Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Screening of cell death genes with a mammalian genome-wide RNAi library |
| Author(s) | 辻井, 久代 |
| Citation | 大阪大学, 2011, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/58097 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【32】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 辻　井　久　代（つじ い ひさ よ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２４２７０　号 |
| 学位授与年月日 | 平成23年1月20日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科未来医療開発専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Screening of cell death genes with a mammalian genome-wide RNAi library<br>（哺乳類ゲノムワイドRNAiライブラリーを用いた細胞死関連遺伝子のスクリーニング） |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　辻本　賀英<br>（副査）<br>教　授　金倉　　譲　　教　授　遠山　正弥 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

RNA干渉は目的の遺伝子の発現を特異的に抑制することができる画期的な技術として、近年様々な実験に用いられている。今回我々は、ヒトゲノムのほぼ全ての転写産物に対するsiRNA/shRNAを含んだゲノムワイドライブラリーを作成し、それを用いて、様々な生物学的現象に重要な役割を果たすと同時に様々な疾患の原因となることが知られている細胞死に関与する遺伝子を網羅的に解析し、細胞死の全容を解明することを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

ゲノムワイドRNAiライブラリーの作成にあたり、siRNAの配列の選択にはAffymetrix社のGeneChip（Human Genome U133 plus 2.0）上のプローブ配列を利用した。このGeneChipは約47000の転写産物をターゲットにしている。1つの転写産物に対して、3から5の配列を選択することにより、合計216568のshRNAをデザインした。作成したゲノムワイドRNAiライブラリーを用い、Fas誘導性細胞死に関与する遺伝子の探索を試みた。

HeLa細胞由来のD98/AH2細胞がスクリーニングに適した細胞株であるか検討するため、D98/AH2細胞を抗Fas抗体で刺激すると、クロマチンの凝縮や核の断片化を伴う細胞死に特徴的な形態変化が観察されたが、細胞死抑制タンパクであるBcl-2を発現した細胞ではそれらが抑制された。また、抗Fas抗体刺激下においてシグナル伝達をBcl-2でブロックすると細胞の生存性が保存されることをviavility assayで確かめた。いくつかの細胞株において抗Fas抗体刺激がネクロトーシスと呼ばれる非アポトーシス性細胞死を引き起こすこと、そのネクロトーシスが化学物質necrostatin-1によって特異的に阻害されることが報告されているが、D98/AH2細胞においては抗Fas抗体刺激下でみられる細胞死はアポトーシスが主要な経路であることを確認した。また、アポトーシス誘導時にミトコンドリアの下流で機能するApaf-1をサイレンシングすると、核の形態変化やフォスファチジルセリンの露出は抑制されたが、生存率には影響がなかった。このことからD98/AH2細胞が抗Fas抗体刺激下

において、アポトーシスのシグナル伝達がミトコンドリアの上流で抑制されると、細胞は生細胞として回収可能であることを示した。

作成したゲノムワイドRNAiライブラリーをレンチウイルスベクターシステムによって細胞内に導入し、抗Fas抗体刺激を与えた後、生存した細胞よりTotal RNAを回収し、生存率を高めるshRNA配列をスクリーニングした。3つの独立したスクリーニングにおいて、抗Fas抗体刺激後生き残った細胞集団から、コントロール群に比べて全て2倍以上濃縮されている6種類のshRNA配列を得た。この中には、Fas誘導性細胞死に関与していることが証明されているFas、Caspase-8、BidのshRNAが含まれていた。

スクリーニングで得られたshRNA配列の効果を検討するため、6種類の候補配列を組み込んだウイルス産生プラスミドを再構築し、抗Fas抗体刺激後の生存率とそれぞれサイレンシング効果を検討した。その結果、6種類の候補配列のうち、caspase-8,Bid,FasをターゲットとしたshRNAは生存率を上げ、また、それぞれのターゲット遺伝子を効率よくサイレンシングしていることがわかった。したがって、このゲノムワイドRNAiライブラリーは、Fas誘導性細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングにおいて有用であることが示された。また、その他の生命機能に関与する遺伝子のスクリーニングにおいても有用であることが示唆された。

次に我々は、このライブラリーを用いてERストレス誘導薬剤であるTM誘導性細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングを試みた。

D98/AH2細胞はTM刺激下において、抗Fas抗体刺激下と同様にクロマチンの凝縮や核の断片化を伴う細胞死に特徴的な形態変化が観察されること、またそれらはBcl-2で抑制されることを確認した。これまでにいくつかの遺伝子がERストレス誘導性細胞死に関与していることが報告されており、それらがD98/AH2細胞においてTM誘導性細胞死に関与するか検討した。Apaf-1、Ask1、JNK、PERK、CHOP、Bimをそれぞれサイレンシングした細胞をTM刺激後、PI染色によって細胞死を評価した結果、Apaf-1のみが抑制効果を示した。さらに、TM刺激下においてシグナル伝達をBcl-2でブロックすると、細胞の生存性が保存されることをviavility assayで確かめた。従って、TM誘導性細胞死に関与する遺伝子をサイレンシングするshRNAが導入された細胞は、TM刺激後高い生存性を与えられることが示唆された。

ゲノムワイドRNAiライブラリーを用い、Fas誘導性細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングと同様の方法でTM誘導性細胞死に関与する遺伝子の探索を試みた。3つの独立したスクリーニングにおいて、TM刺激後生き残った細胞集団から、コントロール群に比べて全て12倍以上濃縮されている12種類のshRNA配列を得た。

スクリーニングで得られたshRNA配列の効果を検討するため、12種類の候補配列を組み込んだウイルス産生プラスミドを再構築し、TM刺激後のアポトーシス及び生存率を検討した。このうちALG5に対するshRNAはわずかにTM誘導性のアポトーシスを抑制し、EST-2に対するshRNAはわずかに生存率を上げたが、その他のshRNA配列は効果を示さなかった。このことより、スクリーニングによって候補遺伝子の濃縮はされたが、それぞれの遺伝子単独ではTM誘導性細胞死に対する強い抑制効果を示さないという結果を得た。

これらの結果より、今回作成したゲノムワイドRNAiライブラリーは細胞死に関与するスクリーニングに有用であるが、Fas誘導性細胞死のような比較的シンプルなシグナル伝達系に限定されることが示された。

〔　総　　括　〕

哺乳類ゲノムワイドRNAiライブラリーを作成し、それを用いたFas誘導性細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングにより、casapase-8、Bid、Fasに対するshRNA配列を得た。これらのshRNAはFas誘導性細胞死を効果的に抑制した。同様のスクリーニングをTM誘導性細胞死において行ったが、いくつかのshRNAは生存率を上げたものの、TM誘導性細胞死に対して強い抵抗性を示す遺伝子を単離することはできなかった。従って、作成した哺乳類ゲノムワイドRNAiライブラリーは、細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングには有用ではあるが比較的シグナル伝達系がシンプルなものに限定であることが示された。



## 論文審査の結果の要旨

哺乳類ゲノムワイドRNAiライブラリーを作成し、それを用いたFas誘導性細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングにより、casapase-8、Bid、Fasに対するshRNA配列を得た。これらのshRNAはFas誘導性細胞死を効果的に抑制した。同様のスクリーニングをTM誘導性細胞死において行ったが、いくつかのshRNAは生存率を上げたものの、TM誘導性細胞死に対して強い抵抗性を示す遺伝子を単離することはできなかった。従って、作成した哺乳類ゲノムワイドRNAiライブラリーは、細胞死に関与する遺伝子のスクリーニングには有用ではあるが比較的シグナル伝達系がシンプルなものに限定であることが示された。

このライブラリーが様々な生物学的現象を解明する手段として有用であることを示したことは、学位に値すると考える。