

培養細胞系における RNA interference の解析

内藤 雄樹 指導教官 西郷 薫

目 的

RNA interference (RNAi) とは、二本鎖RNAを細胞に導入することによって、その二本鎖RNAと相同な配列をもつ遺伝子の発現が特異的に抑えられる現象である。この現象を利用すれば、ヒト、ショウジョウバエ、線虫など数多くの真核生物で任意の遺伝子を簡単にノックアウトできることから、RNAiは遺伝子の機能をさぐる手法のひとつとして大きな注目を集めている。しかしながら、その分子レベルでのメカニズムはまだ不明な点が多い。

本研究は、培養細胞系を用いた網羅的探索により、RNAiに関わる新規因子を発見し、RNAiのメカニズムを明らかにしようとするものである。

実験方法および実験結果

本研究では、ショウジョウバエ由来の培養細胞 (S2 細胞) を用いて実験を行った。

三菱生命研の上田龍博士との共同研究により、ショウジョウバエの個体レベルでは、染色体の66A-66C領域が欠失した系統が野生型と比較してRNAi活性が弱いことが見いだされている。その欠失領域にRNAiに関わる因子が存在する可能性が高いと考えられるので、その領域に位置する69個の遺伝子すべてを対象に培養細胞系でスクリーニングを行った。

まず、対象の遺伝子をS2細胞由来のcDNAから増幅し、両末端に付加したT7プロモーター配列を用いて *in vitro* RNA合成を行った (Fig. 1)。合成したRNAは相補鎖どうしが自動的にアニーリングして二本鎖となる。これを培養細胞に導入することにより対象の遺伝子をノックアウトし、2日後にRNAi活性が残っているか検証した。

培養細胞におけるRNAi活性の評価はluciferase assayで行った。すなわち、luciferaseを標的にした二本鎖RNAを産生する細胞株 (Fig. 2) に luciferase 発現ベクターを導入し、その二本鎖RNAによるRNAi効果を luciferase 発現量の減少という形で光学的に測定した。

現時点までのスクリーニングで、RNAiに関与している可能性がある遺伝子の候補が3つ得られ、それらが真にRNAiに関与しているか解析中である。

展 望

得られた候補遺伝子がRNAiに関与していることが明らかになったら、その具体的な機能について解析を進める。また、個体レベルの研究でRNAi活性を増強する欠失系統も見いだされているので、その領域についても培養細胞系でスクリーニングを行う予定である。

一方で、ゲノムデータベースよりRNAとの相互作用が推定されている遺伝子約400種類を選定し、上記の方法で網羅的にスクリーニングを始めている。

