

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18543

研究課題名(和文) 発生分化過程でみられる転写の振動現象のイメージング解析

研究課題名(英文) Oscillation of transcription during development

研究代表者

村本 哲哉 (MURAMOTO, Tetsuya)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10612575

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)：細胞集団で同調して周期的発現振動を繰り返す遺伝子を探索するため、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。周期的な変動パターンを示す22個の候補遺伝子について、1細胞レベルで連続的に転写動態を計測する細胞株を作製し、発生分化過程をモニターした。その結果、これまでに解析が終了した遺伝子のうち1つで、分化誘導後6時間の細胞集団で転写のオン・オフが同調的に起こることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis was performed to identify genes expressing periodically and synchronously in the cell population during development. Cell lines to visualize transcriptional dynamics were generated for 22 candidate genes showing the oscillatory pattern. Live-cell analysis revealed one of the genes displayed oscillatory pattern during early development.

研究分野：発生生物学

キーワード：遺伝子発現制御 転写 細胞分化 周期的発現 ライブイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 遺伝子発現動態の1細胞レベルでの計測技術の確立

転写産物の解析で広く用いられる QPCR、マイクロアレー、RNA-Seq といった手法は、簡便性と高いスループットという利点を持つが、破碎された細胞集団による平均化された遺伝子発現状態をみることから、個々の細胞における経時的な遺伝子発現動態を観察する目的には適さない。近年の顕微鏡を使ったイメージング技術の発展により、同一の遺伝的バックグラウンドの細胞間で、遺伝子発現がばらついていることが示されてきた。ただし、これらの研究では、転写を直接とらえるのではなく、蛍光タンパク質などを指標として間接的に測定するため、タンパク質のプロセッシング効率や安定性による寄与を考慮する必要があった。

一方、生細胞内で直接 RNA の産生を動的に検出する手法が「MS2 システム」である。これは、MS2 ファージの外皮タンパク質 (MS2 タンパク質) が MS2 RNA に高い親和性で結合する性質を利用したものである。私はこれまでに「MS2 システム」と長時間高解像度でイメージングする技術を融合させ、遺伝子発現動態を直接生きた細胞中で計測するための技術を用いた研究を進めてきた。その結果、転写が不規則な間隔で活性化するパルス状に制御される (転写パルス) という、興味深い知見を得ることができた。

### (2) 発生分化過程で見つかった細胞集団で同調的に起こる短周期発現振動

これまで 15 種類以上の異なる遺伝子の発現動態を「遺伝子発現動態計測技術」を用いて解析した。その結果、これらの遺伝子は、転写パルスという共通の性質を持つが、その発現強度、持続時間、頻度などの動的挙動のパラメータは異なる値を示した。なかでも興味深いことに、発生分化特異的遺伝子の一つである *csaA* 遺伝子は、未分化状態では他の遺伝子同様、確率的な遺伝子発現動態を示していたが、発生分化が進行するに伴い細胞集団で同調し始め、約 6 分間隔でオン・オフを繰り返すという現象 (短周期発現振動) を示した。また、これと連動して、*csaA* 遺伝子を標的とする GATA ファミリー転写因子である *GtaC* の核局在が、同じ周期性で振動していた。

## 2. 研究の目的

周期的な振動現象は生命システムにおける動的挙動の中でもよく観察されるものの一つであり、体節形成過程を制御する分節時計や概日時計、細胞周期など、多くの場面で重要な役割を担っている。わたしはこの生物の動的挙動を生細胞内で観察・計測するシステムを用い、発生分化過程における遺伝子の「短周期発現振動」(転写のオン・オフが細胞集団で同調して約 6 分間隔で振動する現

象)をはじめて見出した。また、この発現振動が、発生分化過程の遺伝子発現や形態形成のタイミングを制御していることを示唆する結果も得た。そこで、発生分化過程で様々な周期性や位相を持った発現振動を示す遺伝子を新たに同定し解析することにより、「短周期発現振動」の発生分化過程での意義を解明していく。

## 3. 研究の方法

### (1) 短周期で同調的に活性化する候補遺伝子の同定

同調的な短周期発現振動が観察された発生分化過程の細胞に対してウリジンアナログの 4-チオウリジン (4sU) を取り込ませ、新生 RNA を標識した。この細胞集団から 2 分間隔に RNA を抽出し、4sU ラベルされた新生 RNA を Streptavidin ビーズにより濃縮した。精製された RNA に対して次世代シーケンサーを用いた配列解析を実施した。

### (2) 遺伝子発現動態を計測するためのノックイン細胞株の作製

得られた候補遺伝子の 3'領域に 24×MS2 リピートを導入するためのノックインコンストラクトを作製した。このコンストラクトを細胞性粘菌 AX3 株に導入しノックイン株を得た。得られた株は、サザンブロッティングにより MS2 リピートが削られていないことを確認した。

### (3) 発生分化過程での候補遺伝子の転写動態解析と画像解析

分化誘導後 4~7 時間の細胞集団を用いて遺伝子発現動態を 1 分おきに 30 分間計測した。撮影は、Z 軸方向に高速で撮影することで 3 次元のタイムラプス画像を取得した。取得した画像に対して、転写スポットの定量化を実施し、転写の強度、持続時間、頻度を求めた。定量化には、画像解析ソフトウェア Volocity (PerkinElmer) を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 短周期で同調的に活性化する候補遺伝子の同定

RNA-Seq により得られた情報は、タイムポイント間でゲノムにマップされた総リード数が異なる。そのため、RPKM による正規化を行った。9 つのタイムポイントいずれかに 0 の値を含んだ遺伝子 5,728 個については、今後の解析対象から排除し、合計 7,694 遺伝子を対象とした。解析対象の遺伝子の中から、短周期で同調的に活性化する候補遺伝子を選定するため以下の 2 つの方法により選抜した。

一つ目は、RNA-Seq の結果をもとに新生 RNA が周期的な変動パターンを示すものを選抜し、変動性の顕著な 12 遺伝子を最終的に候補遺伝子とした。二つ目の方法では、得られた RNA-Seq の結果と先行研究で得られていた

周期的な局在変化を示す転写因子 GtaC の ChIP-Seq の結果を組み合わせた。転写因子 GtaC が結合する可能性のある標的配列 561 個のうち、標的である可能性の高い上位 100 遺伝子のデータと新生 RNA の解析結果を組み合わせることで、GtaC の標的でかつ周期的な変動パターンを示す遺伝子を 10 遺伝子選定した。

(2) 遺伝子発現動態を計測するためのノックイン細胞株の作製

合計 22 個の候補遺伝子に対し、3'領域への 24×MS2 リピートの導入を実施した。その結果、20 個の候補遺伝子について遺伝子発現動態を計測するための細胞株の作製に成功した。これらの細胞に対して発生分化を誘導し、1 細胞レベルで起こる転写の動態をイメージングした。

(3) 発生分化過程での候補遺伝子の転写動態解析と画像解析

画像が取得できたものについては、画像解析を実施した。解析が行われた遺伝子の 1 つで転写因子 GtaC の標的候補であり、かつ新生 RNA が周期的な変動パターンを示した遺伝子の転写が、発生分化過程で周期的に振動していることを発見した(図 1)。

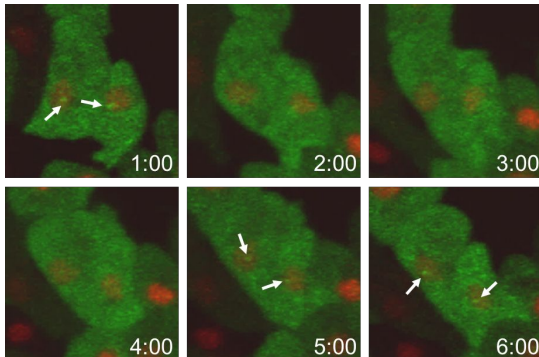


図 1 発生分化過程で周期的な遺伝子発現が起こる様子

発生分化誘導後 6 時間の細胞での転写動態をとらえたもの。転写がオンになった際に現れる輝点(矢印)が周期的に見られる。(分:秒)

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 岡野由里、船江聡子、村本哲哉

「周期的な局在変化を示す転写因子の細胞内動態解析」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(2) 菊地亜紀、清水祐季、村本哲哉

「発生分化における短周期発現振動を示す遺伝子群の同定とその解析」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3) 関根僚也、村本哲哉

「細胞性粘菌での CRISPR/Cas システムの利用」第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016 年 10 月 15 日 上智大学(東京都・千代田区)

(4) 岡野由里、船江聡子、川田健文、村本哲哉

「転写因子の細胞内動態解析による多細胞体構築機構の解明」第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016 年 10 月 15 日 上智大学(東京都・千代田区)

(5) 菊地亜紀、村本哲哉

「転写ダイナミクスの世代を超えた継承の解明」第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016 年 10 月 15 日 上智大学(東京都・千代田区)

(6) 清水祐季、菊地亜紀、平岡真奈、村本哲哉

「発生分化における短周期発現振動を示す遺伝子の探索と解析」第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016 年 10 月 15 日 上智大学(東京都・千代田区)

(7) 嵯峨幸夏、橘高昂平、田向沙樹、栗原直也、島田奈央、村本哲哉、川田健文

「細胞性粘菌 IncRNA の動態解析」RNA Frontier Meeting 2016、2016 年 8 月 31 日 いこいの湯宿いろは(北海道・ニセコ町)

(8) 関根僚也、菊地亜紀、村本哲哉

「発生分化における周期的転写活性化とそのゲノム動態」第 5 回日本細胞性粘菌学会例会、2015 年 10 月 10 日 弘前大学(青森県・弘前市)

(9) 村本哲哉

「遺伝子発現動態のイメージング解析」第 5 回日本細胞性粘菌学会、2015 年 10 月 10 日 弘前大学(青森県・弘前市)招待講演)

(10) 村本哲哉

「発生分化過程でみられる転写の振動現象のイメージング解析」第 37 回つくば藻類・プロティストフォーラム 2015 年 6 月 22 日 筑波大学(茨城県・つくば市)

(11) Muramoto, T., and Ueda, M.

“Nucleocytoplasmic shuttling of a GATA transcription factor functions as a development timer” The 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists 2015 年 6 月 3 日 つくば国際会議場(茨城県・

つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村本 哲哉 (MURAMOTO, Tetsuya)

東邦大学・理学部生物学科・講師

研究者番号：10612575