

論文の内容の要旨

論文題目 Specific gene inactivation by small functional RNAs under the control of RNA polymerase III promoters in mammalian cells

(哺乳動物細胞における RNA ポリメラーゼ III プロモーターから発現される
低分子機能性 RNA を用いた特異的遺伝子発現抑制)

氏名 加藤 義雄

【序論】

2003 年 4 月にヒトゲノムの解読完了が宣言され、全遺伝子の配列情報が自由に利用できるようになったが、配列情報だけから遺伝子の機能を決定することは困難であり、遺伝子の機能を知るためには、やはりそれらの遺伝子について個々に解析していく必要がある。遺伝子の機能を調べる方法として、目的遺伝子の機能を抑制した際に見られる表現型から遺伝子の機能を見積もる、ノックダウン法が選択肢の一つとして挙げられる。当研究室では、リボザイムやアンチセンス、RNAi などの機能性 RNA を用いて、遺伝子の機能を抑制する手法の開発に取り組んできた。このような機能性 RNA は、遺伝情報を仲介する RNA をターゲットとし、塩基対に基づいた標的 mRNA への結合を介して遺伝子の機能を阻害するため、非常に特異的な遺伝子発現の抑制を行うことができる。

このような機能性 RNA を細胞に導入する際には、RNA をそのまま導入する手法と、RNA を細胞内で転写させるための DNA ベクターを細胞内へ導入する方法がある。当研究室では継続的に効果が得られるように RNA 発現ベクターを DNA の形で細胞内に導入している。このような発現ベクターを用いた機能性 RNA の細胞内での活性は、発現するプロモーターによって大きく左右される。真核生物の RNA ポリメラーゼには、RNA ポリメラーゼ I、II、III があり、各々の RNA ポリメラーゼによって認識されるプロモーターや発現される RNA の様式が異なる。中でも RNA ポリメラーゼ III (Pol III) 系プロモーターは元来、tRNA や核内低分子 RNA を発現するために使われているプロモーターであり、他のプロモーターと比較して 10 倍から 1000 倍の転写量がある。また、明確な転写開始点と転写終結配列が存在し、発現された RNA に余計な配列が付加されないため、リボザイムや siRNA 等の短い RNA を発現させるのに適した転写系である。

本研究の目的は、Pol III 系プロモーターを利用した機能性 RNA の発現系を構築し、それぞれのシステムから発現される機能性 RNA を用いた目的遺伝子の機能を特異的に阻害することである。今回構築した発現システムを用いることによって、効果的な遺伝子発現抑制を行うことが可能であり、遺伝子の機能解析のツールや、将来的な遺伝子治療へと向けたアプローチの一つとして有効な手法になると考えられる。

【核-細胞質間の局在を制御したリボザイム発現系】

リボザイムは RNA 鎖を特異的に切断することができる RNA 酵素であり、特定遺伝子の機能解析や、疾病の原因遺伝子を標的とした遺伝子治療への応用が可能であると考えられている。本研究では、細胞内でのリボザイムの活性が (1) リボザイムの切断活性、(2) リボザイムの発現量、(3) リボザイムの細胞内局在、によって左右されると考え、tRNA^{Val} プロモーターおよび U6 プロモーターによるリボザイム発現ベクターを構築し、目的遺伝子の発現抑制にどのような影響を及ぼすのかについて解析した。

各々のプロモーターから発現されるリボザイムの細胞内局在を、*in situ* ハイブリダイゼーション法や、分画ノーザンブロット法によって検出したところ、U6 プロモーターから発現されるリボザイムは核に局在し、tRNA^{Val} プロモーターから発現されるリボザイムは細胞質に局在していることが明らかとなった。U6 プロモーターから発現されるリボザイムとは異なり、tRNA^{Val} プロモーターから発現されるリボザイムは、tRNA 部分が付加された形で転写され、その tRNA 付加型リボザイムが細胞質に輸送されていると考えられる。

細胞内における種々のリボザイムによる目的遺伝子の発現抑制効果は、U6 プロモーターから発現されるリボザイムは、どのリボザイムにおいても、ほとんど活性が無かったのに対し、tRNA^{Val} プロモーターから発現されるリボザイムは一様に活性を示した (図 1)。試験管内では活性の異なる種々のリボザイムの細胞内での活性があまり変化しなかったことから、リボザイムの切断速度の差が重要な要因ではないことを示している。また、tRNA^{Val} プロモーターから発現された、細胞質局在型のリボザイムの活性が、核局在リボザイムよりも高かったことから、細胞質への輸送がリボザイムの発現系が決め手であることを明らかにした

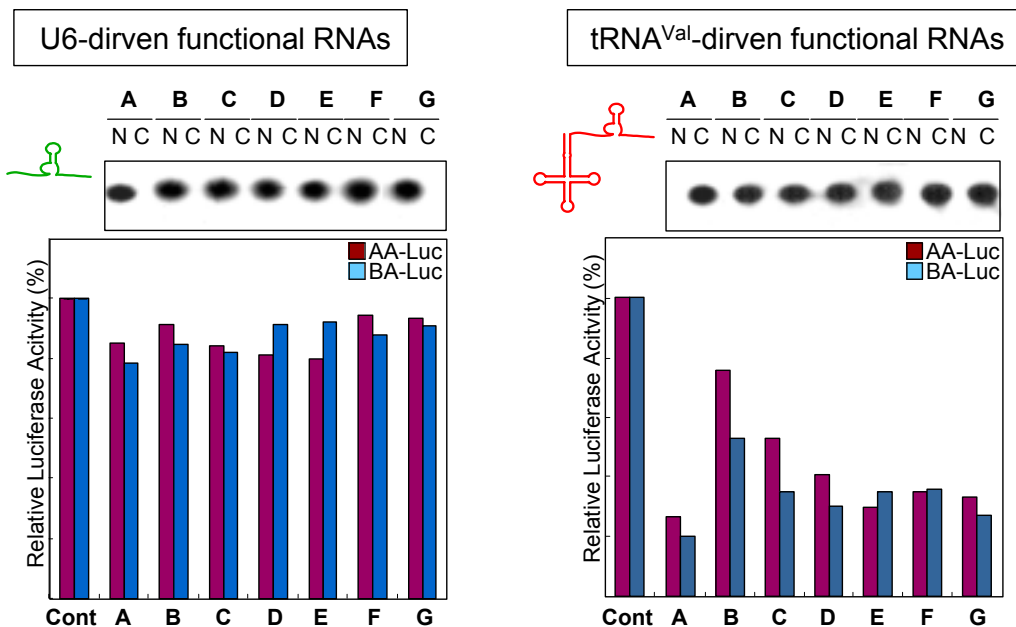


図 1. 細胞質に局在するリボザイムは、mRNA と共存するために遺伝子発現抑制効果が高い。右上のバンドはノーザンブロットによる各リボザイムの局在の確認。N; 核、C; 細胞質。棒グラフは標的遺伝子の発現を示す。Control と比較して低い値ほどリボザイム効果が高い。

【自己切断リボザイムを利用した RNAi 発現ベクターの開発】

RNA interference (RNAi)という現象は、線虫に二本鎖 RNA を導入したところ、その二本鎖 RNA に対応する mRNA の発現が抑制されたという実験によって発見された。RNAi 発見当初は、長い二本鎖 RNA を線虫やハエに導入する実験が主流だったものの、ヒトを含めた高等動物では、長い二本鎖 RNA はウィルスの防御機構によって認識され、非特異的な遺伝子発現の抑制が行われてしまう。そこで高等動物細胞では、短い二本鎖 RNA (siRNA) を導入することによって、特異的な遺伝子発現の抑制が試みられるようになった。このような短い RNA を用いて、細胞内で遺伝子発現を抑制し続けるためには、siRNA を継続的に発現するベクターを細胞内に導入する必要がある。

短い二本鎖 RNA を発現するシステムを構築するためには、(i) 短くて、(ii) 余分な配列を持たない、という siRNA の特徴を備えた RNA の発現系を設計する必要がある。上記の条件を満たす発現系を構築する戦略として、2つのアプローチが考えられる。まず1つ目に、元来細胞内で短い RNA を発現するプロモーターを用いる系である。これには、RNA ポリメラーゼ III (Pol III) プロモーターによる転写システムが該当する。

もう一つのアプローチは、余分な配列を切り落として、短い RNA を作成するという方法である。リボザイムは RNA を切断する酵素的な活性をもつ RNA であり、余分な配列を切り落とす (トリミング) のに適している。このトリミング・リボザイムによる発現系では、初期の転写産物 RNA が長い状態でも、切断することによって任意の長さの RNA を作成することができる。すなわち、短くて余分な配列を持たないという siRNA の条件を満たす RNA を細胞内で生産することができる (図 2A)。

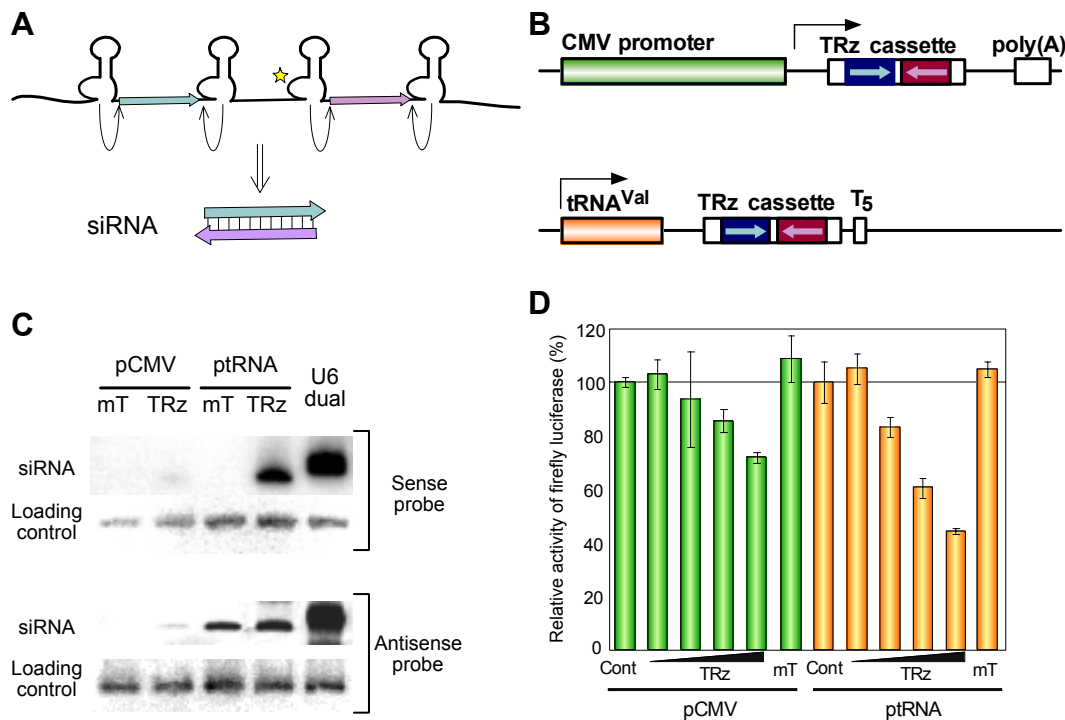


図 2. トリミング・リボザイムによる siRNA 発現系の模式図。

トリミング・リボザイムを発現するためのプロモーターとして、pol II 系と pol III 系の二つの異なる系を用意した (図 2B)。トリミング・リボザイムは、転写産物が長くても、最終的には短い RNA を生産することができるため、任意のプロモーターを用いることができる。本研究では、pol II 系として CMV プロモーター、pol III 系として tRNA プロモーターを使用した。pol II 系のプロモーターは、シグナルに誘導されて発現するプロモーターや、組織特異的に発現するプロモーターなど、その発現量を制御できる系が数多く知られている。このような、制御可能なプロモーターを用いることには、ある組織でのみ siRNA を発現させる、あるいは、ある刺激によって siRNA の発現量をオン・オフすることができる可能性がある。

4つのリボザイムのうちの1つのリボザイムの配列を、1塩基置換して不活性化した変異体を構築した (図 2A☆)。この変異体では、アンチセンス側の RNA 鎖ができず、結果として siRNA を産生しない。この変異体も pol II 系と pol III 系を構築し、合計 4 種類のベクターを構築した。

これらの構築したトリミング・リボザイムのベクターが細胞内で RNAi としての活性を有することを証明するために、(i) トリミング・リボザイムに含まれる 4つのリボザイムそれぞれが、目的の箇所で切断すること、(ii) トリミング・リボザイムのベクターを細胞内に導入した際、発現された RNA が siRNA を産生すること、および(iii) トリミング・リボザイムのベクターを細胞内に導入することによって、遺伝子特異的な発現抑制が行われることを確認した。

まずはじめに、構築したトリミング・リボザイムが期待通りに切断できるかどうかを、試験管内で確認した。リボザイムによる切断反応は生理的条件下で起こるため、転写条件においても同様に、切断反応が起きる。そのため、転写直後の RNA を電気泳動すると、リボザイムによって切断された断片がすべて検出される。この結果、トリミング・リボザイムによって 4箇所で切断が起き、21塩基の siRNA が生産されていることが確認された。

次に、細胞内における siRNA の生産をノーザンブロッティングによって確認したところ、リボザイムの一つを不活性化した変異体 (mT) では、siRNA が検出されなかったが、通常のリボザイム (TRz) では、siRNA が検出された。すなわち、pol II 系、pol III 系ともに、トリミング・リボザイムが、細胞内で効率的に切断を行うことによって siRNA が生産されることが示された (図 2C)。

最後に、トリミング・リボザイムによる遺伝子発現の抑制効果をルシフェラーゼ活性の抑制効果により評価した結果、トリミング・リボザイムのベクターが特に、pol III 系を用いた場合に、効率的にルシフェラーゼ遺伝子発現を抑制することがわかった。その効果は、ベクター量に依存적であり、これまでに報告されている siRNA の効果と一致する。一方で、変異体のトリミング・リボザイムのベクターでは抑制効果を示さなかったことから、この遺伝子発現の抑制は、トリミング・リボザイムによって産生された siRNA の効果によるものであると言える (図 2D)。本研究で開発した siRNA 発現系はこれまでに報告された発現系とは異なるアプローチによる、新規な siRNA 発現系である。

【プロモーター領域を最小化した siRNA 発現ベクターの開発】

siRNA の発現系として、Pol III 系プロモーターである U6 プロモーターや H1 プロモーターを用いた遺伝子発現抑制法が開発されている。その構成は、U6 プロモーターの下流にセンス鎖、ループ領域、アンチセンス鎖を含む DNA 配列を最小ユニットとするものである。このような DNA を細胞内に導入する際には、細胞への取り込み効率や作製コストの面で、より短いものが望ましい。

本研究では、Pol III 系プロモーターの配列を短くすることによって、導入し得る DNA の長さを短くすることを試みた。遺伝子導入という面において、プロモーター領域を短くする利点は主に二つある。一つ目は、短い DNA は細胞への取り込み効率が高いという点である。もう一つは、導入する DNA の長さが 150 塩基対以下の場合、導入する DNA を有機化学的に合成することができる点である。有機化学的な修飾を加えることによって、さらに DNA の導入効率を高めたり、DNA の生体内での安定性を高めることが可能である。

U6 プロモーター (240 bp) のうち、150 bp を欠失させたプロモーター U6(90) および、130 bp を欠失させた U6(110) を作製し、その転写効率と、siRNA の効率について解析を行った。はじめに、短くしたプロモーターに転写活性があるかどうかを、ノーザンブロットングによって確認した。構築した 4 種類の siRNA 発現ベクターによる siRNA の発現量を比較してみると、H1(100)、U6(90)、U6(110)、U6(240) の順で siRNA の発現量が高くなっていった (図 2B)。短くしたプロモーター U6(110) および U6(90) は元来の U6 プロモーター U6(240) よりもわずかに発現量が低かったものの、H1 プロモーターよりは活性が高かった。

今回作製した、短くしたプロモーターから発現させた siRNA は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制することができる。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標として、短くした U6 プロモーターによる siRNA の活性を評価した。その効果、H1(100)、Si(90)、Si(110)、U6(240) の順で高かった。これは、siRNA の発現量の相対的な順位に相当している。今回構築した siRNA 発現ベクターはこれまでに報告されているプロモーターの中でも最小の発現系であり、生体内への導入に、大きなメリットがあると考えられる。

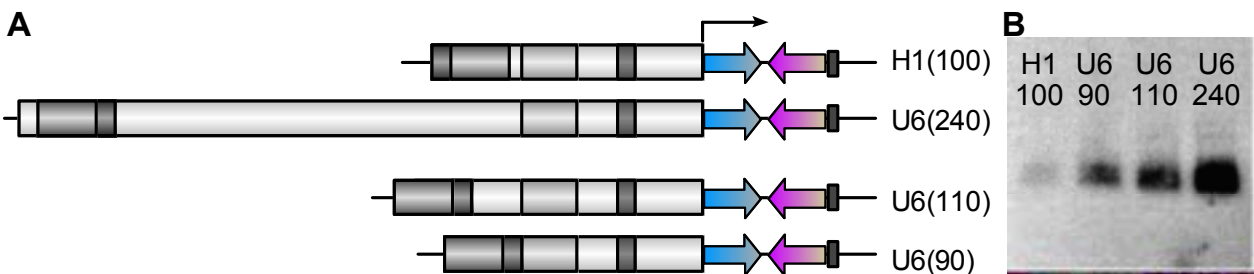


図 3. A. 以前報告されたプロモーター (上 2) および新規小型プロモーター (下 2) による siRNA 発現系。B. それぞれのプロモーターによる shRNA の発現量のノーザンブロットングによる検出。

【アデノウイルス由来の Pol III 転写 RNA ; VA RNA の機能解析】

アデノウイルスのゲノムの中には、RNA ポリメラーゼ III プロモーターから転写される 2 種類の低分子 RNA (VA I RNA、VA II RNA) がコードされており、ウイルスの感染期において高い存在量を示す。どちらの RNA も、23 塩基対程度の二本鎖領域を含む特殊な二次構造を有している (図 4A)。私は VA RNA の二本鎖領域が、翻訳阻害効果を示すマイクロ RNA の前駆体と構造的に類似していることに着目し、VA RNA が細胞内で切断を受ける可能性があると考え、VA RNA の発現パターンをノーザンブロットングによって調べた。

図 4B に示すように、VA I RNA および VA II RNA の二本鎖領域に対するプローブを用いたところ、少ない割合ながらも 21 塩基の RNA が検出された。18-25 塩基程度のマイクロ RNA は、相同的な配列を有する mRNA と相互作用し、標的 mRNA の翻訳阻害を特異的に引き起こすことが知られている。そこで、本研究で発見した VA RNA 由来の低分子 RNA と相同性のある遺伝子をコンピューターを利用したホモロジー-サーチによって検索したところ、二つの候補遺伝子が見つかった。二つの遺伝子はともに、ストレス応答に関連する遺伝子であり、VA RNA を細胞に導入すると、これらの mRNA 発現レベルは変化しないが、タンパク質の発現量が弱く減少していた。低分子 RNA がマイクロ RNA のように翻訳阻害活性を持っていることを示すにはさらなる解析が必要である。一方で、他のウイルスでは、ウイルスの防御を担う宿主のタンパク質の機能を阻害することによって、ウイルスが自らの増殖を助けている例もあり、アデノウイルスでも VA RNA を利用して、宿主のウイルス防御機構をすり抜けている可能性がある。

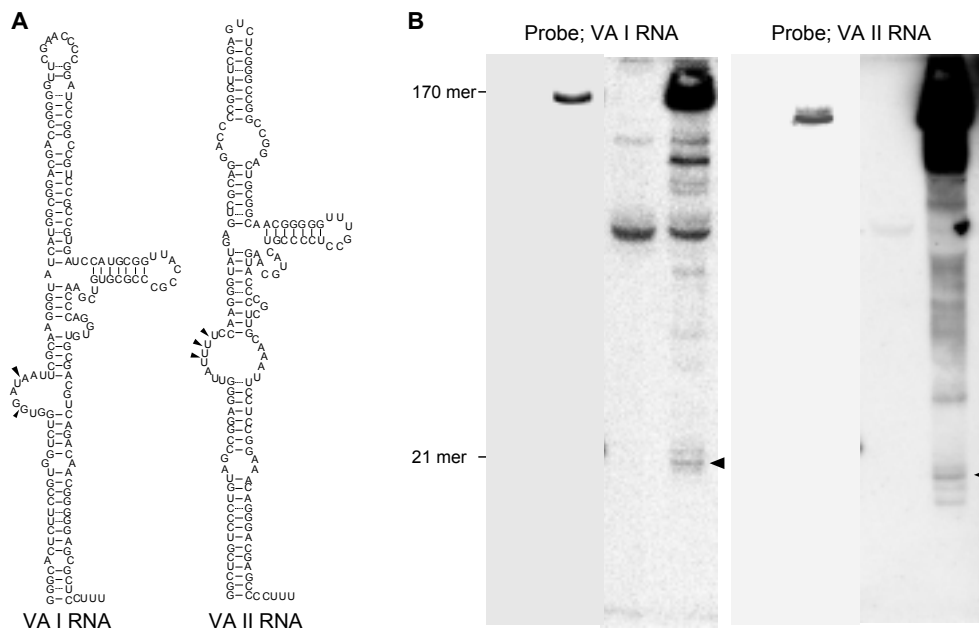


図 4. A. VA I RNA および VA II RNA の二次構造。B. ノーザンブロットングによる VA RNA 由来の低分子 RNA の検出。右側のレーンには VA RNA 発現ベクターを導入した細胞。左側のレーンにはベクター導入無し。同じメンブレン上で異なるプローブをリハイブリさせた。