

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18357

研究課題名(和文)1細胞解析による転写因子NF- κ Bの核内集合体と転写制御メカニズム研究課題名(英文)Single cell analysis of the transcription factor NF- κ B cluster in nucleus and the mechanism of transcriptional regulation

研究代表者

稲葉 岳彦(Inaba, Takehiko)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：60611994

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)：細胞の転写制御メカニズムを調べるために、遺伝子の転写因子NF- κ Bを対象としたライブセルイメージングを行った。刺激により核内に移動したNF- κ Bは巨大集合体を形成した。これは、遺伝子の転写に重要な因子と一緒に集合した構造であり、時間経過とともに増減していた。集合体により、制御される遺伝子群が存在し、かつその制御は時間とともに変化していることを意味しており、細胞の分化などの制御にも関与する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は転写により遺伝子発現スイッチをオンとすることで、様々な外的刺激に対応する。炎症や免疫の成熟に重要な転写因子NF- κ Bを対象として、刺激に応じた細胞内でのふるまいを調べた。刺激後にNF- κ Bは核内に侵入し巨大な集合体を形成する。このような巨大集合体は、スーパーエンハンサーであり、細胞の根本的な性質を変化させるスイッチとして遺伝子発現の制御に関わると考えている。巨大集合体は時間変化で数を変化させており、細胞の性質に関わる様々な遺伝子発現のスイッチの組み合わせを動的に制御している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cells respond to a variety of external stimuli by turning on the gene expression switch through transcription. We investigated the intracellular behavior of NF- κ B, a transcription factor important for inflammation and immune maturation, in response to stimulation. After stimulation, NF- κ B invades the nucleus and forms a huge clusters. They are thought that these clusters are involved in the regulation of gene expression, called superenhancers, which act as switches that change the fundamental properties of the cell. We show that the clusters change in number over time and may dynamically regulate the combination of switches for various gene expression related to the fate of the cell.

研究分野：細胞内情報伝達

キーワード：転写因子NF- κ B 1細胞ライブセルイメージング RNAポリメラーゼ ヒストンアセチル化 トランスクリプトーム スーパーエンハンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同一の遺伝子背景の細胞群であっても、それぞれの細胞のふるまいは異なり、不均一な集団を形成する。ひとつひとつの細胞において、刺激に対する応答を光学顕微鏡による分類を行い、かつ、1細胞の転写レベルの多様性を調べることが、どのように不均一集団が形成されるかについての理解につながると考えられる。

研究対象の NF- κ B は炎症や免疫応答などに関わる転写因子である。刺激後に核内へ単に侵入するだけでなく、周期的に核と細胞質を振動することが知られている。しかし、遺伝子発現において、この振動にどのような意義があるかについては、わかっていない。

2. 研究の目的

細胞刺激によって引き起こされる NF- κ B の核内移行の振動現象が、どのように遺伝子発現制御に関与するかを明らかにすることを目的とした。NF- κ B は細胞分化に重要な転写因子であり、遺伝子上で巨大な集合体を形成するため、この集合体形成と核内移行の振動現象がどのように協調して行われているか、ライブセルイメージングにより解析し、その制御機構を調べた。

3. 研究の方法

ニワトリリンパB細胞 DT40 を用い、転写因子 NF- κ B の核内への侵入を光学顕微鏡で観察する。このときに形成される細胞内の NF- κ B の集合クラスターの数や輝度を調べることで、刺激に対する転写応答の度合いを分類わけする。観察後に、細胞を回収し転写解析を行うことで、刺激入力に対する応答から、実際の遺伝子発現による出力までの一貫して解析を行う。また、細胞回収を効率化するために、微細加工基盤技術を適用する。

4. 研究成果

細胞を刺激すると、細胞質の NF- κ B が核内に侵入した(図1)。核内では均質な分散ではなく、不均質に分布する強大なクラスターが観察された。このクラスターの集合体の形成には、刺激の強さ委に対して、二値的なふるまいをした(図2)。集合体の形成される数や集合体を形成する NF- κ B 分子数は、刺激の強さによらず、非常に幅の広いばらつきがあった。このことは、低濃度刺激において、少数の細胞細胞だけが応答した場合にも、強い応答から弱い応答までバラエティに富んだ細胞集団を形成できること意味する。

ライブセルイメージングにより、核内の集合体の数と核内の NF- κ B 濃度を比較したところ、輝点の数は時間経過で増加して減少した。このとき、各内 NF- κ B 濃度の上昇と下降とはずれがあり、一定濃度の NF- κ B が存在すれば定数の輝点が形成するという対応関係はないことがわかった。

NF- κ B 集合体は多数の転写関連因子の集合体であると考えた。そこで、Pol III、Med1、BRD4 など、転写開始に重要な因子との共局在を調べたところ、どの因子とも部分的な局在をしていた。特に、転写にアクティブな領域とは局在が重なっていた(図3)。そのため、集合体は転写制御に重要な構造であることがわかった。

多数の転写複合体の集合は液液相分離による可能性があるため、阻害剤処理をしたところ、輝点が消失した。薬剤を取り除くと輝点が回復したため、液液相分離により形成された転写関連因子の複合体から形成されている可能性がある。

このような多数の転写因子が一定の領域に密に存在するものは、スーパーエンハンサーである可能性があり、今回観察された集合体は、実態が明らかになっていないスーパーエンハンサーの形成過程を解析するためにも重要な実験系であると考えている。

NF- κ B translocation after stimulation

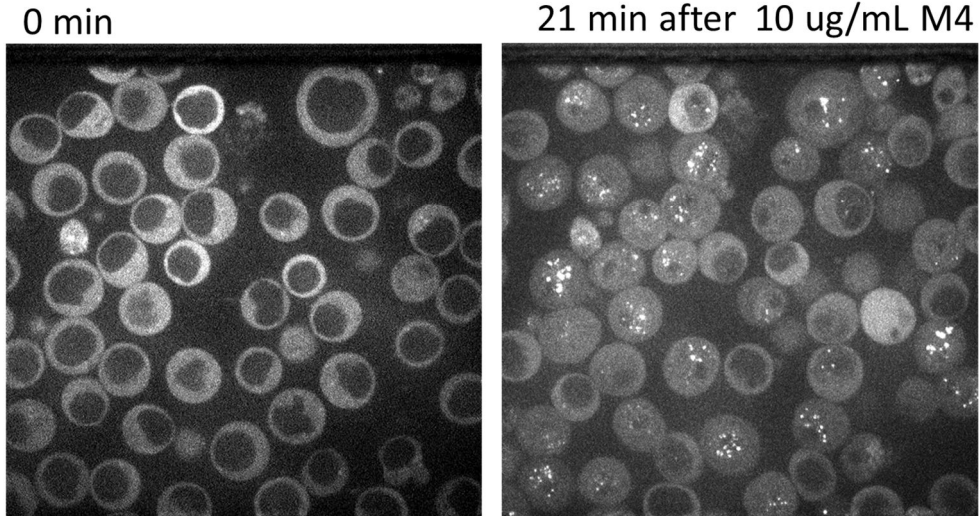


図1 核内に形成される転写因子の集合体

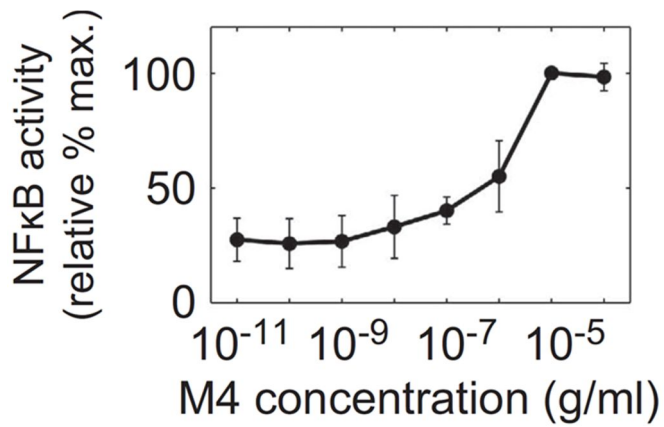
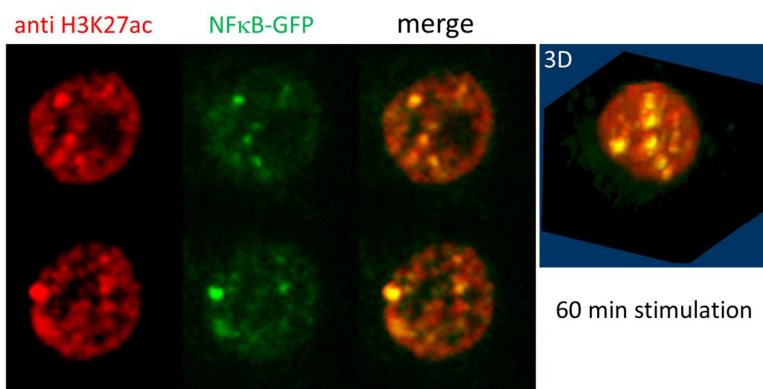


図2 刺激に対する細胞のスイッチ応答

① Immunofluorescence(IF) of Histone H3K27ac



H3K27ac foci colocalized with NF κ B foci.

NF κ B foci are formed on the active enhancer.

図3 転写アクティブな領域に集合体は形成される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲葉岳彦 岩本 一成 岡田真里子 佐甲靖志
2. 発表標題 Analysis of NF- κ B clusters and transcriptional initiations.
3. 学会等名 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉岳彦
2. 発表標題 転写因子NF- κ Bの核内クラスター形成の観察
3. 学会等名 シンポジウム 細胞システムの動態と論理X
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲葉岳彦、宮本佑、岩本一成、篠原久明、岡田真里子、佐甲靖志
2. 発表標題 転写因子NF- κ Bの核内クラスター形成の観察
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----