



Shedding Light on RNAi

psiCHECK™ Vector: RNAiを最適化するための生物発光レポーター遺伝子の使用

By Jolanta Vidugiriene, Ph.D., Thomas Yeager, Ph.D., Brian Almond, Ph.D., Denise Garvin, M.S., Bob Bulleit, Ph.D., and Doug Storts, Ph.D. Promega Corporation

アブストラクト

psiCHECK™ Vectorは、RNA干渉 (RNAi) を最適化するための定量的、迅速なアプローチを提供します。このベクターを用いれば、融合されたレポーター遺伝子の活性をモニタリングすることにより標的遺伝子の発現変化を観察することができます。psiCHECK™ Vectorにはレポーターとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が利用されます。目的の標的遺伝子は、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の翻訳停止コドン下流に位置するマルチクロニングサイトにクローニングすることができます。標的遺伝子に対するRNAiが開始されて切断されると、引き続き融合されているウミシイタケルシフェラーゼRNA配列も分解されます。このRNA分解はルシフェラーゼ活性の低下を引き起こします。活性の低下はモニタリングすることができます。標的遺伝子に対するRNAi効果の簡便な指標として使用することができます。そのため、psiCHECK™ VectorはRNAi活性を定量的に測定することができ、ハイスループットアプリケーションでの使用に簡単に応用することができます。

チクローニングサイト)をウミシイタケルシフェラーゼの翻訳停止コドンの3'側に加えました。これらの制限酵素サイトは、ウミシイタケルレポーター遺伝子と標的遺伝子を遺伝子レベルで融合させるために使用します。ウミシイタケの翻訳停止コドンが存在するため、融合タンパク質が合成されることはありません。そのため、標的遺伝子を挿入する際に、機能的な読み枠を維持させる必要がありません。また、このデザインにより毒性を持つ遺伝子や遺伝子断片についても分析することができます。

psiCHECK™-1 Vectorは、生細胞に対するRNAi効果のモニタリングに推奨されます。ウミシイタケルシフェラーゼ活性の変化はEnduRen™ Live Cell Substrate (カタログ番号E6481)を用いて測定されます。このアプローチは、細胞内発光の継続的なモニタリングを可能にします。ウミシイタケルシフェラーゼ発現は、正常な細胞形態に影響を与えることなく2日間継続的にモニタリングすることができます。

psiCHECK™-2 vector には第2のレポーター遺伝子として改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (hLuc+) も組み込まれており、細胞を溶解するエンドポイントアッセイを行うためにデザインされています。ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ活性は、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (カタログ番号E1910) またはDual-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号E2920) で測定することができます。psiCHECK™-2 Vector にホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を付加することにより、ウミシイタケルシフェラーゼ発現の変化に対してホタルルシフェラーゼの発現で補正できるようになり、このシステムをより頑健で再現性に富むシステムにしています。

すべてのsiRNAが哺乳動物細胞における標的遺伝子の抑制に対して同様の効果を示すわけではありません。そのため、標的遺伝子の発現に最も効果的な阻害効果を示すsiRNA配列を同定することが重要です。

イントロダクション

RNAiの主要な機能的仲介物は、長さ21~23ヌクレオチド、2本鎖のsiRNA (short interfering RNA) です。これらのsiRNAはRISC (RNA induced silencing complex) と相互作用し、相補的な標的mRNAを認識し、切断するための鋳型として機能します。合成siRNAや発現させたshRNA (short hairpin RNA) を細胞内に導入し、実験的にRNAiを誘導することができます。標的遺伝子に対して作製されたすべてのsiRNAが哺乳動物細胞における標的遺伝子の抑制に対して同様の効果を示すわけではありません。そのため、標的遺伝子の発現に最も効果的な阻害効果を示すsiRNA配列を同定することが重要です。現在、効果的なsiRNAを設計するための新しいデザイン法が提案されています(1-3)。現行のスクリーニング技術は半定量的で時間がかかり、複数のsiRNA/shRNA配列を迅速、同時にスクリーニングできるように改良することは容易ではありません。しかし、RNAi法が進歩し、ハイスループットアプリケーションへの適応性が増すに従い、siRNAの効果を確認するための迅速で定量的なスクリーニングに対する要望が高まっています(4-5)。

psiCHECK™ Vectorの概要

psiCHECK™ Vectorは、定量的に最適なsiRNA標的のサイトを選択でき、ハイスループットアプリケーションでの使用に適応できるようにデザインされています。psiCHECK™ -1 (カタログ番号C8011)、-2 (カタログ番号C8021) の両ベクターにはRNAi活性のモニタリング用に改変型ウミシイタケルシフェラーゼ (hRluc) がレポーター遺伝子として組み込まれています。改変ウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子に標的遺伝子を融合させるために、いくつかの制限酵素サイト(マル

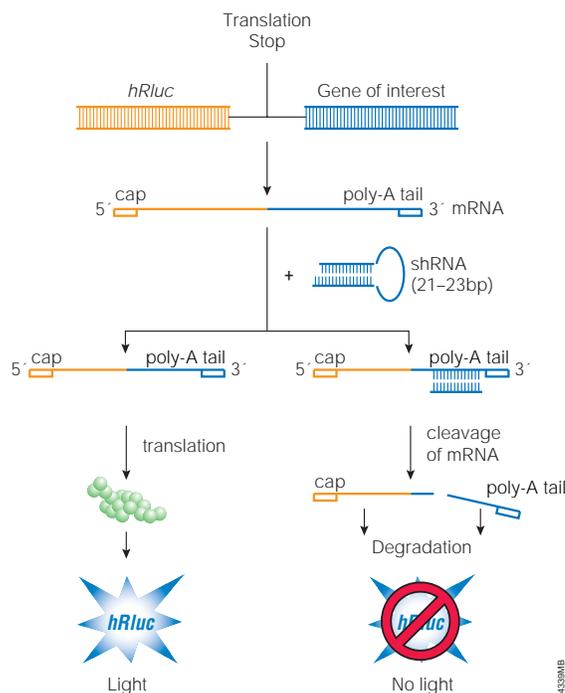


図1. psiCHECK™ Vector機能のメカニズム

psiCHECK™ Vector 機能の原理

図1ではpsiCHECK™ Vectorがどのように使用されるかを示すために基本的な図で解説しています。標的遺伝子は改変ウミシタケ遺伝子およびその翻訳停止コドンの3'側に位置するマルチクロニングサイトにクロニングされます。クロニング後、このベクターを哺乳動物細胞株にトランスフェクションすると、融合した状態でウミシタケ遺伝子と標的遺伝子は転写されます。インタクトな転写産物である場合、機能的なウミシタケルシフェラーゼが翻訳されます。実験のデザインにより、shRNAを発現するベクターまたは合成siRNAを同時または続けてコトランスフェクションすることができます。特定のshRNA/siRNAが標的RNAに対してRNAiプロセスを効果的に開始させれば、融合したウミシタケ+標的遺伝子のmRNA配列は分解され、ウミシタケルシフェラーゼ活性が低下します。

psiCHECK™ Vector の有効性の評価

効果的なsiRNAプロブ同定における本スクリーニング法の有効性を評価するために、psiCHECK™-1 およびpsiCHECK™-2 Vectorの各マルチクロニングサイトに位置する*Sgf I* および*Not I* 制限酵素サイトを用いてヒトp53 cDNAをサブクロニングしました。この制限酵素サイトはウミシタケ翻訳停止コドンの3'側に位置します。また、我々はp53遺伝子に対する異なる5種類のshRNAをデザインしました。p53上の異なる標的サイトに対するshRNA配列を含むDNAコンストラクトを作製するために、siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning System- Basic (カタログ番号C7860)を使用しました。siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning Systemを用いれば、U6プロモーター+shRNA配列(標的配列+ループ+標的逆相補配列)+U6停止配列から成るDNAカセットを1回のPCR反応で作製することができます。合成されたPCR断片は、shRNA標的配列の効果的な前スクリーニングを行うために哺乳動物細胞に直接トランスフェクションすることができ、時間のかかるクロニングステップを省略することができます。

このアプローチを評価するために、p53 cDNAを含むpsiCHECK™-2 Vectorとp53 shRNA(図2, サイト1-5)または非特異的shRNAを発現する直鎖状DNAカセットをHEK293T細胞にコトランスフェクションした。さらに、ポジティブコントロールとして、ウミシタケルシフェラーゼに対して完全に相補するshRNAまたは4塩基ミスマッチshRNAを使用しました。ホタルおよびウミシタケルシフェラーゼのシグナルは、Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System(カタログ番号E1980)を用いてアッセイしました。異なるshRNAの効果は、ホタルルシフェラーゼのシグナルで補正されたウミシタケ活性(トランスフェクション効率の補正)の減少をモニタリングすることにより決定しました。直鎖状DNA分子から発現したshRNAが、siLentGene™-2 Basic VectorにDNA分子をサブクロニングしたコンストラクトからのものと同等な抑制パターンを示すかを確認しました。p53遺伝子の異なる標的サイトに対するshRNAを発現するベクターで繰り返し実験を行いました。図2にはデータのサマリーを示します。

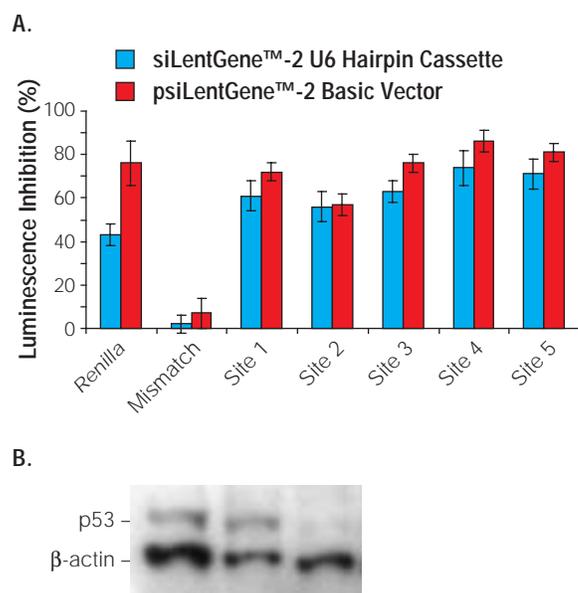


図2. psiCHECK™-2 Vectorを用いたp53遺伝子に対する標的サイトの選択
 パネルA: HEK293T細胞を3,000個/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。ヒト p53 cDNAをpsiCHECK™-2 Vectorの *Sgf I* および *Not I* 制限酵素サイトにサブクロニングした。1ウェルあたりpsiCHECK™-2 Vector:p53 0.02μg および siLentGene™-2 U6 Hairpin Cassette 0.08μg (青)または psiLentGene™-2 Basic Vector (赤)を細胞にトランスフェクションした。DNAカセットのトランスフェクションにはCodeBreaker™ siRNA Transfection Reagent (カタログ番号E5052)を、ベクターDNAのトランスフェクションにはTransFast™ Transfection Reagent (カタログ番号E2431)を用いた。shRNAはヒトp53に対する異なる5つの標的サイト。ポジティブコントロールとして、ウミシタケルシフェラーゼと完全に相補するshRNAおよび4塩基ミスマッチshRNAを使用した。データは非特異的配列に対するshRNAでトランスフェクションした細胞で補正した。トランスフェクション48時間後、Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System (カタログ番号E1980)を用いてウミシタケおよびホタルルシフェラーゼ活性を測定した。データは異なる標的配列または非特異的shRNA配列に対するshRNAでトランスフェクションした細胞のホタルルシフェラーゼ活性で補正したウミシタケ活性の%抑制効果で示した。データは12ウェルの平均±標準偏差。パネルB: p53の阻害実験はHEK293T細胞で行い、ウェスタンブロットにより分析した。細胞はトランスフェクション試薬のみ(レーン1)、psiLentGene™-2 Basic Vector + 非特異的配列(レーン2)またはpsiLentGene™-2 Basic Vector + p53標的サイト4(レーン3)で処理した。トランジェントアッセイは72時間後に行った。

データは、異なる標的サイトに対するshRNAまたは非特異的shRNA配列を生成する細胞からの補正されたウミシタケ活性の%抑制効果として表しました。ウミシタケルシフェラーゼを標的とする直鎖状DNA断片(PCRで合成: Technical Bulletin, TB329に記載)から発現するshRNAの場合、補正されたウミシタケのシグナルは非特異的コントロールに比べて43%の減少を示し、標的配列に対して4塩基ミスマッチを導入したものではその抑制効果は解消されました。p53に対する5種類すべてのshRNAは、ウミシタケ/p53発現を抑制しましたが、その抑制レベルは56%(サイト2)から74%(サイト4)と多様でした。psiLentGene™-2 Basic Vectorに直鎖状DNA断片をサブクロニングした場合、同様の抑制パターンが観察されました(青と赤の比較)。どちらのケースでもp53のサイト4で最大の抑制レベルを示しましたが、実際の抑制レベルは、shRNA発現ベクターをトランスフェクションした細胞でより高い値を示していました。p53のサイト4に対するshRNAを発現するpsiLentGene™-2 Basic Vectorをテストした場合、ウミシタケ(p53)タンパク質の発現は、86%低下していました。

このデータよりいくつかの結論を導き出すことができます。まず、カセットまたはベクターシステムの両方は同様の抑制パターンを示しました。第2に、PCRで合成したDNA分子は、最適な標的サイトを迅速にスクリーニングするために細胞へそのままトランスフェクションして使用することができます。第3にshRNA分子を適切なベクター (psiLentGene™-2 Basic vector) にサブクローニングした場合に最大の抑制レベルを示し、最適なRNAi効果は巨大なDNAベクターコンストラクトから得られたことを示唆していました。

前述したアプローチを評価するために、p53標的サイト4に対するshRNAを発現するsiLentGene™-2 Basic Vectorが、内在性p53タンパク質の発現に対しても抑制能力を有することを示すことが重要でした。図2, パネルBでは非特異的配列に対するshRNA (レーン2) またはp53標的サイト4に対するshRNA (レーン3) を発現するsiLentGene™-2 Basic vectorをトランスフェクションしたHEK293T細胞のウエスタンブロット分析の結果を示しています。ウエスタンブロット分析のデータは、shRNA処理した細胞のp53タンパク質量 (-アクチン量で補正) が80%以上減少していることを示しており、psiCHECK™ Vectorを用いて得られたデータが確かめられました。

RNAiカイネティクスのモニタリング

psiCHECK™ Vectorのウミシイタケルシフェラーゼを利用することにより、RNAiによるウミシイタケの発現変化を生細胞を用いたマリアルタイムでモニタリングすることができます。図3では、ヒトp53 cDNAを含むpsiCHECK™-1 Vectorおよびウミシイタケルシフェラーゼ、その非特異的配列またはp53に対するshRNAを発現するpsiLentGene™-2 Basic Vectorをコトランスフェクションした細胞のウミシイタケ活性の変化を示しています。トランスフェクション17時間後、非破壊アッセイ用のEnduRen™ Live Cell Substrateを各ウェルに添加しました。その後26時間 (トランスフェクション41時間後まで) にわたり相対発光ユニットをモニタリングしました。非特異的配列に対するshRNAをトランスフェクションした細胞でのウミシイタケ活性は劇的に上昇しましたが、ウミシイタケルシフェラーゼまたはp53標的サイト4に対するshRNAをトランスフェクションした細胞ではウミシイタケの発現はほんのわずかに増加しただけでした。41時間後、機能的shRNAをコトランスフェクションした細胞では80%のウミシイタケルシフェラーゼ抑制が測定されました。これらの結果は、エンドポイント分析を用いた図2の抑制結果と一致していました。エンドポイントでの細胞生存性を決定するためにCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay reagent (カタログ番号G7570) を細胞に添加しました。ウミシイタケルシフェラーゼシグナルを各ウェルごとに生存細胞の相対数で補正した場合、抑制レベルに変化はありませんでしたが、ウェル間のシグナルのバラツキが大幅に低減されました (データ未掲載) 。

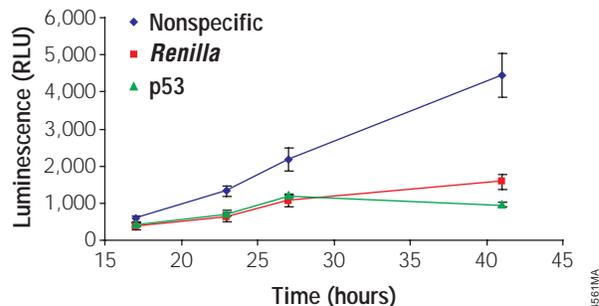


図3. 生細胞におけるウミシイタケルシフェラーゼ活性変化の測定
HEK293Tは3,000個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。一昼夜インキュベーションした後、1ウェルあたり無血清培地35µl、TransFast™ Transfection Reagent (カタログ番号E2431) 0.3µl、psiCHECK™-1:p53 vector 0.02µg、psiLentGene™-2 Basic Vector 0.08µgで構成されるトランスフェクション混合液で処理した。この実験では、psiLentGene™-2 Basic Vectorはヒトp53、ウミシイタケまたは非特異的配列 (ネガティブコントロール) に対するshRNAを発現した。1時間インキュベーションした後、血清含有培地100µlを各ウェルに添加した。トランスフェクション17時間後、終濃度60µMになるようにEnduRen™ Live Cell Substrate (カタログ番号E6481) を添加し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性をモニタリングした。

複数の標的に対する複数のshRNAのスクリーニング

我々は、他の遺伝子に対する効果的なRNAiサイトを同定する上で、本システムの一般的な適応性について検討するためにカスパーゼ遺伝子群のRNAiによるサイレンシングについて分析しました。我々はまず、siLentGene™-2 U6 Hairpin Cloning Systemにより提供される迅速なPCRアプローチを用いてshRNAを作製しました。各カスパーゼの異なる標的サイトに対応するPCR産物と各カスパーゼ遺伝子のcDNAをコードするpsiCHECK™-2 vectorをコ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時間後にウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ活性を測定しました。収集したデータを図4に示しました。パネルAでは、HeLa細胞にカスパーゼ8 cDNAを含むpsiCHECK™-2 vector およびカスパーゼ3、7、8、9の異なる標的サイトに対するshRNAを発現するDNAカセットをコトランスフェクションしました。このデータでは、psiCHECK™-2:caspase 8 vectorとコトランスフェクションした場合、カスパーゼ8に対する標的配列を含む1つのshRNA (サイト3) のみがウミシイタケルシフェラーゼ活性を顕著に減少させていることを示していました。種類の異なるカスパーゼ (例 ; カスパーゼ3、7、9) 標的サイトに対するshRNAでは、補正されたウミシイタケルシフェラーゼ活性の大幅な減少は示されませんでした。

図4, パネルBでは、特定のカパーゼ(例;カパーゼ3)のいくつかの標的配列に対するshRNAを発現するDNAと対応するカパーゼ(この場合;カパーゼ3)のcDNAを含むpsiCHECK™-2 vectorをコトランスフェクションしたデータを示しました。データは、異なる標的サイトへのshRNAをトランスフェクションした細胞の値を非特異的shRNAの値で補正したウミシイタケ活性をベースに算出した抑制%で示しました。今回用いたカパーゼ3を標的とするサイトではウミシイタケ活性の十分な減少は示されませんでした。DNAフラグメントを用いた場合、カパーゼ8、7、9に対する最も効果的なサイトは46%から64%の抑制を示しましたが、ウミシイタケおよびp53標的サイトを分析した我々の先のデータを基にすると、抑制レベルはDNA断片を適切なベクターにサブクローニングすれば増加すると考えられます。

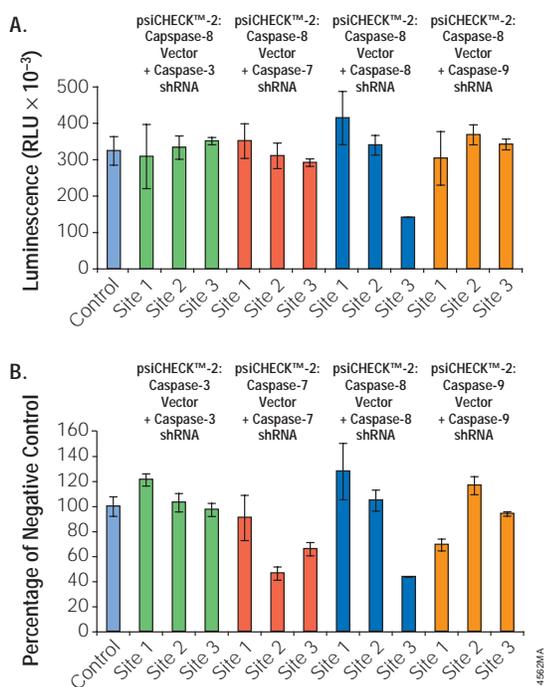


図4. 複数の潜在的shRNAのスクリーニング
 パネルA: カパーゼ8のcDNAをpsiCHECK™-2 vector のマルチクローニング領域にクローニングしpsiCHECK™-2:caspase-8を作製した。カパーゼ3、7、8、9を特異的に阻害するために各3つの潜在的shRNAをデザインした。shRNAを発現するsiLentGene™-2 CassetteはそれぞれPCR反応で作製した。psiCHECK™-2:caspase-8は異なる標的に対する siLentGene™-2 DNA cassetteとともにHeLa細胞にコトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System (カタログ番号E1980)を用いてウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼ活性を測定した。ウミシイタケルシフェラーゼの相対発光ユニットはホタルルシフェラーゼ発現で補正した。パネルB: カパーゼ3、7、8、9のcDNAをクローニングしたpsiCHECK™ vectorと対応するカパーゼのためにデザインされた標的サイトへのshRNAを発現するsiLentGene™-2 Cassetteをコトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、ウミシイタケとホタルルシフェラーゼ活性をパネルAと同様に測定した。データは、異なるカパーゼと異なる標的サイトに対するshRNAをトランスフェクションした細胞および非特異的shRNAをトランスフェクションした細胞の補正されたウミシイタケ活性をベースに算出した%抑制効率として示した。

結論

RNAiに対する潜在的イニシエーター(例;shRNA またはsiRNA)の同定および定量を補助するために、プロメガはpsiCHECK™ Vector Systemを開発しました。目的の遺伝子を選択したpsiCHECK™ Vectorにクローニングした後、RNAiの最適化のための定量的で迅速なアプローチを実施することが出来ます。psiCHECK™-1 VectorをEnduRen™ Live Cell Substrateとともに使用することによりRNAiの効果を示すウミシイタケ発現の減少を生細胞で継続的にモニタリングすることが出来ます。ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むため、psiCHECK™-2 Vectorからのウミシイタケ発現は補正することができ、そのため実験上またはトランスフェクションによるバラツキが低減し、信頼性、再現性のあるデータが得られます。

参考文献

1. Khvorova, A. *et al.* (2003) *Cell* **115**, 209–16.
2. Ui-Tei, K. *et al.* (2004) *Nucl. Acids Res.* **32**, 936–48.
3. Hsieh, A. *et al.* (2004) *Nucl. Acids Res.* **32**, 893–901.
4. Kumar, R. *et al.* (2003) *Genome Res.* **13**, 2333–40.
5. Mousses, S. *et al.* (2003) *Genome Res.* **13**, 2341–7.

プロトコル

- ◆ psiCHECK™ Vectors Technical Bulletin #TB329, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb329/tb329.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
psiCHECK™-1 Vector	20µg	C8011	48,000
psiCHECK™-2 Vector	20µg	C8021	55,000