また, 核内の染色体の構造を保つのに必要な条件は何であるのかという問題は解決されていない. これらの問いに対する答えを知ることは, 染色体が担っている核内における機能を理解するうえで重要なことである. そこで本研究では, 核膜という制約あるいは足場に注目し, 核内の染色体の構造が保たれる必要条件を調べた. 具体的には, 核膜と相互作用をする染色体の領域をモデル 1 からモデル 4 まで変えることで, Bystricky らの実験 (85) で示されているテロメア間の距離の分布が再現できるかどうかを調べた. その結果を図 3.9 に示す. これらの結果から, 染色体のすべての領域が核膜と相互作用をしない場合や, 逆にすべての領域が核膜と相互作用をする場合には, テロメア間の距離の分布を再現することができないことがわかる. 一方, 染色体領域のなかでも, 染色体の末端付近に位置するテロメア領域が核膜と相互作用をすることをモデルに仮定することで, 実験で得られる分布を再現することができることがわかる. これらの結果は, rDNA 領域やテロメアあるいはサブテロメア領域が, 核膜付近に分布していることを示す実験データ (65, 86) と矛盾しておらず, さらに, 核内の染色体の構造を保つのにテロメア領域が核膜と相互作用をすることが必要条件であることを示している. また, 現時点でのシミュレーション結果からは染色体と核膜との相互作用の仕方についてモデル 3 とモデル 4 の違いはみられない. このことから, 核膜と特異的に相互作用をする染色体領域に関してはさらに詳細な実験データとの比較が必要である.

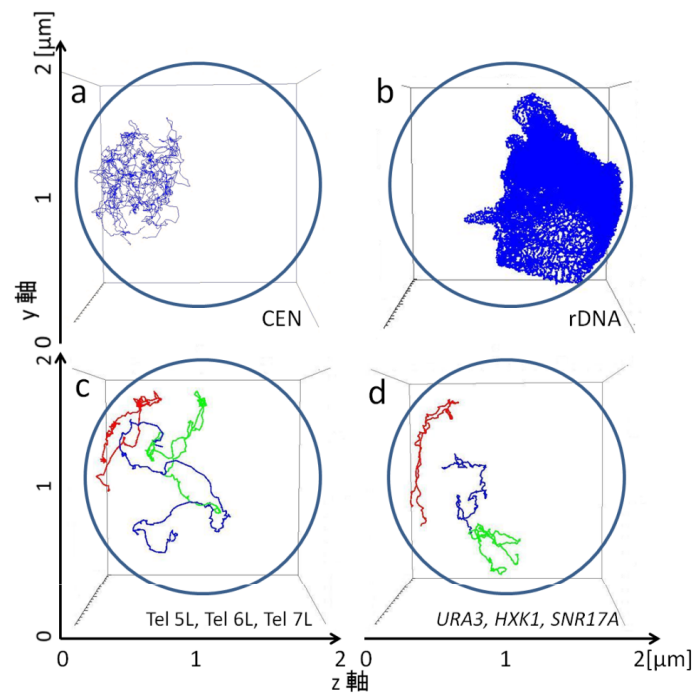


図 3.8: 図 3.1 と同じ軸から見たときの染色体上の各領域におけるトラジェクトリー. (a) 16 本の染色体のセントロメアのトラジェクトリー. (b) rDNA 領域 (第 12 番染色体上の 151-606 ビーズ番号) のトラジェクトリー. (c) いくつかのテロメアのトラジェクトリー. 第 5 染色体の左側のテロメアを青色で, 第 6 染色体の左側のテロメアを赤色で, 第 7 染色体の左側のテロメアを緑色で示す. (d) いくつかの遺伝子領域のトラジェクトリー. *URA3* 遺伝子は青色で, *HXK1* 遺伝子は赤色で, *SNR17A* 遺伝子は緑色で示す. いずれの図も郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さは $\xi/T=10$ の値を用いた計算結果である. また, 核膜と染色体との相互作用は, モデル 3(テロメアに対応する領域と rDNA 領域に対応する領域のみ核膜と引力相互作用をすることを仮定したモデル.) のもとでの結果である. いずれのシミュレーションも 1.1×10^5 ステップの長さのトラジェクトリーを示す.

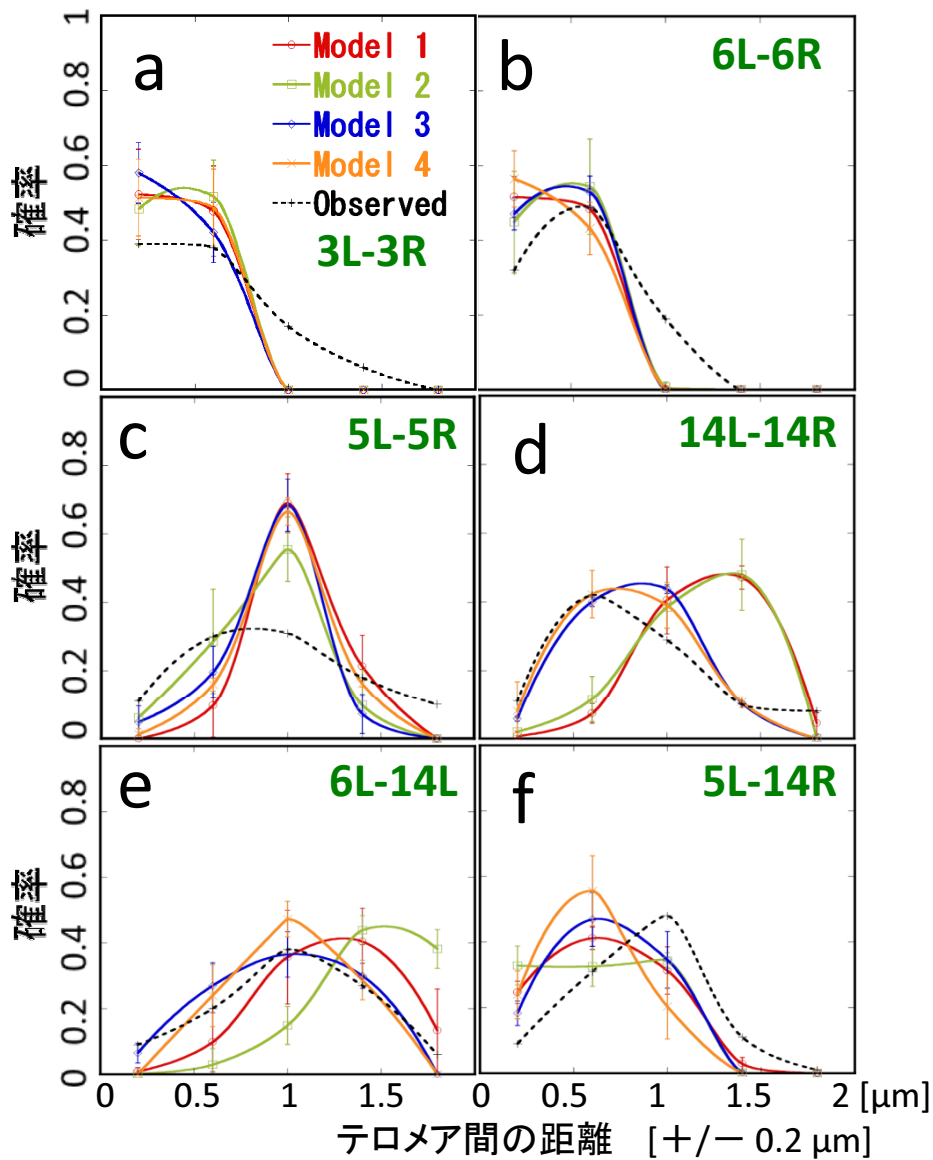


図 3.9: テロメア間の距離分布が染色体と核膜との相互作用の仕方によってどのように依存するかを示す結果。モデル1(赤): 染色体を構成するすべてのビーズが核膜と引力の相互作用をしないモデル。モデル2(緑): 染色体を構成するすべてのビーズが核膜と引力の相互作用をするモデル。モデル3(青): テロメアと rDNA 領域に対応するビーズのみ核膜と引力の相互作用をするモデル。モデル4(オレンジ): Duan らの構造 (3) において、核膜と接触しているビーズとテロメアと rDNA 領域に対応するビーズのみ核膜と引力の相互作用をするモデル。これらモデル1からモデル4におけるテロメア間の距離分布のシミュレーション結果を実線で示す。一方, Bystricky らの実験データ (85) は点線で示す。(a) 第3染色体のテロメア間の距離分布。(b) 第6染色体のテロメア間の距離分布。(c) 第5染色体のテロメア間の距離分布。(d) 第14染色体のテロメア間の距離分布。(e) 第6染色体の左側のテロメアと第14染色体の左側のテロメアの距離分布。(f) 第5染色体の左側のテロメアと第14染色体の右側のテロメアの距離分布。これらの分布は、郷相互作用に含まれるポテンシャルの深さに関連するパラメータの値が $\xi/T = 10$ のデータを用いている。また、分布は $0.4\mu\text{m}$ のビンにおける確率を計算し、それらのデータ点を補間して表示している。

3.4 まとめと議論

本研究では、間期出芽酵母におけるすべての染色体のランジュバン動力学シミュレーションモデルを構築した。粗視化染色体モデルによるシミュレーションから、染色体の揺らぎを反映するテロメア間の距離の分布を再現する染色体内・染色体間の相互作用の強さを見出した。また、その相互作用の強さのもとでは、染色体は核膜から制約を受けながらもブラウン運動をしていることが再現され、シミュレーションにおける時間スケールと現実の時間スケールの対応付けが可能となった。さらに、核内の染色体は揺らぎながらもテリトリーを形成していることが報告されているが、そのような核内の染色体の分布の形成には染色体の特異的な領域と核膜との相互作用が重要であることを示す結果が得られた。

現段階における粗視化染色体モデルから、さらに核小体のモデルを改良すれば、より予測能力が高いシミュレーション系になると思われる。というのも、現段階のモデルにおける核小体領域は、実験で報告されている領域より簡略化した形を用いているため、改良の余地が残されているからである。また、核小体の領域の内と外とで、同じ粘性抵抗係数の値を用いているが、実際の核小体はリボソーム DNA や RNA が混在した領域であり、染色体の動きやすさは核小体の内と外で異なることが想像される。しかし、現段階ではモデル化の第一近似として、核小体を簡略化した領域としてモデル化している。

このような改良を行うことで、例えば以下のような問題に挑戦することができる。出芽酵母の核膜付近では、核膜と相互作用をしているテロメアに近い領域にある遺伝子の発現は抑制される (87)。またその逆に、遺伝子が核膜孔と相互作用をしている場合や特異的な染色体領域が核膜と相互作用をすることで区画化された染色体領域内にある遺伝子の発現は活性化されることが知られている (82, 88)。つまり、染色体は核膜を足場とすることにより、遺伝子の発現調節をおこなっていると思われる。そこで、本研究における染色体と核膜との相互作用を変えることで、着目していた遺伝子の発現が抑制されるか、あるいは、活性化されるかを予測することができるかもしれない。また、そのような予測は、一遺伝子からゲノムの発現パターンへと拡大することが可能かもしれない。さらに、核内の染色体は常に揺らぎを伴い、遺伝子の発現調節あるいは遺伝子損傷の修復などの機能を担っている。そこで、本研究を改良し、染色体の揺らぎの主成分分析をおこなうことで、揺らぎを引き起こす核内の要素を見出し、遺伝子の発現調節や損傷修復に揺らぎが及ぼす影響を調べることが可能となる。

核内では、放射線や DNA 修復のエラーなどの要因により DNA の二重鎖切断が頻繁に引き起こされている。真核生物では、DNA の二重鎖切断が引き起こされた場合には 2 通りの方法で損傷の修復がおこなわれる (89)。一つ目は、相同 DNA の組み換えによる修復である。二つ目は、非相同 DNA の端が接合することで修復がおこなわれる場合である。このうち相同 DNA の組み換えによる修復の過程においては、DNA の二重鎖切断が引き起こされた領域は空間的に近寄ることで、修復蛋白質の密度の高い領域が形成されることが知られている (90–92)。しかし、どのように DNA 修復の領域が形成されるのかについて詳しいことはわかっていない。本研究におけるモデルにおける式 (3.4) の k や式 (3.6) の k_{θ} のような染色体の硬さを表現するパラメータを変えることで、DNA の二重鎖切断が局所的に染色体上で引き起こされる現象を表現することにより、DNA 修復の場の形成は、特異的な蛋白質が DNA の二重鎖切断が起きた場所に結合することで形成されるものであるのか、あるいは、バイアスのかかった染色体の拡散による運動によって形成されるものであるのか

ということを調べることは可能である。

このように真核生物の核内におけるすべての染色体の動力学モデルによるシミュレーションは、染色体が関わっているさまざまな機能のメカニズムを調べる新しいアプローチとなるであろう。いままでは、核内の染色体の一部のダイナミクス、構造変化、遺伝子の発現調節のプロセスしか知ることができなかった。しかし、これからは核内すべての染色体の静的そして動的な描像を得ることができるようになったことで、染色体が関わる機能のメカニズムを細胞核のスケールで、染色体のダイナミクス・構造・ゲノム情報を統合しながら理解できる時代になったといえるであろう。

第4章 まとめ及び展望

第2章では、私たちはエンハンサー阻害活性を示すインスレーターのメカニズムを明らかにすることを目指し、全長が約6 kbpのDNAを表現する粗視化DNAモデルを構築し、Ameresらの実験(10)に対応するモンテカルロシミュレーションをおこなった。その結果、エンハンサーがDNAループ内に閉じ込められてプロモーターから隔てられている構造のもとでは、エンハンサーがDNAループ内に閉じ込められていない構造に比べて、エンハンサーのプロモーターへの接近確率は著しく減少することがわかった。また、接近確率が減少する原因は、DNA鎖のエントロピーの効果ではなくエネルギーの効果であることがわかった。つまり、エンハンサーがプロモーターからトポロジカルに隔てられている構造のもとでは、エンハンサーがプロモーターに接近するときDNAはエネルギー的に高いひずんだ構造をとることになり、接近が難しくなるため、遺伝子の発現を活性化する働きが抑制されることがわかった。さらに、エンハンサーとプロモーターの間にインスレーター類似配列を2つ挿入した配置のシミュレーションでは、エンハンサーのプロモーターへの接近確率は、インスレーター類似配列が挿入されていない配置に比べて増加する結果が得られた。この結果は、インスレーターがエンハンサーとプロモーターの間に2つ挿入されている配置において、インスレーターは遺伝子の発現を活性化するという実験のデータとつじつまが合っている。これらのことから、インスレーターのエンハンサー阻害活性は、インスレーターによって構造変化が引き起こされた後の構造のもとで、エンハンサーとプロモーターが接近する際に形成されるDNA構造の安定性に依存していることがわかった。本研究により、インスレーターは転写がおこなわれる際に形成されるDNA構造の安定性を変えることで、遺伝子の発現調節をおこなっていることが示唆された。

さらに本研究を発展させることで以下の2つの問題にアプローチすることが可能であると考えられる。1つ目は、Dekkerら(52)も問いかけをしているが、どのように遺伝子発現調節領域であるエンハンサーはそのターゲットとなる遺伝子を見つけているのかという問題である。ヒトの場合は約2万5千の遺伝子(93)、出芽酵母の場合は約6千5百の遺伝子(94)がDNA上には刻まれており、それらの遺伝子の発現は時期特異的にまた組織特異的に制御されている。遺伝子の発現を活性化する際の制御を担っているのがエンハンサーであり、近年では、この調節領域はループ構造を伴ってプロモーターに空間的に接近し、プロモーターに転写因子を寄り集めることで、遺伝子が読み取られていることがわかっている(8)。しかし、エンハンサーがいくつか並んでいる遺伝子のうち、読み取る遺伝子を選択する仕組みや、発生の時期によって読み取る遺伝子を変える仕組みなどは明らかにされていない。例えば、こういった現象の典型例として β グロビン遺伝子座がよく扱われる。この遺伝子座には、10万塩基対に及び、遺伝子発現調節領域(LCR)、 ϵ 、 γ 、 δ 、 β 遺伝子がDNA上に並んでいる。そして、各遺伝子が発現する発生段階は異なり、具体的には、初期胚では ϵ グロビン遺伝子が、後期の胚と胎児では γ 遺伝子が、そしておもに成体では β グロビン遺伝子が赤血球細胞において発現するように制御されている(95)。さらに興味深いこととし

て、これらの遺伝子は DNA 上における並びの順番通りに発生の段階で発現されている。もちろん転写因子の特異的な相互作用による効果はあると考えられるが、それに加えて、遺伝子の配置や数は転写が行われやすいように、つまり、転写が行われる際に形成される構造が安定になるように進化が起こり、そのことがこのような時期特異的に遺伝子のスイッチが切り替わる仕組みに関連しているという可能性は興味深い(96)。最近では、この遺伝子座における転写時の 3 次元構造を考慮した描像が描かれるようになり(97)、遺伝子のスイッチの切り替えには遺伝子発現調節領域に結合する“のり”の役割をする蛋白質が重要であると主張されているが(98)、構造の安定性についての議論はなされていない。そのため、本研究で用いた 6 kbp の粗視化 DNA から数百 kbp の粗視化染色体へとモデルを拡張し、 β グロビン遺伝子座に類似したいくつかの遺伝子発現調節領域およびプロモーター領域を含む粗視化染色体モデルを用いることで、遺伝子スイッチが切り替わった後の構造の安定性を比較することは興味深い今後の課題である。

本研究を発展させることで、2 つ目に取り組むことが可能であると考えられることは、同一の DNA あるいは染色体ループ内にあるエンハンサーは必ずプロモーターに作用することで遺伝子の発現を活性化するのかという問題である。インスレーターは、1993 年に Felsenfeld らによって報告された遺伝子発現調節領域であり、エンハンサーとプロモーターの位置に対して、配置される場所や数により、遺伝子の発現を抑制する場合と活性化する場合がある(24, 25, 99)。標準的教科書である文献(13)によると、「インスレーターは、エンハンサーとプロモーターの情報交換を阻止するために、両者の間に位置する必要がある。」と書かれている。しかし、第 2 章で述べた研究を通して、また、インスレーターの初期の頃の Felsenfeld らのデータ(100–102)を注意深く分析すれば、この教科書の記述は正しくない可能性があることがわかる。つまり、エンハンサーとプロモーターの両側に配置されたインスレーター類似配列によっても、同一の DNA あるいは染色体ループの内にあるエンハンサーの機能は阻害される可能性がある。というのは、第 2 章の研究から、ある遺伝子の発現を抑制するためには、ある遺伝子が読み取られる際に形成される構造が不安定になるような構造を引き起こす位置にインスレーター類似配列があればよい、ということがわかってきたことから考えれば、そのような構造は、エンハンサーとプロモーターの間にインスレーター類似配列がなくとも引き起こすことができる可能性があるからである。シミュレーションあるいは実験からこの仮説を確かめることは今後に残された課題だと思われる。

次に、第 3 章における研究について述べる。近年、出芽酵母のすべての染色体の核内における平均的な構造モデルが Duan らにより報告されたが(3)、その構造は、Chromosome Conformation Capture-on-Chip(4C) 法により測定された染色体上の 2 点間距離のデータとなるべく整合性があるように推測された平均構造にすぎない。核内の間期染色体は、核膜から制約を受けながらダイナミックに動いていることが Gasser らにより報告されていることを考えると(11, 12)、核内における遺伝子の発現調節や損傷修復、細胞分裂や細胞の分化などの事象の仕組みを理解するうえで、染色体の動的な側面を考慮することは重要である。そこで、本研究では、染色体上の 2 点間距離が 4C 法で測定された距離に近づくと安定になるような染色体内・染色体間の特異的相互作用(郷相互作用)を Kremer-Grest 模型に導入した動力学シミュレーションモデルを構築し、その計算結果から得られる生物学的知見について述べた。具体的にはまず、測定されているテロメア間の距離の分布の実験データを説明する適切な郷相互作用の強さが $100/(\sqrt{2\pi}\sigma_{ij}^{\mu\nu})k_B T$ 程度であることを見出した。また、実験から得られた核内におけるテロメア間の距離の分布を再現するためには、テ

ロメアと核膜との相互作用が重要であることを示した。この結果は、揺らぎにさらされた環境下にある染色体が“染色体テリトリー”を形成する際に、テロメアと核膜との相互作用が重要であることを示唆している。染色体動力学モデルに蛋白質のフォールディング研究で培われた郷相互作用(染色体内・染色体間相互作用)を導入することにより、核内における染色体の平均構造の描像と動的に揺らぐ描像を統一的に説明するモデル系を計算機上に構築することができた。

ただ、現段階では、染色体の揺らぎとその機能との関連についてまだ調べるべきことが多く残されている。例えば、Misteliら(103)が指摘しているように、染色体の局所的で拡散的な早い運動がどのように遺伝子の発現調節と関連しているのか、また染色体のゆっくりとした広範囲に動く運動は、核内の染色体の構造を保つことやゲノムの安定性に重要であるのか、といった問題である。これらの問題は、染色体の揺らぎの主成分分析をおこなうことでアプローチすることが可能であると考えられる。また、出芽酵母のテロメアは特異的にテロメアに結合する蛋白質を介して核膜と相互作用をする時期としない時期がある(58, 104)。このようなことがどのような効果を引き起こしているのか?ということもまだわかっていない。第3章で述べた研究においてテロメアと核膜との相互作用を変えた場合に、テロメア間の距離の分布が変わるシミュレーション結果が得られた。このことから、核内におけるテロメアの分布や染色体の動きやすさは、テロメアと核膜との相互作用に依存していると思われる。したがって、テロメアと核膜との相互作用が変わったときに、テロメア間の距離の分布や染色体の動きが受ける影響について計算機シミュレーションを用いて検討することは今後の課題である。

また、核内では、放射線やDNA修復のエラーなどの要因によりDNAの二重鎖切断が頻繁に引き起こされている(89)。相同DNAの組み換えによる修復の過程においては、DNAの二重鎖切断が引き起こされた領域が空間的に近寄ることで、修復蛋白質の密度の高い領域が形成されることが知られている(90-92)。しかし、この詳しいメカニズムはよくわかっていない。第3章で述べた粗視化染色体モデルにおける式(3.4)の k や式(3.6)の k_{θ} のような染色体の硬さを表現するパラメータを局所的に変化させることで、染色体上で局所的におこるDNAの二重鎖切断を表現することにより、DNA修復の場の形成が、染色体の拡散による運動のみにより起こりうるものであるのかどうかを検討することも今後に残された課題である。

このように真核生物の核内にある染色体すべての動力学モデルによるシミュレーションは、染色体が関わっているさまざまな機能のメカニズムを調べる新しいアプローチとなるであろう。いままでは、核内の染色体の一部のダイナミクス、構造変化、遺伝子の発現調節などのプロセスしか知ることができなかった。しかし、これからは核内すべての染色体の静的そして動的な描像を得ることができるようになったことで、染色体が関わる機能のメカニズムを細胞核のスケールで、染色体のダイナミクス・構造・ゲノム情報を統合しながら理解することが可能となる。ゲノムの解読が酵母からヒトへと展開されたのと同様に、核内における染色体動力学モデルという手法を酵母からヒトへと拡張することも将来的には可能となるだろう。したがって、第3章で提唱したモデルは、ヒトの染色体の関わるさまざまな機能・メカニズムの解明にも応用できる可能性を持っているのである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導を賜った名古屋大学大学院工学研究科の笹井理生教授に深く感謝の意を表わします。第2章の研究において、御指導を賜った名古屋大学大学院工学研究科の千見寺浄慈助教に感謝致します。また、第3章の研究において、御指導を賜った名古屋大学大学院工学研究科の寺田智樹講師に感謝致します。さらに、有益な御指摘、御助言をいただいた情報・システム研究機構国立遺伝学研究所の前島一博教授ならびに名古屋大学大学院工学研究科の美宅成樹教授に深く感謝致します。最後に、笹井研究室の皆さん、そして精神的・経済的にサポートしてくれた家族および人達に感謝の意を表します。

付録 A 自由エネルギー F のモンテカルロ法による計算の仕方

細胞の核内の環境 (外部の系) は DNA 高分子鎖の系 (注目する系) に比べて十分に大きく、温度 T の熱平衡 (熱浴) にあると仮定する。このとき、DNA 高分子鎖のある状態の実現確率はカノニカル分布をする。本研究においては、DNA 高分子鎖のある状態を、DNA 鎖の 2 領域間の距離であるエンハンサー・プロモーター平均距離 \bar{r} (式 (2.8) 参照) という変数を指標として表現する。このような指標における DNA 高分子鎖の自由エネルギー $F(\bar{r})$ は、以下のように計算した。

まず、モンテカルロ法によりエンハンサー・プロモーター平均距離が \bar{r} である確率分布 $P(\bar{r})$ を計算する。このときには、 $\Delta\bar{r}$ を 1 nm とし、この刻み幅のヒストグラムを作成して $P(\bar{r})$ を求めた。この $P(\bar{r})$ は、分配関数 Z を用い、 $F(\bar{r})$ と以下のような式で関係づけられている。

$$P(\bar{r}) = \frac{Z(\bar{r})}{Z} \text{ から, } Z(\bar{r}) = P(\bar{r})Z$$

$$F(\bar{r}) = -k_B T \ln Z(\bar{r})$$

$$F(\bar{r})/k_B T + \text{const} = -\ln P(\bar{r})$$

したがって、 $-\ln P(\bar{r})$ を計算し、 $F(\bar{r})/k_B T + \text{const}$ を計算する。各配置の自由エネルギープロファイルは、各配置における \bar{r} の値が $10 \text{ nm} \leq \bar{r} < 11 \text{ nm}$ における自由エネルギーがゼロとなるように定数 (const) を定めた。

エネルギー E プロファイルのモンテカルロ法による計算の仕方

エネルギープロファイルの計算の仕方は、以下の通り。

1. 各 \bar{r} の値をもつ構造の集団について、それらの平均エネルギー $\overline{E(\bar{r})}$ を計算する。
2. \bar{r} および $\overline{E(\bar{r})}$ のデータより \bar{r} を変数とする平均エネルギープロファイルのグラフが書ける。
3. $10 \text{ nm} \leq \bar{r} < 11 \text{ nm}$ における平均エネルギー $\overline{E(\bar{r})}$ の値を常にゼロになるようにエネルギーの基準をずらす。

エントロピー S プロファイルのモンテカルロ法による計算の仕方

エントロピーの計算は,

$$F(\bar{r}) = E(\bar{r}) - TS(\bar{r})$$

この式は

$$S(\bar{r})/k_B = E(\bar{r})/k_B T - F(\bar{r})/k_B T$$

と変形できる.

この関係式を用い, 具体的には, 以下の手順にてエントロピー差を計算した.

1. $E(\bar{r})/k_B T$, $F(\bar{r})/k_B T$ を計算する.
2. それらの差から, $S(\bar{r})/k_B$ を求める. (そのときに, $\Delta\bar{r}$ の刻み幅をエネルギーと自由エネルギーで, 一致させておく必要がある.)
3. $10 \text{ nm} \leq \bar{r} < 11 \text{ nm}$ におけるエントロピーの値 $S(\bar{r})/k_B$ を常にゼロになるようにエントロピーの基準をずらす.

付録B シミュレーションにおける諸設定

シミュレーション系における次元の定義

ヌクレオソーム 20 個に対応する 1 ビーズの質量を $m = 1$ とする.

(SI 単位系では, $m = 8.037 \times 10^{-21}$ kg と見積もられる (105).)

1 ビーズの直径の $\frac{1}{3}$ の長さ: $\sigma/3 = 1$ とする. つまり, 10 nm = 1 とする.

(SI 単位系では, $\sigma = 30$ nm)

ボルツマン定数 $k_B = 1$ とする.

(SI 単位系では, $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$ J/K)

温度 $T = 1$ とする.

エネルギー $\epsilon = k_B T = 1$ とする.

ポテンシャルに含まれる変数の値

- 1) ばねポテンシャルに含まれる変数: $\sigma = 30$ nm, $\epsilon = 1.0 k_B T$, $k = 6.0 \epsilon/\sigma^2$,
 $R_0 = 1.15\sigma$, $R'_0 = \sigma$
- 2) 弾性曲げポテンシャルに含まれる変数: $k_\theta = 2.0 k_B T$
- 3) 染色体内・染色体間に働く相互作用に含まれる変数: $\xi = 10 k_B T \text{nm}$, $c = 0.1$,
 σ_{ij} : Supplementary Figure 17 及び Supplementary Table 5, 6 のデータに基づく.
- 4) 排除体積相互作用に含まれる変数: $\epsilon = 1.0 k_B T$
- 5) 染色体と核膜との相互作用に含まれる変数:
 $\epsilon = 1.0 k_B T$, $R_0 = 800$ nm, $u = 1000$ nm.
- 6) 染色体と核小体との相互作用に含まれる変数: $h_{\text{nucl}} = 0.2 k_B T$, $z_0 = 1170$ nm
- 7) セントロメアと紡錘極体との相互作用に含まれる変数: $h = 0.3 k_B T$

各染色体のビーズ数

第 1 染色体を表すビーズ数	$N = 78$,	第 2 染色体を表すビーズ数	$N = 271$,
第 3 染色体を表すビーズ数	$N = 104$,	第 4 染色体を表すビーズ数	$N = 511$,
第 5 染色体を表すビーズ数	$N = 191$,	第 6 染色体を表すビーズ数	$N = 91$,
第 7 染色体を表すビーズ数	$N = 364$,	第 8 染色体を表すビーズ数	$N = 186$,
第 9 染色体を表すビーズ数	$N = 144$,	第 10 染色体を表すビーズ数	$N = 247$,
第 11 染色体を表すビーズ数	$N = 221$,	第 12 染色体を表すビーズ数	$N = 806$,
第 13 染色体を表すビーズ数	$N = 307$,	第 14 染色体を表すビーズ数	$N = 261$,

第 15 染色体を表すビーズ数 $N = 364$, 第 16 染色体を表すビーズ数 $N = 314$,
合計 4460 ビーズ数

時間積分を行う時間のきざみ幅は, $\Delta t = 0.01$ (計算機上での値) を用いた. また, データ解析には, $t_0 = 10^4$ ステップから $t_{\max} = 6 \times 10^4$ ステップまでに出力したデータを用いている. 大きさが $I_R = \sqrt{\frac{2\zeta T}{\Delta t}}$ で表されるランダム力に含まれる粘性係数は, 計算機上の単位系において, $\zeta = 10^{-5}$ を用いた. また, 動画ファイルは, 27500 ステップから 6×10^4 ステップまでの 32500 ステップのデータを用いて作成している. そのため, 2.63×10^{-3} sec/step の見積もりを用いると, 動画は 1.4 min に対応する.

粘性抵抗力

粘性抵抗力は, ブラウン運動をする粒子が受ける平均の抵抗力に起因する速度の減衰項である. この項に含まれる粘性抵抗係数 ζ の値は, 実際の数値から見積もった値ではなく実現可能な計算時間の範囲で, ある量の平衡分布が得られるような適当な値を用いた. そのため, シミュレーションにおける 1 ステップの実時間に対応する時間は, 適当な値として選択した粘性抵抗係数を用いて求めた平均二乗移動距離の計算結果と実験で得られている値とを比較して求めた.

ランダム力

シミュレーションにおけるランダム力は, ガウス分布関数を用いて表現される.

$$P(\Gamma) = \left(\frac{\Delta t}{4\pi T \zeta} \right)^{1/2} \exp(-\Delta t \Gamma^2 / 4T \zeta) \quad (\text{B.1})$$

具体的には, Box-Muller アルゴリズムによって, 生成される正規 (ガウス) 乱数 (106) を用いて, 以下のように求めた.

$$(w_i^x(t), w_i^y(t), w_i^z(t)) = \left(\sqrt{\frac{2\zeta T}{\Delta t}} \times \text{正規乱数}, \sqrt{\frac{2\zeta T}{\Delta t}} \times \text{正規乱数}, \sqrt{\frac{2\zeta T}{\Delta t}} \times \text{正規乱数} \right)$$

付録C 出芽酵母のクロマチン繊維の持続長

クロマチン繊維の持続長の大きさについては、未だ論争中であり (60)、クロマチン繊維が、DNA よりやわらかいことを報告しているグループ (7, 107, 108) と、DNA より硬いことを報告しているグループ (72) による意見の相違がある。このような状況の中、我々は出芽酵母の間期染色体の持続長として、Bystricky らの見積もりの値、170-220 nm(72) を参考にした。以下、染色体の持続長の見積もりを行った、実験手法、根拠などを各論文についてまとめる。

出芽酵母のクロマチン繊維の持続長は DNA より柔らかいと主張する文献

(1) Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure, Yujia Cui and Carlos Bustamante, PNAS, vol. 97, 127-132 (2000).

- (a) 見積もられた持続長: 30 nm
- (b) 手法: 光ピンセットによる力測定
- (c) in vitro or in vivo: **in vitro**
- (d) 染色体の周囲環境: 室温, 低イオン強度 (~ 40 mM NaCl)
- (e) 根拠となるデータ: 論文中 (107) の Fig. 5.

クロマチン繊維に加えた力と、そのときの繊維の伸張の関係を示した実験データと、拡張されたミミズ鎖モデルによる論文中の式 (1) との比較による。

(2) Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances」 L. Ringrose et al., EMBO J., vol.18, 6630-6641(1999).

- (a) 見積もられた持続長: 27 nm
- (b) 手法: **FLP recombination**
- (c) in vitro or in vivo: **in vitro**
- (d) 染色体の周囲環境: 25 °C, 25 mM TAPS, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA etc.
- (e) 根拠となるデータ: 論文中の Fig. 7.

(3) Capturing Chromosome Conformation, Job Dekker, Karsten Rippe, Martijn Dekker, Nancy Kleckner, Science, vol. 295, 1306-1311(2002).

- (a) 見積もられた持続長: 28 nm
 - (b) 手法: **Capturing Chromosome Conformation**
 - (c) in vitro or in vivo: **in vivo**
 - (d) 染色体の時期: 酵母の細胞周期における G_1 期, 酵母の第 3 染色体
 - (e) 根拠となるデータ: 論文中 (7) の Fig. 3.
- Fig. 3 の実験データと, 論文中の式 (2) との比較による.

出芽酵母のクロマチン繊維の持続長は DNA の持続長より長いと主張する文献

(4) Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques, Kerstin Bystricky, Patrick Heun, Lutz Gehlen, Jorg Langowski and Susan M. Gasser, PNAS, vol. 101, 16495-16500 (2004).

- (a) 見積もられた持続長: 170-220 nm
- (b) 手法: **in situ hybridization, imaging techniques**
- (c) in vitro or in vivo: **in vivo**
- (d) 染色体の時期: 酵母の細胞周期における G_1 期, 酵母の第 6, 14 染色体
- (e) 根拠となるデータ: 論文中 (72) の Fig. 1 (F). and Fig. 4.

Fig. 1 (F) の実験データ (染色体の両端間距離) と, 半屈曲性高分子鎖の場合に用いられる鎖の両端間距離の 2 乗平均式 (1) との比較による.

付録D Andronescu 博士からの追加情報

筆者は Andronescu 博士に電子メールによる問い合わせをおこない以下の回答を得た。

(1) “A three-dimensional model of the yeast genome” の論文の内容以外に、彼らの研究室の Web サイトに、追加のデータが提供されている。 <http://noble.gs.washington.edu/proj/yeast-architecture/sup.html>

(2) 上記の Web サイトにある “Text file with genomic positions and 3D coordinates” (1D-3D file) のデータは、ビーズの両端の順番に操作が加えられていないものである。また、このデータにはビーズ位置の情報とともに、ゲノム位置の情報が追加されている。

(3) 論文にある PDB 形式ファイルと Web サイトにある 1D-3D file の両方とも、ビーズの両端の座標のみについては、4C 法の実験から推測された 2 点間距離にあるが、それ以外のビーズの座標については、そうではない。これは、ベジエ曲線によりビーズ間を補間しているからである。

(4) 公開されていないが、メールの返信のなかで、添付ファイルとして送られてきた “3d_model_of_yeast_without_Bezier_smoothing.pdb” は、10 kbp 間隔ごとに、4C 法の実験データから推測される距離にあるビーズ “N” を含むデータである。彼らは、このデータをもとに、ベジエ曲線による smoothing を後に行い、提供されている PDB 形式ファイルを作成している。ベジエ曲線による smoothing を行うことで、10 kbp 間隔ごとに、実験から推測される距離にあったビーズ座標がずれることになる。

(5) PDB 形式ファイルにある座標空間における長さ 1 の単位は、10 nm である。

(6) PDB 形式ファイルにあるビーズにより作られる 1 セグメントは、両端を除き 500 bp である。1D-3D file に、ゲノム位置情報が追加されているので、そのファイルから両端の 1 セグメントの長さ (bp) は知ることができる。

付録E 出芽酵母の核内構造

真核生物の核内の染色体は、細胞核、核小体、紡錘極体などの核内構造から制約を受けたブラウン運動をしている (59, 71). そのため、これらの要素をモデルに取り入れることを検討した. この付録では、Duan らのモデルでは、どのようにこれらの要素がモデル化されているのかをまとめる. また、Duan らの研究以外のデータについてもまとめる. 出芽酵母の核内構造に関する内容は、Gasser らの総説 (66) が詳しい.

細胞核

Duan らのモデル

Berger らの論文 (62) により、酵母の核はおよそ半径 $1 \mu\text{m}$ の球であることが報告されているので、Duan (2010) らは細胞核を半径 $1 \mu\text{m}$ の球であると仮定し、その球の中に、染色体を構成するすべてのビーズが含まれるようにしている. また、その球の中心の座標は、文献中に明示されていないが、Duan らの PDB 形式ファイルの座標系において (100, 100, 100) (ナノメートル単位で (1000, 1000, 1000)) であると思われる. そのように推測する理由は、この中心点からビーズまでの距離を計算すると、すべてのビーズの距離は $1 \mu\text{m}$ 未満にあるからである (図 E.1 参照).

他の研究

出芽酵母の細胞の半径は約 $1 \mu\text{m}$ であることを示す文献

- (i) 根拠となるデータ：論文 (109) の Fig. 1 の (e), (f)
- (ii) 細胞の時期：G1 期と S 期との境界の時期
- (iii) 実験手法：蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

出芽酵母の細胞の半径は約 $1 \mu\text{m}$ であることを示す文献

- (i) 根拠となるデータ：論文 (62) の Fig. 1 の (f), Supplementary Figure 1
- (ii) 細胞の時期：G1 期
- (iii) 実験手法：透過型蛍光顕微鏡

出芽酵母のリボソーム DNA

Duan らのモデル

Duan らのモデルにおいては, 第 12 番染色体の 450 kbp から 1815 kbp の領域をリボソーム DNA 領域としている (図 E.2 参照). この領域に, 9.1 kbp を最小単位に持つ rDNA 配列が 150 連なっている. これら rDNA 領域にあたるすべてのピースが, 核小体領域を表す球の中に含まれていることが Supplementary Information の記述にある. しかし, 気になる点は, PDB 形式ファイルの座標系における (100, 100, 170) を核小体モデルの球の中心点だと仮定すると, rDNA の一部のピース (150, 593~605 番目のピース) は, 半径 300 nm の球の中には含まれていないという点であり, Duan らの記述に矛盾があるように思われる.

他の研究

- ・出芽酵母の rRNA をコードしている領域 (rDNA) は, 第 12 番染色体にある (110).
- ・リボソーム DNA を蛍光蛋白質で染色した酵母の細胞観察 (111).
- ・出芽酵母のリボソーム合成に関する総説 (112).
- ・透過型蛍光顕微鏡により, 数千個の間期出芽酵母の細胞内におけるリボソーム DNA 領域の確率密度を計算. その結果, その確率密度が 50 %を超えている領域は, $0.53 \mu\text{m}^3$ で, その体積は, 核の体積の 13.9 %に相当する. また, リボソーム DNA 領域の確率密度がある体積は, 約 $1.6 \mu\text{m}^3$ で, その体積は, 核の体積の約 40 %に相当する.

(i) 根拠となるデータ: 論文 (62) の Fig. 2(b) および Table 1

(ii) 細胞の時期: G1 期

(iii) 実験手法: 透過型蛍光顕微鏡

核小体

Duan らのモデル

PDB 形式ファイルの座標系における (100, 100, 170) を中心点に持つと思われる半径 $0.3 \mu\text{m}$ の球を核小体の領域であると表現している.

他の研究

核小体の電子顕微鏡写真

(i) 根拠となるデータ: 論文 (113) の Fig. 1

(ii) 細胞の時期: 論文に記述がない

(iii) 実験手法：電子顕微鏡

・免疫染色によって、核小体と紡錘極体を染色した酵母の細胞 (合計 463 細胞) を観察したところ 77 %の細胞内において、紡錘極体が核小体から反対側に位置している。

(i) 根拠となるデータ：論文 (114) の Fig. 5(d) および Fig. 6.

(ii) 細胞の時期：間期

(iii) 実験手法：免疫蛍光抗体法

・透過型蛍光顕微鏡により、数千個の間期出芽酵母の細胞内におけるリボソーム DNA 領域の確率密度を計算。その結果、その確率密度が 50 %を超えている領域は、 $0.53 \mu\text{m}^3$ で、その体積は、核の体積の 13.9 %に相当する。また、リボソーム DNA 領域の確率密度がある体積は、約 $1.6 \mu\text{m}^3$ で、その体積は、核の体積の約 40 %に相当する。出芽酵母の rDNA 領域は、核小体の中に位置しているとの報告があり、そうであると仮定するとおよそ核小体の体積は、約 $1.6 \mu\text{m}^3$ と見積もられる。

(i) 根拠となるデータ：論文 (62) の Fig. 2(b) および Table 1

(ii) 細胞の時期：G1 期

(iii) 実験手法：透過型蛍光顕微鏡

紡錘極体およびセントロメア

Duan らのモデル

”1D-3D file”における PDB 形式ファイルにおける紡錘極体のモデル球の中心点は (100, 100, 10) だと思われる。Duan(2010) らのモデルでは、この中心点と、第 12 番染色体のセントロメアとの距離に制約が加えられている。具体的には、そのセントロメアの位置が、半径 $0.1 \mu\text{m}$ の紡錘極体のモデル球の中に位置するという制約である。それ以外の染色体のセントロメアには、紡錘極体のモデルからの制約は加えられていない。

他の研究

出芽酵母のセントロメアは、間期 (G1 期) の間中、紡錘極体 (SPB) の近くに寄り集まっている。

(i) 根拠となるデータ：論文 (115) の Fig. 3

(ii) 細胞の時期：間期 (G1 期)

(iii) 実験手法：蛍光 in situ ハイブリダイゼーション & 免疫染色法

出芽酵母の間期 (G1 期) のセントロメアは、核膜の近くに分布している。最も分布確率が高いのは、核膜から 200 nm 程度の領域 (116)。

(i) 根拠となるデータ：Fig. 1. および Fig. 3.

(ii) 細胞の時期：間期 (G1 期)

(iii) 実験手法：蛍光 in situ ハイブリダイゼーション & 免疫蛍光抗体法

出芽酵母のセントロメア (chr 4) の核内の位置の分布. セントロメアは, 核膜から 500 nm 程度まで細胞において分布が見られる (72).

- (i) 根拠となるデータ : Fig. 2.
- (ii) 細胞の時期 : 間期 (G1 期)
- (iii) 実験手法 : 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション & 免疫蛍光抗体法

透過型蛍光顕微鏡により, 数千個の間期出芽酵母の細胞内におけるセントロメア領域の確率密度を計算. その結果, その確率密度が 50 %を超えている領域は, $0.97 \mu\text{m}^3$ で, その体積は, 核の体積の 15.3 %に相当する. また, 確率密度は, 核膜から 500 nm 程度のところまで分布している.

紡錘極体 (SPB) につけた蛍光ラベル (tag) と核膜までの平均距離は, 13 nm (62).

- (i) 根拠となるデータ : 論文 (62) の Fig. 2(a and c) および Table 1
- (ii) 細胞の時期 : G1 期
- (iii) 実験手法 : 透過型蛍光顕微鏡

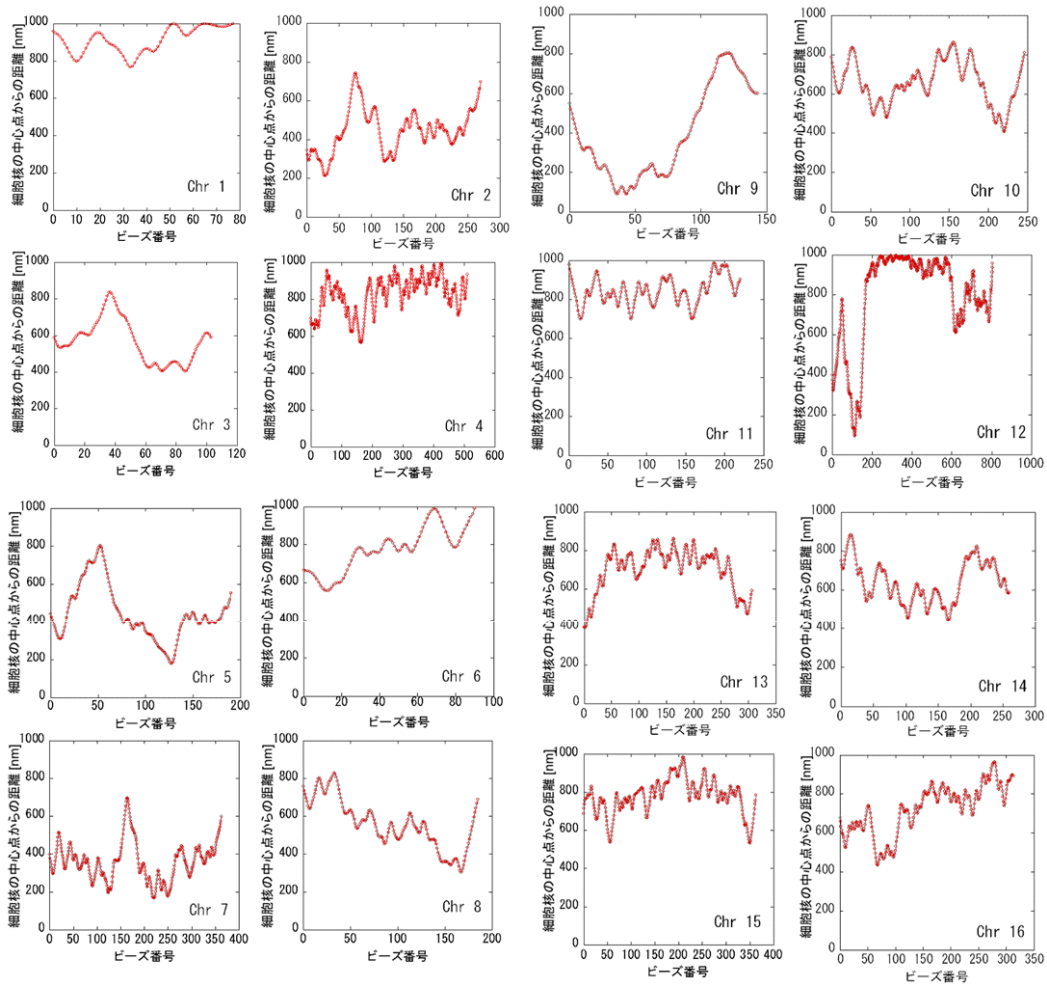


図 E.1: 文献 (3) で報告された間期染色体構造の PDB データの座標を用い, ナノメートル単位で (1000, 1000, 1000) から粗視化染色体モデルにおける各ビーズまでの距離を計算した結果を示す. 核の中心座標をナノメートル単位で (1000, 1000, 1000) と仮定すると, すべての染色体を構成するビーズは半径 $1 \mu\text{m}$ 以内に収まる.

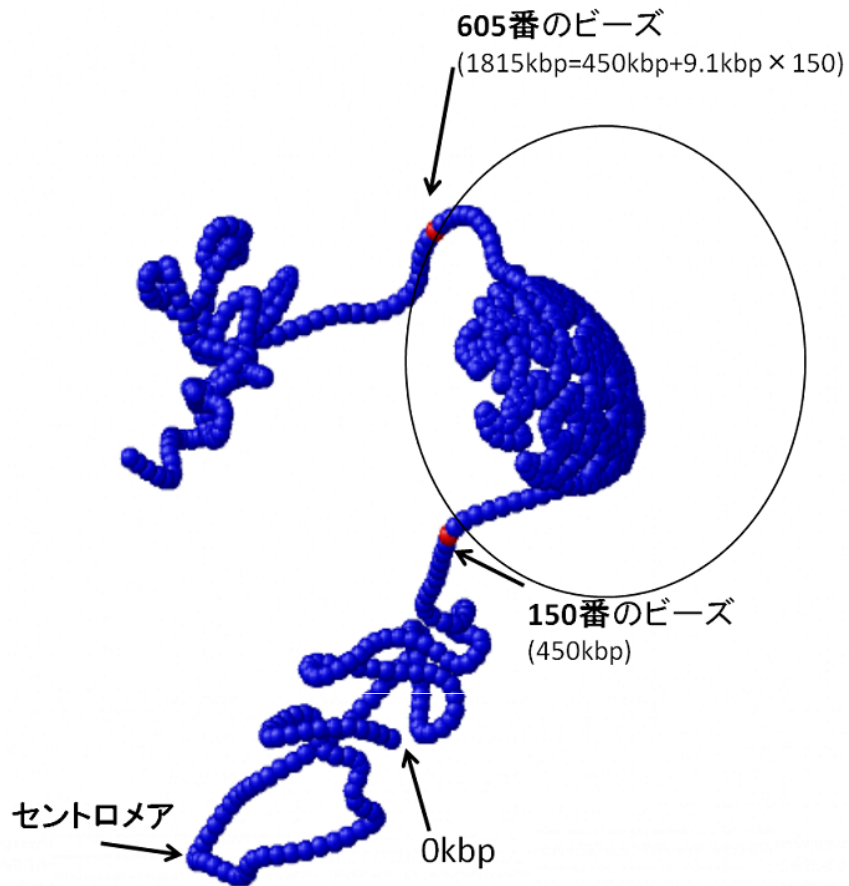


図 E.2: “1D-3D file” から 1 セグメントを 3 kbp に粗視化した PDB 形式ファイルのデータに基づく出芽酵母の第 12 番染色体構造を表わす。円内の領域 (450-1815kbp) は、rDNA 領域を表す。この領域の構造は、4C 法の実験データに基づいた構造ではないので、本研究の粗視化染色体モデルにおいては、この領域についての郷相互作用を定義していない。

付録F 4C法で推測された構造において核膜付近に位置している染色体の領域

Chr 1	ビーズ番号	中心点からの距離[nm]
	51	997.8616
	52	999.0789
	53	993.3602
	63	992.7174
	64	997.4119
	65	998.9624
	66	998.4305
	67	996.6816
	68	993.6615
	76	991.9069
	77	999.5382

Chr 4	ビーズ番号	中心点からの距離[nm]
	424	990.2224
	425	994.3343
	426	995.4178
	427	992.6459

Chr 6	ビーズ番号	中心点からの距離[nm]
	69	990.1164
	90	991.3628

Chr 12	ビーズ番号	中心点からの距離[nm]
	242	990.6556
	243	993.3358
	244	994.2132
	245	993.3613
	246	991.562
	253	991.6206
	254	991.506
	289	990.4346
	290	991.9535
	291	993.5136
	292	995.2602
	293	996.313
	294	996.004
	295	994.4865
	296	992.929
	297	991.7655
	298	990.9381
	299	990.1397
	316	990.651
	317	993.6457
	318	995.3891
	319	996.1927
	320	996.6189
	321	996.4713
	322	996.062
	323	995.9052
	324	995.6861
	325	995.4004
	326	994.6065
	327	992.4763
	333	991.7059
	334	991.5409
	348	990.6773
	349	993.6789
	350	994.8871
	351	993.9322
	352	991.1302
	367	990.3467
	378	990.0557
	379	990.7105
	380	991.7078
	381	992.9793
	382	994.594
	383	995.1296
	384	993.9826
	385	991.1272

図 F.1: Duan や Andronescu らが, chromosome conformation capture-on-chip(4C) 法を用いて推測した出芽酵母の間期染色体構造において, 核膜と接触しているビーズ (核の中心からの距離が 990 nm 以上のビーズ).

付録G 各染色体におけるセントロメア 及びテロメアのゲノム位置

セントロメア、テロメアというのは、染色体の複製や細胞分裂に関与している特異的塩基配列の領域の名称である。複製や分裂のようなプロセスにおいては、セントロメアやテロメアに特定の蛋白質が結合し、複製や分裂を進行させる装置(蛋白質)をこの領域に導く。以下、それぞれのDNA領域について文献(13)を参考にまとめる。また、ヒト、ハエ、分裂酵母、出芽酵母などの真核生物のセントロメアおよびテロメアに関しては、論文(117)のTable 1にまとめられている。

セントロメア

- 複製し凝縮したそれぞれの染色体を1つずつ、細胞分裂が起きるときに各娘細胞に引き込む過程に関与。
- 出芽酵母では、およそ125塩基対の短い特異的DNA塩基配列が、セントロメアとして機能を果たす。この短いDNA領域に10種類以上の蛋白質が集合する。
- 酵母セントロメアに結合している蛋白質が、セントロメア特異的ヌクレオソームを、酵母の有糸分裂紡錘極体の1本の微小管に結合させる。
- 複雑な生物のセントロメアは出芽酵母よりかなり長い。例えば、ヒトやハエのセントロメアは、数十万塩基対以上に及ぶ。

テロメア

- 反復塩基配列が含まれており、染色体末端の複製という機能に関与。
- テロメアは短い塩基配列が何度も反復したもので、広範囲の生物で互いによく似ている。
- 塩基配列特異的なDNA結合蛋白質がテロメアDNAを識別してテロメラーゼという酵素をよび寄せ、これが細胞分裂のたびに反復配列を補充する。
- ヒトの場合はGGGTTAで、各テロメアは、約1000個の反復からなっている。
- 出芽酵母の場合、テロメアの反復配列の数を一定の範囲に保つ恒常性維持機構が備わっている。

以下、粗視化染色体モデルにおけるセントロメアおよびテロメアのゲノム上での位置とDuanらのデータ、文献値・データベース(Saccharomyces Genome Database)の値をまとめる。(ビーズ番号は、ビーズを1番から数えた場合の数を表す。)

第 1 染色体 (230, 208 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (118) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	150kbp(112.6, 111.0, 2.5)	151kbp 0-0.8kbp 1bp(76.4, 61.8, 15.2)	230.1-230.3kbp 230kbp(65.1, 107.7, 6.6)
	150kbp, ピーズ:51(112.6, 111.0, 2.5)	左端の 1 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 2 染色体 (813,178 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (119) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	230kbp(121.2, 110.3, 30.0)	238kbp 0-6.6kbp 1bp(106.1, 133.6, 105.1)	812.4-813.2kbp 810kbp(132.3, 74.6, 156.5)
	231kbp, ピーズ:78(120.9, 109.8, 30.2)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 3 染色体 (316,617 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (120) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	110kbp(130.9, 125.5, 26.3)	114kbp 0-1.1kbp 1bp(133.9, 129.5, 61.9)	315.8-316.6kbp 310kbp(148.6, 124.6, 81.6)
	111kbp, ピーズ:38(131.1, 125.2, 26.3)	左端の 1 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 4 染色体 (1,531,919 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (121) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	440kbp(124.7, 94.5, 27.9)	450kbp 0-0.9kbp(0.9kbp) 1bp(77.0, 35.4, 86.7)	1529.5-1530.2kbp(0.7kbp) 1530kbp(95.7, 6.6, 106.6)
	441kbp, ピーズ:148(124.5, 94.5, 27.9)	左端の 1 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 5 染色体 (576,869 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (122) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	150kbp(97.5, 119.8, 24.6)	152kbp 0-6.5kbp 1bp(84.2, 134.5, 76.8)	570-570.7kbp 570kbp(47.3, 83.1, 97.3)
	150kbp, ピーズ:51(97.5, 119.8, 24.6)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 6 染色体 (270,148 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (123) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	140kbp(122.4, 104.9, 21.7)	149kbp 0-5.5kbp 1bp(116.1, 53.6, 55.0)	269.7-270.1kbp 270kbp(117.8, 59.0, 11.5)
	141kbp, ピーズ:48(122.4, 104.8, 22.2)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 7 染色体 (1,090,947 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (124) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	490kbp(117.1, 117.4, 34.9)	497kbp 0-0.8kbp 1bp(73.4, 75.1, 116.1)	1089.4-1090.1kbp 1090kbp(76.3, 104.8, 156.3)
	489kbp, ピーズ:164(117.0, 116.8, 35.0)	左端の 1 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 8 染色体 (562,643 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (125) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	100kbp(140.9, 112.9, 29.1)	106kbp 0-5.5kbp 1bp(161.8, 98.1, 56.2)	556-563kbp 560kbp(157.6, 138.5, 123.6)
	99kbp, ピーズ:34(141.0, 112.9, 29.1)	左端の 2 ピーズ	右端の 2 ピーズ

第 9 染色体 (439,885 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (126) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	350kbp(114.6, 108.5, 22.3)	356kbp 0-7.8kbp 1bp(54.5, 126.7, 84.4)	439.1-439.8kbp 430kbp(93.8, 108.2, 41.2)
	351kbp, ピーズ:118(114.7, 108.5, 22.3)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 10 染色体 (745,741 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (127) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	430kbp(101.7, 94.8, 23.5)	436kbp 0-7.8kbp 1bp(41.1, 56.0, 71.6)	744.9-745.7kbp 740kbp(64.6, 40.6, 53.3)
	429kbp, ピーズ:144(101.6, 95.0, 23.4)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 11 染色体 (666,454 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (128) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	430kbp(124.8, 88.2, 23.0)	440kbp 0-0.8kbp 1bp(123.8, 14.4, 58.7)	665.9-666.8kbp 660kbp(145.6, 46.6, 42.9)
	429kbp, ピーズ:144(124.6, 87.7, 23.5)	左端の 1 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 12 染色体 (1,078,175 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (129) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	150kbp(100.4, 101.2, 22.0)	151kbp 0-12kbp 1bp(92.3, 121.4, 67.2)	1064-1078kbp 2420kbp(136.5, 35.7, 167.2)
	150kbp, ピーズ:51(100.4, 101.2, 22.0)	左端の 4 ピーズ	右端の 4 ピーズ

第 13 染色体 (924,429 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (130) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	260kbp(133.1, 103.1, 28.5)	268kbp 0-6.4kbp 1bp(114.8, 64.0, 92.4)	923.5-924.4kbp 920kbp(126.0, 52.8, 129.8)
	261kbp, ピーズ:88(132.4, 103.3, 28.5)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 14 染色体 (784,334 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (131) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	620kbp(102.3, 107.4, 21.2)	629kbp 0-7.4kbp 1bp(66.9, 38.1, 126.6)	783.3-784.3kbp 780kbp(60.0, 102.1, 56.6)
	621kbp, ピーズ:208(102.6, 107.6, 21.0)	左端の 2 ピーズ	右端の 1 ピーズ

第 15 染色体 (1,091,289 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (132) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	320kbp(113.6, 86.2, 25.0)	327kbp 0-0.8kbp 1bp(55.5, 65.0, 60.9)	1084-1091kbp 1090kbp(50.7, 46.3, 133.0)
	321kbp, ピーズ:108(113.5, 86.6, 24.5)	左端の 1 ピーズ	右端の 2 ピーズ

第 16 染色体 (948,062 bp)

	セントロメア	テロメア (左)	テロメア (右)
文献 (133) 及びデータベース Duan(2010) らのファイル (ゲノム位置および (x,y,z) 座標) 粗視化染色体モデル (ゲノム位置および初期構造の (x,y,z) 座標)	550kbp(132.9, 96.3, 23.2)	556kbp 0-7.2kbp 1bp(162.1, 90.3, 125.1)	942-948kbp 940kbp(152.5, 32.7, 74.4)
	549kbp, ピーズ:184(132.5, 96.2, 23.4)	左端の 2 ピーズ	右端の 2 ピーズ

第 12 番染色体の右側のテロメアの位置に関しては, 文献値と Duan(2010) らのデータおよび私たちの粗視化染色体モデルにおける値とが約 1.4 kbp 異なっている. その理由は, Duan(2010) らのデータでは, この第 12 番染色体に約 9kbp の rDNA 領域を 150 回反復し配置しているからである.

付録H 4C法で推測された構造データにおけるセグメント長

	1セグメント	2セグメント	3セグメント	N-3セグメント	N-2セグメント	N-1セグメント
第1染色体	3295	2704	3000	2500	2719	2781
第2染色体	3295	2704	3000	3000	2473	3527
第3染色体	3295	2704	3000	3000	3099	3297
第4染色体	3697	2302	3000	3000	3200	2800
第5染色体	3295	2704	3000	3000	3215	2785
第6染色体	3295	2704	3000	3000	3202	2798
第7染色体	3295	2704	3000	3000	3101	3304
第8染色体	3295	2704	3000	3000	3000	2500
第9染色体	3315	2684	3000	3000	3098	3297
第10染色体	3357	2642	3000	3000	2500	3798
第11染色体	3296	2704	3000	3000	3197	2803
第12染色体	3318	2681	3000	3000	3000	2500
第13染色体	3295	2704	3000	3000	2500	3810
第14染色体	3365	2634	3000	3000	3197	2803
第15染色体	3295	2704	3000	3000	3099	3299
第16染色体	2516	3483	3000	3000	3098	3297

(単位は bp)

表 H.1: Duan らにより推測された染色体の位置座標とゲノム位置の情報が記載された“1D-3D file” (<http://noble.gs.washington.edu/proj/yeast-architecture/sup.html>) のデータから1セグメントが3 kbpになるように、ビーズ座標を抽出した後の1セグメントの長さを示す。各染色体の両端に近いセグメント長は約3 kbpである。

付録I 遺伝子の染色体上での位置 (*URA3*, *HXK1*)

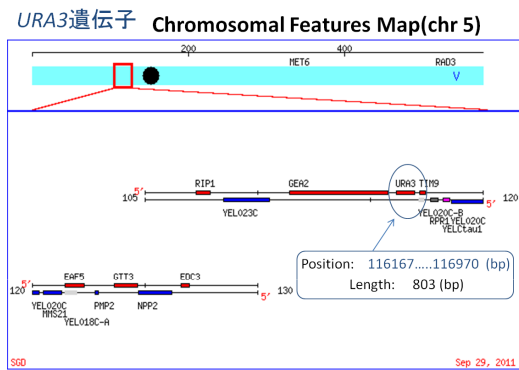


図 I.1: Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) より検索した *URA3* の染色体上での位置

*URA*遺伝子の核内配置

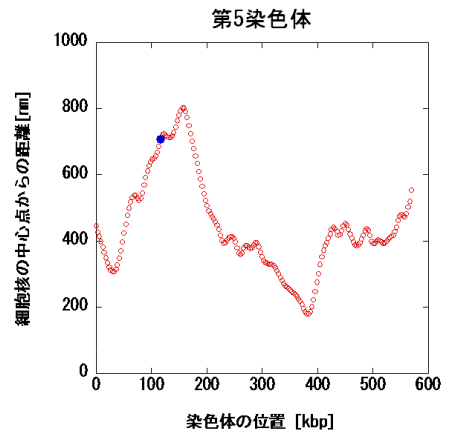


図 I.2: Duan らの構造データ (3) を基に調べた *URA3* の核内配置

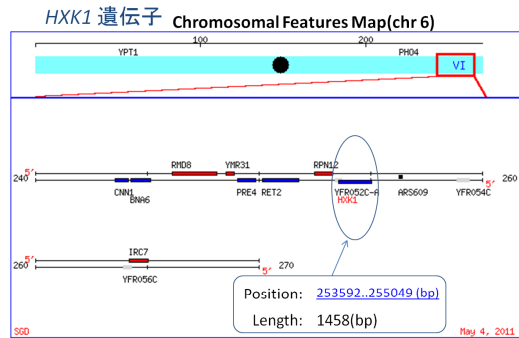


図 I.3: Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>) より検索した *HXK1* の染色体上での位置

HXK1 遺伝子の核内配置

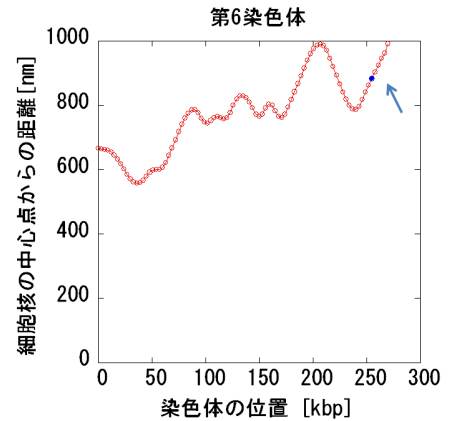


図 I.4: Duan らの構造データ (3) を基に調べた *HXK1* の核内配置

引用文献

- [1] Baker, M., 2011. Genomics: Genomes in three dimensions. *Nature* 470:289–294.
- [2] van Steensel, B., and J. Dekker, 2010. Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nat Biotechnol* 28:1089–1095.
- [3] Duan, Z., M. Andronescu, K. Schutz, S. McIlwain, Y. J. Kim, C. Lee, J. Shendure, S. Fields, C. A. Blau, and W. S. Noble, 2010. A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature* 465:363–367.
- [4] Tanizawa, H., O. Iwasaki, A. Tanaka, J. R. Capizzi, P. Wickramasinghe, M. Lee, Z. Fu, and K. ichi Noma, 2010. Mapping of long-range associations throughout the fission yeast genome reveals global genome organization linked to transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 38:8164–8177.
- [5] Osborne, C. S., L. Chakalova, K. E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J. A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser, 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 36:1065–1071.
- [6] Sutherland, H., and W. A. Bickmore, 2009. Transcription factories: gene expression in unions? *Nat Rev Genet* 10:457–466.
- [7] Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker, and N. Kleckner, 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* 295:1306–1311.
- [8] Tolhuis, B., R. J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld, and W. de Laat, 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* 10:1453–1465.
- [9] Bondarenko, V. A., Y. I. Jiang, and V. M. Studitsky, 2003. Rationally designed insulator-like elements can block enhancer action in vitro. *EMBO J* 22:4728–4737.
- [10] Ameres, S. L., L. Drupeppel, K. Pfeleiderer, A. Schmidt, W. Hillen, and C. Berens, 2005. Inducible DNA-loop formation blocks transcriptional activation by an SV40 enhancer. *EMBO J* 24:358–367.
- [11] Heun, P., T. Laroche, K. Shimada, P. Furrer, and S. M. Gasser, 2001. Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus. *Science* 294:2181–2186.

- [12] Gasser, S. M., 2002. Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* 296:1412–1416.
- [13] Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, 2008. *Molecular Biology of The Cell* (Fifth Edition). Garland Science.
- [14] Geyer, P. K., and I. Clark, 2002. Protecting against promiscuity: the regulatory role of insulators. *Cell Mol Life Sci* 59:2112–2127.
- [15] West, A. G., M. Gaszner, and G. Felsenfeld, 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev* 16:271–288.
- [16] Wallace, J. A., and G. Felsenfeld, 2007. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev* 17:400–407.
- [17] Bushey, A. M., E. R. Dorman, and V. G. Corces, 2008. Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell* 32:1–9.
- [18] Raab, J. R., and R. T. Kamakaka, 2010. Insulators and promoters: closer than we think. *Nat Rev Genet* 11:439–446.
- [19] Valenzuela, L., and R. T. Kamakaka, 2006. Chromatin insulators. *Annu Rev Genet* 40:107–138.
- [20] Gaszner, M., and G. Felsenfeld, 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7:703–713.
- [21] Geyer, P. K., 1997. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7:242–248.
- [22] Zhao, H., and A. Dean, 2004. An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucleic Acids Res* 32:4903–4919.
- [23] Corces, V. G., 1995. Chromatin insulators. Keeping enhancers under control. *Nature* 376:462–463.
- [24] Cai, H. N., and P. Shen, 2001. Effects of cis arrangement of chromatin insulators on enhancer-blocking activity. *Science* 291:493–495.
- [25] Muravyova, E., A. Golovnin, E. Gracheva, A. Parshikov, T. Belenkaya, V. Pirrotta, and P. Georgiev, 2001. Loss of insulator activity by paired Su(Hw) chromatin insulators. *Science* 291:495–498.
- [26] Majumder, P., and H. N. Cai, 2003. The functional analysis of insulator interactions in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5223–5228.

- [27] Hou, C., H. Zhao, K. Tanimoto, and A. Dean, 2008. CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20398–20403.
- [28] Maksimenko, O., A. Golovnin, and P. Georgiev, 2008. Enhancer-promoter communication is regulated by insulator pairing in a *Drosophila* model bigenic locus. *Mol Cell Biol* 28:5469–5477.
- [29] Krivega, M., and A. Dean, 2011. Insulators organize chromatin: emerging rules of the game. *Mol Cell* 44:1–2.
- [30] Allison, S. A., 1986. Brownian dynamics simulation of wormlike chains. Fluorescence depolarization and depolarized light scattering. *Macromolecules* 90:118–124.
- [31] Allison, A.-R. . H. M., S., 1989. Bending and twisting dynamics of short linear DNAs. Analysis of the triplet anisotropy decay of a 209 base pair fragment by Brownian simulation. *J. Chem. Phys.* 90:3843–3854.
- [32] Chirico, G., and J. Langowski, 1996. Brownian dynamics simulations of supercoiled DNA with bent sequences. *Biophys J* 71:955–971.
- [33] Huang, J., T. Schlick, and A. Vologodskii, 2001. Dynamics of site juxtaposition in supercoiled DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:968–973.
- [34] Hagerman, P. J., 1988. Flexibility of DNA. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 17:265–286.
- [35] Liu, Z., and H. S. Chan, 2008. Efficient chain moves for Monte Carlo simulations of a wormlike DNA model: Excluded volume, supercoils, site juxtapositions, knots, and comparisons with random-flight and lattice models. *The Journal of Chemical Physics* 128:145104–145131.
- [36] Vologodskii, A., and N. Cozzarelli, 1995. Modeling of Long-Range Electrostatic Interactions in DNA. *Biopolymers* 35:289–296.
- [37] Jian, H., and A. V. Vologodskii, 1997. A Combined Wormlike-Chain and Bead Model for Dynamic Simulations of Long Linear DNA. *Journal of Computational Physics* 136:168–179.
- [38] Su, W., S. Porter, S. Kustu, and H. Echols, 1990. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5504–5508.
- [39] Rippe, K., P. H. von Hippel, and J. Langowski, 1995. Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription. *Trends Biochem Sci* 20:500–506.

- [40] Tolhuis, B., R. J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld, and W. de Laat, 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* 10:1453–1465.
- [41] Jen-Jacobson, L., 1997. Protein-DNA recognition complexes: conservation of structure and binding energy in the transition state. *Biopolymers* 44:153–180.
- [42] Leach, A. R., 2001. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Prentice Hall.
- [43] Savelyev, A., and G. A. Papoian, 2007. Inter-DNA electrostatics from explicit solvent molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* 129:6060–6061.
- [44] Minton, A. P., 2001. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem* 276:10577–10580.
- [45] Liu, Z., R. W. Deibler, H. S. Chan, and L. Zechiedrich, 2009. The why and how of DNA unlinking. *Nucleic Acids Res* 37:661–671.
- [46] Maeshima, K., S. Hihara, and M. Eltsov, 2010. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol* 22:291–297.
- [47] Simonis, M., P. Klous, E. Splinter, Y. Moshkin, R. Willemsen, E. de Wit, B. van Steensel, and W. de Laat, 2006. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet* 38:1348–1354.
- [48] Zhao, Z., G. Tavoosidana, M. Sjölander, A. Göndör, P. Mariano, S. Wang, C. Kanduri, M. Lezcano, K. S. Sandhu, U. Singh, V. Pant, V. Tiwari, S. Kurukuti, and R. Ohlsson, 2006. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38:1341–1347.
- [49] Lieberman-Aiden, E., N. L. van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragozy, A. Telling, I. Amit, B. R. Lajoie, P. J. Sabo, M. O. Dorschner, R. Sandstrom, B. Bernstein, M. A. Bender, M. Groudine, A. Gnirke, J. Stamatoyannopoulos, L. A. Mirny, E. S. Lander, and J. Dekker, 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326:289–293.
- [50] Misteli, T., 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128:787–800.
- [51] Dillon, N., 2008. The impact of gene location in the nucleus on transcriptional regulation. *Dev Cell* 15:182–186.

- [52] Miele, A., and J. Dekker, 2008. Long-range chromosomal interactions and gene regulation. *Mol Biosyst* 4:1046–1057.
- [53] Nolis, I. K., D. J. McKay, E. Mantouvalou, S. Lomvardas, M. Merika, and D. Thanos, 2009. Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20222–20227.
- [54] Martin, S., and A. Pombo, 2003. Transcription factories: quantitative studies of nanostructures in the mammalian nucleus. *Chromosome Res* 11:461–470.
- [55] Cremer, T., and M. Cremer, 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003889.
- [56] Chakalova, L., E. Debrand, J. A. Mitchell, C. S. Osborne, and P. Fraser, 2005. Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet* 6:669–677.
- [57] Lanctôt, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, and T. Cremer, 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8:104–115.
- [58] Hediger, F., F. R. Neumann, G. V. Houwe, K. Dubrana, and S. M. Gasser, 2002. Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. *Curr Biol* 12:2076–2089.
- [59] Marshall, W. F., A. Straight, J. F. Marko, J. Swedlow, A. Dernburg, A. Belmont, A. W. Murray, D. A. Agard, and J. W. Sedat, 1997. Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. *Curr Biol* 7:930–939.
- [60] Rosa, A., N. B. Becker, and R. Everaers, 2010. Looping probabilities in model interphase chromosomes. *Biophys J* 98:2410–2419.
- [61] Mirny, L. A., 2011. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res* 19:37–51.
- [62] Berger, A. B., G. G. Cabal, E. Fabre, T. Duong, H. Buc, U. Nehrass, J.-C. Olivo-Marin, O. Gadal, and C. Zimmer, 2008. High-resolution statistical mapping reveals gene territories in live yeast. *Nat Methods* 5:1031–1037.
- [63] Schober, H., V. Kalck, M. A. Vega-Palas, G. V. Houwe, D. Sage, M. Unser, M. R. Gartenberg, and S. M. Gasser, 2008. Controlled exchange of chromosomal arms reveals principles driving telomere interactions in yeast. *Genome Res* 18:261–271.
- [64] Therizols, P., T. Duong, B. Dujon, C. Zimmer, and E. Fabre, 2010. Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2025–2030.

- [65] Mekhail, K., J. Seebacher, S. P. Gygi, and D. Moazed, 2008. Role for perinuclear chromosome tethering in maintenance of genome stability. *Nature* 456:667–670.
- [66] Taddei, A., H. Schober, and S. M. Gasser, 2010. The budding yeast nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000612.
- [67] Marti-Renom, M. A., and L. A. Mirny, 2011. Bridging the resolution gap in structural modeling of 3D genome organization. *PLoS Comput Biol* 7:e1002125.
- [68] Onuchic, J. N., and P. G. Wolynes, 2004. Theory of protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 14:70–75.
- [69] Taketomi, H., Y. Ueda, and N. Gō, 1975. Studies on protein folding, unfolding and fluctuations by computer simulation. I. The effect of specific amino acid sequence represented by specific inter-unit interactions. *Int J Pept Protein Res* 7:445–459.
- [70] Clementi, C., H. Nymeyer, and J. N. Onuchic, 2000. Topological and energetic factors: what determines the structural details of the transition state ensemble and "en-route" intermediates for protein folding? An investigation for small globular proteins. *J Mol Biol* 298:937–953.
- [71] Chubb, J. R., S. Boyle, P. Perry, and W. A. Bickmore, 2002. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr Biol* 12:439–445.
- [72] Bystricky, K., P. Heun, L. Gehlen, J. Langowski, and S. M. Gasser, 2004. Long-range compaction and flexibility of interphase chromatin in budding yeast analyzed by high-resolution imaging techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16495–16500.
- [73] Kremer, K., and G. S. Grest, 1990. Dynamics of entangled linear polymer melts: A molecular-dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* 92:5057–5086.
- [74] Rosa, A., and R. Everaers, 2008. Structure and dynamics of interphase chromosomes. *PLoS Comput Biol* 4:e1000153.
- [75] Worcel, A., S. Strogatz, and D. Riley, 1981. Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:1461–1465.
- [76] Lankas, F., R. Lavery, and J. H. Maddocks, 2006. Kinking occurs during molecular dynamics simulations of small DNA minicircles. *Structure* 14:1527–1534.
- [77] Wiggins, P. A., R. Phillips, and P. C. Nelson, 2005. Exact theory of kinkable elastic polymers. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 71:021909.
- [78] Goldstein, R. A., Z. A. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes, 1992. Optimal protein-folding codes from spin-glass theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4918–4922.

- [79] Sasai, M., 1995. Conformation, energy, and folding ability of selected amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8438–8442.
- [80] Sasaki, T. N., H. Cetin, and M. Sasai, 2008. A coarse-grained Langevin molecular dynamics approach to de novo protein structure prediction. *Biochem Biophys Res Commun* 369:500–506.
- [81] Taddei, A., G. V. Houwe, S. Nagai, I. Erb, E. van Nimwegen, and S. M. Gasser, 2009. The functional importance of telomere clustering: global changes in gene expression result from SIR factor dispersion. *Genome Res* 19:611–625.
- [82] Taddei, A., G. V. Houwe, F. Hediger, V. Kalck, F. Cubizolles, H. Schober, and S. M. Gasser, 2006. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* 441:774–778.
- [83] Hediger, F., A.-S. Berthiau, G. van Houwe, E. Gilson, and S. M. Gasser, 2006. Subtelomeric factors antagonize telomere anchoring and Tel1-independent telomere length regulation. *EMBO J* 25:857–867.
- [84] Mondoux, M. A., and V. A. Zakian, 2006. Telomeres. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [85] Bystricky, K., T. Laroche, G. van Houwe, M. Blaszczyk, and S. M. Gasser, 2005. Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. *J Cell Biol* 168:375–387.
- [86] Therizols, P., T. Duong, B. Dujon, C. Zimmer, and E. Fabre, 2010. Chromosome arm length and nuclear constraints determine the dynamic relationship of yeast subtelomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2025–2030.
- [87] Andrulis, E. D., A. M. Neiman, D. C. Zappulla, and R. Sternglanz, 1998. Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* 394:592–595.
- [88] Ishii, K., G. Arib, C. Lin, G. V. Houwe, and U. K. Laemmli, 2002. Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* 109:551–562.
- [89] Therizols, P., C. Fairhead, G. G. Cabal, A. Genovesio, J.-C. Olivo-Marin, B. Dujon, and E. Fabre, 2006. Telomere tethering at the nuclear periphery is essential for efficient DNA double strand break repair in subtelomeric region. *J Cell Biol* 172:189–199.
- [90] Lisby, M., U. H. Mortensen, and R. Rothstein, 2003. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* 5:572–577.

- [91] Aten, J. A., J. Stap, P. M. Krawczyk, C. H. van Oven, R. A. Hoebe, J. Essers, and R. Kanaar, 2004. Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303:92–95.
- [92] Neumaier, T., J. Swenson, C. Pham, A. Polyzos, A. T. Lo, P. Yang, J. Dyball, A. Asaithamby, D. J. Chen, M. J. Bissell, S. Thalhammer, and S. V. Costes, 2012. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:443–448.
- [93] Stein, L. D., 2004. Human genome: end of the beginning. *Nature* 431:915–916.
- [94] Database, S. G. <http://www.yeastgenome.org/> .
- [95] Strouboulis, J., N. Dillon, and F. Grosveld, 1992. Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev* 6:1857–1864.
- [96] Dillon, N., T. Trimborn, J. Strouboulis, P. Fraser, and F. Grosveld, 1997. The effect of distance on long-range chromatin interactions. *Mol Cell* 1:131–139.
- [97] Palstra, R.-J., B. Tolhuis, E. Splinter, R. Nijmeijer, F. Grosveld, and W. de Laat, 2003. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet* 35:190–194.
- [98] Phillips, J. E., and V. G. Corces, 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137:1194–1211.
- [99] Chung, J. H., M. Whiteley, and G. Felsenfeld, 1993. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74:505–514.
- [100] Chung, J. H., A. C. Bell, and G. Felsenfeld, 1997. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:575–580.
- [101] Recillas-Targa, F., A. C. Bell, and G. Felsenfeld, 1999. Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14354–14359.
- [102] Farrell, C. M., A. G. West, and G. Felsenfeld, 2002. Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci. *Mol Cell Biol* 22:3820–3831.
- [103] Soutoglou, E., and T. Misteli, 2007. Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability. *Curr Opin Genet Dev* 17:435–442.
- [104] Ebrahimi, H., and A. D. Donaldson, 2008. Release of yeast telomeres from the nuclear periphery is triggered by replication and maintained by suppression of Ku-mediated anchoring. *Genes Dev* 22:3363–3374.

- [105] Bedoyan, J. K., S. Lejnine, V. L. Makarov, and J. P. Langmore, 1996. Condensation of rat telomere-specific nucleosomal arrays containing unusually short DNA repeats and histone H1. *J Biol Chem* 271:18485–18493.
- [106] Press, W. H., B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, and W. T. Vetterling, 1993. Numerical Recipes in C .
- [107] Cui, Y., and C. Bustamante, 2000. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:127–132.
- [108] Ringrose, L., S. Chabanis, P. O. Angrand, C. Woodroffe, and A. F. Stewart, 1999. Quantitative comparison of DNA looping in vitro and in vivo: chromatin increases effective DNA flexibility at short distances. *EMBO J* 18:6630–6641.
- [109] Heun, P., T. Laroche, M. K. Raghuraman, and S. M. Gasser, 2001. The positioning and dynamics of origins of replication in the budding yeast nucleus. *J Cell Biol* 152:385–400.
- [110] Petes, T. D., 1979. Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:410–414.
- [111] Guacci, V., E. Hogan, and D. Koshland, 1994. Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125:517–530.
- [112] Venema, J., and D. Tollervy, 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33:261–311.
- [113] Molenaar, I., W. W. S. Smitt, T. H. Rozijn, and G. J. Tonino, 1970. Biochemical and electron microscopic study of isolated yeast nuclei. *Exp Cell Res* 60:148–156.
- [114] Yang, C. H., E. J. Lambie, J. Hardin, J. Craft, and M. Snyder, 1989. Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma* 98:123–128.
- [115] Jin, Q. W., J. Fuchs, and J. Loidl, 2000. Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J Cell Sci* 113:1903–1912.
- [116] Guacci, V., E. Hogan, and D. Koshland, 1997. Centromere position in budding yeast: evidence for anaphase A. *Mol Biol Cell* 8:957–972.
- [117] Perrod, S., and S. M. Gasser, 2003. Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences. *Cell Mol Life Sci* 60:2303–2318.
- [118] Bussey, H., D. B. Kaback, W. Zhong, D. T. Vo, M. W. Clark, N. Fortin, J. Hall, B. F. Ouellette, T. Keng, and A. B. Barton, 1995. The nucleotide sequence of chromosome I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3809–3813.

- [119] Feldmann, H., M. Aigle, G. Aljinovic, B. André, M. C. Baclet, C. Barthe, A. Baur, A. M. Bécam, N. Biteau, and E. Boles, 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J* 13:5795–5809.
- [120] Oliver, S. G., Q. J. van der Aart, M. L. Agostoni-Carbone, M. Aigle, L. Alberghina, D. Alexandraki, G. Antoine, R. Anwar, J. P. Ballesta, and P. Benit, 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357:38–46.
- [121] Jacq, C., J. Alt-Mörbe, B. Andre, W. Arnold, A. Bahr, J. P. Ballesta, M. BARGUES, L. Baron, A. Becker, N. Biteau, H. Blöcker, C. Blugeon, J. Boskovic, P. Brandt, M. Brückner, M. J. Buitrago, F. Coster, T. Delaveau, F. del Rey, B. Dujon, L. G. Eide, J. M. Garcia-Cantalejo, A. Goffeau, A. Gomez-Peris, and P. Zaccaria, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IV. *Nature* 387:75–78.
- [122] Dietrich, F. S., J. Mulligan, K. Hennessy, M. A. Yelton, E. Allen, R. Araujo, E. Aviles, A. Berno, T. Brennan, J. Carpenter, E. Chen, J. M. Cherry, E. Chung, M. Duncan, E. Guzman, G. Hartzell, S. Hunicke-Smith, R. W. Hyman, A. Kayser, C. Komp, D. Lashkari, H. Lew, D. Lin, D. Mosedale, and R. W. Davis, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome V. *Nature* 387:78–81.
- [123] Murakami, Y., M. Naitou, H. Hagiwara, T. Shibata, M. Ozawa, S. Sasanuma, M. Sasanuma, Y. Tsuchiya, E. Soeda, and K. Yokoyama, 1995. Analysis of the nucleotide sequence of chromosome VI from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 10:261–268.
- [124] Tettelin, H., M. L. A. Carbone, K. Albermann, M. Albers, J. Arroyo, U. Backes, T. Barreiros, I. Bertani, A. J. Bjourson, M. Brückner, C. V. Bruschi, G. Carignani, L. Castagnoli, E. Cerdan, M. L. Clemente, A. Coblenz, M. Coglievina, E. Coissac, E. Defoor, S. D. Bino, H. Delius, D. Delneri, P. de Wergifosse, B. Dujon, and K. Kleine, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. *Nature* 387:81–84.
- [125] Johnston, M., S. Andrews, R. Brinkman, J. Cooper, H. Ding, J. Dover, Z. Du, A. Favello, L. Fulton, and S. Gattung, 1994. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII. *Science* 265:2077–2082.
- [126] Churcher, C., S. Bowman, K. Badcock, A. Bankier, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, K. Devlin, S. Gentles, N. Hamlin, D. Harris, T. Horsnell, S. Hunt, K. Jagels, M. Jones, G. Lye, S. Moule, C. Odell, D. Pearson, M. Rajandream, P. Rice, N. Rowley, J. Skelton, V. Smith, and B. Barrell, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IX. *Nature* 387:84–87.
- [127] Galibert, F., D. Alexandraki, A. Baur, E. Boles, N. Chalwatzis, J. C. Chuat, F. Coster, C. Cziepluch, M. D. Haan, H. Domdey, P. Durand, K. D. Entian, M. Gatius, A. Goffeau, L. A. Grivell, A. Hennemann, C. J. Herbert, K. Heumann,

- F. Hilger, C. P. Hollenberg, M. E. Huang, C. Jacq, J. C. Jauniaux, C. Katsoulou, and L. Karpfinger-Hartl, 1996. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *EMBO J* 15:2031–2049.
- [128] Dujon, B., D. Alexandraki, B. André, W. Ansorge, V. Baladron, J. P. Ballesta, A. Banrevi, P. A. Bolle, M. Bolotin-Fukuhara, and P. Bossier, 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* 369:371–378.
- [129] Johnston, M., L. Hillier, L. Riles, K. Albermann, B. André, W. Ansorge, V. Benes, M. Brückner, H. Delius, E. Dubois, A. Düsterhöft, K. D. Entian, M. Floeth, A. Goffeau, U. Hebling, K. Heumann, D. Heuss-Neitzel, H. Hilbert, F. Hilger, K. Kleine, P. Kötter, E. J. Louis, F. Messenguy, H. W. Mewes, and J. D. Hoheisel, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature* 387:87–90.
- [130] Bowman, S., C. Churcher, K. Badcock, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, K. Dedman, K. Devlin, S. Gentles, N. Hamlin, S. Hunt, K. Jagels, G. Lye, S. Moule, C. Odell, D. Pearson, M. Rajandream, P. Rice, J. Skelton, S. Walsh, S. Whitehead, and B. Barrell, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XIII. *Nature* 387:90–93.
- [131] Philippsen, P., K. Kleine, R. Pöhlmann, A. Düsterhöft, K. Hamberg, J. H. Hege-
mann, B. Obermaier, L. A. Urrestarazu, R. Aert, K. Albermann, R. Altmann, B. André, V. Baladron, J. P. Ballesta, A. M. Bécam, J. Beinhauer, J. Boskovic, M. J. Buitrago, F. Bussereau, F. Coster, M. Crouzet, M. D’Angelo, F. D. Pero, A. D. Antoni, and J. Hani, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XIV and its evolutionary implications. *Nature* 387:93–98.
- [132] Dujon, B., K. Albermann, M. Aldea, D. Alexandraki, W. Ansorge, J. Arino, V. Benes, C. Bohn, M. Bolotin-Fukuhara, R. Bordonné, J. Boyer, A. Camasses, A. Casamayor, C. Casas, G. Chéret, C. Cziepluch, B. Daignan-Fornier, D. V. Dang, M. de Haan, H. Delius, P. Durand, C. Fairhead, H. Feldmann, L. Gail-
lon, and K. Kleine, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Nature* 387:98–102.
- [133] Bussey, H., R. K. Storms, A. Ahmed, K. Albermann, E. Allen, W. Ansorge, R. Araujo, A. Aparicio, B. Barrell, K. Badcock, V. Benes, D. Botstein, S. Bow-
man, M. Brückner, J. Carpenter, J. M. Cherry, E. Chung, C. Churcher, F. Coster, K. Davis, R. W. Davis, F. S. Dietrich, H. Delius, T. DiPaolo, and J. Hani, 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. *Nature* 387:103–105.