

平成16年度 委託業務成果報告書

基盤技術研究促進事業

平成15年度採択

「siRNA発現ベクターライブラリーを用いた迅速な標的探索」

委託業務成果報告書

委託先 株式会社ジェノファンクション

平成17年5月

独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

本報告書の著作権は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構にあります。本報告書の一部又は全部を引用する場合は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構研究開発推進部基盤研究促進事業グループの許可を受けて下さい。

TEL 044-520-5172 FAX 044-520-5177

8. 外部発表等の状況

(1) 論文発表

a. 登録研究員のみの場合

現在までに成果の論文発表は無し

b. 登録研究員以外を含む場合

現在までに成果の論文発表は無し

(2) 学会発表

a. 登録研究員のみの場合

第25回 日本炎症・再生医学会（平成16年7月13日～14日）

ワークショップ8 遺伝子導入・発現制御技術開発と遺伝子治療

W-8-1 RNAi overviewとshRNA発現ベクターライブラリーの開発

鈴木要介（株式会社ジェノファンクション）

b. 登録研究員以外を含む場合

現在までに成果の学会発表は無し

(3) プレス発表

2004年 7月19日 日本経済新聞

2004年11月19日 日本経済新聞

(4) ノウハウ

現在までに成果のノウハウ指定は無し

9. 要約

(和文)

② siRNA発現ライブラリーの作製

(a) cDNAの増幅と回収

500個の候補遺伝子のcDNA部分に対して共通条件でPCR増幅を行った。その結果、472個のクローンに関しては共通条件でPCR増幅が可能であったが、28個のクローンに関しては、PCR産物が確認できなかった。そこで、PCR増幅が可能であった472個のクローンに関しては、共通条件でPCR増幅後、全てのサンプルを全量混ぜ合わせてExonuclease I 処理を行った。PCR産物が確認できなかった28個のクローンに関しては、各サンプル個別にminiprepで増幅した後、cDNA部分のみを制限酵素で切り出し、全量混ぜ合わせてExonuclease I 処理を行った。その結果、最終的に目標である30 μ gを超える 92 μ gのcDNA断片を得た。

(b) 酵素処理とゲル電気泳動による分離・回収

実験条件等の詳細は(c)に記載するが、30 μ gのcDNA断片を出発原料とし、目標値を超える1.2 μ gのDNAフラグメントを得た。

(c) ショートヘアピン発現カセットの調製及び発現プラスミドベクターへの搭載

実際の評価用ベクターライブラリーの調製に先立って、モデル遺伝子を用いて、ショートヘアピン発現カセットの調製及び発現プラスミドベクターへの搭載を行った。反応条件の最適化を行った結果、モデル遺伝子RNA断片30 μ gを出発原料とし、目標値以上の、60ng以上のショートヘアピン発現カセットおよび10の7乗以上のショートヘアピン発現プラスミドベクターを調製できる条件の設定に成功した。

(d) 作製したsiRNA発現ライブラリーのダイバーシティの確認

測定の結果、目標値を超える 6.1×10^7 の7乗以上のsiRNA発現ライブラリーの調製に成功した。

③スクリーニングシステム構築

(a) HREの制御下でCD4が発現されるベクター (HRE-CD4コンストラクト) の構築

HREの制御下で細胞表面にマーカー遺伝子であるCD4が発現するHRE-CD4コンストラクトの調製を行い、設計したコンストラクトと一致することを確認した。またコントロールとして、HREの制御下で細胞内にマーカー遺伝子であるEGFPが発現するHRE-EGFPコンストラクトの調製も同時に行った。

(b) 評価細胞の樹立

(a)で構築したHRE-CD4コンストラクトを評価用細胞に導入し、評価細胞の樹立を行った。低酸素条件で培養した後にマーカー遺伝子の発現量を測定した結果、目標通り86%の細胞でマーカー遺伝子の発現が確認された。

④スクリーニング

(a) 一次スクリーニング

(i) 閉塞性動脈硬化症モデル一次スクリーニング

(ii) がん転移モデル一次スクリーニング

③-(b)で樹立した評価細胞を用い、スクリーニングを実施中である。

(英文)

2 Preparation of siRNA Expression Library

(a) Amplification and collection of cDNA

We did the PCR amplification in a common condition for a cDNA part of 500 candidate genes. As a result, the PCR product was not able to be confirmed for 28 clones though PCR was able to amplify for 472 clones under a common condition. Therefore a gross quantity mixed all 472 clones and processed laying

upon Exonuclease I after the PCR amplification in a common condition. After it amplifies to an individual each sample with miniprep, only the cDNA part is cut out by the restriction enzyme for 28 clones that were not able to confirm the PCR product, and processed Exonuclease I in gross quantity mixing. As a result, I finally got a cDNA piece of 92 μ g more than 30 μ g which were an aim.

(b) Separation / collection by enzyme processing and gel electrophoresis
Although details, such as experiment conditions, were indicated to (c), the cDNA fragment of 30 μ g was used as start materials, and the DNA fragmentation of 1.2 μ g exceeding a target value was obtained.

(c) Preparation of Short Hairpin Expression Cassette and Ligation into Expression Plasmid Vector

We used luciferase (Luc) and von Hippel-Lindau syndrome causative gene (VHL) as model genes to prepare a short hairpin expression cassette and ligate it into the expression plasmid vector. With optimization of the conditions and starting from 30 μ g of cDNA model genes, we successfully obtained more than 60 ng of short hairpin expression cassette and over 7th power or more of 10 of short hairpin expression plasmid vector.

(d) Confirmation of diversity in made siRNA appearance library

It succeeded in manufacture of the siRNA discovery library exceeding a target value of the 7th power or more of 6.1×10 as a result of measurement.

3 Construction of a Screening System

(a) Construction of a vector expressing CD4 under the control of HRE (HRE-CD4 construct)

We produced HRE-CD4 construct, which expresses CD4, a marker gene, on the cell surface under the control of HRE as scheduled. We confirmed the sequence agreement of the construct obtained with the one we designed. We also produced, as a control, HRE-EGFP construct expressing the marker gene EGFP intracellularly under the control of HRE in parallel.

(b) Establishment of Cells for Evaluation

HRE-CD4 construct that constructed was introduced into the cells for the evaluation, and the cells were established. The amount of appearance of the marker gene was measured after it had cultured it under the low oxygen condition, therefore the appearance of the marker gene was confirmed by the cells of 86% according to the target.

4 Screening

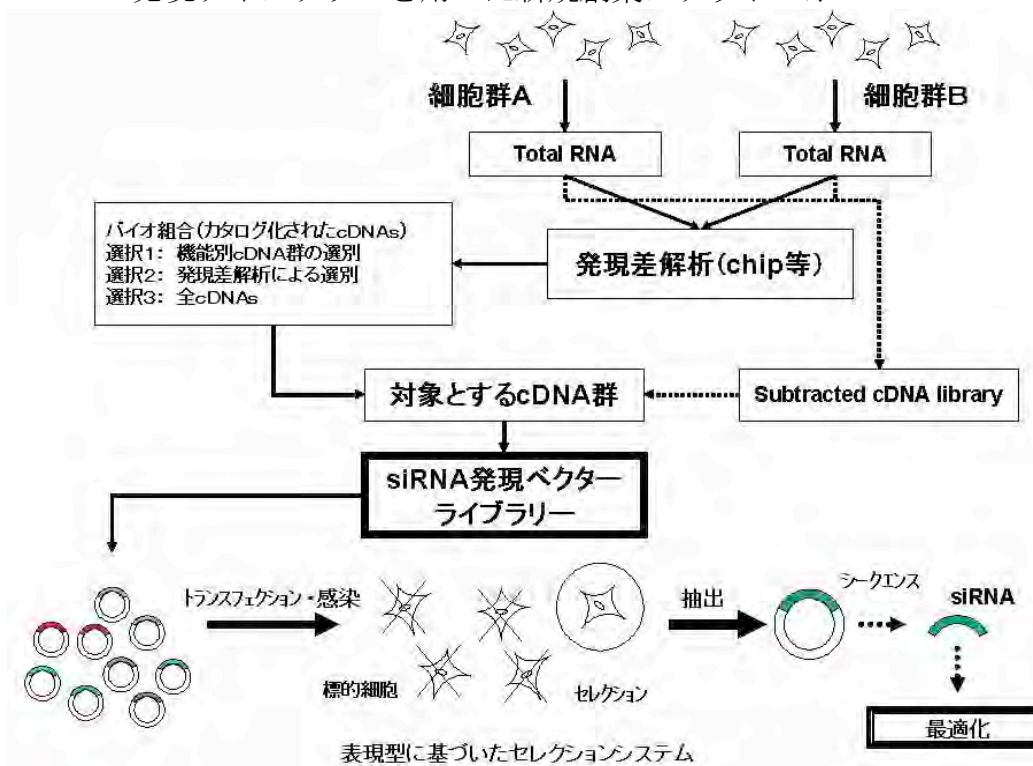
Screening is being executed by using the evaluation cell established in 3-(b).

第2章 本論

1. 研究成果物及び研究の背景

1. 1 研究成果物

(1) 研究成果物：疾病等に関連するDNAライブラリーを原料として調製される s i R N A 発現ライブラリーを用いた新規創薬プラットフォーム



(2) 対象製品：疾病等に関連する遺伝子の網羅的探索用 s i R N A 発現ライブラリー

(3) 概要及び仕様： 10^7 個以上の独立クローンを含む s i R N A 発現ライブラリー

(4) 対象製品のイメージ：