

- S.M. 2000. Expression and functional analysis of Uch-L3 during mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2498–2504.
22. Kwon, J., Kikuchi, T., Setsuie, R., Ishii, Y., Kyuwa, S., and Yoshikawa, Y. 2003. Characterization of the testis in congenitally ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-I (Uch-L1) defective (*gad*) mice. *Exp. Anim.* 52: 1–9.
  23. Kwon, J., Mochida, K., Wang, Y. L., Sekiguchi, S., Sankai, T., Aoki, S., Ogura, A., Yoshikawa, Y., and Wada, K. 2005. Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L-1 Is Essential for the Early Apoptotic Wave of Germinal Cells and for Sperm Quality Control During Spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 73: 29–35.
  24. Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sakurai, M., Sato, Y., Lee, W.W, Ishii, Y., Kyuwa, S., Noda, M., Wada, K., and Yoshikawa, Y. 2004a. Developmental regulation of ubiquitin C-terminal hydrolase isozyme expression during spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 71: 515–521.
  25. Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., and Wada, K. 2004b. Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis. *Am. J. Pathol.* 165: 1367–1374.
  26. Lippert, T.H., Seeger, H., Schieferstein, G., and Voelter, W. 1993. Immunoreactive ubiquitin in human seminal plasma. *J. Androl.* 14: 130–131.
  27. Matin, R., Santamaria, L., Fraile, B., Paniagua, R., and Polak, J.M. 1995. Ultrastructural localization of PGP 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in rat ductus epididymidis epithelium. *Histochem. J.* 27: 431–439.
  28. Ohta, H., Aizawa, S., and Nishimune, Y. 2003. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol. Reprod.* 68: 2249–2254.
  29. Oren, M. 1999. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* 274: 36031–36034.
  30. Orłowski, R.Z. 1999. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 303–313.
  31. Osaka, H., Wang, Y. L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., Sato, Y., Nishikawa, K., Sun, Y. J., Sakurai, M., Harada, T., Hara, Y., Kimura, I., Chiba, S., Namikawa, K., Kiyama, H., Noda, M., Aoki, S., and Wada, K. 2003. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1945–1958.
  32. Rasoulpour, R.J., Schoenfeld, H.A., Gray, D.A., and Boekelheide, K. 2003. Expression of a K48R mutant ubiquitin protects mouse testis from cryptorchid injury and aging. *Am. J. Pathol.* 163: 2595–2603.
  33. Russell, L.D., Chiarini-Garcia, H., and Korsmeyer, S.J., Knudson, C.M. 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 66: 950–958.
  34. Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., and Wada, K. 1999. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in *gad* mice. *Nat. Genet.* 23: 47–51.
  35. Santamaria, L., Martin, R., Paniagua, R., Fraile, B., Nistal, M., Terenghi, G., and Polak, J.M. 1993. Protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in rat epididymis epithelium. *Histochemistry* 100: 131–138.
  36. Sutovsky, P. 2003. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.* 61: 88–102.
  37. Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., and Schatten, G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell Sci.* 114: 1665–1675.
  38. Turner, T.T. and Riley, T.A. 1999. p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 188–197.
  39. Yamamoto, C.M., Sinha Hikim, A.P., Huynh, P.N., Shapiro, B., Lue, Y., Salameh, W.A., Wang, C., and Swerdloff, R.S. 2000. Redistribution of Bax is an early step in an apoptotic pathway leading to germ cell death in rats, triggered by mild testicular hyperthermia. *Biol. Reprod.* 63: 1683–1690.
  40. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285–291.

## Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population

Yoshiko Tamura<sup>a,1</sup>, Yuji Sakasegawa<sup>a,1</sup>, Kazuya Omi<sup>a,b</sup>, Hitaru Kishida<sup>a,c</sup>, Takashi Asada<sup>d</sup>,  
Hideo Kimura<sup>a</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>b</sup>, Naomi S. Hachiya<sup>a</sup>,  
Kiyotoshi Kaneko<sup>a</sup>, Hirohiko Hohjoh<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> National Center of Neurology and Psychiatry, National Institute of Neuroscience, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

<sup>b</sup> Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>c</sup> Department of Neurology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama 236-0004, Japan

<sup>d</sup> Department of Neuropsychiatry, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan

Received 25 November 2004; received in revised form 21 December 2004; accepted 22 December 2004

### Abstract

Inflammation is profoundly involved in the development of Alzheimer's disease (AD) and other neurodegenerative diseases. Chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1; or GRO1) is an inflammatory cytokine and appears to be implicated in the pathogenesis of AD. It is of interest and importance to see if the *CXCL1* gene, mapped on chromosome 4q12–q13, has potential for conferring the predisposition to AD. Here we report on an association study of the *CXCL1* gene with sporadic AD patients in a Japanese population; three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CXCL1* locus were investigated in 103 AD patients and 130 healthy individuals. The results indicate that neither genotype frequencies nor allele frequencies of the examined SNPs attained statistical significance even after being stratified by the presence or absence of the *Apolipoprotein E ε4* allele. Therefore, the data presented here suggests that the *CXCL1* gene could not be associated with the susceptibility to AD in a Japanese population.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Alzheimer' disease; Chemokine; CXC motif, ligand 1 (CXCL1); Single nucleotide polymorphisms (SNPs); Association study

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder of the elderly, and characterized by accumulation of neurofibrillary tangles and amyloid deposition resulting in the formation of senile plaques in the brain. Sporadic AD other than familial AD appears to be a multifactorial disorder in which both genetic and environmental factors are involved [2]. A genetic factor strongly associated with sporadic AD has been found in the *Apolipoprotein E (APOE)* gene: the *APOE ε4* allele increases the predisposition to AD [10,12,13]. It is likely that other genetic factors besides *APOE ε4* could participate in developing AD, and it is of importance and

necessary to determine such genetic factors conferring the predisposition to AD.

Chemokines are inflammatory cytokines which have multiple functions in the immune system, and also have effects on cells of the central nervous system [1,3,4,7–9,15–17]. It appears that inflammation is implicated in the pathogenesis of various neurodegenerative disorders including AD [9,14–17]. Previous study suggested that chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1; or GRO1) could work as a potent trigger for the ERK1/2 and PI-3 kinase pathway and induce hypermethylation of the tau protein in mouse primary cortical neurons, and also that the immunoreactivity for CXCL1 increased in a subpopulation of neurons in some AD brains [14]. It was further suggested that a chemokine receptor for CXCL1, CXCR2, was expressed on neurons and was strongly upregulated in a subpopulation of senile plaques in AD [9,15].

\* Corresponding author. Tel.: +81 42 342 2711x5176;  
fax: +81 42 346 1748.

E-mail address: [hohjoh@ncnp.go.jp](mailto:hohjoh@ncnp.go.jp) (H. Hohjoh).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

Table 1  
Genotype and allele frequencies of the SNPs in the *CXCL1* locus

SNP name (position <sup>a</sup> )		Patients (n = 103)	Controls (n = 130)	P	OR (95% CI)
rs3117602 (75,199,137)	Genotype frequency			0.43	1.0 0.7 (0.3–1.5) –
	C/C	90 (87.4%)	107 (82.3%)		
	C/A	13 (12.6%)	22 (16.9%)		
	A/A	0 (0%)	1 (0.8%)		
	Allele frequency			0.25	
	C allele	93.7%	90.7%		
A allele	6.3%	9.3%			
rs4074 (75,202,395)	Genotype frequency			0.95	1.0 0.9 (0.45–1.7) 1.0 (0.4–2.0)
	G/G	26 (25.2%)	31 (23.8%)		
	G/A	55 (53.4%)	72 (55.4%)		
	A/A	22 (21.4%)	27 (20.8%)		
	Allele frequency			0.93	
	G allele	51.9%	51.6%		
A allele	48.1%	48.4%			
rs1429638 (75,204,181)	Genotype frequency			0.92	1.0 1.0 (0.6–1.7) 1.3 (0.4–4.2)
	C/C	46 (44.7%)	59 (45.4%)		
	C/A	51 (49.5%)	65 (50.0%)		
	A/A	6 (5.8%)	6 (4.6%)		
	Allele frequency			0.82	
	C allele	69.4%	70.2%		
A allele	30.6%	29.8%			

<sup>a</sup> The nucleotide positions are based on the numbering used in the NCBI public location.

These observations lead to the possibility that the *CXCL1* gene could confer the predisposition to sporadic AD, i.e., it may be a genetic risk factor for AD, and stimulate our interest in studying if there is any association between the *CXCL1* gene and AD.

In this study, we investigated three single nucleotide polymorphisms (SNPs) around the *CXCL1* locus mapped on 4q12–q13 in sporadic AD patients and healthy individuals. The subjects were all Japanese: 103 patients with AD (47 men and 56 women; mean age of onset, 70.7 years old) were diagnosed by meeting the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and The Alzheimer's Disease and Related Dementias Association criteria (NINCDS-ADRDA) [11], and 130 unrelated healthy individuals (57 men and 73 women; mean age, 70.9 years old) were examined as controls. Peripheral blood samples were obtained and subjected to isolation of genomic DNA with standard protocols. For a high-throughput analysis, allelic discrimination assay with commercially available Assays-on-Demand SNP Genotyping products (Applied Biosystems) was carried out in 25  $\mu$ l of 1  $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) containing  $\sim$ 10 ng of genomic DNA and 1.25  $\mu$ l of an Assays-on-Demand SNP Genotyping product (Applied Biosystems) by using the Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The Assays-on-Demand SNP Genotyping products used (the Assay ID numbers; public ID numbers) were as follows: C\_9761059\_10; rs3117602 (intergenic SNP), C\_11820472\_1; rs4074 (intron3 SNP), C\_2042711\_10; rs1429638 (intergenic SNP).

The SNPs cover the *CXCL1* gene and the physical distances between rs3117602 and rs4074 SNPs and between rs4074 and rs1429638 SNPs are approximately 3.3 and 1.8 kb long, respectively. After SNP typing, statistical analyses of the data were carried out using SNPAllyse (DYNACOM, Yokohama, Japan). The presence of Hardy-Weinberg equilibrium was examined by  $\chi^2$ -test for goodness of fit. Allele distributions between the patients and controls were examined by  $\chi^2$ -test for independence. As for haplotype analysis, haplotype frequencies and linkage disequilibrium parameters were estimated on the basis of an expectation-maximization algorithm [5]. Case-control haplotype analyses were carried out by using the permutation method to obtain the empirical significance [6]. Each haplotype was tested for association by grouping all other haplotypes together and applying  $\chi^2$ -test with 1 d.f. *P* values were estimated on the basis of 10,000 replications.

Table 1 shows the results of the SNP typing in the AD patients and healthy controls. The SNPs examined in this study revealed no significant differences in their genotype frequencies, allele frequencies and allele carrier frequencies between the patients and healthy controls. In addition, none of the polymorphisms in each group deviated from expectations based on Hardy-Weinberg equilibrium at a significance level of 0.01. Accordingly, although there was a limitation in the number of the subjects used in this study, i.e., the numbers of the patients and controls used were small; the typing data suggested that the *CXCL1* gene could not be a major risk factor conferring the susceptibility to AD at least. We further examined allelic associations (haplotypes) among the rs3117602, rs4074 and rs1429638 SNPs. As a result, strong

Table 2  
Estimated haplotypes and their frequencies

Haplotypes <sup>a</sup>	Patients (n = 103), HF (%)	Controls (n = 130), HF (%)	P
C–G–C	51.9	50.5	0.75
C–A–A	29.4	28.9	0.66
C–A–C	12.3	11.4	0.75
A–A–C	5.2	7.5	0.32

HF: haplotype frequency.

<sup>a</sup> Estimated haplotypes with the rs3117602, rs4074 and rs1429638 SNPs are indicated and the haplotypes with 5% or more of their frequencies are shown.

allelic associations (haplotypes) among the SNPs were detectable in either the healthy controls or AD patients (Table 2); but, the estimated haplotype frequencies resulted in no significant difference between the patients and controls. We must add that further analyses stratified by either the presence or absence of the *APOE*  $\epsilon 4$  allele resulted in no statistical significance, although the difference in the frequency of the *APOE*  $\epsilon 4$  allele alone between the patients and controls attained statistical significance ( $P = 0.0079$ ). Taking all the data together, it is suggested that the *CXCL1* gene is not associated with the susceptibility to sporadic AD. Since inflammation appears to be implicated in the development of AD, it is conceivable that the *CXCL1* gene could contribute to only inflammatory response in the course of the development of AD, but not participate in the pathogenesis of AD as a genetic factor conferring the predisposition to AD.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr. N. Minami for providing the DNA samples of patients. This work was supported by the Millennium Project of Alzheimer's Disease in Japan.

## References

- [1] A. Bajetto, R. Bonavia, S. Barbero, T. Florio, G. Schettini, Chemokines and their receptors in the central nervous system, *Front Neuroendocrinol.* 22 (2001) 147–184.
- [2] D. Blacker, L. Bertram, A.J. Saunders, T.J. Moscarillo, M.S. Albert, H. Wiener, R.T. Perry, J.S. Collins, L.E. Harrell, R.C. Go, A. Mahoney, T. Beaty, M.D. Fallin, D. Avramopoulos, G.A. Chase, M.F. Folstein, M.G. McInnis, S.S. Bassett, K.J. Doheny, E.W. Pugh, R.E. Tanzi, Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 23–32.
- [3] R. Bonavia, A. Bajetto, S. Barbero, P. Pirani, T. Florio, G. Schettini, Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation, *Toxicol. Lett.* 139 (2003) 181–189.
- [4] C.M. Coughlan, C.M. McManus, M. Sharron, Z. Gao, D. Murphy, S. Jaffer, W. Choe, W. Chen, J. Hesselgesser, H. Gaylord, A. Kalyuzhny, V.M. Lee, B. Wolf, R.W. Doms, D.L. Kolson, Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons, *Neuroscience* 97 (2000) 591–600.
- [5] L. Excoffier, M. Slatkin, Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population, *Mol. Biol. Evol.* 12 (1995) 921–927.
- [6] D. Fallin, A. Cohen, L. Essioux, I. Chumakov, M. Blumenfeld, D. Cohen, N.J. Schork, Genetic analysis of case/control data using estimated haplotype frequencies: application to APOE locus variation and Alzheimer's disease, *Genome Res.* 11 (2001) 143–151.
- [7] J.K. Harrison, C.M. Barber, K.R. Lynch, cDNA cloning of a G-protein-coupled receptor expressed in rat spinal cord and brain related to chemokine receptors, *Neurosci. Lett.* 169 (1994) 85–89.
- [8] J.K. Harrison, Y. Jiang, S. Chen, Y. Xia, D. Maciejewski, R.K. McNamara, W.J. Streit, M.N. Salafra, S. Adhikari, D.A. Thompson, P. Botti, K.B. Bacon, L. Feng, Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 10896–10901.
- [9] R. Horuk, A.W. Martin, Z. Wang, L. Schweitzer, A. Gerassimides, H. Guo, Z. Lu, J. Hesselgesser, H.D. Perez, J. Kim, J. Parker, T.J. Hadley, S.C. Peiper, Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system, *J. Immunol.* 158 (1997) 2882–2890.
- [10] S.M. Laws, E. Hone, S. Gandy, R.N. Martins, Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription, *J. Neurochem.* 84 (2003) 1215–1236.
- [11] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E.M. Stadlan, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease, *Neurology* 34 (1984) 939–944.
- [12] M. Michikawa, K. Yanagisawa, Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed de novo cholesterol synthesis, *J. Neurosci. Res.* 54 (1998) 58–67.
- [13] A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D. Schmechel, P.H. George-Hyslop, M.A. Pericak-Vance, S.H. Joo, B.L. Rosi, J.F. Gusella, D.R. Crapper-MacLachlan, M.J. Alberts, et al., Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease, *Neurology* 43 (1993) 1467–1472.
- [14] M. Xia, B.T. Hyman, GROalpha/KC a chemokine receptor CXCR2 ligand, can be a potent trigger for neuronal ERK1/2 and PI-3 kinase pathways and for tau hyperphosphorylation—a role in Alzheimer's disease? *J. Neuroimmunol.* 122 (2002) 55–64.
- [15] M. Xia, S. Qin, M. McNamara, C. Mackay, B.T. Hyman, Interleukin-8 receptor B immunoreactivity in brain and neuritic plaques of Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 1267–1274.
- [16] M.Q. Xia, B.J. Bacskai, R.B. Knowles, S.X. Qin, B.T. Hyman, Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease, *J. Neuroimmunol.* 108 (2000) 227–235.
- [17] M.Q. Xia, B.T. Hyman, Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease, *J. Neurovirol.* 5 (1999) 32–41.

# RNAi 効果の評価法

## ～本当に RNAi が起きているのか？

北條浩彦

RNAi は、今日、簡単な遺伝子機能阻害（遺伝子ノックダウン）方法としてさまざまな研究分野で利用されている。この便利な手法を上手に使いこなすためには、誘導する RNAi の遺伝子発現抑制効果を正しく把握する必要がある。そのために、RNAi の評価方法は重要であり、その効果を正確に測定できるものでなければならない。

### はじめに

1998 年、二本鎖 RNA が誘導する不思議な現象（配列特異的な遺伝子発現の転写後抑制）、すなわち、RNA 干渉（RNA interference：RNAi）が線虫で発見された<sup>1)</sup>。その後 RNAi は、線虫をはじめ、ショウジョウバエ、原生動物、脊椎動物、そして植物とさまざまな生物種で観察される保存された現象であることが明らかとなった<sup>2)~5)</sup>。そして、2001 年、化学合成した小さな二本鎖 RNA（small interfering RNA：siRNA）を使って、ほぼすべての哺乳動物細胞に RNAi を誘導できることが示されてから<sup>6)</sup>、RNAi は、その不思議な現象に対する学問的な興味だけでなく、その計り知れない応用面に注目が注がれるようになった。今日、RNAi は、簡単な遺伝子ノックダウン方法としてさまざまな研究分野で利用されている。これは、RNAi のツールとしての簡便性、即効性、そして正確性によるものと実感する。この一般的となった RNAi 技術を大いに活用するためにも、その効果を正確に評価することが大切である。本稿では、その評価法について、特に哺乳動物 RNAi の評価法について解説する。

それぞれ異なるレベルの RNAi 活性を誘導するというものである。当初この特徴は、ターゲットとなる mRNA の二次構造やそれに結合するタンパク質の影響によるものと考えられていたが、現在では、siRNA 自身の配列がそれに大きくかかわっていると考えられている<sup>8)~11)</sup>。したがって、ターゲット遺伝子に対して効果的な RNAi を実現するためには、まず、強い RNAi 活性を誘導するような siRNA 二量体を設計しなければならない。

### 1. 哺乳動物 RNAi の特徴と RNAi 効果の評価

哺乳動物 RNAi の特徴として、siRNA 二量体に依存した RNAi 活性がある<sup>1)</sup>。これは、同じ遺伝子をターゲットとする異なる siRNA 二量体が、

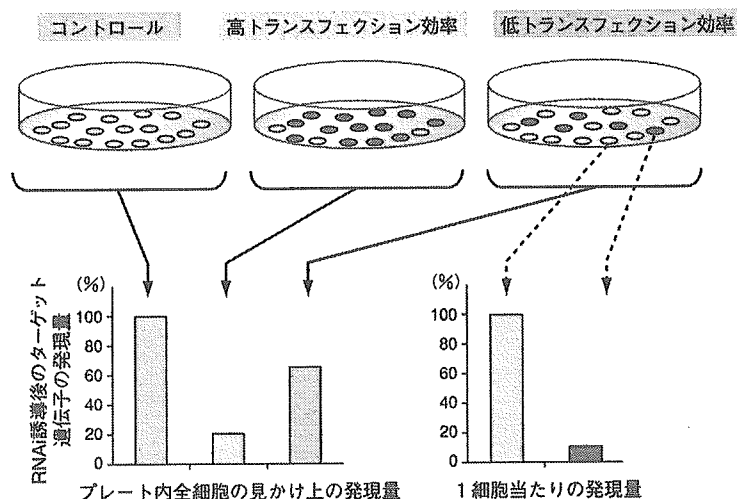


図1 ●トランスフェクション効率が RNAi 評価に与える影響

強い RNAi を誘導する siRNA 二量体（1 細胞当たりの発現量）を細胞内にトランスフェクションしたとしても、そのトランスフェクション効率が低いと、ターゲット遺伝子の見かけ上の発現抑制効果は低く評価されてしまう（プレート全体の見かけ上の発現量）。siRNA 二量体が導入された細胞を●、何も導入されなかった細胞を○で示してある

今日では、優れたアルゴリズムを備えた予測プログラムによって、そのような siRNA 二量体を設計することが可能となっている<sup>11)12)</sup>。

さて、そのような強い RNAi 活性を誘導するポテンシャルをもった siRNA 二量体を設計できたとしても、実際の細胞内で期待した RNAi 効果が誘導できるかどうかは実際にやってみなければ

わからない。そこで重要になるのが評価法である。評価方法にはさまざまなものがあるが、その戦略から大きく2つに分けることができる。1つは、直接内在性のターゲット遺伝子産物(mRNAやタンパク質)を評価指標とするもの、もう1つは、外因性のレポーター遺伝子を評価指標にするものである。どちらにしても、まず、気を付けなければいけないことは、siRNA 二量体を含めた核酸の細胞内導入効率(トランスフェクション効率)である。特に、内在性のターゲット遺伝子産物を直接対象として評価する場合、この導入効率は大きく影響する。図1で示すように、たとえ siRNA 二量体が強い RNAi 活性を誘導するものであってもトランスフェクション効率が悪かった場合、その後の評価(Q-PCR法\*やウエスタンブロット法)で見かけ上の抑制効果は実際よりも低く評価されてしまうのである。それに対して、レポーター遺伝子を用いた評価方法では、レポーターの検出感度に影響が現れるが、レポーターのシグナルが検出可能な範囲内であれば、RNAiの効果を十分評価することができる。

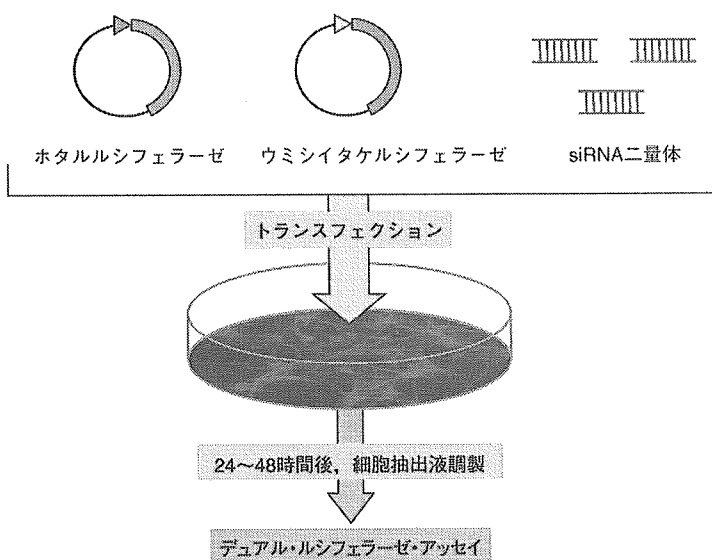


図2 ●ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を使った RNAi の評価法

ホタルルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含むそれぞれのプラスミド DNA と siRNA 二量体を細胞内に導入(トランスフェクション)する。このとき、ともに導入した siRNA 二量体のターゲットとなるルシフェラーゼ遺伝子が RNAi 効果のインディケーターであり、もう片方がコントロール・レポーター遺伝子として測定される。デュアル・ルシフェラーゼ・アッセイを用いて、両者のシグナルを測定し、ターゲット・ルシフェラーゼのシグナル/コントロール・ルシフェラーゼのシグナルで補正し、さらに、何の抑制効果を示さない siRNA 二量体 (siControl) を用いて得られた値と比較して、RNAi の効果を評価する

## 2. レポーター遺伝子を用いた RNAi 効果の評価法

レポーター遺伝子を用いた RNAi の評価法には、酵素活性を用いて評価するものと、蛍光タンパク質を用いて評価するものがある。前者は、ルシフェラーゼ遺伝子に代表されるものであり、後者は、GFP (Green fluorescent protein)

### \*Q-PCR (Quantitative-PCR) 法

PCR法を用いて、ターゲットDNA量をそのPCR増幅効率から測定する方法。本稿の場合、RNAiを誘導した細胞からRNAを抽出し、それを鋳型に逆転写酵素(reverse transcription: RT)反応によってまずcDNAを合成する。次に、リアルタイムPCR法などを用いてターゲット遺伝子の発現量を測定する。

表1 ●RNAi 評価に用いるレポーター遺伝子の特徴

レポーター遺伝子	レポーターの発現 (遺伝子導入後、検出可能な時間)	検出感度	定量性	トランスフェクション 効率の影響	生細胞内での検出
酵素系タンパク質 (ルシフェラーゼ遺伝子など)	早い (>約12時間)	◎	◎	ほとんど受けない	△*
蛍光タンパク質 (GFP, DsRedなど)	遅い (酵素系と比べて時間が かかる>24時間)	○	○	受ける場合がある (効率が低いと判定が困難)	◎

◎:優, ○:良, △:可

\* 生細胞用ウミシイタケルシフェラーゼ試薬 (Promega) により、生きた細胞内でルシフェラーゼの活性を観察できるようになった

やDsRed (*Discosoma sp.* Red fluorescent protein) 遺伝子に代表されるものである。それらの特徴には、それぞれ一長一短があり、それらを表1にまとめてみた。さて、表1からもわかるように、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターに使った評価法は、誘導したRNAi活性、すなわち遺伝子発現抑制効果を簡単に数値化できる点で優れている。そして、多くの研究にこの評価方法が用いられている。これから後半は、ルシフェラーゼ遺伝子を用いた具体的なRNAi評価法について解説する。

ルシフェラーゼ遺伝子を用いたRNAiの評価法は、図2に示すように、2種類のルシフェラーゼ遺伝子を用いて行われる。一般的に、ホタルのルシフェラーゼ (*Photinus luciferase*) 遺伝子とウミシイタケルシフェラーゼ (*Renilla luciferase*) 遺伝子を用いた評価方法が多く利用されている。この2種類のルシフェラーゼは、それぞれ異なる基質要求性があり、これによって同じ反応系であっても基質を変えるだけでそれぞれのルシフェラーゼ活性を区別して測定することができる。実際の実験では、キット化されたデュアル・ルシフェラーゼ定量システムを用いて測定する(図3)。このような評価系では、片方のルシフェラーゼ遺伝子をRNAiのターゲット・レポーター遺伝子、もう一方をコントロール・レポーター遺伝子として解析する。そして、ターゲットのレポーターシグナルをコントロールのレポーターシグナルで補正(正常化)することで実験間のバラツキを小さくし、再現性の高いデータを得ることができる。

この評価システムの使用方法としては、主に2通りある。1つは、機能阻害を目的とする遺伝子に対して設計したsiRNA二量体のRNAi効果を評価する場合、もう1つは、レポーター遺伝子自身をターゲットとするsiRNA二量体を用いてRNAi効果の特徴やメカニズムを解析する場合、さらには改良型または化学修飾したsiRNAのRNAi効果を評価する場合にも利用することができる。プロトコールで、前者のsiRNA二量体

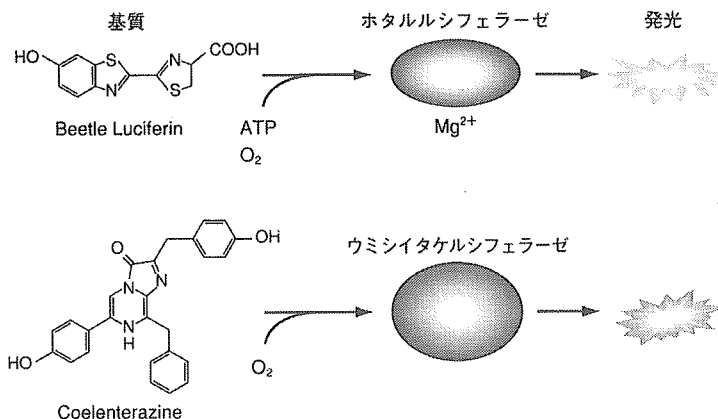


図3 ●デュアル・ルシフェラーゼ・アッセイのTips

ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼは、それぞれ基質要求性が異なる。前者(ホタル)はBeetle Luciferinを基質とし、後者(ウミシイタケ)はCoelenterazineを基質とする。この基質要求性の違いにより、同一反応系内にそれら二者が存在していても、それらのシグナルを区別して測定することができる。実際の実験(デュアル・ルシフェラーゼ・アッセイ)では、二段階の基質投与によってそれぞれのシグナルを検出する。まず、Beetle Luciferinを基質とした反応で、ホタルルシフェラーゼ活性を測定し、その後直ちに、ホタルルシフェラーゼの失活剤を含むCoelenterazine基質を投入し、ウミシイタケルシフェラーゼの活性を測定する。測定時の注意点は、比較するサンプル間の基質溶液条件を一定にすることが重要である。これは、Beetle Luciferin基質溶液の保存過程での劣化や、測定前に調製するCoelenterazine基質溶液の調製具合がルシフェラーゼ活性に影響するためであり、測定途中で基質溶液がなくなり新しく調製して測定すると、その前後でシグナルの値が変わり、RNAi活性を正確に比較できなくなる。測定前に、サンプル数+α分の基質溶液(アッセイ溶液)をまず1つのチューブに調製し、そこから分注することが大切である。

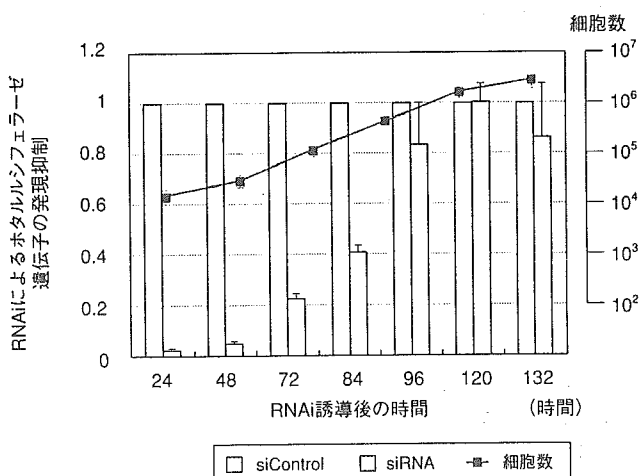


図4 ●細胞増殖とRNAi効果の持続性

マウスP19細胞に、図2で示した評価系を用いてRNAiを誘導し、その後、RNAi効果の持続性を解析した。この実験では、ホタルルシフェラーゼ遺伝子に対する合成siRNA二量体を使用している。RNAiを誘導して2日ぐらいは強いRNAi効果が観察されるが、その後細胞分裂に伴って、RNAi効果は徐々になくなっていく。これは、siRNA導入によって細胞内に成立した活性型RISC (RNA-induced silencing complex) の一細胞当たりの数が、細胞分裂に伴って減少するためと考えられる(文献13より改変)<sup>13)</sup>





## ② 簡単ミニプレップ (boiling miniprep)

- ① 形質転換した JM109 を LB 液体培地 (アンピシリンを含む) で培養 (37°C, オーバーナイト)。
- ② 1 ml の培養液を 1.5 ml チューブにとり, 13,000 × g で 2 分間遠心する。
- ③ 上清を取除き, 菌ペレットに 300 μl の STET 溶液<sup>注2</sup>を加え, ホルテックスで懸濁する。
- ④ 沸騰したお湯の中にチューブを 1 分間入れ, その後ただちに氷水に浸けて冷やす (5 分間静置)<sup>注3</sup>。このステップで, 溶菌とタンパク質変性が起こる。
- ⑤ トップスピードで 10 分間の遠心。
- ⑥ 上清 (約 200 μl) を新しい 1.5 ml チューブに移し, 400 μl の 100 % エタノールを加えて混和させる<sup>注4</sup>。
- ⑦ トップスピードで 10 分間の遠心。
- ⑧ 上清を取除き, ペレットを風乾させる。
- ⑨ 50 μl の TE に溶解する。

## ③ 制限酵素によるチェック

(サンプル数 15 の調整例)

	× 1	× 15
10 × バッファー	1 μl	15 μl
ddW	6 μl	90 μl
plasmid solution	3 μl	
<i>Spe</i> I <sup>注5</sup> (10 units/μl) (TaKaRa)	2 U	3 μl
Ribonuclease Mix solution (ニッポン・ジーン)	0.2 μl	3 μl
Total	10 μl	

- ① 37°C インキュベーション。
- ② アガロース・ゲル電気泳動, EtBr 染色によって判定。
- ③ *Spe* I で消化されたプラスミドがポジティブクローンであり, シークエンスによる最終確認に進む。

## ④ シークエンス前のプラスミドの精製 (PEG 沈殿)

- ① 約 50 μl のポジティブ・プラスミド溶液に 1 μl の Ribonuclease Mix solution (ニッポン・ジーン) を添加し, 混和させる。
- ② 37°C インキュベーション, 30 分間。
- ③ 30 μl の PEG 溶液<sup>注6</sup>を加え, よく混和させる。
- ④ 氷上に 1 時間静置する。
- ⑤ 4°C, 14 krpm, 15 分遠心する。
- ⑥ 上澄液除去。
- ⑦ ~100 μl の 75 % EtOH (冷凍) で洗い, 風乾させる。
- ⑧ 20 μl の TE に溶解する。
- ⑨ シークエンス解析または -20°C で保存する。

注2: STET 溶液組成

- ・ 8 % (wt/vol) Sucrose
  - ・ 5 % (wt/vol) TritonX-100 [またはポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル, NP-40 でも可]
  - ・ 50 mM EDTA
  - ・ 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
- フィルター滅菌後, 4°C で保存する。原本 ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons) では, 使用前にリゾチームを加えるようになっているが入れなくてもよい。

注3:

重要なステップである。冷却が不十分な場合, 遠心後に大腸菌のゲノム DNA と変性タンパク質がうまくペレットを形成しないため, 上清の回収量が減る。このような場合は, ゲノム DNA をチップなどで引っ掛けて取り出し, 残った上清に 2 倍量のエタノールを加える。また, 菌数が多すぎても同様な結果になることがあるので注意。

注4:

大腸菌の RNA がキャリアーとなるため, エタノール混和後, ただちに遠心してよい。冷やす必要はない。

注5:

*Spe* I と *Nhe* I のダブル消化でもよい。

注6: PEG 溶液組成

- ・ 20 % ポリエチレングリコール 6000
- ・ 2.5 M NaCl

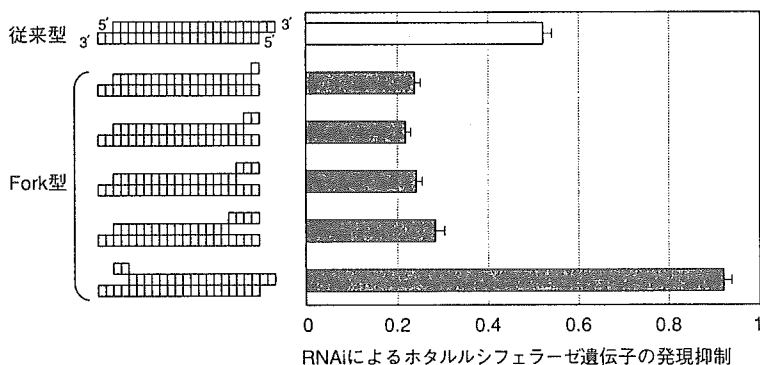


図5 ●改良型 siRNA (Fork-siRNA) 二量体による RNAi 効果

siRNA のアンチセンス鎖 (RNAi の配列特異的メディエーターとなる siRNA 鎖: 赤色の siRNA 鎖) はそのまま、siRNA センス鎖 (水色の siRNA 鎖) の 3' 末端 (または 5' 末端) に mismatches 配列を導入しアンチセンス鎖とアニールできなくした。このような siRNA 二量体は片方の末端が開いた形をとる。このような形状から、"Fork-siRNA duplex" と名づけた。実験では、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をターゲットとする siRNA 二量体のさまざまな Fork 型 siRNA 二量体を用いてその RNAi 効果を調べた (図 2 の評価系を使って)。siRNA センス鎖 3' 末端に mismatches を導入すると RNAi 効果が高まること が観察された (特許出願中)。おもしろいことに、siRNA センス鎖 5' 末端に同様の mismatches を導入した場合、逆に RNAi 効果が失われることが観察された。これらの理由は、Fork 型の形状により、Fork 末端からの二本鎖 RNA、すなわち、siRNA 二量体の巻き解きが高まり、それに伴い 5' 末端から巻き解かれた siRNA 鎖の RISC 内取り込みが進むためと考えられる。したがってセンス鎖 3' 末端に mismatches を導入した場合、アンチセンス鎖 siRNA の RISC 取り込みが高まり、その結果、RNAi 活性が亢進する。逆に、センス鎖 5' 末端に mismatches 配列を導入した場合、センス鎖 siRNA の RISC 内取り込みが高まり、その結果、ターゲット遺伝子に対する RNAi 効果は低下する。これらの結果から、RNAi 効果を高めるためには、いかに効率よくアンチセンス鎖の siRNA を RISC 内に取り込ませるかが 1 つのポイントになると考えられる (文献 10 より改変)<sup>10)</sup>

の RNAi 評価に用いるターゲット・レポーター遺伝子の作製について紹介し、図 4 と図 5 で、後者のレポーター遺伝子をターゲットとする合成 siRNA 二量体を使った RNAi 活性の持続性そして改良 siRNA 二量体を用いた RNAi 効果の評価例を紹介する。

### 3. RNAi 評価に利用されるレポーター・プラスミドの種類とその特徴

RNAi に関連するベクターにはさまざまなものがあるが、その大半は siRNA を細胞内で発現させるための shRNA (short-hairpin RNA) 発現ベクターである。これらのベクターについては、本誌の「目的・方法別 siRNA のデリバリー法①~④」を参照していただくこととして、ここでは RNAi 評価に用いるレポーター・プラスミドについて紹介する。すでに上記で記したように、レポーターを主体とする評価法は、ルシフェラーゼに代表されるような酵素活性を指標にするものと、GFP や DsRed のような蛍光タンパク質を指標にするものとに大別される。実験者は、これらの特徴・性質の違いを十分考慮して (表 1)、それぞれの実験にあったレポーターを選択することが大切

表 2 ●RNAi 評価に用いるレポーターベクター

プラスミド名	pGL3 vectors または PicaGene Vector2	phRL vectors	pGL4 luciferase reporter vectors	psiCHECK™ vectors	蛍光タンパク質発現ベクター pEGFP-N or -C シリーズベクター、 pDsRed2-N1 or -C1 ベクター など
メーカー	Promega または ニッポン・ ジーン	Promega	Promega	Promega	Clontech Laboratories
レポーター 遺伝子	ホタル ルシフェラーゼ (改良型)	ウミシイタケ ルシフェラーゼ (改良型)	ホタル、またはウミ シイタケルシフェ ラーゼ (改良型)	psiCHECK™-1: ウミシイタケルシフェ ラーゼ psiCHECK™-2: ウミシイタケルシフェ ラーゼとホタルルシフェラーゼ	Living Colors 蛍光タンパク質: EGFP (enhanced GFP) DsRed2 (DsRedの変異体)
薬剤耐性遺伝子	Amp <sup>r</sup>	Amp <sup>r</sup>	Amp <sup>r</sup>	Amp <sup>r</sup>	Kan <sup>r</sup> と Neo <sup>r</sup>
特徴・備考	酵素活性を高めるように工夫され たレポーター遺伝子で、一般的な RNAi 効果の測定に用いられている。		ルシフェラーゼの 高レベル発現と低 バックグラウンド を実現したプラス ミドベクター。	ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 3' UTR にマルチクロニングサイトがあり、RNAi モニタリング用のターゲット・レポ ーターを簡単に作製することができる。 psiCHECK™-2 には、コントロールとなる ホタルルシフェラーゼ遺伝子が含まれている。	蛍光の強度を高めるように工夫 されている。さらに、哺乳動物 細胞内で翻訳効率を高めるため にヒトのコードに合わせてレポ ーター遺伝子を最適化している。
測定キット 検出装置	デュアル・ルシフェラーゼ定量システム (Promega) または PicaGene Dual SeaPansy Luminescence kit (ニッポン・ジーン) など ルミノメーター				蛍光顕微鏡、FACS など

である。さて、RNAiの活性評価に特化したベクターとしては、Promega社のRNAi効果検定用ルシフェラーゼレポーターベクター、psiCHECK™ vectorsがある。これらのベクターは、ウミシイタケルシフェラーゼ・レポーター遺伝子の3' UTRにマルチクロニングサイトがあり、簡単にターゲット・レポーター遺伝子を作製できるようになっている。さらに、psiCHECK™-2 vectorにはコントロールとなるホタルルシフェラーゼ遺伝子も含んでいるため、1つのプラスミドベクターを用いてターゲットとコントロールの両方を解析できるようになっている。プロトコルを参考にしてターゲット・レポーター・プラスミドを作製し、それらを用いて簡単にRNAiの活性評価、設計したsiRNAのRNAi誘導効果を評価することができる。psiCHECK™ vectors以外にも代表的なレポータープラスミド・ベクターを表2に挙げたので参考にしていきたい。

て今後、さらに多くの研究・開発に利用されていくと考えられる。この一般的となったRNAi技術を上手く利用するためには、siRNAの設計、siRNAの(目的細胞・組織への)デリバリー、そして誘導したRNAiの活性評価が重要なポイントになると考える。これらのポイントを押さえ、効果的なRNAiを実現し、大いに研究に役立てていただきたいと願う。

#### 参考文献

- 1) Fire, A. et al.: Nature, 391 : 806-811, 1998
- 2) Boshier, J. M. & Labouesse, M.: Nature Cell Biol., 2 : E31-36, 2000
- 3) Fire, A.: Trends Genet, 15 : 358-363, 1999
- 4) Sharp, P. A.: Genes Dev., 13 : 139-141, 1999
- 5) Vaucheret, H. & Fagard, M.: Trends Genet., 17 : 29-35, 2001
- 6) Elbashir, S. M. et al.: Nature, 411 : 494-498, 2001
- 7) Hohjoh, H.: FEBS Lett., 521 : 195-199, 2002
- 8) Khvorova, A. et al.: Cell, 115 : 209-216, 2003
- 9) Schwarz, D. S. et al.: Cell, 115 : 199-208, 2003
- 10) Hohjoh, H.: FEBS Lett., 557 : 193-198, 2004
- 11) Ui-Tei, K. et al.: Nucleic Acids Res., 32 : 936-948, 2004
- 12) Naito, Y. et al.: Nucleic Acids Res., 32 : W124-129, 2004
- 13) Omi, K. et al.: FEBS Lett., 558 : 89-95, 2004

#### おわりに

RNAiは、今日、簡便な遺伝子機能阻害方法として揺るぎない地位を確立したといえる。そし



#### 北條浩彦 (Hirohiko Hohjoh)

1990年九州大学大学院医学系研究科博士課程修了。1991年東京大学医科学研究所助手。1992年米国国立衛生研究所(NIH)、国立ガン研究所(NCI)生化学研究室研究員。1997年東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室助手。2002年 国立精神・神経センター神経研究所室長~現在に至る。