

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651212

研究課題名(和文)新規ポリA鎖長決定法を用いた翻訳と転写を結ぶ遺伝子発現制御プラットフォームの構築

研究課題名(英文)Construction of a transcriptional-translational regulation platform using a novel poly(A) determination method.

研究代表者

程 肇(Tei, Hajime)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：00242115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：新規な真核生物のmRNAポリA鎖決定法であるPACHINCO RT-PCR法を構築した。そして、本方法を全自動型DNA分析用マイクロチップ電気泳動装置に適用するための条件の最適化を実施した。その結果、実際にLarkによる哺乳類時計遺伝子Per1 mRNAのポリA鎖伸長を、明快に確認することができた。さらにスループット性と、ポリA鎖長の分析精度を飛躍的に高めることを目的に、この方法を大規模シーケンサへ適用することを試みた。その結果、ラット視交叉上核由来細胞とマウス視交叉上核細胞において、多数のポリA鎖長に概日リズムが見られるmRNAを集積することができた。

研究成果の概要(英文)：I have constructed a novel method for the determination of poly(A) in eukaryotic mRNA, and designated as PACHINCO RT-PCR. The method was optimized for the application of automatic microchip DNA sequencers, and the elongation of the poly(A) of Per1 clock gene transcripts was clearly determined. Subsequently, the method was applied for NGS sequencers for the improvement of the throughput and analytical precision for poly(A) determination. Accordingly, I have collected mRNAs with the circadian oscillation of poly(A) length in both a rat suprachiasmatic nucleus derived cell line and mouse suprachiasmatic cells.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム生物学

キーワード：概日リズム 時計遺伝子 視交叉上核 Per1 poly(A) 翻訳制御

## 1. 研究開始当初の背景

DNA の遺伝情報は、mRNA への転写、タンパク質への翻訳を通して発現する。多くの生物で遺伝子発現は、転写段階で制御されていると考えられてきた。しかし近年、転写制御だけでは説明できないタンパク質発現制御機構が明らかになるにつれ、今まで殆ど着目されなかった翻訳制御にも研究の焦点が当てられ始めた。真核生物の場合、mRNA の 5' 末端にある CAP 構造、ならびに 3' 末端の poly(A) は、転写された後に DNA 配列非依存的に付加され、翻訳反応の必須構造である。最近動物の発生や学習及び miRNA 発現抑制等の様々な生命現象において、mRNA のポリ A 鎖長制御が遺伝子発現の基本的制御機構の一つとして注目を集めている。哺乳類の時計遺伝子 Period1(Per1) mRNA 及び Per1 タンパク質の発現リズムには長時間の位相差が観察されるため、Per1 の転写後制御の分子機構の解明に着手した。そして、Per1 の翻訳活性化に機能する Lark を単離した。実際 Lark は、Per1 mRNA の 3' UTR 長を延長させて翻訳を活性化していた。一般に mRNA のポリ A 鎖長は、同一遺伝子由来でも不均一な分布をもち、その長さ(平均値と分散)を簡便にかつ厳密に決定できる方法は今のところない。そこで従来 of Anchored RT-PCR 法を改良して、ポリ A 鎖を簡便に決定できる PACHINCO(Poly(A) Capture by Hairpin Chimeric Oligonucleotide)-RT-PCR 法を考案した。この方法を用いて Per1 mRNA のポリ A を経時的に測定した結果、Per1 タンパク質発現の極大点で、そのポリ A も最長であった。新規開発したポリ A 鎖検出法は確かに感度がよくスループット性も高いが、ポリ A 鎖長は連続した分布図として得られる。この分布から得られる情報はポリ A 鎖長の平均値と分散であり、実際の mRNA 分子に付加されている離散的なポリ A 鎖長値を精度よく求めることはできていない。

## 2. 研究の目的

遺伝子発現制御は殆どの生物の営みの重要な基盤をなす。この制御機構は大きく転写制御と転写後制御機構(翻訳やタンパク質分解)に分けられる。最近転写制御だけでは説明できないタンパク質発現制御の具体例が集積されつつあるが、今まで主に転写制御に焦点が当てられてきたため、翻訳制御についての解明は殆どなされていない。ましてや翻訳制御の重要な一端を担う mRNA ポリ A 鎖長を包括的に解析する研究は今までない。本研究では、新規に開発したハイスループットな mRNA ポリ A 鎖長決定法を用いて、生命科学の重要な主題である概日リズムにおいて、転写制御あるいは細胞内 mRNA ポリ

A 鎖長の制御による翻訳制御を受けている遺伝子をそれぞれ検索し、この生物現象の成立に果たす双方の遺伝子発現制御とその相互作用の意義の解明を目的とする。さらに、今までその存在すら明らかでなかった、ポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA を哺乳類の時計細胞で包括的に検索し、さらにそれらと転写日周リズムを有する遺伝子群と比較することで、転写と翻訳それぞれの制御、及びそれらの相互作用が概日リズム形成に果たす機能の解明に、世界で初めて端緒をつけるという野心的な課題に挑戦する。本研究で実施するポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA と転写日周リズムを有する遺伝子のゲノムワイド検索の結果は、哺乳類の行動形成に機能する転写と翻訳の相互作用ネットワークの時間的制御という斬新かつユニークな分野を創出することができ、脳神経システムの理解、ならびに体内時計の機能異常が原因となる種々の疾患の発症機構の解明やその診断・治療への展開が可能である。その上、遺伝子の転写と翻訳制御、並びにそれらの相互作用が果たす新規かつ普遍的な遺伝子発現制御原理を明らかにできることが期待できる。

## 3. 研究の方法

本研究では PACHINCO-RT-PCR 法のハイスループット化さらに進めるために、まず蛍光プライマーを導入し DNA シークエンサに対応させた改変 PACHINCO-RT-PCR 法を構築する。この方法を用いてポリ A 鎖長に概日リズムを有する mRNA の検索をゲノムワイドに展開するとともに、その結果を転写日周リズムをもつ遺伝子と比較参照することで、これらがリズム形成に果たす機能を解明する。その結果、概日リズムにおける転写と翻訳を結ぶ遺伝子発現制御プラットフォームの構築を目指す。研究計画の方法は以下である。

[1] シークエンサに対応させたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR 法プライマーの開発、及びその反応と解析の条件検討

シークエンサ対応型ゲノムワイド mRNA 3' UTR 特異的プライマーの設計  
蛍光標識 RNA-DNA キメラアンカーの設計と全 poly(A) mRNA との連結反応の最適化  
シークエンサを用いた PACHINCO-RT-PCR 法の検討  
マウス SCN からの RNA 抽出  
ラット SCN 由来細胞からの RNA 抽出

[2] 視交叉上核(SCN)及び SCN 由来細胞を用いたトランスクリプトーム解析の実施

マウス SCN を用いたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR の実施

ラット SCN 由来細胞を用いたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR の実施

[3] 視交叉上核 (SCN) 及び SCN 由来細胞を用いたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR の実施

マウス SCN を用いたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR の実施

ラット SCN 由来細胞を用いたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR の実施

[4] トランスクリプトーム及びポリ A 鎖長のデータ比較解析ツール及び統合データベースの構築

mRNA 発現レベルに概日リズムが見られる遺伝子の集積とそのプロモータ構造比較解析

ポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA の配列解析

トランスクリプトームと PACHINCO-RT-PCR 法の結果を組み合わせた統合データベースの構築

#### 4. 研究成果

生物には概日リズムとよばれる、約 24 時間周期の自律的な活動リズムが見られる。真核生物の概日リズム形成には、転写制御フィードバックループが一義的な機能を担うとされる。一方転写リズムがなくても、多数のタンパク質で発現概日リズムが見出され、タンパク質の時刻依存的濃度変化を構築する転写後制御機構 (翻訳やタンパク質分解) も、概日振動ネットワークが機能するために重要であることが明らかとなった。真核生物の場合、mRNA の 5' 末端にある CAP 構造、ならびに 3' 末端の poly(A) は、転写された後に DNA 配列非依存的に付加され、翻訳反応の必須構造である。一般に mRNA のポリ A 鎖長は、同一遺伝子由来でも不均一な分布をもち、その長さ (平均値と分散) を簡便にかつ厳密に決定できる方法は今のところない。そこで従来からある低効率かつ結果がばらつきがちなポリ A 鎖決定法の Anchored RT-PCR 法を改良して、PACHINCO (Poly(A) Capture by Hairpin Chimeric Oligonucleotide)-RT-PCR 法を構築した。初年度に本方法を全自動型 DNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 (Shimadzu 社) に適用するための条件の最適化を実施した。その結果、実際に Lark による哺乳類時計遺伝子 Per1 mRNA のポリ A 鎖伸長を、明快に確認することができた。さらに、スループット性と、ポリ A 鎖長の分析精度を飛躍的に高めることを目的に、この方法を大規模シーケンサへ適用することを試みた。そして、シーケンサに対応させたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR 法プライマーの開発、及びその反応と解析の条件検討を実施した。

その結果、ラット視交叉上核由来細胞において、多数のポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA を集積することができた。しかし、本法を自動シーケンサへ対応後も、ポリ A 鎖に概日リズムを有する mRNA の集積のために、計画で予想していた以上の期間が必要となった。そのため、視交叉上核細胞を用いたポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA の集積、及びその結果の使用を前提とした、PACHINCO-RT-PCR 法による解析データとの統合データベース構築までは、初年度中にはいかなかった。そこで、最終年度にはトランスクリプトーム及びそれらの結果を用いた統合データベースの構築を実施した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

程 肇

時計遺伝子、転写・翻訳フィードバックループと概日リズム

第 20 回日本時間生物学会(招待講演) 2013. 11.10 於近畿大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

特になし。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

程 肇 (TEI, Hajime)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：00242115

(2)研究分担者  
なし。( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
なし。( )

研究者番号：