

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14661

研究課題名(和文) 蛍光1分子追跡の超解像化による核内タンパク質の液相分離挙動解析の実現

研究課題名(英文) Super-resolved single-molecule imaging of nuclear proteins for quantification of phase separated behavior

研究代表者

伊藤 由馬 (Ito, Yuma)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70803245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高解像度の生細胞1分子追跡法を確立することにより、核内タンパク質の相分離挙動を、生きた細胞内で直接定量することを可能にした。本手法を用いた核内タンパク質動態の定量解析から、リボソーム生合成に依存した核小体内の分子挙動や、ヘテロクロマチンタンパク質のヘテロクロマチン領域とは独立したクロマチンとの相互作用のような、これまで測定が困難であった生細胞内の粘弾性挙動について新たな定量的知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の相分離は様々な生物学的機能に関わる極めて重要な性質と考えられているが、その動態解析にはタンパク質の抽出精製等による試験管内での実験が一般的であった。本研究の高精細な1分子イメージング技術開発により、生きた細胞の小器官内で直接相分離挙動を定量解析することが可能になった。本研究の技術は、今まで未知であった生細胞内における生体分子の相分離動態の解明にむけて、強力な手法になると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established a method for high-resolution single-molecule imaging in living cell. This method enables us to quantify directly the phase separated behavior of nuclear proteins. We demonstrated the analysis of ribosome biogenesis dependent behavior of nucleolar proteins and chromocenter independent behavior of heterochromatin proteins. These results suggest that this method provides new quantitative insights into viscoelastic dynamics of nuclear proteins in the living cell that are difficult to achieve using previous approaches.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測 生細胞イメージング 相分離 細胞核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生細胞 1 分子イメージングは、生体分子の挙動を直接細胞内で追跡し解析することで、その動態を定量的に理解することが出来る強力な手段である (図 1)。申請者はこれまで生細胞 1 分子イメージングの開発研究を行ってきた。特に 1 分子イメージングに特化した観察法 (Ito Y et al, Anal Sci, 2014) や、1 分子輝点追跡の新たな解析法 (Ito Y et al, Sci Rep, 2017) を開発してきた。蛍光 1 分子の輝点追跡により、生体分子の機能を理解する上で重要な、拡散係数、結合解離定数、分子の個数、ナノメートル精度の局在などの情報を生きた細胞内で直接定量可能である。さらに、近年の多彩な蛍光物質の開発や局在化顕微鏡 (PALM/STORM 法) 等の画像撮影解析技術の発展に伴い、今まで観察できなかったナノメートルスケールの微細な分子動態を捕らえることも可能になってきた。一方で、細胞内の分子動態について近年、液 - 液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation) という性質が急速に注目されはじめている。これは、核小体のように膜で囲われていない細胞内器官は、水と油のような液性の違いによって分離するという性質であり、核小体 (Feric M. et al. Cell 2016)、ストレス顆粒 (Jain S. et al. Cell 2016)、ヘテロクロマチン (Strom AR. et al. Nature 2017) 等に相分離の性質 (液滴融合や粘弾性) があることが見出されている。このように、生細胞 1 分子イメージングで得られる生体分子の動態情報をタンパク質間の結合解離で説明することはもはや十分でなく、分子が存在する液相の粘弾的性質を含めた動態の定量解析が急務である。

相分離の重要性に関わらず、細胞内でその粘弾性特性を定量することは極めて難しく、現在は精製したタンパク質や細胞抽出液を用いた液滴の融合実験やマイクロレオロジーによる粘弾性計測が主流であるが (Feric M. et al. Cell 2016) *in vitro* で細胞内の複雑な環境を再現するには限界があり、生細胞内でそのような計測を行うことは困難である。したがって、生細胞 1 分子追跡の利点を生かしつつ、細胞内で直接タンパク質の粘弾性挙動を定量する新たな手法の確立が強く望まれる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、最新の高輝度蛍光色素を用いた 1 分子イメージングと局在化超解像顕微鏡技術を用いた高解像度の生細胞 1 分子追跡法を確立し、核内タンパク質が存在する異なる液相の粘弾性挙動を、生きた細胞内で直接定量することを目的とした。これにより、蛍光 1 分子追跡による細胞内液相の物性定量という新たな手法を開発できるとともに、得られる粘弾性性質は細胞内の相分離研究において生物学的にも重要な情報となると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 高解像度で 1 分子輝点追跡するために、高輝度蛍光色素で核内タンパク質を標識した安定発現細胞株を構築する。その際、Janelia Fluor 等の高輝度蛍光色素と、HaloTag 等のタンパク質タグの組み合わせを検討するために、細胞核内において結合状態で存在するヒストンタンパク質をタグと融合して安定発現させた培養細胞を作製する。蛍光色素の輝度安定性、退色特性を現有の 1 分子観察顕微鏡を本研究に最適化して測定し検証する。高輝度蛍光色素の特性と超解像技術を活用した 1 分子追跡を行うために、撮影画像に対して局在化超解像技術を適用し、輝点中心の検出、ノイズ除去、位置精度の算出、軌跡追跡において、その追跡精度を検証する。粘弾性挙動解析は、核内タンパク質の 1 分子軌跡から得られる平均二乗変位 (Mean Square Displacement, MSD) を対数スケールで解析し、粘性・弾性のパラメータを得る。これらの情報を *in vitro* 実験等で報告された数値と比較検討する。

(2) 細胞核内のタンパク質動態の定量には、相分離の性質が報告されている核小体や

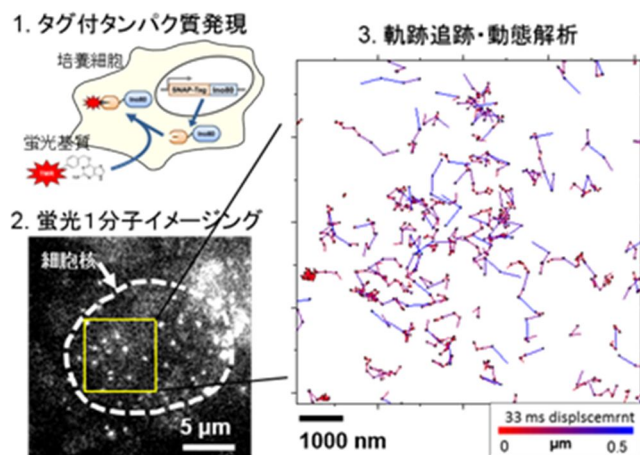


図 1. 標的タンパク質に結合した蛍光 1 分子の追跡により生体分子の挙動を生きた細胞内で直接定量できる

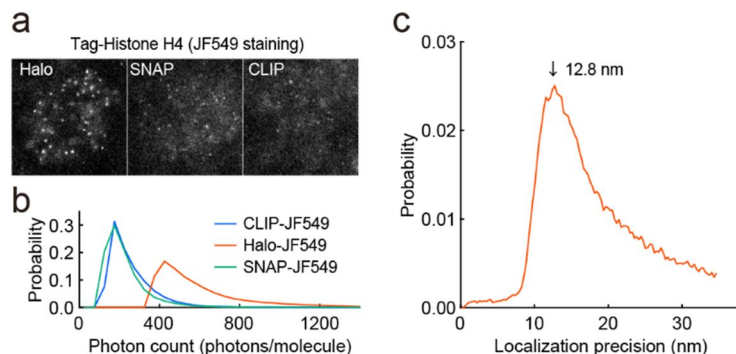


図 2. 核内 1 分子蛍光と位置検出精度
各タグを融合したヒストン発現 HeLa 細胞の核内 1 分子蛍光画像(a) および 1 分子当たりの光子数(b)、Halo タグ染色時の 1 分子中心位置精度(c)

ヘテロクロマチンの構成タンパク質を用いる。核小体では Nucleophosmin (NPM1) や Fibrillarin (FBL)、ヘテロクロマチンでは Heterochromatin Protein 1a (HP1a) の N または C 末端配列に Tag タンパク質を融合し、培養細胞に導入後薬剤セレクションにより安定発現株を構築する。薄層斜光照明により細胞核を照明し、高シグナルノイズ比の 1 分子イメージングを行い、1 分

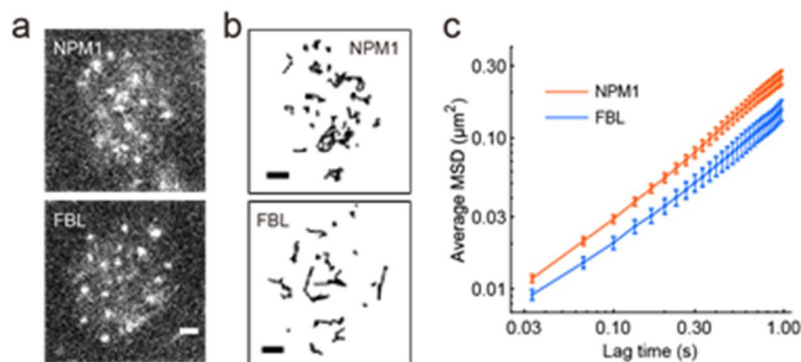


図3. 核小体タンパク質の1分子イメージングと相分離動態の定量解析
HeLa 細胞の核内における、核小体タンパク質の1分子イメージング蛍光像(a)と1分子軌跡(b)。スケールバー 1 μm。生細胞内の微小な構造内における粘性挙動の定量解析(c)が可能になった。

子軌跡から得られた粘性の定量情報を *in vitro* 実験等で報告された粘性係数等と比較して、細胞内に特有の相分離動態を調べる。次に、薬剤阻害や変異体タンパク質などにおける粘性の変化を定量し、それらの相分離に対する影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 高精細な 1 分子イメージングを実現するために、複数候補の高輝度蛍光色素の NHS-ester と、Halo, SNAP, CLIP タグ基質から蛍光リガンドを作製し、各タグを融合したヒストンタンパク質を定常発現する HeLa 細胞を用いて、生細胞内で蛍光 1 分子の特性を測定したところ、同じ色素でもタグの組み合わせによって、1 分子レベルで蛍光強度が異なることが分かった(図 2)。超解像局在化解析の手法を用いて位置検出精度を算出したところ、約 13 nm の位置精度で軌跡追跡できることが確認できた。

(2) 相分離の性質が報告されているタンパク質として、核小体の最外層である granular component に存在する NPM1 と、その内側である dense fibrillar component に存在する FBL にそれぞれタグタンパク質を融合し、HeLa 細胞内で 1 分子イメージングを行った。軌跡追跡による定量解析の結果、NPM1 は単純粘性に近い動態を示しており、その拡散係数及び α 値(異常拡散の指標)は、*in vitro* 実験で報告された値と良く一致した(図 3)。これにより、生細胞 1 分子イメージングを用いることで、タンパク質の抽出精製や、ビーズ導入等をすることなく、生きた細胞内で相分離特性の測定が可能になった。

(3) NPM1 および FBL の動態から得られた相分離の特性が、相分離の阻害や ATP 量の影響を受けるかを調べたところ、相分離阻害剤である 1,6-ヘキサンジオールによる影響は見られなかったが、ATP 枯渇により NPM1 の拡散係数には上昇傾向がみられた。これらの結果は高精細 1 分子イメージングを用いても未だばらつきが大きいことから、解析の自動化により計測数を増やして再現性を確認するとともに、細胞形状変化など軌跡追跡に影響を与える要因の検証を進めている。一方、相分離挙動が、核小体の主な機能であるリボソーム生合成と関連するかを調べるために、リボソーム関連タンパク質のノックダウン実験を行ったところ、NPM1 の拡散係数が増大した因子が複数見つかった。これらの結果より核小体の相分離挙動はリボソーム生合成に依存しており、その影響は内部の層によっても異なることが示唆された。

(4) ヘテロクロマチン内の相分離動態を調べるために、ヘテロクロマチンに存在する Heterochromatin Protein 1a (HP1a) にタグタンパク質を融合し、ヘテロクロマチンが chromocenter 構造を形成して観察が容易であるマウス NIH3T3 細胞に導入して、1 分子イメージングを行った。HP1a は、核内全体で自由に動く分子とクロマチンに結合して止まっている分子に顕著に分かれた。これらの動態とヘテロクロマチン領域との関係を調べるために、ヘキスト染色との 2 色同時観察で HP1a を追跡したところ、chromocenter 領域内外において同様に 2 種類の動態が見られた(図 4)。これらの結果は、HP1a の動態はヘテロクロマチン領域に依存した相分離挙動よりも、クロマチンとの個々の分子レベルでの結合が主要であることを示唆している。最近 HP1 様タンパク質はヌクレオソームと結合することで、クロマチンの相分離の性質を制御していると報告 (Sanulli S. et al. Nature 2019) されたことから、観察された動態は、HP1a のクロマチンとの相互作用を反映していると考えられる。以上のように高精細な生細胞 1 分子イメージングの開発により、相分離動態の直接解析が可能となり核内タンパク質の動態に新たな描像が得られた。

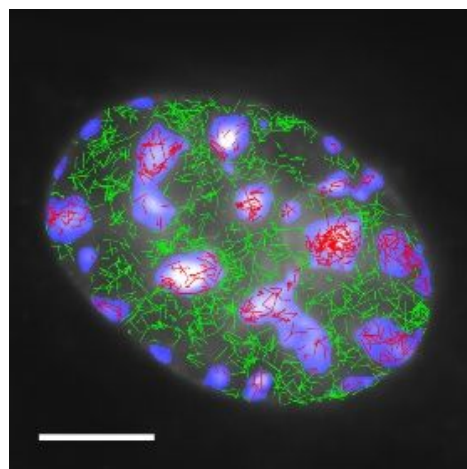


図4. マウス NIH3T3 細胞核内における HP1 の 1 分子動態。ヘテロクロマチン領域(青)の内(赤)、外(緑)において自由に動く動態と、結合した動態が同様に見られた。スケールバー 10 μm。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Lim Wei Ming, Ito Yuma, Sakata-Sogawa Kumiko, Tokunaga Makio	4. 巻 8
2. 論文標題 CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by regulating dynein localisation on the cell surface	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35593-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yuma, Akatsuki Kimura	4. 巻 12
2. 論文標題 Session 1SEA-physics of chromatin dynamics at the 57th Biophysical Society of Japan meeting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 265-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-020-00642-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤由馬
2. 発表標題 蛍光1分子イメージングにおける動態解析法の開発と核内タンパク質挙動の定量解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lim WM, Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M
2. 発表標題 CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by recruiting proteins to the plus-end tracking on the cell surface
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ito Y, Maeda T, Sakata-Sogawa K, Shiina M, Tokunaga M
2. 発表標題 Dimerization dependent single-molecule dynamics of MafG transcription factor in living cell
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maeda T, Ito Y, Isobe S, Obuse C, Tokunaga M
2. 発表標題 Dynamics of Heterochromatin protein 1 in living cells using single-molecule imaging
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato S, Ito Y, Sato Y, Kimura H, Tokunaga M
2. 発表標題 Single-molecule imaging of post-translational modification using genetically encoded antibody probe
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤由馬
2. 発表標題 超解像1分子イメージングを用いたクロマチンタンパク質の動態と局在の定量解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sirisukhodom S, Matsumoto D, Ito Y, Saitoh N, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M
2. 発表標題 Single-molecule dynamics and localization of nucleolar proteins in phase-separated compartments of nucleolus
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeda T, Ito Y, Isobe S, Obuse C, Tokunaga M
2. 発表標題 Dynamics and localization of Heterochromatin protein 1 involved in phase separation using single-molecule and super-resolution imaging
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito Y, Kunimi S, Takahashi H, Tokunaga M
2. 発表標題 Molecular localization and dynamics of Mediator regulating transcription elongation using single-molecule and super-resolution microscopy
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito Y, Tokunaga M
2. 発表標題 A single-molecule localization approach for the interaction between transcriptional machinery and chromatin structure
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤由馬、徳永万喜洋	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 236
3. 書名 全反射照明蛍光顕微鏡 対物レンズ型 / 生きてるものは全部観る！イメージングの選び方・使い方100+	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----