遺伝子ノックアウトを用いたmiRNAの機能及び生成機構の解析

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2021-02-19
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 原田, 文夫, Harada, Fumio
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00060441

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

遺伝子ノックアウトを用いたmiRNAの機能及び生成機構の解析

Research Project

All

Project/Area Number	15657039
Research Category	Grant-in-Aid for Exploratory Research
Allocation Type	Single-year Grants
Research Field	Molecular biology
Research Institution	Kanazawa University
Principal Investigator	**原田 文夫** 金沢大学, がん研究所, 教授 (40124424)
Co-Investigator(Kenkyū-buntansha)	木戸 敬治 金沢大学, がん研究所, 助手 (60272986)
Project Period (FY)	**2003 – 2004**
Project Status	Completed (Fiscal Year 2004)
Budget Amount *help	**¥3,200,000 (Direct Cost: ¥3,200,000)** Fiscal Year 2004: ¥1,200,000 (Direct Cost: ¥1,200,000) Fiscal Year 2003: ¥2,000,000 (Direct Cost: ¥2,000,000)
Keywords	miRNA / DT40 / 遺伝子ノックアウト

Research Abstract

昨年度までにトリBリンパ細胞株DT40から得たmiR17-5P(miR91),miR17-3P(miR17),miR18,miR19a, miR20,miR19b, miR92の7種類のmiRNA遺伝子が密集して存在する遺伝子クローンについて、miRNA遺伝子群を含む1.9kbpをpuromycinおよびblasticidin S耐性遺伝子で置き換えたノックアウトコンストラクトを構築し、エレクトロポレーション法によってDT40細胞に順次導入し、それぞれの抗生剤の存在下培養することにより、これらのmiRNA遺伝子を完全に欠失した細胞株を得ることに成功した。変異遺伝子を導入した親株は野性株であることから、この遺伝子群は細胞の増殖には必須でないことが明らかになった。
得られたノックアウト細胞株と親株(野性株)とを比較すると、形態的には殆ど変わることはなかった。一方、細胞の増殖速度はノックアウト細胞株で有意に遅くなっていた。各細胞株から全RNAを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、各miRNAに対するプローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、ノックアウト細胞株ではmiR17-3P及びmiR20の発現が完全に消失していた。しかし、他の5種類のmiRNAの発現は野性株と比較して減少しているものの、完全に消失するまでには至らなかった。これはそれぞれのmiRNAと類似した、あるいは完全に一致した塩基配列を持つmiRNA遺伝子が他に存在することによるものと考えられる。
本研究により、2種類のmiRNAの発現が完全に押さえられた細胞株が得られた。この細胞株および野性株で発現しているタンパク質を、二次元マッピングなどで比較することにより、これらのmiRNAのターゲットを特定することができるものと考えられる。

Report (2 results)

2004 Annual Research Report

2003 Annual Research Report

URL: https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-15657039/

Published: 2003-03-31 Modified: 2016-04-21