

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		分子イメージングによる Poly(A) 鎖ダイナミクス解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Molecular imaging of poly(A) tail dynamics			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓) コジマ	名) シホコ	研究期間 B	2015 ~ 2017 年
	漢字 CB	小島	志保子	報告年度 YR	2017 年
	ローマ字 CZ	Kojima	Shihoko	研究機関名	バージニア工科大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		バージニア工科大学 生物科学科 バイオインフォマティクス研究所・准教授			
<p>概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)</p> <p>Poly(A) 鎖は真核生物のほぼ全ての mRNA の 3' 末端に見られる普遍的な構造であるが、その機能や構造はその発見より 40 年たった今もはっきりとしない。本研究の目的は、生細胞イメージングの手法を用いて Poly(A) 鎖の動態を直接モニターし、Poly(A) 鎖長の変化は RNA の一生にどのような影響を与えるのか、なぜ RNA には Poly(A) 鎖が必要なのか、その役割が進化の過程でどのような変化を遂げたのかを明らかにすることであった。</p> <p>本研究を遂行するにあたりまず、試験管内で実験条件の最適化を試みた。生細胞イメージングを達成させるには、蛍光試薬の細胞毒性、細胞透過性等を考慮する必要があり、実験条件を吟味し、最適化することが成功への第一段階だと考えたからである。これにあたり、本提案で提示した2種のモレキュラー・ビーコン(ターゲットビーコン、Poly(T)ビーコン)をデザインし、それぞれのターゲットへの親和性と特異性、そして蛍光共鳴のシグナル・ノイズ比を検証した。少なくとも試験管内では、両ビーコンはターゲットへの親和性があり、蛍光共鳴シグナルを産生可能なことが明らかとなった。しかし、シグナル・ノイズ比はさほど高くなく、実際に細胞内イメージングを可能にするためにはシグナル・ノイズ比を上げる必要であることが明らかとなった。また、Poly(T)ビーコンはターゲットへの親和性はあるものの、鎖長の異なるターゲットを区別し、異なる波長の蛍光を発する能力を欠いていた。よって、今後は異なる Poly(T) ビーコンをデザインし、ターゲットの分別能力を高める必要があることが判明した。これらの成果は、以降の研究の発展に必要不可欠であり、本助成は今度の研究の基盤を生成する役割を果たしたと結論づけられる。</p>					
キーワード FA	Poly(A) 鎖	生細胞イメージング	蛍光共鳴(FRET)	モレキュラー・ビーコン	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Unique characteristics of transcripts regulated by circadian alternative polyadenylation							
	著者名 ^{GA}	Gendreau et al	雑誌名 ^{GC}	submitted					
	ページ ^{GF}		発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}	Modeling the interactions of sense and antisense Period transcripts in the mammalian circadian clock network							
	著者名 ^{GA}	Battogtokh et al	雑誌名 ^{GC}	PLoS Computational Biology					
	ページ ^{GF}	e1005957~	発行年 ^{GE}	2	0	1	8	巻号 ^{GD}	14(2)
雑誌	論文標題 ^{GB}	Period2 3' -UTR and microRNA-24 regulate circadian rhythms by repressing PEIROD2 protein accumulation							
	著者名 ^{GA}	Yoo et al	雑誌名 ^{GC}	Proc. Natl. Acad. Sci. USA					
	ページ ^{GF}	E8855~E8864	発行年 ^{GE}	2	0	1	7	巻号 ^{GD}	114(42)
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Poly (A) tail is a multimeric sequence of adenosine attached at the end of mRNAs. Even though it was discovered more than 40 years, functions of poly (A) tail are still not fully understand, primarily due to the technical difficulties in measuring the kinetics of poly(A) tails, particularly at real-time. Since poly(A) tail length changes dynamically, and even structure is found to be more diverse than previously anticipated, it is essential to develop different methodologies to analyze the true function of poly(A) tails. This proposal sought to monitor and visualize the dynamics of poly(A) tail in a live cell using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) between the two molecular beacons that recognize target mRNA and different length of poly(A) tails.

To achieve the goal, we first attempted to optimize the experimental conditions in vitro. Based on the original proposal, I designed two types of molecular beacons: Target beacon and poly (T) beacon. These molecular beacons must specifically interact with their target. They should also be cell permeable but not cytotoxic. It is also important to attain high S/N ratio of the FRET to ultimately achieve live cell imaging. The beacons I designed had an affinity for the target and produced FRET signals in vitro. However, the S/N ratio was not high to tolerate live cell imaging. Furthermore, the poly (T) beacon lacked the ability to distinguish target RNAs with different lengths of poly(A) tails, and it is necessary to re-design the beacons. Overall, these results help developing the new strategy in the future to ultimately achieve the goal of this proposal.