

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640100

研究課題名(和文)概日リズムをモデル系に新規ポリA鎖長決定法を用いた翻訳制御プラットフォームの構築

研究課題名(英文)Development of translational regulation platform of circadian rhythms using a novel poly(A) determination method

研究代表者

程 肇 (Tei, Hajime)

金沢大学・理工研究域自然システム学系・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

研究成果の概要(和文)：一般にmRNAのポリA鎖長は不均一な分布をもち、その長さを簡便にかつ厳密に決定できる方法は存在しない。そこで従来の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。この方法は遺伝子特異的5' PCRプライマーをゲノム全遺伝子のmRNA 3' UTRに対応させるだけで、全mRNAポリA鎖長をハイスループットに決定できる。実際、全自動型DNA分析用マイクロチップ電気泳動装置を用いて、Per1 mRNAのポリA鎖伸長を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：In general, the length of poly (A) in eukaryotic mRNA shows a wide distribution, and at present, there is no precise and simple method to determine it. A novel method for its determination was developed with the improvement of conventional anchored RT-PCR, and designated as PACHINCO (Poly (A) Capture by Hairpin Chimeric Oligonucleotide)-RT-PCR. The new method can be applied for the comprehensive determination of poly (A) in whole cellular mRNAs with simply replacing 5' primers used for PACHINCO-RT-PCR with sequences involved in the corresponding 3'UTRs of mRNA. Indeed, the method was optimized for an automatic microchip DNA electrophoresis apparatus, and the elongation of poly (A) of Per1 mRNA was identified using this system.

研究分野：ゲノム時間生物学

キーワード：概日リズム 時計遺伝子 視交叉上核 翻訳制御 Period1 poly(A)

## 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' 末端のポリ 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。程は哺乳類の時計遺伝子 *Period1* (*Per1*) を同定し、*Per1* が転写日周リズムとともに、その翻訳産物も発現リズムを刻むことを明らかにした (Nature, 1997; Science, 2000; PNAS, 2006)。*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 (BBRC, 2003)。そして、*Per1* の翻訳活性化に機能する *Lark* を単離した (PNAS, 2007)。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。そこで従来の 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。そこで本研究では、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する。さらにそれらと発現日周リズムを有するタンパク質群と参照比較することで、ポリ A 鎖長と翻訳制御の関係、そしてそれが概日リズム形成に果たす意義の解明に、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。

## 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検索した、細胞内 mRNA ポリ A 鎖長が概日性時刻依存的制御を受ける遺伝子が示す、翻訳の制御ダイナミクスを明らかにする。それにより生命科学の重要な主題である概日リズムにおいて、ポリ A 鎖長と翻訳の両制御の関係が示す意義の解明を目的とする。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 と発現日周リズムを持つタンパク質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翻訳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と普遍的な遺伝子発現制御原理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。

## 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。そして、その結果をプロテオーム解析により得られた、発現リズムを有するタンパク質と比較参照することで、翻訳制御がリズム形成に果たす機能と意義を解明する。この極めて挑戦的な研究を立ち上げるために、あえて 1 年間の集中的な研究期間を設定し、概日リズムにおける翻訳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] 視交叉上核 (SCN) 及び SCN 由来細胞を用いたプロテオーム解析の実施

マウス SCN からの粗タンパク質溶液の抽出

ラット SCN 由来細胞からの粗タンパク質溶液の抽出

マウス SCN を用いたプロテオーム解析の実施

ラット SCN 由来細胞を用いたプロテオーム解析の実施

[2] 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 からの RNA 抽出

ラット SCN 由来細胞からの RNA 抽出

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] ポリ A 鎖長のデータ比較解析ツール及び発現統合データベースの構築

ポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA の配列解析

全 mRNA ポリ A 鎖長の経時的変化を取り込んだゲノムワイドなデータベースを作製する。このデータベースを用いて、ポリ A 鎖長に概日リズムが見られる mRNA について位相差に基づいたクラスタリングを行い、各位相で特異的な伸縮を示す mRNA に共通な配列を抽出し、それらの間の相同性あるいは相違性について詳細に解析する。

トランスクリプトーム、プロテオームと PACHINCO-RT-PCR の 3 者の結果を組み合わせた発現統合データベースの構築

前年度得られたトランスクリプトーム、及び [1] と [2] で得られたプロテオームと PACHINCO-RT-PCR の結果を統合したデータベースを構築する。

Lark によりポリ A 鎖長が制御されている mRNA の検索とその解析

[3]- で得られたデータベースより、Lark によりそのポリ A 鎖が制御されている mRNA を同定する。特に概日時計遺伝子に着目して、その遺伝子産物発現とポリ A 鎖伸縮の位相関係、そしてそれが概日リズム形成に果たす生物学的意義について解析する。

### [4] シークエンサに対応させたゲノムワイド PACHINCO-RT-PCR 法の開発

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

マウス及びラットの全遺伝子の mRNA 3' UTR に対するシークエンサ対応型蛍光プライマーを昨年度開発した設計ツールを用いて設計する。そしてマウスとラット全遺伝子 mRNA 3' UTR に対する 5' 蛍光 PCR 増幅用プライマーを設計する。

シークエンサを用いた PACHINCO-RT-PCR 法の検討

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。ところが一般的にシークエンサーは単一ポリヌクレオチド鎖 (今回の場合はポリ A またはポリ T 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シークエンサを選定し、それを用いた詳細な解析条件を決定する。

## 4. 研究成果

遺伝子発現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。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。翻訳制御の中でも特に、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。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。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た。さらに、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できる。実際、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 法で、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、スループット性をさらに高めるために本法をシークエンサに対応させることに成功した。

## 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 1 件)

1. Nangle, SN., Rosensweig, C., Koike, N., Tei, H., Takahashi, JS., Green, CB., Zheng, N.

Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex.

(2014) *Elife* 3, e03674.

(DOI: 10.7554/eLife.03674)

[学会発表](計 4 件)

1. 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 19 回日本時間生物学会学術大会 (招待講演)

2013 年 11 月 10 日 (近畿大学)

2. 大場祐希、松本健、高畑佳史、藤井義明、

程 肇

哺乳類時計遺伝子 *Bmal1* の新規転写機構の解析

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 3 日 (神戸ポートアイランド)

3. 大場祐希、松本健、高畑佳史、藤井義明、  
程 肇  
哺乳類時計遺伝子 *Bmal1* の新規転写制御機構  
の解析  
第 37 回日本分子生物学会年会  
2014 年 11 月 26 日 (パシフィコ横浜)

4. 松浦知諒、高畑佳史、山田洋一、程 肇  
哺乳類時計遺伝子 *Rev-erb* の転写制御機構  
の解明  
第 37 回日本分子生物学会年会  
2014 年 11 月 27 日 (パシフィコ横浜)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

程 肇 (TEI, Hajime)  
金沢大学・理工研究域自然システム学系・教  
授  
研究者番号：00242115

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：