

論文の内容の要旨

ハイスループット RNAi ライブラリー構築技術の開発と

カルシウムシグナル関連遺伝子探索への応用

太向 勇

背景

RNAi は siRNA や shRNA と呼ばれる 20 bp 程度の短い 2 本差 RNA を細胞に導入することで配列特異的に遺伝子の mRNA が切断される現象である。RNAi を用いた遺伝子のノックダウンは遺伝子を簡便にノックダウンする方法として生命科学分野の研究ツールとして定着しており、ゲノムワイドな siRNA や shRNA のコレクション (ゲノムワイド RNAi ライブラリー) が構築されている。RNAi はその簡便さから RNAi スクリーンと呼ばれる網羅的な遺伝子の探索法にも応用されている。RNAi スクリーンによって様々な遺伝子の機能が明らかにされて一定の成果を上げているが、標的遺伝子の不十分なノックダウンによる偽陰性が問題になっている。RNAi のノックダウン効果は用いる siRNA や shRNA の配列に大きく依存しているが、ノックダウン効果を規定する因子については詳しく解明されておらず、ノックダウン効果の高い配列を理論的に予測することは難しい。このため、現状のゲノムワイド RNAi ライブラリーには、ノックダウン効果が低い配列も含まれてしまい、偽陰性が生じる要因となっている。ノックダウン効果の高い配列をゲノム上の全の遺伝子について作製した高機能な RNAi ライブラリーを構築することで偽陰性の問題を克服することができる。

高機能な RNAi ライブラリーの構築を実現し得る技術として、EPRIL 法と呼ばれる技術が

開発されている。EPRIL 法は標的遺伝子の cDNA を多段階の酵素反応によって処理して標的遺伝子の塩基配列に対応した数百種類の shRNA を発現するコンストラクト (shRNA コンストラクト) を同時に作製する技術である。百種類にも及ぶ配列の混合物であればその中には非常にノックダウン効果の高い配列もいくつか含まれているため、混合物の状態でも高いノックダウン効果を得られることが期待される。従って、EPRIL 法をゲノム上の全ての遺伝子に適用すれば高いノックダウン効果を有する、大規模な shRNA コンストラクトのセット (ゲノムワイド RNAi ライブラリー) が構築可能である。しかしながら、EPRIL 法は操作の煩雑性からゲノムワイド規模のような大規模な RNAi ライブラリーの構築には応用できなかった。そこで本研究では、ゲノムワイド RNAi ライブラリー構築のために、EPRIL 法をもとにハイスループットな RNAi ライブラリー構築技術 (HT-EPRIL 法) の開発を行った。さらに、2200 遺伝子について RNAi ライブラリーを構築し、カルシウムシグナルに関連する RNAi スクリーンを行い、HT-EPRIL 法の実用性を示した。

結果

HT-EPRIL 法の開発

従来の EPRIL 法は多段階の酵素反応によって構成されているが、多検体の同時操作を意図しておらず、溶液の分注操作を手動で行っており、酵素反応も 1.5ml チューブ内で行っている。また、各反応後の DNA 中間産物の精製にはフェノール・クロロホルム抽出とアクリルアミドゲル電気泳動となどの煩雑な操作を含んでおり、多検体の同時操作を行う上で技術的な障害となっている。数千遺伝子を同時に扱うために、384 ウェルプレートとラボラトリーオートメーションシステムを導入し、384 遺伝子を同時に扱うことができるようにすることで、酵素反応液などの溶液の分注の自動化及び操作の高速化が可能になり、多検体の同時処理を可能とした。また、各酵素反応後の DNA 断片の精製法の簡略化のため、シリカゲル磁性粒子体及びストレプトアビジン磁性粒子体の 2 種類の磁性粒子体を用いた精製法を採用した。いずれの磁性粒子体も磁気セパレーターを用いて溶液を簡単に交換できることから、精製操作の簡略化が可能になった。以上により、多検体の同時操作が可能な技術である HT-EPRIL 法を開発した。

HT-EPRIL 法で得られる shRNA コンストラクトは数百種類の配列を持つものが混ざった状態で得られる。数百種類にも及ぶ多種類の混合物の中には非常に高い遺伝子発現抑制効果を持つ配列が含まれることが示されていることから、HT-EPRIL 法で得られる多種類の配列が高い遺伝子発現抑制効果を示す可能性がある。この可能性を検証するために、HT-EPRIL 法で作製した shRNA コンストラクトの混合物のノックダウン効果を調べた。定量的 PCR と免疫染

色法により Jurkat T 細胞とラット培養海馬神経細胞でノックダウン効果を確認したところ、高い遺伝子発現抑制効果を有することが示された。

大規模な shRNA コンストラクトのコレクションを HT-EPRIL 法を用いて構築するために、ヒト 2,375 遺伝子、マウス 173 遺伝子、ラット 29 遺伝子の合計 2577 遺伝子を標的として HT-EPRIL 法に適用した。その結果、2,273 遺伝子の shRNA コンストラクトのコレクションを構築することに成功した。

カルシウムシグナルに関連する遺伝子の探索

HT-EPRIL 法で構築した shRNA コンストラクトのコレクションが RNAi スクリーンに応用可能であることを実証し、HT-EPRIL 法の有用性を示すために、細胞内のカルシウムシグナル伝達経路に関連する遺伝子のスクリーンを行った。このスクリーンのために細胞内カルシウム濃度依存的に活性化する転写因子である NFAT を利用した。NFAT 依存的なプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードしたレポーターコンストラクトを安定的に発現する Jurkat T 細胞を用いて、細胞内のカルシウム濃度の上昇をルシフェラーゼの発現として検出した。スクリーンを行った結果、ノックダウンするとルシフェラーゼ活性を下げる 10 遺伝子、上げる 34 遺伝子の計 44 遺伝子を候補として同定した。候補の中には、カルシウム依存的に NFAT を脱リン酸化するカルシニューリンのサブユニットの一部として知られている PPP3R1 が含まれており、本スクリーンの有効性が示された。

候補遺伝子のカルシウムシグナルへの関与を詳細に検証するために、44 遺伝子のうち PHB2、BCL7B、PPP3R1、B3GAT1 の 4 遺伝子について NFAT の核移行を蛍光イメージングにより解析した。この解析のために、NFAT に GFP を融合させたレポーターコンストラクトを安定的に保持する HeLa 細胞株を樹立し、GFP の蛍光を指標として NFAT の核内の局在を定量的に評価した。その結果、4 遺伝子とも細胞内のカルシウム上昇に伴う NFAT の核移行を調節していることが示された。

次に NFAT の核移行の変化が最も大きかった PHB2 についてノックダウンした際のストア作動性カルシウム流入 (SOCE) への影響を調べた。PHB2 を標的として作製した shRNA コンストラクトを導入した細胞では shRNA コンストラクト非導入細胞に比べて SOCE 活性が有意に低下していた。さらに、小胞体のカルシウム量についても非導入細胞に比べて有意な低下が見られた。SOCE 活性、小胞体のカルシウム量のいずれの低下についても、PHB2 をノックダウンした細胞で PHB2 を過剰発現させることで回復した。この結果より、PHB2 のノックダウンにより SOCE 活性及び小胞体のカルシウム量が低下することが明らかとなった。

PHB2 はミトコンドリア内膜に局在することが知られている。また、ミトコンドリアは膜電位依存的なカルシウムの取り込みを担うことによって、SOCE の機構を調節していることが知られている。これらの知見より、PHB2 のノックダウンによる SOCE の減弱は、ミトコンドリアへのカルシウムの取り込みが減弱したことが原因である可能性が考えられた。そこで、PHB2 をノックダウンした際のミトコンドリアのカルシウム取り込み能の検証を行った。ミトコンドリアのカルシウム取り込み能を評価するために、ミトコンドリア局在シグナルを付加したカルシウム感受性蛍光タンパク質を用いた。HeLa 細胞をカルシウム非存在下でサポニン処理により細胞膜を透過性にした後に、カルシウムを含む液に置換して蛍光強度の変化を評価した。その結果、PHB2 をノックダウンした細胞でミトコンドリアのカルシウムの取り込みが有意に低下していた。ミトコンドリアのカルシウム取り込みは電位依存的であるため、PHB2 が膜電位の形成または維持に関与しているかを検証した。その結果、PHB2 のノックダウンの有無で膜電位の変化は見られなかった。この結果より、PHB2 がミトコンドリアの膜電位を変化させず、ミトコンドリアのカルシウム取り込みを調節していることが示唆された。

結論

本研究により、多検体の同時処理が可能な shRNA コンストラクトの作製技術である HT-EPRIL 法を開発し、2,273 遺伝子の shRNA コンストラクトのコレクションを構築することに成功した。この技術は他の類似技術と比較して、構築できるコレクションのノックダウン効果、コレクション構築際のスループット及びコストに関して高い優位性を持っている。さらに、カルシウムシグナルとの関連が報告されていない遺伝子である PHB2 が同定され、HT-EPRIL 法により構築した shRNA コンストラクトのコレクションを用いて RNAi スクリーンを行うことで細胞機能に関連する未知の遺伝子を同定できることを示した。本研究結果により、ミトコンドリア内膜における様々なタンパク質の足場として重要な働きを担っている遺伝子である PHB2 が、小胞体のカルシウム量と SOCE 活性、ミトコンドリアのカルシウムの取り込みを調節していることが示唆された。今後、PHB2 を詳細に研究することで、ミトコンドリアによるカルシウムシグナルの調節機構が明らかになることが期待される。