

# 28amA-529

色素対型 siRNA を用いた RISC の細胞内可視化解析

○神谷 由紀子<sup>1</sup>, 伊藤 杏奈<sup>1</sup>, 高井 順矢<sup>1</sup>, 漆原 雅朗<sup>1</sup>, 伊藤 浩<sup>1</sup>, 藤井 大雅<sup>1</sup>,  
梁 興国<sup>1</sup>, 檜田 啓<sup>1</sup>, 浅沼 浩之<sup>1</sup>(<sup>1</sup>名大院工)

RNA 干渉(RNAi)は短鎖の二重鎖 RNA(siRNA)によって引き起こされる配列特異的な遺伝子発現の抑制機構である。本機構では、複数のタンパク質によって二重鎖 RNA が認識され、センス鎖が切断・解離されたのちに RISC とよばれる複合体を形成し、アンチセンス鎖と相補的な mRNA が分解される。この RISC の成熟過程を明らかにするために、蛍光観察可能な二重鎖 RNA を設計・合成し、これを用いた細胞内イメージング解析を試みた。

本研究室ではこれまで、様々な機能性分子を D-threoinol を通じて RNA に導入することで、色素会合体の調製や RNA 干渉効果の向上に成功している。そこで、RNA のセンス鎖に消光剤である Methyl red、アンチセンス鎖に蛍光色素である Thiazole orange (To) をそれぞれ導入し、二重鎖中で色素会合が形成されるように siRNA を設計した。合成した siRNA の蛍光スペクトルを測定したところ、二重鎖 siRNA と比較して、To を挿入したアンチセンス鎖の蛍光強度が 100 倍以上増加することが明らかとなった。次に、siRNA の RNAi 活性を Dual luciferase assay によって解析した。その結果、色素対標識 siRNA は、未修飾の siRNA を用いた場合と遜色ない効率で、標的 mRNA の発現を抑制することが示された。以上の結果より、本研究で開発した色素対標識 siRNA を用いることで、細胞内における siRNA の二重鎖解離を検出することが可能であると期待された。そこで、実際に HeLa 細胞に色素対標識 siRNA を導入し、共焦点顕微鏡による観測を行ったところ、時間経過とともにアンチセンス鎖に標識した To の蛍光が増大していく様子をとらえることに成功した。