

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16158

研究課題名(和文) 転写因子Nanogの新規機能が、Ground stateを誘導する

研究課題名(英文) Molecular dynamics of Nanog on its binding loci facilitates to induce ground state pluripotency

研究代表者

岡本 和子 (Okamoto, Kazuko)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：40710265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞などの未分化細胞において、その未分化性維持に重要だとされる転写因子群が知られている。特に転写因子Nanogは他の転写因子を伴い、未分化性維持に中心的に機能すると考えられている。これら転写因子の機能や、ゲノム上の結合領域などが明らかになる中、転写因子の詳細な核内動態は未知であった。これまで30余年にわたり使用されている1分子顕微鏡法のさらなる発展により、核内で動きまわる分子ひとつひとつの観察が可能になった。そこで、生きて動き回るNanogの実際の振る舞いの観察・計測を行った。本研究は、未分化・脱未分化状態での分子動態の差を計測し、分子動態と未分化維持機構の関係性の一端を明らかにしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1分子顕微鏡法は、いまや生細胞核内での観察も可能となり、核中で動き回るタンパク質の1分子動態も実測可能である。そこで、未分化維持に重要な転写因子Nanogの核内での振る舞いを実測した。Nanogの結合領域での振る舞いを可視化し、未分化・脱未分化状態での振る舞いの差を定量解析した。特に結合領域での滞在時間に着目し、脱未分化状態での振る舞いに着目した。本研究は、脱未分化状態時に、未分化維持機構を増強するNanog分子の振る舞いを明らかにし、未分化維持機構の一端を分子の振る舞いから説明するものである。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem (ES) cells are pluripotent stem cells, and their pluripotency is controlled by various types of transcription factors. One of such transcription factors, Nanog is known that it centrally controlled in the maintenance of pluripotency in association with other transcription factors. Recently single molecular microscopy has been greatly progressed to observe single molecular inside a living nucleus. Then we observed single molecular behavior of Nanog in nuclei of living ES cells. We observed and measured the molecular dynamics of Nanog both in pluripotent ES cells and differentiating ES cells. We found the difference of molecular dynamics of Nanog between pluripotent and differentiating cellular conditions. The difference should connect the molecular system to maintain pluripotency. Our data can explain Nanog's function by the single molecular behavior.

研究分野：細胞生物学

キーワード：1分子計測 転写因子 Nanog

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景(Background at the beginning of the Research)

ES細胞の未分化性維持機構の中で、もっとも高い未分化性だと考えられている Ground state そのものの細胞状態や、Ground state への誘導方法を探る膨大な数の研究がなされてきた。特に転写因子 Nanog は、Ground state への誘導や維持を司る働きをすることが期待され、その機能や動態は多くの研究課題の対象となっていた。これら多くの研究課題を踏まえ、未踏の領域が、分子動態であった。転写因子の時空間挙動を可視化・定量解析できる1分子計測技術を用いて、Ground state という細胞状態へ到達する作用機序を Nanog の分子挙動から探ることを思いついた。

2. 研究の目的(Purpose of the Research)

Ground state を維持・誘導させる分子機能を Nanog 分子の核内動態より探る。特に Ground state とされる未分化細胞の特徴である、ほとんどヘテロクロマチンを持たないという核内構造に着目し、クロマチン動態との相関関係を探る。未分化細胞状態と、脱未分化細胞状態での Nanog 標的領域の空間的配置、標的領域における滞在時間に着目する。

3. 研究の方法(Research Methods)

1) 1分子計測法は、約30年に渡り、モータータンパク質の二足歩行の解明や、膜受容体タンパク質とリガンドの結合・解離定数の定量計測を可能にした顕微鏡法である。核内観察は、ごく近年になって可能となった。従来の1分子計測法は、主に *in vitro* で全反射顕微鏡法を採用していたため、核内の観察は不適とされていたが、HILO 顕微鏡 (Tokunaga et al., 2008) の開発によって、可能となった。そこで、この顕微鏡法を用いて、Nanog の核内分子動態を観察・定量計測することとした。転写因子 Nanog の遺伝子座に EGFP をノックインし、Nanog-EGFP を発現する細胞株を作出し、実験に使用することとした。解析方法は、Gebhardt et al., 2013 を参考にし、蛍光退色に影響を受けない滞在時間の計測法 (観察プロトコルと計算・統計処理) を準備した。

2) ES細胞の Ground state は 2i と呼ばれる阻害剤2種の添加によって誘導されることが知られている (Ying et al., 2008)。阻害剤2種と、培養環境において未分化性維持に必須とされる LIF を添加した +2iLIF 状態と LIF のみ添加した場合での、Nanog の標的領域での滞在時間の差の定量計測を行った。加えて LIF も除いた培養環境にし、自発的な分化が始まる脱未分化の細胞状態での定量計測に進んだ。

加えて、クロマチン動態との関係性の計測を行うため、ヘテロクロマチンをユークロマチン化することが知られている薬剤 Trichostatin A (Yoshida et al., 1995) を使用した。Ground state ではクロマチンは、ほぼユークロマチンの状態にあることが知られているが、脱未分化状態では分化の度合いに従って、ヘテロクロマチンが形成されていくことが知られている。そこで、脱未分化状態にあっても、クロマチン状態はユークロマチン状態をもつ細胞を用意し、上記の +2iLIF 状態と LIF のみ添加した場合との差を定量計測することとした。

Tokunaga et al., 2008. Nat Methods. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells.

Ying et al., 2008. Nature. The ground state of embryonic stem cell self-renewal.

Yoshida et al., 1995. BioEssays. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function.

4. 研究成果(Research results)

1) Nanog-EGFP の1分子計測法

3. 研究の方法で示した通り、HILO 顕微鏡法を用いた1分子計測を行った。ES細胞は比較的レーザーによるダメージを受けやすいことが知られているが、この点を踏まえた上で十分な1分子輝点のデータを取得可能なプロトコルを立ち上げた。(図1、Okamoto 2020) HILO 照明によって、生細胞核内であっても S/N よく輝点を撮影できることを示す (図1C)。

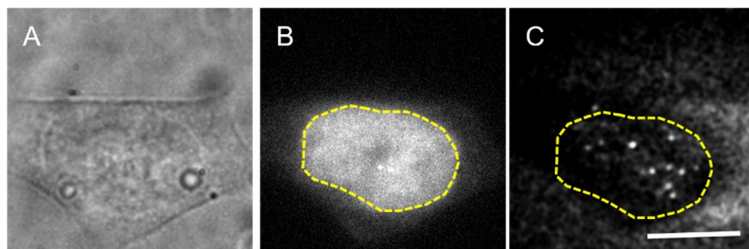


図1. A: 明視野, B: 落射照明, C: HILO 照明 スケールバー 10 μ m。

2) それぞれの細胞状態 (+LIF+2i, +LIF, -LIF) における Nanog の標的領域における解離定数 (滞在時間の逆数) 滞在時間は両未分化状態 (+LIF+2i, +LIF) および脱未分化状態 (-LIF) の細胞状態それぞれにおいて計測した。解離定数 K_{off} は未分化状態 (平均値 0.10、0.11)・脱未分化状態を比較すると、脱未分化状態のほうが (平均値 0.081) が、小さい。つまり脱未分化状態の方が、長期にわたり標的領域に滞在している。(図2)

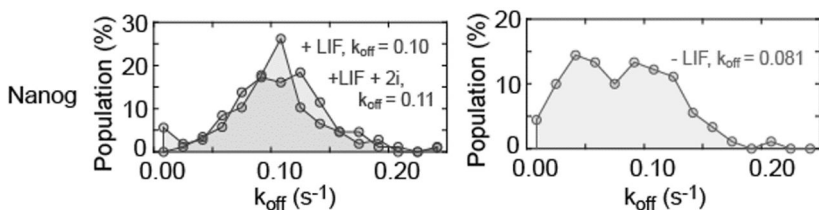


図2
左:未分化状態(+LIF+2i)
右:脱未分化状態(-LIF)

3)滞在時間の差をもたら

すもの

滞在時間の差をもたらす要因の探索を行い、クロマチン状態に着目した。3.研究の方法にて示した通り、クロマチン構造を変える試薬 TrichistatinA にて処理した細胞サンプルを用意し、2)と同様に K_{off} (滞在時間) の計測を行った。(図3)

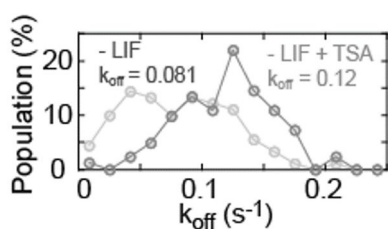


図3: TSA 処理した-LIF 条件の細胞を濃色、処理なし-LIF 細胞を淡色で示す。

TSA を添加した細胞の K_{off} は、未分化細胞状態のそれに近づき、数値が大きくなった。つまり滞在時間は短くなった。転写因子 Nanog の標的領域における滞在時間は、クロマチン構造とくに凝集の程度によって、調節されることが示唆される。

転写因子 Nanog は、脱未分化時に長期に標的配列に結合することで、下流の未分化維持関連遺伝子の転写を活性化することで、未分化方向への引き戻しを行っているのではないか、という示唆を得た。クロマチン構造は転写制御の大きな要因であるが、構造に由来し、滞在時間に差が生じることは未知であった。また Nanog としては、脱未分化時に分化方向に抗い、未分化性維持に寄与するメカニズムの一端を示せたかと考える。

加えて ES 細胞の核内 1 分子計測実験系を立ち上げたことにより、Nanog 以外の核タンパク質等の計測等も開始し、転写因子を含む核タンパク質の核内動態の時空間動態の定量計測に取り組んでいる。

Okamoto.2020. Biophysical Reviews. From a young BSJ member: advanced technologies encouraged me to dive into biophysics field.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kazuko Okamoto | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 From a young BSJ member: advanced technologies encouraged me to dive into biophysics field | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biophysical Reviews | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-020-00648-x | 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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡本和子, 岡田康志, 渡邊朋信 |
| 2. 発表標題 クロマチンのゆらぎと転写調節機構の関係性を転写因子1分子計測によって解析する |
| 3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学年会・第71回日本細胞生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡本 和子, 岡田 康志, 阿倍 訓也, 渡邊 朋信 |
| 2. 発表標題 転写因子の振る舞いとクロマチンのゆらぎの関係性を1分子計測によって解析する |
| 3. 学会等名 第57回生物物理学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡本 和子, 岡田 康志, 阿倍 訓也, 渡邊 朋信 |
| 2. 発表標題 転写因子の振る舞いとクロマチンのゆらぎの関係性を1分子計測によって解析する |
| 3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|