発現ベクターによる RNAi

特長　・合成 siRNA を導入した場合に比べ、長期に RNAi 効果を観察できる。
・細胞中に高効率で siRNA を発現させることが可能。
・研究目的に応じて任意のベクターが選択できる。

原理及び説明

遺伝子発現をノックダウンする手法としてRNA干渉作用（RNAi）が注目されている。RNAiは二本鎖RNA（dsRNA）を細胞に導入することにより、標的遺伝子のmRNAを分解し、発現を抑制する手法である。哺乳類細胞では 21 塩基の短い二本鎖RNA（short interfering RNA; siRNA）によってRNAi効果が得られることが明らかとなった[1)]。
しかし、細胞に直接短い二本鎖 RNA を導入する手法では、発現抑制効果が一過性であり、長期の RNAi 効果は期待できない。また、細胞への導入効率が問題となる場合もある。
そこで、これらの問題を解決するため、発現ベクターを用いた方法が開発された[2) 3)]。
一般的によく用いられている U6 プロモーターを使用したヘアピン型 RNA 発現ベクターについて説明する（図 1 参照）。

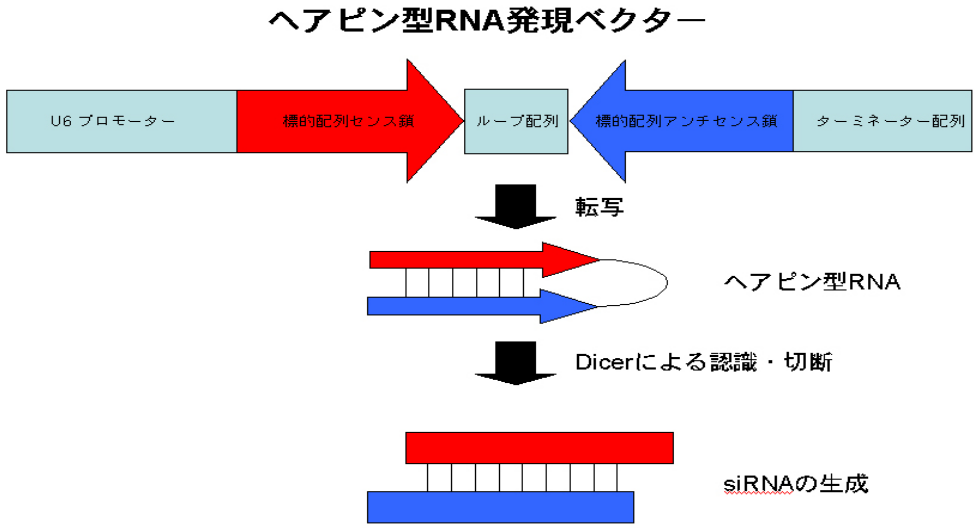


図 1. ヘアピン型 RNA 発現ベクター
まず、U6 プロモーターから転写された短鎖 RNA はアニーリング反応によりヘアピン型 RNA の構造をとる。このヘアピン型 RNA は Dicer により認識・切断されて短い二本鎖 RNA (siRNA) となる。これら発現ベクターは、任意の方法（トランスフェクションや組換えウイルス感染法）で細胞に導入可能である。

・ベクターの選択について

発現ベクターには、プラスミドベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが用いられる。これら発現ベクターはそれぞれに特徴を有しており、研究目的に応じて任意のものを選択できる。

プラスミドベクターを用いる発現ベクターは比較的簡単に構築でき、培養細胞での一過性及び薬剤選択による長期の RNAi 実験、*in vivo* での動物実験（→「*in vivo* へのトライ」参照）に使用できる。

アデノウイルスベクターは効率の良い感染能を利用した *in vitro* および *in vivo* での実験に適している（→「アデノウイルスベクターによる RNAi」参照）。

レトロウイルスベクターはゲノムへの組込み能を利用した簡便な *in vitro* での長期 RNAi 実験に適している（→「レトロウイルスベクターによる RNAi」参照）。

タカラバイオでは、プラスミドベクターでの実験のために pBAsi ベクターを販売している。レトロウイルスベクターの実験のためには pSINsi ベクターを販売している。pBAsi ベクターはアデノウイルスベクターでの実験に利用できる。（ウイルスベクターについての詳しい説明は各章を参照のこと。）

・発現について

siRNA の発現には短鎖 RNA の発現効率が高い RNA polymerase Ⅲ（polⅢ）系の U6 プロモーター（pSINsi / pBAsi シリーズ）、H1 プロモーター（pSINsi / pBAsi シリーズ）を使用する。プロモーターの適性は、使用する細胞によって異なる。U6 プロモーターにはヒト由来およびマウス由来があり、用いる細胞により選択する。

これら polⅢ系プロモーターの下流にヘアピン型やタンデム型 RNA を発現させるための DNA 配列を挿入し、siRNA 発現プラスミドベクターを得て、RNAi 実験に使用する。

・**ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成**

ヘアピン型 RNA（shRNA）を発現させるためには、［Ligation 用の制限酵素サイト＋標的配列（センス）＋ループ配列＋標的配列（アンチセンス）＋ターミネーター配列＋Ligation 用の制限酵素サイト］の順でデザインした合成 DNA をプロモーターの下流に挿入する。pBAsi ベクターのクローニングサイトは、ネオマイシン耐性およびピューロマイシン耐性の場合、上流側は *Bam*H I、下流側は *Xba* I、*Sse*8387 I、*Hin*d III のいずれかを使用できる。薬剤耐性遺伝子を含まない pBAsi ベクターの場合、上記のサイトに加えて、下流に *Sal* I、*Acc* I、*Hin*c II、*Pst* I、*Sph* I も使用できる。

例えば、*Bam*H I、*Hin*d III に挿入する場合には、下図に示すような合成オリゴ DNA を作製する（Top strand と Bottom strand の 2 本； N 部分が標的配列）。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基（G または A）が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入する。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG（Boden *et al*. 参考文献 4)を挙げているが、GTGTGCTGTCC（Miyagishi *et al*. 参考文献 5)も有用であることが確認されている。また、これ以外のヘアピンループとして、Lee *et al*.(参考文献 6)、Paddison *et al*. (参考文献 7)、Paul *et al*.(参考文献 8)、Sui *et al*. (参考文献 9)らによってそれぞれ異なった配列が報告されている。

ターミネーター配列には、TTTTTT 配列を用いる（T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まる）。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後には必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていないことを確認することが必要である。

転写開始点（ターゲット配列の最初の塩基が G または A でない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入すること）

	*Bam*H I ↓	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator *Hin*d III
Top strand	5’-GATCC (G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN (C/T)	TTTTTT A-3’
Bottom strand	3’-G (C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNN (G/A)	AAAAAA TTCGA-5’

RNAi の効果は標的配列によって大きく異なる。選択した配列が他の遺伝子に作用しないことをBLAST 検索により確認する。

ネガティブコントロールの例としては、標的配列をランダムシャッフル法などによってスクランブルしたものが挙げられる。スクランブル配列についてもBLAST 検索し、他の遺伝子に作用しないことを確認する。

一般的なプロトコール

以下に pBAsi ベクターを用いた red-shift GFP（rsGFP）をターゲットとした RNAi 実験例について具体的に説明する。

タカラバイオのベクターを用いれば初心者の方でも、この例を参考に転写開始点（G または A）及び T の数に気をつけ、標的配列部分のみを変更することで容易に合成 DNA デザイン及びベクター構築が可能である。

用意するもの

- pBAsi ベクター（製品コード 3220、3221、3222）
- 10× アニーリングバッファー［100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl］
- DNA Ligation Kit Ver. 1（製品コード 6021）
- コンピテントセル（*E. coli* JM109：製品コード 9052）
- LB＋Amp プレート、LB＋Amp 液体培地（アンピシリン 100 μg/ml 含有）
- 制限酵素 *Bam*H I（製品コード 1010A）、*Hin*d III（製品コード 1060A）
- アガロース（PrimeGel Agarose LMT PCR-Sieve GAT：製品コード 5815A など）
- *Trans*IT-293（製品コード V2700)
- 24 ウェルコラーゲンコートプレート（IWAKI 社など）
- フィルター付滅菌済みチップ
- 電気泳動装置
- 恒温槽
- CO_2インキュベーター
- 安全キャビネット
- 細胞観察用蛍光顕微鏡　など

１．二本鎖オリゴDNAの調製

まず、DNA合成を行う（HQ-SEQグレード)。合成したDNA配列を以下に示す。標的配列は論文に記載されている配列[9)]である。

＜Top strand＞　**5'-**　GATCC GGAGTTGTCCCAATTCTTG TTCAAGAGA
CAAGAATTGGGACAACTCC TTTTTT A　**-　3'**

＜Bottom strand＞　**5' -**　AGCTT AAAAAA GGAGTTGTCCCAATTCTTG
CCCATCTGTGGCTTCACAG　CAAGAATTGGGACAACTCC G **- 3'**

合成した相補オリゴ DNA（Top strand および Bottom strand）を終濃度 20 pmol/μl になるように 1×アニーリングバッファー中に添加し、95℃、5 分間加熱処理後、30 分かけて 25℃まで徐冷する。

２．ベクターの調製

・pBAsi vector　4 µl (2 µg)
・*Bam*H I　10 units
・*Hin*ｄ III　10 units
・10× K buffer　2 µl
up to　20 µl (dH_20)

37℃で1 時間反応後、エタノール沈殿を行い、10～20 µlのTE バッファーに溶解する。通常、ライゲーションには1 反応あたり1 µl を用いる。インサートとして用いる二本鎖オリゴDNAのmole 濃度が高いため、ベクターから切り出された小断片をゲル抜きで除く操作をしなくても、通常、目的のクローンを取得できる。

３．ライゲーションおよびトランスフォーメーション

＜DNA 溶液の調製＞

2.で調製したベクター1 µl に 1.で調製した 2 本鎖オリゴ DNA 5 pmol を加え、TE バッファーで液量を 5 µl にする。

＜ライゲーション反応＞

DNA 溶液 5 µl に、DNA Ligation Kit Ver. 1 の A 液 20 µl を加えてよく撹拌し、ついで B 液 5 µl を添加してさらに撹拌した後、16℃、30 分間インキュベートする。

＜トランスフォーメーション＞

ライゲーション液 10 µl を 100 µl のコンピテントセルに加え、氷中に 30 分間放置後、42℃、45 秒間、熱処理を行ってトランスフォーメーションし、LB+Amp にまき、37℃で 16 時間培養する。

４．インサートの確認

3.のトランスフォーメーションにより得られた１コロニーの半分を 5 ml の LB+Amp 液体培地に植菌、培養する。残りを LB+Amp プレートに植菌してコロニー形成まで培養後、4℃にて保存する（レプリカコロニープレートの作製）。
液体培養は、37℃、16 時間培養後、プラスミド DNA を調製する。
得られたプラスミド約 500 ng を *Bam*H I、*Hin*d III で消化し、4%アガロースゲルで電気泳動後、EtBr 染色にて約 60 bp のバンドを確認する。
（参考：通常、約 90%の確率で合成 DNA 挿入クローンが得られる。 必要に応じてシーケンスプライマーである M4 または RV で塩基配列の確認をする。）

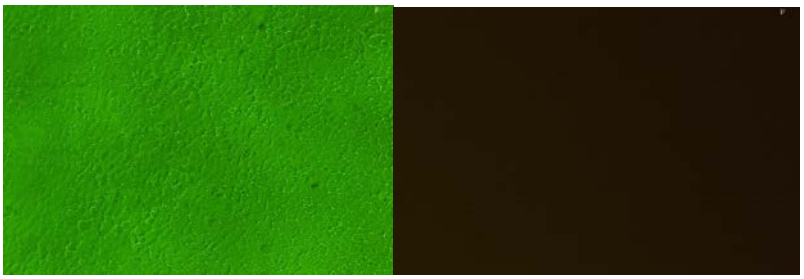
５．プラスミドDNAの大量調製

４.で保存しておいたインサートが確認できたクローンのレプリカコロニーを LB+Amp 液体培地 40 ml に植菌し、37℃、18 時間培養後、NucleoBond Xtra Midi 等を使用してプラスミド DNA を抽出・精製する。
エタノール沈殿後、滅菌蒸留水で無菌的に 1 mg/ml の濃度に溶解する。
溶解後は実験に使用するまで、－20℃にて凍結保存する。

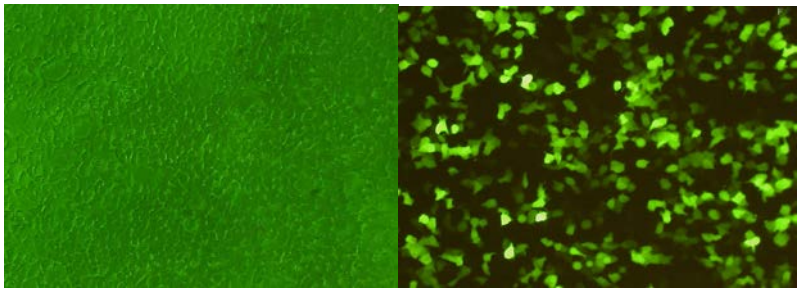
実験例とその結果

293T 細胞に、標的となる rsGFP 発現ベクターと siRNA 発現ベクターを *Trans*IT-293 を用いてコトランスフェクションし、24 時間後に蛍光顕微鏡で rsGFP の発現状態を観察した（**下写真**）。その結果、siRNA 発現ベクターによる rsGFP の発現抑制が確認できた。

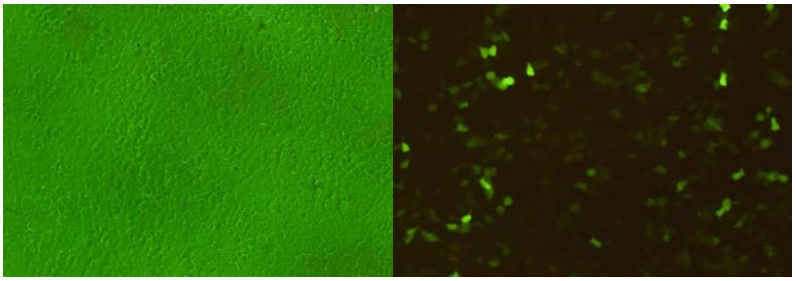
① 細胞のみ



② rsGFP 発現ベクター 0.2 μg ＋ pBAsi-NC 0.3μg （ネガティブコントロール）



③ rsGFP 発現ベクター 0.2 μg ＋ pBAsi-GFP 0.3 μg



③のサンプルにて rsGFP に対する RNAi が観察された。

関連製品

pBAsi-hH1（製品コード 3220）

pBAsi-hU6（製品コード 3221）

pBAsi-mU6（製品コード 3222）

pSINsi ベクター（製品コード 3660、3661、3662）

*Trans*IT-293 （Mirus 社製：製品コード MIR2700）

文献名

1) Elbashir,S.M *et al.*, （2001）*Nature*., **391**, 806-811.
2) Tuschl, T *et al.* （2002）*Nature Biotech.*, **20**, 446-448.
3) Kawasaki, H *et al.,* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 700-707.
4) Boden *et al.,* (2004)*Nucleic Acids Res.*, **32**, 1154-1158.
5) Miyagishi *et al.,* (2004)*J. Gene Med.*, **6**, 715-723.
6) Lee *et al.,* (2002) *Nat. Biotech.*, **20**, 500-505.
7) Paddison *et al.,* (2002) *Genes and Dev.*, **16**, 948-958.
8) Paul *et al.,* (2002) *Nat. Biotech.*, **20**, 505-508.
9) Sui *et al.,* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 5515-5520.
10) Juhana E *et al.,* (2002) *FEBS.Lett.*, **527**, 274-278.