

Tet-On Advancedシステムを用いたMicroRNAとLiving Colors蛍光タンパク質の同時誘導発現

クロンテック社、分子生物学グループ

RNA干渉 (RNAi) は、新たに発見された哺乳類遺伝子の役割と機能を決定するために必須となってきた有力かつ最先端の遺伝工学的手法です。microRNA (miRNA) を用いたRNAiの誘導は、レポーター遺伝子をmiRNAに連結することによりその発現を追跡できるという利点があります。ここでは、miRNA-Living Colors蛍光タンパク質コンストラクトをTet-On Advanced誘導発現システムに組み込み、生細胞内でのmiRNAの生成と遺伝子の阻害を同時に制御し、モニターしました。この多機能のシステムにより、最適なmiRNA発現プロフィールを示す安定細胞株の同定が容易になり、標的遺伝子の阻害を微調整することができます。また、このTet-On Advanced誘導発現システムはPol IIIによるmiRNA転写の活性化に依存するため、トランスジェニック動物における組織特異的な遺伝子阻害に使用することができます。

はじめに

RNAi技術の最近の進歩により、遺伝子の機能を迅速に調べるための遺伝子機能喪失 (loss-of-function) 法が生まれました。RNAiは遺伝子の発現を配列特異的に阻害する内在性の機構で、種々のタイプの小さなノンコーディングRNAにより行われます。

ショートヘアピンRNA (shRNA) はPol IIIによる転写で生成する小さな転写産物で、標的mRNAの配列特異的な分解の引き金となります (1-2)。microRNA (miRNA) もヘアピン型の小さなRNAでmRNAの分解を誘導しますが、翻訳過程も阻害すると考えられています (3)。miRNAの元になるDNA配列はヒト、動物、植物、およびウイルスのゲノムに広く存在し、Pol IIIにより転写されてmiRNA前駆体となります。これらのすべての阻害性RNA種はプロセッシングを受けてsiRNA (small interfering RNA) duplexとなり、それが細胞内のRNAi経路の特定のタンパク質複合体と会合し、その効果を発揮します。

Pol IIIで転写されるshRNA発現コンストラクトを標的細胞に導入することにより、RNAiを効率的に誘導することができます。しかし、Pol IIIで転写された産物は容易にタンパク質に翻訳されず、レポータータンパク質を同時発現させることによってshRNAの発現を追跡することはできません。したがって、shRNAを介する遺伝子阻害がうまくいかない場合や、レポータータンパク質が存在しない場合では、遺伝子阻害がうまくいかなかった原因が、shRNA配列が不活性であったためなのかその発現レベルが低かったためなのかを判断することは難しいと思われれます。

Tet-On Advanced SystemによるmiRNAの導入

RNAiを利用した研究を行うためにmiRNAを用いることは、いくつかの理由で魅力的です。この方法では、遺伝子阻害作用をもつRNAをshRNAの場合よりも容易に細胞内で産生させることができます。実際、Pol IIによって産生された(タンパク質をコードする)mRNAのイントロン内にmiRNAがしばしば認められます。miRNA発現の特徴を利用し、さらにTet-On Advanced Inducible Gene Expression System (製品コード 630930) を用いることにより、miRNA転写の高レベルの誘導と制御を達成することができます。また、レポータータンパク質のコード配列をmiRNAに簡便に結合させてそれらを1つの転写産物として発現させることができます。同時発現されたレポータータンパク質は、miRNAの産生を確認・追跡するのに非常に有用です。

Tet-On Advanced Systemはテトラサイクリンによって遺伝子発現を高レベルに誘導し、かつ厳密に制御できるため (4-7)、このアプローチによく適しています。特に、ある特定の遺伝子の構成的な発現抑制が細胞に有害あるいは致死的であり、それによって十分な解析ができない場合に、このようなRNAiの誘導制御は有用です。Tet-On Advanced Systemにおける基底レベルの発現は非常に低いため、好ましくない標的遺伝子の抑制を防ぐことができます。一方、発現の誘導レベルが高いため、特定の遺伝子を強力にノックダウンすることができます。プロモーターの活性化ではなく転写抑制を利用している他の誘導システムと違い、Tet-On Advanced誘導システムでは、RNAiを介した遺伝子のノックダウンを動物内で組織特異的に誘導・制御することができます。

miRNAの蛍光レポーターへの連結

このアプローチ法の有用性を実証するために、2種類の遺伝子（内在性のlamin A/C遺伝子と、遺伝子導入したルシフェラーゼ遺伝子）に対してRNAiを介したノックダウンを試みました。アンチ-lamin A/Cまたはアンチ-ルシフェラーゼ（L1）用のmiR-30様配列を含むmiRNAベースの発現コンストラクトをそれぞれ作製し、それらを蛍光タンパク質cDNA配列の5'末端に連結しました（図1）。それぞれのmiRNA配列は、G.J. Hannon研究室（Cold Spring Harbor Laboratory, NY）で公開されているオンラインmiRNA/shRNAデザインツールを用いて設計しました。これらのmiRNA配列は、22塩基のセンスおよびアンチセンス標的配列が19塩基のループ配列で連結された構造をしています（8）。miRNA融合転写産物の発現を追跡するためのレポーターとして、2種類のLiving Colors蛍光タンパク質（DsRed2またはAcGFP1）を用いました。これらのコンストラクトからRNA前駆体が生成し、このRNA前駆体が細胞内の装置によってプロセッシングされて活性型のmiRNAになります。一部のRNA前駆体はインタクトな状態で残り、蛍光タンパク質をコードする成熟mRNAとなります。

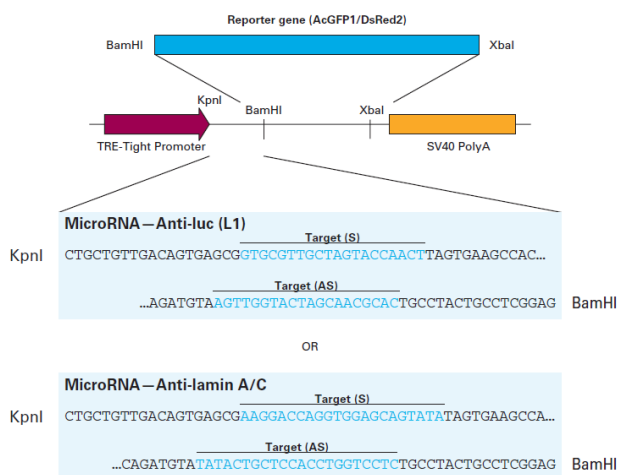


図1. アンチ-lamin A/Cおよびアンチ-ルシフェラーゼ（L1）miRNA発現カセットの構成

miR-30 miRNA（8）をベースにしたアンチ-ルシフェラーゼ（L1）およびアンチ-lamin A/C miRNA配列をpTRE-Tight発現プラスミド内のAcGFP1またはDsRed2 cDNAに連結した。センス（S）およびアンチセンス（AS）標的配列は19塩基のループ配列によって連結されている。転写産物はプロセッシングされて、活性型のmiRNA、または蛍光タンパク質をコードする成熟mRNAになる。

Tet-On AdvancedシステムのTRE-Tightプロモーターの使用により、miRNA融合転写産物の発現がTet-On Advanced reverse transactivatorにより制御可能になります。構築したpTRE-Tightプラスミドを安定なHEK 293 Tet-On Advanced Cell Line（製品コード 630931）にトランスフェクトすることにより、あるいはpTet-On-Advanced発現プラスミドとともにHeLa細胞にコトランスフェクトして安定細胞株を調製することにより、RNAiを介した標的遺伝子のノックダウンと蛍光タンパク質の発現をドキシサイクリン（Dox：テトラサイクリン誘導体）により同時に誘導できるようになりました。

HeLa細胞における内在性laminの発現阻害

HeLa細胞における内在性laminの発現を抑制するためにアンチ-lamin-DsRed2およびアンチ-lamin-AcGFP1コンストラクトを用いました。Tet-On Advancedシステム下で制御発現されるアンチ-lamin miRNAコンストラクトを含む安定HeLa細胞株を調製しました。トランスフェクトされたHeLa細胞をDox存在下で培養するとlaminタンパク質の量が著しく減少することがウェスタンブロットにより検出されました（図2）。

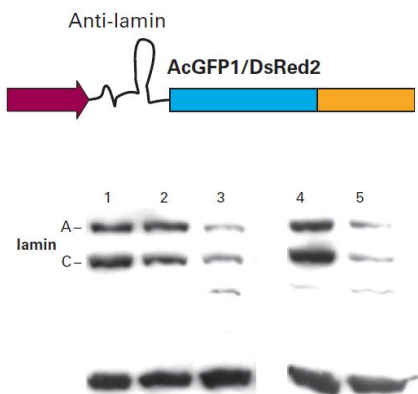


図2. HeLa細胞におけるlamin A/C遺伝子のドキシサイクリン誘導性の抑制

Tet-On Advanced transactivatorとpTRE-Tight-lamin A/C-AcGFP1またはpTRE-Tight-lamin A/C-DsRed2コンストラクトを誘導発現する安定なHeLa細胞株を作製した。この細胞をDoxの存在下または非存在下で培養し、72時間後にウェスタンブロット分析によりアッセイした。レーン1：親細胞。レーン2：Dox非存在下で培養したアンチ-lamin A/C-AcGFP1導入細胞。レーン3：Dox（1 μg/ml）存在下で培養したアンチ-lamin A/C-AcGFP1導入細胞。レーン4：Dox非存在下で培養したアンチ-lamin A/C-DsRed2導入細胞。レーン5：Dox（1 μg/ml）存在下で培養したアンチ-lamin A/C-DsRed2導入細胞。

それとは対照的に、トランスフェクトしていないHeLa細胞（親細胞）と、トランスフェクトされたHeLa細胞をDoxの非存在下で培養した場合は、比較的正常レベルのlaminが産生されました。また、Doxで処理した結果として、それぞれ高レベルの蛍光タンパク質が生細胞内で検出されました（図3）。これらの結果は、蛍光タンパク質転写ユニットと関連して発現したmiRNAは効力があり、内在性の標的遺伝子の特異的なインヒビターとなることができ、またレポータータンパク質の検出に十分な量のmRNAがインタクトな状態で残ったことを示唆しています。

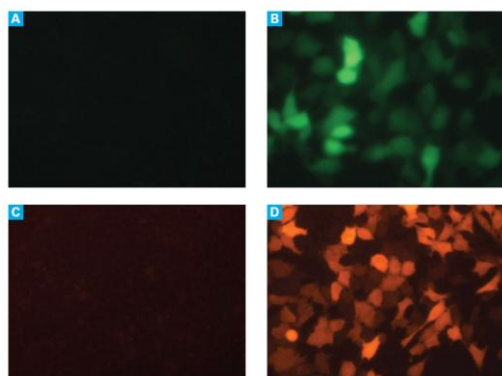


図3. アンチ-lamin A/C-蛍光レポーターコンストラクトを導入したHeLa細胞株におけるドキシサイクリン (Dox) による蛍光の誘導

図2で述べたように調製、処理したHeLa細胞株を蛍光顕微鏡で観察した。**パネルA.** Dox非存在下で培養したアンチ-lamin A/C-AcGFP1導入細胞。**パネルB.** Dox (1 μg/ml) 存在下で培養したアンチ-lamin A/C-AcGFP1導入細胞。**パネルC.** Dox非存在下で培養したアンチ-lamin A/C-DsRed2導入細胞。**パネルD.** Dox (1 μg/ml) 存在下で培養したアンチ-lamin A/C-DsRed2導入細胞。ドキシサイクリンで蛍光が誘導された細胞は、lamin A/C遺伝子のノックダウンも示した。

導入したルシフェラーゼ遺伝子の抑制

ルシフェラーゼ遺伝子の導入と誘導抑制の宿主としてHEK 293 Tet-On Advanced Cell Lineを用いました。この細胞株にpTRE-Tight-L1-DsRed2とルシフェラーゼ発現プラスミド (pCMVLuc) を一過性にコトランスフェクトし、Doxの存在下または非存在下で細胞を72時間培養しました。ルシフェラーゼ発現アッセイを行ったところ、Doxで処理した細胞ではL1 miRNAの誘導発現によってルシフェラーゼ活性が未処理の細胞に比べて85%減少しました（図4）。また、Doxで処理した細胞でのみ強いDsRed2の蛍光が検出され、蛍光の発現と効果的なルシフェラーゼ遺伝子のノックダウンが一致して起こることが認められました（図5）。

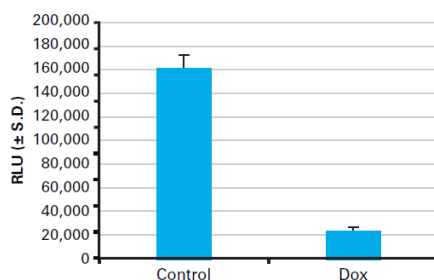


図4. アンチ-Luc-DsRed2レポーターとルシフェラーゼ遺伝子が導入されたHEK293細胞のルシフェラーゼ活性はドキシサイクリン (Dox) 処理によって減少する

Tet-On Advanced調節ベクターで安定に形質転換されたHEK293細胞株にpCMV-LucとpTRE-Tight-L1-DsRed2を1:2の比率で一過性に3連 (n=3) でコトランスフェクトし、次にDox (1 μg/ml) の存在下または非存在下で細胞を72時間培養した。Dox処理で誘導されたL1 miRNAにより、ルシフェラーゼ活性が85%減少した。S.D.=標準偏差。

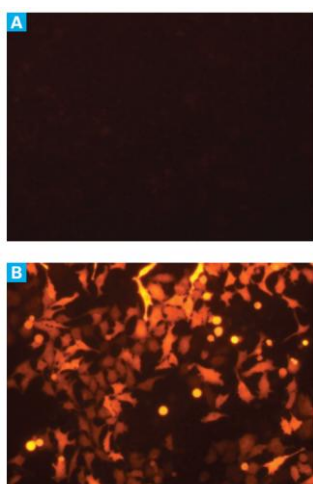


図5. アンチ-Luc-DsRed2レポーターを発現するHEK293細胞の（ドキシサイクリンの存在下または非存在下における）蛍光観察

パネルA. Doxの非存在下ではアンチ-Luc-DsRed2レポーターは蛍光顕微鏡で観察できなかった。**パネルB.** Dox (1 μg/ml) の存在下で、アンチ-Luc-DsRed2レポーターの発現は高レベルに達した。

結語

以上の実験により、miRNAで誘導される標的遺伝子のノックダウンの制御にTet-On Advanced Systemの使用が有用であること、およびノックダウンの進行をモニターするために蛍光タンパク質の同時発現が有用であることが実証されました。この意味で、機能アッセイ（標的タンパク質の量の減少の測定）でmiRNA活性を測定する代わりに細胞の蛍光を測定することで安定細胞株の一次スクリーニングを行うことができます。この多機能なコンストラクトはTet-On Advanced Systemに容易に組み込むことができ、遺伝子ノックダウンを正確に制御誘導することができます。内在性遺伝子の研究の場合では、長期にわたるRNAi実験を行うために、このようなコンストラクトの宿主として現在いくつかのTet System細胞株をご利用いただくことができます。

参考文献

1. Paddison, P., *et al.* (2002) *Genes & Devel.* **16** (8):948–958.
2. Du, T. & Zamore, P. (2005) *Development* **132**(21):4645–4652.
3. Bartel, D. (2004) *Cell* **116**(2):281–297.
4. Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(12):5547–5551.
5. Gossen, M., *et al.* (1995) *Science* **268**(5218):1766–1769.
6. Urlinger, S., *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(14):7963–7968.
7. Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System (July 2006) *Clontechiques* **XXI**(2):1–3.
8. Hannon Lab Website; <http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNA/RNAi.cgi?type=shRNA>.
9. Cai, X. *et al.* (2004) *RNA* **10**(12):1957–1966.

製品ガイド

- ▶ Tet-On[®] Advanced & Tet-Off[®] Advanced テトラサイクリン発現誘導システム
- ▶ Tet-Advanced 細胞株
- ▶ pTRE-Tight ベクター