



Light Up Your Best shRNA

生物発光レポーター遺伝子を利用した*bcr/abl* 遺伝子に対する RNAiのためのshRNA標的サイトの最適化

By Natalie Betz, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

哺乳動物細胞を用いて標的遺伝子発現を抑制する場合、全てのshRNAが同等に機能するわけではありません。そのため、特定の標的遺伝子配列に対するRNAiを誘導する最も効果的なshRNA配列を迅速、簡便に同定することは非常に重要です。2種類の発光レポーター遺伝子を持つpsiCHECK™-2 Vectorは、*bcr/abl* 遺伝子に対するRNAiを誘導する最も効果的なshRNAを同定するために使用されました。テストされた7種類のshRNAは、T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemを用いて作製されました。

psiCHECK™-2 Vectorは、*bcr/abl* 遺伝子に対する7種類のshRNAからのスクリーニングを行う迅速で簡便なアプローチを提供しました。

イントロダクション

哺乳動物細胞において、RNAi (RNA干渉) はsiRNA (short interfering RNAs) やshRNA (short hairpin RNAs) により特定の標的遺伝子の発現低下を誘導します。これらのsiRNAはRISC (RNA-induced silencing complex) と相互作用して相補的な標的mRNAを認識、切断するための鋳型として機能し、タンパク質レベルを低下させます (参考文献1を参照)。

標的遺伝子に対して作製された全てのsiRNA、shRNAが哺乳動物細胞内における遺伝子サイレンシングに対して同等の効果があるわけではありません。標的遺伝子発現の最も効果的な阻害剤であるshRNA配列を迅速、容易に同定することが重要です。半定量的で時間のかかる標的サイト選別のためのスクリーニング法では、複数の配列を同時に、しかも迅速にスクリーニングできるように改変する際に困難を伴う場合があります。

psiCHECK™-2 Vectorは、RNAiサイトの選別を最適化するための定量的で迅速なアプローチを提供します (2)。このベクターは、融合したウミシイタケルシフェラーゼ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、測定対象となる標的遺伝子の発現変化を追跡することができます。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ストップコドンの下流にクローニングされ、ハイブリットmRNAが発現されることになります (タンパク質はハイブリットではない)。標的遺伝子へのRNAiが開始されると、ウミシイタケルシフェラーゼmRNA配列を含む融合mRNAは切断に引き続き分解が起こります。この結果、RNAi効果の指標として容易にモニタリングできるウミシイタケルシフェラーゼ活性が低下します。また、psiCHECK™-2 Vectorに含まれる第2のレポーター遺伝子 (ホタルルシフェラーゼ) によりトランスフェクション効率を補正することができます。ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼの活性はDual-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いることにより非常に簡単に測定することができます。

bcr/abl 標的遺伝子に対する最適なshRNA配列を決定するために7種類の異なるshRNAを作製しました。これらのshRNAは、T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemを用いて2本鎖オリゴヌクレオチドDNAを鋳型としたin vitro転写により合成しました (3)。*bcr/abl* 遺伝子は、染色体9番と22番が相互転座した変異遺伝子で、細胞遺伝学上 フィラデルフィア染色体として識別され、慢性骨髄性白血病患者の90~95%に認められます (4)。この標的は臨床上の観点から選択されました。

psiCHECK™-2-*bcr/abl* コンストラクトの作製

フィラデルフィア染色体転座 陽性であるヒトCML細胞株 K562細胞からTotal RNAを精製し、Access RT-PCR Systemを用いたRT-PCRにより*bcr/abl* mRNAのある領域 (200bp) を増幅しました (4; GenBank® accession# M30829)。

この産物はハイブリットmRNAの*bcr*および*abl*遺伝子間の接合領域に相当します。*Sgf I*または*Pme I* 制限酵素サイトを含むフォワードおよびリバースプライマーを用いることにより、増幅産物に同様のサイトを導入しました (フォワード=5'-GTCA **GCGATCGC** GGAGCT-GCAGATGCTGACCAAC; リバース=5'-GATC **GTTTAAAC** TCAGACC-CTGAGGCTCAAAGTC)。このRT-PCR産物を同様に*Sgf I*および*Pme I* 制限酵素で消化したpsiCHECK™-2 Vectorにクローニングしました。その後、psiCHECK™-2-*bcr/abl* プラスミドはPureYield™ Plasmid Midiprep Systemを用いて精製しました。

bcr/abl mRNAに対する7種の異なるshRNAの合成

shRNAは、T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemおよび7種類の異なる2本鎖オリゴヌクレオチドを用いて合成しました。これら7種類のshRNAは、psiCHECK™-2-*bcr/abl* コンストラクトに含まれた200bpの配列に対応します。加えて、ウミシイタケルシフェラーゼを標的とするshRNAもRNAi のポジティブコントロールとして作製しました。これらshRNAの配列を表1に示しています。これらのshRNAは; 5'センス標的配列-ループ-アンチセンス標的配列-UU-3'から成る一般的な構造です。

表1. shRNA配列

標的サイト	shRNA配列
<i>bcr/abl</i> site 1	5'-GCUGCAGAUUGCUGACCAAC-uucaagaga-GUUGGUCAGCAUCUGCAGC-UU-3'
<i>bcr/abl</i> site 2	5'-GUGAAACUCCAGACUGUCC-uucaagaga-GGACAGUCUGGAGUUUCAC-UU-3'
<i>bcr/abl</i> site 3	5'-GAAACUCCAGACUGUCCAC-uucaagaga-GUGGACAGUCUGGAGUUUC-UU-3'
<i>bcr/abl</i> site 4	5'-GUUUCUGAAUGCAUCUGUC-uucaagaga-GACGAUGACAUCAGAAAC-UU-3'
<i>bcr/abl</i> site 5	5'-GUAGCAUCUGACUUUGAGC-uucaagaga-GCUCAAAGUCAGAUUCUAC-UU-3'
<i>bcr/abl</i> site 6	5'-GCAUCUGACUUUGAGCCUC-uucaagaga-GAGGCUCAAAGUCAGAUUC-UU-3'
<i>bcr/abl</i> site 7	5'-GACUUUGAGCCUCAGGGUC-uucaagaga-GACCCUGAGGCUCAAAGUC-UU-3'
<i>Renilla luciferase</i>	5'-GCUGGACUCCUUCAUCAAC-uucaagaga-GUUGAUGAAGGAGUCCAGC-UU-3'

RNAiのための最も効果的なshRNAの決定

mRNAの分解を誘導し、RNAiを引き起こす最も効果的な*bcr/abl* shRNAを決定するために、psiCHECK™-2-*bcr/abl* プラスミドとともにハイブリットmRNAからの*bcr/abl* タンパク質またはウミシイタケタンパク質に対する各shRNAをCHO細胞にトランスフェクションしました。CHO細胞は、24ウェル組織培養プレートの各ウェル（培地500μl/ウェル）に4×10⁴個 播種しました。37°C（5% CO₂）で一晩インキュベーションした後、細胞は約40～50%コンフルエントになりました。

まず、TransFast™ Transfection Reagentを用いてpsiCHECK™-2-*bcr/abl* レポーターベクターを細胞にトランスフェクションしました。200μl Opti-MEM® medium (Invitrogen)、3μl TransFast™ Reagentおよび0.5μg psiCHECK™-2-*bcr/abl* プラスミドDNAを含むトランスフェクション混合液をTechnical Bulletin #TB260に従い調製しました。培地を除去した後、トランスフェクション混合液200μlを各ウェルに添加し、37°C、1時間インキュベーションしました。その後、完全培地1mlを各ウェルに添加し、さらに37°C、一晩インキュベーションしました。

翌朝、200μl Opti-MEM® medium、1.52μl CoderBreaker™ siRNA Transfection Reagentおよび200ng shRNAを含むshRNAトランスフェクション混合液をTechnical Bulletin #TB326に従い調製しました。細胞から培地を除去し、新鮮な完全培地 400μlで交換しました。shRNAトランスフェクション混合液をトリプリケートに設定した各ウェルに分注（200μl/ウェル）し、37°C、一晩インキュベーションしました。時間差トランスフェクション法（1回目 プラスミド、2回目 shRNA）は、プラスミドDNAとshRNAを同時にトランスフェクションする方法に比べ、よりRNAiが誘導されました（データ未掲載）。ウミシイタケルシフェラーゼおよびホタルルシフェラーゼレポーター活性はDual-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いて測定しました。ホタルルシフェラーゼに対するウミシイタケルシフェラーゼ活性の比率をトランスフェクションした各shRNAごとに算出し、この比率の%阻害率（No -shRNAコントロールに対する）を決定しました。図1に示した結果では、ウミシイタケ*bcr/abl* ハイブリットmRNAに対する*bcr/bcl* サイト7 shRNAの分解誘導がウミシイタケshRNAと同様の効果を示すとともに、両方のshRNAでウミシイタケルシフェラーゼ活性シグナル 約90%が阻害されていることを示していました（ホタルルシフェラーゼ活性シグナルによるトランスフェクション効率の補正を行った場合）。この結果は、psiCHECK™-2 Vectorが最適なshRNAまたはsiRNA標的サイトを選別する上で簡便、有用なスクリーニングツールとなることを証明しました。

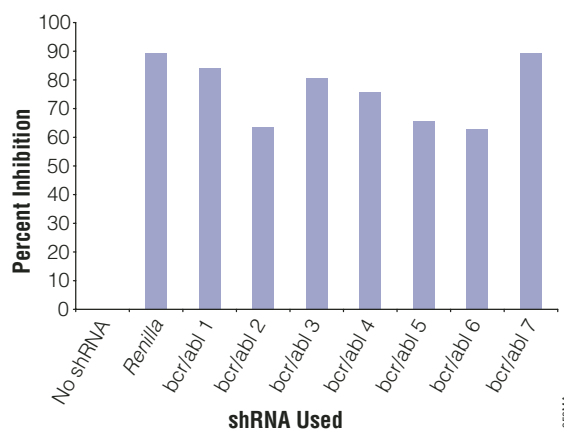


図1. 様々なshRNAによるウミシイタケルシフェラーゼ活性の阻害

トランスフェクションはpsiCHECK™-2-*bcr/abl* コンストラクトおよびウミシイタケまたは*bcr/abl* に対するshRNAを用いて行い、shRNAをトランスフェクションしないものと比較した。ウミシイタケおよびホタルルシフェラーゼはDual-Glo™ Luciferase Assayを用いて測定した。培地を各ウェルから除去し、新鮮な完全培地300μlで交換した。Dual-Glo™ Luciferase Assay SystemのFirefly Luciferase Reagentを調製し、各ウェルに添加した後（300μl）、プレートを手振しながら室温で5分間インキュベーションした。それぞれ一部づつ（100μl）を96ウェルホワイトプレートに移し、Berthold EG&G plate reading luminometerで測光した（測定時間2秒；RLU factor=1.0）。Dual-Glo™ Luciferase Assay Systemの*Renilla* Luciferase Reagentを調製し、50μlづつ各ウェルに添加し、プレートを手振しながら室温で5分間インキュベーションした。発光はホタルルシフェラーゼと同様に測定した。結果は各shRNAごとのトリプリケートウェルの平均値で表した。

結論

2つのレポーターを持つpsiCHECK™-2 Vectorを用いることにより、*bcr/abl*に対する7種類のshRNAの中からmRNAの分解を最も効率的に誘導するものを迅速、簡便にスクリーニングすることができました。CHO細胞に比べてトランスフェクションが非常に難しく、スクリーニングの段階での使用が困難なK562細胞でこの*bcr/abl*標的サイトshRNAをRNAi誘導に使用することができます。通常psiCHECK™ Vector由来のハイブリットmRNA上の特定標的配列に対する異なるshRNAの有効性は、内在性の標的mRNAにおいても認められます。

psiCHECK™ Vectorは、今回のDual-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いたエンドポイントアッセイに加えて、EnduRen™ Live Cell Substrate (2)を用いたRNAiキネティクスのモニタリングにも使用することができます。

参考文献

1. Betz, N. (2003) *Promega Notes* **83**, 33–6.
2. Vidugiriene, J. *et al.* (2004) *Promega Notes* **87**, 2–6.
3. Betz, N. and Worzella, T. (2003) *Promega Notes* **85**, 15–8.
4. Tbakhi, A. *et al.* (1998) *Am. J. Clin. Pathol.* **109**, 16–23.

プロトコル

- ◆ *psiCHECK™ Vectors Technical Bulletin* #TB329, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb329/tb329.html)
- ◆ *T7 RiboMAX™ Express RNAi System Technical Bulletin* #TB316, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb316/tb316.html)
- ◆ *TransFast™ Transfection Reagent Technical Bulletin* #TB260, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb260/tb260.html)
- ◆ *CodeBreaker™ siRNA Transfection Reagent Technical Bulletin* #TB326, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb326/tb326.html)
- ◆ *Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual* #TM058, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tm058.tm058.html)
- ◆ *Access RT-PCR System Technical Bulletin* #TB220, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tb220/tb220.html)
- ◆ *PureYield™ Plasmid Midiprep System Technical Manual* #TM253, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tm253/tm253.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
T7 RiboMAX™ Express RNAi System	50×20µl反応	P1700	60,000
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2920	30,000
	100ml	E2940	240,000
	10×100ml	E2980	1,920,000
TransFast™ Transfection Reagent	1.2mg	E2431	35,000
CodeBreaker™ siRNA	0.4ml	E5052	40,000
Transfection Reagent	1.0ml	E5053	64,000
Access RT-PCR System	20回分	A1260	16,000
	100回分	A1250	55,000
	500回分	A1280	220,000
PureYield™ Plasmid	25回分	A2492	27,000
Midiprep System	100回分	A2495	96,000