

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24118006

研究課題名（和文）生細胞核の複数種蛍光1分子イメージング定量解析による転写サイクルの機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms of transcription cycle using multi-color, single-molecule, quantitative fluorescence imaging of living cell nuclei.

研究代表者

十川 久美子（SAKATA-SOGAWA, Kumiko）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：20291073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 78,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生細胞1分子イメージング観察と定量解析により、転写サイクルの動態観察と転写に関わるタンパク質群の個々の振る舞いや相互作用を、時空間の関数として高精細に定量することを目的とした。独自に開発した薄層斜照明法を基に、1分子蛍光顕微鏡システムの最適化を行い、転写サイクルの複雑な時空間制御の解明を進めた。薄層斜照明法を用いた超解像イメージングにより、転写関連タンパク質について高精細な空間分布解析を行った。1分子軌跡追跡による時空間動態と結合解離の定量解析法を開発し、転写因子の結合解離や、リモデリング複合体構成タンパク質の核内構造との相互作用ダイナミクスの解析を進めた。

研究成果の概要（英文）：Transcription cycle consists of various protein factors, which interact in different ways depending on their stage in the cycle. Single-molecule approaches provide quantitative and high-resolution analysis, through capturing heterogeneous behavior of the protein factors.

By installing a single-molecule fluorescence microscope based on our original HILO illumination method, we analyzed the interaction of transcription factors and molecular dynamics of chromatin remodeling complex. Super-resolution imaging with HILO microscopy realized high-resolution analysis in the spatial distribution of transcription-related proteins. We further developed an image-analyzing method using single-molecule tracking approach. Combining this technique with three-color simultaneous single-molecule imaging, we quantified the dynamics and kinetics of molecules. This approach facilitates the spatiotemporal quantification of the dynamics and kinetics of interactions of protein factors in transcription cycle.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子イメージング 超解像イメージング 転写調節 遺伝子発現 生体分子

1. 研究開始当初の背景

これまでのイメージングによる転写機構研究では、FRAP による RNA ポリメラーゼの動態解析、新生 RNA のラベルによる転写の量的解析などにより 1 細胞レベルでの知見が得られてきている。しかし転写はダイナミックに変化するタンパク質複合体により、時空間的に制御されると考えられる。その解明には、平均値でなく、個々の分子・部位を直接生きた細胞で計測する 1 分子観察・定量解析法が適している。我々が新規開発した蛍光照明法（HILO: 薄層斜光照明法）により、生細胞核内での 1 分子観察が可能になった（引用文献 1）。1 分子観察・定量解析により滞在時間、拡散係数、結合数などの算出を通して核内タンパク質因子の挙動を明らかにしてきた。近年、アメリカ、ドイツ、フランスでも転写の 1 分子アプローチに注目が集まっており、1 分子観察による転写機構研究の発展が見込まれていた。我が国においても、生化学、構造解析、ゲノム情報、計算科学を含めた総合的アプローチにより強力に転写機構研究を進めることが必要であった。

<引用文献>

(1) Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa, K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. Nat Methods. 5, (2) 159-161 (2008)

2. 研究の目的

1 分子イメージング観察と定量解析を、転写サイクルの動態観察のために最適化する。開発した技術を駆使し、転写に関わるタンパク質群の個々の振る舞いや相互作用を、時空間の関数として高精細計量する。転写反応では RNA ポリメラーゼ、転写因子群の多くのタンパク質が複合体を形成し機能している。複合体は一定不変でなく、細胞刺激応答によりダイナミックに変化している。しかも、特定の時期に DNA の特定の場所に限定し段階的に起きる。複雑な時空間制御を適切に計測する方法が無いために未解明の点が多い。個々のタンパク質を直接観察計測できる 1 分子イメージング定量技術の特性を生かし、核内での転写サイクルの時空間制御解明に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 転写サイクル解析のために、独自開発技術である薄層斜光照明法による 1 分子イメージング顕微鏡システムを最適化し使用した。さらにこのシステムを超解像イメージングに適用し、高精細な空間分布解析を行った。

(2) 複数のタンパク質因子を同時に 1 分子イメージング解析するための、複数種タンパク質同時発現細胞系の構築法を開発した。この構築方法の特色は、細胞のゲノムに 1 コピーだけ発現させることと、プロモータ選択に

より、1 分子レベルでタンパク質発現が可能なことである。従来の一過性発現で問題になった過剰発現タンパク質による影響を避けることが可能という利点もある。さらに、蛍光タンパク質を発現させるだけでなく、抗体による蛍光標識法を組み合わせることにより複数色のリアルタイム 1 分子同時観察を進めることができた。

(3) 1 分子顕微鏡で得られた画像データの解析方法を開発した。輝度中心位置から、ナノメートルの高精細で分子位置決定し、その軌跡を追跡した。複数種蛍光タンパク質の画像解析により、タンパク質分子間の相互作用について空間動態と結合解離の定量解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 転写開始におけるヌクレオソームリモデリングの役割解明のために、INO80 複合体構成タンパク質について、1 分子イメージング解析と FRAP（光褪色後蛍光回復法）を組み合わせた解析を進めた。領域内の原田昌彦および連携研究者の木村宏との共同研究により、構成タンパク質である Ino80, Arp4, Arp8 の解析を進めた。HeLa 細胞で定常発現させた蛍光ラベル Ino80 について、輝度中心位置から、ナノメートルの高精細で分子位置決定し、その軌跡を追跡した。核内の Ino80 分子は、核内を広く動く分子、ほとんど動かない分子や、両状態を遷移する分子が見られた（図 1）。1 分子動態の高精細な軌跡追跡法を開発することにより、細胞内 ATP が複合体への結合解離に重要な役割を果たしていることを明らかにした（伊藤、光塾、2016）。また、原田昌彦らとの共同研究により、構成タンパク質である核内アクチンの可視化を進め、核内アクチンが OCT4 などの転写因子の発現を活性化することを明らかにした（Biosci. Biotechnol. Biochem. 79, 242-246, 2014）。

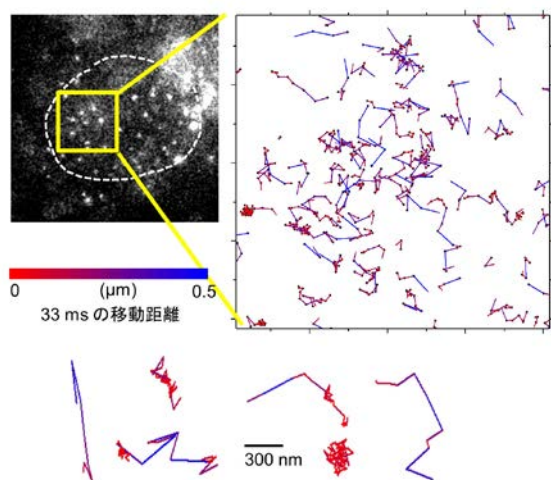


図 1. Ino80 の軌跡追跡

(2) 細胞の活性化に伴う転写因子の細胞質から核への移行を解析する目的で、核膜孔複合体の3色同時1分子イメージングの観察系を確立した。核膜孔複合体構成タンパク質を位置マーカーとして、核膜通過時のタンパク質の定量解析が可能になった。また、分裂酵母の核膜孔複合体構成タンパク質の蛍光1分子定量解析により、発芽酵母やヒトと異なる特徴的な組成を示すことが分かった (Nucleus 5, 1-14, 2014)。

(3) RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット C 末端 (CTD) の繰返し配列 (YSPTSPS) 中にあるセリンのリン酸化状態は、転写開始点結合時 (非リン酸化状態)、転写開始時 (5 番目のセリンリン酸化)、転写伸長時 (2 番目のセリンリン酸化) で変化する。木村宏らとの共同研究により、リン酸化セリンに対する蛍光抗体フラグメントを用いて、転写開始型と転写伸長型に対する結合タンパク質の推移を解析した。ホルモン添加時に、ホルモン誘導性遺伝子の繰返し配列 (遺伝子アレイ) における遺伝子活性化を可視化した。この方法により、ヒストン H3 アセチル化が転写因子の DNA への結合と転写伸長反応の両方に働くことを明らかにした (図 2)。(Nature 516, 272-275, 2014)。

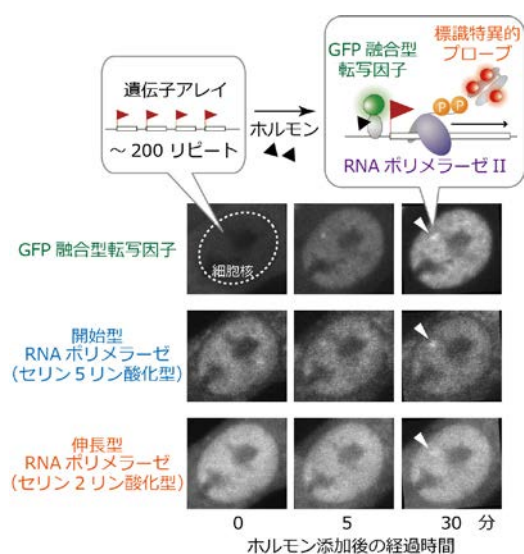


図 2. ホルモン添加による遺伝子活性化

(4) 核内転写関連タンパク質の動態は、細胞外からの刺激に応答し変化しているために、細胞表面での刺激受容体分子の動態解析も重要な情報である。特に免疫細胞などの浮遊細胞では、細胞表面分子の本来の動きを維持しながら細胞を観察用のディッシュに保持することが求められる。このために、ガラス支持脂質二重膜を簡便に構築する方法を確立した (Anal. Sci. 30, 1103-1106, 2014)。この方法により、細胞表面から核内へのシグナル伝達を含めて、核内転写関連タンパク質の刺激応答の詳細な解析が可能になった。

(5) 転写伸長因子 NELF と DSIF は、転写の開始から伸長を経て終結にいたるまで、RNA ポリメラーゼ II のセリンリン酸化に関連して、相互作用のタイミングが異なると考えられている。領域内の山口雄輝らとの共同研究により、リン酸化阻害剤および DSIF の各種ドメイン欠失変異体を用いた 1 分子イメージングおよび FRAP 解析により、転写伸長因子のダイナミクス解明を進めた (伊藤、池田、生物物理学会、2015)。さらにリン酸化阻害剤存在下での FRAP 解析を行い、リン酸化部位による相互作用安定性の違いを明らかにした。(國見、生物物理学会、2016)

(6) 核小体は核内に存在する最も大きな構造体であるが、生体膜に囲まれずに構造を維持しているという特徴を持ち、タンパク質および RNA を含んでいる。また、核小体は RNA 結合タンパク質と結合していることが知られている。核小体ではリボソーム合成を行うという重要な役割があるにもかかわらず、膜がない状態でそのような構造を取るメカニズムは未だにわかっていない。連携研究者の斉藤典子との共同研究により、RNA 結合タンパク質ノックダウン条件下での核小体構成タンパク質の動態を解析し、核小体構造維持への関与を明らかにした。(松本、生物物理学会、2016)

(7) 転写因子 IPAS は、低酸素状態で HIF 依存的に抑制性の転写因子として機能する一方、酸化ストレスに対応して、ミトコンドリアのアポトーシスを誘導するという 2 つの機能を有する。東北大学の十川和博との共同研究により、IPAS とミトコンドリア局在マーカーの 2 色同時 1 分子イメージング解析を行い、IPAS の細胞内局在を詳細に解析することにより、IPAS が核内構造およびミトコンドリア膜タンパク質と相互作用していることを明らかにした。さらに核内因子 HIF-1 α およびミトコンドリア局在の IPAS 結合タンパク質 Bcl-X_L 共発現下での FLIM-FRET の結果と合わせて、これらのタンパク質の結合により、IPAS の構造変化が引き起こされることを明らかにした。(J. Biochem. 161, 291-296, 2017)

(8) 炎症反応は、病原体侵入に対抗する生体防御反応として重要な免疫応答である。一方で、過剰な炎症反応は、自己免疫疾患やアレルギー疾患の原因となるため、活性化と同時に抑制が不可欠となる。そのための機構の一つとして、炎症反応抑制タンパク質 PDLIM2 が核内において炎症性転写因子である NF- κ B をポリユビキチン化し、核内プロテアソームで分解する機構が明らかになったが、PDLIM2 の活性制御の分子メカニズムはまだ不明である。2 色同時 1 分子イメージング解析により、PDLIM2 の LIM ドメインが核内での

分解に寄与していることを明らかにした（伊藤、瀧本、アメリカ生物物理学会、2014）。さらに、炎症抑制因子 MKRN2 を発見し、PDLIM2 と協同的に NF- κ B のユビキチン化と分解に作用することを明らかにした。（Sci Rep. 7, 46097, 2017）

(9) 転写反応を始め、多くの細胞内反応において、タンパク質複合体が形成されしかも細胞刺激応答によりダイナミックに変化している。タンパク質因子が複合体に結合・解離する様子は、1分子イメージングで可視化することが可能である。一方で、イメージングデータから個々のタンパク質因子がどのように複合体と相互作用しているかを解析する方法が求められている。この解析のモデル系として、免疫細胞活性化初期過程に重要な役割を果たしている T 細胞受容体マイクロクラスターを用い、1分子軌跡追跡による時空間動態と結合解離を定量する解析法を開発した。3種類の TCR シグナルタンパク質因子による3色同時1分子観察を行い、マイクロクラスター内外での各タンパク質因子の結合解離を解析したところ、マイクロクラスター内外でのタンパク質因子の動態の詳細な定量データを得ることができた。（論文投稿中）。この方法により、核内での転写因子の結合解離のダイナミクスや、リモデリング複合体構成タンパク質の核内構造との相互作用ダイナミクスの解析が可能になった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計25件）

- (1) MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- κ B and negatively regulates inflammatory responses. Shin C, Ito Y, Ichikawa S, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, *Tanaka T. Sci Rep. 7:46097 (2017) doi: 10.1038/srep46097. 査読有り
- (2) Conformational changes in inhibitory PAS domain protein associated with binding of HIF-1 α and Bcl-xL in living cells. Kasai S, Kajimoto S, Ito Y, Saito T, Yasumoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Fukumura H, *Sogawa K. J Biochem, 161, 291-296 (2017) doi: 10.1093/jb/mvw068. 査読有り
- (3) A Facile Preparation of Glass-supported Lipid Bilayers for Analyzing Molecular Dynamics. Ito Y, *Sakata-Sogawa K, *Tokunaga M. Analytical Sciences 30, 1103-1106 (2014) doi: 10.2116/analsci.30.1103 査読有り

- (4) Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Stasevich T.J, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally J.G, *Kimura H. Nature 516, 272-275 (2014) doi: 10.1038/nature13714. 査読有り
- (5) Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene. Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, *Harata M. Biosci Biotechnol Biochem 79, 242-246 (2014) doi: 10.1080/09168451.2014.972332. 査読有り
- (6) Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, *Hiraoka Y, *Haraguchi T. Nucleus 5, 1-14 (2014) doi: 10.4161/nucl.28487. 査読有り

〔学会発表〕（計60件）

- (1) 伊藤由馬, 原田昌彦, 木村宏, 十川久美子, 徳永万喜洋. 1分子イメージングとFRAPによるIN080クロマチン再構成複合体の核内動態解析, 第8回「光塾」(招待講演), 2016年12月17日~18日, 東京工業大学(神奈川県・横浜市)
- (2) 松本 大輝, 伊藤 由馬, 斎藤 典子, 徳永万喜洋, 十川久美子. Single molecule imaging and quantitative analysis of Nucleolar-localized protein dynamics. 第54回日本生物物理学会年会, 2016年11月25~27日, つくば国際会議場(茨城県・つくば市)
- (3) 國見 慎之介, 伊藤 由馬, 山口 雄輝, 十川久美子, 徳永万喜洋. Quantitative image analysis of dynamics of promoter-proximal pausing related proteins. 第54回日本生物物理学会年会, 2016年11月25~27日, つくば国際会議場(茨城県・つくば市)
- (4) Sakata-Sogawa K, Ito Y, Tokunaga M. Integrated imaging approach of transcription regulatory proteins in living cells. UK/RoI-Japan Symposium on frontier technologies: from single molecules to cells and tissues (招待講演), 2016年7月4日~5日, レスタ

ー (イギリス)

- (5) 十川久美子. 1 分子顕微鏡で観る免疫細胞活性化の初期過程, 宇都宮大学 オプトバイオシンポジウム(招待講演), 2015 年 12 月 21 日, 宇都宮大学 (栃木県・宇都宮市)
- (6) 十川久美子, 伊藤由馬, 深川暁宏, 原田昌彦, 木村 宏, 徳永万喜洋. Integrated imaging approach to the study of dynamics of chromatin. 第 52 回日本生物物理学会年会 (招待講演), 2014 年 9 月 25 日~27 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- (7) Ito Y, Takimoto J, Tanaka T, Kaisho T, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M. Molecular imaging analysis of regulatory mechanism of inflammatory response. 58th Annual Meeting of Biophysical Society (USA) 2014 年 2 月 15 日~19 日, サンフランシスコ (アメリカ)
- (8) Ito Y, Inaba N, Harata M, Kimura H, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K. Quantitative imaging analysis of molecular dynamics of actin-related protein in the nucleus. 58th Annual Meeting of Biophysical Society (USA) 2014 年 2 月 15 日~19 日, サンフランシスコ (アメリカ)
- (9) 十川久美子, 徳永万喜洋. Quantitative analysis of single molecule imaging of physicochemical field for genetic activities. 第 50 回日本生物物理学会年会 シンポジウム「染色体場のダイナミクス」(招待講演) 2012 年 9 月 22 日~24 日, 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 4 件)

- (1) 山本達郎、中尾光善、斉藤典子. クロマチンから核構造へ、東京化学同人 「基礎分子生物学 II: 遺伝子発現制御機構」 p. 231-242 (総ページ数: 250 ページ), 2017.
- (2) 十川久美子. 免疫細胞における受容体の動態. 化学同人 「1 分子生物学」 p. 147-153 (総ページ数: 304 ページ), 2014.
- (3) 徳永万喜洋. 1 分子操作. 化学同人 「1 分子生物学」 p. 215-227 (総ページ数: 304 ページ), 2014.
- (4) 斉藤典子, 坂本智代美, 松森はるか, 中尾光善, Ilya G. Goldberg. 機械学習に

よる細胞形態の分類と推定、羊土社「バイオ画像解析 手とり足とりガイド」 p195-207 (総ページ数: 221 ページ), 2014.

〔その他〕

報道関連 (計 2 件)

- (1) 徳永万喜洋 (2014) 「分子光らせ 1 つずつ観察」, 『日経産業新聞』, 2014 年 10 月 27 日
- (2) 東工大プレスリリース「遺伝子活性化の仕組みを生きた細胞内で観察 一転写制御にはたらくヒストン標識の役割を解明」 2014 年 9 月 24 日

アウトリーチ活動 (計 6 件)

- (1) 十川久美子. スーパーサイエンスハイスクール東京研修講義 (大阪府立大手前高校) 2016. 10. 6 東工大すずかけ台キャンパス (2012~2016 に 5 回実施)
- (2) 十川久美子. 東京工業大学 高校生のための夏休み特別講習会 実習担当 2014. 7. 31-8. 1 東工大すずかけ台キャンパス

ホームページ等

<http://www.toku.bio.titech.ac.jp/>
<http://www.bio.titech.ac.jp/laboratory/tokunaga-sogawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

十川 久美子 (SAKATA-SOGAWA, Kumiko)
東京工業大学・生命理工学院・准教授
研究者番号: 20291073

(2) 連携研究者

徳永 万喜洋 (TOKUNAGA, Makio)
東京工業大学・生命理工学院・教授
研究者番号: 00192659

木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)
東京工業大学・科学技術創成研究院・教授
研究者番号: 30241392

斉藤 典子 (SAITOH, Noriko)
熊本大学・発生病学研究所・准教授
研究者番号: 40398235