

様式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成24年度）

1. 機関番号 

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成24年度～平成25年度

5. 課題番号 

2	4	6	5	1	2	3	0
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 Gene dosageを利用したマウス個体でのNotchシグナル活性の調節

## 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
7 0 2 6 1 2 5 3	ベツヨ ヤスマサ 別所 康全	バイオサイエンス研究科	教授

## 8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

## 9. 研究実績の概要

動的な生命現象の動作原理を解析するためには、細胞内シグナル活性を操作することは有効である。しかしそれを安定的かつ定量的に制御することは困難である。我々はマウスにおいてNotchシグナル活性をGene dosage効果によって、遺伝学的に増強させたマウスを作製する。Notch1遺伝子を本来の遺伝子座で重複させるために、本来のNotchシグナルの時空間的制御を保ったまま、シグナルはエンハンスされる。我々のこれまでの研究で、体節周期を制御する遺伝子発現振動の周期が、Notchシグナル活性に依存して変化することが明らかになってきたが、本研究で作製する遺伝子改変マウスを使えばNotch活性を安定的かつ定量的に変化させることができるので、その相関を定量的に解析することができる。

マウスNotch1遺伝子を重複させた遺伝子改変マウスの作製を開始した。Notch1遺伝子の上流の約13.5kbを遺伝子調節領域と考え、その上流にNeoカセットを伴ったLoxP配列を、ホモロガスコンビネーション法によって、ES細胞のゲノムに導入する。また、Notch1遺伝子の下流にPuromycine耐性遺伝子カセットを伴ったlocP配列を同様にES細胞に導入する。両変異が導入された細胞株にCreレコンビナーゼを導入されたES細胞に発現させ、アリル間組み替えをおこなわせる。現在変異ベクターを作製し、ホモロガスコンビネーション法による組み替え実験の準備をしている。

## 10. キーワード

(1) Notch

(2) 遺伝子

(3) ジェノム編集

(4) マウス

(5) 体節

(6)

(7)

(8)

## 11. 現在までの達成度

(区分) (3) やや遅れている。

(理由)

Notch1遺伝子がたいへん大きいために遺伝子改変に用いるベクターの作製に遅れが生じている。今後全力をあげてすすめていく。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

Notchシグナル活性を定量的に調節することができる遺伝子改変マウスを作製する目的で、マウスNotch1遺伝子を重複させるためのノックインベクターの作製を継続しておこなう。Notch1遺伝子上流の約13.5kbにNeoカセットを伴ったLoxP配列を、ホモログスコンビネーション法によって、ES細胞のゲノムに導入する。正しくホモログスコンビネーションが起こったES細胞をPCR法およびサザンブロット法によって選択する。得られたES細胞株に、Notch1遺伝子下流にPuromycine耐性遺伝子カセットを伴ったlocP配列を同様に導入する。同様にホモログスコンビネーションが正しく起こった細胞株を選択する。両変異が導入された細胞株にCreレコンビナーゼを導入されたES細胞に発現させ、アリル間組み替えをおこなわせる。

得られたES細胞株をマウス初期胚にインジェクションし、キメラマウスの作製、キメラマウスの掛け合わせにより、ヘテロ接合体、ホモ接合体を得て、それらを用いて体節形成過程を観察し、Notch1遺伝子のgene dosage効果によるNotchシグナル活性の変化が発生にどのように影響するかを解析する。

(次年度の研究費の使用計画)

該当なし

## 13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名	論文標題			
Nakashima et al.	Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
J. Physiol.	有	591	2 0 1 3	1749-1769
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
doi: 10.1113/jphysiol.2012.247361.				

著者名	論文標題			
Matsui et al.	Celf1 regulation of dmrt2a is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Development	有	139	2 0 1 2	1553-1560
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
doi: 10.1242/dev.077263.				

著者名	論文標題			
Matsui et al.	Left-right asymmetry in zebrafish			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Cell Mol Life Sci.	有	69	2 0 1 2	3069-3077
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
doi: 10.1007/s00018-012-0985-6.				

〔学会発表〕計(5)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名	発表標題	
別所 康全	形づくりを制御する2時間周期の生物時計	
学会等名	発表年月日	発表場所
生物リズム若手研究者の集い2012(招待講演)	2012年08月04日	茨城県つくば市

発表者名	発表標題	
Natsui Takaaki	Celf1 regulation of dmrt2a is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development	
学会等名	発表年月日	発表場所
第35回 日本分子生物学会年会	2012年12月11日	福岡県福岡市

発表者名	発表標題	
森本佳世子	マウス発生過程における、vivo-Morpholinoを用いた遺伝子ノックダウン法の確立	
学会等名	発表年月日	発表場所
第35回 日本分子生物学会年会	2012年12月11日	福岡県福岡市

発表者名	発表標題	
Bambang Retnoaji	A possible mechanism which adjusts differences between anterior- and posterior-somitogenesis in zebrafish	
学会等名	発表年月日	発表場所
第18回 小型魚類研究会	2012年09月22日	京都府京都市

発表者名		発表標題	
Tatsuro Matta		Cell clustering required for proper organogenesis	
学会等名		発表年月日	発表場所
第18回 小型魚類研究会		2012年09月22日	京都府京都市

〔図書〕計(0)件

著者名		出版社		
書名			発行年	総ページ数

## 14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

A large, empty rectangular box with a black border, intended for writing preparation notes. It occupies the upper half of the page.