

アデノウイルスベクターによる RNAi

特長

- ・ 高い感染能を利用し、効率よく一過性の RNAi 実験が行える。
- ・ 広い動物種に用いることができ、増殖細胞だけでなく静止期の細胞にも感染・発現できる。
- ・ 神経系を含む多くの分化・未分化動物培養細胞をターゲットにすることができ、さらに動物個体への直接注入・投与による遺伝子発現が可能である。

原理説明

<アデノウイルスベクターとは>

アデノウイルスは最もよく研究されているウイルスのひとつである。現在汎用されているアデノウイルスベクターはE1 遺伝子を欠損しているため、E1 遺伝子を持続的に発現している特殊な細胞（293 細胞）でのみ増殖することができ、通常の細胞には感染することは可能であるが増殖することはない¹⁾。このような特徴からアデノウイルスベクターは安全かつ高効率なGene Deliveryツールとして、遺伝子機能解析などの基礎研究から遺伝子治療の分野まで広く利用されている²⁾。アデノウイルスベクターの特徴を次に示す。

- ・ 高力価のウイルスを得ることができる。
10⁸~10⁹ PFU/ml程度のウイルス液を容易に得ることができる。
さらに 10¹¹ PFU/ml程度まで濃縮することも可能である。そのため、接着性の細胞ではほぼ 100%の細胞に遺伝子導入することが可能である。
- ・ 広い動物種に用いることができる。
- ・ 増殖細胞だけではなく静止期の細胞にも感染・発現できる。
- ・ 神経系を含む多くの分化・未分化動物培養細胞をターゲットにすることができ、さらに動物個体への直接注入・投与による遺伝子発現が可能である。

<アデノウイルスベクターによる RNAi>

RNAiは生物学的に興味深い現象であるだけでなく、遺伝子解析の強力なツールである。ヘアピン型のRNA（shRNA）を発現すると、Dicerによるスプライシングを受けてRNAi効果を示すこと（→発現ベクターによるRNAiの項参照）が発見^{1) 2)}されて以来、siRNA（shRNA）発現ベクターによるRNAi実験が多く行なわれるようになり、アデノウイルスベクターを用いた研究も報告されている³⁾。

<siRNA 発現アデノウイルスベクター作製の流れ>

基本プラスミドベクターpBAsi および Adenovirus Dual Expression Kit を用いる。RNAi は選択する標的配列によって遺伝子抑制効果が異なる。したがって、通常は 3~5 種類の標的配列を選択し、まずは基本プラスミドベクターpBAsi (図 1 ベクター図) に挿入して効果の高い配列を実験的に確かめる。(→「発現ベクターによる RNAi」参照) RNAi 効果が確認できたら「プロモーター+ヘアピン型 RNA 配列」を切り出して、アデノウイルス作製用コスミド pAxcwit2 に載せ換える。Cla I または EcoR V で切り出せるようデザインされているためこの操作は容易である。インサートを挿入したコスミドを各キットのプロトコールに従って 293 細胞にトランスフェクトすれば、siRNA 発現アデノウイルスベクターが構築できる。

siRNA発現用基本ベクター：pBAsiについて

pBAsi ベクターシリーズではプロモーターおよび薬剤耐性遺伝子の異なる 9 種のプラスミドベクターを取り揃えている。標的細胞、実験目的に応じたベクターを選択する。

- human H1 promoter (Accession S68670) を使用 ;
 - ・ pBAsi-hH1 DNA (製品コード 3220)
 - ・ pBAsi-hH1 Pur DNA (製品コード 3223) : ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載。
 - ・ pBAsi-hH1 Neo DNA (製品コード 3226) : ネオマイシン耐性遺伝子を搭載。
- human U6 promoter (Accession X07425) を使用 ;
 - ・ pBAsi-hU6 DNA (製品コード 3221)
 - ・ pBAsi-hU6 Pur DNA (製品コード 3224) : ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載。
 - ・ pBAsi-hU6 Neo DNA (製品コード 3227) : ネオマイシン耐性遺伝子を搭載。
- mouse U6 promoter (Accession X06980) を使用 ;
 - ・ pBAsi-mU6 DNA (製品コード 3222)
 - ・ pBAsi-mU6 Pur DNA (製品コード 3225) : ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載。
 - ・ pBAsi-mU6 Neo DNA (製品コード 3228) : ネオマイシン耐性遺伝子を搭載。

準備

・ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成

ヘアピン型 RNA 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 BamH I、下流側は Xba I、Sse8387 I、Hind 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、Hinc II、Pst I、Sph I も使用できる。

例えば、*Bam*H I、*Hind* 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）

	<i>Bam</i> H I ↓	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator <i>Hind</i> III
Top strand	5'-GATCC (G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (C/T)	TTTTTT A-3'
Bottom strand	3'-G (C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (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。

用意するもの

- 10× アニールバッファー [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 (アンピシリン 100 µg/ml 含有)
- 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)、*Hind* III (製品コード 1060A)

プロトコール

I. 二本鎖オリゴ DNA の調製

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する。

95℃、5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25℃まで徐冷する。

II. ベクターの調製

- pBAsi vector 2 μg (4 μl)
- *Bam*H I 10 units
- *Hind* III 10 units
- 10× K buffer 2 μl

滅菌蒸留水で 20 μl に調製し、37℃、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。通常、合成オリゴ DNA の mole 濃度が高いため、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目的のクローンを取得できる。

III. ライゲーション

ベクター 1 μl に I. で調製した 2 本鎖オリゴ DNA 3 pmol 以上を加え、TE バッファーで液量を 5 μl にする。Ligation Kit Ver. 1 A 液 20 μl を加えてよく混合し、Ver.1 B 液 5 μl を添加してさらに混合し、16℃、30 分間インキュベートする。

IV. 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、トランスフォーメーションし、LB Amp プレートにまき、16 時間培養する。

V. インサートの確認

トランスフォーメーションにより得られたコロニーを 2～5 ml の LB Amp 液体培地で 16 時間培養し、プラスミドを調製する。

プラスミド約 500 ng を *Bam*H I、*Hind* III で消化し、4%アガロースゲル電気泳動にて約 60 bp のバンドを確認する。通常、約 90%の確率で、合成オリゴ DNA 挿入クローンが得られる。必要に応じてのシーケンスプライマーM4 または RV で塩基配列の確認をする。

VI. プラスミド DNA の大量調製

プラスミド DNA を細胞にトランスフェクションする場合は、高純度に精製されたものが必要である。pBAsi ベクターは high-copy プラスミドであり、25~40 ml の大腸菌培養液から約 100 µg のプラスミドが得られる。プラスミドは塩化セシウム密度勾配による超遠心やイオン交換カラム（NucleoBond Xtra Midi など）によって精製し、エタノール沈殿後、滅菌蒸留水で無菌的に 1 mg/ml の濃度に溶解したものを用意しておく。

アデノウイルスベクターへの挿入

プラスミドベクターのRNAi効果が確認できたら、「プロモーター+ヘアピン型RNA配列」を乗せ換えてsiRNA発現アデノウイルスベクターを作製する。*EcoR V*で切り出してアデノウイルスベクター作製用コスミドpAxcwit2の*Smi I*（*Swa I*）部位に挿入にするのが一般的である。組換えアデノウイルスの作製に関しては、Adenovirus Dual Expression Kitを参照する。アデノウイルスベクターは高力価（ $10^9 \sim 10^{10}$ pfu/ml）のウイルスを容易に得ることができ、感染する細胞域が広く、*in vitro*でも*in vivo*でも使用できる。

実験例とその結果

rsGFPに対するsiRNAを発現するアデノウイルスを作製し、rsGFP発現細胞に感染させて、ノックダウンした例を紹介する。プロトコールにしたがいヘアピン型RNA配列をpBAsi hU6に挿入した後、「プロモーター+ヘアピン型RNA配列」を*EcoR V*で切り出してアデノウイルス作製用コスミドpAxcwit2の*Smi I*（*Swa I*）部位に挿入した。アデノウイルスの作製はAdenovirus Dual Expression Kitのプロトコールにしたがって行い、 6.0×10^9 pfu/mlのウイルス液を得た。得られたsiRNA発現アデノウイルスをrsGFP発現細胞に感染し、蛍光強度の変化を観察した（図2）。siRNA発現アデノウイルスによるRNAi効果が確認できた。

Basic vector: pBASi hU6
pBASi hH1
pBASi mU6

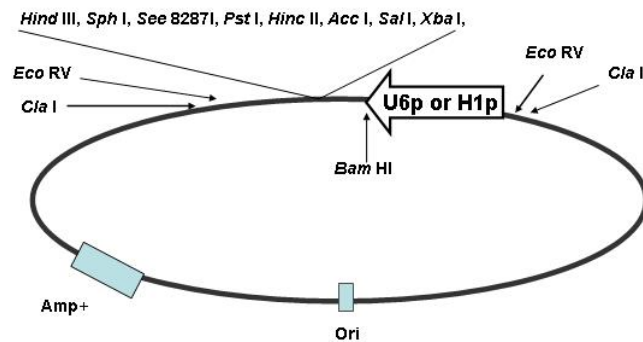


図 1 : pBASi ベクター

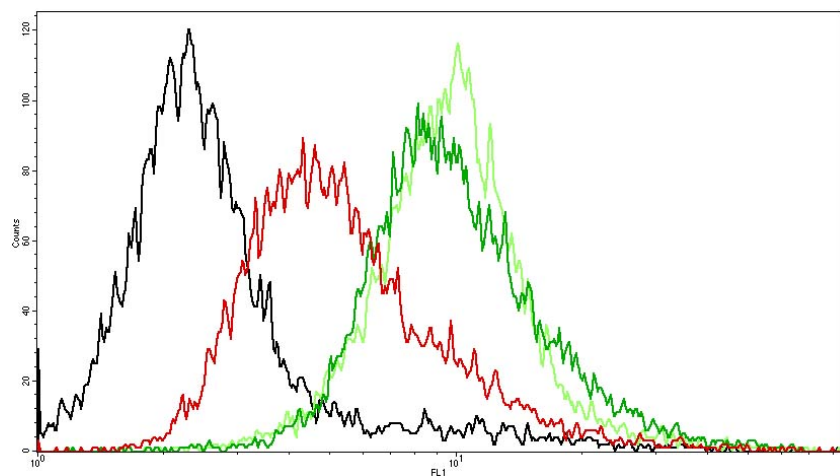


図 2

あらかじめ HepG2 (ヒト肝臓由来) に rsGFP を導入した細胞を構築しておき、この細胞に組換えアデノウイルスを MOI=60 で感染し、5 日後にフローサイトメーターで蛍光強度を観察した。

黒 : HepG2

緑 : rsGFP 発現 HepG2

赤 : siRNA 発現アデノウイルスを感染させた rsGFP 発現 HepG2

黄緑: si スクランプル (NC) 発現アデノウイルスを感染させた rsGFP 発現 HepG2

文献

- 1) Tuschl, T, *et al.*, (2002) *Nature Biotech.*, **20**, 446-448.
- 2) Kawasaki, H, *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 700-707.
- 3) Shen, C, *et al.*, (2003) *FEBS Lett.*, **537**, 111-114.
- 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.

関連製品

pBAsi-hH1 (製品コード 3220)
pBAsi-hH1 Pur DNA (製品コード 3223)
pBAsi-hH1 Neo DNA (製品コード 3226)
pBAsi-hU6 (製品コード 3221)
pBAsi-hU6 Pur DNA (製品コード 3224)
pBAsi-hU6 Neo DNA (製品コード 3227)
pBAsi-mU6 (製品コード 3222)
pBAsi-mU6 Pur DNA (製品コード 3225)
pBAsi-mU6 Neo DNA (製品コード 3228)
Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170)
Adenovirus Genome DNA-TPC (製品コード 6171)