

テクニカルセミナー

1. 多階層性の遺伝子発現制御機構のゲノムワイド解析

平成 29 年 12 月 5 日(火) 13 時 30 分～(約 60 分)

村川 泰裕 先生(M.D., Ph.D.)

(理化学研究所 イノベーション推進センター ユニットリーダー)

2. Eprobe®を用いた核酸検出

平成 29 年 12 月 5 日(火) 14 時 30 分～(約 20 分)

山中 保和 氏 (株式会社ダナフォーム、オリゴ受託合成部)

奈良先端技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 大セミナー室

Summary of presentation 1

遺伝子はmRNAへ転写され、mRNAはさらにタンパク質へ翻訳される。RNAへの転写量はエンハンサーやプロモーターに結合する転写因子により制御されるが、転写されたmRNAも3'UTR領域に結合するRNA結合タンパク質やmicroRNAにより分解の制御を受けている。近年、ショットガンプロテオミクスを用いて約1,000種類ものRNA結合タンパク質(うち300種類が新規)が同定され、またDICER PAR-CLIP法により約2,000種類のヒトmicroRNA(うち400種類が新規)が同定された。

そして、自己免疫に関与するRNA結合蛋白質ROQUINは、3'UTRに存在するAUリッチなステムループ構造を認識して数千の標的RNAを分解に導くことがゲノムワイド解析により示された。このように、転写されたRNAは数千にも及ぶトランス因子により活発な分解を受けており、RNAの発現量は合成と分解のバランスにより決定される。

一方、CAGE法はRNAの5'末端を一塩基レベルで網羅的に解析する技術である。mRNAの5'末端の解析によりプロモーターを同定できるのみならず、エンハンサーから両方向性に転写されるRNA(eRNA)の5'末端を検出することで遠位のシスエレメントであるエンハンサーも同定できる。しかし、従来のCAGE法では細胞内のトータルRNAがinputに用いられてきた。トータルRNA量は上述のように合成と分解の均衡状態であり、CAGEシグナルは真の転写活性を反映していない。特に、eRNAは合成された直後に核内で活発に分解され、トータルRNA中には極僅かしか存在しない。そこで我々は、RNAポリメラーゼIIにより合成中で分解を受ける前の新生鎖RNAを、15分程度のone stepの生化学的作業により精製できる工夫を施し、得られた新生鎖RNAをinputにCAGE法を行った。本法により、eRNA, uaRNA, convRNAなどゲノムの様々な部位から発現する不安定なRNAが超高感度に検出され、転写制御に関与するシスエレメントの包括的な可視化に成功している(未発表)。

一方、CAGE法はRNAの5'末端を一塩基レベルで網羅的に解析する技術である。mRNAの5'末端の解析によりプロモーターを同定できるのみならず、エンハンサーから両方向性に転写されるRNA(eRNA)の5'末端を検出することで遠位のシスエレメントであるエンハンサーも同定できる。しかし、従来のCAGE法では細胞内のトータルRNAがinputに用いられてきた。トータルRNA量は上述のように合成と分解の均衡状態であり、CAGEシグナルは真の転写活性を反映していない。特に、eRNAは合成された直後に核内で活発に分解され、トータルRNA中には極僅かしか存在しない。そこで我々は、RNAポリメラーゼIIにより合成中で分解を受ける前の新生鎖RNAを、15分程度のone stepの生化学的作業により精製できる工夫を施し、得られた新生鎖RNAをinputにCAGE法を行った。本法により、eRNA, uaRNA, convRNAなどゲノムの様々な部位から発現する不安定なRNAが超高感度に検出され、転写制御に関与するシスエレメントの包括的な可視化に成功している(未発表)。

Summary of presentation 2

Eprobe®は株式会社ダナフォームと理化学研究所で共同開発された、新しい発光メカニズムを有する蛍光プローブである。通常のオリゴに比べて10°C程度Tm値が高く、標的となる核酸に特異的にハイブリダイズした場合にのみ強い蛍光を発する。発光に加水分解を伴わないため、PCR後に融解曲線解析を行うことで、1本のEprobe®でSNPだけでなく、体細胞変異も明瞭に感度良く検出することが可能である。本セミナーではEprobe®を用いた核酸検出の実例や、Eprobe®の設計用のツールについて紹介する。

GWAS-SNP over-representation in different genomic regions

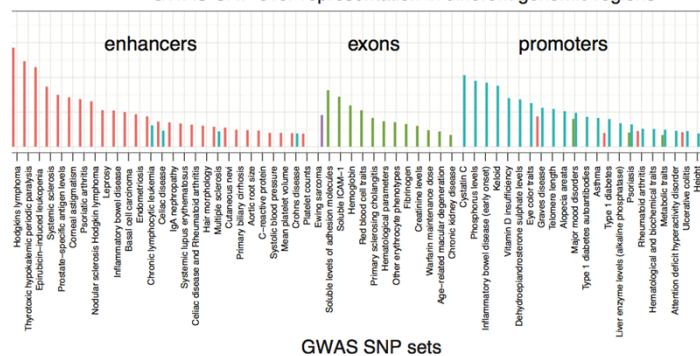


Fig1, GWAS SNP sets preferentially overrepresented within enhancers, exons and mRNA promoters. The horizontal axis gives enrichment odds ratios. The vertical axis shows GWAS traits or diseases.