

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15220

研究課題名(和文)1細胞内の複数の遺伝子の転写活性計測による転写キネティクスの解明

研究課題名(英文)Analysis of transcriptional kinetics of synexpression genes in a single cell

研究代表者

別所 康全 (BESSHO, Yasumasa)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：70261253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の発生・形態形成では一群の遺伝子が協調して発現し、さまざまな生命現象を制御している。したがって、細胞レベルで複数の遺伝子の発現を同時に検出し、遺伝子座間の協調性を解析することは、発生・形態形成のメカニズムの解明には有効である。我々は体節原基で起こる同調した遺伝子発現制御をモデル系として、1細胞内で複数の遺伝子の転写活性状態を定量する系を確立することを目指した。2種類の遺伝子の転写状態を同時に1細胞の核内で検出することに成功した。また、組織レベルでは転写が活性化されている領域に、転写が活性化されていない細胞も存在することを見だし、転写が確率的に起こっていることを示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

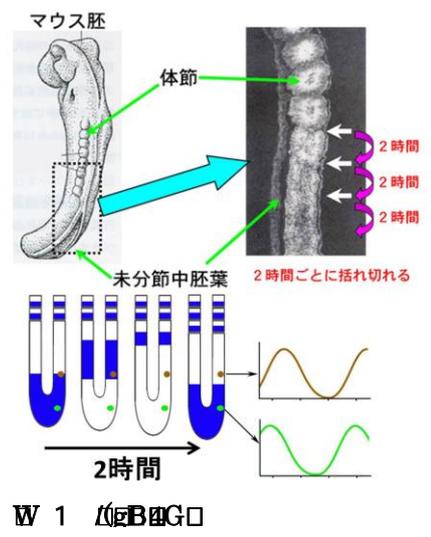
これまで高等生物の発生過程での遺伝子発現の解析は、組織レベルの解析がほとんどであり、1細胞ごとの転写レベルの解析は技術的困難さからほとんどおこなわれていなかった。一方で特定の遺伝子の転写は1細胞あたり2つの遺伝子座のみで起こる現象であるので、ゆらぎが大きい生命現象であることは認識されており、それを示唆するデータも得られている。本研究では同じ転写制御を受ける遺伝子(synexpressions genes:同期発現遺伝子)の1細胞内でのゆらぎを計測しようとする新しい研究である。つまり複数の同期発現遺伝子のゆらぎが同期しているか否かを明らかにしようとする新しい研究である。

研究成果の概要(英文)：In development and morphogenesis of multicellular organisms, many genes are expressed cooperatively, thereby regulating cell growth, differentiation and movement, and forming functional tissues and organs. Thus, detecting several gene expression simultaneously in single cells and analyzing cooperativity between multiple genes are effective for revealing the mechanism of development and morphogenesis, which are regulated by gene networks. We aimed to establish a system for quantifying the transcriptional activity of multiple genes in single cells, using the synchronized gene expression that occurs in the primordium of somites as a model. We successfully detected transcriptional status of two genes in a single nucleus. We also showed that transcription occurs stochastically.

研究分野：発生生物学

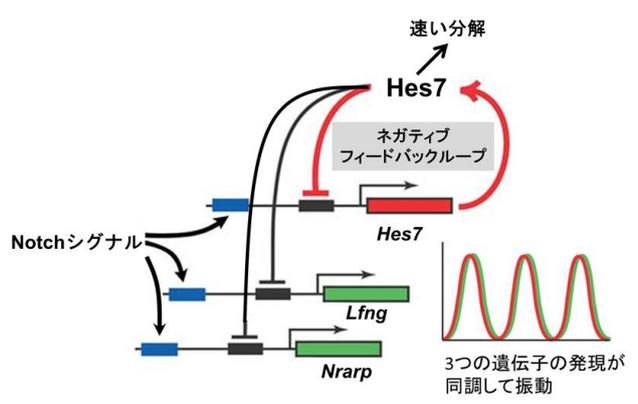
キーワード：転写 発生 転写因子 同調 Notch

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100

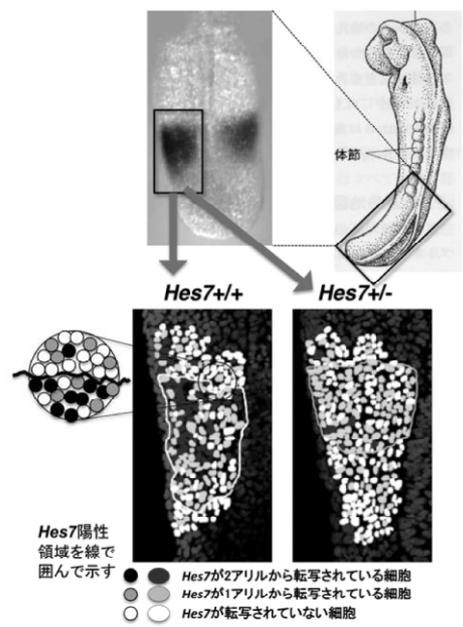


ON OFF CKMU4GhKZOKZ8S  
 dEE 2 6MLb4GhKZ8EEGb  
 KZ 2 6M(2sGMG\_WZ  
 Pb/(sKKGZ  
 3KS4C (W 1) #4E(+%\_KOMG\_WZ  
 bqGWZ8HG  
 Hes7 Lunatic fringe (Lfg)  
 Notch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp)  
 Notch WZq  
 IQbU Hes7 cD3  
 IK Hes7 2A(+  
 s Hes7 +3 Lfg  
 Nrarp b3DMG  
 gBMG  
 bz06G  
 KZ8 (W 2)

1 Pb/(gBK 5 BZ 64  
 OA899bS3H\_WS  
 Notch



Hes7 Lfg Nrarp Notch  
 WZq Hes7  
 WZDIbG 3 b4Gvb  
 3DwKZHE  
 2  
 ON OFF BKZ  
 8 G KZ/(gBDKZ8  
 V\_G 3 b4Gb3  
 c)ECL8  
 KKSd Hes7 b3(+0  
 M)B ON gb8bp  
 10% b(+e32sGWZ88G  
 gM9bZ8S (W 3)Q  
 Rb(+c Hes7 Lfg Nrarp b4G  
 2 NM 3gQRb  
 4GKS8b640MG  
 c)76WS  
 MG MG0s  
 0%2b%  
 2 (1  
 K8b 1 b(+8Z64G  
 b6%6b3g  
 2 4G 3  
 IZ8 1 4GIZ88  
 IZ88b 3 gKS)8qIZ88vNKv

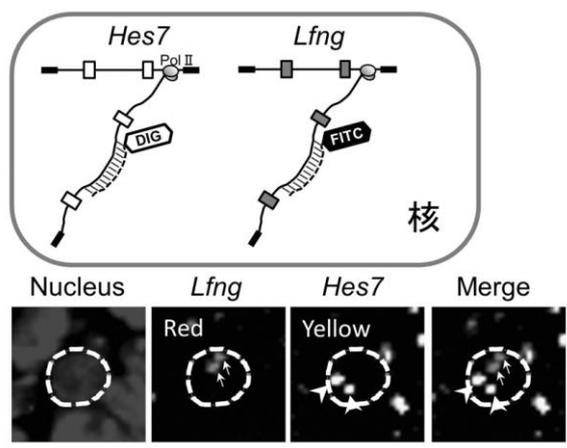


MLb4G5b3 □ ON □ OFF )BKKZ8Qb4GbpD  
 3DwE □ 3 b4G5b3qQRb(+b4G □  
 KQR □ b3q b4G6b10MG □  
 % KS □  
 Hes7 8 S9b)c)BqLZ8 □  
 8b(+bZ3qLZ8EeCeS 2 64G5bU5M  
 b5BIZ8(+vC09IS (W 3)G5G □ Hes7 c3 □ ON □  
 □ (Notch qLZ Hes7 2A8 )b(+6WZvNKv  
 3INeK3EIG □ S □

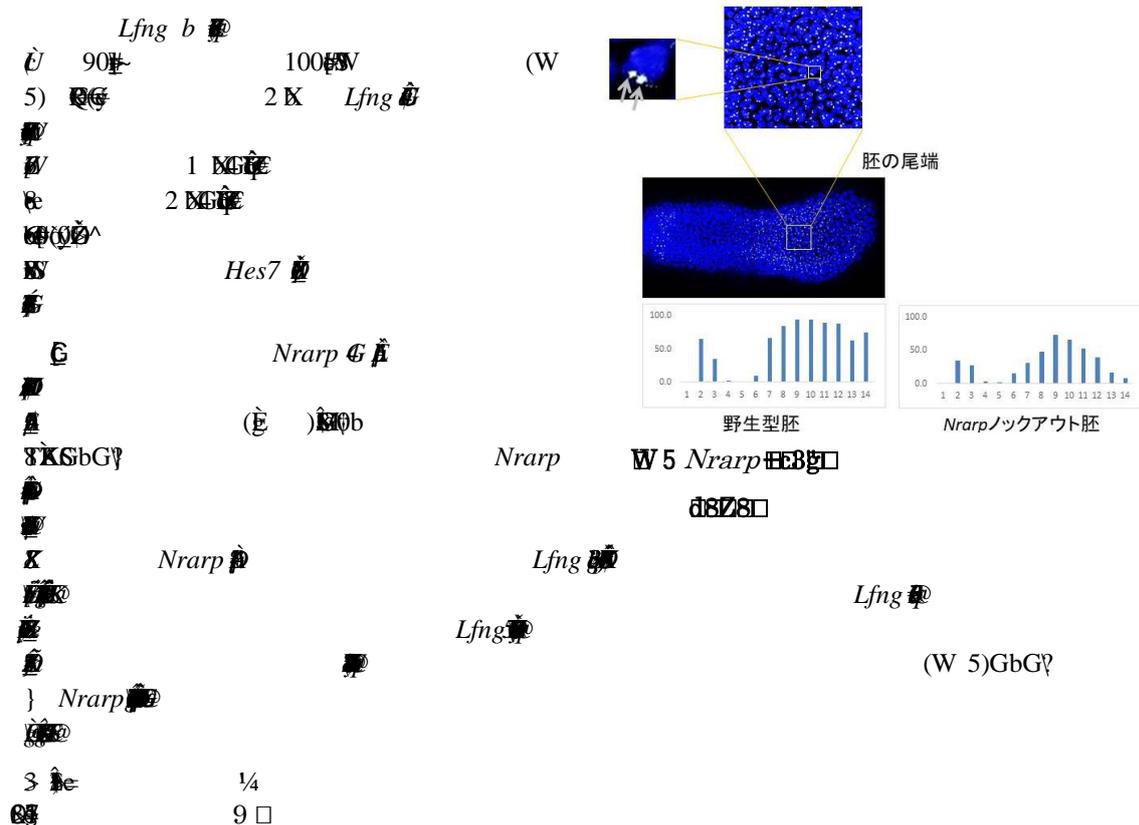
1, L3DwE □ 3 b4G5b10BIBL □  
 b □  
 2, 4G6b18E6 □ bdfb4G5b3qLZ8 □  
 (+cb4G5b3vqLKM8 □  
 3 b4G □ Hes7 □ Lfng □ Nrarp b4G5b □  
 g □ KOMG % 2b % KS □  
 I, % □ 2b2

Hes7 □ Lfng □ Nrarp b4GHb3q □ M □  
 □ whole mount in situ hybridization 3Bp53MG □ WZ5 □  
 G05 □ □□□K1868Z33p53 □  
 QRb(+bb □ IKZ09M □ 3 b4G5b3q □  
 M □ IO b □ WZ6M □ □  
 Y2M □ Locked Nucleic acid 8KS RNA b98K  
 ZQ □ MG05 □  
 RNA polymerase II K3BMB □  
 % □ LZSE3X □ (OIBZ8Z □  
 2 □ SZ □ Hes7 g Lfng b8L □ RNA 80KZ □  
 G b4G5b3M □ Nrarp c5S4G5 □  
 4 □ OM □  
 2, % 2B □

RNA □ □ c3 □  
 digoxigenin (DIG) □ DIG # mRNA #  
 DIG bo? fluorescein  
 isothiocyanate (FITC)rS biotin #  
 GOK FITC c FITC K avidin e  
 biotin c biotin 90vK  
 M GK FITC #  
 BE )S 2 K G63  
 b4G5b3M □  
 biotin #  
 S FITC / c DIG #v  
 FITC # RNA e  
 Hes7 b Lfng B Nrarp BA Nrarp #  
 S



W 4 2 #  
 Hes7 Lfng #  
 Nrarp #  
 Hes7 b Lfng B Nrarp BA Nrarp #  
 Lfng b 3



- Hayashi, S., Nakahata, Y., Kohno, K., Matsui, T., and Bessho, Y. (2018) Presomitic mesoderm-specific expression of the transcriptional repressor Hes7 is controlled by E-box, T-box, and Notch signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 239, 12167-12176. doi: 10.1074/jbc.RA118.003728
- Ishimatsu, K., Hiscock, T.W., Collins, Z.M., Sari D.W.K, Lischer, K., Richmond, D.L., Bessho, Y., Matsui, T., and Megason S.G. (2018) Size-reduced embryos reveal a gradient scaling-based mechanism for zebrafish somite formation. *Development* 145, dev161257. doi: 10.1242/dev.161257
- Sari, D.W.K., Akiyama, R., Naoki, H., Ishijima, H., Bessho, Y., and Matsui, T. (2018) Time-lapse observation of stepwise regression of Erk activity in zebrafish presomitic mesoderm. *Scientific Reports* 8, 4335. doi: 10.1038/s41598-018-22619-9
- Nozoe, H., Yamada, T., Sakumura, Y., Bessho, Y., and Ikeda, K. (2018) Stochasticity Promotes Synchronized Gene Expression between Cells in Somite Segmentation. *Biophysical Journal* 114, 152A. doi: 10.1016/j.bpj.2017.11.854
- Nakahata Yasukazu, Yasukawa Shiori, Khaidizar Fiqri Dizar, Shimba Shigeki, Matsui Takaaki, and Bessho Y. (2018) Bmal1-deficient mouse fibroblast cells do not provide premature cellular senescence in vitro. *Chronobiology International* 35, 730-738. doi: 10.1080/07420528.2018.1430038
- Khaidizar, F.D., Nakahata, Y., Kume, A., Sumizawa, K., Kohno, K., Matsui, T., and Bessho, Y. (2017) Nicotinamide phosphoribosyltransferase delays cellular senescence by upregulating SIRT1 activity and antioxidant genes expression in mouse cells. *Genes to Cells*, 22, 982-992. doi: 10.1111/gtc.12541
- Yamada, S., Iino, T., Bessho, Y., Hosokawa, Y., and Matsui, T. (2017) Quantitative analysis of mechanical force required for cell extrusion in zebrafish embryonic epithelia. *Biology Open*, 6, 1575-1580. doi: 10.1242/bio.027847
- Matsui, T., and Bessho, Y. (2017) Analyzing ERK signal dynamics during zebrafish somitogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1487, 367-378. [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6424-6\\_27](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6424-6_27)
- Nakahata, Y., and Bessho, Y. (2016) The Circadian NAD+ Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging. *Biomed Res. Int.*, 2016, 3208429. doi: 10.1155/2016/3208429.

