

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of double-stranded RNA-induced apoptosis pathways using interferon-response noninducible small interfering RNA expression vector library.

和訳 インターフェロン応答を引き起こさない siRNA 発現ベクターライブラリーを用いた、2 本鎖 RNA によるアポトーシス経路の解析

指導教員 永井良三 教授

東京大学医学系研究科

平成 14 年 4 月 1 日入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 松本佐保姫

RNAi(RNA interference;RNA 干渉)とは、2 本鎖の RNA(double-stranded RNA: dsRNA)を細胞内に導入することで、その相補配列の mRNA が切断され、その結果遺伝子の発現が抑制されるという現象であり、1998 年に初めて線虫で報告された(Fire et al., 1998)。当初、30bp 以上の dsRNA を哺乳動物細胞に導入すると、細胞の防御機構であるインターフェロン応答によりアポトーシスが誘導されてしまうという現象が観察され、哺乳動物への応用は困難と考えられた。しかし、Tuschl らの研究により、21 塩基の small interfering RNA (siRNA)を細胞導入することにより、dsRNA によるインターフェロン応答を回避することで哺乳動物での応用が可能となり(Elbashir et al., 2001)、以来 RNAi は、簡便な遺伝子解析の方法として研究分野および医療分野での応用が注目されている。特に、RNAi による遺伝子発現抑制活性の高さと手法の簡便さから、RNAi を用いたライブラリーの作製が世界的に行われ、遺伝子の網羅的解析に対する試みが進められている。しかしながら、siRNA を合成して細胞に導入するという方法では、遺伝子抑制効果が一過性にしか働かないこと、ライブラリーのように大量に合成するにはコストがかかりすぎることなどの重大な問題があるこ

とが分かってきた。宮岸らは、細胞内で DNA から siRNA を合成する発現ベクター系を開発し、これによって、より長時間にわたる安定した遺伝子の発現抑制を可能とした(Miyagishi and Taira, 2002)。さらに、ベクター系では一度構築してしまえば、大腸菌内にトランスフォーメーションすることで無限に利用することが可能であり、低コストでのライブラリーの構築が実現した。

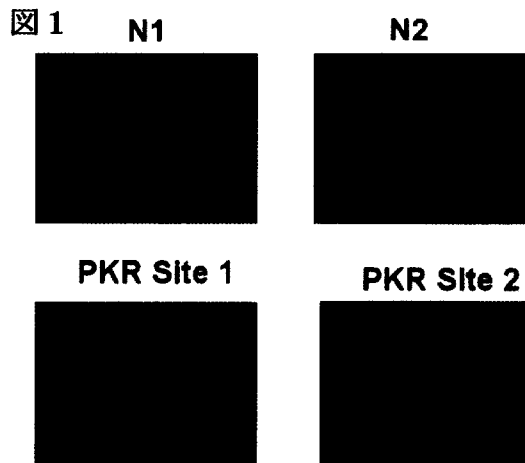
siRNA の遺伝子抑制効果は、あるサイトでは十分な抑制効果が得られても、他のサイトでは不十分であるというように、ターゲットサイト依存的である。一つ一つの遺伝子に対するライブラリーを作製する際には、十分な遺伝子抑制作用を得るために、最適なターゲットサイトを予測することが必要である。宮岸らは、独自の効果の高いターゲットサイト選択アルゴリズムの作製に成功し、又、特異性を高めるための検索システムの構築などを行うことで、遺伝子抑制作用・特異性ともに高いサイトを高効率にピックアップすることができるようになった。これにより、大規模なレベルでの質の高い siRNA ライブラリー作製が可能となった(Miyagishi et al., 2004; Miyagishi and Taira, 2003)。

しかしながら、更なる研究の積み重ねにより、当初考えられていたような siRNA によるインターフェロン応答の回避は完全ではなく、siRNA によってもある程度のインターフェロン応答が起きていることが観察されてきた(Sledz et al., 2003)。私は siRNA を直接細胞内に導入するよりも、独自に開発した発現ベクターにより、細胞内で siRNA を発現させるほうが、インターフェロン応答を起こさない事を見出した。この独自の発現ベクターライブラリーを用いて、dsRNA によるアポトーシスに関連する遺伝子を解析した。

siRNA 発現ベクターライブラリーを用いた dsRNA によるアポトーシスの経路の解析

ウイルス感染を起こした細胞がアポトーシスを起こすことはすでに知られている。これには、長い dsRNA が細胞内に入ることによって引き起こされるアポトーシスの経路が関わっているが、その経路に関してはいまだ未知の部分が多い。私は、この経路に関する遺伝子を新規に同定するために、アポトーシス関連遺伝子、キナーゼ、転写因子などのおおのこの遺伝子に対して、およそ 700 の siRNA 発現ベクターを作製し、スクリーニングを行った。

dsRNA が引き起こすアポトーシスに PKR が関与していることは、今までに報告されており、PKR に対する siRNA 発



現ベクターを、アポトーシスを抑制する陽性コントロール(PKR site1, PKR site2)として作製し、*Renilla luciferase* に対する siRNA 発現ベクターを陰性コントロール(N1,N2)として作製した。これらを細胞に導入し、その後 dsRNA でアポトーシスを誘導した。図1の顕微鏡写真に示すとおり、陰性コントロール

ではほとんどの細胞がアポトーシスを起こしているのに対し、PKR をノックダウンした細胞ではアポトーシスが抑制され生き残っていることが示された。この陽性コントロールと陰性コントロールを用いて、スクリーニングの系を立ち上げた(図2)。

HeLaS3細胞を48ウェルプレートに撒き、24時間後に siRNA 発現ベクターを1ウェルあたり1ベクターとなるようにトランスフェクションした。36時間の培養の後、1µg/mlのピューロマイシンでベクターのトランスフェクションされた細胞のみセレクションして1ウェルあたり1×10⁵細胞となるように細胞数をそろえて撒きなおした。さらに24時間培養し、FuGENE 6を用いて、dsRNA[poly(I-C)]を細胞に導入しアポトーシスを誘導した。24時間後に、4%パラホルムアルデヒドで固定し、クリスタルバイオレットで染色することで、アポトーシスを抑制したウェルだけが紫色に染色された。これらのウェルをピックアップし、その遺伝子を解析した。私は、このスクリーニング方法を確立し、これを用いて、興味深い因子の同定に成功した。

表1にあげるように、PKR, caspase 8などの現在までに知られているPKR依存的な古典的経路に加えて、cytochrome c, Apaf-1, VDAC, BAX, Bid, caspase 9などのミトコンドリア関連遺伝子, MAPK1, MAPK9, MAPK13, MAPK14, MKK,

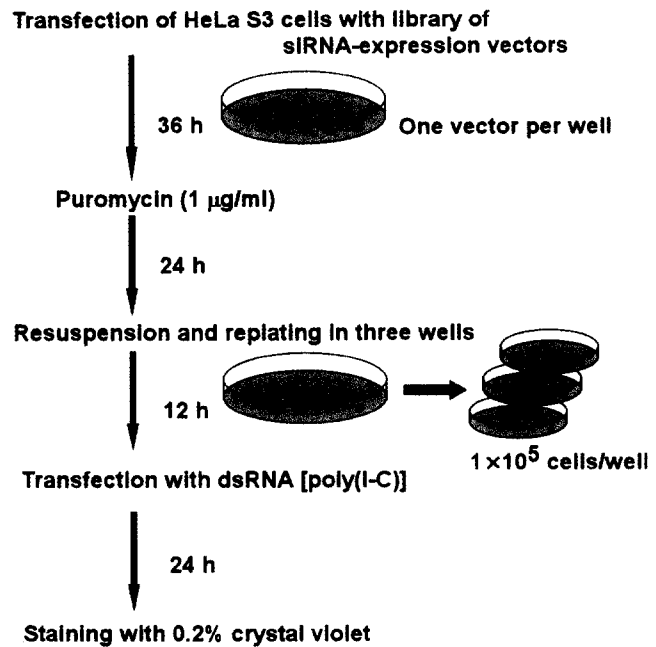


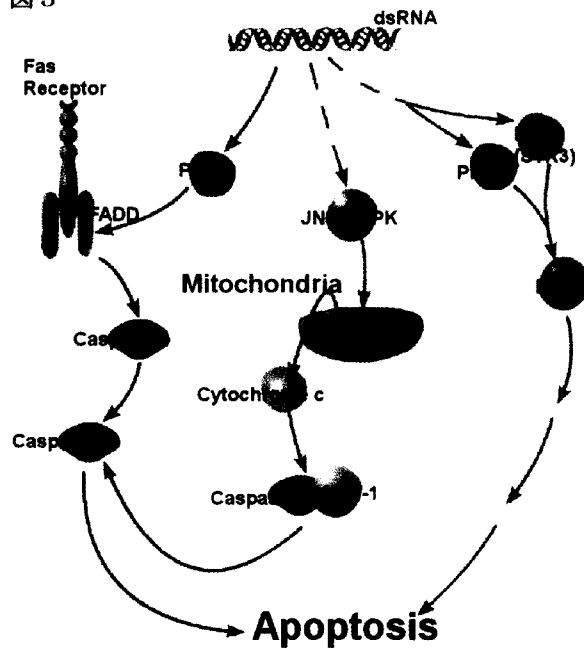
表1. Genes identified using siRNA-expression vectors that inhibited dsRNA-induced apoptosis

Group	Gene product	Accession number
Caspase family	caspase 8	NM_001228
	caspase 3	NM_004346
	caspase 9	NM_032996
	caspase 10	NM_001230
Bcl-2 family	BAX	NM_138761
	Bid	NM_001196
Kinase family	PKR	NM_002759
	MAP3K1	XM_042066
	MAP3K2	NM_006609
	MAP3K6	NM_004672
	MAP2K1	NM_002755
	MAP2K2	NM_030662
	MAP2K4	NM_003010
	MAPK1	NM_002745
	MAPK9	NM_002752
	MAPK13	NM_002754
	MAPK14	NM_139013
	STK3	NM_006281
	PKCα	NM_002737
	MLK4	NM_032435
	DAPK2	NM_014326
RIPK2	NM_003821	
RIPK3	NM_006871	
Others	CDC6	NM_001254
	DEDD	NM_004216
	VDAC	NM_003374
	Apaf-1	NM_001160
	cytochrome c	NM_018947

MEKK などの MAPK ファミリーなどをノックダウンする事でアポトーシスが抑制され、これらが dsRNA によるアポトーシスの経路に関与するものとして新たに認められた。私は、これらの新たにとれてきた因子の相互関係についても解析を行い、dsRNA によるアポトーシスを経路的に解明することに成功した。ミトコンドリアに関連する経路は、アポトーシスの経路としては広く認識されているものであるが、dsRNA によるアポトーシス経路での報告は余り認められていない。そこで、ミトコンドリアの経路の関与を確認するために、dsRNA を細胞に導入したのちに cytochrome c がミトコンドリアから放出されるかどうかを細胞質を分画してウェスタンブロッティングを行ったところ、たしかに、cytochrome c の放出が確認された。私は、ミトコンドリアの経路の上流に位置する遺伝子を同定するために、スクリーニングで取れてきた遺伝子おのをおのをノックダウンし、dsRNA によるアポトーシスを誘導したときに cytochrome c の放出を抑制する遺伝子を検索した。この実験の結果、JNK/SAPK をノックダウンすると、cytochrome c の放出が抑制され、アポトーシスが起こらなくなることを見出した。これにより dsRNA によるアポトーシスにおいて JNK/SAPK がミトコンドリアの経路の上流に位置していることが示唆された。

さらに興味深いことに、ERK2(MAPK1)という、今までは細胞の増殖あるいは生存に関与すると考えられていた因子をノックダウンすることで、アポトーシスが抑制されることを見出した。リン酸化の ERK を認識する抗体でウェスタンブロットを行ったところ、dsRNA を細胞に導入することにより、ERK2 はリン酸化を受けることが確認された。そこで、ERK2 の上流に位置する遺伝子を解析するために、スクリーニングで取れてきた遺伝子おのをおのをノックダウンし、dsRNA によるアポトーシスを誘導したときに ERK2 のリン酸化を抑制する因子を解析した。その結果、MST2 および PKC α をノックダウンした時にアポトーシスが抑制され、さらに dsRNA による ERK2 のリン酸化が抑制されることを見出した。これらより、MST2 および PKC α は、ERK2 のリン酸化を介して、dsRNA 依存的なアポトーシスに関与していることが示された。

図 3



私は今回の研究により、dsRNA のアポトーシスの経路に、今まで考えられてきた PKR 依存的な経路に加えて、JNK/SAPK を介したミトコンドリアの経路、MST2 および PKC α を介した ERK2 の経路、の少なくとも 3 つの経路が関与していることを初めて示唆することに成功した。私は、本研究を通して、アポトーシスの経路に関する新しい知見を呈示するのみならず、siRNA 発現ベクターを用いて遺伝子を網羅的に解析し、さらに、その遺伝子の相互関係についても詳細な解析を行うことが出来ることを示した。今回の研究の様な dsRNA 依存的な経路を網羅的に解析した例は初めてであり、さらに siRNA ライブラリーを用いた網羅的な解析手法がシグナルトランスダクションネットワークの解明に非常に有効であることをも示す事が出来たと考えている。

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Miyagishi, M., Matsumoto, S. and Taira, K. (2004) Generation of an shRNAi expression library against the whole human transcripts. *Virus Res*, **102**, 117-124.
- Miyagishi, M. and Taira, K. (2002) U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **20**, 497-500.
- Miyagishi, M. and Taira, K. (2003) Strategies for generation of an siRNA expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides*, **13**, 325-333.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. and Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.