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２８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２８年度～平成２９年度

5．課題番号　1 6 K 1 5 2 2 0

6．研究課題名　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

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	ベツシヨ　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

2倍体生物では、1つの細胞は任意の遺伝子を2つしか持たないので、1つの細胞についてある遺伝子のある瞬間の転写状態は、2遺伝子座が転写されている、1遺伝子座が転写されている、転写されていない、の3状態しかない。組織レベルで転写が活性化されている領域でも必ずしも全ての遺伝子座が転写されているわけでなく、3状態の細胞が混在している。マウス胚尾部では、一群の遺伝子の転写が周期的にONとOFFを繰り返している(振動している)が、それらの遺伝子の中で同じ転写制御を受ける3つの遺伝子の転写活性状態を、それぞれの細胞の遺伝子座レベルで同時に検出し、それぞれの転写活性化のキネティックス、遺伝子座間の協調性などを解明することを目指した。

マウス胚尾部で発現が振動している遺伝子として、Hes7、Lunatic Fringe (Lfng)、Notch-regulated ankyrin repeat protein (Nrarp)に着目した。これらの遺伝子の発現はマウス胚の体節形成周期に同期して、2時間周期で振動している。3つの遺伝子の転写はNotchシグナルによって促進され、また転写因子Hes7によって抑制されるが、Notchシグナル活性、Hes7タンパク質の量が、それぞれ２時間周期で増減するので、組織レベルでは同調して振動することが観察される。

まず、３つの遺伝子の転写状態を単独で、核細胞の遺伝子座レベルで検出することを試みた。これまでに蛍光プローブを用いて、転写の遺伝子座レベルの検出は成功しているが、本研究では当該の遺伝子座の転写状態を調べようとするものであるので、検出感度を高めて偽陰性率を低くする必要がある。今年度は検出感度を高める条件を検討し、ほぼ条件を決めることができた。

10.キーワード

(1) 転写	(2) 発生	(3) 転写因子	(4) 同調
(5) Notch	(6)	(7)	(8)

11.現在までの進捗状況

（区分）（3）やや遅れている。

（理由）

蛍光プローブを用いたin situ hybridizationによって遺伝子座レベルでの転写を検出する手法は、既に確立されたものであるが、これまでは遺伝子座ごとの解析はおこなわれていないので、検出感度はある程度以上であれば問題にはならなかった。しかし本研究では遺伝子座レベルの転写活性化状態のキネティックスを評価しようとしているので、検出感度を十分に高くする必要がある。検出感度を高くするための条件検討に時間を要した。

12.今後の研究の推進方策　等

（今後の推進方策）

対象とする３つの遺伝子のぞれぞれの転写活性化状態を遺伝子座レベルで検出し、解析をおこなう。Hes7、Lfngについてはある程度研究が進んでいるので、Nrarpについてデータ解析を進める。Hes7、Lfngについては、転写直後の転写産物を検出するために、イントロン領域にプローブを設定して、成熟したmRNAが検出されないようにしている。しかしNrarpはイントロンを持たない遺伝子であるために、その手法が使えない。コーディング領域をにプローブに設定したプローブでは成熟したmRNAを同時に検出してしまうので、バックグランドを高めてしまうことになるが、核内のスポット状のシグナルを評価すればよいので理論的には、コーディングに設定したプローブでも転写活性化状態の遺伝子座レベルでの検出は可能である。実験条件をさらに検討してNrarpの転写家政科状態の検出をおこなう。

３つの遺伝子のうち、２つずつの組み合わせで遺伝子座レベルでの転写活性化状態を同時に検出する。

さらに３つの遺伝子の遺伝子座レベルでの転写活性化状態を同時に検出する。同時に遺伝子ごとの転写キネティックスを評価して、数理モデルを構築することを試みる。

（次年度使用額が生じた理由と使用計画）

（理由）

（使用計画）

（課題番号： 16K15220 ）

13.研究発表（平成２８年度の研究成果）

〔雑誌論文〕　計（２）件／うち査読付論文　計（１）件／うち国際共著　計（０）件／うちオープンアクセス　計（０）件

著者名	論文標題
Nakahata Y, Bessho Y	The Circadian NAD+ Metabolism: Impact on Chromatin Remodeling and Aging

雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Biomed Research International	無	2016	2016	3208429	－

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）
10.1155/2016/3208429

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

著者名	論文標題
Matsui,T, Bessho Y	Analyzing ERK Signal Dynamics during Zebrafish Somitogenesis

雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Methods Mol. Biol.	有	1487	2017	367-378	－

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）
10.1007/978-1-4939-6424-6_27

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

〔学会発表〕　計（５）件／うち招待講演　計（１）件／うち国際学会　計（３）件

発表者名	発表標題
Bessho Y	Dynamics of cellular behavior during zebrafish development

学会等名	発表年月日	発表場所
KRIPIK-SciFiMaS 2016 International Conference（招待講演）（国際学会）	2016年05月26日	Purwokerto, Indonesia

発表者名	発表標題	
Ashimori A, Nakahata Y, Matsui T, Bessho Y	Molecular Mechanism to Lengthen the Circadian Period by Low NAD+	
学会等名	**発表年月日**	**発表場所**
International Symposium on Biological Thythms（国際学会）	2016年11月11日	名古屋大学豊田講堂、愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Iwamoto S, Nakahata Y, Ashimoro A, Matsui T, Bessho Y	The Impact of Decrease in NAD+ with Cellular Senscence on the Period of Circadian Gene Expression	
学会等名	**発表年月日**	**発表場所**
International Symposium on Biological Thythms（国際学会）	2016年11月11日	名古屋大学豊田講堂、愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Ashimori A, Nakahata Y, Matsui T, Bessho Y	Molecular Mechanism to Lengthen the Circadian Period by Low NAD+	
学会等名	**発表年月日**	**発表場所**
時間生物学会	2016年11月12日～ 2016年11月13日	名古屋大学豊田講堂、愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Iwamoto S, Nakahata Y, Ashimoro A, Matsui T, Bessho Y	The Impact of Decrease in NAD+ with Cellular Senscence on the Period of Circadian Gene Expression	
学会等名	**発表年月日**	**発表場所**
時間生物学会	2016年11月12日～ 2016年11月13日	名古屋大学豊田講堂、愛知県名古屋市

〔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 出願年月日	国内・外国の別

15.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

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

（1）国際共同研究：－

17.備考

（課題番号： 16K15220 ）
（注）・印刷に当たっては、Ａ４判（縦長）・両面印刷すること。