

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22404

研究課題名(和文)核内転写因子集積点形成の1粒子ダイナミクスと機能解析

研究課題名(英文)Single particle dynamics of the NF- $\kappa$ B foci in the living cell nucleus

研究代表者

佐甲 靖志 (Sako, Yasushi)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：20215700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：スーパーエンハンサー(SE)は、集団的な遺伝子発現制御において主要な役割を果たす領域であるとされているが実体は明らかでない。本研究では免疫B細胞の分化過程でNF- $\kappa$ Bが核内に作る集積点をSEの実体と予想し、その形成と遺伝子発現との関わりを研究した。NF- $\kappa$ Bの核内集積点が、BRD4蛋白質と共局在し、液-液相分離構造的な性格を持つ転写開始点である可能性を明らかにし、さらに遺伝子発現との関係を詳細に解析した。NF- $\kappa$ B下流には共同性や発現ゆらぎの大きい遺伝子転写が見られ、中でもCD83遺伝子の転写はNF- $\kappa$ B集積と相関して変動し、SE形成によって制御されていることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の基本単位である細胞が、全体性・一貫性を保って環境に応答し変化して行くには、多くの遺伝子発現が協調して制御されることが必須であると考えられるが、その仕組みは不明な点が多い。我々は、免疫B細胞由来の培養細胞の細胞成熟過程で、NF- $\kappa$ Bという代表的転写制御蛋白質が、核内に多数の集積点を作ることを発見した。この構造の性質と遺伝子発現の関係を研究し、CD83を含む特定の遺伝子群の協調的制御の様子から、それがスーパーエンハンサーと呼ばれる協調的遺伝子発現制御構造の一つである可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cellular gene expression is regulated by complex molecular assemblies, among which the super-enhancer (SE) is considered to play a major role by regulating collective gene expression. However, the details of its function and structure are unclear. In this study, we investigated the relationship between gene expression and formation of the NF- $\kappa$ B foci in the nucleus during differentiation of immune B cells.

The NF- $\kappa$ B foci co-localized with BRD4 protein and were reversibly resolved by hexanediol, suggesting that they are a transcription initiation site with a liquid-liquid phase-separated structure. We analyzed NF- $\kappa$ B accumulation and gene expression in detail using RNA-seq and RNA-FISH, and found that downstream of NF- $\kappa$ B, the gene transcriptions were highly cooperative and fluctuating. Especially, CD83 gene transcription fluctuated in correlation with NF- $\kappa$ B accumulation. Single-cell transcription analysis also suggested that CD83 expression is regulated by SE formation.

研究分野：生物物理学

キーワード：転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

スーパーエンハンサー (SE) は、染色体上に遺伝子転写因子・転写制御因子が高密度に集積した構造であり、複数のエンハンサー領域が集積して集団的な遺伝子発現制御を行うことによって、細胞運命決定等において主要な役割を果たす領域であるとして提唱された。しかし、その実体は明らかでなく機能についても依然として多くの議論があった。

我々は大阪大学・岡田らと共同して、DT40 を用いて B 細胞分化シグナルによる転写調節因子 NF- $\kappa$ B を介した新規遺伝子発現の調節機構を研究し、スイッチ的な遺伝子発現調節のメカニズムを明らかにした (Shinohara et al. 2014)。その研究過程で作成した GFP::NF- $\kappa$ B 安定発現細胞において、分化刺激後に細胞質から核内へ移行した NF- $\kappa$ B 分子が明るい核内輝点を多数形成することに気づいた (Fig.1)。直感的に、それらの蛍光輝点は転写部位であると予想したが、その数は NF- $\kappa$ B 下流で発現調節を受ける数百の遺伝子の十分の一以下しか存在せず、また細胞間の輝点数のゆらぎが単純な統計ゆらぎ (平均値の平方根) よりも遙かに大きく、さらに核質内 NF- $\kappa$ B 濃度・輝点数・輝点の蛍光強度の間に単純な比例関係が見られないなどの疑問が存在した。

これらの疑問に答えるべく、NF- $\kappa$ B 集積点の構造・動態と、遺伝子発現の相関を詳細に解析することによって、SE の実体に迫ることができると期待し、本研究を提案した。

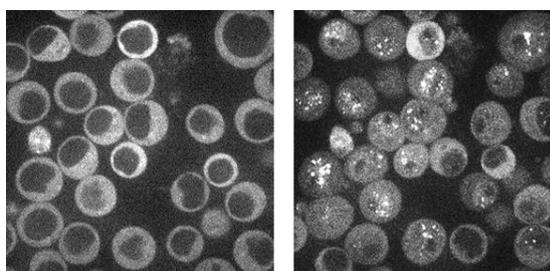


Fig.1 : NF- $\kappa$ B 集積点の形成  
抗 BCR 抗体刺激前(左)と刺激後 20 分(右)の細胞群

## 2. 研究の目的

提案点における SE 研究のひとつの限界は、ほとんどの研究が細胞集団の遺伝子解析手法によるものであり、生きた細胞内で SE の実体が直視されていなかったこと、さらに、1細胞レベルでの遺伝子発現と SE 形成の相関がほとんど知られていなかったことである。本研究では、単一細胞レベルで NF- $\kappa$ B 集積点の形成と遺伝子発現解析を行い、両者の相関解析から集積点が SE であることを検証するとともに、検証がなされれば SE の機能の実体を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ニワトリ免疫 B 細胞由来の培養細胞 DT40 に対して GFP を融合した転写調節因子 NF- $\kappa$ B (具体的には NF- $\kappa$ B 複合体中の RelA 蛋白質、以下 GFP::NF- $\kappa$ B) を安定発現させた細胞 (内在性の RelA 遺伝子は破壊してある) をもちいて研究を進めた。この細胞の B 細胞受容体を抗体刺激すると、数十分の内に細胞質から核内へ移行した GFP::NF- $\kappa$ B が一過的に蛍光輝点を多数形成する (Fig. 1)。NF- $\kappa$ B の核移行を 1 細胞観察した例はこれまでもあるが、このような核内集積点の報告例は我々の知る限り存在しなかった。スーパーエンハンサーの可視化例はあるが、形成・解消のダイナミクスは見られていなかった。

この実験系において以下の実験を行い、SE の動態を明らかにすることを目指した。

### 転写因子集積点の形成・解消ダイナミクス

抗 B 細胞受容体抗体 (M4) 刺激後の核質における NF- $\kappa$ B 濃度変化と輝点の形成・解消ダイナミクスを定量的に可視化計測する。種々の転写調節に関わる蛋白質等の抗体や阻害剤を用いて、集積点の分子構成や形成・解消のメカニズムを明らかにする。

### 遺伝子発現との関係

一細胞 RNA-seq 及び RNA-FISH を用いて遺伝子発現解析を行い、集積点動態と相関する動態を

持つ遺伝子群を同定し、それらの発現ダイナミクスおよび、発現制御メカニズムの解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### 転写因子集積点の形成・解消ダイナミクス

3次元的な共焦点蛍光顕微計測法を確立して (Wabisana et al. 2020) 蛍光輝点形成のダイナミクス計測を行い、DT40 細胞の分化刺激となるM4 抗体の環境濃度に対する NF- $\kappa$ B 集積点形成の応答関数を求めた。集積点の形成ダイナミクスは共同的反応を示唆している (Fig. 2)。NF- $\kappa$ B 核内濃度との相関解析の結果、集積点は核質濃度と正に相関して形成され、核質濃度上昇と集積点形成それぞれの中央値を与える抗体濃度は一致するが、集積点は NF- $\kappa$ B の核質濃度が低いとき相対的にできやすく、高濃度ではできにくくなるという結果が得られた。これは何らかの凝集促進因子の濃度変動によって、共同的な集積点形成反応が起きていることを示唆している。

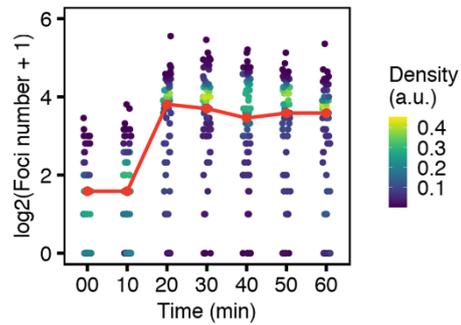


Fig.2: 単一細胞内集積点形成数の時間変化

集積点は、転写促進因子 BRD4 の阻害剤で形成阻害され、K27 アセチル化ヒストン H3 や RNA ポリメラーゼ II の抗体で染色されることなどから、転写開始点に存在していると考えられる。蛍光退色回復法により、集積点内の NF- $\kappa$ B 分子が溶液分子と容易に交換すること、さらにヘキサソジオール処理で消失し、洗浄後に復活するなど、液-液相分離構造と共通の性質を持つルースな集合体であることが示唆された。

##### 遺伝子発現との関係

1細胞 RNA seq により、M4 で刺激された DT40 細胞において、核内集積点の形成と同様の on/off 的な転写応答を示す遺伝子群が存在し、集積点形成と転写で同様の刺激量に対する応答を示すことが明らかになった (Fig. 3)。この傾向は NFKBIA や CD83 といった NF- $\kappa$ B 直下にある遺伝子で著しい。しかし、BRD4 阻害剤 JQ1 により、CD83 の転写は阻害されるが、NFKBIA の転写は阻害されなかった。IKK-16 により NF- $\kappa$ B の核移行を阻害すると、NFKBIA, CD83 とともに転写阻害された。これらの結果は、CD83 は NF- $\kappa$ B 集積すなわち SE によって制御される一方で、NFKBIA は SE を構成しない NF- $\kappa$ B の制御下にあることを示唆する。

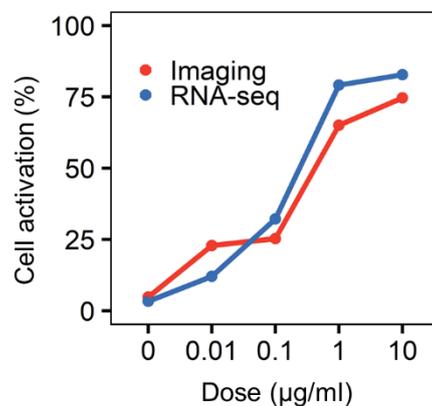


Fig.3: 集積点形成 (red) と遺伝子発現 (blue) の抗体濃度依存性

細胞間の転写量のばらつき (Fano 因子) を RNA-seq および RNA-FISH データに対して計算したところ、いずれの結果も CD83 のばらつきが大きく、SE に依存した共同性の高い転写応答が関係しているものと思われた。さらに Cicero アルゴリズム (Pliner et al. Mol Cell 2018) を用いて NFKBIA と CD83 それぞれと他の遺伝子との、M4 刺激後の転写変動の相関解析を行ったところ、CD83 と相関する変動が多数発見されたのに対し、NFKBIA と相関する変動は見つからなかった。

以上の遺伝子発現解析の結果は NF- $\kappa$ B 集積により、CD83 遺伝子近傍に SE が形成されることを強く示唆している (Wabisana et al. 2022)。

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 1件）

1. 著者名 Wibisana, J. N., Inaba, T., Sako, Y., Okada, M.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Quantitative imaging analysis of NF- B for mathematical modelling applications.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	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） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wibisana, J. N., Inaba, T., Shinohara, H., Yumoto, N., Hayashi, T., Umeda, M., Ebisawa, M., Nikaido, I., Sako, Y., Okada, M.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Enhanced transcriptional heterogeneity mediated by NF- B super-enhancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	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） なし	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 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Wibisana, J. N., Inaba, T., Sako, Y., and Okada, M.
2. 発表標題 NF-kB mediated transcriptional regulator in B-cell.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wibisana, J. N., Inaba, T., Sako, Y., and Okada, M.
2. 発表標題 NF-kB mediated transcriptional regulation in B-cell.
3. 学会等名 Cold Spring Harbour Laboratory Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wibisana, J. N., Inaba, T., Sako, Y., and Okada-Hatakeyama, M.
2. 発表標題 Multi-dimensional analysis of NF-kB nuclear dynamics.
3. 学会等名 The 20th International Congress on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------