

小さなRNAによる転写レベルの遺伝子発現制御

RNAがDNAメチル化を誘導する

RNAi (RNA干渉) は、二本鎖RNAが引き金となってある特定のmRNAを切断し蛋白生産を抑制する現象 (PTGS) であり微生物から動植物において広く保存されている。このRNAiの現象においては、小さなRNA (siRNA) は、RNAi実行蛋白質 (RISC) と複合体を形成して配列特異的に標的mRNAを分解する。一方、植物や酵母では、siRNAがヒストンおよびDNAメチレーション (メチル化) を誘導することが知られていたが、哺乳動物においては不明であった。今回我々は、世界に先駆けてsiRNAがヒト細胞においてDNAメチル化を誘導し、転写レベルでの遺伝子サイレンシングを引き起こすことを明らかにしたので紹介したい。

はじめにE-カドヘリンの遺伝子プロモーター領域に存在するCpG領域に対して10種類のsiRNAを設計して、ヒト乳ガン細胞に導入した。その結果、全てのsiRNAがその標的とするE-カドヘリン遺伝子のプロモーター領域中のCpG配列に対して配列特異的にメチル化を引き起こすことをバイサルファイトシーケンシング法により明らかにした。このDNAメチル化によりE-カドヘリンの遺伝子発現は、転写レベルで抑制された。これらの結果からsiRNAは、従来の細胞質で起こる転写後の遺伝子サイレンシング (遺伝子発現抑制) だけでなく核内で起こるDNAメチル化を介した転写レベルでの遺伝子サイレンシング (遺伝子発現抑制) にも関与することが示された (図1)。

さらに将来的にガンなどに対する遺伝子治療を

考慮した場合、siRNAを細胞内で長期的に発現できるシステムの開発が必要である。現在、siRNAを細胞内で発現させるシステムとしてショートヘアピンRNA (shRNA) をRNAポリメラーゼIIIの転写システムで発現させる系が有効である。shRNAは、細胞内でDicerと呼ばれるRNA分解酵素によってsiRNAにプロセッシングされる。そこで我々は、ガン遺伝子 *erbB2* のプロモーターに対して5種類のshRNAを設計し、tRNAプロモーターで発現制御されるshRNA発現ベクターを構築した。これらをヒト乳ガン細胞に導入したところ、*erbB2* 遺伝子プロモーター中のshRNAが標的とする領域に存在するCpG配列がメチル化され *erbB2* 遺伝子の発現が転写レベルで抑制された。またそれにともない、乳ガン細胞の細胞増殖にも阻害が見られた (図2)。さらに同様の結果は、U6プロモーターから発現するshRNAを用いた実験でも得られており、合成siRNAだけでなくshRNA発現ベクターを用いた場合でもCpG領域のDNAメチル化を誘導し、転写レベルでの遺伝子発現を制御することを証明した。

以上の結果から、任意のCpG領域を標的としたsiRNA/shRNAを設計することで人為的にDNAメチル化を誘導でき、転写レベルでの遺伝子発現を特異的に制御することが可能になった。また今後、ガン遺伝子やウイルス蛋白質をコードする遺伝子のプロモーターを標的としたsiRNA/shRNAを構築することにより、ラショナルデザインが可能な新しい薬剤として期待される。

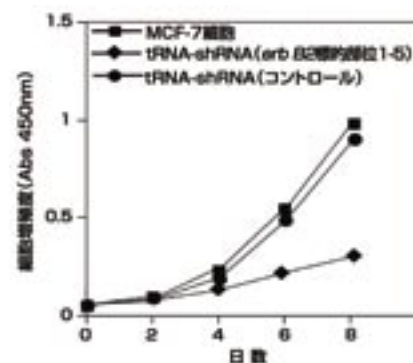
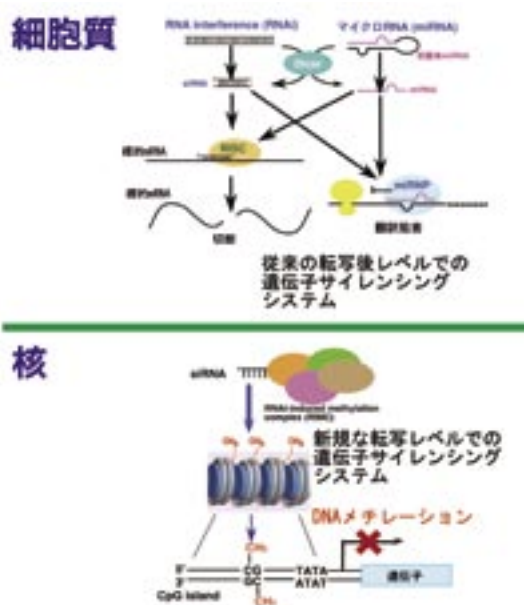


図1 (左) 新規な転写レベルでの遺伝子サイレンシングシステムと従来の転写後レベルでの遺伝子サイレンシングシステムとの比較

図2 (上) ガン遺伝子 *erbB2* のプロモーターを標的としたtRNA-shRNAによる乳ガン細胞の増殖抑制



かわさきひろあき
川崎広明
h-kawasaki@aist.go.jp
ジーンファンクション研究センター

関連情報

- 共同研究者：多比良和誠 (ジーンファンクション研究センター)。
- H. Kawasaki, K. Taira; Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, 431, 211-217 (2004)。
- 出願番号: 60/449,860 「哺乳動物細胞におけるdsRNAによるCpG配列へのメチル化誘導」 (多比良和誠, 川崎広明)。