

レトロウイルスベクターによる RNAi

レトロウイルスベクターは目的遺伝子を感染細胞染色体に安定に組み込むことができるため、目的遺伝子の長期安定発現ベクターとして非常に有効である。レトロウイルスベクターを用いることにより、以下のようことが期待できる。

- 高効率遺伝子導入
- 宿主染色体への siRNA 発現ベクター安定組み込み
- 長期安定遺伝子ノックダウン

原理

レトロウイルスは RNA 型のウイルスで、ウイルス粒子中に逆転写酵素を持ち、RNA→DNA→RNA の形式で複製する。レトロウイルスゲノムは、両端の反復配列 (LTR) と構造遺伝子 (gag, pol, env)、RNA ゲノムが粒子内に取り込まれるのに必要なパッケージングシグナル (ψ) から成る (5'-LTR- ψ -gag-pol-env-LTR-3')。

ウイルス複製のメカニズムは以下の通りである。

まず、ウイルス粒子は細胞レセプターに吸着、融合の後、細胞質内に侵入する。感染細胞の細胞質内では逆転写反応が進行し、ウイルスゲノム RNA から逆転写酵素によって RNA/DNA ハイブリッドが作られ、次いで RNA が分解された後二本鎖 DNA が形成される。この二本鎖 DNA は細胞の染色体の中に組み込まれる (プロウイルス)。プロウイルスからはウイルスゲノム RNA (mRNA) が合成され、宿主細胞のタンパク合成工場を借りてウイルス構造タンパクを合成し、ウイルス粒子を形成する。

レトロウイルスはその粒子内にインテグラーゼという組み込み酵素を持っており、インテグラーゼの働きにより、二本鎖 DNA は高効率で宿主染色体に組み込まれる。このようなレトロウイルスの組み込み能を利用して、レトロウイルスベクターが開発された。すなわち、レトロウイルスの複製に必要な gag, pol, env を欠失させ、他の遺伝子 (外来遺伝子) を挿入したプラスミドベクターを作製し、gag, pol, env を発現している細胞 (レトロウイルスパッケージング細胞という) に導入すると、そこからは外来遺伝子を持つウイルス粒子 (レトロウイルスベクター) が産生される。最近では、ウイルス構造タンパク発現プラスミドをレトロウイルスベクタープラスミドと同時に 293T 細胞にトランスフェクションすることによって、一過性にレトロウイルスベクターを得る方法も開発されている。レトロウイルスベクターは、増殖性は持たず染色体への組み込み能が高いという特色を持っており、外来遺伝子を安定に染色体 DNA に組み込み、長期間目的遺伝子を発現させることができる。

siRNA発現レトロウイルスベクター

pSINsi-hU6
pSINsi-hH1
pSINsi-mU6

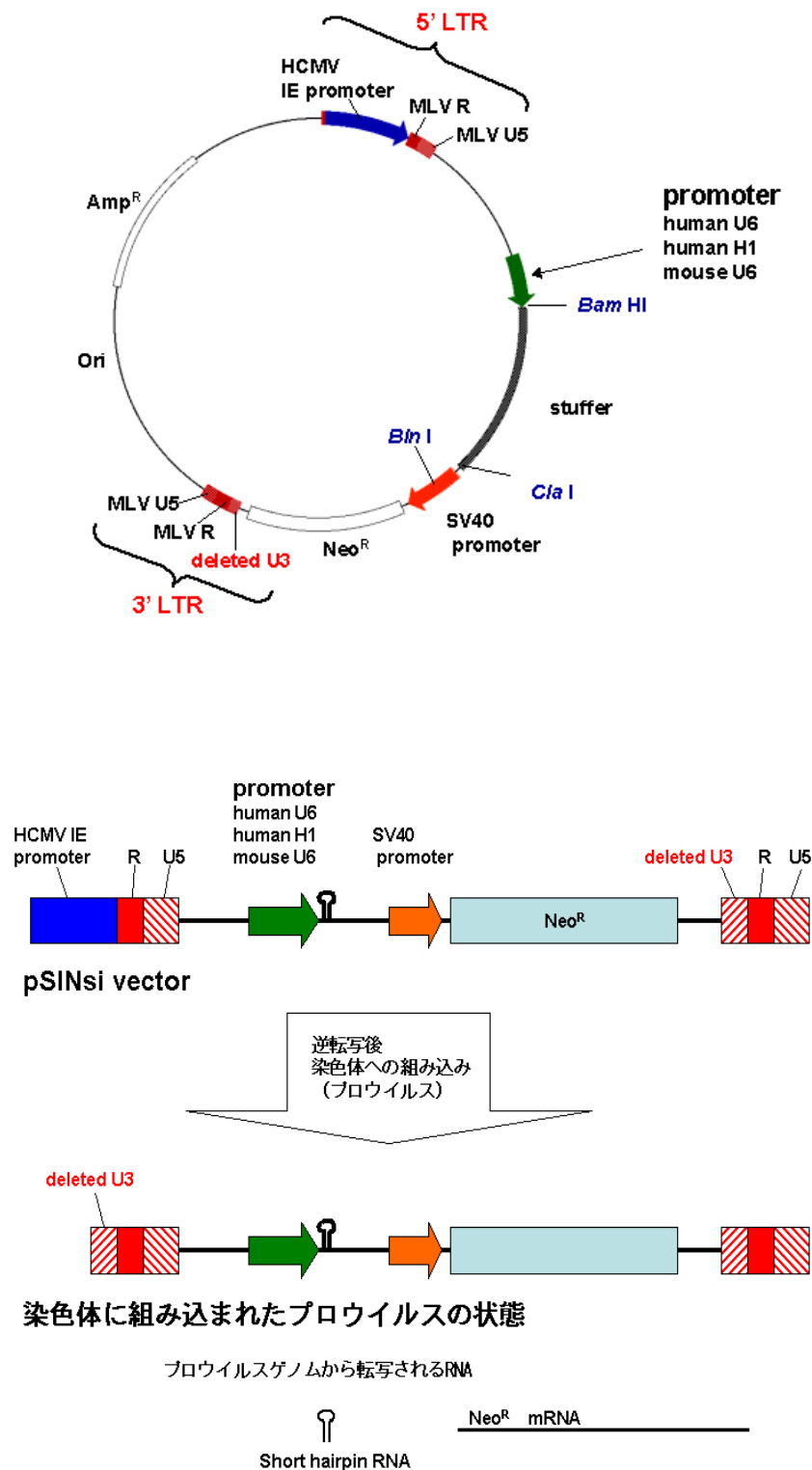


図 1. レトロウイルスベクターpSINsi シリーズ

本章では、レトロウイルスベクターに RNA polymerase III (polIII) 系のプロモーターを搭載し、ヘアピン型 RNA を発現させるベクター (図 1) について、プラスミドベクターの構築方法、ウイルスの産生方法、細胞への遺伝子導入方法について説明する。ここで使用するレトロウイルスベクター pSINsi シリーズは 3'LTR 内の U3 領域のプロモーター配列を欠失した自己不活型 (self inactivating 型 (1)) である。レトロウイルスベクターは逆転写反応の過程で 3'LTR 配列が 5' LTR にジャンプするため、染色体に組み込まれたプロウイルスの状態では 5' LTR のプロモーター活性を欠失した形となり、プロウイルスゲノム mRNA の転写は起こらなくなる。したがってプロウイルスから転写されるのは、polIII 系のプロモーターからのヘアピン型 RNA と sv40 プロモーターからのネオマイシン耐性遺伝子のみである (図 2)。

polIII 系のプロモーターの下流のクローニングサイトは *Bam*H I と *Cla* I であり、このサイトにあわせてヘアピン型 RNA を発現させるための合成 DNA 配列を挿入することによって siRNA 発現レトロウイルスベクタープラスミドが得られる。

レトロウイルスベクターは以下のいずれかの方法で調製することができる。

- ① siRNA 発現レトロウイルスベクタープラスミドを、レトロウイルスパッケージング細胞にトランスフェクションし、高力価ウイルス産生クローンを選択し、その培養上清から siRNA 発現レトロウイルスベクターを得る方法。
- ② 弊社の Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161) を用いて G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)、293 細胞、293T 細胞などに一過性トランスフェクションすることにより、短時間で siRNA 発現レトロウイルスベクターを得る方法。

siRNA 発現レトロウイルスベクターを用いた標的細胞への遺伝子導入方法としてはポリブレン法とレトロネクチン法を紹介するが、特に血球系の細胞への遺伝子導入にはレトロネクチン法が有効である (2~5)。

プロトコール

I. siRNA 発現用レトロウイルスベクター : pSINsi シリーズ

pSINsi シリーズではプロモーターの異なる 3 種のプラスミドベクター (human H1、human U6、mouse U6) を取り揃えており、標的細胞、実験目的に応じてベクターの選択が可能である。

- ・ pSINsi-hH1 (製品コード 3660) : human H1 promoter (Accession no. S68670) を搭載。
- ・ pSINsi-hU6 (製品コード 3661) : human U6 promoter (Accession no. X07425) を搭載。
- ・ pSINsi-mU6 (製品コード 3662) : mouse U6 promoter (Accession no. X06980) を搭載。

II. インサートデザイン、クローニング方法

II-1. 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。pSINsi ベクターのクローニングサイトは、上流側は *Bam*H I、下流側は *Cla* I である。

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)。U6 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 6) を挙げているが、GTGTGCTGTCC (Miyagishi *et al.* 参考文献 7) 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 8)、Paddison *et al.* (参考文献 9)、Paul *et al.* (参考文献 10)、Sui *et al.* (参考文献 11) 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>Cla</i> I
Top strand	5'-GATCC (G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNN (C/T)	TTTTTT AT-3'
Bottom strand	3'-G (C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN (G/A)	AAAAAA TAGC-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。

II-2. pSINsi vector へのヘアピン型 RNA 発現のための合成 DNA の挿入

(1) 用意するもの

- 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 または Ver. 2.1 (製品コード 6021/6022)
- コンピテントセル (注意 : *dam*⁻株は使用しないこと)
 - E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
 - E. coli* DH5α Competent Cells (製品コード 9057)
 - E. coli* HB101 Competent Cells (製品コード 9051) など
- 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)
 - Cla* I (製品コード 1034A)
 - Bln* I (製品コード 1022A)

(2) 二本鎖合成 DNA の調製

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。

(3) ベクターの調製

pSINsi vector	2 µg (4 µl)
<i>Bam</i> H I	10 units
<i>Cl</i> al	10 units
10× K buffer	2 µl
Total	20 µl

滅菌水で20 µl に調製し、30℃で1 時間反応後、アガロースゲル電気泳動でスタッファー（約920 bp）が切り出された断片（hU6/mU6 vectorの場合：約5.6 kb、hH1 vector の場合：約5.4 kb）を回収する。回収断片はエタノール沈殿後、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。ゲルからのDNA断片の回収には、NucleoSpin Gel and PCR Clean-upなどの使用を推奨する。ゲルからの切り出しにはPrimeGel Agarose LE 1-20K GAT 等、高純度のアガロースを使用する。

II-3. ライゲーションおよびトランスフォーメーション

(1) DNA 溶液の調製

ベクター 1 µl にアニールした 2 本鎖オリゴ DNA を 3 pmol 以上を加え、TE バッファーで液量を 5 µl にする。

(2) ライゲーション

- Ligation Kit Ver. 1 の場合：DNA 溶液 5 µl に Ver. 1 の A 液を 20 µl 加えてよく攪拌し、さらに Ver.1 の B 液を 5 µl を添加して攪拌した後、16℃で 30 分間インキュベートする。
- Ligation Kit Ver. 2.1 の場合：DNA 溶液 5 µl に Ver.2.1 の I 液を 5 µl 添加してよく攪拌した後、16℃で 30 分間インキュベートする。

(3) 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てトランスフォーメーションし、LB+ Amp プレートにまき、37℃で 16 時間培養する。

II-4. インサートの確認

- ① II-3- (3) で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 37℃、16 時間培養し、プラスミドを調製する。
- ②プラスミド約 500 ng を *Bam*H I、*Bln* I で消化し、2%アガロースゲル電気泳動にて約 340 bp のバンドを確認する。通常 80～90%の確率で、合成オリゴ DNA 挿入クローンが得られる。

II-5. プラスミド DNA の大量調製

プラスミド DNA はパッケージング細胞などへのトランスフェクションに用いるので、高純度に精製されたものが必要である。pSINsi vector 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。

III. レトロウイルスベクターの産生

III-1. 必要な器具・装置 (3-2、3-3 共通)

- ・ CO₂インキュベーター
- ・ 安全キャビネット
- ・ 細胞観察用顕微鏡
- ・ 超低温フリーザー
- ・ 0.45µm 滅菌済みフィルター
- ・ 電動ピペッター
- ・ 組織培養用シャーレ
- ・ フィルター付滅菌済みチップ

III-2. パッケージング細胞を用いる場合

(1) 用意するもの

- ・ レトロウイルスパッケージング細胞 : GP+E-86 (ATCC CRL-9642)、 GP+envAM-12 (ATCC CRL-9642)、 PG13 (ATCC CRL-10686)など、実験の目的に応じて選択する。
- ・ 培地 (DMEM High glucose)
- ・ パッケージング細胞に適した血清
- ・ トランスフェクション用試薬 (*Trans* IT transfection reagents など)
- ・ ペニシリン/ストレプトマイシン
- ・ トリプシン - EDTA 液
- ・ クローニングリング (IWAKI)
- ・ 0.45 µm フィルター (低吸着タイプ)
- ・ ポリブレン (8 mg/ml 水溶液)
- ・ 力価測定用細胞 (NIH/3T3 など)
- ・ G418

(2) トランスフェクションおよび細胞のクローニング

① トランスフェクション

トランスフェクションの前日にパッケージング細胞を φ10 cm シャーレに播き、トランスフェクション試薬を用いて、10 µg の pSINsi retrovirus vector plasmid をトランスフェクションする。トランスフェクションから 24~48 時間後、細胞を G418 含有培地 (500 µg/ml) に継代する。このとき、細胞を 1 : 10、1 : 100、1 : 1000、1 : 10000 に段階希釈してプレートに播く (各希釈段階 2~3 枚)。

② クローニング

3~4 日ごとに G418 含有培地を交換し、約 2 週間培養する。クローニングリングを用いてコロニーを回収し、24 ウェルプレートで培養する。通常、20 個以上のコロニーを回収する。24 ウェルプレートでコンフルエントになった細胞から順次 6 ウェルプレートに継代し、6 ウェルプレートでセミコンフルエントに生育したところで G418 を含まない培地 1 ml に交換し、24 時間後、上清と細胞を回収する。上清にはレトロウイルスベクターが含まれる。上清は、0.45 µm フィルターでろ過して分注後、超低温フリーザーで保存し、後日力価を測定する。細胞はトリプシン処理後遠心し、細胞凍結保存液に懸濁して超低温フリーザーまたは液体窒素中で保存する。約 20 クローンの上清と細胞を調製する。

(3) ウイルス力価測定

◆ 前日

NIH/3T3 細胞を 6 ウェルプレートに 5×10^4 cells/well の密度で播く。

◆ 1 日目 (感染)

ウイルスストックの溶解および希釈：

- ① 超低温フリーザーで保存したウイルスを 37℃ 水浴中で速やかに溶かし、溶解後は氷上で保持する。
- ② ウイルス液はマイクロチューブ中で 10% ウシ血清入り DMEM を用いて 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍に希釈する。希釈液は各段階 200 μ l 以上用意する。
- ③ NIH/3T3 細胞の培地を 8.9 μ g/ml のポリブレン含有 10% 血清培地 900 μ l と交換する。
- ④ 10 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍に希釈したウイルス液を各ウェルに 100 μ l 添加し、感染させる。
(ここでウイルス液の最終希釈段階は 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍になり、ポリブレン濃度は 8 μ g/ml となる。)
- ⑤ 感染から 4～6 時間後、各ウェルに 10% 血清培地 1 ml を添加する。

◆ 2 日目以降

- ・ 感染から 24 時間後、G418 を 500 μ g/ml 含有する 10% 血清培地 2 ml と交換する。(培地交換するとき細胞が乾かないように注意すること。)
- ・ 以後、3 日～4 日ごとに G418 含有培地を交換し、9～12 日間培養する。

◆ 10～14 日目 (コロニー染色)

コロニーが生育してきたところでコロニーをギムザ液やメチレンブルーなどで染色する。

【メチレンブルー染色の場合】

用意するもの

- ・ PBS
- ・ 0.2% メチレンブルー／メタノール溶液

【染色操作】

- ① プレートから培地を吸引除去し、1 ウェルあたり 1 ml の PBS を添加し、PBS を吸引除去する。
- ② プレートの蓋を安全キャビネット内で開け、キャビネットのファンで風乾させる。
- ③ プレートが完全に乾いたら、1 ウェルあたり 0.5 ml の 0.2% メチレンブルー／メタノール溶液を添加して 10 分間染色する。
- ④ メチレンブルー染色液を除き、ウェルを水洗し、乾燥させる。
- ⑤ 青く染まったコロニーの数を計数し、10～100 個の範囲で得られた値に希釈倍率を乗じた値を力価 (cfu/ml) とする。

(4) ウイルス産生

高力価レトロウイルスベクター産生クローンが得られれば、拡大培養し、一部細胞バンクを調製する。実験の規模に合わせてレトロウイルスベクター産生細胞を拡大培養し、セミコンフルエントに生育したところで新しい増殖培地と交換し (ϕ 10 cm シャーレの場合、5 - 7 ml)、37℃ 24 時間、または 32℃ 48 時間培養し、上清を 0.45 μ m フィルターでろ過し、ウイルス上清液とする。ウイルス上清液はクライオバイアルなどに分注後、超低温フリーザーで保存可能である。

III-3. Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161) を用いる場合

(1) 用意するもの

- Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161)
- G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)、293 細胞、293T 細胞など
- ゼラチンまたはコラーゲンコートプレート
- 5 ml ポリスチレン丸底チューブ
- 培地 (DMEM High glucose)
- 血清
- 滅菌蒸留水
- ペニシリン/ストレプトマイシン
- トリプシン - EDTA 液
- 0.45 µm フィルター (低吸着タイプ)
- ポリブレン (8 mg/ml 水溶液)
- 力価測定用細胞 (NIH/3T3 など)

(2) ウイルス産生

◆ 前日

G3T-hi細胞、293 細胞または 293T細胞をφ6cm シャーレに 3×10^6 cells播く。

◆ 1 日目 (トランスフェクション)

- Retrovirus Packaging Kit の中からベクター (pGP, pE-eco/ampho)、クロロキン、必要数量のトランスフェクションバッファーを溶解する。

①トランスフェクションバッファー、滅菌蒸留水を室温に戻す。

②添付のクロロキンを培地 (10%FBS/DMEM) に 1000 分の 1 量添加し、培地を 37°Cで温めておく。

③細胞が 70~80%コンフルエントであることを確認しクロロキン入り培地 3 ml と交換する。

④DNA 混合液の調製 (以下の溶液を 5 ml 容ポリスチレン丸底チューブで混合する。)

pSINsi retrovirus vector (1 µg/µl 水溶液)	10 µl
pGP Vector	5 µl
pE-eco/-ampho Vector	5 µl
2M CaCl ₂	62 µl
滅菌蒸留水	418 µl
Total	500 µl

⑤磷酸カルシウム沈殿の作製およびトランスフェクション

- トランスフェクションバッファー 500 µl をはかりとる (電動ピペッターを使用)。
- ④の液に緩やかに加える (チューブを振りながら混ぜる)。添加後、直ちにピペッターの排出を利用してバブリングする (10~20 秒)。
- 1~2 分以内にシャーレに均一に滴下し、培地と混合する。(長時間の放置は大きな結晶形成の原因となるためできるだけ避けること)。
- 37°C、5%CO₂インキュベーターで培養する (7~11 時間)。(顕微鏡観察で細胞に粉雪が降りかかったような状態が見えれば磷酸カルシウム沈殿の形成は成功している)
- (トランスフェクションから 7~11 時間後) シャーレから培地 3 ml を除き、新たに 10% FBS/DMEM を 4 ml 加える。

◆ 2 日目（トランスフェクションから 24 時間後）培地を交換する（10%FBS/DMEM、4 ml）

◆ 3 日目（トランスフェクションから 48 時間後）

上清を 0.45 µm フィルターでろ過し、ウイルス液とする。調製したウイルス液は直ちに使用しない場合、小分けして超低温フリーザーで保存し、凍結融解の繰り返しを避ける。293T 細胞を用いてウイルス産生した場合、 10^6 cfu/ml 程度のウイルス力価が得られる。

(3) ウイルス力価測定

III-2-(3).参照

実験例

red shift GFP (rsGFP) のターゲット配列 (GGAGTTGTCCCAATTCTTG) に対するヘアピン型 RNA 発現のためのオリゴ DNA (下記) を合成し、それを pSINsi-hH1, pSINsi-hU6, pSINsi-mU6 の *Bam*HI-*Cla*I 部位に挿入し、レトロウイルスベクタープラスミドを構築した。

	<i>Bam</i> HI target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	<i>Cla</i> I
Top strand	5'-GATCC GGAGTTGTCCCAATTCTTG	CTGTGAAGCCACAGATGGG	CAAGAATTGGGACAACCTCC	TTTTTT	AT-3'
Bottom strand	3'-G CCTCAACAGGGTTAAGAAC	GACACTTCGGTGTCTACCC	GTTCTTAACCCTGTTGAGG	AAAAAA	TAGC-5'

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (Code 6160/6161) を用いて 293T 細胞で一過性にウイルス産生を行い、NIH/3T3 細胞で力価を測定した。

得られたウイルス力価は以下の通りである。エコトロピックウイルスの方が力価は高い傾向にあったが、プロモーターhH1, hU6, mU6 間での力価に大きな違いはなかった。

	ロット数	力価 ($\times 10^6$ cfu/ml)
Eco SINsi	5	3.0 - 4.2
Ampho SINsi	5	0.5 - 2.1

IV. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験

IV-1. 必要な器具・装置 (IV-2、-3 共通)

- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ 安全キャビネット
- ・ 細胞観察用顕微鏡
- ・ 電動ピペッター
- ・ 組織培養用シャーレ
- ・ フィルター付滅菌済みチップ

IV-2. RetroNectin を用いる場合

(1) 用意するもの

RetroNectin (製品コード T100A/B) およびノントリート培養容器、2% BSA/PBS 溶液、PBS または RetroNectin Dish (製品コード T110A)

(2) 準備 (RetroNectin Dish を用いる場合には不要)

ノントリート培養容器に RetroNectin をコーティングし、2% BSA/PBS 溶液でブロッキング後、PBS または Hank's 緩衝液で洗浄する (詳細は RetroNectin の説明書参照、この状態で 4℃ にて保存可能である)。

(3) 感染

- ① RetroNectin をコートしたプレートにウイルス液を 100~250 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 加え、32℃ または 37℃ の CO₂ インキュベーターで 3~5 時間インキュベートする。
- ② 増殖期にある細胞を回収し、新しい増殖培地で 0.2 - 1×10⁵ cells/ml になるように懸濁する。
- ③ 感染の直前に RetroNectin プレートからウイルス液を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄する。プレートが乾かないように注意すること。
- ④ 洗浄後直ちに細胞をプレートに添加する。播種密度は、細胞の大きさや増殖速度によって異なるが、一般的に推奨される密度は 0.5 - 2.5×10⁴ cells/cm² である。

(4) 遺伝子導入細胞の選択

pSINsi vector はマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を搭載しているため、遺伝子導入細胞を G418 で選択することができる。G418 選択は感染後 24 時間以上経過してから開始し、3~4 日ごとに G418 培地を交換する。接着系の細胞を用いる場合には、組織培養用培養器に細胞をまきなおしてから G418 選択を行う。G418 選択開始後約 2 週間で遺伝子導入細胞が得られる。細胞によって G418 に対する感受性は異なるので、あらかじめ使用する細胞に適した G418 濃度を決定しておく。

IV-3. ポリブレンを用いる場合

(1) 用意するもの

ポリブレン (8 mg/ml 水溶液)

(2) 準備

感染の前日に細胞を組織培養用シャーレに播種する。播種密度は、細胞の大きさや増殖速度によって異なるが、一般的に推奨される密度は 0.5 - 2.5 ×10⁴ cells/cm² である。血球系の浮遊細胞は一般的にポリブレン法での遺伝子導入効率が悪いので RetroNectin 法が推奨される。

(3) 感染

- ① ウイルス液に 1000 分の 1 量のポリブレンを添加し、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレンを含有するウイルス液を用意する。ウイルス液は原液を使用すると感染阻害がおこる可能性があるため、増殖培地で 3~4 倍以上に希釈したものを用いる。
- ② プレートから培地を吸引除去し、速やかにポリブレンを含有するウイルス液を 100~250 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ で加え、CO₂ インキュベーターで培養する。
- ③ 4~6 時間後、ポリブレンを希釈するため、必要に応じて増殖培地を添加する。ポリブレンへの感受性が高い細胞株の場合には新しい増殖培地と交換する。

(4) 遺伝子導入細胞の選択

pSINsi vector はマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を搭載しているため、遺伝子導

入細胞を **G418** で選択することができる。**G418** 選択は感染後 24 時間以上経過してから開始し、3～4 日ごとに **G418** 培地を交換する。**G418** 選択開始後約 2 週間で遺伝子導入細胞が得られる。細胞によって **G418** に対する感受性は異なるので、あらかじめ使用する細胞に適した **G418** 濃度を決定しておく。

実験例

rsGFP を安定に発現している NIH/3T3 細胞（マウス由来）に、rsGFP に対するヘアピン型 RNA 発現を発現するレトロウイルスベクター eco-SINsi-hH1GFP、eco-SINsi-hU6GFP、eco-SINsi-mU6GFP を $\text{MOI} = 0.01$ 以下の条件でポリブレン法によって感染し、**G418** 培地で 2 週間選択の後、GFP の蛍光強度をフローサイトメーターで測定し、GFP 傾向強度の低下を算出した（図 3）。

また、rsGFP を安定に発現している HT1080 細胞（ヒト由来）に、rsGFP に対するヘアピン型 RNA 発現を発現するレトロウイルスベクター ampho-SINsi-hH1GFP、ampho-SINsi-hU6GFP ウイルスの希釈段階を変えてポリブレン法によって感染し、**G418** 培地で 2 週間選択の後、GFP の蛍光強度をフローサイトメーターで測定し、GFP 蛍光強度の低下を算出した（図 4）。

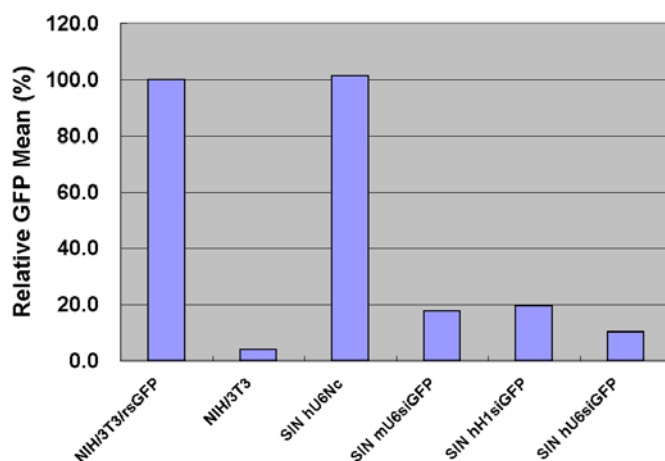


図 3.

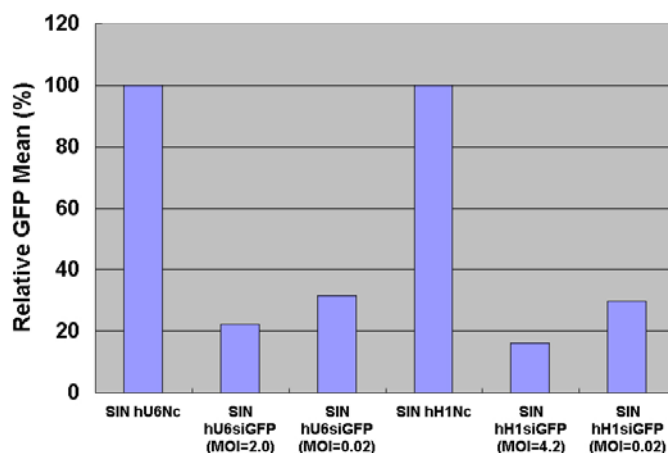


図 4.

参考文献

- (1) Yu SF, von Ruden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Ruther U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **83**, 3194-3198.
- (2) Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. (1996) *Nat. Med.* **2**, 876-882.
- (3) Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, Williams DA. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. (1997) *Hum. Gene Ther.* **8**, 2193-2206.
- (4) Pollok KE, Hanenberg H, Noblitt TW, Schroeder WL, Kato I, Emanuel D, Williams DA. High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. (1998) *J. Virol.* **72**, 4882-4892.
- (5) Chono H, Yoshioka H, Ueno M, Kato I. Removal of inhibitory substances with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34(+)CD38(-) bone marrow cells. (2001) *J. Biochem.* **130**, 331-334.
- (6) Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, 1154-1158.
- (7) Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, Taira K. Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. (2004) *J Gene Med.* **6**, 715-723.
- (8) Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P, Rossi J. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. (2002) *Nat. Biotechnol.* , **20**, 500-505.
- (9) Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. (2002) *Genes Dev.* **16**, 948-958.
- (10) Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. (2002) *Nat. Biotechnol.* **20**, 505-508.
- (11) Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 5515-5520.