

26P-pm242

二本鎖 RNA 結合タンパク質を利用した siRNA と shRNA デリバリーの評価

○川口 泰永¹, 古島 亜季¹, 奥田 知将¹, 岡本 浩一¹(¹名城大・薬)

〔目的〕 RNAi は目的遺伝子の発現を配列特異的に抑制することができ、医薬品としての応用が期待されている。しかし二本鎖 RNA は生体内で速やかに RNA 分解酵素により分解され、また細胞膜透過性が低いという問題がある。カチオン性リポソームやポリエチレンイミン、キトサンなど様々なカチオン性ベクターが研究されているが、我々は二本鎖 RNA 結合タンパク質(dsRBD3)を用いた新規ベクターの開発を試みた。

〔方法〕 dsRBD3 に精製用アフィニティータグ GST tag と His tag を融合した GST-His-dsRBD3 の発現プラスミド pET-42a(+)/dsRBD3 を構築し、大腸菌 BL21(DE3)でのタンパク質の発現と Ni カラムによる精製を行った。精製後の GST-His-dsRBD3 を用いて血清中での siRNA と shRNA の分解抑制効果、colon26/Luc 細胞に対する細胞傷害性(MTT アッセイ)と RNAi 効果の評価を行った。

〔結果〕 GST-His-dsRBD3 を用いることにより血清中での shRNA の分解を抑制できることが示された。GST-His-dsRBD3/二本鎖 RNA の比率を高めることで分解抑制効果が向上する傾向が見られた。colon26/Luc 細胞での MTT アッセイ結果からは GST-His-dsRBD3 667nM までの濃度でそれほど大きな傷害性は認められなかった。しかし RNAi 実験では siRNA、shRNA 濃度を 667nM まで上げ、GST-His-dsRBD3/二本鎖 RNA の比率を 50 まで大きくしても RNAi 効果を確認できなかった。

〔考察〕 GST-His-dsRBD3 は shRNA と結合し、RNA 分解酵素による shRNA の分解を抑制する効果はあるが細胞への取り込みを向上させる能力に欠けるため RNAi 効果が得られなかったものと推察される。R8 や GALA などの機能性ドメインの融合による機能拡張や化学修飾などが必要である。