

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580101

研究課題名（和文）スプライシング調節を応用したコンディショナル・トランスジェニック技術の開発研究

研究課題名（英文）A study of controlling splicing for conditional gene expression.

研究代表者 笹川 昇 (SASAGAWA NOBORU)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：70302817

研究成果の概要（和文）：

本研究では線虫 *C. elegans* をモデルとし、高等真核生物に広く見られる選択的スプライシングという生命現象を応用して、個体内での遺伝子発現パターンを人工的に調節し、任意の時期、部位で任意の遺伝子発現を可能にする実験系の開発を目的としている。遺伝子のエキソン-イントロン構造の中に蛍光タンパク質遺伝子を挿入し、特定の選択的スプライシングが起こると特定の蛍光が発するように仕向けた発現コンストラクトを構築すると同時に、この選択的スプライシングに関与する RNA 結合タンパク質の解析を進め、RNA とタンパク質の両面から自在なスプライシング調節の確立を目指した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to control alternative splicing and gene expression as our own purpose. By using nematode *C. elegans* as model organism, reporter mini-gene with GFP/RFP is constructed. This mini-gene is designed to express GFP/RFP only when alternative splicing is completed as desired. An RNA binding protein which plays an important role to alternative splicing is also investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：遺伝子発現、遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術の進歩は目覚ましく、モデル生物の種類を問わず、遺伝子を破壊するノックアウトや、過剰発現系であるトランスジェニックの技術は既に多くの場面で用いられている。しかし、遺伝子破壊にせよ過剰発現にせよ、従来の手法では、その発現部位や時期を自在に調節することが困難な場合がある。一方で真核生物の多くは遺伝子にエキソン-イントロン構造を持ち、スプライシングの際に、用いるエキソンを選択的に挿入/欠失させることによって、時期特異的、部位特異的にスプライシングパターンを変化させることが知られている。つまり、真核生物は選択的スプライシングによって遺伝子の発現を調節していると言える。

2. 研究の目的

本研究では線虫 *C. elegans* をモデルとし、高等真核生物に広く見られる選択的スプライシングという生命現象を応用して、個体内での遺伝子発現パターンを人工的に調節し、任意の時期、部位で任意の遺伝子発現を可能にする実験系の開発を目的としている。この選択的スプライシングを自在に操ることができれば、同じ遺伝子が発現するにしても、ある臓器ではエキソンが挿入された型、他の臓器ではエキソンが抜けた型というように、個体内での組換え遺伝子の発現パターンを人工的かつ、詳細に調節することができる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 選択的スプライシングの発現様式を簡便に検出するミニジーンコンストラクトの作成を行う。既に選択的スプライシングの様式が知られている遺伝子をレポーターとして用い、そのエキソン-イントロン構造の中に蛍光タンパク質遺伝子を挿入することで、特定の選択的スプライシングが起こると特定の蛍光が発するよう仕向けた発現コンストラクトを構築する。

(2) 選択的スプライシングに関与する RNA 結合タンパク質の解析を進める。線虫で簡便に行える RNAi 実験を行い、研究対象とする RNA 結合タンパク質の表現型に対する機能を解析する。これらのことを通じて、RNA とタンパク質の両面から自在なスプライシング調節の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 当初予定していた、目的を達成するための DNA 発現コンストラクトを構築することができた。特定のエキソン-イントロン構造を持つミニジーンのなかに蛍光蛋白質をコードする遺伝子配列を挿入し、あるスプライシングパターンなら緑色蛍光、別のスプライシングパターンなら赤色蛍光が発現するというように、選択的スプライシングの結果を蛍光色で見分けるコンストラクトの構築に成功した。現在、この DNA を線虫 *C. elegans* に導入し、その蛍光による発現パターンの違いを追究している。

(2) 本研究の目的であるスプライシングの人工調節に重要な意味を持つ RNA 結合タンパク質の機能についてエキソン特異的にノックダウンする RNAi 実験をおこない、ひとつの遺伝子から生じる個々のスプライシングアイソフォームの機能について詳細に追究した。線虫のこの RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子が欠失すると寿命短縮の表現型変化が見られるが、ここで私は、この寿命短縮という表現型変化はこの遺伝子のスプライシング産物中に特定のエキソンが挿入されている時のみ起こることを見出した。実際の寿命短縮にはある特定の遺伝子発現が関与していると考えられるため、現在、この RNA 結合タンパク質が介する遺伝子発現機構について追究している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Koebis M., Ohsawa N., Kino Y., Sasagawa N., Nishino I. and Ishiura S. Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes to Cells* 16, 961-972 (2011).

2. Yoshida T., Kimura E., Koike S., Nojima J., Futai E., Sasagawa N., Watanabe Y. and Ishiura S. Transgenic Rice Expressing Amyloid β -peptide for Oral Immunization. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 301-307 (2011).

3. Nojima J., Ishii-Katsuno R., Futai E., Sasagawa N., Watanabe Y., Yoshida T. and Ishiura S. Production of Anti-Amyloid β Antibodies in Mice Fed Rice Expressing Amyloid β . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 396-400 (2011).

4. Ishii-Katsuno R., Nakajima A., Katsuno T., Nojima J., Futai E., Sasagawa N., Yoshida T., Watanabe Y. and Ishiura S. Reduction of amyloid beta-peptide accumulation in Tg2576 transgenic mice by oral vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 593-599 (2010).

5. Tanabe C., Hotoda N., Sasagawa N., Futai E., Komano H. and Ishiura S. ADAM19 autolysis is activated by LPS and promotes non-classical secretion of cysteine-rich protein 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 927-32 (2010).

[学会発表] (計 3 件)

① 鈴木俊輔、笹川昇 線虫 *C. elegans* の RNA 結合タンパク質である CeMBL 遺伝子の機能解析 日本農芸化学会 2013 年度年会 2013 年 3 月 27 日 仙台

② 高橋航大、笹川昇 ブドウ抽出物 ANOX-R5 による線虫 *C. elegans* の寿命への影響 日本農芸化学会 2013 年度年会 2013 年 3 月 27 日 仙台

③ 鈴木俊輔、笹川昇 RNAi 実験を用いた、線虫 *C. elegans* の RNA 結合タンパク質である CeMBL 遺伝子の選択的スプライシング発現産物が持つ機能の追究 日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 23 日 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹川 昇 (SASAGAWA NOBORU)
東海大学・工学部・准教授
研究者番号：70302817

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：