

細胞情報学教室

10191043 鈴木健一

ストレス応答の分子機構

目的

ストレス応答の分子機構を解析する手法の一つとして、小胞体ストレスに応答した mRNA のスプライシングおよび転写誘導を検討する。また、同時に小胞体ストレス誘導刺激による細胞死を検討する。これらの実験操作を通して細胞レベルでの RNA の解析手法および細胞死の検出方法についての理解を深める。

実験方法

実習書に基づき TA の指示にしたがって実験を行った。ただし、BiP の PCR においてサイクル数を 16,19,24 からそれぞれ 19,24,30 に変更している。

結果・考察・課題

今回は課題の内容に則しながら結果と考察を行う。

単離した RNA の品質

以下の画像から A,B,C それぞれにおいてメジャーバンドが 3 本ずつ観察され、上から順に 28S,18S,5S となっている。その中で目的とする rRNA のバンドは 28S と 18S である。本来 28S と 18S の質量比は 2:1 であり、28S の方が明瞭なバンドが出るはずだが、28S の RNA は細胞内でプロセシングを受けると 18S の RNA と同じような泳動度を示す。したがって画像では 18S の方が明瞭なバンドが現れているが、28S のバンドも十分に現れているので、RNA の品質は問題ないことが確認された。

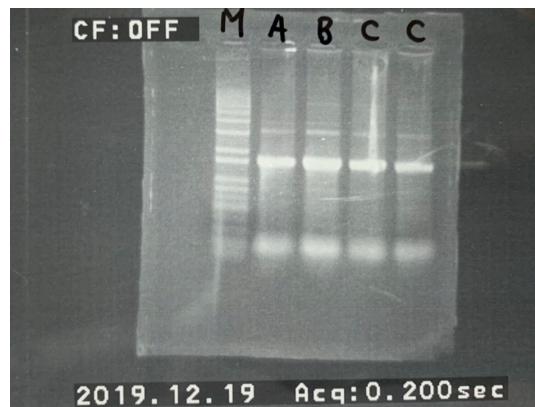


図1 RNA の電気泳動

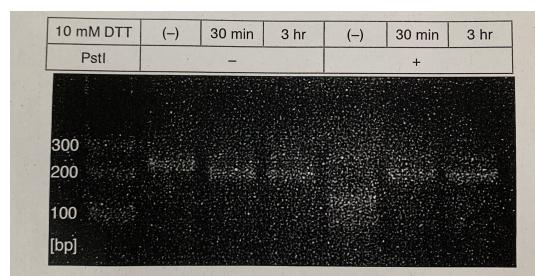
Xbp1 のスプライシング

間接的に撮影した画像ではよくわからないが、うっすらとバンドを確認することができた。しかし、PstI 切断部位とステムループ構造までを確認することはできなかった。



図2 Xbp1 の電気泳動

本来は次の画像のようにインキュベートの前後でバンドの位置の変化が確認できた。



BiP mRNA の発現量

電気泳動の結果、RPS18 のバンドだけが見られ、BiP のバンドが全く観察できなかった。

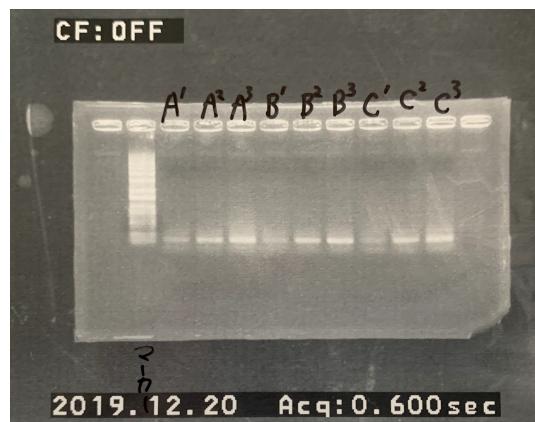
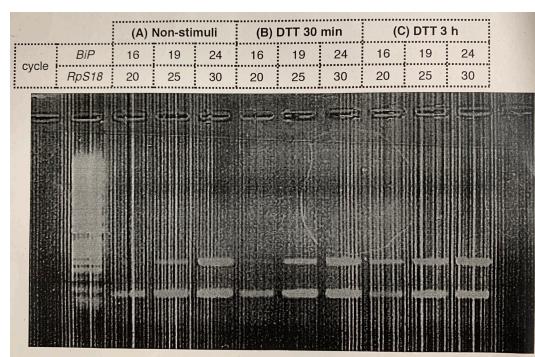


図 3 BiP の電気泳動

そのため、昨年までの模範結果をもとに考察を行う。



RPS18 はハウスキーピング遺伝子由来で定常的に発現するタンパク質であるため、このバンドの強さが一定である限り、サンプル間でのタンパク質の量や濃度に違いがないことが保証できる。模範の結果では A よりも B、B よりも C の方がサイクル数が少ない時のバンドが明瞭になっている。このことから、もともとの BiP mRNA 量は C>B>A となっていることがわかる。

DTT の濃度と時間による生存率

以下の表のように 30 分間の刺激では、刺激がない群とほとんど生存率に差がなかった。一方、3 時間ストレス下にあった群では、有意に生存率が低下した。

DTT	None	10mM 30min	10mM 180min	50mM 180min
生存率 (%)	96.5	95.1	79.0	70.3

総合課題

(1)

XBP1 タンパク質は常時 mRNA から発現されているため、急なストレスに対しても素早く応答できるという利点がある。

(2)

スプライス型、非スプライス型それぞれに特異的なプライマーを作るには、スプライシングされる部分を跨るようにそれぞれの塩基配列を持ったプライマーを作成すれば良い。

(3)

ゲノム除去反応を行わなかった場合、cDNA だけでなく微量に含まれる gDNA も増幅されてしまう。したがって gDNA では間にイトロンがコードされている cDNA のエキソン間の部分をまたがるようなプライマーを用いれば良い。

(4)

前半よりも実習終了時刻が早くてよかったです。TA が班に一人いるのでわからないこともすぐに聞けるところが心強い。