

RNAiによる初代培養細胞の遺伝子ノックダウン：psiSTRIKE™ およびpsiCHECK™ Vectorとamaxa社のNUCLEOFECTOR® Technologyを利用した標的遺伝子の抑制

By Jessica G. Drenzek¹, Svetlana V. Dambaeva¹, Thaddeus G. Golos¹, Gediminas Vidugiris², Jolanta Vidugiriene² ¹National Primate Research Center at the University of Wisconsin, ²Promega Corporation

アブストラクト

抑制効果が高いshRNAを初代培養細胞に効率的に導入することにより、生物学的に重要な役割を果たす遺伝子の機能を検討することができます。本稿には、RNAiアプローチを用いた初代培養細胞の遺伝子ノックダウンの成功例を示します。効果的なshRNAは、psiCHECK™-2 Vectorを用いた迅速なスクリーニングにより選択しました。amaxa社のNucleofector® Technologyを用いてpsiSTRIKE™-hMGFP Vectorを初代培養細胞に効率的に導入し、ヘアピン短鎖干渉RNA (siRNA) を発現させました。

イントロダクション

妊娠期間中、母体の免疫系と、母体の脱着膜および血管に浸潤する胎児由来のトロホプラストの間には微妙なバランスが保たれています。非古典的主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I 分子は、胎盤が母体の免疫系からの攻撃を回避することに関与していると考えられています。ヒトでは、妊娠期間中にこの機能を担う主な候補分子はHLA-Gと考えられています(1)。アカゲザルでは、Mamu-AGが同様の特性を示し、HLA-G のホモログと推定されています(2, 3)。脱着膜のナチュラルキラー (NK) 細胞は、トロホプラスト表面に存在する Mamu-AGとの相互作用により、活性化および胎盤の攻撃を阻止する阻害シグナルを受け取ると考えられています。

本研究の目的は、RNA干渉を用いた Mamu-AG 発現の抑制が胎盤の生理機能にもたらす影響を検討するための実験系をデザインすることでした。胎盤にMamu-AGが発現していない状態では、NK細胞受容体がクラス I 発現を検出できないため、NK 細胞がトロホプラストの細胞溶解をもたらすという仮説を立てました。母体NK細胞による攻撃からの胎盤の防御にMamu-AGが果たす役割を定義するため、Mamu-AG発現を抑制した条件でさらなる実験を実施する予定です。

psiCHECK™-2 Vectorを用いた効果的なshRNA配列の選択

効果的なshRNA 標的配列を選択するため、Mamu-AG遺伝子の異なる部位を標的とするshRNAを発現するベクター一式を構築しました。shRNA 配列は、Promega siRNA Target Designerアルゴリズム (www.promega.com/siRNA Designer/) に基づき決定しました。選択した配列は、U6プロモーターからヘアピン短鎖干渉 RNA (siRNA) を発現するpsiSTRIKE™-hMGFP Vectorに連結しました。このベクターにはこの他、GFPを発現させるためのCMVプロモーターも含まれています。RNAiによる標的のノックダウンを最適化するため、Mamu-AGをpsiCHECK™-2 Vectorにクローニングしました。psiCHECK™-2 Vectorには2種類のレポーター遺伝子が含まれています。このうちウミシイタケルシフェラーゼはMamu-AGに融合させ、ホタルルシフェラーゼは内部対照として使用されます。構築したベクターを細胞にトランスフェクションしました。Mamu-AG mRNA特異的なshRNAにより効果的なRNA干渉が起こると、全mRNAが分解され、ウミシイタケルシフェラーゼの活性が低下します。ウミシイタケルシフェラーゼを標的とするshRNAを陽性対照として使用しました。7個のshRNAのうち、3候補

(shRNA-A、B、D) がウミシイタケルシフェラーゼの活性を効果的に抑制しました(図 1)。この 3 候補は Mamu-AG mRNA に対し強力な RNA 干渉作用を示すと判断され、うち 2 候補 (shRNA-A および B) を次の実験に使用することにしました。

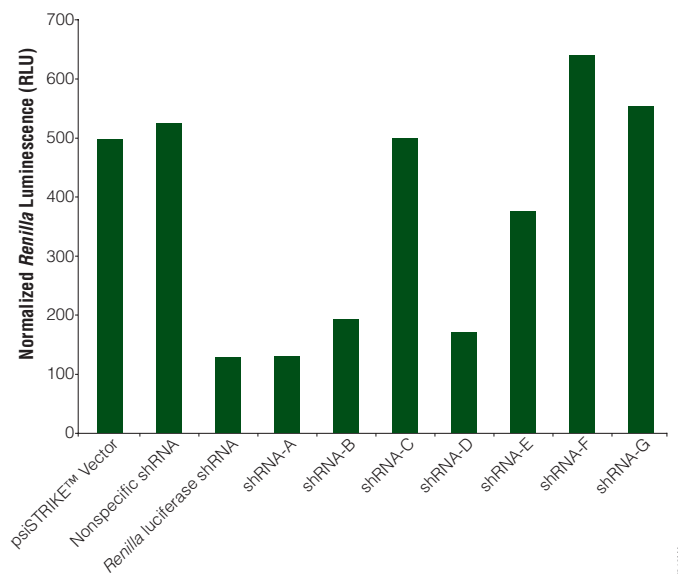


図1. Mamu-AG遺伝子の標的部位の選択

最も効率的なshRNAは、ウミシイタケルシフェラーゼに融合させたMamu-AG遺伝子を含むpsiCHECK™-2 Vectorと、Mamu-AG遺伝子の異なる標的部位に対するshRNAを発現するpsiSTRIKE™ Vectorを用いて選択した。両ベクターをBRL細胞に同時に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-Glo™ Luciferase Assay Systemを用いて測定したウミシイタケルシフェラーゼ活性 (ホタルルシフェラーゼ活性による補正值) の低下により、shRNAの効率を確認した。ウミシイタケルシフェラーゼに対するshRNA、非特異的なshRNA、あるいはshRNA配列を含まないベクターを対照として用いた。shRNA-GはshRNA-Aのスクランブル配列で、標的遺伝子の抑制をもたらさない。結果は3ウェルの平均値とした。

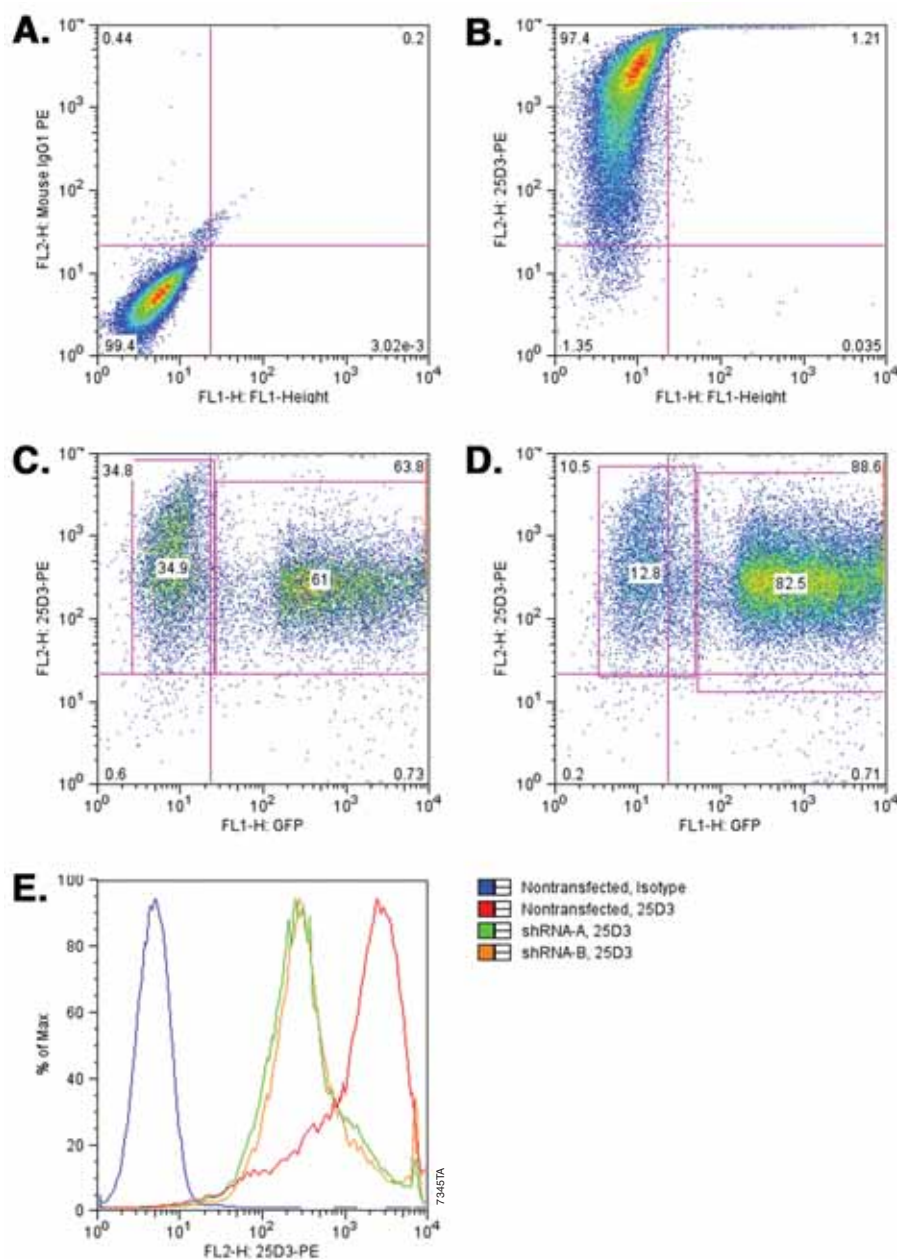


図2. BLCL細胞株を用いたMamu-AG抑制の検証

Mamu-AG発現721.221細胞株に、shRNA-AまたはshRNA-Bを含むpsiSTRIKE™-hMGFP Vectorをトランスフェクションした。72時間後、トランスフェクション細胞およびshRNAをトランスフェクションしていないMamu-AG発現721.221細胞（対照）を、Mamu-AG特異的抗体（25D3）で標識した。いずれのドットプロット図も、X軸はGFP検出に用いた緑色蛍光チャンネルを示し、Y軸はMamu-AG染色または同じアイソタイプ（IgG）を用いた対照染色を示す。**パネルA**：同じアイソタイプ（IgG）を用いた対照細胞の染色。**パネルB**：Anti-Mamu-AGを用いた対照細胞の染色。**パネルC**：Anti-Mamu-AGを用いたshRNA-Aトランスフェクタントの染色。**パネルD**：Anti-Mamu-AGを用いたshRNA-Bトランスフェクタントの染色。Nucleofector® Technologyを使用した結果、shRNA-Aが61%の細胞（パネルC）、shRNA-Bが82.5%の細胞（パネルD）にトランスフェクションされた。**パネルE**：標的配列の相対抑制率（対照細胞との比較）を示すヒストグラム。

選択したshRNAの検証

選択したshRNAの内在性Mamu-AGタンパク質に対する機能を検証するため、BLCL 721.221細胞株を使用しました。この細胞株はMHCクラスI陰性で、さまざまなMHCクラスIトランスフェクタントの作製に幅広く使用されています。今回の実験には、Mamu-AGタンパク質を安定的に発現させたBLCL 721.221細胞株を用いました(4)。細胞にMamu-AGの標的部位AまたはBに対するshRNAを発現するpsiSTRIKE™-hMGFP Vectorをトランスフェクションしました。トランスフェクションの72時間後、FACS® AnalysisによりGFP陽性細胞をソートしました。Mamu-AG発現レベルを確認するため、細胞をMamu-AG特異的抗体（25D3）で標識し、FACS® イメージングにより解析しました(5)。shRNAのトランスフェクション前（図2、パネルB）、ならびに標的部位Aおよ

びBに対するshRNAのトランスフェクション後（それぞれ図2、パネルCおよび図2、パネルD）に細胞をMamu-AG特異的抗体で標識し、FACS® 解析した結果を図2で比較します。同じアイソタイプ（IgG）で標識した非トランスフェクション細胞を対照として示します（図2、パネルA）。これらのデータに基づいて平均蛍光強度を求め、Mamu-AG発現レベルの低下率を算出しました。標的部位Aに対するshRNA、標的部位Bに対するshRNAのいずれを細胞に発現させた場合にも、Mamu-AG発現レベルが74%以上低下したことから、生物発光アプローチにより得られたデータが裏づけられました。これらのデータは、Nucleofector® Technologyを使用することにより、通常はトランスフェクションが難しいBLCL細胞懸濁液にsiRNA試薬を効率的に導入できることも示しています。

初代培養トロホプラストの内在性表面タンパク質のノックダウン

次に、選択したshRNAのアカゲザル初代培養トロホプラストにおける使用を検証しました。妊娠36日目のアカゲザルから分離した初代培養トロホプラストに、shRNA-Aを発現するpsiSTRIKE™-hMGFP Vectorをトランスフェクションしました。配列特異的なサイレンシングと、shRNAの細胞への導入および発現に伴う配列非依存性の影響を区別するため、非特異的shRNAを対照として用いました。非特異的shRNAは哺乳類細胞内に存在することが知られている分子を標的としないよう設計しました。Mamu-AG遺伝子の発現レベルは、前項に示した抗体染色およびFACS®解析により確認しました。累積データを図3に示します。初代培養トロホプラストはMamu-AGタンパク質の発現レベルが相対的に高いことが明らかになり、この発現レベルは非特異的shRNAのトランスフェクションにより影響を受けませんでした。一方、shRNA-Aを発現させたベクターを初代培養トロホプラストに導入した結果、Mamu-AGの発現が効率的に阻害されました（細胞集団全体およびGFP陽性細胞における阻害率はそれぞれ約70%および約85%）。これらのデータから、構築したshRNAベクターがamaxa社のNucleofector® Technologyにより確実かつ効率的に初代培養細胞へ導入されること、また、shRNAが細胞内で転写され、標的遺伝子の発現を効果的に阻害することが示唆されています。

結論

本研究から、初代培養トロホプラストのMamu-AG遺伝子が効率的にノックダウンされることが実証されました。このような結果を得るため、生物発光アプローチの感度および利便性を利用して、効果的なshRNA配列を迅速かつ効率的に選択しました。続いて、amaxa社のNucleofector® Technologyを用いて、初代培養細胞へのshRNA導入に成功しました。以上のことから、これらの技術を組み合わせることにより、RNAi実験を設計するための強力なアプローチとなること、また、これまで遺伝子導入が困難であった細胞株にRNAi技術を利用できる可能性を検討できることが明らかになりました。

謝辞

この実験に使用したBLCL細胞をご提供いただいたR. DeMars研究室およびD. Watkins研究室のスタッフに感謝の意を表します。

参考文献

1. Le Bouteiller, P. (1997) *Eur. J. Immunogenet.* **24**, 397–408.
2. Langat, D.K. *et al.* (2002) *Biol. Reprod.* **67**, 1367–74.
3. Slukvin, I.I. *et al.* (1998) *Biol. Reprod.* **58**, 728–38.
4. Boyson, J.E. *et al.* (1997) *J. Immunol.* **159**, 3311–21.
5. Slukvin, I.I. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9104–9.

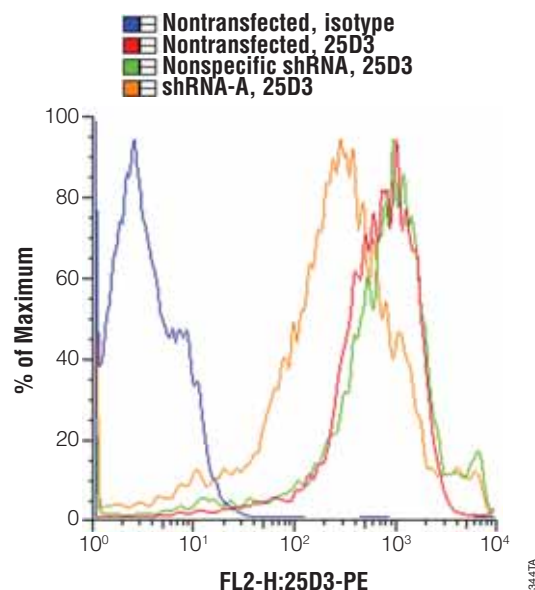


図3. アカゲザル初代培養トロホプラストにおけるMamu-AG発現の阻害

アカゲザル初代培養トロホプラストに、shRNA-Aを発現するpsiSTRIKE™-hMGFP Vectorを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、トロホプラストをMamu-AG特異的抗体で標識し、FACS®で解析した。ノックダウン効率は平均蛍光強度により確認した。shRNA-Aをトランスフェクションしたトロホプラストは、非トランスフェクション・トロホプラストおよび非特異的shRNAをトランスフェクションしたトロホプラストのいずれと比較しても、低蛍光強度側へのシフトを示した。

プロトコル

- ◆ Dual-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual #TM058
www.promega.com/tbs/tm058/tm058.html
- ◆ siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System—hMGFP Technical Bulletin #TB335
www.promega.com/tbs/tb335/tb335.html
- ◆ psiCHECK™-2 Vector Technical Bulletin #TB329
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(¥)
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10 ml	E2920	30,000
siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System—hMGFP	20 reactions	C3550	58,000
psiCHECK™-2 Vector	20 µg	C8021	55,000

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011

東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル6F
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011

大阪府大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室

Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2008年6月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店