

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 30 年 5 月 8 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
職 名 教授
研 究 代 表 者 名 中村 輝

下記のとおり平成29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	CRISPR-Cas9 を活用した長鎖非コード RNA 機能の解析			
2. 共同利用研究 目的	ショウジョウバエ LOL RNA の変異体を作成し、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。また、lol 遺伝子が位置しているイントロン領域の宿主遺伝子である CG9650 の突然変異体を作成し、lol との遺伝学的相互作用等についても検討を行う。			
3. 共同利用研究 期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 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・実施及び総括	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	細胞増殖分化制御	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。

6. 共同利用研究計画

CRISPR-Cas9 技術を用いて、*lobe-less* (*lol*) 遺伝子領域の各種欠失変異体を作成する。また、*lol* 遺伝子が位置するイントロン領域の宿主遺伝子である *CG9650* についても突然変異体を作成し、*lol* との遺伝学的相互作用等について検討を行う。これらのノックアウトおよびノックイン系統の作成や、系統の確立、免疫組織化学による既知の表現型の確認については申請者が行い、*Lobe-less RNA* の相互作用因子と考えられる *Polycomb* 複合体や、標的分子の一つである *Plexin* シグナル関連因子の挙動の解析については、貴センターの影山らの協力のもと、共同で実施する。また、研究の進展に応じて年に2回程度の研究打合せを行う。

7. 共同利用研究の成果

lobe-less プロモーター領域を欠いたノックアウト系統を、計 4 種作成した。また、4.25 kb の *lobe-less* 被転写領域を含む 5.4 kb あるいは 10.5 kb のゲノム領域を欠失させ、その代わりに *Pax6* エンハンサー下で RFP ORF を発現するノックイン系統を作成した。これらのノックアウトおよびノックイン系統は、*LOL RNA* を発現しないにもかかわらず、約 2 割の個体が弱い表現型を示すのみであり、*lol* 欠失系統 (*lol* を含む約 30 kb のゲノム領域の欠失) の表現型は、*lol* 遺伝子座の近傍の領域にも原因があると考えられた。*lol* の宿主遺伝子である *CG9650* の発現が *lol* 変異系統で低下することから、CRISPR-Cas9 技術を用いて *CG9650* ノックアウト系統を作成した。その結果、*CG9650* ノックアウト系統は劣勢致死性を示した。興味深いことに、*CG9650* と *lol* 欠失染色体とをヘテロに持つ個体 (*lol*^{+/+} *CG9650*^{+/+}) では、約 8 割の個体で *lol* 表現型が観察された。このような結果から、*lol* 欠失系統の表現型は、*lol* のすぐ近傍にある *CG9650* の発現低下が大きな原因の一つになっていると思われる。一方、*lol* 欠失系統の表現型は *UAS-lol* の発現によりレスキューされることから、*lol* 領域は *CG9650* の *cis* 配列 (エンハンサー) として機能するのではなく、*trans* 因子としても機能していることが予想された。これらの結果を元に、平成 30 年 3 月に神戸大学を訪れ、今後の研究方針について研究打合せを行った。

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。)

なし

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。

なし