

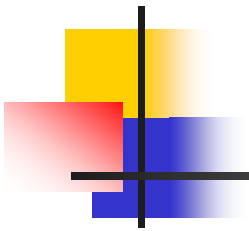
H17 SPP連携講座

クラゲの蛍光蛋白の秘密とその応用

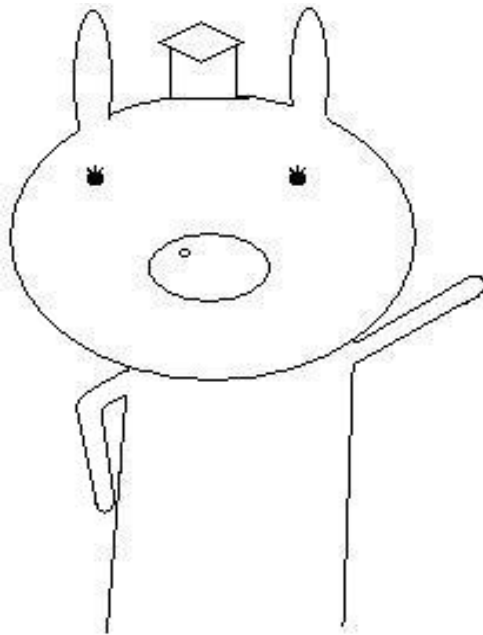
siRNAによるGFP発現抑制について



福井県立三国高等学校

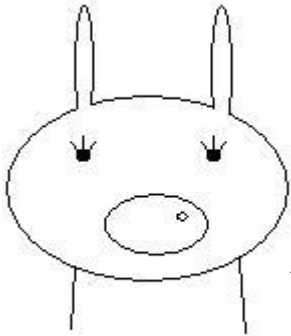


遺伝子抑制の方法について



近年、注目を浴びている遺伝子抑制の方法に、siRNA (small interfering RNA) がある。では、なぜ注目を浴びているのかー。

それは、従来のノックアウト動物を作成する方法より、はるかに容易に、しかも確実に発現を抑制できることにある。

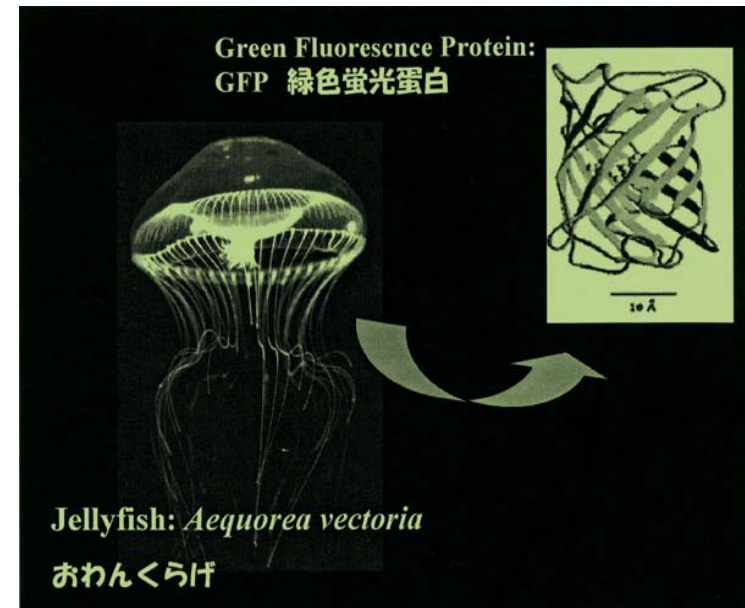


まずsiRNAの遺伝子抑制効果を確認するため
に！！

GFPプラスミドを利用します

GFP: 緑色蛍光タンパク

これはアメリカに生息している「おわんクラゲ」からとれるタンパクで、青色の光を当てると緑に光ります。このタンパク質の mRNA から cDNA を作成し (GFPcDNA), これを哺乳動物発現ベクターに挿入したのち, 大腸菌に取り込ませ, 大量にGFPプラスミドを産生させます。



siRNAとは？

約21bpからなる2本鎖RNAであり，その塩基配列と相補的關係にあるmRNAに結合し，RISC(mRNA切断酵素)を誘導することでmRNAを切断，mRNA由来のタンパク質合成を抑制させる特徴をもつ。この作用をRNA干渉とよび，この分子の集団をsiRNAとよぶ。

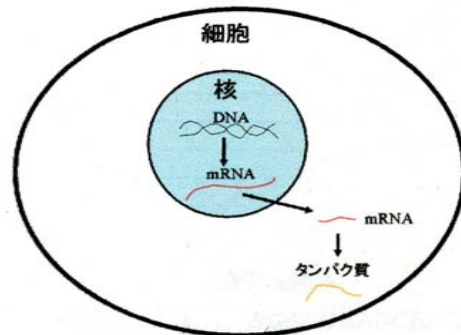


図1. DNAからタンパクまでの流れ
DNAの遺伝情報はmRNAに転写され，次にmRNAの情報が翻訳されてタンパク質ができる。

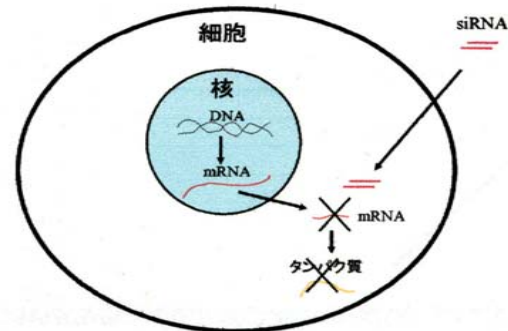
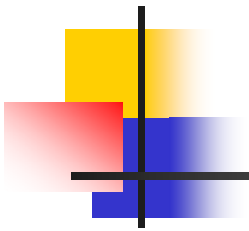


図2. siRNAの細胞内での働き
siRNAが細胞の中に入るとsiRNAは自分と同じ配列を持つmRNAを切断する。したがってタンパクも合成できなくなる。

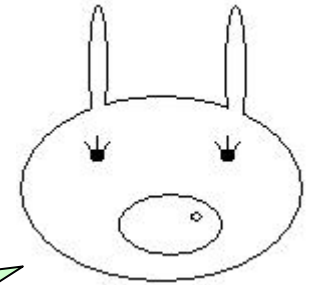
しかし



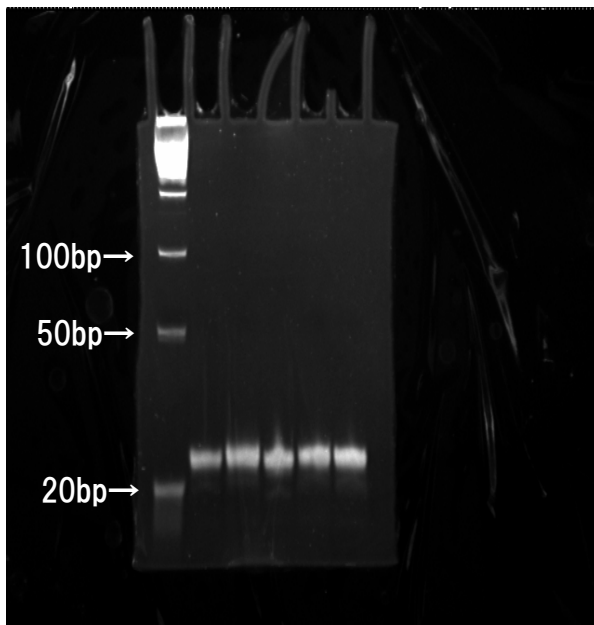
実験手順 & 内容

1. siRNAの確認……溶液中のsiRNAの確認とその大まかなサイズを確かめる。
2. プラスミドの精製……増殖した大腸菌からプラスミドを抽出し精製する。
3. プラスミドの定量……プラスミドの濃度を測定する。
4. プラスミドの確認……精製した液の中にプラスミドがあるのか確認する。
5. siRNAとプラスミドのトランスフェクション……siRNA及びGFPプラスミドを培養細胞に導入する。また、DsRedプラスミドも同様に細胞内に入れる。
6. 蛍光顕微鏡による観察……GFPの発現及びGFP siRNAによる発現抑制の効果を観察する。また、DsRedプラスミドについても同様に観察する。

siRNAの確認



siRNAを確認するために、ゲル電気泳動という方法を利用します。
siRNAは22塩基対(bp)であり、それが確認できればよいということです。



siRNA(22bp)

電気泳動: DNA、RNA、タンパク質などはマイナスに荷電しており、これらを電場の中におくと、プラス側に引き付けられます。そこで、siRNAを電流を流したゲルの上におき、マーカーと比較して大まかなサイズをはかり、そして、エチジウムブロマイドで染色し、溶液中の存在の有無を調べます。

GFPプラスミドの増殖 & 精製

①増殖した大腸菌の中から，GFPプラスミドを精製します。



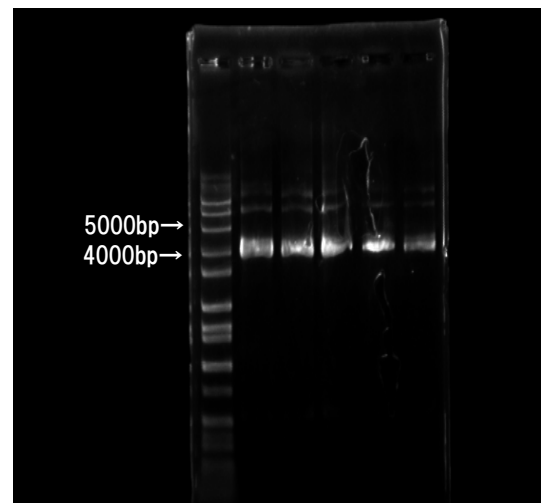
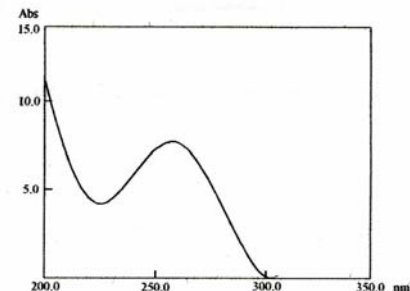
②そのプラスミドを定量

DNA & RNAが紫外線をよく吸収する性質を利用して定量します。
吸収スペクトルのグラフをコンピュータで出します。



③プラスミドの確認

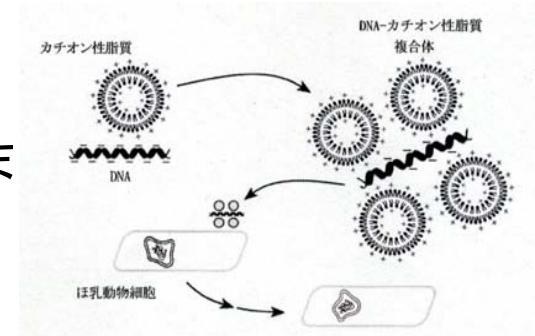
大腸菌から精製，定量したものが本当にsiRNAかどうかを調べるために，もう一度電気泳動します。



プラスミド(約4700bp)

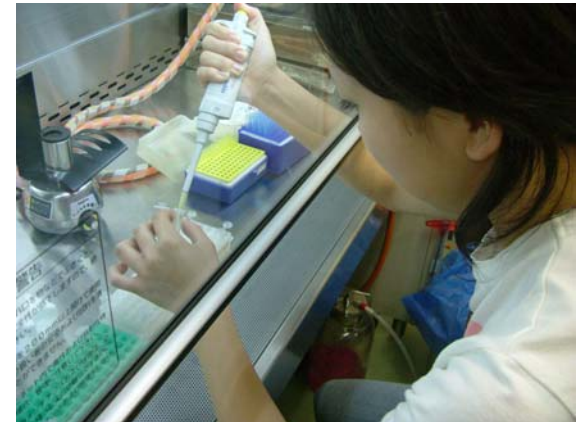
siRNAとプラスミドのトランスフェクション

今回の実験では、カチオン(陽イオン)性脂質試薬を用い、siRNAとプラスミドを細胞内へ導入します。



■細胞へのトランスフェクションパターン

- ①GFPプラスミドのみ
- ②GFPプラスミド+GFPsiRNA
- ③DsRedプラスミドのみ
- ④DsRedプラスミド+GFPsiRNA



※DsRedとは、GFPと異なる蛍光タンパク質であり、③・④の組合せは、①・②との対照となる。

→ このまま約半日培養したところ……

結果

～果たしてうまく抑制されているのか・・・!?～

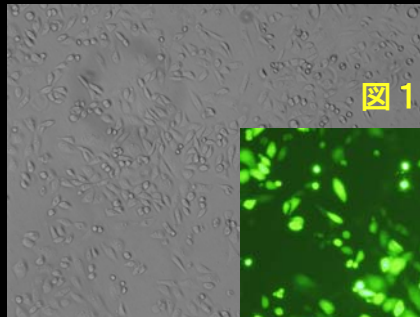


図1 GFPのみ

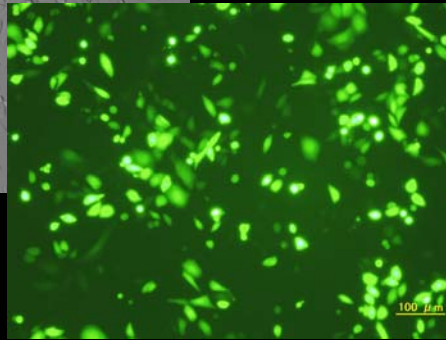


図3 DsRedのみ

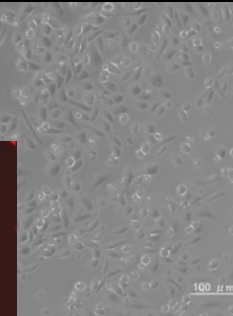
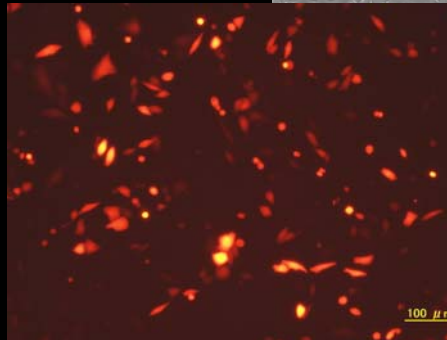


図1, 2の比較より,
GFPsiRNAにはGFP
発現を抑制する働き
があることがわかる。

図3, 4の比較より,
GFPsiRNAにはDsRed
発現を抑制する働き
はないことがわかる。

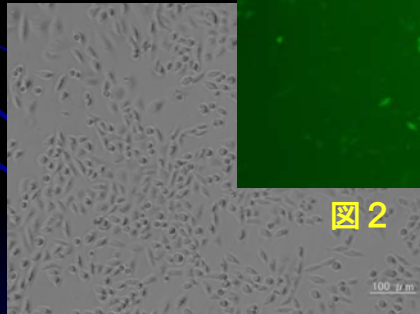


図2 GFP+GFPsiRNA

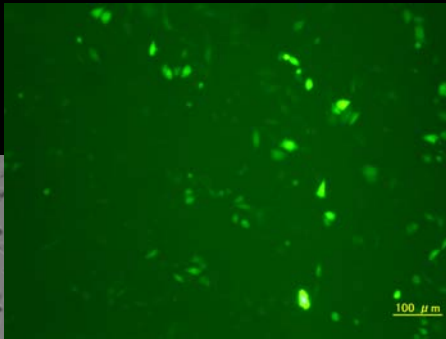
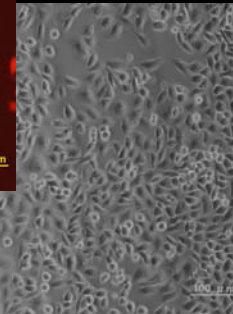
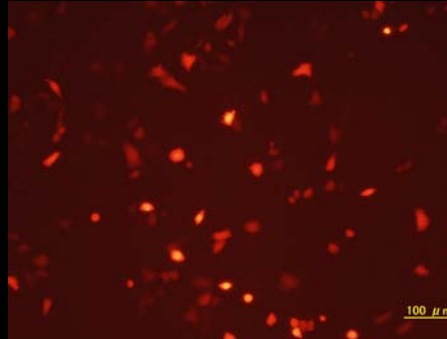


図4 DsRed+GFPsiRNA



以上の結果より, GFPsiRNAはGFP遺伝子の発現
のみを特異的に抑制する働きがあると言える。

実習を終えて

まずこのプログラムが始まる前に冊子をもらい、読んだのですが、一つもしっかりと理解できることがなく、実験を始めるまでは混乱していました。しかし、実験を始めてみると、最初の方はずっと目に見えないことを手探りでしているようで楽しかったし、最後には、はっきりと目に見える結果が得られてうれしかったです。

ただ生物系のことに興味があるというだけで、このSPPに参加をしようと決めたのですが、冊子をもらって読んでみても全然理解できず、どうしようかと思いました。でも実験をしてみると、あまりわからないところもあったけど、楽しいと思えるところがたくさん見つけられて、より生物に興味を持つことができ、このSPPに参加できてよかったと思いました。

私は物理を選択しているため、最初に見た冊子はとても難解に見えました。しかし先生に教えてもらい何とか解る様になりました。実験では慣れない器具を多く使い、最初は難しく感じましたが次第に慣れていくことができました。DNAが変わることによって本当に細胞自体が変化することを自分の目で見ることで感動しました。こんな貴重な体験ができたSPPに参加してよかったと思います。また機会があったら参加したいと思います。

私は物理を選択していたので、最初冊子を見てもよくわかりませんでした。ただ、こんな実験をするのだなと思っていました。ですが、実際に実験をしてみると、その内容を少しずつ理解し、最後にはほとんど理解することができました。そして特に、GFPプラスミドを導入した細胞が、緑色に光る現象が印象に残りました。このSPPではとても貴重な体験をすることができ、本当によかったと思います。