

**タイトル: MicroRNAと蛍光タンパク質の同時誘導発現(1)**

カテゴリ: 発現誘導・発現制御

キーワード: 遺伝子発現、Tet System、Tet-On、miRNA

データソース: [Clontechiques 2007年早春号](#)、[クロンテック社](#) [分子生物学グループ](#)**方法:**Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System (製品コード [630930](#))

miR-30 miRNAをベースにしたanti-lamin A/C miRNA配列をAcGFP1またはDsRed2 cDNA配列の5'側に連結し、pTRE-Tight Vectorのマルチクローニングサイトに挿入したベクターを構築した (pTRE-Tight-lamin A/C-AcGFP1またはpTRE-Tight-lamin A/C-DsRed2)。pTet-On-Advanced VectorとpTRE-Tight-lamin A/C-AcGFP1またはpTRE-Tight-lamin A/C-DsRed2をHeLa細胞に導入し、安定発現株を作製した。この細胞をDoxの存在下または非存在下で培養し、72時間後にウェスタンブロッティングによるlamin A/C発現解析と、蛍光顕微鏡観察による蛍光タンパク質の発現確認を行った。

**結果:**

ウェスタンブロッティングでlamin A/Cの発現解析を行ったところ、プラスミドを導入していないHeLa細胞 (親細胞) やDox非存在下で培養した安定発現株に比べ、Dox存在下で培養した安定発現株ではlaminタンパク質の発現量が著しく減少していた (図1)。また、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、Dox存在下で培養した細胞では、高レベルの蛍光タンパク質の発現を確認することができた (図2)。このように、Doxによって蛍光タンパク質の発現が誘導された細胞では、miRNAの誘導発現によるlamin A/C遺伝子のノックダウンも同時に起こっていた。

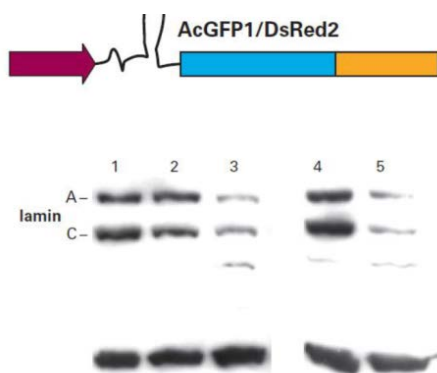


図1 ウェスタンブロッティング:

レーン1: 親細胞、レーン2: Dox非存在下で培養したanti-lamin A/C-AcGFP1導入細胞、レーン3: Dox (1 µg/ml) 存在下で培養したanti-lamin A/C-AcGFP1導入細胞、レーン4: Dox非存在下で培養したanti-lamin A/C-DsRed2導入細胞、レーン5: Dox (1 µg/ml) 存在下で培養したanti-lamin A/C-DsRed2導入細胞。

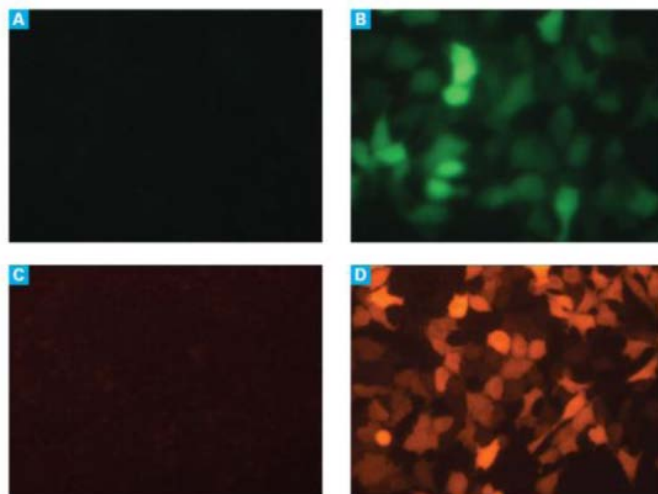


図2 蛍光顕微鏡観察:

パネルA: Dox非存在下で培養したanti-lamin A/C-AcGFP1導入細胞、パネルB: Dox (1 µg/ml) 存在下で培養したanti-lamin A/C-AcGFP1導入細胞、パネルC: Dox非存在下で培養したanti-lamin A/C-DsRed2導入細胞、パネルD: Dox (1 µg/ml) 存在下で培養したanti-lamin A/C-DsRed2導入細胞。

**備考:**