

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成30年4月25日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所 属 部 局 iPS細胞研究所 未来生命科学開拓部門

職 名 特別研究員

氏 名 中 西 秀 之

| | | | | |
|--------------------------------|--|-------------|---------|--|
| 助 成 の 種 類 | 平成29年度 ・ 研究活動推進助成 | | | |
| 申請時の科研費 研究 課 題 名 | 生細胞において活性を持つmicroRNAの高効率・網羅的探索システムの開発 | | | |
| 上記以外で助成金を 充 当 した 研 究 内 容 | 高感受性microRNA応答レポーター開発のための翻訳制御システム構築 | | | |
| 助成金充当に関 わる共同研究者 | (所属・職名・氏名) 京都大学iPS細胞研究所・教授・齊藤博英 | | | |
| 発表学会文献等 | (この研究成果を発表した学会・文献等) なし | | | |
| 成 果 の 概 要 | 研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」) | | | |
| 会 計 報 告 | 交付を受けた助成金額 | 1,000,000 円 | | |
| | 使用した助成金額 | 1,000,000 円 | | |
| | 返納すべき助成金額 | 0 円 | | |
| | 助成金の使途内訳 | 費 目 | 金 額 | |
| | | 酵素類 | 285,843 | |
| | | シーケンス解析 | 196,049 | |
| | | 核酸精製 | 147,312 | |
| | | 遺伝子導入試薬 | 105,473 | |
| 実験機械 | | 101,952 | | |
| オリゴDNA合成 | 55,076 | | | |
| その他消耗品、学会参加費 | 108,295 | | | |
| 当財団の助成に つ い て | (今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 申請書ならびに報告書が比較的簡略化されていて実験に割くべき時間をあまり消費せずに済んだ点や、申請時以外の研究内容に対する助成金充当が認められている点はあると感じました。 | | | |

① 生細胞において活性を持つ microRNA の高効率・網羅的探索システムの開発

本研究の内容は、レポーター遺伝子を持つベクターに microRNA (miRNA) 標的配列を付加し、レポーターの発現変化に基づき標的細胞内において活性を持つ miRNA を探索するシステムを構築するというものである。

このシステムの実現のため、報告者はレポーター遺伝子と Cre recombinase の組換え配列、ならびに Negative selection 用の NfsB 遺伝子を有するベクターである pAAVS1-CAG-tagRFP-hmAG1_FloxEF1NfsB (図 1A 上) を構築し、これを 293FT 細胞のゲノムに組み込むことで安定発現細胞株を構築した。また、この安定発現株におけるレポーター遺伝子の発現も確認できた (図 1B 左, 中央)。加えて、メトロニダゾールを活性化させる作用を持つ NfsB 遺伝子を有するこの安定発現株は、通常の 293FT 細胞には無害であるメトロニダゾールにより除去可能であることも確認できた (図 1C 左, 中央)。

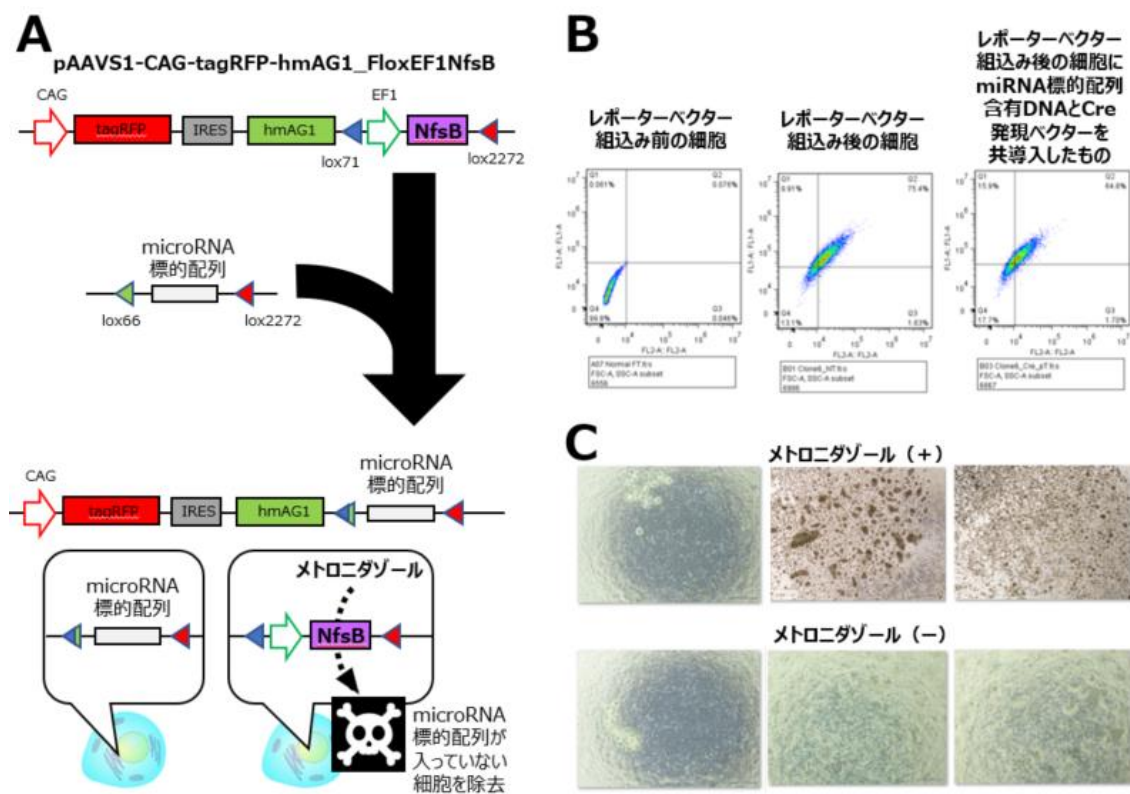


図1：レポーターへのmiRNA標的配列付加、ならびに標的配列不含有細胞の除去

しかしながら、この安定発現株に Cre recombinase 発現ベクターと miRNA の標的配列ならびに Cre recombinase の組換え配列を含む DNA を共導入することでレポーター遺伝子への miRNA 標的配列付加を試みたところ、レポーター遺伝子の発現に変化は認められなかった (図 1B 中央, 右)。また、miRNA 標的配列挿入時に入れ替わりに除去されるはずの NfsB 遺伝子によるメトロニダゾール活性化作用にも変化は見られなかった (図 1C 中央, 右)。これらの結果から、Cre recombinase による miRNA 標的配列の挿入に問題があるものと考えられる。そこで報告者は、Cre recombinase の組換え配列を現在使用しているものから変更したベクターを新規に構築した。

