

RNAi実験を始めるにあたって

(1) RNAi実験に必要な道具

(2) siRNA形態の決定と配列デザイン

- i) RNAi効果を誘導するsiRNA形態の決定
- ii) siRNA配列デザインサービス
- iii) 合成siRNAの入手
- iv) sh/siRNA発現ベクターの構築
- v) ポジティブ・ネガティブコントロールの選択

(3)細胞への導入

- i) トランスフェクション方法の決定
- ii) トランスフェクション条件の検討
- iv) 実験条件の最適化

(4) RNAi効果を確認する方法の選択

- i) mRNAレベルの変化を調べる
- ii) タンパク質レベルの変化を調べる

(5) RNAi実験を行う際の注意点

(1) RNAi実験に必要な道具

- 大きくわけてふたつの試薬、設備および機器を準備します。
 - siRNAを細胞に導入しRNAi効果を誘導するため
 - RNAi効果の検出するため

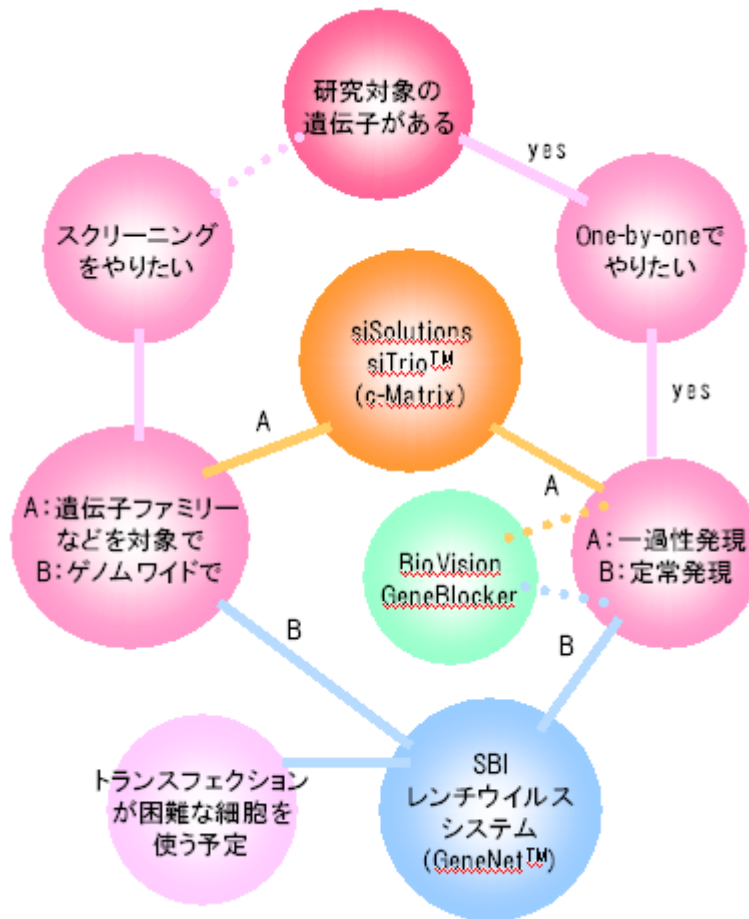
- 必要な機器・試薬等
 - 細胞培養設備 — CO₂ インキュベーターとクリーンベンチ
 - siRNAとして用いる材料 — 合成siRNA、sh/siRNAベクター
 - siRNAの導入に必要な試薬・機器 — トランスフェクション試薬、エレクトロポレーター、ウイルスベクター
 - RNAi効果の確認に必要な試薬・機器 — リアルタイムPCR、レポーターベクター、ルミノメーター、蛍光顕微鏡、蛍光光度計、Northern Blotting用器具と定量化システム

(2) siRNA効果の誘導

● RNAi効果を誘導するsiRNA形態の決定

研究対象となる細胞や遺伝子の特徴ならびに研究目的に応じ、合成siRNAを用いるかsh/siRNA発現ベクターを用いるのかを決定します。

※哺乳類を対象としたRNAi実験を始める場合には、培養細胞を用いて、①使用するsiRNAがRNAi効果を誘導できるか/ターゲット配列が有効な配列であるかどうか、②対象とする遺伝子が容易にノックダウンできる遺伝子であるか、を確かめるのが一般的です。



➤ 合成siRNAを用いる

一過性の反応となります。

➤ ベクターを用いる

基本的に一過性の反応となりますが、stable株も樹立可能です。ウイルス粒子を利用する場合はゲノムにintegrateされますので、stable株が構築できます。次の3点を主に考慮します。

- ① プロモーター: pol II系または pol III系
- ② ベクター骨格: プラスミドベクターまたはウイルスベクター

③ RNA 発現方法: siRNA 発現系または shRNA 発現系

※特に、初代培養細胞や非分裂細胞など、トランスフェクションの困難な細胞を利用する場合は、レンチウイルスベクターの利用をご検討ください。

● siRNA 配列デザイン

RNAi メカニズムをよく理解した上で、ノックダウン効果が高く、かつ配列特異的のオフターゲット効果を回避できるような siRNA 配列をデザインする必要があります。フリーランスのデザインツールも種々あります。B-Bridge では、目的にあわせて種々のデザインサービスを行っています。

➤ 合成 siRNA を用いる場合

❖ [siTrio](#)

B-Bridge の siRNA 配列デザインアルゴリズム (B-Algo™) により、3 種類の siRNA 配列が既に選択されており、ノックダウンをより確実にします。75% のノックダウン保証付き^{注)}商品です。配列特異的 off-target を回避するデザインを行います。

(注) 100nM の siRNA を細胞に導入し、コントロールにより導入が確認された細胞で 24 時間後に対象とする mRNA レベルを 25% 以下にまで抑制する。

❖ [配列解析サービス \(siRNA 配列解析サービス\)](#)

SNPs やプライミングバリエーション、他の遺伝子との交差性を詳細に考慮し、配列特異的 off-target 効果を最小限に抑えるデザインを行います。また、他種間共通の siRNA 配列デザインが可能です。mRNA レベルで、実績平均 80% 以上のノックダウン効率です。

➤ ベクターを用いる場合

❖ [配列解析サービス \(shRNA 配列・ベクター最適化\)](#)

※ siRNA としてよい配列であっても、ベクター用としてよい配列であるとは限りません。これは、細胞内で発現ベクターから siRNA が産生される過程には様々な因子が関与しているためです。後々ベクターを用いて実験する計画がある場合には最初からこの点を念頭において、ベクターにも使用できる配列を使用するのがよいでしょう。

※ shRNA 配列デザインを行うと同時に対応する siRNA を合成し、*in vitro* で siRNA の機能を先にバリデーションする方法も有効です。

● 合成 siRNA の入手方法

siRNA は、3' 末端に 2 塩基のオーバーハングを持つ 21 ~ 23 塩基の 2 本鎖 RNA です。アニーリング処理された ready-to-use の siRNA を購入する場合は一般的です。

➤ アニーリング済み 2 本鎖の siRNA を購入する場合

- ❖ siRNA配列指定: 通常、ターゲット遺伝子配列を指定します。
 - ❖ 塩基数の指定: 21~27塩基が一般的。
 - ❖ オーバーハングの指定: RNAオリゴまたはRNA-DNAのキメラオリゴから選択。
 - ❖ センス鎖とアンチセンス鎖間でミスマッチがある場合は、ポジションを明記。
 - ❖ 通常は、アニーリングバッファーが含まれています。不要な場合は明記。
- ※ siTriolは、アニーリング済み、21塩基(19nt+dTdTのoverhang)です。
- ※ 2塩基のオーバーハングには、多くの場合チミン(TT)やウラシル(UU)が使用されます。もちろん、その他のオーバーハングを使用した場合でも、RNAi 効果に大きな影響を与えるという報告はありません。しかし、siRNA 末端を平滑にする、5'末端のみをオーバーハングする、オーバーハングの長さを変えるなどを行うと RNAi 効果に影響を与える場合があります。
- Elbashir et al., EMBO J, 20:6877-6888.

siRNA のオーダー例:

ターゲット遺伝子配列:	CGGAAGATGAAGAGGAAGA
センス配列:	CGGAAGAUGAAGAGGAAGATT
アンチセンスセンス配列:	UCUUCUCUCUCAUCUUCCTT

➤ 1本鎖RNAを購入する場合

1本鎖のRNAを購入し、自分でアニーリングすることもできます。

- ❖ RNAオリゴまたはRNA-DNAのキメラオリゴから選択
- ❖ 通常、RNAは糖鎖の2'に保護基が付いた状態で合成されるため脱保護が必要

※当初、RNAi 効果の高い siRNA 配列とは「ターゲット遺伝子の AA から始まる 19 塩基に相補する配列である」と紹介されました(1,2,3)。そのため、多くの研究者が AA から始まる 19 塩基を siRNA のターゲット配列として使用し、文献上では AA+19 塩基と記載されています。この文献情報をもとに、「AA+19 塩基+2 塩基のオーバーハング(合計 23 塩基)」の 2 本鎖 siRNA を合成すると、文献で紹介された配列とは異なる配列となってしまうので注意が必要です。

- 1) *Nature*, 411, 494-498, 2001
- 2) *EMBO J.*, 20, 6877-6888, 2001
- 3) *Genes Dev.*, 15,188-200, 2001

● sh/siRNA 発現ベクターの構築

sh/siRNA 配列および使用する発現ベクターが決定したら、次にサブクロニングサイトを決定します。一般に、pol III 系のプロモーターは転写開始がポジショニングや塩基配列(プリン塩基)に依存するといわれ、注意が必要です。

➤ 挿入配列のデザイン

下記のように、末端に制限酵素サイトをもたせた挿入配列をデザインするのが一般的です。



➤ DNA オリゴの入手

下記のような、2本のDNAオリゴを入手します。



アニーリングした後、ベクターのプロモーター下流にライゲーションします。サブクローニング後は、sequencingにより配列確認を行います。

● ポジティブ・ネガティブコントロールの選択

RNAi実験を行う際は、[ネガティブコントロールsiRNA](#)と[ポジティブコントロールsiRNA](#)での実験を並行して行います。ネガティブコントロールは実験に使用する種のすべての遺伝子配列と一致しないもの(すなわちRNAi効果のないもの)、ポジティブコントロールはあるターゲット遺伝子に対して優れたRNAi効果を示すことが既実証されているものを用います。なお、DNAプラスミドと合成siRNAのトランスフェクション至適条件は異なるので、合成siRNA用に最適化することが必要です。

(3) 細胞への導入

● トランスフェクション方法の決定

合成siRNAまたはsh/siRNA発現ベクターのいずれを用いてRNAi実験をする場合にも、細胞内に導入する必要があります。用いたい細胞系の培養設備が整っていれば、あとはトランスフェクションの系を確立すればよいことになります。

➢ 合成siRNAおよびプラスミドベクターを用いる場合

一般的には一過性の反応となります。そのため、出来る限り高いトランスフェクション効率での実験が望ましく、用いる細胞のトランスフェクション効率、細胞毒性などの性質によって、どのトランスフェクション試薬を用いるか、あるいはエレクトロポレーションを行うかを決めます。

➢ B-Bridgeでは、種々のトランスフェクション試薬をご用意しています。

❖ [SureFECTOR/UniFECTOR](#)

❖ [siFECTOR](#)

❖ [QuickStep Transfection kit](#)

● トランスフェクション条件の検討

➢ トランスフェクション試薬を用いる場合

- ① 6-well plate に、24 時間後に 50-70% confluent になるよう細胞を播種する。
- ② ポジティブコントロール siRNA(100 μ M ストックを 1 μ L)を MEM(血清無添加)に加えて 100 μ L とする。GFP などのレポーターベクターがある場合は、co-transfection してもよいでしょう。
- ③ 種々のトランスフェクション試薬濃度の溶液を調製する。
 - a: トランスフェクション試薬1 μ Lと培地(血清無添加)を加えて100 μ Lとする。
 - b: トランスフェクション試薬 2 μ L と培地(血清無添加)を加えて 100 μ L とする。...など
- ④ step③で調製したトランスフェクション試薬溶液に、step②の siRNA 溶液を各 100uL ずつ添加し、混和し、室温で 15 分程度放置する。
- ⑤ 細胞を培地で洗浄後、培地(血清無添加)を 0.8mL 添加する。
- ⑥ step④で調製した siRNA-トランスフェクション試薬複合体を、それぞれの dish に滴下する。
- ⑦ 数時間培養する。
- ⑧ 通常使用している倍量の血清と抗生物質を含む MEM を 1mL 添加して、24~48 時間培養する。

実際には、トランスフェクション試薬や siRNA 導入による問題が生じないか確認するため、siRNA 存在下、非存在下の両方で検討するとよいでしょう。細胞毒性が低く、かつノックダウン効果の高い条件を選択します。

トランスフェクション試薬 1 μ L siRNAなし	トランスフェクション試薬 1 μ L ネガティブコントロールsiRNA	トランスフェクション試薬 1 μ L ポジティブコントロールsiRNA
トランスフェクション試薬 2 μ L siRNAなし	トランスフェクション試薬 2 μ L ネガティブコントロールsiRNA	トランスフェクション試薬 2 μ L ポジティブコントロールsiRNA

● 実験条件の最適化

ノックダウン効果を改善する場合、種々のポイントを検討する必要があります。

➤ 使用する細胞数

➤ 培地(血清の添加・無添加など)

➤ 至適 siRNA 導入量の選択

高濃度の siRNA を導入したからといって高いノックダウン効果が得られるとは限りません。高濃度の siRNA を導入することにより、RISC の飽和やインターフェロン応答などが生じて、細胞毒性を生じたり、目的としない遺伝子の活性化・不活化を誘導したりすることが報告されています。一般に、siRNA 濃度が 100nM を超えないよう、なるべく低濃度で使用します。

➤ 培養時間の最適化

siRNAをトランスフェクションしてから24~48時間後にターゲット遺伝子のmRNAレベルを確認する場合があります。しかし、mRNAの寿命の長い遺伝子ではノックダウン効果の検出が難しくなります。初期実験では経時的にmRNAレベルを測定するなど、培養時間の最適化を行います

➤ RNAi 効果の確認方法

後述しますが、qPCR プライマーのデザインには注意が必要です。また、タンパク質レベルでノックダウンが確認できなかった場合は、必ず mRNA レベルで確認します。

(4) RNAi効果を確認する方法の選択

- RNAi効果の確認

RNAiはmRNAの切断がそのメカニズムであることから、通常、mRNA発現レベルの変化でノックダウン効率を測定します。また、RNAi効果でタンパク質レベルも低下すると期待されることからタンパク質の発現レベル変化をみることもあります。

- mRNAレベルの変化を調べる

- mRNAレベルを直接測定する方法: qPCR(リアルタイムPCR)、Northern Blotting

qPCRはmRNAを定量できる方法として広く用いられています。専用の機器とqPCR用試薬を用いるのは一般にmRNAを定量する際と同じです。しかし、RNAi実験の場合は特別な考慮が必要で、通常はmRNA発現を検出できているプライマーにもかかわらず、RNAi効果は正確に検出できない場合があります。そのため、[RNAi実験用にデザインしたプライマーセット](#)を使用することがあります。

- 間接的に測定する方法: レポーターアッセイ

より簡便にRNAi効果を確認する方法としてレポーターアッセイがあります。レポーター遺伝子とターゲット遺伝子の配列のキメラ分子を発現するベクターを利用するもので、ルシフェラーゼやGFP(green fluorescent protein)などがよく用いられます。すなわち、mRNAがターゲット配列部分で切断されることによってレポーター遺伝子mRNAも分解されることを利用するものです。

- タンパク質レベルの変化を調べる

多くの研究者は、目的とするタンパク質の発現レベルを低下させることを目的としてRNAi実験をおこなうため、Western Blottingによりターゲット遺伝子のタンパク発現レベルを検出する場合も多くみられます。しかし、たとえmRNAレベルが低下しても、タンパク質レベルには変化が見られないというケースもあるため、あくまでも間接的な検出方法であることを理解しておく必要があります。タンパク質への影響のみからみてノックダウンが確認されない場合、用いたsiRNAにRNAi効果がないのか、mRNAはノックダウンされているにもかかわらずタンパク質には影響がみられないのか、はっきりしません。遺伝子によっては、mRNAがノックダウンできても、何らかの理由(ターンオーバーが遅いなど)でタンパク質のレベルは変化しにくい場合があります。

(5) その他、RNAi実験を行う際の注意点

● ターゲット遺伝子の選択

- ターゲット遺伝子の発現量確認
- mRNA やタンパク質のターンオーバーの情報を可能な限り入手

ターゲット遺伝子がほとんど発現していない環境下ではRNAi誘導実験そのものが成立しません。使用する細胞や、遺伝子自身の日周期性などによるmRNA発現レベルを理解しておくことが大切です。また、mRNAの寿命や代謝回転の情報があれば、実験条件設定の際に役立ちます。

● 使用する培養細胞種の決定

研究目的に則した細胞での実験計画を思い浮かべるかもしれませんが、細胞種によってはsiRNAの導入が困難なものや、RNAiメカニズムの中核をなすDicerやRISCの細胞内レベルが異なったり、インターフェロン応答活性化が生じやすかったりします。一方で、特に一過性のノックダウン実験を行う場合は、siRNAを効率よく細胞にトランスフェクションする必要があります。まずは扱いやすい細胞を用いてsiRNAのノックダウン効果を確認しておくといでしょう。

● 複数種類のsiRNAを試す

1種類のsiRNAでは期待した効果が得られないことがあるため、1つのターゲット遺伝子に対して複数種のsiRNAを用いてノックダウン実験を行うことが大切です。また、3種類の[siRNAのカクテル](#)を利用することで、ノックダウン効果がより確実になることも知られています。一方で、ノックダウン効果があるsiRNAを複数種用いて、同じ表現型が得られるか確認することも大切です。これは、複数種のsiRNAが引き起こすオフターゲット効果が同じとは考えにくいからです。

● siRNAの取り扱い方

- 酵素による分解ならびに機械的な分解の可能性があるため、その両者に留意します。
 - ❖ 常にRNase-freeの環境で扱うことを心がける
 - ❖ 使用するチューブやチップ、水やバッファーなどRNase-freeのものを用いる
- ❖ 溶解後は分注、冷凍保存し凍結融解を繰り返さないようにする
 - 溶解方法
乾燥状態の合成siRNAは、添付の指示に従って溶解し、stock solutionを調製します。濃度は200 μ M以下が適切で、一般には50-100 μ Mです。
 - 保存方法
 - ❖ 乾燥状態
-20°Cで1年間は安定です。
 - ❖ 溶解保存

凍結融解を繰り返すと分解する原因となります。そのため、実験サイズを考慮してsiRNA溶液を分注し、冷凍保存します。-20℃で半年間は安定ですが、冷凍庫内の温度上昇で凍結融解が繰り返される場合があるので、注意してください。

➤ 実験に使用する際の注意

一旦溶解したsiRNAは4℃で保存しておけば、1週間程度は実験に使用できますが、あくまでもRNase-freeの状態で保存されている場合ですので、取り扱いには十分注意します。万が一、使用していたsiRNAの活性が急に低下した場合は、凍結保存してあるstock solutionを使用しましょう。

● レスキュー実験

究極的には、siRNAには認識されない核酸配列をもつターゲット遺伝子を導入することで、表現型を復帰できるはずですが、そのため、RNAi実験のレスキュー実験として試される方法があります。

➤ ターゲット遺伝子の核酸配列に変異を導入

ターゲット遺伝子のcDNAクローンに対し、野生型のタンパク質配列は変更することなく、核酸配列に変異を導入し、siRNA効果がレスキューできるか確認します。

➤ 3'UTRを標的するsiRNAとORFクローンの利用

ターゲット遺伝子の3'UTRを標的とするsiRNAを用いてノックダウン実験を行い、表現型を確認します。次にCDS領域のみをコードするORFクローン(open reading frame clone)を用いてレスキュー実験を行います。

※目的タンパク質を期待する量発現調節することが比較的困難であること、また、過剰発現することにより弊害が生ずる可能性があることから、レスキュー実験は非常に困難で、一般的な手法とはいえないのが現状です。