

# Thermo Scientific Accell siRNAを用いた 長期遺伝子サイレンシング実験

*Zaklina Strezoska and Christina Yamada, Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO, USA*

## はじめに

siRNAを細胞に導入する方法としては、カチオン性のリピッド系トランスフェクション試薬を用いる方法が一般的です。しかし、リピッド系トランスフェクション試薬ではsiRNAの導入が困難な細胞があったり、リピッドにより細胞に悪影響が生じることがあります。

Thermo Scientific Dharmacon Accell siRNA（以下Accell siRNA）は、トランスフェクション試薬を用いずに細胞に導入することのできる全く新しいタイプのsiRNAです。Accell siRNAには特殊な化学修飾が施されたヌクレオチドを導入しており、結果として、さまざまな細胞に受動的に取り込まれます。従来トランスフェクション試薬による導入が困難であった細胞（初代培養細胞・神経細胞・免疫細胞など）での実験例も増えつつあります。Accell siRNAは、配列デザインおよび化学修飾によりオフターゲット効果も同時に低減しており、ターゲット遺伝子の発現を特異的にノックダウンします。また、トランスフェクション試薬を使わないため、細胞毒性や炎症応答を最小限に抑えることができます。これらの特長からAccell siRNAを繰り返し細胞へ投与することにより、長期的な遺伝子ノックダウンが可能になりました。

## 長期的な遺伝子ノックダウンを簡便に実現するAccell siRNA

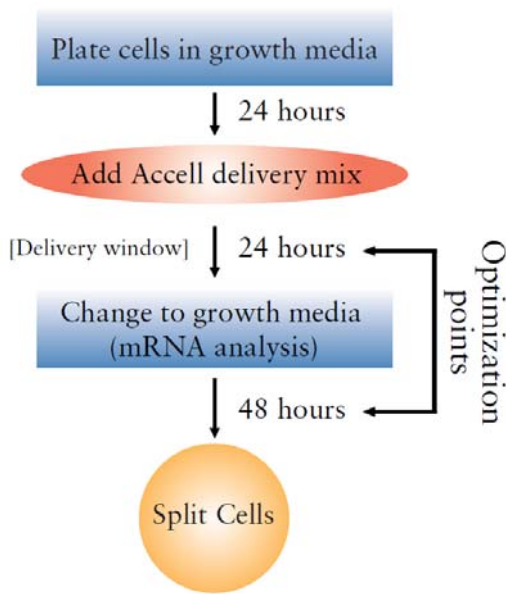
ターゲット遺伝子がコードするタンパク質の機能を正確に評価するために、以下の理由から長時間にわたって遺伝子ノックダウンを引き起こさないと解析できない場合があります。

- (1) ターゲット遺伝子のコードするタンパク質が細胞内に豊富に存在する。
- (2) タンパク質の半減期が長く、細胞内に安定して存在する。
- (3) ターゲット遺伝子を発現抑制しても、目的の表現型が現れるまでに時間がかかる。

このような場合に、リピッド系トランスフェクション試薬を用いて連続的に複数回のトランスフェクションを行う実験アプローチでは、多くの場合、細胞毒性や炎症応答を引き起こす可能性があります。また、ウイルスベクターを用いた長期的な遺伝子ノックダウンもよく利用される手法ですが、コストや時間がかかるというデメリットがあります。これらの問題を簡便に解決して、長期のサイレンシング実験を可能にしたAccell siRNAを用いた実験の流れを説明します。

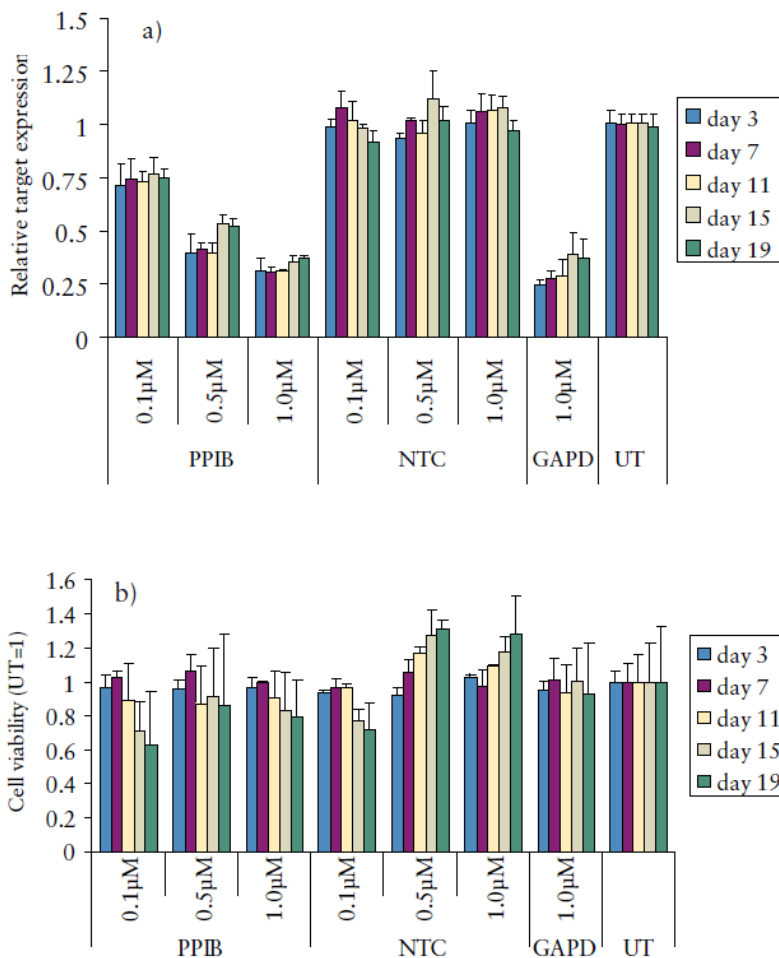
## Accell siRNAを用いた長期的な遺伝子ノックダウンのワークフロー

Accell siRNAを用いて長期的な遺伝子ノックダウンを実現する方法の概略を図1に示しました。細胞をトリプシン処理し、細胞数をカウント後、通常の培地（血清やサプリメント、抗生物質を含む）で24時間培養します。次に、培地をAccell siRNAとAccell delivery mediaとの混合溶液（Accell delivery mix）に代えてさらに培養します。この24-48時間の培養過程において、細胞内への受動的なトランスフェクション（トランスポート）が進行します。そのあとAccell delivery mixを通常の培地と置換し、24-48時間培養を続けます。細胞がコンフルエントになる前に細胞を分け、上述のAccell siRNAの導入プロトコルを再び行います。細胞がコンフルエントになるまでに時間を要する場合には、細胞を分けずにAccell delivery mixを添加することも可能です。また、通常の培地とAccell delivery mixとを繰り返し交換して培養しても、細胞への悪影響は最小限に抑えられます。



**図1 Accell siRNAの繰り返し導入による長期的な遺伝子ノックダウンの概略**

細胞を通常の培地（血清やサプリメント、抗生物質を含む）で培養後、培地をAccell siRNAとAccelldelivery mediaとの混合溶液（Accell delivery mix）に代えて培養を続けます。24-48時間後、delivery mixを通常の培地と置換し、細胞がコンフルエントになる前まで培養します。その後細胞を分け、上述のAccell siRNAの導入のプロトコルを再びおこないます。



**図2 Accell siRNAを用いた長期的な遺伝子ノックダウン（その1）**

ウェル（96ウェルプレート）あたり5,000個のSH-SY5Y細胞をプレーティングし、通常の培地中で24時間インキュベートしました。細胞を通常の培地（血清、サプリメント、抗生物質を含む）で培養後、培地をAccell PPIB siRNA（100 nM、500 nM、1 μM）あるいはAccell GAPDH（1 μM）とAccell delivery mediaとの混合溶液（Accell delivery mix）に置き換えてさらに培養しました。Accell Non-targeting Control siRNA #1（NTC；100 nM、500 nM、1 μM）をネガティブコントロールとして用いました。48時間後、Accell delivery mixを通常の培地と置換し培養を続けました。以降、上述のAccell siRNAの導入のプロトコルを繰り返しました。導入3、7、11、15、19日後のターゲット遺伝子のノックダウン効率と細胞生存率について、それぞれbranched DNA（bDNA: Panomics）とalarmarBlue（BioSource）を用いて調べました。Accell siRNAを導入せず培地の交換操作のみ行った細胞をコントロールとしました（UT）。

## PIIBをターゲットとするAccell siRNAを用いた長期的な遺伝子ノックダウン

Accell siRNAを用いた長期的な遺伝子ノックダウンの実証実験として、ハウスキーピング遺伝子であるPIIB (Cyclophilin B, NM\_000942) をターゲットとするAccell siRNA (Accell PPIB siRNA) を、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に繰り返し導入しました。Accell PPIB siRNAは、3種類の濃度 (100 nM、500 nM、1  $\mu$ M) にて導入し、3、7、11、15、19日後のmRNA発現レベルをbranched DNA (bDNA: Panomics) を用いて調べました。実験ではAccell Non-targeting Control siRNA #1をネガティブコントロールとして用いました。また、siRNAを導入せず培地の交換や継代操作のみを行った細胞に、GAPDHをターゲットとするAccell siRNAを継代ごとに用い、細胞のAccell siRNA導入に関するコントロールとしました。図2に示すように、Accell siRNAを用いることによって、長期的な遺伝子ノックダウンを効率よく実現することができました。Accell PPIB siRNAによる遺伝子ノックダウンは濃度依存的で、1  $\mu$ Mにおいて70%以上のノックダウン効果が見られました。5回の継代 (19日間) を通して細胞の生存率は80%程度でした。また、HeLa細胞を用いて同様の実験を行い、30日間にわたる遺伝子ノックダウンを実現することができました (図3)。

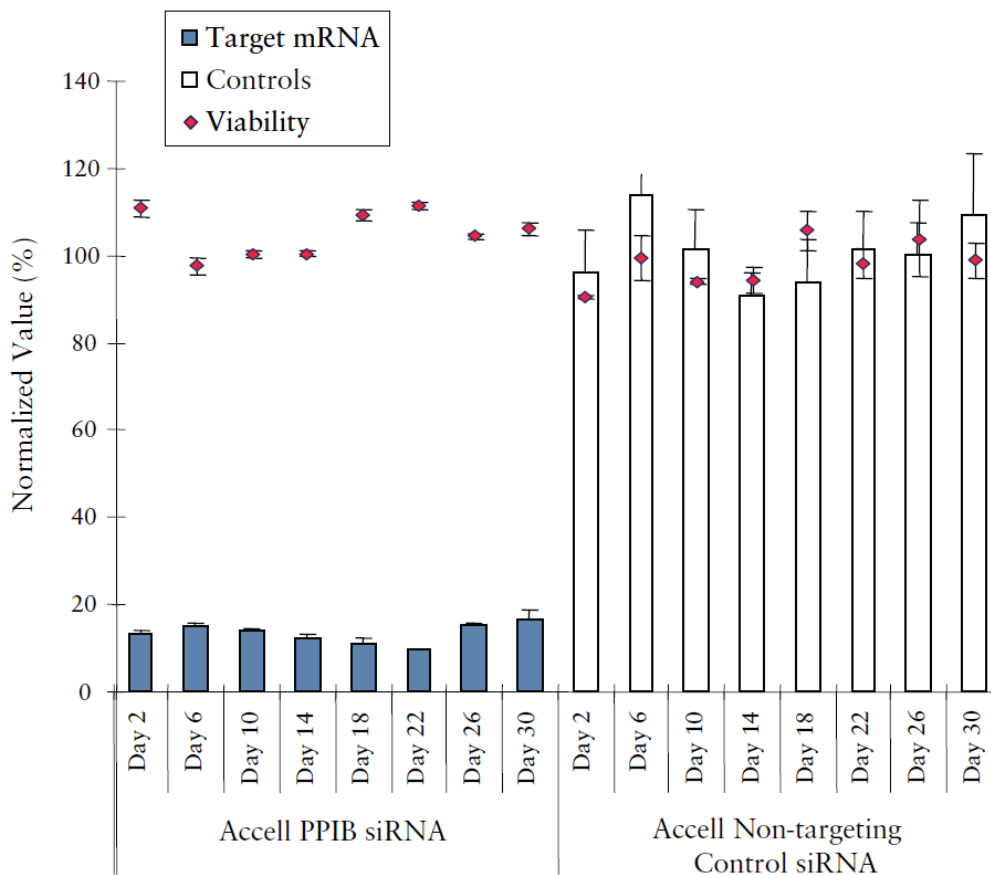


図3 Accell siRNAを用いた長期的な遺伝子ノックダウン(その2)

ウェル (96ウェルプレート) あたり10,000個のHeLa細胞をプレATINGし、通常の培地中で24時間インキュベートしました。細胞を通常の培地 (血清、サプリメント、抗生物質を含む) で培養後、培地をAccell PPIB siRNA (1  $\mu$ M) とAccell delivery mediaとの混合溶液 (Accell delivery mix) に置き換えてさらに培養しました。Accell Non-targeting Control siRNA #1 (NTC; 1  $\mu$ M) をネガティブコントロールとして用いました。24時間後、Accell delivery mixを通常の培地と置換し培養を続けました。以降、上述のAccell siRNAの導入のプロトコルを繰り返しました。導入2、6、10、14、18、22、26、30日後のターゲット遺伝子のノックダウン効率と細胞生存率について、それぞれbranched DNA (bDNA: Panomics) とalamarBlue (BioSource)を用いて調べました。

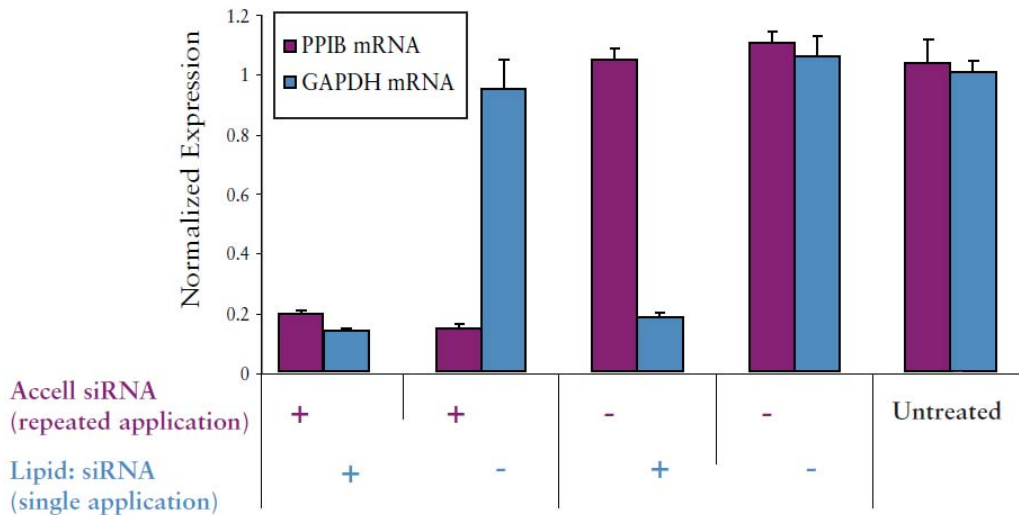


図4 Accell siRNAとリポフェクション法の併用

HeLa細胞を10日間（3回の継代）にわたってAccell PPIB siRNA（1 μM）で処理しました。10日後に細胞を分配、再プレーティングした後に、GAPDHをターゲットとするsiGENOME siRNA（100 nM）を、DharmaFECT 1（DF1）を用いてトランスフェクションしました。その24時間後に、PPIBとGAPDHのmRNAレベルをbranched DNA（bDNA: Panomics）を用いて調べました。

## Accell テクノロジーとリポフェクション法の併用

Accell siRNAを用いて長期的な遺伝子ノックダウンを行った細胞に、リピッド系トランスフェクション試薬を用いてsiRNAを導入できるかどうか調べました。Accell PPIB siRNAで10日間にわたって処理したHeLa細胞に、GAPDHをターゲットとするsiGENOME siRNA（siGENOME GAPDH siRNA）をトランスフェクションしました。Accell PPIB siRNAとsiGENOME GAPDH siRNAの両方を導入した細胞では、各遺伝子のmRNAレベルが少なくとも80%以上抑制されていました。この結果はAccell テクノロジーとスタンダードなりポフェクション法が併用可能であることを示しています(図4)。Accell siRNAテクノロジーを用いた実験デザインは柔軟に変更でき、また、Accell siRNAとリポフェクション法を併用することにより、複数の遺伝子を同時にノックダウンすることができます。

## まとめ

比較的短時間の遺伝子ノックダウンを目的とするときは、Accell siRNA実験条件の至適化はほとんど不要ですが、長期的な遺伝子ノックダウンを行うときは、細胞にあわせてプロトコルを至適化する必要があります。また、適切なコントロールを用いて細胞の生存率や生理状態をモニターし、Accell delivery mix中で繰り返し細胞を培養することによる細胞への影響を確認することが大切です。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 バイオサイエンス事業本部

■ 製品お問い合わせ

TEL 045-453-9089

E-mail info.bid.jp@thermofisher.com

■ 価格・納期・注文お問い合わせ

TEL 03-3811-3621

E-mail sales.bid.jp@thermofisher.com