

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		ゲノムの核内配置と転写活性化機構の動態解析法の開発			
研究テーマ (欧文) AZ		Simultaneous imaging of active transcription and nuclear position in living cells			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓)ムラモト	名)テツヤ	研究期間 B	2015 ~ 2017 年
	漢字 CB	村本	哲哉	報告年度 YR	2017 年
	ローマ字 CZ	Muramoto	Tetsuya	研究機関名	東邦大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東邦大学理学部・講師			
概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)					
<p>同一条件下で培養し、形態学的に同じに見える細胞集団でも、1 細胞レベルでの mRNA 量やタンパク質量に不均一性がみられることが報告されている。そこで本研究では、その不均一性を生み出す一因と考えられる転写とそのゲノム領域のダイナミクスを 1 細胞レベルで同時に計測・可視化する技術の開発を行うことで、細胞間で見られる不均一性を理解するための研究基盤を構築することを目指した。転写の活性化状態の可視化には、MS2 リピート配列を目的遺伝子の中にノックインする方法を用いた。未分化状態でも活発に発現するアクチン遺伝子や分化過程で発現する細胞接着に関わる遺伝子を標的とすることで、転写の活性化レベルが可視化でき、細胞間で異なる様子が確認された。一方、それらの遺伝子の核内配置を可視化する方法として、ゲノム編集技術で広く用いられている CRISPR/Cas9 システムを応用した。MS2 リピートを標的とする sgRNA を設計し、dCas9-GFP を用いた可視化を行った結果、生細胞内で標的遺伝子領域を示す輝点は観察されなかった。その原因として、標的 sgRNA の発現量が低く、効率よく dCas9 と sgRNA の結合が起こっていない可能性が示唆された。そこで、標的 sgRNA の発現系を改良し、tRNA のプロセッシング過程を利用した発現系を構築した。その結果、従来の U6 プロモーターより約 10 倍の発現量を示すことがわかり、さらに核内での dCas9 と sgRNA の結合割合が増加したことがわかった。この結果は、標的遺伝子の転写阻害やゲノム編集の効率化という側面からも確認され、このシステムを用いた複数遺伝子同時改変技術の確立に成功した。このことから、この発現系で核内配置の可視化と転写活性化機構をイメージングできる可能性が期待される。</p>					
キーワード FA	イメージング	CRISPR/Cas9	転写動態		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in Dictyostelium							
	著者名 ^{GA}	Ryoya Sekine, Takefumi Kawata, and Tetsuya Muramoto	雑誌名 ^{GC}	Scientific Reports					
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}	2	0	1	8	巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Heterogeneity exists in the amount of mRNA and protein levels observed at the single cell level, even in a cell population cultured under the same conditions. Therefore, we have developed a technique to enable simultaneous visualisation of transcription and the position of its genomic region within the nucleus with the aim of building a research base from which to understand heterogeneity. To visualise the active transcriptional state, MS2 repeats were knocked into target genes. By visualising constitutively active gene and gene related to cell adhesion during differentiation, transcriptional heterogeneity between individual cells was observed. To visualise the spatial position of gene regions, we applied the CRISPR/Cas9 system, which is widely used for genome editing. sgRNAs were designed against MS2 repeats to visualise the position using dCas9-GFP; no bright spot was observed within the nucleus in living cells, suggesting that expression levels of sgRNA can be low, and sgRNA and dCas9 may not be bound efficiently. Therefore, we improved the expression system of target sgRNA by utilising the endogenous tRNA-processing system. As a result, expression levels were approximately 10 times more effective than the commonly used U6 promoter, and the assembly of dCas9 and sgRNA was improved. This improvement was also confirmed by effective transcriptional inhibition and genome editing, and we successfully established simultaneous targeting of multiple genes using this system.