

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)。

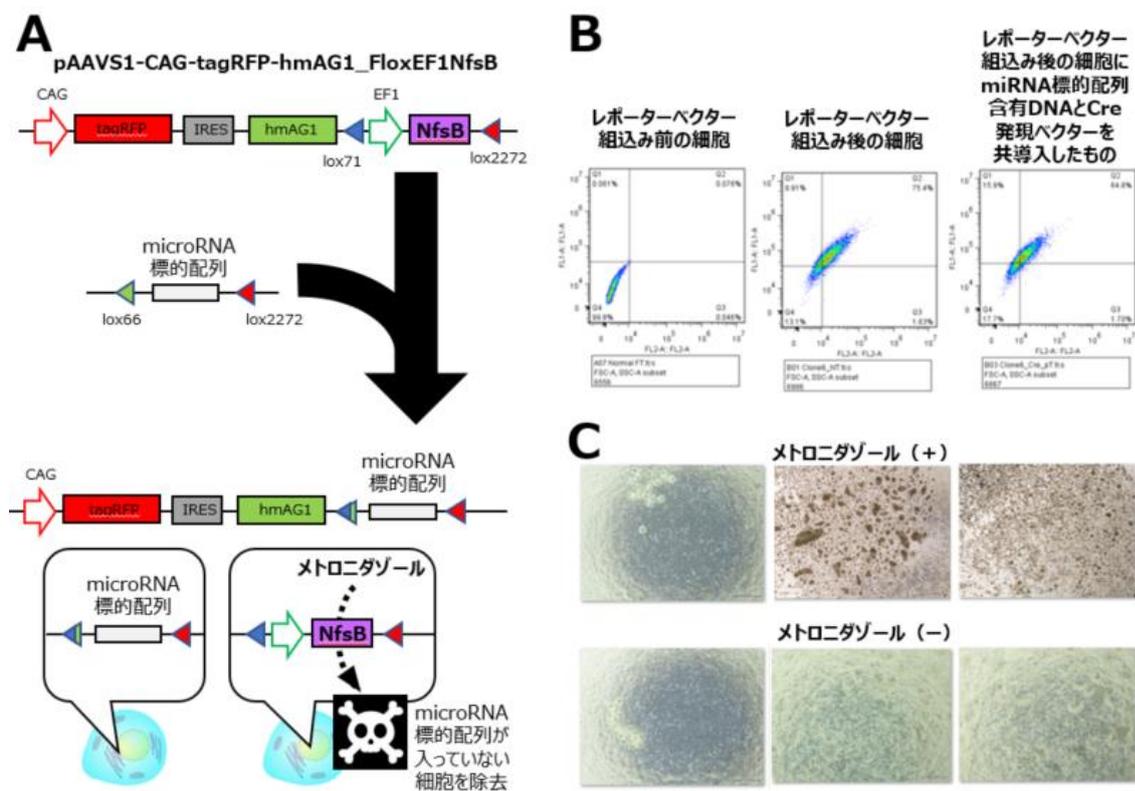


図1：レポーターへのmiRNA標的配列付加、ならびに標的配列不含有細胞の除去

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。

今後の展望としては、この新たなベクターを用いて miRNA 標的配列の挿入を検討する予定である。また、Cre recombinase の代わりに Flp recombinase を用いることも検討する。

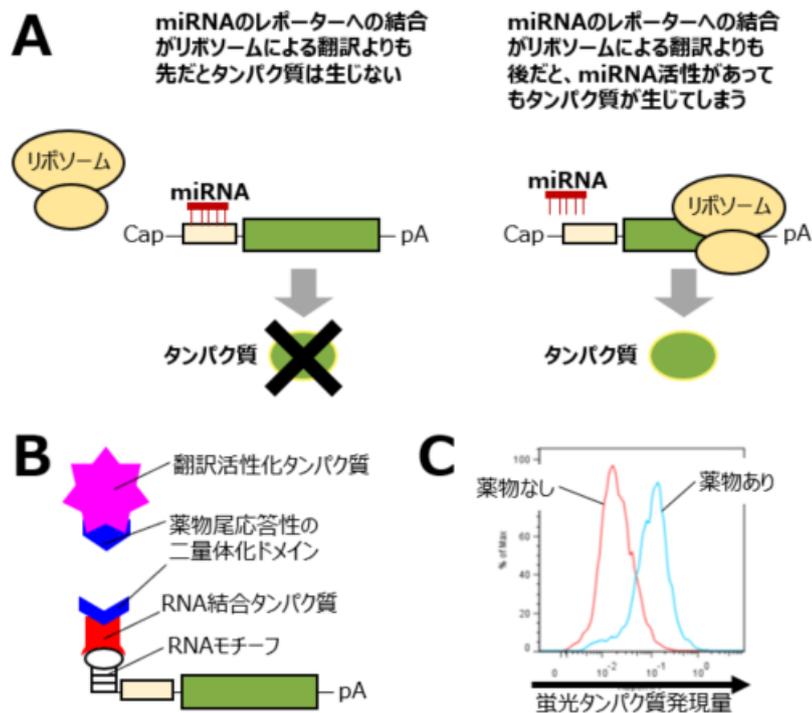
## ② 高感受性 microRNA 応答レポーター開発のための翻訳制御システム構築

現行の miRNA レポーターシステムでは、miRNA 活性が十分に高くない場合、miRNA 活性の有無に基づき FACS で細胞を分離することが困難になる。この問題を解決するために、報告者は以前の研究において miRNA 標的配列の数の増加によりレポーターベクターの miRNA 感受性を改善した (H. Nakanishi et al., *Biomaterials*, 2017)。

しかしながら、①の網羅的探索システムにおいて同様の戦略をとろうとした場合、miRNA 標的配列部分として用意しなくてはならない DNA の配列長が長くなるため、コストが大幅に増大する。これを回避するためには、1 コピーのみの miRNA 標的配列で十分に細胞を分離できるだけの感受性を持つレポーターベクターを開発する必要がある。

そこで報告者は、レポーター遺伝子の翻訳タイミングを制御することで、miRNA の結合によるレポーター不活化よりも先にレポーターの翻訳が開始されてしまう (図 2A) のを防ぐシステムを考案した。これは、レポーター遺伝子の mRNA に結合するタンパク質と、mRNA の翻訳を活性化させるタンパク質それぞれに薬物応答性の二量体化ドメインを融合させることにより、薬物添加時に翻訳が始まるという

ものである (図 2B)。実際にシステムを用いることにより翻訳を制御することが確認できた (図 2C)。今後の展望としては、システムでレポーター翻訳開始のタイミングを定めることで、レポーター miRNA 感受性が実際に可能かを検討する予定である。



もこので、薬きる2C)。このの翻遅らの改善であ

図2：レポーター翻訳制御の必要性とそのメカニズム