

論文の内容の要旨

論文題目: 網羅的 RNAi ライブラリーの構築と遺伝子探索への応用

指導教員: 飯野正光 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

菅生厚太郎

背景と目的

哺乳動物細胞において迅速かつ簡便な遺伝子発現抑制を実現する RNA interference (RNAi) は、網羅的な遺伝子機能解析を可能とする技術として注目を浴びている。私は以前に、2 本鎖 DNA を酵素的に変換し、多様な short hairpin RNA 発現コンストラクト (shRNA コンストラクト) を作製する技術、EPRIL (enzymatic production of RNAi library) 法を開発した。単一遺伝子の cDNA を原料に EPRIL 法を適用した場合、その遺伝子由来の多様な配列を持った shRNA コンストラクトの集合体 (RNAi ライブラリー) が構築される。EPRIL 法は単一の遺伝子だけでなく、原理的には複数の遺伝子の混合物も原料とすることができる。そこで、もし細胞から調製した mRNA から合成した莫大な数の cDNA の混合物にも適用できるならば、細胞で発現している転写産物を全てカバーする RNAi ライブラリーが構築でき、網羅的な遺伝子探索への応用が可能となる。しかしながら、従来の EPRIL 法は、各ステップで用いる酵素反応系が必ずしも最適ではなかったため、複雑性の高い RNAi ライブラリーの構築法としては適していなかった。そこで本研究では、EPRIL 法を改良し、大規模な RNAi ライブラリーを構築することを試みた。さらに本研究では、細胞由来の RNAi ライブラリーの有用性を検証するため、細胞の形質を指標とした RNAi ライブラリーの選択を行うことによって、その形質を変化させる shRNA コンストラクトを RNAi ライブラリーの中から単離することが可能であるかについて調べた。

結果

1. 大規模 RNAi ライブラリーの構築

従来の EPRIL 法の各ステップを見直し、効率の良い酵素反応系とともに、回収率の高いビオチン-ストレプトアビジン磁性粒子システムを用いた精製方法を導入し、中間産物の増幅なしに大規模な RNAi ライブラリーを構築する方法—改良型 EPRIL 法を確立した。改良型 EPRIL 法の概要を図に示す。まず始めのステップでは、原料とする 2 本鎖 DNA を DNaseI で処理し、ランダムに切断する。次のステップでは、これに MmeI の認識配列を配置したアダプター 1 を結合し、MmeI で処理する。MmeI は認識配列からプラス鎖では 3' 方向に 20 (または 21) 塩基先を、マイナス鎖では 5' 方向に 18 (または 19) 塩基先を切断する。したがって、MmeI で処理することによって、原料 DNA から 20 (または 21) 塩基の配列を取得することにな

る。ステップ 3 では、この DNA 断片にヘアピン型アダプター 2 を結合する。ステップ 4 では、このヘアピン型 DNA 断片にニックング酵素である Nt.BstNBI で処理することで片鎖にニックを入れ、この部分の 3' 末端よりポリメラーゼ伸長反応を行う。ヘアピンを開きながら伸長反応が進む結果、アダプター 2 部分がスペーサーとして挿入された逆方向反復配列を有する 2 本鎖 DNA 断片が生成する。ステップ 5 では、ステップ 4 で得られた産物をストレプトアビジン磁性粒子に吸着させた後 BpmI で処理することで、アダプター 1 部分が除去された逆方向反復配列 DNA 断片を得る。ステップ 6 ではこれにアダプター 3 を結合し、ストレプトアビジン磁性粒子に吸着させた後 BbsI で処理し、4 塩基突出が付加された逆方向反復配列 DNA 断片を得る。最後のステップでは、逆方向反復配列 DNA 断片をベクタープラスミドに挿入し、スペーサー内の制限酵素で切断した後、再環状化する。

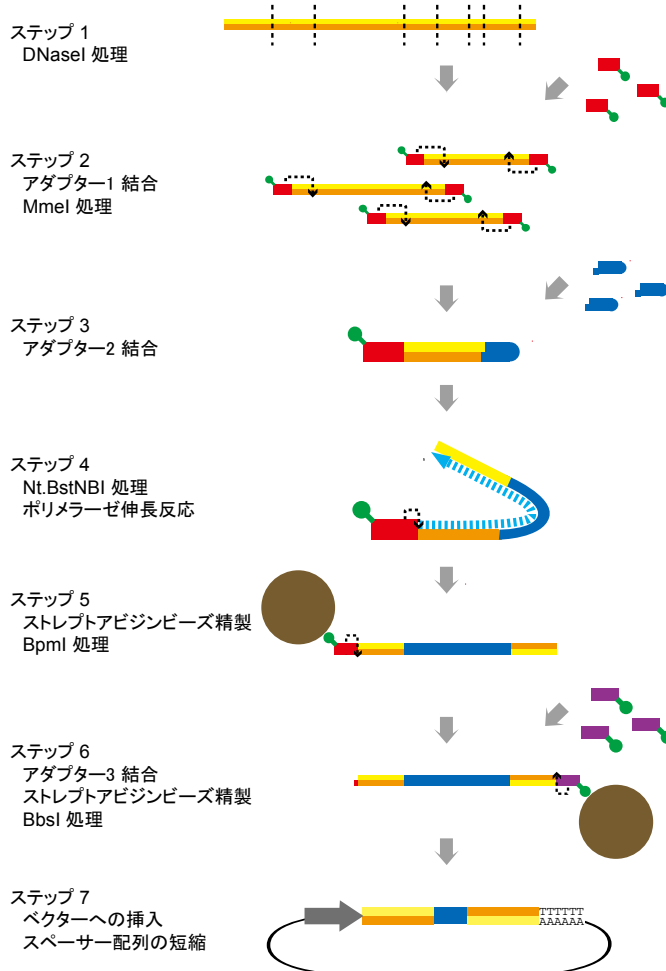


図. 改良型 EPRIL 法の概要

原料 DNA より shRNA コンストラクトが生成する模式図。黄色と橙色は原料 DNA、赤はアダプター 1、青はアダプター 2、紫はアダプター 3、緑はビオチン、茶色はストレプトアビジンビーズを示す。点線で示した矢印は制限酵素の切断様式を示す。

改良型 EPRIL 法を評価するために、ヒト T 細胞株である Jurkat T 細胞及びマウス前駆 B 細胞株である FL5.12 細胞の mRNA より合成した cDNA 混合物を原料として RNAi ライブラリーを構築した結果、それぞれ 3.5×10^6 個及び 5.4×10^6 個の独立したクローンを含む RNAi ライブラリーが構築された。また、ライブラリーを構成するクローンの配列を解析した結果、構築された RNAi ライブラリーは、様々な遺伝子を標的とする shRNA コンストラクトから構成されていることが明らかとなった。

2. RNAi ライブラリーを用いた網羅的遺伝子探索

細胞由来の RNAi ライブラリーは、細胞の形質を担う遺伝子の同定への応用が期待される。この可能性について検証するため次の 3 つの RNAi ライブラリーの選択実験を行った。

① GFP の発現を細胞の形質のモデルとして、GFP の発現を指標とした RNAi ライブラリーの選択を行った。GFP を構成的に発現する Jurkat T 細胞 (JT-GFP 細胞) より RNAi ライブラリーを構築した。これを JT-GFP 細胞に導入し、GFP 蛍光強度の低い細胞をセルソーターを用いて選択分離した。続いて、分離された細胞のゲノム DNA より shRNA コンストラクトを PCR で回収し、ライブラリーを再構築した。この選択分離と再構築を 3 回繰り返した結果、選択後のライブラリーを導入した細胞では、30% の細胞に GFP 蛍光強度の低下が認められた。また、選択後のライブラリーに含まれる shRNA コンストラクトを単離して個

別に評価した結果、GFP の発現を強く抑制する shRNA コンストラクトが得られ、これらの shRNA コンストラクトは GFP の mRNA に相同な配列を有していることが確認された。

② 細胞に内在する機能の 1 つとして、アポトーシスを指標とした RNAi ライブラリーの選択を行った。FL5.12 細胞は、IL-3 の欠乏によって速やかにアポトーシスが誘導されることが知られている。FL5.12 細胞由来の RNAi ライブラリーを構築した。これを FL5.12 細胞に導入し、IL-3 を除去してアポトーシスを誘導した。アポトーシスを免れた細胞を選択分離し、ライブラリーを再構築した。この選択分離と再構築を計 4 回行ったところ、ライブラリー導入細胞の IL-3 除去時の生細胞率の上昇が認められた。選択後のライブラリーに含まれるクローンを単離して個別に評価した結果、アポトーシス抑制効果を有するクローンが 60.4%含まれていた。さらに、配列解析の結果、単離された shRNA コンストラクトの配列が Casp2、Bbc3、Bid、Apaf1 などアポトーシスとの関与が報告されている遺伝子と一致していた。

③ 細胞内シグナル伝達経路の 1 つとして、ストア作動性カルシウム流入機構を指標とした RNAi ライブラリーの選択を行った。まず、ストア作動性カルシウム流入機構を指標とした選択を可能とするため、NFAT 依存的プロモーターの下流にジフテリア毒素の遺伝子を配置した条件依存的選択マーカーを安定的に保持する Jurkat T 細胞 (JT-NFAT-DTA 細胞) を樹立した。この細胞では、ストア作動性カルシウム流入機構によってカルシウム濃度上昇が惹起されると、NFAT の活性化によってジフテリア毒素が発現し、細胞死が引き起こされる。Jurkat T 細胞から構築した RNAi ライブラリーを JT-NFAT-DTA 細胞に導入し、ストア作動性カルシウム流入機構を活性化させた。続いて、生き残った細胞を選択分離し、RNAi ライブラリーを再構築した。この選択分離と再構築を計 4 回行ったところ、その過程でライブラリーを導入した細胞の生細胞率の上昇が認められた。次に、ライブラリーを導入した細胞にカルシウム指示薬を負荷し、ストア作動性カルシウム流入機構を活性化した際の細胞内カルシウム濃度上昇が減弱している細胞をセルソーターを用いて選択分離し、ライブラリーを再構築した。この選択分離と再構築を計 3 回行ったところ、選択後のライブラリーを導入した細胞では、40%の細胞に細胞内カルシウム濃度上昇の減弱が認められた。続いて、このライブラリーに含まれるクローンを単離して個別に評価した結果、ストア作動性カルシウム流入機構を強く抑制する shRNA コンストラクトが得られた。これらの shRNA コンストラクトについて配列解析した結果、stromal interaction molecule 1 (STIM1) に一致する shRNA コンストラクトが 6 種類見つかった。この結果より、STIM1 がストア作動性カルシウム流入機構に関与する可能性が高いと考えられたため、単離された shRNA コンストラクトによって STIM1 の mRNA 量が低下していることを定量的 RT-PCR にて確認し、さらに、この shRNA コンストラクトの標的とならないマウス STIM1 の cDNA の強制発現によってストア作動性カルシウム流入機構が回復することを確認し、STIM1 がストア作動性カルシウム流入機構において重要な役割を持つことを明らかとした。

結論

EPRIL 法の改良により、細胞の転写産物を網羅するのに十分な複雑性を持つ RNAi ライブラリーが構築可能となった。また、細胞由来の RNAi ライブラリーを特定の形質を指標として選択することにより、その形質に変化を与える shRNA コンストラクトが得られ、その配列情報から形質に関連する遺伝子の同定が可能であることが示された。