

**【目的】** 遺伝子発現は細胞の状態を決定する最も基本的な調節因子の一つである。細胞内 RNA は、インスリン刺激などの様々な刺激に応答することで変動を示し、その量は合成と分解のバランスにより制御を受ける。近年、SLAM-seq や BRIC-seq など、核酸アナログによる RNA 標識を用いて RNA 合成速度や分解速度を計測する手法が多く開発されている。しかしながら、これらを同時に定量する手法は未だ存在しない。したがって本研究では、複数の核酸アナログを用いて細胞内 RNA の合成速度および分解速度を同時かつ網羅的に計測する新規手法を開発した。

**【方法】** 本研究では、4-チオウリジン (4sU) と 5-ブロモウリジン (BrU) の同時標識を用いて、細胞内 RNA 合成および分解速度を同時かつ網羅的に計測する新規手法“Dyrec-seq”を開発した。初めに BrU を含む培地を用いてヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を培養し、細胞内 RNA を BrU 標識した。続いて、培地を 4sU を含むものと交換し、時系列で細胞内 RNA を回収・精製した。培地交換に伴って、BrU 標識 RNA は時間依存的な減少を、4sU 標識 RNA は時間依存的な増加を示す。次世代シーケンサ (NGS) を用いて回収した RNA を解析することにより、培地交換後の各時点における 4sU 標識 RNA および BrU 標識 RNA を情報学的に定量した。また、これらの標識 RNA の時間的変化を、微分方程式を用いた数理モデルにフィッティングすることで、個々の RNA の合成速度と分解速度を定量した。

**【結果】** 本研究により、4,702 遺伝子に由来する細胞内 RNA について合成速度と分解速度を同時計測した。またそれぞれの合成速度と分解速度により遺伝子进行分类・機能解析を行うことで、遺伝子の生物学的機能によって RNA の合成速度や分解速度が決定されている可能性が示唆された。さらに数理解析と実測値を比較した結果、細胞内 RNA 量は合成速度および分解速度の比で決定される一方、外部刺激に対する応答速度は分解速度のみで決定されることが明らかになった。これらにより遺伝子発現プロファイルの形成には、転写のみならず RNA 分解も重要であることが明らかになった。この様に複数の核酸アナログを用いて各段階の RNA 制御を実測する手法を総称し、我々は“RNA dynamics recording”という概念を提唱している。今後は本研究で開発した Dyrec-seq を用いて、インスリン刺激に応答する RNA 合成速度および分解速度の変化を定量する。これにより、インスリン刺激に応答した遺伝子発現変動に対する転写制御および分解制御の寄与を解明する予定である。

RNA 合成および分解速度を同時定量する新規手法“Dyrec-seq”の概要

