

U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells

Makoto Miyagishi¹ and Kazunari Taira^{1,2*}

The first evidence for gene disruption by double-stranded RNA (dsRNA) came from careful analysis in *Caenorhabditis elegans*¹. This phenomenon, called RNA interference (RNAi), was observed subsequently in various organisms, including plants, nematodes, *Drosophila*, and protozoans²⁻⁵. Very recently, it has been reported that in mammalian cells, 21- or 22-nucleotide (nt) RNAs with 2-nt 3' overhangs (small inhibitory RNAs, siRNAs) exhibit an RNAi effect^{6,7}. This is because siRNAs are not recognized by the well-characterized host defense system against viral infections, involving dsRNA-dependent inhibition of protein synthesis. However, the current method for introducing synthetic siRNA into cells by lipofection restricts the range of applications of RNAi as a result of the low transfection efficiencies in some cell types and/or short-term persistence of silencing effects⁸. Here, we report a vector-based siRNA expression system that can induce RNAi in mammalian cells. This technical advance for silencing gene expression not only facilitates a wide range of functional analysis of mammalian genes but might also allow therapeutic applications by means of vector-mediated RNAi.

We have used a U6 promoter to create our siRNA expression vector, because it is known to work in mammalian cells⁹. Unlike other Pol III promoters⁹, the U6 promoter does not contain internal promoter sequences, such as A box and B box. Thus, we proposed that the U6 promoter might directly transcribe small RNAs, which can subsequently form siRNA duplexes in cells. We constructed an siRNA expression vector in which 19-nt sense and antisense sequences against a target gene were placed under the control of U6 promoters as shown in Figure 1. Because RNAs transcribed by a U6 promoter have a stretch of about four uridines at the 3' end¹⁰, resulting siRNAs have an overhang at each 3' end of ~4 nt.

To assess the intracellular effect of this U6 promoter-driven siRNA, we first used reporter plasmids harboring a hygromycin/enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion protein or coral (*Discosoma* spp.)-derived red fluorescent protein (DsRed). The expression of these reporters can be easily visualized by fluorescence microscopy in living cells. We constructed an siRNA-generating vector to target hygromycin/EGFP transcripts (psiHygEGFP) and cotransfected with the hygromycin/EGFP expression vector (pHygEGFP) and the DsRed expression vector

(pDsRed2) into HeLa S3 cells. As shown in Figure 2A, cells transfected with psiHygEGFP exhibited a significant reduction in hygromycin/EGFP expression compared with cells transfected with a pU6 control vector. In contrast, there was no difference in DsRed expression, used as an internal control. We have obtained identical results when these constructs were used to transfect COS-7 cells (data not shown).

To further confirm the RNAi effect of U6 promoter-driven siRNAs quantitatively, we analyzed their ability to repress the expression of other reporter genes coding for firefly luciferase and *Renilla* luciferase. Cotransfection experiments with HeLa S3 cells revealed that the siRNA expression vector against firefly luciferase disrupts the expression of firefly luciferase gene specifically without altering *Renilla* luciferase activity in a dose-dependent manner, and vice versa for the siRNA expression vector against *Renilla* luciferase (Fig. 2B, C). Plasmids, which express only sense or antisense RNA, affected neither firefly nor *Renilla* luciferase expression. Transcripts expressed from each plasmid were identified by northern blot analysis (Fig. 2D). Bands of expected length (relative to 5'-phosphorylated 21-mer and 23-mer RNAs) were clearly discernible when RNAs were extracted from cells that expressed both sense and antisense strands (the lane indicated by psi*Renilla*). In contrast, only weak signal was detected for RNAs extracted from cells expressing only sense (pU6 sense) or antisense RNA (pU6 antisense). These data demonstrate that U6-driven siRNAs can be produced in cells. It is very probable that they form duplexes in cells, and that this protects them from intracellular nucleases. This would explain their significantly longer half-lives compared with the individually expressed sense and antisense strands (see Fig. 2D, lanes 3, 4, and 5). Most importantly, these results demonstrate that the U6 promoter-driven siRNA can efficiently and specifically disrupt the gene of interest.

Relative efficacy of antisense molecules has been reported to depend strongly on the chosen target site¹¹. We thus reasoned that

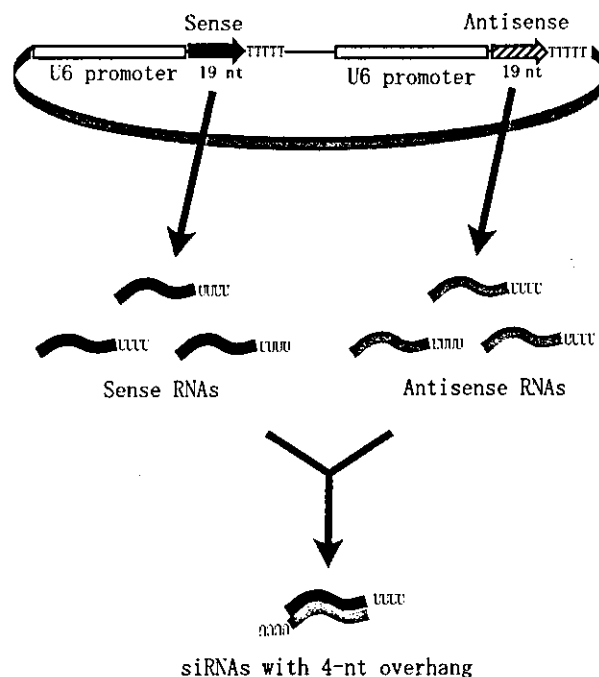


Figure 1. Strategy for generating siRNA using U6 promoter. Each U6 promoter transcribes sense and antisense siRNAs, which have about four uridine stretches at the 3' end. Subsequently, sense and antisense RNAs are annealed and form siRNA duplexes with a 4-nt overhang at each 3' end.

¹Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, the University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113-8656, Japan. ²Gene Discovery Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-4 Higashi, Tsukuba Science City 305-8562, Japan. *Corresponding author (taira@chembio.t.u-tokyo.ac.jp).

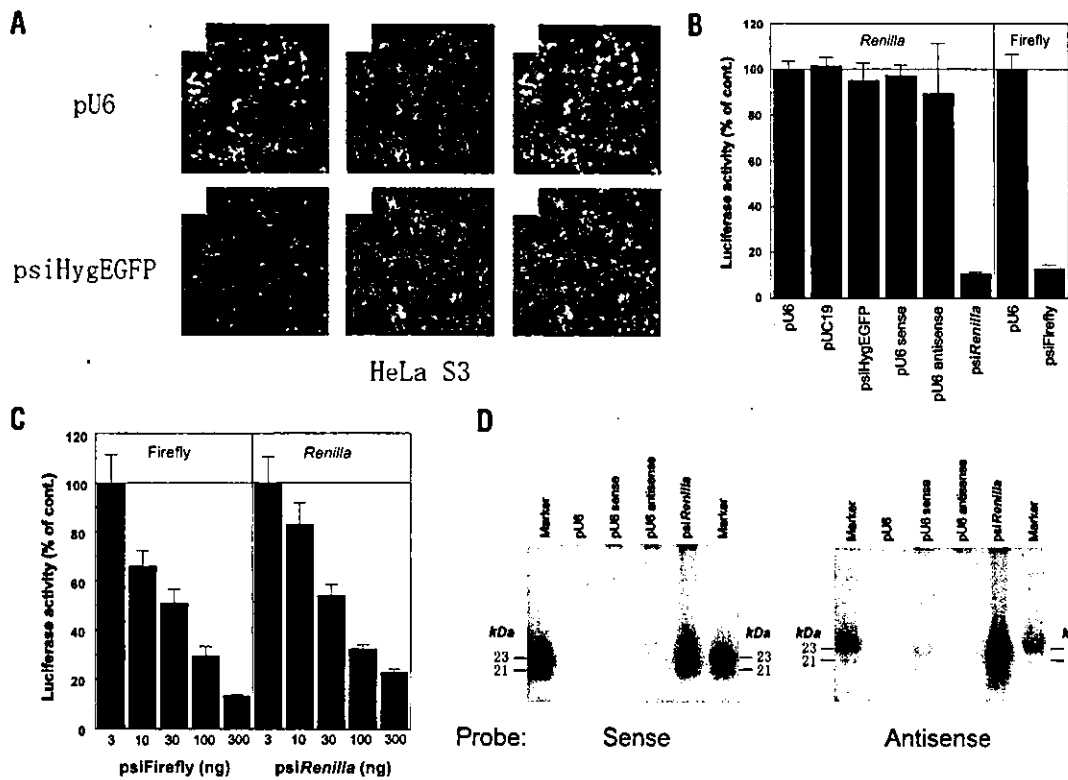


Figure 2. Effect of siRNA expression vector targeted against various reporter genes. (A) Effect of siRNA expression vector targeted against hygromycin/EGFP fusion gene. The lefthand panels show the expression of hygromycin/EGFP, and the middle panels represent the expression of DsRed. The righthand panels show overlay images of hygromycin/EGFP and DsRed. The cells coexpressing hygromycin/EGFP and DsRed appear yellow. (B) Effect of siRNA expression vector on *Renilla* or firefly luciferase expression. (C) *Renilla* or firefly luciferase expression as a function of siRNA expression vector concentration. To ensure equal amounts of DNA, empty plasmids (pU6) were added in each transfection. (D) Northern blot analysis of U6 promoter-driven transcripts.

siRNA-generating vectors against different target sites within the same transcript might also result in different degrees of suppression. Figure 3A shows the activities of siRNA expression vectors against five different sites of firefly luciferase transcript. The siRNA expression vector against site B suppressed luciferase activity by 86%, whereas corresponding values at site O, site A, site C, and site D were about 0%, 56%, 62%, and 64%, respectively.

To examine whether this target site-dependent suppression of luciferase expression is solely dependent on varying target sites, or whether it is attributable to the transcription efficiency of each construct, we synthesized siRNA oligonucleotides targeted to the same sites and determined their activities. Suppression profiles of luciferase expression by synthetic siRNA oligonucleotides for each site (Fig. 3B) closely matched corresponding profiles obtained from siRNA expression vectors (Fig. 3A), suggesting that the difference in the suppressive activity of siRNA expression vectors is due to their target sites. This difference is most likely due to the secondary structure or existence of RNA-binding proteins, although we cannot completely exclude several confounding possibilities. First, product release of a cleaved mRNA may be rate-limiting, and the sequence and G/C content of the siRNA may be important. Second, the sequence of the siRNA may also affect the rate of 5'-phosphorylation of the antisense siRNA, a requirement for siRNA function. Finally, because siRNAs target sense as well as antisense single-stranded RNAs, it may be possible that the ratios of sense- to antisense-targeting endonuclease complexes are siRNA sequence-dependent. Clearly, siRNA effects are dependent on target site and/or siRNA, and the detailed mechanism remains to be elucidated.

As mentioned earlier, siRNAs generated by the U6 promoter are known to have about four uridine overhangs at each 3' end¹⁰. Tuschl and coworkers report that siRNA oligonucleotides with a longer overhang at the 3' end are less effective than those with 2- or 3-nt overhangs, on the basis of *in vitro* experiments using *Drosophila* lysates¹². Therefore, we next addressed whether the four-uridine overhang at the 3' end of the siRNA made from our U6 promoter interferes with the RNAi effect in cultured cells. RNA oligonucleotides with 2-, 3-, or 4-nt overhangs for the same target site in *Renilla* luciferase were synthesized and were compared for their suppressive activities. Cotransfection experiments using RNA oligonucleotides with 2-, 3-, or 4-nt overhangs, and *Renilla* luciferase and firefly luciferase expression vectors, revealed that there are no significant

differences among siRNAs with 2- to 4-nt overhangs (Fig. 3C). Thus, it appears that siRNA with 4-nt overhang produced by our U6 promoter has suppressive activity equivalent to that with 2- or 3-nt overhang in culture cells.

We next tested whether it might be possible to suppress the expression of two different genes simultaneously. A plasmid carrying two siRNA expression cassettes against firefly luciferase and *Renilla* luciferase was constructed and cotransfected with firefly luciferase expression vector, *Renilla* luciferase expression vector, and β -galactosidase expression vector, which was used as an internal control. As shown in Figure 3D, transfection using the siRNA expression vectors against two genes resulted in the reduction of expression of firefly and *Renilla* luciferase simultaneously, and to the same level as that obtained using the siRNA expression vector against each independent gene. These results suggest that each of the two cassettes in the same plasmid is capable of disrupting the expression of the corresponding gene without interference between two promoters or two different kinds of siRNAs.

Finally, we attempted to disrupt an endogenous gene. We chose as a target β -catenin, which is a scaffold protein in cadherin-mediated cell-cell adhesion and was recently described as a potent oncogene¹³. To establish stable transformants, we utilized the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1)/Ori-P system¹⁴, in which plasmids harboring the Epstein-Barr virus DNA replication origin (Ori-P-sequence) are maintained stably and extrachromosomally in cells expressing the EBNA-1 antigen. We constructed Ori-P containing siRNA expression plasmids that targeted against two sites of β -catenin transcript (pcOriP/si β -catenin) and transfected them into HeLa S3/EBNA-1 cells. After selection for one week in medium con-

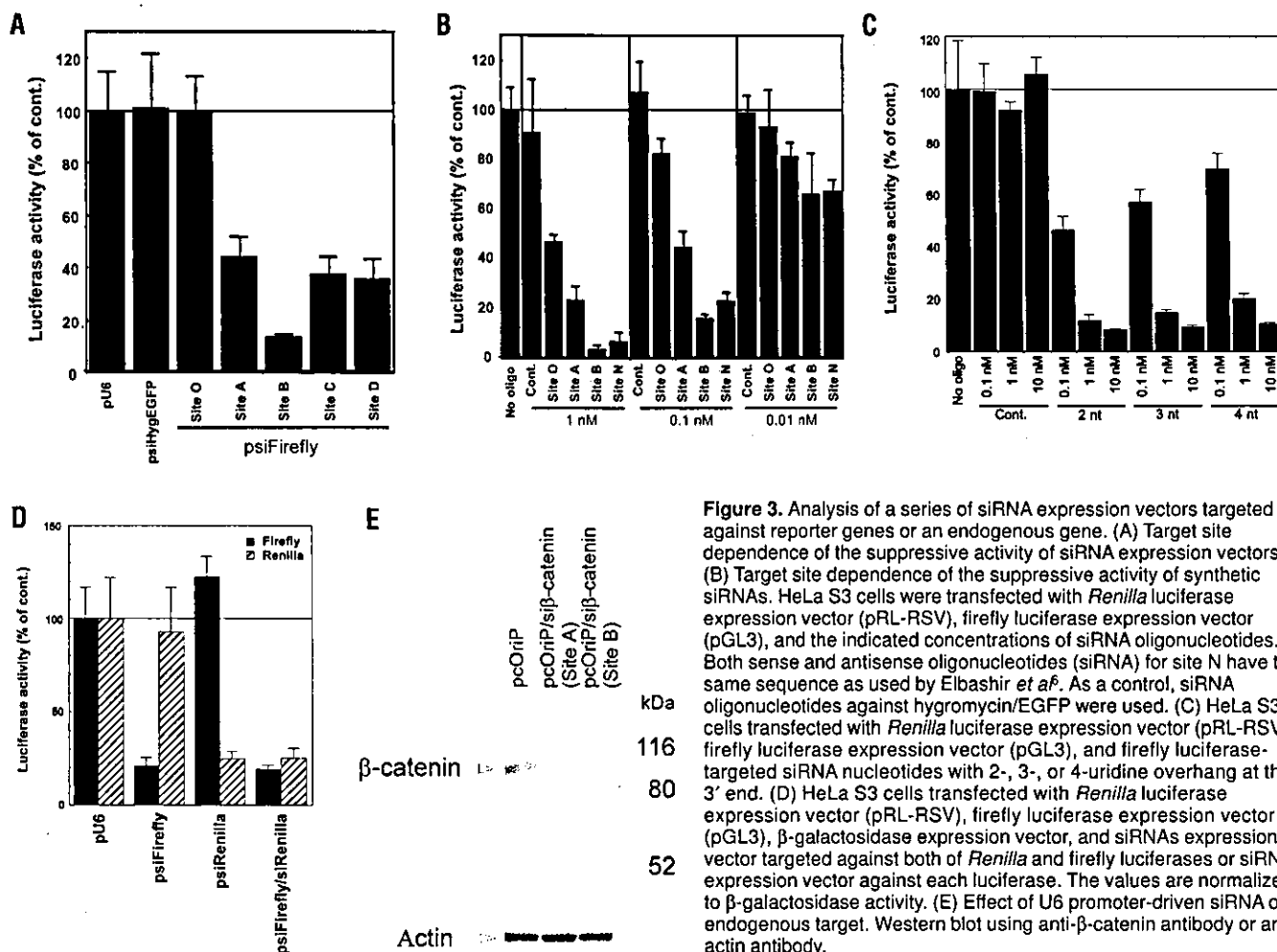


Figure 3. Analysis of a series of siRNA expression vectors targeted against reporter genes or an endogenous gene. (A) Target site dependence of the suppressive activity of siRNA expression vectors. (B) Target site dependence of the suppressive activity of synthetic siRNAs. HeLa S3 cells were transfected with *Renilla* luciferase expression vector (pRL-RSV), firefly luciferase expression vector (pGL3), and the indicated concentrations of siRNA oligonucleotides. Both sense and antisense oligonucleotides (siRNA) for site N have the same sequence as used by Elbashir *et al.* As a control, siRNA oligonucleotides against hygromycin/EGFP were used. (C) HeLa S3 cells transfected with *Renilla* luciferase expression vector (pRL-RSV), firefly luciferase expression vector (pGL3), and firefly luciferase-targeted siRNA nucleotides with 2-, 3-, or 4-uridine overhang at the 3' end. (D) HeLa S3 cells transfected with *Renilla* luciferase expression vector (pRL-RSV), firefly luciferase expression vector (pGL3), β-galactosidase expression vector, and siRNAs expression vector targeted against both of *Renilla* and firefly luciferases or siRNA expression vector against each luciferase. The values are normalized to β-galactosidase activity. (E) Effect of U6 promoter-driven siRNA on endogenous target. Western blot using anti-β-catenin antibody or anti-actin antibody.

taining G418, the expression levels of β-catenin were examined by western blot analysis. As shown in Figure 3E, both of the siRNA expression transformants—each of which possesses pcOriP/siβ-catenin plasmids targeted against one of the two sites of β-catenin—exhibit substantially lower levels of β-catenin expression as compared to mock-transfected cells. This result demonstrates that the siRNA expression system is fairly applicable to RNAi knockdown of endogenous genes and has a potential to suppress gene expression consecutively by generating stable transformants.

In addition to potential applications for making stable cell lines and transgenic mice in which specific genes are suppressed, there are several notable advantages of the siRNA expression system. One is the inducible regulation of RNA interference. We have already established the tetracycline-regulatable system of a U6 promoter¹⁵. This system might permit strict control of RNA interference. Second, our siRNA expression cassette could be maintained in vectors or the genomic DNA with a higher stability than stem-loop or hairpin type of dsRNA-producing cassettes that include an unstable palindromic sequence¹⁶. Third, it could be possible to generate siRNA using opposing U6 promoters, similar to the opposing T7 promoters¹⁷, with two different U6 promoters placed in opposing orientations with ~20 nt between them. In our preliminary experiment, we have been able to develop opposing U6 promoters. This opposing promoter system may allow the production of randomized siRNA libraries and may eventually allow reverse genetic screens using RNAi, utilizing an approach similar to that reported earlier using hybrid ribozyme libraries^{18,19}.

Experimental protocol

Constructs. pU6, which contains human U6 promoter, was described¹⁵. Sense or antisense sequence expression vectors were generated by PCR-based subcloning into pU6. A series of siRNA expression vectors were made by inserting antisense sequence expression cassettes into sense sequence expression vectors. Sequences that inserted immediately downstream of U6 promoter were as follows (only sense sequence is shown): hygromycin/EGFP, 5'-GTT CGA CAG CGT CTC CGAC-3'; firefly luciferase site O, 5'-GCT ATG AAA CGA TAT GGG C-3'; site A, 5'-GTT CGT CAC ATC TCA TCT AC-3'; site B, 5'-GTG CGC TGC TGG TGC CAA C-3'; site C, 5'-ATG TAC ACG TTC GTC ACA T-3'; *Renilla* luciferase, 5'-GTA GCG CGG TGT ATT ATA C-3'; β-catenin, site A, 5'-GTC CTG TAT GAG TGG GAA C-3'; site B, 5'-GCA ACA GTC TTA CCT GGA C-3'. pcOriP/siβ-catenin vectors were generated by PCR-based subcloning of siRNA expression cassette targeted against β-catenin into pcOriP vector.

Cell culture, transfection, and reporter gene assays. HeLa S3/EBNA-1 cells were generated by stable transfection with a linearized form of pHygEGFP, and hygromycin selection of a single clone based on the expression level of hygromycin/EGFP protein. Transfections were carried out using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies, Rockville, MD) as per manufacturer's instructions. For luciferase assays, typically HeLa S3 cells were transfected with 30 ng of *Renilla* luciferase expression vector (pRL-RSV)²⁰, 30 ng of firefly luciferase expression vector (pGL3; Promega, Madison, WI), and 300 ng of siRNA expression vector against each target gene, 300 ng of sense or antisense expression vector, or 300 ng of control vectors (pU6 and pUC19) in each well of 48-well plates. The values were normalized to *Renilla* luciferase activity (when measuring firefly luciferase activity) or firefly luciferase activity (when measuring *Renilla* luciferase activity). Luciferase activity was analyzed after 24 h using the dual luciferase system (Promega).

Cells were lysed and the activities of firefly and *Renilla* luciferases were measured sequentially with a Berthold luminometer.

Fluorescence analysis. HeLa S3 cells were cotransfected with 1 µg siRNA expression vector against hygromycin/EGFP (psiHyEGFP), 1 µg hygromycin/EGFP expression vector (pHyEGFP; Clontech, Palo Alto, CA), 0.05 µg DsRed expression vector (pDsRed2; Clontech), and 1 µg siRNA expression vector against hygromycin/EGFP (psiHyEGFP) or pU6. Cells were visualized by confocal microscopy (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

RNA synthesis and purification. RNA oligonucleotides were synthesized using the synthesizer Model 394 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The synthetic RNAs were deprotected and purified using a denaturing acrylamide gel. After elution from gel, the RNAs were desalted by a NAP-10 column (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) in RNase-free water, dried under vacuum, and resuspended in annealing buffer (PBS, pH 6.8, 2 mM MgCl₂). The RNA oligonucleotides were annealed by incubation at 95°C for 1 min and then cooled to 70°C, followed by slow cooling to 4°C for 2 h at 10 µM concentration. Sequences of RNA oligonucleotides were as follows: firefly luciferase, site O, 5'-GCU AUG AAA CGA UAU GGG CUU-3' (sense), 5'-GCC CAU AUC GUU UCA UAG CUU-3' (antisense); site A, 5'-GUU CGU CAC AUC UCA UCU ACU U-3' (sense), 5'-GUA GAU GAG AUG UGA CGA AUU-3' (antisense); site B, 5'-GUG CGC UGC UGG UGC CAA CUU-3' (sense), 5'-GUU GGC ACC AGC AGC GCA CUU-3' (antisense); site C, 5'-AUG UAC ACG UUC GUC ACA UUU-3' (sense), 5'-AUG UGA CGA ACG UGU ACA UUU-3' (antisense); *Renilla* luciferase, 5'-GUA GCG CGG UGU AUU AUA CUU-3' (sense, 2-nt overhang), 5'-GUA UAA UAC ACC GCG CUA CUU-3' (antisense, 2-nt overhang).

Northern blot analysis. HeLa S3 cells were transfected with 5 µg siRNA expression vector against *Renilla* luciferase gene, 5 µg sense or antisense expression vector, or 5 µg control vector (pU6). At 24 h post transfection, total RNAs were isolated from each cell with Isogen Reagent (Wako, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol. RNAs (15 µg) were separated by electrophoresis on a 18% (wt/vol) polyacrylamide-urea gel and transferred to Hybond N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech). The blots were prehybridized in 30% formamide, 10% dextran sulfate, 2× SSC, 1% SDS, 2× Denhardt's solution, and 0.2 mg/ml salmon sperm DNA, and hybridized with a ³²P-labeled sense (5'-GTA GCG CGG TGT ATT ATA C-3') or antisense (5'-GTA TAA TAC ACC GCG CTA C-3') probe at 36°C for 3 h. The membranes were washed in 2× SSC twice for 15 min at 36°C and analyzed with a Fujix Bio-Image Analyzer BAS1000 (Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan). RNA oligonucleotides phosphorylated at the 5' end were used as markers.

Western blot analysis. HeLa S3/EBNA-1 cells were transfected with siRNA expression vector targeted against two sites of β-catenin transcript (pcOriP/siβ-catenin) or an empty vector (pcOriP) and subjected to selection for a week in medium with G418 (1 mg/ml). Cells were lysed in a Triton X-100-based buffer (1% (vol/vol) Triton X-100, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6) and protease inhibitors (complete; Roche Applied Science, Mannheim, Germany), and the resulting lysates were cleared by centrifugation. Proteins were resolved by 7.5% (wt/vol) SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, blocked by 3% skim milk, and probed with anti-β-catenin (6F9, Sigma, St. Louis, MO) or anti-actin (Sigma) antibody. Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech), immunoblots were visualized using enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

Acknowledgments

This research was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan, and grants from the Ministry of Economy, Trade and Industry (METI) of Japan.

Competing interests statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

Received 7 December 2001; accepted 15 March 2002

1. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
2. Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* **15**, 358–363 (1999).
3. Sharp, P.A. RNA interference 2001. *Genes Dev.* **15**, 485–490 (2001).
4. Hammond, S.M., Caudy, A.A. & Hannon, G.J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Rev. Genet.* **2**, 110–119 (2001).
5. Zamore, P.A. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 746–750 (2001).
6. Elbashir, S.M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
7. Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. & Morgan, R.A. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9742–9747 (2001).
8. Yang, S., Tutton, S., Pierce, E. & Yoon, K. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7807–7816 (2001).
9. Paule, M.R. & White, R.J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1283–1298 (2000).
10. Bogenhagen, D.F. & Brown, D.D. Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell* **24**, 261–270 (1981).
11. Warashina, M., Kuwabara, T., Kato, Y., Sano, M. & Taira, K. RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5572–5577 (2001).
12. Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877–6888 (2001).
13. Peifer, M. & Polakis, P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science* **287**, 1606–1609 (2000).
14. Chittenden, T., Lupton, S. & Levine, A.J. Functional limits of oriP, the Epstein-Barr virus plasmid origin of replication. *J. Virol.* **63**, 3016–3025 (1989).
15. Ohkawa, J. & Taira, K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. *Hum Gene Ther.* **11**, 577–585 (2000).
16. Akashi, H., Miyagishi, M. & Taira, K. Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **11**, 359–367 (2001).
17. Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E. & Englund, P.T. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.* **275**, 40174–40179 (2000).
18. Kawasaki, H., Onuki, R., Suyama, E. & Taira, K. Identification of genes that function in the TNF-α-mediated pathway to apoptosis by analysis of randomized hybrid-ribozyme libraries. *Nat. Biotechnol.* **20**, 376–380 (2002).
19. Kawasaki, H. & Taira, K. Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity of an endogenous RNA helicase. *EMBO Rep.* (in press).
20. Miyagishi, M. *et al.* Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating β-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* **275**, 35170–35175 (2000).

3 章 siRNAの作製と導入の新技术

4 siRNAライブラリーの利用


松本佐保姫 宮岸 真 多比良和誠

はじめに

RNAi (RNA interference : RNA干渉) とは、二本鎖のRNA (double-stranded RNA : dsRNA) を細胞内に導入することで、その相補配列のmRNAが切断され、その結果遺伝子の発現が抑制されるという現象であり、簡便に高効率に遺伝子の発現を抑制する手法として注目されてきている。近年のヒトゲノム計画の進展により、人類の遺伝情報が次々と明らかにされる中で、その多くの遺伝情報は、機能が未解明のままである。これらの遺伝子の網羅的な機能解析への試みは今までもなされており、われわれの研究室を含め、ランダムリボザイムライブラリーを用いた手法などが開発され、多くの成果を挙げてきている。こうした流れの中で、RNAiの技術を用いたライブラリースクリーニングが注目されている。

われわれのグループを含むいくつかのグループで、RNAiを用いたライブラリーの作製が行われ、遺伝子の網羅的解析に対する試みが進められている^{1)~5)}。本項では、siRNA発現ベクターライブラリーを用いた遺伝子の解析についてその具体的方法を紹介したい。

原理とストラテジー

RNAiを用いたライブラリーを作製する場合には、化学的に合成したsiRNAを用いる場合と、ベクターを細胞に導入してsiRNAを発現させる場合の2つが考えられる。化学的に合成したsiRNAを用いる場合には、抑制効果が一過的にしか持続しない、細胞によっては導入が困難である、コストがかかるなどの問題がある。われわれのグループでは、siRNA発現ベクターを用いることで、安定した遺伝子の発現抑制効果をもつライブラリーの作製に成功した(3章-参照)。siRNA発現ベクターシステムは、センス鎖とアンチセンス鎖がループを描くヘアピン(ステムループ)タイプと、直鎖状のタンデムタイプに分けることができる。ヘアピンタイプでは、ヘアピン型の転写産物が細胞内のRNase (Dicer) によってプロセッシングされsiRNAとなる。タンデムタイプでは2つのプロモーターから各々センス鎖とアンチセンス鎖に相当するRNAを転写し、細胞内でハイブリダイズして、二本鎖のsiRNAとなる。これら2つのタイプのベクターを比較すると、低濃度ではヘアピンタイプの方がより高い遺伝子抑制効果をもつことが示された⁶⁾。しかし、ヘアピンタイプは、反復配列が存在する

ために、大腸菌内で不安定であり変異などが入りやすい。われわれは、センス鎖に点変異を入れることで、活性を維持したまま安定したベクターを作製することに成功した。さらに、ループ配列についてもより活性の高いものを見出した。現在、この最適化された安定なベクターシステム (piGENE™hU6ベクター, iGENE社) を用いて、ライブラリーを用いたスクリーニング系の研究が進行中である^{6) 7)}

以下に、siRNA発現ベクターライブラリーを用いた、dsRNAによるアポトーシス経路の網羅的解析法について述べる。

準備するもの

1) siRNA発現ベクターライブラリー

- ・ターゲットサイトの選択

翻訳領域を主にターゲットサイトとして選び、独自のアルゴリズムに基づいて1つの遺伝子に対して2ヵ所以上のターゲットサイトを選択している

- ・siRNA発現ベクター

ヘアピンタイプで、ヒトU6プロモーターを発現プロモーターとするpc PUR hU6⁸⁾を用いた。このベクター系は、TaKaRa社、TOYOBO社で受託販売を行っている

2) 細胞

- ・HeLa S3

- ・スクリーニングに適した細胞の選択

表現型が見やすいもの、取り扱いやすいものが望ましい

3) 試薬

- ・培地 (DMEM+10% FBS)

- ・Lipofectamine 2000 (Invitrogen社)

- ・puromycin (和光純薬)

- ・FuGENE™6 Transfection Reagent (Roche社)

- ・poly (I:C) (Amersham Biosciences社)

- ・PBS (-)

- ・0.2%クリスタルバイオレット

4) ネガティブコントロールとなるsiRNA発現ベクター

プロトコール



1. siRNA発現ベクターライブラリーの細胞へのトランスフェクション

HeLa S3細胞にLipofectamine 2000を用いてベクターをトランスフェクションする (試薬に添付のプロトコールを参照)。1ウェル当たり細胞と同量の1ベクターをトランスフェクションする⁹⁾

① この際、ネガティブコントロールのsiRNA発現ベクターも同様にトランスフェクションする。

② 今回使用したベクターは、ピューロマイシン耐性であり、ピューロマイシンを加えることで、トランスフェクションされている細胞のみが生き残りセレクトすることができる。

2. ピューロマイシンでのセレクトション⁹⁾

トランスフェクションして36時間後、1 mg/mlのピューロマ

イシンでトランスフェクションされた細胞のみセクションする。この際、ピューロマイシン耐性ではないベクターをトランスフェクションしたものにも同様にピューロマイシンを加える^③

③ピューロマイシンセクションの陰性コントロールとなる。

3. 播き換え

24時間後、陰性コントロールの細胞が完全に全滅したことを顕微鏡で確認



1ウェルを同細胞数ずつ48ウェルプレートの3ウェルに播き換える

4. アポトーシスの誘導

播き換え12時間後に、poly (I:C)^④を0.5 μg/ウェルずつFuGENE6でトランスフェクションする（試薬に添付のプロトコルを参照）

④ dsRNAとしてpoly (I:C) を用い、インターフェロン応答によりアポトーシスを誘導する。

5. クリスタルバイオレットで染色

アポトーシス誘導24時間後に細胞をPBS (-) で洗う



細胞を固定し0.2%クリスタルバイオレットで染色する

〈注意〉違う細胞を用いる場合にはピューロマイシンでのセクションの条件や、アポトーシス導入条件などの再検討が必要である。

❓ トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
ピューロマイシンのセクションが不十分	細胞密度が濃すぎる	☑ 細胞密度の条件を振ってみて陰性コントロールが十分に全滅する条件を検討する
	ピューロマイシンの濃度が低すぎる	☑ ピューロマイシンの濃度を検討する
ピューロマイシンを加えると生き残る細胞数が少なすぎる	細胞密度が薄すぎる	☑ 細胞密度の条件の再検討をする
	ピューロマイシンの濃度が高すぎる	☑ ピューロマイシンの濃度を検討する
	ベクターのトランスフェクション効率が低い	☑ トランスフェクション試薬を変えてみる。トランスフェクション条件を再検討する
アポトーシスの誘導後、染色しても陰性と陽性の差がはっきりしない	細胞密度が濃すぎるもしくは薄すぎる	☑ 細胞数を振ってみる
	アポトーシス誘導条件が強すぎる	☑ poly (I:C) の量を再検討する

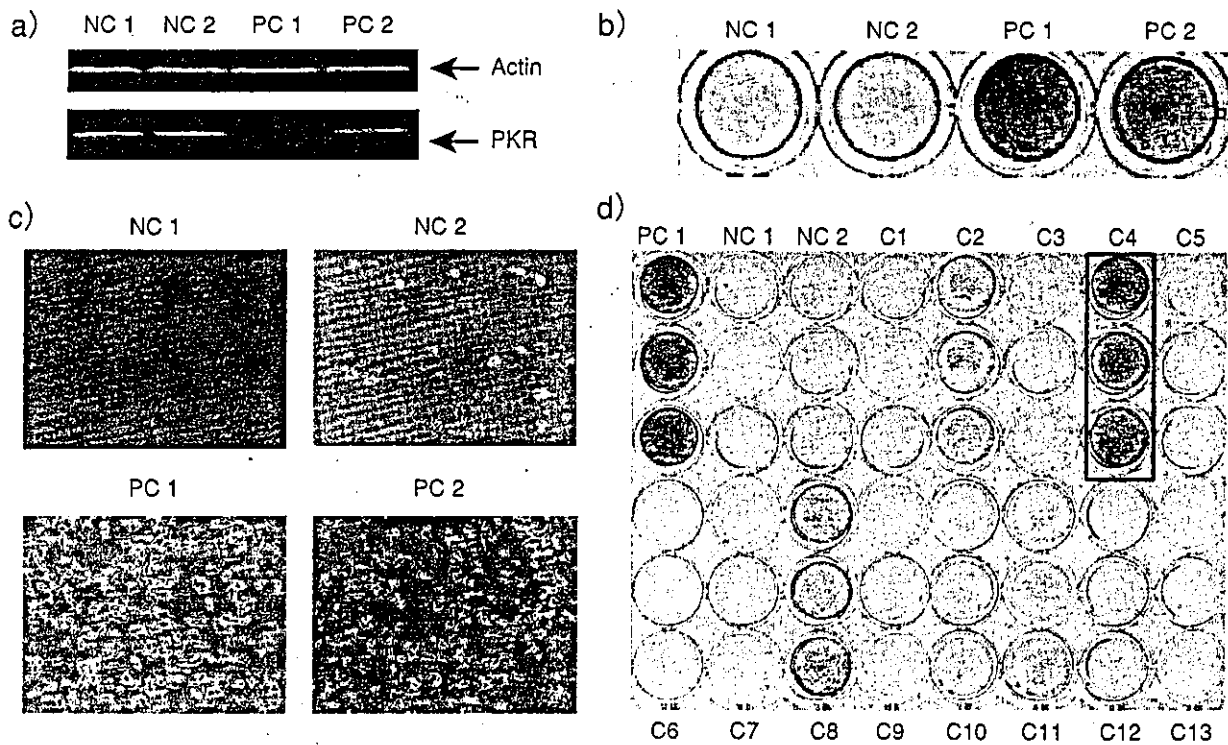


図1 PKRノックダウンによるアポトーシスの抑制およびスクリーニング実験例

- PKRの異なる2つのサイトに対するsiRNA発現ベクターをトランスフェクションしたサンプルをPC 1, PC 2 (陽性コントロール 1, 2), Renilla luciferaseの異なる2つのサイトに対するsiRNA発現ベクターをトランスフェクションしたサンプルをNC 1, NC 2 (陰性コントロール 1, 2) として, タンパク質を回収し, ウェスタンブロットティングした
- NC, PCそれぞれにdsRNAでアポトーシスを誘導し, 24時間後に細胞を洗浄のうえ, クリスタルバイオレットで染色したもの. 生き残った細胞のみが紫色に染色されている
- b) のプレート顕微鏡撮影したもの
- プロトコルの方法にてスクリーニングを行い, クリスタルバイオレットで染色したプレート. C1からC13は, PKR, Renilla luciferaseとは異なる遺伝子に対するsiRNA発現ベクターをトランスフェクションした後, アポトーシスを誘導したもの. 太線で囲ったC4は, 細胞が生き残っておりdsRNAによるアポトーシスを阻害している (巻頭カラー口絵参照)

実験例

PKR (プロテインキナーゼR) がdsRNAによるアポトーシスに関与していることはすでに知られている。そこで、PKRをスクリーニングの陽性コントロールとした。まず、PKRに対するsiRNA発現ベクターを2種類 (PC1, PC2) 作製し、細胞にトランスフェクションした。これらのsiRNA発現ベクターが十分にタンパク質の発現を抑制しているかどうかをウェスタンブロットティングで確認した。図1 a)に示すように、PC1ではほぼ完全にPKRはノックダウンされておりPC2も十分に抑制されていることがわかる。PKRに対するsiRNA発現ベクターをトランスフェクションした後、プロトコルに示す方法で、dsRNAによるアポトーシスを誘導し、クリスタルバイオレットで染色した (図1 b, c)。陰性コントロールでは、ほとんどの細胞がアポトーシスを起こしているのに対し、PKRをノックダウンした細胞は生き残っていることがわかる。これらの結果から、PKRをノックダウンすることで、dsRNAによるアポトーシスが抑制されたことが示された。このPKRを陽性コントロール、Renilla luciferaseに対するsiRNA発現ベクターを陰性コントロールとして、プロトコルに

示す方法にてスクリーニングを行った例を図1dに示す。図1dではC1～C13までの13種類の異なる遺伝子に対するsiRNA発現ベクターを作製し、細胞にトランスフェクションのうえ、アポトーシスを誘導している。図に示すように、C4では、アポトーシスが抑制されており、C4がdsRNAによるアポトーシスに関連する因子であることが示唆される。

❑ おわりに

以上述べてきたように、RNAiは目的の遺伝子の特異的・効率的に簡便に抑制する方法として、その有用性が注目されてきた。今後は、RNAiによるノックダウン技術を用いて、遺伝子の網羅的解析を行う動きがますます加速することが予想される。そこで問題となるのは、RNAiのより効率的なデリバリーシステムと、遺伝子抑制の特異性である。ウイルスベクターが導入効率の高さから注目されるが、特に、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターはゲノム中に組み込まれるため、恒常的なsiRNAの発現が期待できる。安全性が確立すれば、これらウイルス系のsiRNA発現ベクターが広く有用なものとなるであろう。RNAiの特異性に関しては、研究が進むにつれて必ずしも一般的な現象であるといえないことがわかってきた。ターゲット遺伝子と塩基のミスマッチを有していても遺伝子抑制効果を示す場合もあり、また、導入したsiRNAの量が多い場合にはoff-target効果⁹⁾(3章-❑参照)やインターフェロン応答(1章-❑参照)といった非特異的な抑制効果を示す場合もありうる。このようなRNAiの非特異的な効果を回避するためには、優れたアルゴリズムを使って適切なサイトを選択することが重要なポイントとなってくる。また、同一の遺伝子の異なる部位をターゲットとして複数のsiRNAを作製するなど、適切なコントロールを置くことも非常に重要である。さらに、ノックダウンした遺伝子に対するレスキュー実験を行う必要もあるだろう。

今後、より安定した遺伝子抑制効果や、高い特異性が実現することで、RNAi研究がさらに大きな成果を生物学研究の領域にもたらすことが期待される。本項で紹介したライブラリーはアポトーシス関連の数百の遺伝子に対してのみであったが、今後、キナーゼ・ホスファターゼ・転写因子に対するライブラリーを順次作製し、AIST/NEDO siRNA expression LibraryとしてAIST/NEDO(産業技術総合研究所/新エネルギー・産業技術総合開発機構)から一般の日本の研究者に配布する予定である。本項で紹介したsiRNAベクターライブラリーを用いた機能的スクリーニングによって、今後数多くの研究者が、生理的現象を明らかにすることを期待している。

参考文献

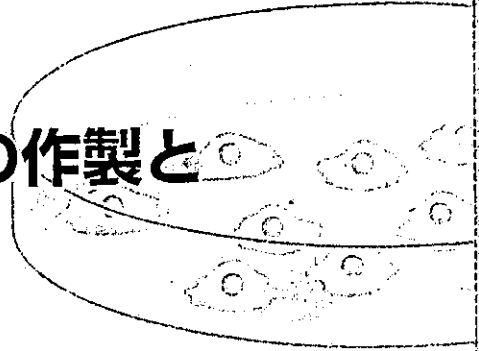
- 1) Sen, G. et al.: Nat. Genet., 36: 183-189, 2004
- 2) Shirane, D. et al.: Nat. Genet., 36: 190-196, 2004
- 3) Zheng, L. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 135-140, 2004
- 4) Aza-Blanc, P. et al.: Mol. Cell, 12: 627-637, 2003
- 5) Berns, K. et al.: Nature, 25: 431-437, 2004
- 6) Miyagishi, M. & Taira, K.: Oligonucleotides, 13: 325-333, 2003
- 7) Miyagishi, M. et al.: Virus Res., 102: 117-124, 2004
- 8) Miyagishi, M. & Taira, K.: Nat. Biotechnol., 20: 497-500, 2002
- 9) Jackson, A. L. et al.: Nat. Biotechnol., 21: 635-637, 2003



6 哺乳類細胞

1) siRNA発現ベクターの作製とトランジェントRNAi

宮岸 真 多比良和誠



はじめに

RNAiは、二本鎖RNAを導入することにより、対応する遺伝子をノックダウンする現象であり、ポストゲノム時代における、リバーズジェネティクスの最有力のツールとして、最近特に注目されている。1998年にFireらによりRNAiが線虫で発見されてから¹⁾、植物やショウジョウバエなど、他のさまざまな生物種で同様の現象が報告され、2001年には困難であると考えられてきた哺乳類におけるRNAiがRNAiの中間物質である、短い二本鎖RNA (siRNA) を用いることにより可能であることが報告された²⁾。この方法では化学合成した21塩基のRNAを用いており、哺乳類細胞での二本鎖RNAによるインターフェロン応答をバイパスし、非常に効率よく、高い特異性で遺伝子をノックダウンできることが明らかになった。

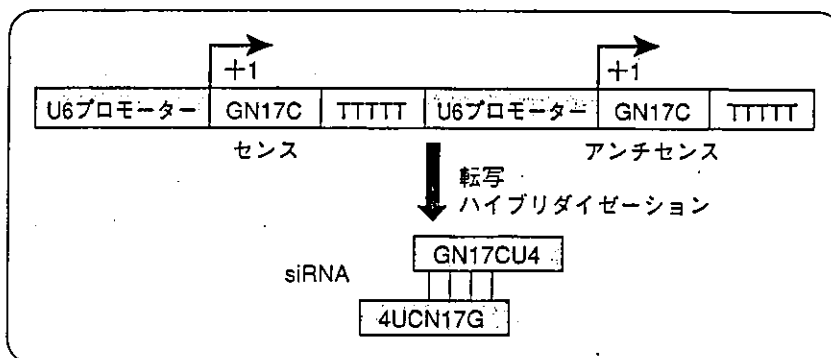
彼らの開発したsiRNAをリポフェクションなどにより直接細胞に導入する方法にはいくつかの欠点があった。効果の持続性が一過的であること、細胞によっては導入効率が低いことなどがあげられる。これらの問題はベクター系を用いて細胞内でsiRNAを産生し、RNAiを引き起こすことができれば解決できるはずである。また、ベクターでRNAiを引き起こすことができれば、ノックダウンマウスやノックダウン細胞株を作ったり、ウイルスを用いた遺伝子治療などが可能になることが予想される。TuschlのsiRNAを用いた方法の発見から約1年後、2002年4月から5月にわれわれのグループを含む7つのグループから、ベクター系によってsiRNAを発現するシステムの論文が報告された^{3)~10)}。本項では、これらのベクターの作製法¹¹⁾、および実験例¹¹⁾ について紹介したい。

原理とストラテジー

siRNAの転写はU6RNAあるいはH1RNAの転写系であるRNA polymerase III (Pol III) 系によって行う。Pol III系はPol II系に比べて転写量が多いこと、また短いRNAを効率よく転写できることからこれまでリボザイムやアンチセンスRNAによるノックダウンの研究に使われてきた。特にU6やH1などのType IIIに属するPol III系プロモーターはType IやType IIのように内部プロモーターをもたないことから、任意の配列を転写するのに適している。

siRNAを発現する系は主にこのpol III系を使っているが、大別してタンデムタイプ

a) タンデムタイプ



b) ステムループタイプ

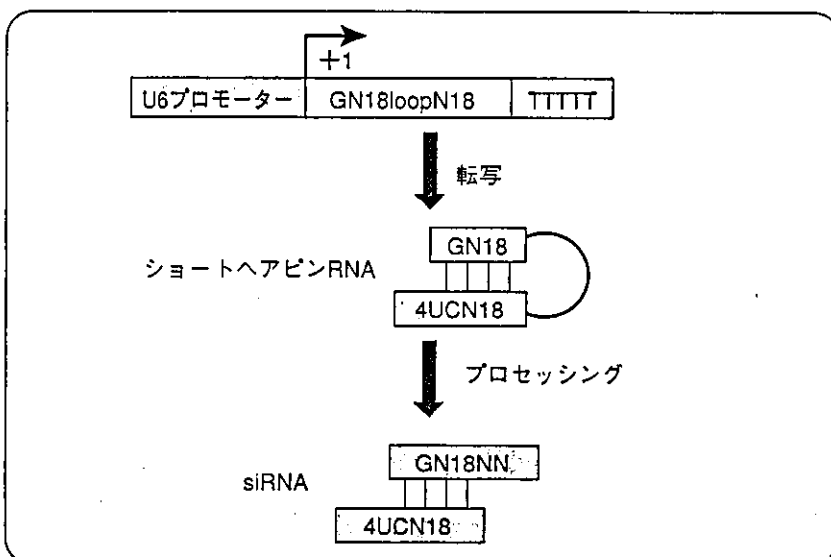


図1 siRNA発現ベクター

a) タンデムタイプのsiRNA発現ベクター。2つのU6プロモーターからセンスRNA、アンチセンスRNAが転写される。b) ステムループタイプのsiRNA発現ベクター。ショートヘアピンRNAが転写され、プロセッシングを受けて、siRNAが産生される

とステムループタイプ（あるいはヘアピンタイプ）の2種類に大別される（図1）。タンデムタイプは2つのU6（H1）プロモーターをもち、それぞれ独立にセンスRNAとアンチセンスRNAを転写する。転写されたセンスおよびアンチセンスRNAは細胞内で二本鎖RNAを形成し、siRNAとして働く。Pol III系は転写終了後、およそ4つのUを付加するため、この系で作られたsiRNAは3'側に4つのUをもつことになる。2つのOverhang（3'側の突出）をもつWild TypeのsiRNAとは、細胞培養系ではほとんど活性に差がないことが示されている⁶¹。

ステムループタイプは一つのプロモーターをもちその下流にセンス鎖とアンチセンス鎖をループでつないだ構造をもつ。このステムループRNA構造をもったRNA（ショートヘアピンRNA：shRNA）はDicerなどによりプロセッシングを受け、siRNAが産生される。このようなshRNAは生体内に存在することが知られており、プロセッシングを受けてmicroRNAと呼ばれる一本鎖のRNAとなる。この場合も同様にDicerによってプロセッシングを受け、RISCに取り込まれて、翻訳抑制（あるいは切断）

によって遺伝子の発現を制御していることがわかっている。

U6あるいはH1プロモーターの転写開始の塩基はプリン (G or A) が好ましい。また、どちらの場合も配列を認識するアンチセンス鎖の最後にUUUUが付加されるため、ターゲットサイトの転写開始点に相当する塩基の前の2つはAAであったほうがいい。したがって、タンデムタイプの場合のターゲット配列の制約はAAG (N17-19) CあるいはAA(G/A) (N19-23) (C/T) ということになる [U6の場合、Wild TypeがGであるので、AAG(N19-23)Cを選んでしたが、Aスタートでも大丈夫のようである]。これに対し、ステムループタイプの場合はAAG(N18-20) あるいはAAA(N18-20) が制約となる。

本項では、主にpol III系を用いたsiRNA発現システムを説明するが、最近、Xiaらによって、pol II系を用いたsiRNA発現システムも報告されている¹²⁾。彼らは、効果を上げるために、CMVプロモーターの転写開始点近くにステムループを挿入したり、短いpoly(A) 付加配列を用いるなどの工夫をしている。また、テトラサイクリンで調節可能なプロモーターによりRNAiの調節も可能であると報告している。この系についてはまだ、再現はとっていないが、データを見る限りでは、pol III系に及ばない印象を受ける。pol II系が実現すれば、部位特異的なサイレンシングなどpol III系ではできないような調節が可能になるため、今後の進展が期待される。

準備するもの

1) ターゲットサイトの選択

学会などで発表していると、配列をどうやって選べばいいかということをししばしば聞かれる。siRNAの効果はそのぐらいターゲットサイトによって大きく異なる。現状では効果の予測することは非常に難しいと思われる。したがって、少なくとも3カ所から5カ所のターゲットサイトに対してベクターを構築すべきである。場所に関しては、諸説があるが、われわれは翻訳領域を主にターゲットサイトとして選んでいる。また、GCコンテンツは30~70%の範囲で選び、経験的に強い二次構造を取るところは、活性が低いという感じがするので、できるだけRNAの構造が開いていると思われる場所を狙うようにしている。また、Tが4つ続くとPol III系の転写が止まってしまうので、そういう配列を含まないように注意する。選択した配列はBLASTでサーチをかけて、他の遺伝子に作用しないことを確認する。

・タンデムタイプの場合

前述したとおりプロモーターの制約からAAG (N17-19) Cを探す。いい場所がないようであれば、AA (G/A) (N19-23) (C/T) を探す。ない場合はCA (G/A) (N19-23), A (G/A) (N19-23) の順に探す

・ステムループの場合

AAG (N21) を探す。いい場所がない場合には、AAA (N21), CA (G/A) (N21) の順に探す

2) 試薬

- ・ MinElute Gel extraction (Qiagen)
- ・ MinElute PCR purification kit (Qiagen)
- ・ Pyrobest (TaKaRa)
- ・ Ligation high (TOYOBO)

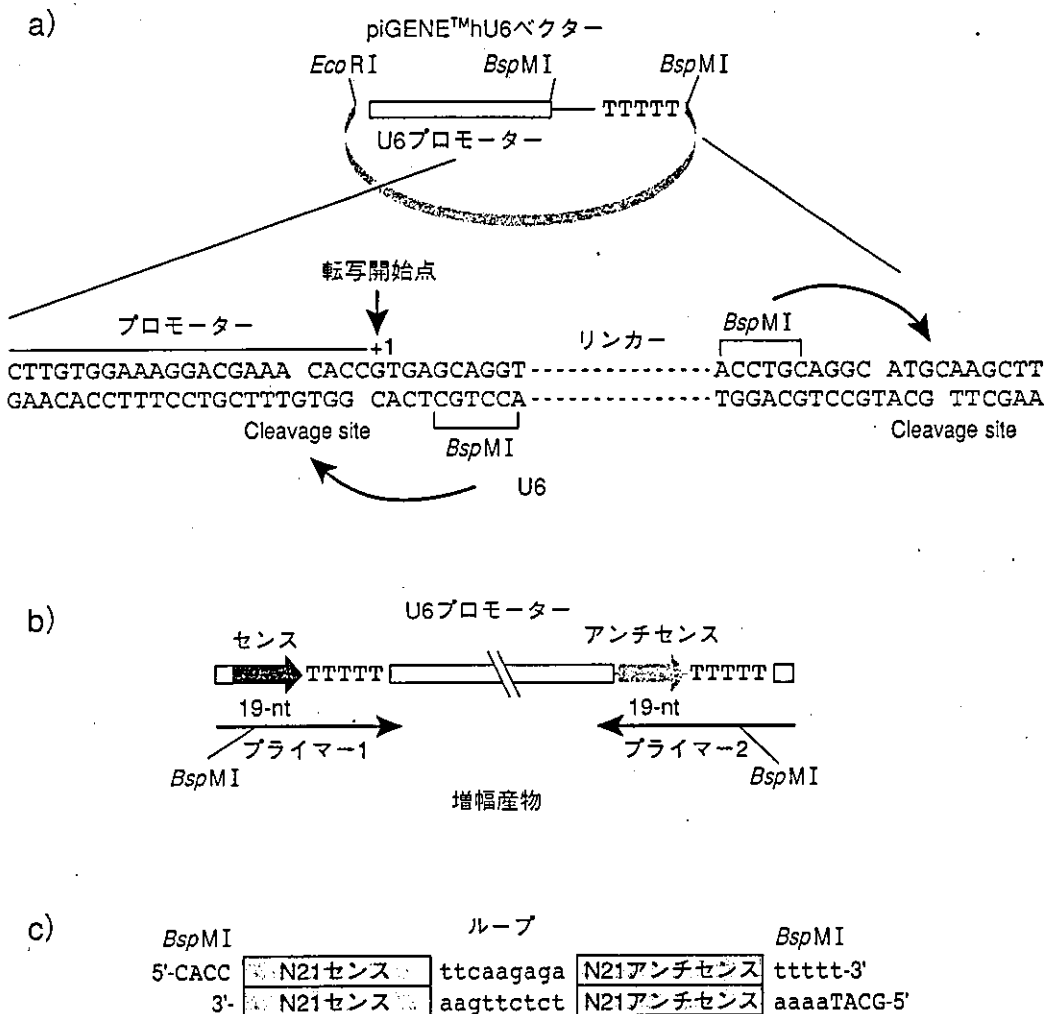


図2 piGENE™hU6ベクター (iGENE Therapeutics社から市販)

- a) piGENE™hU6ベクターのクローニングサイト。b) タンデムタイプの作製におけるインサート断片。
c) ステムループタイプの作製におけるインサート断片の配列

プロトコール

われわれはタンデムタイプおよびステムループタイプのsiRNA発現ベクターをワンステップで構築できるベクターとしてpiGENE™hU6ベクターベクターを設計した(図2)。このベクターはヒトのU6プロモーターの下流に2つのBspMIサイトをもつ。BspMIはクラスII Sの制限酵素であり、認識配列とは異なるサイトで切断する。これを利用して、U6の直下に配列を挿入することができる。タンデムタイプの場合はPCRによってセンス、アンチセンス配列を含むプライマーによりプロモーター部分を増幅し、増幅断片を制限酵素で切断後、U6プロモーターの下流に挿入する。ステムループタイプの場合には、センス、ループ、アンチセンス配列を含むオリ

制限酵素処理および精製:

PCR産物をMinElute PCR purification kitで精製し、100 μ lのスケールでBspMIで2時間以上処理する。その後、ゲル電気泳動し、MinElute Gel purification kitで回収する。10 μ lでElutionする

B) ステムループタイプの場合^①

次のオリゴヌクレオチドを合成/注文する

(ターゲット配列がGTGCGCTGCTGGTGCCCAACCCの場合)

5'-caccGTGCGtTGtTGGTGttAAtCCgtgtgctgtccGGG
TTGGCACCAGCAGCGCACttttt-3'

5'-gcataaaaaGTGCGCTGCTGGTGCCCAACCCggacagcac
acGGaTTaaCACCAaCAaCGCAC-3'



アニーリング:

100 μ Mのオリゴヌクレオチドをそれぞれ5 μ lとり、混ぜ、塩濃度が終濃度100 mM~150 mMになるようにNaClを加える^②

次の温度条件でアニールする

99°C 2分

72°Cから4°Cまで2時間で冷却する

アニールしたオリゴヌクレオチドをTEで200倍に希釈し、そのうち1 μ lをライゲーションに使用する

3. ライゲーション, トランスフォーメーション^{③④}

BAP処理されたベクター1 μ lとインサート1 μ lおよびLigation high 1 μ lを混ぜ、16°Cで30分インキュベーションする



大腸菌にトランスフォーメーションする。ホストはDH5 α を使用している



siRNA発現ベクターの評価は実験例を参照

①ループ配列はmicroRNA由来の当研究室で最適化したものを用いた。

②最初からTE, 100 mM NaClにオリゴヌクレオチドを溶かしてもよい。

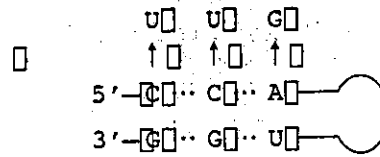
③ステイブルの細胞株を取ったり、ウイルスベクターを使用する場合には、発現ユニットの部分が必要とするベクターに組換える。

④タンデムタイプとステムループタイプの活性を比較するとより、プラスミドのより低い濃度では、ステムループタイプの方が活性が高いという結果が出ている。これを裏付けるように、ウイルスベクターを用いた場合にはこれまで、ステムループタイプの方がよい結果が出ている。しかし、薬剤耐性でstable cell lineをとった場合には、タンデムタイプの方が効いた例もあり、また、ステムループにすると、効く場所であっても効かなくなる場合もあつたりすることから、現在のところ、両者を使い分けている段階である。



ステムループの問題点とその解決法

ステムループタイプをそのまま作製すると、シーケンスが読めなかったり高頻度で組換わるといったトラブルが生じる。これはセンス鎖にいくつかのミューテーションを導入することによって軽減される。一般的にセンス鎖にC→UミューテーションあるいはA→Gミューテーションを3つあるいは4つ入れるようにしている^{11) 13)}。



このようにC→U、あるいはA→Gのミューテーションをセンス鎖に入れることにより、シーケンスなどのトラブルがなくなる。

? トラブルとその対応法

トラブル	可能性	解決のための処置
ターゲット遺伝子の発現抑制がみられない	ターゲットサイトがよくない、またはターゲット配列がSNPなどの理由で変わってしまっている	<ul style="list-style-type: none"> ☒ ターゲットサイトを変える ☒ 通常5~10個のサイトから効果の高い部位を選んだほうがいい
内在の遺伝子をターゲットとした場合に、ターゲットの抑制がみられない	ターゲットサイトがよくない トランスフェクション効率が高い	<ul style="list-style-type: none"> ☒ ターゲット遺伝子発現ベクターとのコトランスフェクション実験によりターゲットサイトを選択する ☒ 薬剤マーカーなどを用いて、トランスフェクションされていない細胞を除く
ステイブルノックダウン細胞が取れない	致死遺伝子である ターゲットサイトがよくない	<ul style="list-style-type: none"> ☒ Tet-ONなどの誘導系を検討する ☒ 低コピーとなるので、特にターゲットサイトの選択は重要 ☒ 細胞のクローン化をする

実験例

蛍光タンパク質であるGFPとDsRedに対するsiRNA発現ベクターの評価を行った結果を図3に示す。HeLaS3細胞にGFPあるいはDsRed2発現ベクターおよび、それぞれに対するステムループタイプのsiRNA発現ベクターとコトランスフェクションし、2日後に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、どちらの場合においても、siRNAベクターによる特異的な約90%の発現抑制が観察された。

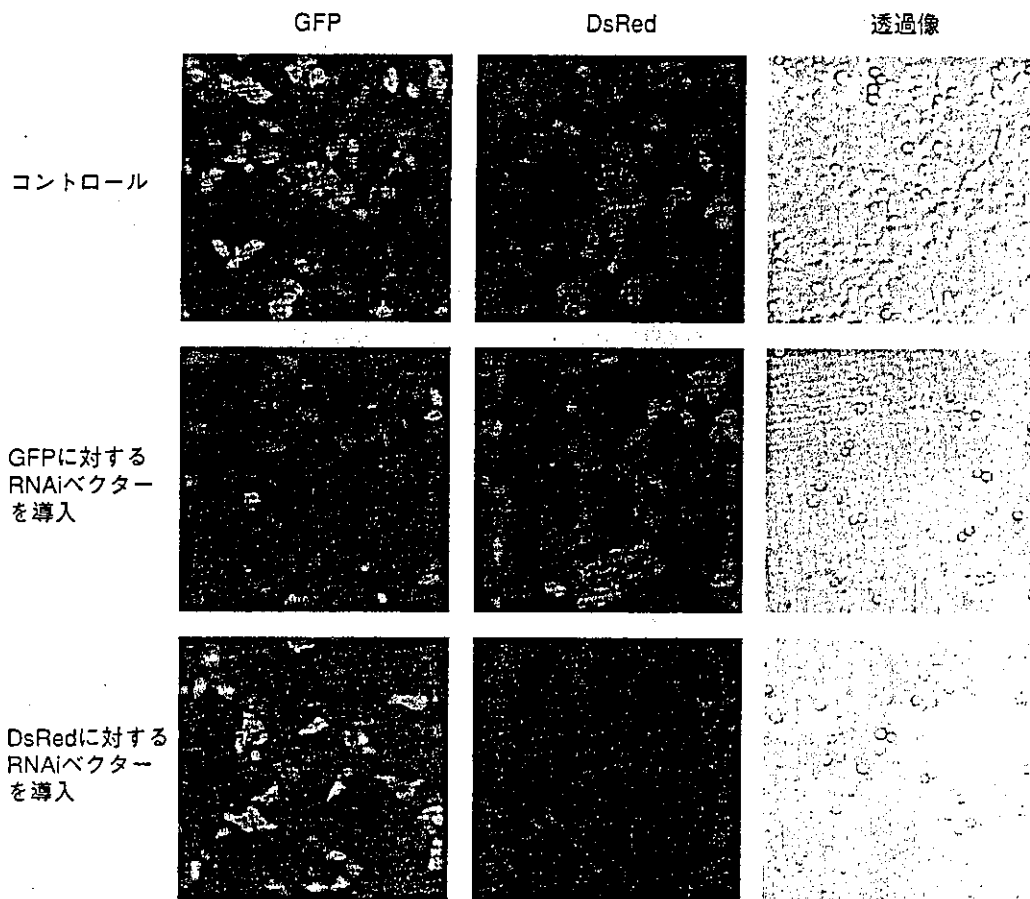


図3 siRNA発現ベクターによるHygGFP遺伝子およびDsRed遺伝子の発現抑制
 HygGFPおよびDsRed2に対するsiRNA発現ベクターをそれぞれHygGFP, DsRed2発現ベクターとHeLaS3細胞にコトランスフェクションし、2日後に蛍光顕微鏡で観察した。ターゲットサイトはGFP: GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC, DsRed2: GTG GGA GCG CGT GAT GAA CTT (カラー口絵3参照)



RNAiのベクター系の研究を始めたのは2001年の夏ごろからだ。当時は、ようやく線虫でのベクター系が発表され、それを哺乳類動物細胞でという機運が強まった頃である。他の研究者とは少しはずして、tRNA^{val}プロモーターのあとに長いdsRNAを連結する方法で行ったが、やってみると、非特異的な発現阻害がみられ、確かにインターナルコントロールで割り返すと阻害していることになるのだが、データに自信がもてなかった。その後、PKRを阻害してみたりといった

実験などを行ってみたのだが、まったくうまくいかず、このまま、終わってしまいそうところだった。2002年にTuschlがsiRNAの動物細胞への応用を発表し、すぐに、Pol III系によるsiRNA発現ベクターの実験を始め、最初にSubmissionすることができ、論文がPublishされる運びとなった。うまくいなくてもちょっとしたことで道が開けることがある。情報は常にwatchしていなくてはいけない。この2つがこの仕事で得ることができた大きな教訓である。

■ おわりに

siRNAが哺乳細胞で有効であることが発見されてから約2年が経過し、最近になってRNAiによるノックダウン法は哺乳類における遺伝子の機能解析の一般的な方法として、定着してきた感がある。ベクター系を用いた方法でもウイルスベクターを用いたり、トランスジェニックの作製など、さまざまな実験例が報告されてきている。しかし、まだ、RNAiベクターを有効に使うためには、ターゲットサイトの選択法やステイブル体やトランスジェニックマウスの効率的作製に関して、いくつかの問題を残していると思われる。これらの点に関して、今後のさらなる技術的進歩を期待したい。

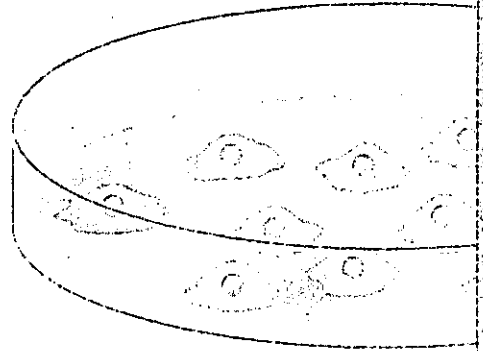
参考文献

- 1) Fire, A. et al. : Nature, 391 : 806-811, 1998
- 2) Elbashir, S. M. et al. : Nature, 411 : 494-498, 2001
- 3) Brummelkamp, T. R. et al. : Science, 296 : 550-553, 2002
- 4) Lee, N. S. et al. : Nature Biotech., 20 : 500-505, 2002
- 5) Miyagishi, M. & Taira, K. : Nature Biotech., 20 : 497-500, 2002
- 6) Paddison, P. J. et al. : Genes & Dev., 16 : 948-958, 2002
- 7) Sui, G. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 5515-5520, 2002
- 8) Tuschl, T. : Nature Biotech., 20 : 446-448, 2002
- 9) Paul, C. P. et al. : Nature Biotech., 20 : 505-508, 2002
- 10) Yu, J. Y. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 6047-6052, 2002
- 11) 多比良和誠, 宮岸 真「siRNA発現システムおよびこれを用いた機能遺伝子ノックダウン細胞等の生産方法」特願, 2001-363385, 2001
- 12) Xia, H. et al. : Nature Biotech., 20 : 1006-1010, 2002
- 13) Miyagishi, M. et al. : 投稿中, 2003

6 哺乳類細胞

3) ON/OFF 制御型 RNAiベクター

宮岸 真 多比良和誠



はじめに

前項までに述べられてきたように、哺乳類においてさまざまなベクター系RNAiが開発され、リバースジェネティクスによる遺伝子の機能解析が容易に行えるようになってきた。しかし、ノックダウンした場合に細胞が死んでしまうような致死遺伝子の場合や、時間的により詳細に解析を要する場合には、薬剤などによってRNAiのスイッチがON/OFFできるような系があれば非常に有用であるに違いない。特に、近い将来において、RNAiベクターによるノックダウン動物が容易に作製可能となった場合、RNAiのON/OFFが可能になれば、その有用性は計り知れないものがあると考えられる。本項では、哺乳類におけるON/OFF可能なRNAiのいくつかの手法について論じるとともに、培養細胞を用いて行った一実験例のプロトコールについて紹介したい。

原理とストラテジー

U6プロモーターを用いたPol III系プロモーターを用いたRNAiベクターの調節系^{1)~3)}としては、テトラサイクリンで調節可能なU6プロモーター（テトラサイクリン調節型U6プロモーター）を用いた系と、Cre-loxPシステムなどのリコンビネースによる組換えによって調節する系⁴⁾の2つが主に考えられる（図1）。

テトラサイクリン調節型U6プロモーターは2000年に当研究室によって開発されたプロモーターである。われわれはTATAボックスの前後にテトラサイクリンオペレーターを配置した、さまざまなコンストラクトを作製し、その中でTetO₁オペレーターをTATAボックスの直前に挿入したものが野生型U6プロモーターの約80%の活性を保持し、テトラサイクリン存在下ではほとんどプロモーター活性がなくなることを見出した。テトラサイクリンによる調節の原理は図1 aに示すとおり、テトラサイクリン非存在下では、テトラサイクリンリプレッサー（TetR）がTetO₁オペレーターに結合し、Pol III系の転写を阻害するのに対し、テトラサイクリン存在下では、テトラサイクリンを結合したTetRのオペレーター配列に対する結合能がなくなるため、Pol III系の転写の阻害が開放される。このテトラサイクリン調節型U6プロモーターを用いて、siRNAを発現させればRNAiのテトラサイクリンによる調節が可能となるは

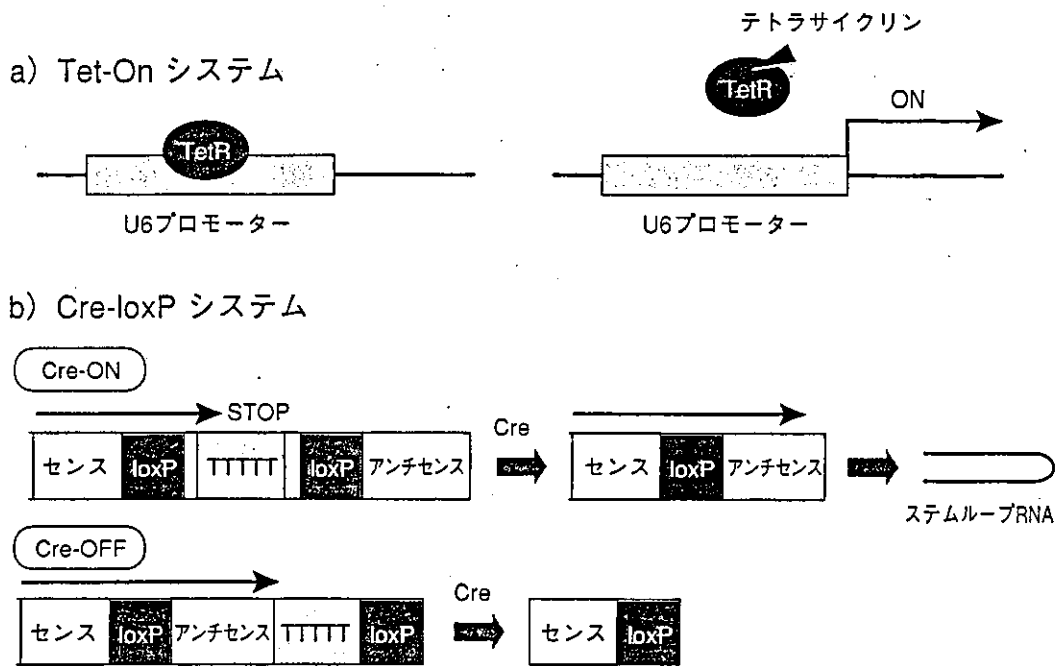


図1 調節型siRNA発現ベクター (piGENE™hU6-Tet)

- a) テトラサイクリン調節型：テトラサイクリンがテトラサイクリンリプレッサー (TetR) に結合するとテトラサイクリンプロモーター内の結合配列から離れて転写がオンになる
- b) Cre-loxP調節型：Creリコンビネーゼの発現によりloxPが組み換わり、loxPの間の配列がなくなる。これを利用して、Cre-ON、Cre-OFF型のU6発現調節システムが可能である

ずである。

もう一つの有力な方法として、Cre-loxPシステムを用いた調節法が考えられる。図1bに示したように、ステムループタイプのsiRNA発現ベクターのループ領域に2つのloxP配列とpol III系プロモーターのターミネーター配列であるTTTTTを挿入することにより、Creに発現依存的に組み換わって、正常なステムループRNAを発現し、RNAiを引き起こすCre-ONが可能となる。また、同様に一つのloxP配列をループ領域に、もう一つのloxP配列をターミネーター配列の後ろに挿入することにより、Cre-OFFも可能なはずである。このCre-loxPを用いた方法では、テトラサイクリンによる調節の場合に問題となるような残存活性が全くなく、非常に切れ味のよい調節が可能となることが予想される。また、Cre-loxPシステムを用いたトランスジェニックマウスの場合のように、組織特異的なプロモーターを用いてCreを発現させることにより、RNAiを組織特異的に起こすことが可能となるかもしれない。

最近、XiaらによってPol II系のプロモーターを用いたsiRNA発現ベクターが報告された。彼らはアデノウイルスを用いた系でテトラサイクリン誘導型のプロモーターを用いることにより、RNAiを調節できることを報告している。しかし、非常に高いタイトルのウイルスを用いていることから、RNAiベクター自身の抑制効率が低いことが予想され、今後の改良が期待される。

本項では最初に述べたテトラサイクリン誘導型のU6プロモーターを用いたRNAiの調節に関するプロトコールを紹介する。