

Take Aim and Score a Kock Down

siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System: siRNAターゲットの迅速なスクリーニング

By Jolanta Vidugiriene, Ph.D.¹, Thomas Yeager, Ph.D.¹, Lin Wang, Ph.D.², Jiwu Wang, Ph.D.², Zhaohui Dong, Ph.D.², Cynthia Sprecher, B.S.¹, and Doug Storts, Ph.D.¹ ¹Promega Corporation, ²Allele Biotechnology and Pharmaceuticals, Inc.

アブストラクト

プロメガでは、siRNAを発現するDNAカセットを用いて、哺乳動物細胞にRNA干渉 (RNAi) 効果を誘導するための最適化された試薬キットを開発しました。カセットには、効率が良く、正確な真核生物RNAポリメラーゼIII U6プロモーターが備わっています。

この発現カセットは、PCRで合成し、目的の細胞株にトランスフェクションするようにデザインされています。この方法は、複数の標的サイトを迅速にスクリーニングする場合に最適です。

siLentGene™ Systemは迅速、経済的で、迅速なスクリーニングや異なるsiRNAの効率評価を簡便に行えるシステムです。

はじめに

RNA干渉 (RNAi) として知られている2本鎖RNA (dsRNA) を用いた遺伝子発現のサイレンシングは、遺伝子機能解析を行う上で強力なツールとなっています。特定の遺伝子発現の選択的なダウンレギュレーション (またはノックダウン) により、多くの細胞内プロセスの中でその機能を決定づけることができます。遺伝子ノックダウンは、単一遺伝子の機能解析を行う研究者にとって非常に有用です。さらに、シンプルで予想可能である場合、ノックダウン法は薬剤開発過程においても有効な手段です。遺伝子ノックダウン実験は、細胞内経路のマッピング、薬剤による抑制ターゲットの選択、遺伝子治療の開発などを含む多くの生物学的研究において有用です。siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference Systemは、RNAiを利用した遺伝子機能解析を行う上で便利なツールとなります。

RNAiの現象

RNAiは、dsDNAと相同するmRNAを特異的に分解するdsRNAにより誘導される細胞内プロセスとされています。いくつかのシステムでは、細胞内で少コピー数のsiRNAが同種の転写産物全体を分解することが知られています(1)。ショウジョウバエにおけるタイプIII RNaseである“Dicer” (2) など、このプロセスに関与する多くの遺伝子産物が同定されています。Dicerは、長鎖dsRNAやヘアピンRNA (3) を通常21~23ヌクレオチドの2本鎖siRNA (small interfering RNA) に分解します。siRNAの生成が、RISC (RNA-induced silencing complex) 形成の引き金となります。この複合体に含まれるヘリカーゼはdsRNAを解き、1本鎖になったRNA (ssRNA) が基質を選別するガイド役を担います。このssRNAが標的mRNAと塩基対を形成すると、複合体に存在すると考えられるヌクレアーゼ活性によりmRNAが分解されます (図1)。

哺乳動物細胞へのRNAi導入法

1998年のFireらによるRNAi現象の発見直後 (1)、dsRNAは線虫、ショウジョウバエ、植物での遺伝子機能解析ツールとして利用されるようになりました (4,5)。哺乳動物細胞では、長鎖dsRNAによるマウスの胚性がん細胞や胚性幹細胞での配列特異的な遺伝子サイレンシングが観察されました (6,7)。しかし、哺乳動物細胞への長鎖dsRNA導入は、

抗ウイルス防御システムを活性化し、非特異的なRNA分解 (8)、宿主細胞のタンパク質合成全般を低下させました(9, 10)。これらの2つの機構は効果的に哺乳動物細胞の活性を停止させるため、長鎖dsRNAの特異的なRNAi作用を無効にします。しかし、3'突出塩基末端を持つ短鎖dsRNA (21~23nt) は、これらの抗ウイルス機構を誘発せず、哺乳動物細胞でも遺伝子特異的な抑制を仲介します。短鎖dsRNAはin vitroで

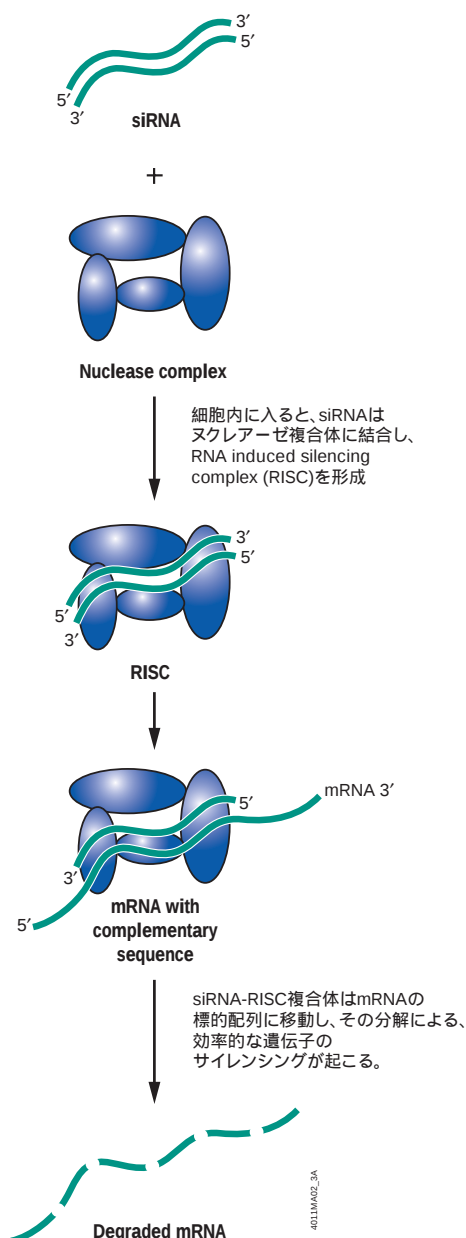


図1. 提唱されるRNA干渉のメカニズム

合成し、哺乳動物細胞に導入することができます。また、DNAベクターをベースとした戦略は、siRNAを哺乳動物細胞に導入するために使用され、哺乳動物におけるRNAiの利便性を高めています。

しかしながら、この新しいアプローチの成功は、最適な発現抑制を与える標的mRNA内の特定領域の選択に依存します。いくつかのアルゴリズムは、標的に対する与えられたsiRNAの発現抑制効果を予想するためにデザインされていますが、適性領域として選別されても、まだ試行とエラーを伴う長い実験過程が残されています。そのため、一般的に各標的ごとに複数の領域についてスクリーニングを行います。スクリーニングには、高価な合成RNAを用いる方法や、煩雑なDNA配列のクローニングを伴うものがあります。siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference Systemは、RNA合成にかかる費用、DNAクローニングに費やす時間と労力を削減し、比較的迅速、簡便に異なるsiRNA配列をスクリーニングすることができます。効率の高い標的配列は、頑強なsiRNAを介した遺伝子特異的の阻害を与え、哺乳動物細胞の遺伝子機能解析においてRNAiアプローチを強力な武器に変えます。

siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System

siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference Systemは、DNAカセットがベースとなったアプローチで、迅速、効果的にsiRNAを細胞内に直接供給するためにsiRNA発現コンストラクトを作製します。プライマーに依存するこのPCRベースのシステムでは、U6プロモーターおよびターミネーターの制御下に選択されたsiRNA配列を配します。PCR産物は細胞に直接トランスフェクションされ、1つ1つをクローニングする労力を必要としません（図2）。

比較的シンプルなプロモーターとターミネーター配列は、トランスフェクションした哺乳動物細胞の内在性RNAポリメラーゼIIIにより大量のsiRNA合成を促します。ターミネーターは短いウリジンで構成され、これらは2つのウリジン3'突出末端を持つ元来のsiRNAデザインに合致します（9）。siLentGene™ Systemは、異なるsiRNA効力の迅速なスクリーニングと決定を行うための迅速、経済的で簡便なアプローチです。

siLentGene™ Systemでは、上流プライマーとPCRの鋳型となるU6 Cassette DNAを供給します（下流プライマーは自家調製）。下流プライマーは3つの部分（U6 Cassetteとアニーリングする領域、siRNAに転写される領域、U6ターミネーター領域）を含むように構成します。従って、PCRで合成されたU6発現カセットには、U6プロモーター、センスまたはアンチセンスmRNA標的配列、ターミネーター配列が含まれます。

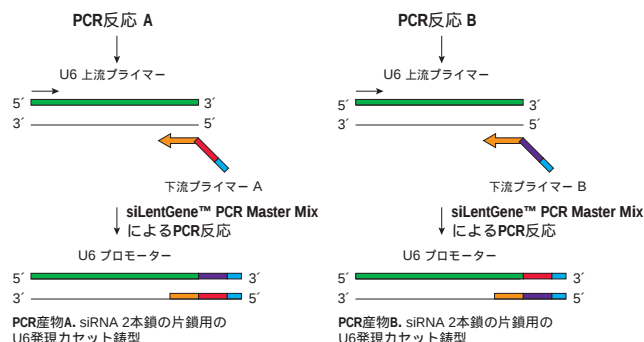
それぞれアンチセンスまたはセンスRNAを発現する2つの発現カセットが合成され、カラム精製した後に2つを混和し、siLentGene™ Transfection Reagentを用いて適切な細胞株にトランスフェクションします（図2）。

トランスフェクション後、細胞内の内在性RNAポリメラーゼIIIが、各発現カセットから短鎖RNAを転写します。相補的なsiRNAがアニーリングすると、siRNAの2重鎖を形成します。この2重鎖がトランスフェクションされた細胞内で標的mRNAの特異的な分解の引き金となります。

最適な標的配列のスクリーニング

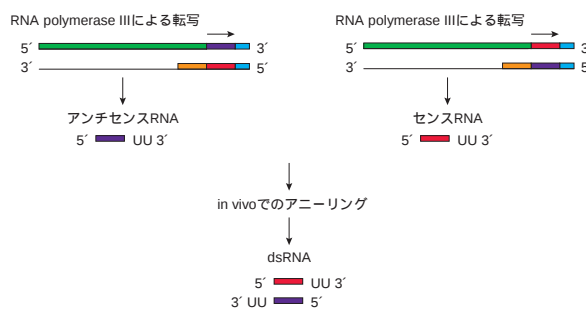
最適な標的配列の決定は、RNA干渉実験の成功を左右します。標的に対する最適なRNA配列を完全に予想することは不可能であり、siLentGene™ テクノロジーは迅速、経済的に複数の標的を評価すること

1. 適切な配列を含む下流DNAプライマーの設計と合成（下流プライマー-Aと下流プライマー-B）



2. siLentGene™ PCR DNA Purification SystemによるPCR産物の精製

3. 混和したPCR産物を適当な細胞株にトランスフェクション



4. 任意の方法によるRNA干渉の分析（例：ウエスタン分析、酵素活性測定、免疫細胞染色）

図2. siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference Systemのプロトコル概要

のできる理想的なフォーマットを提供します。siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference SystemのTechnical Manual TM061に記載されている一般的なガイドラインに従い、ヒューマニズした*Renilla* ルシフェラーゼ遺伝子のコード領域に対する5つの異なる標的配列を選別しました。1つの標的についてセンスまたはアンチセンス配列を持つ2つのDNAカセットを作製しました。PCR産物はプライマーを除くためにカラム精製し、*hRluc*を安定に発現するCHO細胞株にトランスフェクションしました。RNAiの抑制効果は、ウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ活性の減少により簡便にモニタリングしました。選択された5つ全ての標的配列は、非特異的配列に較べ*hRluc*活性が減少しました（図3）。しかし、抑制のレベルは20～70%と多様で、領域が異なれば、直接的なノックダウン効果も異なることを示しました。サイト3が最も顕著なRNAi効果を示しました。対照的に、サイト4は最も低い阻害効果を示し、機能解析実験に適していませんでした。RNAi実験で最も効率の高い配列を選択することは、遺伝子機能の消失効果の理解を目的とする研究において重要なポイントであり、siLentGene™ Systemは複数の標的サイトを迅速に評価する上で便利なツールとなります。

最適な抑制条件の決定

レポーター遺伝子（例：ヒューマニズされたウミシイタケルシフェラーゼ）を安定に発現する細胞株は、アッセイの最適化に便利なシステムを提供します。我々はヒューマニズされたウミシイタケルシフェラーゼを安定に発現するいくつかの細胞株を構築しました。これ

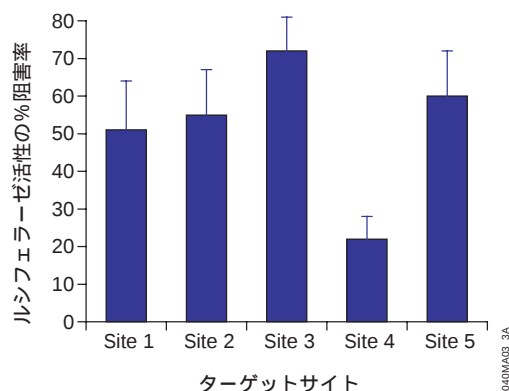


図3. CHO細胞における“ヒューマニズ”されたウミシイタケルシフェラーゼの抑制

トランスフェクション前日にhRlucを安定に発現するCHO細胞を96ウェルプレートに細胞密度 3×10^3 個/ウェル（50%コンフルエンス）で播種。翌日、センスおよびアンチセンスDNA U6カセット0.05 μ gおよびトランスフェクション効率を決定するためのGFP発現ベクター（カタログ番号 E6421）0.1 μ gをトランスフェクションした。5種類の異なる標的サイト：サイト1（ATGより75-93）、サイト2（ATGより297-315）、サイト3（ATGより375-393）、サイト4（ATGより508-526）、サイト5（ATGより756-776）およびネガティブコントロールとして非特異的配列を用いた。1サンプルあたり10ウェルを使用し、5ウェルでウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、残る5ウェルで細胞数/生存性を計測した。ウミシイタケルシフェラーゼ活性はRenilla Luciferase Assay System（カタログ番号 E2810）を用いて測定した。細胞数/生存性の計測にはCellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay（カタログ番号 G7570）を使用した。データは、細胞数あたりの非特異的配列（コントロール）に対する特異的標的配列のウミシイタケルシフェラーゼ活性の%減衰率で示した。結果は4重複体の平均値で示した。

らの細胞株は重要な抑制パラメーターを最適化するために使用しました。細胞は異なる細胞密度で播種し、サイト3に対する標的配列を含むセンスおよびアンチセンスU6カセットをトランスフェクションしました（図3で前述）。抑制レベルは、96時間後にhRluc活性のモニタリングにより決定されました。

平行して、細胞数の変化を48～96時間モニタリングしました。トランスフェクションした高密度の細胞ではhRluc活性の抑制はほとんど認められませんでした。低密度の細胞では実質的な抑制を示していました（60%以上、図4）。これらの観察結果は、コンフルエントな細胞ではタンパク質合成が著しく低下し、RNAi効果の減少を導いたと考えられました。細胞増殖性のデータでは、高密度に播種した細胞では、低密度の細胞と比べ低い増殖率を示しました。これは、siLentGene[™] U6 Cassette RNA Interference Systemのアプリケーションの成功には健康な培養細胞の維持が必須であることを示しています。

内在性の遺伝子発現阻害：p53のケーススタディー

転写因子p53はヒトの癌において最も一般的に変異を受ける癌抑制遺伝子です（11）。p53タンパク質は短い半減期を持ちますが、遺伝子の点変異やSV40 Large T antigenなどある種のDNAがんウイルスとの相互作用により安定化場合があります。

p53タンパク質の阻害テストを行うために、293T細胞株を用いました。これは293T細胞がp53タンパク質を安定化するSV40 T antigenを持ち、p53タンパク質を高レベルに蓄積するためです。細胞の播種から24時間後、p53用または非特異的コントロール用のU6カセットをトラン

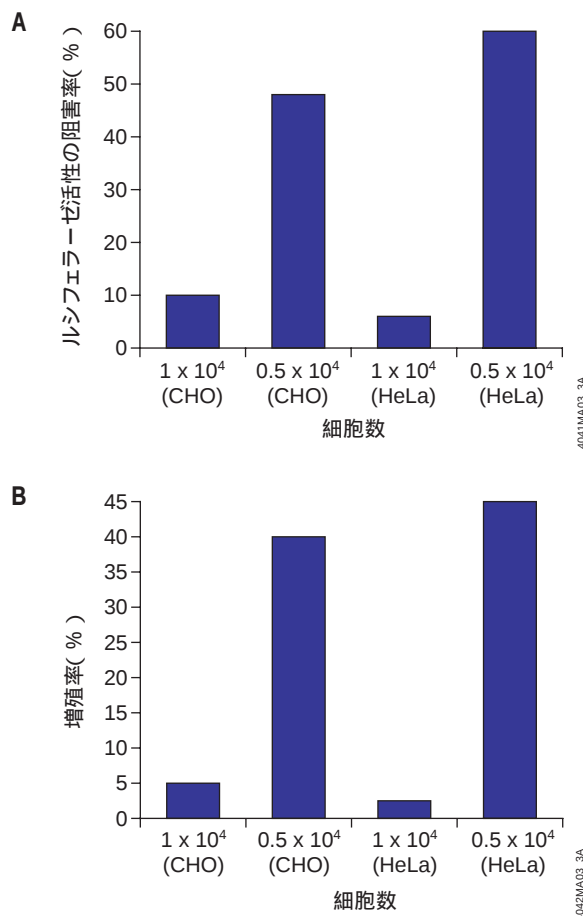


図4. hRluc発現抑制と細胞増殖の相関性

実験は96ウェルプレートで行った。1サンプルあたり10ウェルの細胞にトランスフェクションし、5ウェルでウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し（パネルA）、残る5ウェルで細胞数/生存性を計測した（パネルB）。ウミシイタケルシフェラーゼ発現の抑制は、トランスフェクション96時間後に測定した。増殖率はトランスフェクション後48～96時間の間に増加した細胞数をベースに算出した。図3で記述したサイト3をトランスフェクションした細胞のルシフェラーゼ活性は、非特異的配列を含むカセットをトランスフェクションした細胞の活性と比較した。

スフェクションしました。また、細胞にはGFPベクターもトランスフェクションしました。トランスフェクション48時間後、トランスフェクション効率を算出するためにGFPポジティブ細胞の%を求めました。残りの細胞は72時間後に溶解し、タンパク質定量を行いました。サンプルあたり等量のタンパク質をアクリルアミドゲルに泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写しました。検出はp53モノクローナル抗体を用いて行いました。アクチン抗体はレーン間の等しい添加量を確認するために使用しました（図5）。バンドはデンストメトリーにより定量し、p53の減少を決定し、アクチンの添加量コントロールにより補正しました。

p53の実験は、平均53%の阻害効果を示しました。同じタイムポイントでのGFPトランスフェクション効率は40%と決定されました。U6カセットによる阻害レベルは、プラスミドマーカーのトランスフェクション効率よりもわずかに高い値を示しました。

ラミンA/Cの発現阻害

通常、標的遺伝子の発現低下は、細胞集団を調べる場合はウエスタンブロッティング、個々の細胞を分析する場合は免疫細胞染色法を用います。培養細胞において合成siRNAにより効果的に阻害されることが知られている (12, 13) ヒトの核タンパク質ラミンA/Cを標的として選びました。センスまたはアンチセンス標的配列を含むsiLentGene™ U6 Cassette (図6、パネルB、D) または非特異的配列を含むU6 Cassette (図6、パネルA、C) をHeLa細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクション72時間後、細胞を固定し、ラミンA/C (赤) またはラミンB1 (緑) に対する抗体で染色しました。図6、パネルBは、ラミンA/C標的配列に対するsiRNAを生成するためにU6カセットをHeLa細胞に一過性にトランスフェクションすることにより、ラミンA/Cタンパク質が減少したことを示しています。非特異的配列を含むU6カセットをトランスフェクションした場合 (図6、パネルA) タンパク質の減少は認められませんでした。加えて、ラミンA/C PCRカセットはラミンB1の発現に影響を及ぼさず、この観察結果が特異的な効果によるものであることを示唆していました (図6、パネルC、D)。

結論

siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference SystemはsiRNAの細胞内発現を迅速、経済的に行うことのできるPCRベースのアプローチです。最適なsiRNA標的配列の同定や次段階における広範な遺伝子の抑制テストに有用な実験ツールです。

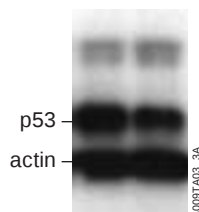


図5. 内在性p53タンパク質の抑制

293T細胞は、12ウェルプレートでU6カセット1μg/ウェル (各PCR産物0.5μg) をsiLentGene™ Transfection Reagent 6μg/ウェルを用いてトランスフェクションした。その後、細胞を72時間インキュベーションし、溶解後タンパク質を定量した。1レーンあたり5μgタンパク質を10% トリス-グリシンゲルで泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンはp53抗体 (1:1,000 Calbiochem Ab-2) および添加量コントロールとしてβ-アクチン抗体 (1:5,000 Abcam, Ab 6276) でブローブした。ヤギ 抗マウス-ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識2次抗体を使用し、化学発光で検出した。第1レーンでは非特異的U6カセットをネガティブコントロールとしてテストした。第2レーンでは、p53 U6カセットをトランスフェクションした。実験はデュープリケートで行った。

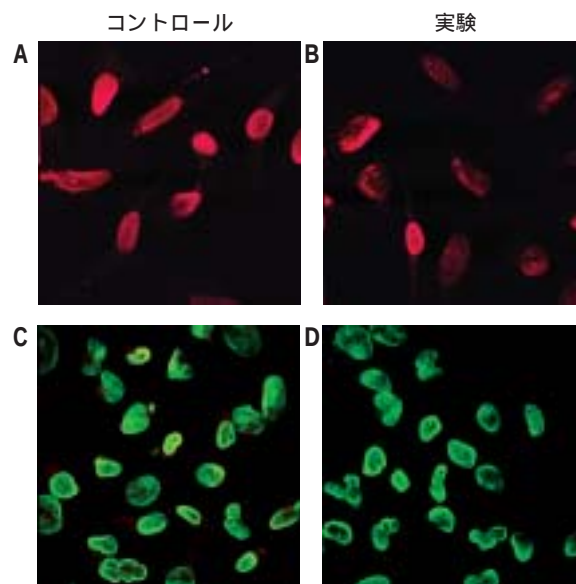


図6. siRNAを発現するPCRカセットをトランスフェクションしたHeLa細胞のラミンA/C発現阻害

HeLa細胞にラミンA/C U6発現カセット (パネルB、D) または非特異的標的配列を発現するU6カセット (パネルA、C) をトランスフェクションした。細胞はラミンA/C抗体 (パネルA、B) またはラミンB1抗体 (パネルC、D) で免疫染色し、共焦点顕微鏡で分析した。

参考文献

1. Fire, A. et al. (1998) *Nature* **391**, 806–811.
2. Hannon, G.J. (2002) *Nature* **418**, 244–251.
3. McManus, M.T. and Sharp, P.A. (2002) *Nat. Rev. Genet.* **3**, 737–747.
4. Hammond, S.M., Caudy, A.A. and Hannon, G.J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* **2**, 11–19.
5. Grishok, A. and Mello, C.C. (2002) *Adv. Genet.* **46**, 339–360.
6. Billy, E. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14428–14433.
7. Paddison, P.J., Caudy, A.A. and Hannon, G.J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1443–1448.
8. Martinand, C. et al. (1998) *J. Cytokine Res.* **18**, 1031–1038.
9. Farrell, P.J. et al. (1977) *Cell* **11**, 187–200.
10. Groskreutz, D. and Schenborn, E. (1994) *Promega Notes* **48**, 8–12.
11. Reznikoff, C.A. (1996) *Sem. in Oncology* **23**, 511–584.
12. Elbashir, S.M. et al. (2001) *Nature* **411**, 494–498.
13. Harborth, S. et al. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 4557–4565.

プロトコール

- ◆ siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System Technical Manual, #TM061, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm061/tm061.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System	1 システム	C7800	110,000