

Antisense Display: 新しい機能性遺伝子スクリーニング法開発の試み

著者	山本 博
著者別表示	Yamamoto Hiroshi
雑誌名	平成9(1997)年度 科学研究費補助金 重点領域研究 研究概要
巻	1997
ページ	3p.
発行年	2016-04-21
URL	http://doi.org/10.24517/00065978



Antisense Display-新しい機能性遺伝子スクリーニング法開発の試み

Research Project

All

Project/Area Number

09272210

Research Category

Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas

Allocation Type

Single-year Grants

Research Institution

Kanazawa University

Principal Investigator

山本 博 金沢大学, 医学部, 教授 (00115198)

Co-Investigator(Kenkyū-buntansha)

原田 真市 金沢大学, 医学部, 助手 (90272955)

米倉 秀人 金沢大学, 医学部, 助教授 (80240373)

Project Period (FY)

1997

Project Status

Completed (Fiscal Year 1997)

Budget Amount *help

¥2,300,000 (Direct Cost: ¥2,300,000)

Fiscal Year 1997: ¥2,300,000 (Direct Cost: ¥2,300,000)

Keywords

Angiogenesis / Antisense display / Antisense oligonucleotides / Vascular endothelial cells / Functional gene screening / cDNA cloning

Research Abstract

本研究の目的は、ゲノム機能解析のための一手段として、“Antisense Display”法という新しい遺伝子スクリーニング技術を確立することである。本法は、(1)ほぼ全てのmRNA分子種をカバーする-アンチセンスDNAレパートリーの作製-(2)細胞の機能/表現形質変化を来すアンチセンス配列の同定→(3)5'センスプライマーと3'アンカー型プライマーを用いたRT-PCRによるcDNAクローニング→(4)構造決定(5)当該遺伝子の機能検定の計5ステップからなる。平成9年度は、(3)と(4)のステップの検証のため、新規血管新生制御因子の分離に本法を適用した。

1.内皮細胞の増殖を指標としてアンチセンスDNAレパートリースクリーニングを行い、最終的に内皮細胞増殖を抑制する単一のアンチセンス配列を同定した。

2. 同定されたアンチセンス配列に対応するセンスプライマーとアンカー型オリゴ(dT)プライマーを用いヒト微小血管内皮細胞ポリA⁺RNAを鋳型にてRT-PCR法を行い候補cDNAを3種分離した。

3. 得られたcDNAの塩基配列を決定した結果、cDNAの一つ(clone2)は10merアンチセンス配列と100%マッチする配列を有し、残りの二種(clone30,32)はアンチセンス配列と10塩基中9塩基が一致する配列を有していた。

4. DNA配列データベースでの相溶性検索の結果、clone2はミトコンドリアNADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3をコードするcDNAであることが判明した。また、clone30,32は新規遺伝子で、それぞれ酵母のMIC1 cDNA、マウスのNck interacting kinase(NIK)cDNAと相同性を示した。次に、10mer領域を含む各mRNAに特異的な16~18塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製し、各アンチセンスがヒト微小血管内皮細胞DNA合成に及ぼす影響を解析した結果、clone2とclone30に相補的なアンチセンスがDNA合成を阻害した。コントロールのセンスオリゴヌクレオチドおよびclone32に対するアンチセンスは内皮細胞DNA合成に影響を及ぼさなかった。以上より、ミトコンドリアNADH-ubiquinone oxidoreductase chain3遺伝子と酵母MIC1と相同性を示す新規遺伝子clone30が内皮細胞増殖に関与することが示された。MIC1蛋白は酵母転写因子Maclpに結合する蛋白質で、関連遺伝子が脊椎動物で分離されたのは初めてである。

5. 本法の有効性を他のモデルで検証するため、新規がん抑制遺伝子の分離を目的にNIH3T3細胞の足場非依存性増殖を指標にアンチセンスDNAレパートリーの一次スクリーニングを行った。その結果、足場非依存性増殖を促進する数種の候補サブプールを得た。

以上、本年度研究により機能性遺伝子スクリーニング法として“Antisense Display”法が有効であることが示された。

Report (1 results)

1997 Annual Research Report

Research Products (18 results)

All Other

All Publications (18 results)

- [Publications] Yamagishi,S., et al.: "Advanced GlycationEndproducts-drive Angiogenesis in Vitro." Journal of Biological Chemistry. 272. 8723-8730 (1997) ▼
- [Publications] Narushima,Y., et al.: "Structure,chromosomal localization,and expression of mouse genes encoding type III Reg,RegIIIa,RegIIIβ,RegIIIγ." Gene. 185. 159-168 (1997) ▼
- [Publications] Noguchi,N., et al.: "Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca²⁺ from islet microsome." Journal of Biological Chemistry. 272. 3133-3136 (1997) ▼
- [Publications] Nata,K., et al.: "Human gene encoding CD38(ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) : organization,nucleotide sequence and alternative splicing." Gene. 186. 285-292 (1997) ▼
- [Publications] Hayashi,Y., et al.: "Induction of various blood-brain, barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes." Glia. 19. 13-26 (1997) ▼
- [Publications] Yonemura Y., et al.: "A possible role of cytokines in the formation of peritoneal dissemination." International Journal of Oncology. 11. 349-358 (1997) ▼
- [Publications] Ogawa,H., et al.: "Functional properties of the unc-64 gene encoding a Caenorhabditis elegans syntaxin." Journal of Biological Chemistry. 273. 2192-2198 (1998) ▼
- [Publications] Takamura,T., et al.: "Transgenic mice overexpressing type 2 nitric oxide synthase in pancreatic b cells develop insulin-dependent diabetes without insulinitis." Journal of Biological Chemistry. 273. 2493-2496 (1998) ▼
- [Publications] Yamagishi,S., et al.: "Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells." Diabetologia. (in press). (1998) ▼
- [Publications] Segawa,Y., et al.: "Upregulation of retinal vascular endothelial growth factor mRNAs in spontaneously diabetic rats without ophthalmoscopic retinopathy." Ophthalmic Res.(in press). (1998) ▼
- [Publications] Kaneko,T., et al.: "A novel pyrimidine ribonucleoside phosphorylating enzyme in Escherichia coli." Nucleosides & Nucleotides. (in press). (1998) ▼
- [Publications] Yamagishi,S., et al.: "AGE and endothelial cells." Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. (in press). (1998) ▼

- [Publications] 山岸昌一 他: "Advanced glycation endproductsの血管新生活性について." 分子糖尿病学. 8. 243-249 (1997) ▼
- [Publications] 山本靖彦 他: "糖尿病-肺癌合併の分子メカニズム." 分子糖尿病学. 8. 251-255 (1997) ▼
- [Publications] 山本靖彦 他: "AGE受容体." 現代医療. 30. 144-147 (1998) ▼
- [Publications] 山本 博: "「医学のための基礎分子細胞生物学」" 平賀紘一、伊達孝保、山本 博、野口民夫編集(南山堂), 122 (1997) ▼
- [Publications] 山岸昌一 他: "「血管新生のメカニズムと疾患」H.2.h"周皮細胞" 室田誠逸、井藤英喜編(医薬ジャーナル社,東京), 141-149 (1997) ▼
- [Publications] 米倉秀人: "キーワード'98~99「高脂血症・動脈硬化」3章 血管新生" 斎藤 康,萩原俊男、馬淵 宏編(先端医学社)(印刷中), (1997) ▼

URL: <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-09272210/>

Published: 1997-03-31 Modified: 2016-04-21