

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

令和元年 5月 9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 30 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 技術を用いた長鎖 noncoding RNA 機能の解析			
2. 共同利用研究 目的	長鎖 noncoding RNA である LOL RNA の細胞内機能を明らかにすることを目的とし、CRISPR-Cas9 技術を用いた各種変異系統の作成及びその解析を行うことで、LOL RNA の機能ドメインを同定する。			
3. 共同利用研究 期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 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	研究の計画と実施	
(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6~9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6~9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

ショウジョウバエ Lobe-less (LOL) RNA は、胚発生期の神経芽細胞に強く発現する核内長鎖 noncoding RNA であり、ショウジョウバエの行動・記憶の中核であるキノコ体ニューロンの軸索誘導に重要であることが明らかとなっている。本研究は、LOL RNA の分子活性を明らかにすることを目的とし、各種 LOL RNA 変異体の作成とその解析を行うことにより、LOL RNA の遺伝子活性に必要な RNA 領域 (RNA 機能ドメイン) の同定を目指す。*lol* 遺伝子座には、近縁種間で保存された領域 (それぞれ 200-300 塩基対) が 5 箇所ある。これらの領域のみを含むトランスジーン、あるいは全長領域からこれらの領域を欠失したトランスジーンをすでに作成しており、*lol* 表現型の回復を指標に個々のトランスジーン の遺伝子活性を解析することで、LOL RNA の機能ドメインと考えられる領域の探索を行う。この結果をもとに、CRISPR-Cas9 システムにより、内在の *lol* 遺伝子座に対してゲノム編集を行い、機能ドメインを欠失した変異系統を作成・解析することにより、LOL RNA の機能ドメインを同定する。

7. 共同利用研究の成果

lol 遺伝子座に存在する近縁種間で保存された 5 個の領域を結合し、*UAS^{GAL4}* プロモーターにより発現誘導可能なトランスジーン (*lol-CR*) および *lol* 転写領域からこれらの領域全てを欠失したトランスジーン (*lolΔCR*) について、*lol* 変異体の表現型を回復させる活性があるかどうかについて検討した。*lol* 転写領域全長を含むトランスジーン (*lol-FL*) を *lol* 変異系統に導入した場合、約 80% 以上の個体が野生型と同様の表現型を示すのに対し、*lol-CR* ではほとんど効果が見られなかった。少なくとも LOL RNA の保存領域は、*lol* 遺伝子の活性には十分ではないと考えられた。また、*lolΔCR* については、*lol-FL* とほぼ同程度の回復が見られ、上記の保存領域以外に *lol* 遺伝子活性を担う領域が存在することが強く示唆された。この結果を受けて、LOL RNA を 1 kb 程度の 4 つの領域に大きく分けて、それぞれの領域を欠失したトランスジーン (*lol-Δ1~Δ4*) を作成し、上記と同様の検討を行ったところ、5' 末端から二つ目の領域を欠いたトランスジーン (*lol-Δ2*) で表現型を回復させる活性が大きく損なわれることが明らかとなった。

一方、ショウジョウバエにおける CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術は汎用性が高まっているが、ショウジョウバエ胚への顕微注射など高度な技術が必要である。そこで、影山研究室の大学院生を熊本大学に招き、ショウジョウバエ胚への顕微注射技術の指導を行った。3 日間に渡り、顕微注射に必要なガラスキャピラリーの作成、初期胚のスライドガラスへの整列、マイクロマニピュレータを操作しての顕微注射等の技術についてトレーニングを行った。

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。)

該当なし。

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。

該当なし。