様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 28 年　 6 月 22 日現在

機関番号：12102
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26650004

研究課題名（和文）低分子DNAによる遺伝子発現制御とその応用

研究課題名（英文）Basic and Applied Studies on Regulation of Gene Expression by Small DNAs

研究代表者
馬場　忠（BABA, Tadashi）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：40165056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、細胞質に低分子DNAが存在し、それがmRNAとヘテロ２本鎖を形成することによって遺伝子サイレンシングで機能しているのかを明確にすることである。まず、低分子DNAが各組織で普遍的に存在することが明らかになった。また、いくつかのmRNA分子種に対するRNase H処理の感受性を調べたところ、RNase Hへの感受性はmRNA分子種によって異なり、actinやacrosinは感受性が高く、転写因子であるTRF2やTFIIAγ、ACTはやや抵抗性があることも明確になった。マウス肝臓全RNA中にはほぼ10塩基長の低分子DNAが見いだされたが、それらの配列決定までは研究が進展しなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to explore whether a small DNA is present in somatic cells, and functions in gene silencing. Total cellular RNA was prepared from various mouse tissues, including the testis and liver, annealed to oligo(dT), and treated with commercial RNase H. The protein-coding region of mRNA encoding actin, in addition to the mRNA poly(A) tail, was digested by RNase H in a dose-dependent manner. The susceptibility of actin and acrosin mRNAs to the RNase H treatment was greater than those of TRF2, TFIIAgamma, and ACT mRNAs. Although small DNA with an approximate size of 10 nucleotides was found in liver total RNA, we have been unable to determine the sequence of the DNA yet.

研究分野：生物学

キーワード：低分子核酸　DNA・mRNAハイブリッド　遺伝子サイレンシング　mRNA分解　翻訳抑制　転写後調節

１．研究開始当初の背景

siRNA や miRNA に代表される「小さな RNA」に関する研究は、過去 10 数年のあいだに著しい発展を遂げ、生物の発生や分化、恒常性の維持など広範な生命現象に関与している証拠が次々と報告されている。また、RNA 干渉は、線虫からはじまりショウジョウバエ、動植物などさまざまな生物種に保存された機構であることも明らかとなり、非常に簡便で有効な遺伝子発現抑制（サイレンシング）の手段として幅広く利用されてきた。

私たちは、精子形成過程での精細胞の細胞質で起こる転写後翻訳レベルの研究を mRNA のポリＡ鎖を指標として研究してきた。このため、精子形成分化過程における各種精細胞の mRNA ポリＡ鎖の鎖長変化を調べる必要があった。常用される方法のひとつは、RNA と DNA のヘテロ２本鎖中の RNA 部分を特異的に切断する RNase H を利用するものであり、mRNA ポリＡ鎖に oligo(dT)をハイブリダイズさせ、RNase H 処理後にポリＡ鎖を除去した mRNA のサイズをノーザンブロット法などによって測定するという原理に基づいている。この RNase H 処理の際にやや過剰量の酵素を加えたところ、予想に反して、ポリＡ鎖以外の mRNA 領域も RNase H 分解を受けてしまうことが偶然に見いだされた。さらに驚いたことには、oligo(dT)存在の有無にかかわらず、mRNA が RNase H によって限定分解を受けることも明らかになった。加えて、染色体 DNA が切断されないような温和な条件で RNA を調製した場合でも、調製した RNA 標品を熱や DNase I で前処理した場合でも、RNase H 処理による mRNA 分解に変化がなかった。これらの予備的な結果は、調製・精製した RNA 標品に低分子 DNA が含まれており、それが mRNA とハイブリダイズしていることを示唆している。本研究は、このような先行研究結果を基盤として着想に至った。

２．研究の目的

本研究は、上述の予備的な研究結果をもとにして、細胞質内に低分子性の１本鎖 DNA が存在し、それが mRNA とヘテロ２本鎖を形成することによって遺伝子サイレンシングに関与しているか否かを解明することを目的としている。まず、低分子 DNA の網羅的スクリーニングによってそれらの配列を調べ、細胞内の局在や生成経路を明確にする。次いで、同定した低分子 DNA が細胞質で標的 mRNA の効率的分解や翻訳抑制に関与しているのかを調べる。また、人為的に作製したほかの低分子 DNA でも培養細胞内で機能するかどうかを明らかにする。この研究の特色は、遺伝情報をコードしている DNA が低分子化し、mRNA とのハイブリッド形成によって翻訳を制御しているという新しい発想に基づいている点である。

３．研究の方法

（１）低分子 DNA と RNA ハイブリッド形成の検証

これまでの研究結果から推測すると、室温での RNA 調製時に低分子 DNA と mRNA のハイブリッドはすでに形成されていると考えられる。そこで、大腸菌由来の市販 RNase H によって分解を受ける actin、acrosin、および TRF2 について ^{32}P 標識した RNA を合成し、組織由来の RNA 標品と混合後に熱処理を行って室温に戻す（図１）。さらに、RNase H 処理を行い、標識 RNA の分解を指標として、低分子 DNA が標識 RNA ともハイブリッドを形成するのかどうかを調べる。また、大腸菌ではなく好熱菌 *Thermococcus litoralis* 由来の組換え型 RNase H を利用し、低分子 DNA が RNA から解離するような高温（70℃）条件下で反応を行う（図２）。室温では RNase H 切断が起こるが高温で起こらなければ，生理的温度条件下では実際に低分子 DNA が mRNA とハイブリッドを形成していると結論づけられる。以上の実験によって、細胞内に低分子 DNA が存在することを明確にする。

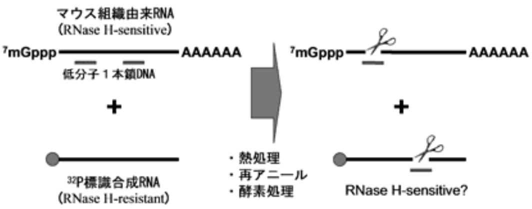

図１　市販 RNase H による低分子 DNA と mRNA ハイブリッドの分解法

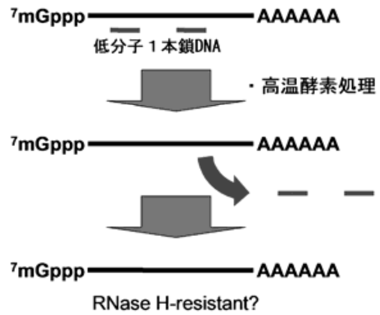

図２　低分子 DNA と mRNA ハイブリッドの熱処理法

（２）低分子 DNA の単離と配列の決定

低分子 DNA が１本鎖なのか２本鎖なのか、あるいは両者の混合であるのかは明確でないが、RNase H の特異性（１本鎖同士の DNA・RNA ハイブリッドの RNA 部分を切断する）を考慮すれば、たとえ低分子 DNA が２本鎖であっても生理的温度では解離して１本鎖になっていると判断できる。したがって、１本鎖低分子 DNA のサイズはおそらく 10 mer 以下であると推測している。そこで、マウス精巣

全 RNA を既報に従って調製し、分子量１万でカットして低分子画分を得る。次いで、配列既知の 3’リンカーと 5’リンカーを順次低分子 DNA へ連結し、Klenow 処理と PCR を行って２本鎖 DNA とする。この DNA を適当なベクターへ挿入後に大腸菌を形質転換し、生じたコロニーを網羅的にピックアップして塩基配列を決定する（図３）。このようにして決定した低分子 DNA の配列をデータベース検索し、それらの DNA の由来に関する情報を得る。

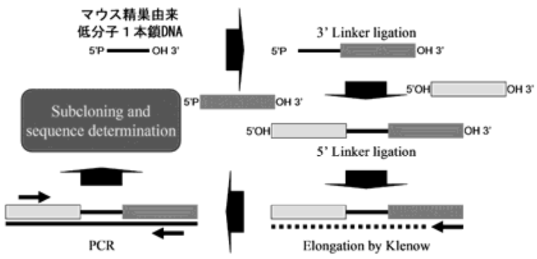

図３　低分子 DNA の単離と配列の決定法

（３）低分子 DNA と RNA のハイブリッド形成部位の同定

RNase H によって分解を受ける actin、acrosin、および TRF2 について、低分子 DNA が mRNA のどの領域に結合しているのかを調べる。まず、RNase H によって消化された mRNA の 3’末端に RNA アダプターを連結し、逆転写酵素による cDNA 合成後に 5’末端上流の任意プライマーを用いて PCR を行う（図４）。得られた DNA 断片の配列を網羅的に決定し、そのデータをもとにして RNase H による切断点、つまり低分子 DNA と mRNA のハイブリッド形成部位を明らかにする。特に、RNase H による分解は酵素量依存的であることから、最低の酵素量で切断される部位、すなわち mRNA 分子内で一番切断されやすい部位が明確になる。

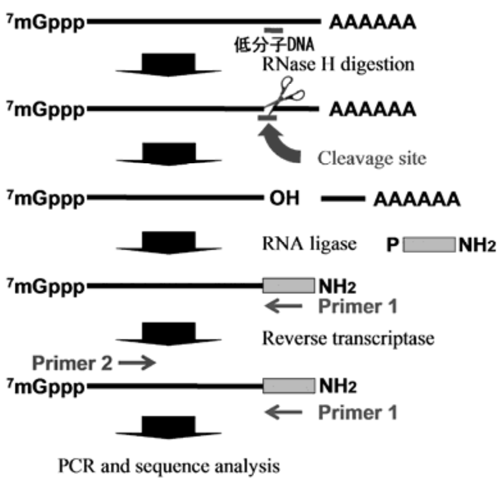

図４　ハイブリッド形成部位の同定法

（４）低分子 DNA の細胞内での局在

マウス精巣切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、同定した低分子 DNA が細胞内のどこに局在しているのかを調べる。この際に、TUNEL 染色も組合せ、アポトーシスを起こしている細胞に特異的なのかどうかを検証する。

（５）低分子 DNA と RNA のハイブリッド形成が翻訳におよぼす影響

低分子 DNA による mRNA･DNA ハイブリッドの形成が翻訳阻害に関与しているかを調べるために、ウサギ網状赤血球無細胞翻訳系を用いて、低分子 DNA が mRNA の翻訳に及ぼす影響を調べる（図５Ａ）。また、翻訳が不活性な非ポリソーム画分(mRNP)と翻訳が活発に行われているポリソーム画分より mRNA を調製し、RNase H に対する感受性を検討する（図５Ｂ）。これらの実験によって、低分子 DNA と翻訳効率との関連が明らかになる。

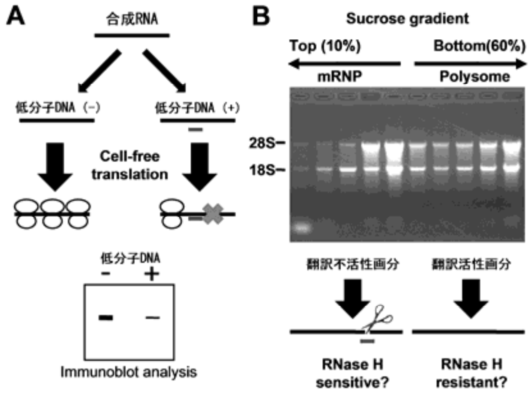

図５　低分子 DNA と RNA のハイブリッド形成による翻訳制御決定法

４．研究成果

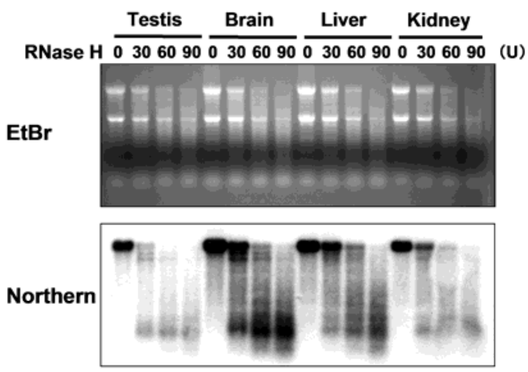

図６　さまざまなマウス組織全 RNA の RNase H 処理

まず、低分子 DNA と RNA のハイブリッド形成が精巣特異的な現象かどうかを調べるために、マウスの脳、肝臓、および腎臓から全 RNA を調製し oligo(dT)処理後に RNase H で反応させた。さらに、actin をプローブとして用いノーザンブロット分析を行った。この現象は精巣特異的なものではなく、ほかの組織由来の RNA サンプルでも類似の結果が得ら

れた（図６）。
次に、精巣全 RNA に含まれるいくつかの mRNA 分子種に対する RNase H 処理の感受性を調べた。その結果、RNase H への感受性は mRNA 分子種によって異なり、actin や acrosin は感受性が高く、転写因子である TRF2 や TFIIAγ、ACT はやや抵抗性があることが明らかになった（図７）。

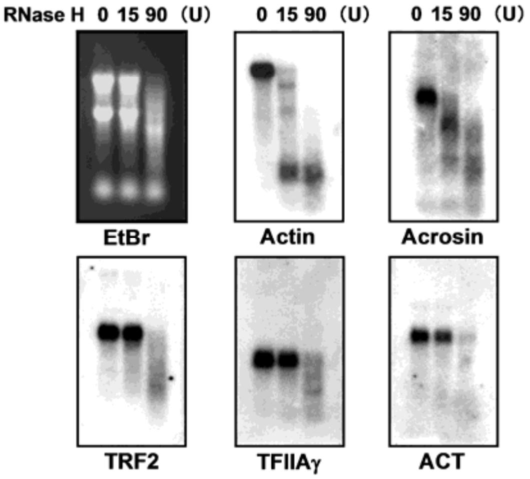

図７　さまざまな mRNA 分子種への RNase H 反応性

精巣全 RNA 標品から低分子画分を調製し、アクリルアミドゲル電気泳動を行い低分子 DNA を単離した。この低分子 DNA の塩基配列を明らかにする目的で、DNA を種々のベクターへ挿入後に大腸菌を形質転換したが、好成績が得られなかった。
そこで、全 RNA 標品中に含まれる分子が DNA かどうかをさらに明確にするために、まず、肝臓由来の全 RNA 標品を水酸化ナトリウム処理し、塩酸で中和後に分解された RNA を除去した。脱リン酸化処理後にアイソトープでリン酸基を再修飾し、尿素ポリアクリルアミド電気泳動で分離した。結果的に、ほぼ 10 塩基の単一スポットが得られ、これが目的の DNA と思われた。この低分子 DNA は非常に微量であると考えられたので、その両末端に人為的に配列既知のアダプターを連結させて、PCR 法で増幅させた後にベクターと連結させて塩基配列の決定を行った。この低分子 DNA に相当するいくつかの配列、すなわち CGGCTGGAGC や ACGGCGCGAC などが見いだされた。しかし、コントロール実験を行っても同様の配列を持つ DNA 様の分子が検出されたため、試薬などに混入した微量分子である可能性も否定できなかった。
全 RNA 標品へ外来性 RNase H を添加すると、時間経過とともに mRNA が限定分解を受ける。そこで、アクチンをモデルとして、低分子 DNA が仲介する分解様式を調べた。アクチン cDNA から人工的にビオチン化した RNA を合成し、肝臓または精巣全 RNA 標品と混和させて RNase H 処理を行った。得られた５個前後の分解産物を精製し、PCR 法で増幅後に配列決定を行った。この実験によって、低分子 DNA が関与する少なくとも６か所のアクチン mRNA 結合部位を同定することができた。
以上の結果から、マウス各種組織由来の全 RNA 中にはほぼ 10 塩基長の低分子 DNA の存在が見いだされたが、それらの配列決定までは研究が進展しなかった。これらの低分子 DNA は細胞内で修飾されている可能性も否定できないため、今後はさらに詳細な検討を加えていく必要がある。これらの塩基配列が明確になれば、この分野の研究が飛躍的に発展することが十分に期待できる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計０件）

〔学会発表〕（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
馬場　忠研究室
http://agbi.tsukuba.ac.jp/~acroman/

６．研究組織
(1)研究代表者
馬場　忠（BABA, Tadashi）
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：40165056

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし