

## 様式3

## 神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29年 4月 24日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 熊本大学・発生医学研究所・生殖発生分野  
職 名 教授  
研究代表者名 中村 輝

下記のとおり平成 28 年度の共同利用研究成果を報告します。

## 記

(課題番号:281025)

1. 共同利用研究 課題名	ショウジョウバエ中枢神経系におけるノンコーディング RNA の機能		
2. 共同利用研究 目的	ショウジョウバエノンコーディング RNA 遺伝子 <i>lobe-less</i> の変異体、ならびに発現細胞を同定することのできるノックイン系統等を作成し、細胞学的・遺伝学的解析を行うことにより、中枢神経系におけるその生理機能を明らかにする。		
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
4. 共同利用研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 中村 輝	熊本大学・発生医学研究所	教授	研究の計画・実施
(分担研究者)			
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究部 門・細胞増殖分化制御研 究分野	氏 名 影山 裕二

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:281025)

#### 6. 共同利用研究計画

ゲノム解析の進展により、長鎖ノンコーディング RNA が真核生物に広く見られる機能分子であり、発生・分化や疾患との相関について、多数の研究が精力的に行われるようになった。しかし、それらの生理機能についてはごく一部を除き不明である。ショウジョウバエ *Lobe-less RNA* は、中枢神経系に強く発現するノンコーディング RNA であり、記憶・行動中枢である成虫のキノコ体の発生において、神経軸索誘導に重要であることが明らかとなっている。そこで、本研究ではゲノム編集技術を利用したノックアウトおよび各種ノックインショウジョウバエ系統の作成を行い、*Lobe-less RNA* の詳細な機能解析を進める。具体的には、1) 複数存在する *Lobe-less RNA* 発現領域について、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子ノックアウト技術により完全欠失変異体を作成する。また、2) *Lobe-less RNA* はタンパク質をコードする CG9650 遺伝子のイントロン中に存在することから、宿主遺伝子である CG9650 についてノックアウト系統を作成する。さらに、3) *Lobe-less RNA* 転写領域に RFP 遺伝子をノックインした系統を作成することにより、ショウジョウバエ中枢系における *Lobe-less RNA* 発現細胞を細胞レベルで同定することを目指す。これらのノックアウトおよびノックイン系統の作成、系統の確立は申請者が行い、解析については、貴センターの影山准教授、稲垣幸研究員の協力のもと、共同で実施する。

#### 7. 共同利用研究の成果

CRISPR/Cas9 システムにより、*lol* 遺伝子のプロモーター配列の一部を欠いた系統、及びプロモーター配列を含む全転写領域を蛍光タンパク質 (DsRed) と poly(A)付加シグナルを含むトランスジーンに置き換えた系統 (ノックイン) を作製し、これらの表現型を観察した。*lol* ノックイン系統では、既存の欠失系統で観察されるキノコ体の形態異常は観察されなかったが、サザン法による解析ではノックイン系統では *lol* 領域は確かに欠損していることが確認された。また、ノックイン系統は plasmid dimer (もしくは multimer) を含むと推定された。既存の欠失系統においても、継代を繰り返すことで表現型の増強がみられることから、ノックイン系統の継代を重ねた後に同様の解析を行う予定である。また、ノックインにより導入された DsRed 遺伝子が、細胞毎に発現の異なる表現型を示すことから、*lol* 遺伝子座は挿入遺伝子に対して位置効果を与えているものと考えられた。これらの結果は、*lol* 遺伝子がヘテロクロマチン形成等のクロマチンレベルの遺伝子発現制御に影響を及ぼしている可能性を示している。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

#### 9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。