

令和元年6月4日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18363

研究課題名(和文) 遺伝子転写活性とゲノム三次元構造の経時的同時計測による発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Simultaneous visualization of transcriptional activity and 3D genomic structure

研究代表者

有吉 哲郎 (Ariyoshi, Tetsuro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：00782103

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)：研究代表者の開発した発蛍光性RNA・Romanescoを用いたライブセルRNAイメージングの感度を大幅に向上させることに成功し、内在性遺伝子転写活性の蛍光イメージングによる可視化を達成した。刺激に応じた転写活性化を単一細胞の解像度で解析することを可能にし、これまで細胞集団レベルで発生することが知られていた周期的な転写活性化が単一細胞レベルでも起こっていることを初めて見出した。DNA構造を可視化する蛍光プローブとの同時イメージングにより、ゲノム構造と転写活性の同時イメージングを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により遺伝子の発現が一つ一つの細胞の中でどのように変化していくのか計測できる技術基盤が確立された。細胞ごとの遺伝子発現の違いは人体を始めとする複雑な生命構造を形作る基盤となるメカニズムであるので、今後本研究成果の応用により幅広い生命科学分野で様々な発見が生み出されるであろうと期待される。

研究成果の概要(英文)：The investigator used Romanesco, a fluorogenic RNA previously developed by the investigator, and succeeded in enhancing the sensitivity in Romanesco-based live-cell RNA imaging. Visualizing endogenous gene transcriptional dynamics at single-cell resolution has been achieved and transcriptional oscillation at single-cell level has been discovered. Simultaneous imaging of gene transcriptional dynamics and genomic DNA structural changes was also successful.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 技術開発 イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞外部からの刺激によって遺伝子発現の変化とゲノム立体構造の変化が共役して引き起こされることがいくつかの研究によって示唆されていた。核内ゲノム DNA の立体構造が何らかの形で遺伝子の転写を制御している可能性が議論されていたが、転写活性をダイレクトに可視化する手法が欠如していたため実際に「DNA 構造」と「転写活性」を同時にイメージングした研究は存在しなかった。

そこで、申請書が開発した蛍光 RNA と DNA 可視化色素を組み合わせることで生きた細胞で高い時間・空間分解能で DNA 構造と遺伝子発現を同時計測できるのではないかと、この着想を得た。

2. 研究の目的

申請者の開発した蛍光 RNA・Romanesco を用いて内在性遺伝子の転写活性をイメージングする系を確立する。確立した系と DNA 可視化色素を組み合わせ、「DNA 構造」と「転写活性」の変化を経時的に同時計測する。

3. 研究の方法

内在性遺伝子の転写に由来する mRNA は非常にコピー数が少ないので、Romanesco を用いたイメージングのシグナル-バックグラウンド比を向上させ少ない mRNA でも可視化可能な系を確立する。また、内在性遺伝子の mRNA に Romanesco がノックインされた細胞株を樹立する。樹立した細胞株を用いて、刺激依存的な mRNA 発現量の増減が可視化可能であることを確かめる。

さらに、DNA 構造を可視化する色素と同時イメージングを行うことにより「DNA 構造」変化と「転写活性」変化の経時的同時計測を実現する。

4. 研究成果

まず蛍光 RNA・Romanesco を用いて特定遺伝子の転写活性をイメージング可能な細胞株の樹立を試みた。ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムにより種々の細胞において Romanesco 配列のノックインを試みたところ、マウス ES 細胞、ヒト HEK293 細胞、ヒト乳がん細胞 MCF7、免疫 B 細胞モデル細胞 DT40 において Romanesco 配列をゲノム上の狙った遺伝子に挿入することに成功した。このうちいくつかの細胞株において、外部から細胞を刺激し遺伝子の転写を誘導することで蛍光強度が大きく変化する様子が観察された。

一方で、遺伝子の発現量によっては一般的な顕微鏡では十分な感度を持ったイメージングができないことが分かってきた。そこで次に、顕微鏡法の改良により Romanesco に由来する蛍光を高い感度で検出することを目指した。Romanesco は細胞の自家蛍光などに比べ長い蛍光寿命を持つことに着目し、パルスレーザーを用いた時間分解蛍光寿命イメージングを行ったところ、転写活性イメージングにおけるシグナル-バックグラウンド比が大幅に向上するという大きな改善が達成された。

改良されたイメージング系を用い外部刺激に応答して誘導される転写活性を可視化したところ、細胞集団レベルではこれまでの知見と一致する周期的な転写活性化が観察された。さらに単一細胞レベルでの転写動態を解析したところ、集団で見られたのと同様の周期的活性化が個々の細胞についても起こることが見出された。これは本研究計画において確立されたライブセル RNA イメージング技術によって初めて明らかとなった新たな知見である。

さらに、ゲノム構造を可視化可能な蛍光色素と Romanesco の同時イメージングを行ったところ、外部刺激によりゲノム構造がゆるやかに変化する様子が観察された。ある種の内在性遺伝子の転写活性化はゲノム構造の変化に先立って起こることがわかり、ゲノム立体構造の変化を伴わずに転写活性化しうることが示された。

また、開発した新技術を用いることで、遺伝子発現過程における転写産物の核内微細構造への局在化イメージング、細胞質 RNA のストレス顆粒への移行動態解析、神経細胞におけるリボ核タンパク質輸送動態のイメージングにも成功しており、これまで不可能であった「ライブセルにおける RNA 発現動態の時空間的解析」が実現された。

以上の研究実績により、本研究計画で目標としていた「遺伝子転写活性とゲノム三次元構造の経時的同時計測」が無事達成された。今後本研究計画で得られた成果を元に、遺伝子転写活性化機構の詳細や RNA 局在化によるタンパク質発現の制御機構について研究を発展させて行きたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Highly Photostable Near-Infrared Labeling Agent Based on a Phospha-rhodamine for Long-Term and Deep Imaging. Grzybowski M, Taki M, Senda K, Sato Y, Ariyoshi T, Okada Y, Kawakami R, Imamura T & Yamaguchi S *Angewandte Chemie International Edition* 57.32 (2018): 10137-10141.(査読有)DOI: 10.1002/anie.201804731

2. Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Shige-yuki N & Hirose, K. *Nature neuroscience* 21.1 (2018): 41. (査読有)DOI: 10.1038/s41593-017-0041-9

〔学会発表〕（計 7 件）

1. Tips on live-cell super-resolution microscopy and its application in RNA imaging (有吉哲郎、2019年3月、第92回日本薬理学会年会、大阪)
3. Visualizing spatiotemporal mRNA dynamics at subcellular resolution with a bright fluorogenic RNA (有吉哲郎、2018年12月、2018 ASCB | EMBO Meeting、San Diego)
4. Imaging spatiotemporal mRNA dynamics at subcellular resolution with a bright fluorogenic RNA (有吉哲郎、2018年7月、第91回日本薬理学会、京都)
5. Genetically-encoded fluorogenic RNA for imaging spatiotemporal mRNA dynamics at subcellular resolution (有吉哲郎、2018年6月、第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生物学会合同大会、東京)
6. 新規遺伝子コード型 RNA プローブを用いた単一生細胞での mRNA 動態イメージング (有吉哲郎、2018年3月、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、東京)
7. Visualization of transcriptional dynamics at single-cell resolution with a genetically-encoded fluorogenic RNA (有吉哲郎、2017年12月、2017 ASCB | EMBO Meeting、Philadelphia)
8. Genetically-encoded fluorescent RNA probe for visualizing transcriptional dynamics in live single cells (有吉哲郎、2017年6月、第69回日本細胞生物学会大会、仙台)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：蛍光発生核酸分子、及び標的RNAの蛍光標識方法

発明者：有吉哲郎、岡田康志

権利者：同上

種類：特許権

番号：特願 2018-226743

出願年：2018

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。