

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23651184

研究課題名（和文） 新規ポリ A 鎖長決定法を用いた概日リズムが見られる mRNA のゲノムワイド検索

研究課題名（英文） A Genome-wide screening of circadian transcripts 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

研究成果の概要（和文）：

mRNA のポリ A 鎖長を決定する、PACHINCO (Poly(A) Capture by Hairpin Chimeric Oligonucleotide)-RT-PCR 法を構築した。

本年度は本方法を全自動型 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、poly(A-T) 鎖を効率的に検出する泳動条件を決定し、さらに、自動電気泳動装置からの出力データを用いた poly(A) 鎖長分布解析プログラムを開発した。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel method to determine the length of poly(A) in eukaryotic mRNA, and designated as PACHINCO (Poly(A) Capture by Hairpin Chimeric Oligonucleotide)-RT-PCR.

In this year, we optimized the application of the method to an automated microchip electrophoresis system (MultiNA, SHIMADZU), including the development of the distribution analysis algorithm of a variety of poly(A) length.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・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、Period1、poly(A)、翻訳制御

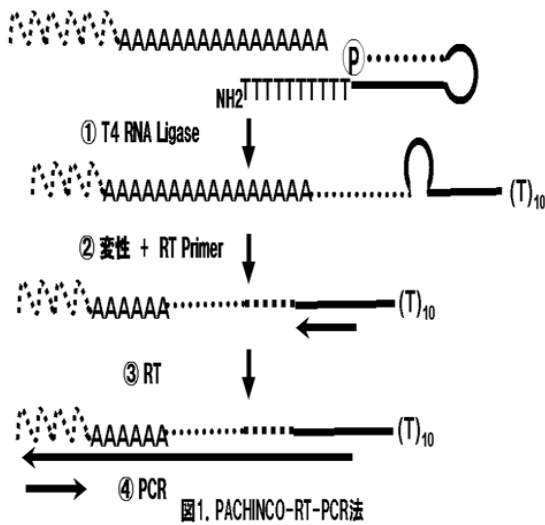
1. 研究開始当初の背景

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 (図 1)。最も重要な改良は、オリゴ dT 構造を含む RNA アンカーである一本鎖 RNA を、ヘアピン型 RNA-DNA キメラオリゴヌクレオチドにした点である。この採用により粘着末端が生成した結果、mRNA 3' 末端連結高効率化と同時に非特異的な mRNA 3' 末端連結抑制が図られ、特異的ポリ A 末端捕捉効率を飛躍的に向上させることに成功していた。



- ① ヘアピン型RNA (点線)-DNA (実線)キメラオリゴアンカーとpoly (A) mRNAの連結反応
- ② アンカー内部分的二重鎖の熱変性ならびに逆転写 (RT) 反応プライマーの添加
- ③ 逆転写酵素 (RT) によるアンカー-poly (A) 鎖連結領域のDNA化
- ④ PCR反応によるpoly (A) 鎖領域の増幅

2. 研究の目的

この方法は原理上、遺伝子特異的 5' PCR プライマーをヒトやマウスゲノム全遺伝子の mRNA 3' UTR に対応させるだけで、ヒトやマウス全 mRNA ポリ A 鎖長をハイスループットに決定する本研究の提案に展開することができる。

そこで、本研究では全自動型 DNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 (Shimadzu 社) を用いた PACHINCO-RT-PCR 法の展開を試みる。さらに、解析のスループット性と分析精度を飛躍的に高めるために、本方法を大規模シーケンサと組み合わせて用いる可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 大規模シーケンサ及びマイクロチップ分析装置を用いたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR 法の条件検討

まず、マウス及びラットの全遺伝子の mRNA 3' UTR に対する共通プライマーの設計ツールを開発する。この設計ツールを用いて、リボソーム RNA 遺伝子や tRNA 遺伝子を除いたマウスとラット全遺伝子 mRNA 3' UTR に対する PCR 増幅用プライマーを設計する。さらに、現在使用しているヘアピン型 RNA-DNA キメラオリゴチドアンカーは、T 鎖が 10 塩基ある。

すなわち解析精度が 10 塩基以上であり、10 塩基以下のポリ A 鎖をもつ mRNA を効率的に測定することができない。この方法をゲノムワイドに展開するにあたり、どこまで極小化できさらに反応ノイズが少ないかを実験的に決定する。そしてアンカーオリゴヌクレオチドと mRNA との連結に用いる RNA ligase は反応生成物による阻害を受けるため、生成物阻害を回避する方法をも考案する。次に PACHINCO-RT-PCR 法は、原理の制約上オリゴ (A-T) 鎖が反応生成物である。ところが一般的に大規模シーケンサは単一ポリヌクレオチド鎖の解読精度が落ちる傾向にある。そこでゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR 法で得られたポリ A 鎖を効率的に解読する大規模シーケンサを選定する。

(2) 視交叉上核 (SCN) 及び SCN 由来細胞より経時的 RNA の抽出

- ① マウス SCN からの RNA 抽出
- ② ラット SCN 由来細胞からの RNA 抽出

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 (図 1)。本年度は本方法を全自動型 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、poly (A-T) 鎖を効率的に検出する泳動条件を決定し (図 2)、さらに、自動電気泳動装置からの出力データを用いた poly (A) 鎖長分布解析プログラムを開発した (図 3)。

そして、この方法の有効性を実際の実験で評価し、実際にマウス視交叉上核 (SCN) 及び SCN 由来細胞内で哺乳類時計遺伝子 *Per1* mRNA のポリ A 鎖伸長収縮を、明快に確認することができた (図 4)。
 本研究をさらに伸展させることで、大規模シーケンサを用いることでスループット性と、ポリ A 鎖長の分析精度を飛躍的に高められると期待できる。

図 2 MULTINA 電気泳動による DNA 解析精度

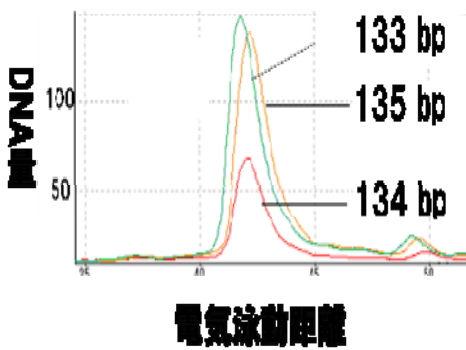
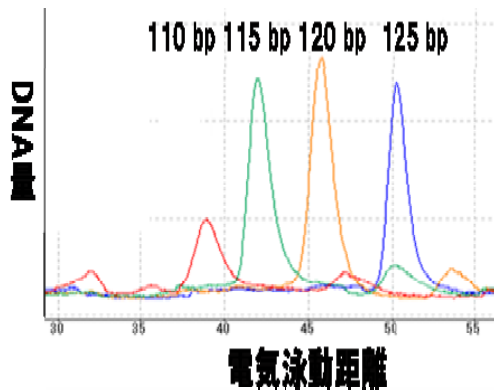
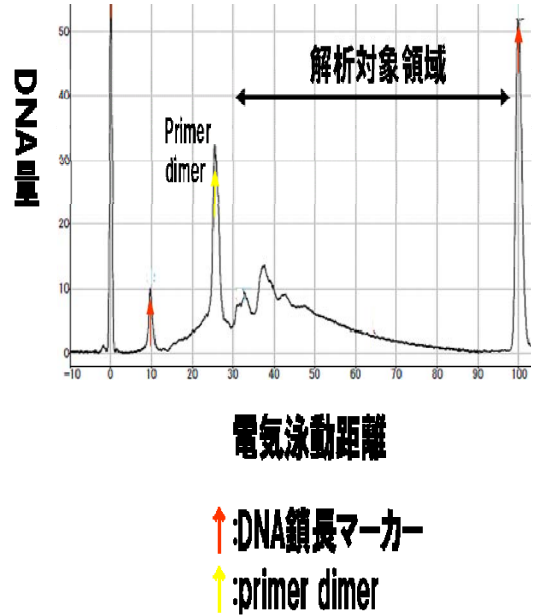
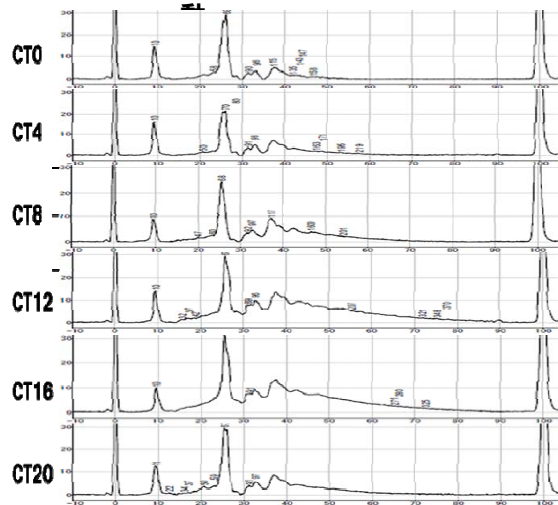


図 3 MULTINA 電気泳動データを用いた poly (A) 鎖長分布解析プログラムによる解析



Sample No.	Peak No.	Peak (bp)	Average (bp)	Variance (bp)
***	9	35, 39, 54, 59, 72, 109, 215, 224, 269	104.6	43.8

図 4 MULTINA 電気泳動による *Per1* mRNA 中ポリ A 鎖長の経時的変



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1件)

①Ogawa Y, Koike N, Kurosawa G, Soga T, Tomita M, Tei H.
Positive Autoregulation Delays the Expression Phase of Mammalian Clock Gene Per2. (査読有)
PLoS One. 6 E18663 (2011).
DOI: 10.1371/journal.pone.0018663

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

(3) 連携研究者

なし