

# 論文の内容の要旨

## ヒト RNA 干渉における3塩基周期性と活性予測に関する研究

加藤 敬行

### ・緒言

RNA 干渉(RNAi)とは、細胞に2本鎖 RNA (dsRNA)を導入すると、配列特異的にターゲット遺伝子の発現抑制が起こる現象である(Fig.1)。当初、哺乳動物細胞においては長い dsRNA を導入すると非特異的な mRNA の分解とタンパク合成のシャットダウンが生じるという問題があったが、Tuschl らのグループはこのような長い dsRNA に対する防御機構を回避するために、初めから短い 21~23 塩基程度の dsRNA を導入する方法を開発した。このような短い dsRNA は一般に small interfering RNA (siRNA)と呼ばれている。細胞内に導入された siRNA は、Dicer やそのパートナータンパクである TRBP (transactivating response(TAR) RNA-binding protein) などとともに複合体を形成する。さらに、ターゲット RNA の切断活性(スライサー活性)を有する ago2 に受け渡されて RISC(RNA-induced silencing complex)複合体を形成し、ターゲット RNA を認識・切断する。

このように、哺乳動物細胞においても特異的な遺伝子発現抑制が実現されたことにより、RNAi は医薬品開発や生命科学分野の様々な研究において応用され始めている。実際に、RNAi による HIV などの RNA ウィルスの発現抑制の成功例が数多く報告されているほか、siRNA を用いた様々な機能未知遺伝子の機能解析の例も近年多く報告されている。

しかしながら、RNAi においては siRNA の配列を標的遺伝子内のどの位置に設定するかによって遺伝子発現抑制効果に大きな差が出るため、活性の高い siRNA 配列をうまくデザインしなければならないという問題がある。既にいくつかのグループによって、siRNA の配列と活性の解析結果から siRNA のデザインにおけるガイドラインが示されている。例えば、siRNA アンチセンス鎖(=ガイド鎖)の 5' 末端側が 3' 末端側と比較して熱力学的により不安定であることが活性に寄与するとされている。しかし、これまでに示されているこのようなガイドラインは、いずれも複数の遺伝子を対象とする siRNA の活性データを混合した上で解析された結果であった。そのため、活性の測定法の違いによる誤差が大きく、必ずしも精度の高い解析結果とは言えないものであった。そこで、本研究においてはこのような問題点を解決するために、1つの遺伝子(EGFP)の ORF を網羅的にターゲットとする siRNA の配列と活性との関連性を統計的に解析し、siRNA の活性の高さに影

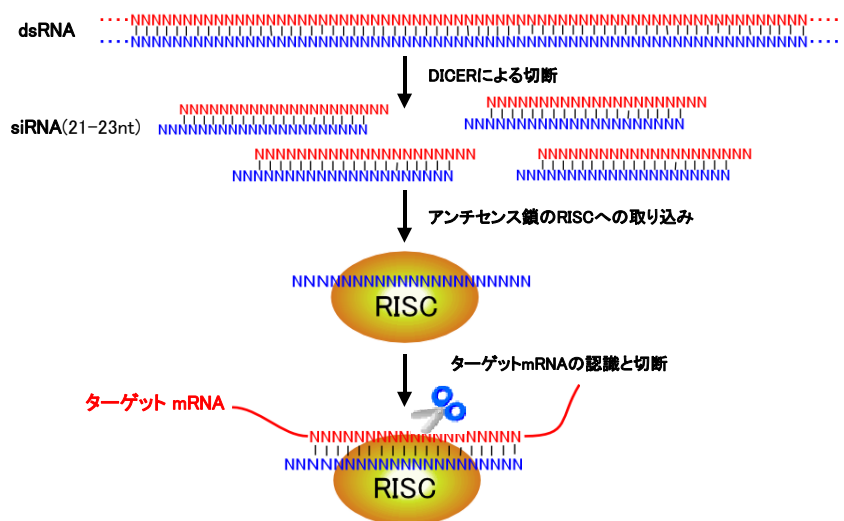


Fig.1 RNA interference(RNAi)のメカニズム

響を及ぼす因子の同定を行った。また、この結果を元に活性の高い siRNA をデザインするための RNAi 活性予測アルゴリズムの開発を行った。

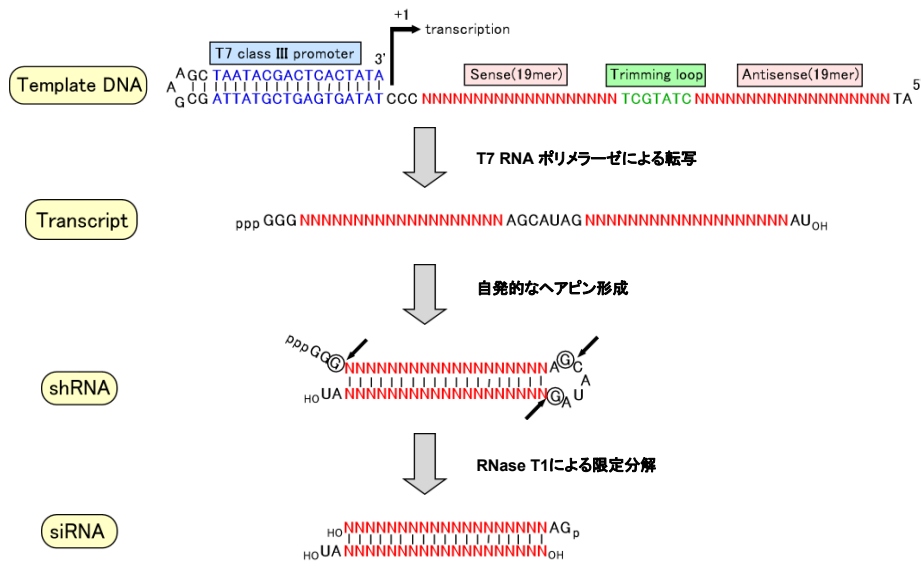


Fig.2 新規 siRNA 転写合成法の概要

### ・新規 siRNA 転写合成法の開発

まず、実験に使用するための siRNA を安価かつ迅速に合成するための手法として、1本鎖のヘアピン RNA を経由して siRNA を転写合成する方法を確立した(Fig.2)。はじめに、センス鎖とアンチセンス鎖がトリミングループという配列を介してつながれた配列を鋳型 DNA の T7 プロモーターの下流に配置した。ここで、転写反応によって得られた転写産物は自発的なヘアピン形成により short hairpin RNA (shRNA) を形成する。次に、限定条件下で1本鎖の G のみを特異的に切断する RNaseT1 を加え、転写開始部分の G とトリミングループ中に配置された G の 3' 側で

切断させ、最終的に siRNA を得た。トリミング反応は 100mM MgCl<sub>2</sub>、0°C の条件で 30 分間行った(Fig.3 左)。RNaseT1 の濃度は 8U/μl のときに最も効率よくトリミングできていることが確認された。また、得られた siRNA の MALDI-TOF マススペクトルを測定し、

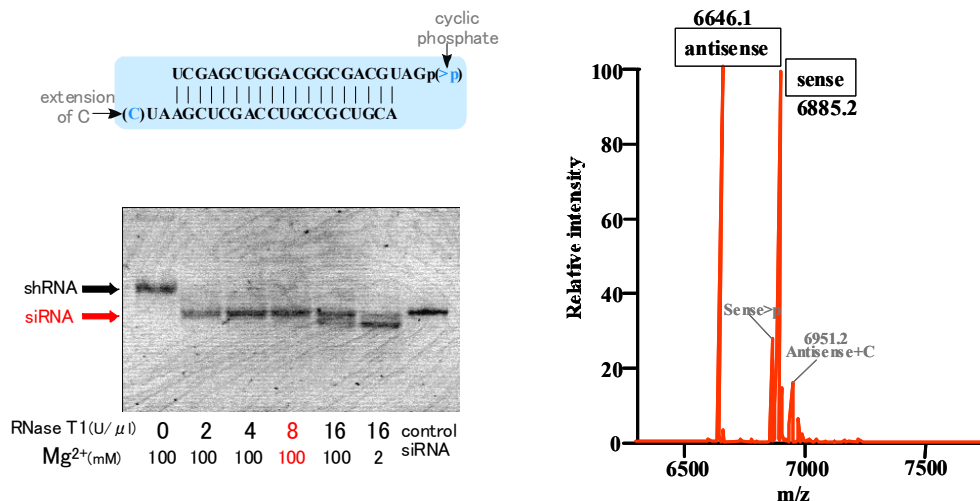


Fig.3 RNase T1 による shRNA の限定分解 (siRNA の生成) の結果

左: 15% 未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
 右: 精製後の siRNA の MALDI-TOF マススペクトル

目的とする siRNA が問題なく得られていることを確認した(Fig.3 右)。

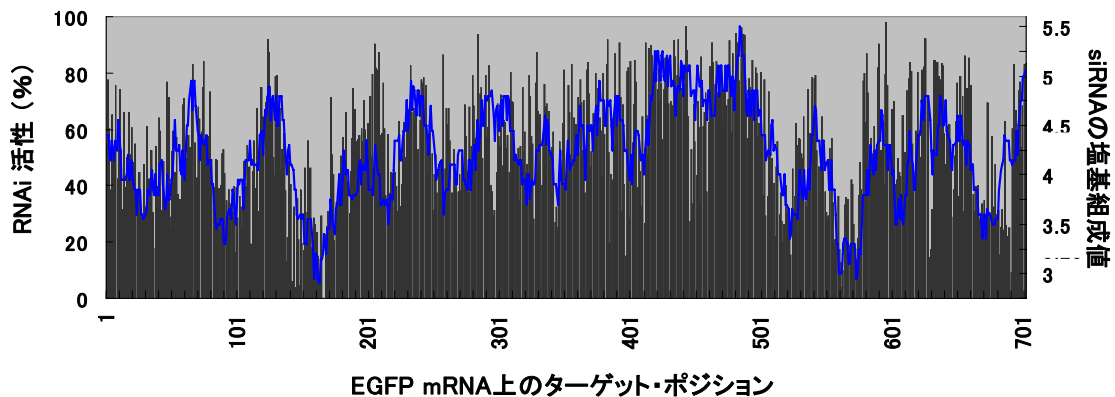


Fig.4 RNAi 活性と siRNA の塩基組成値との相関性 (相関係数 R=0.601)  
 棒グラフ: RNAi 活性実測値、  
 折れ線グラフ: siRNA の塩基組成値(A の個数 x 0.4 + U の個数 x 0.35 + G の個数 x 0.15 + C の個数 x 0.1)

・RNAi 活性に影響を及ぼす因子の同定

siRNA の活性の高さを決定する因子としては、例えば mRNA の高次構造や相互作用するタンパクの影響などの様々なものが想定できるが、実際にどのような因子によって活性の高さが決定されているのかは完全には明らかにされていない。そこで、本研究においては EGFP mRNA のすべてのポジションをターゲットとする 702 本の siRNA を転写合成によって作成し、その活性の強さと配列との関連性を統計的に調べることで RNAi 活性に影響を及ぼす因子を同定し、RNAi 活性予測アルゴリズムの構築を試みた。その結果、siRNA の活性はその塩基組成と明らかな相関性があることが示された(Fig.4)。siRNA センス鎖 (=パッセンジャー鎖) の 19 塩基のうち、A の個数x0.4、U の個数x0.35、G の個数x0.15、C の個数x0.1 として計算したものの和を siRNA の塩基組成値としたとき、siRNA の活性と塩基組成の値はよく対応しており、0.601 という相関係数の値が得られた。A:U:G:C=0.4:0.35:0.15:0.1 という塩基組成パラメータは、値の合計が 1 になるように数値をランダムに変化させたときに活性との相関が最大になる値である。パラメータ値は G + C < A + U、かつ U < A、かつ C < G となる時に高い相関係数が得られた。

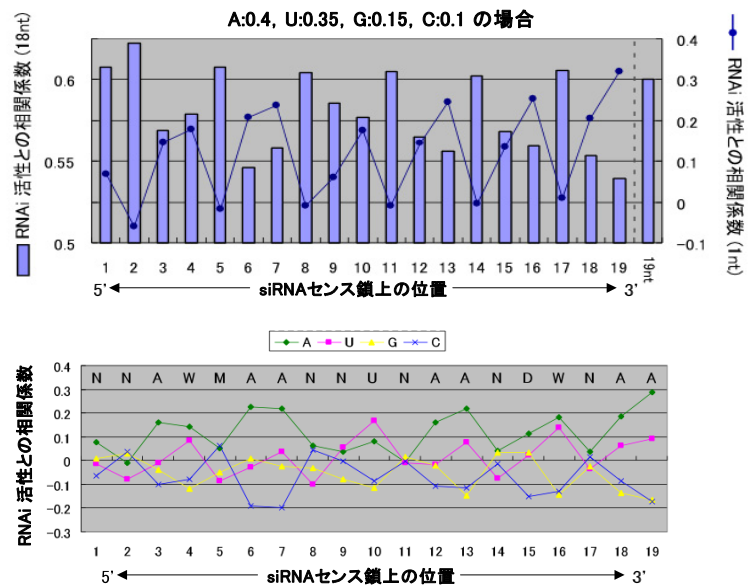


Fig.5 siRNA センス鎖の各ポジションにおける塩基組成と RNAi 活性との相関性  
 上: 塩基組成値を A:U:G:C=0.4:0.35:0.15:0.1 とした場合  
 棒グラフ: 19 塩基のうち 18 ポジションのみの塩基組成値と活性との相関係数  
 折れ線グラフ: 1 ポジションのみの塩基組成値と活性との相関係数  
 下: A・U・G・C の各塩基について個別の相関性を求めた場合

次に、siRNA センス鎖の 19 箇所の塩基について、個々のポジションごとの塩基組成値と活性との相関を調べた結果 (Fig.5 上:折れ線グラフ)、4・7・10・13・16・19 番 (3n+1) の位置においては相関係数値が高く、これらの位置では A や U が活性に寄与していることが示唆された。一方、2・5・8・11・14・17 番 (3n+2) の位置では相関係数はほぼ 0 であり、この位置の塩基の種類が活性に影響しないと言える。そして、活性への寄与度には 3 塩基ごとの周期性があることがわかった。また、相関係数値は全体的に右肩上がりになっており、5' 末端側では 0 に近いのに対し、3' 末端側では値が高く、A・U が活性に大きく寄与していた。

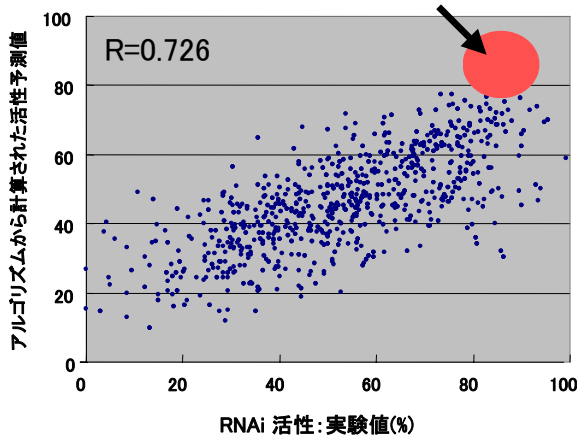


Fig.6 EGFP mRNA をターゲットとする siRNA(702 本)の活性予測値と実測値の相関性

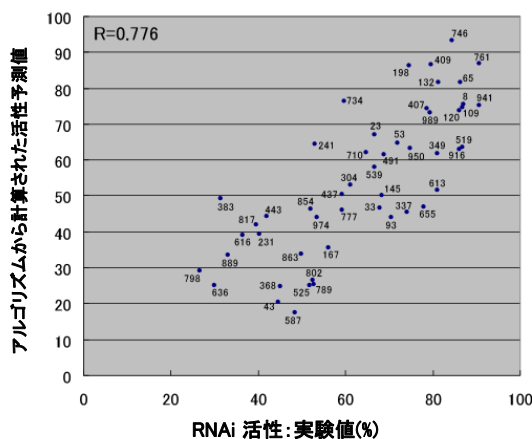


Fig.7 GAPDH mRNA をターゲットとする siRNA(50 本)の活性予測値と実測値の相関性

さらに各ポジションの塩基の種類別の活性への寄与度を調べた結果 (Fig.5 下)、6・7・13・19 番といった位置に A が来た場合や、10 番に U が来た場合には活性が上がっているが、11 番や 17 番といった位置においてはどの塩基が来てもあまり活性には影響を与えなかった。これらの結果から活性の高い siRNA のコンセンサス配列は 5' - NNAWMAANNUNAANDWNAA - 3' であることが示唆される。

次に、以上の結果を元に、実際の RNAi 活性値を計算によって予測した。RNAi 活性の予測値は、全体の塩基組成と個別の位置情報について各々の寄与度を別個に計算し、その合計値をとって算出した。これを 702 本の抗 EGFP siRNA 配列について計算したところ、予測値と活性との相関係数は 0.726 という値を達成した (Fig.6)。予測値 80% 以上の配列は全て実際に 80% 以上の活性を示しており、この予測法が活性の高い siRNA を選択する方法として有効であると言える。また GAPDH mRNA をターゲットとする siRNA を 50 本作成し、その予測値と実際の活性を調べたところ、相関係数

0.776 という値が得られ (Fig.7)、外来遺伝子だけでなく内在の遺伝子に対しても予測アルゴリズムが有効であることが確認された。

## ・総括

本研究では、まず新規転写合成法の確立により低コストかつ高品質な siRNA の供給を可能にした。この方法では 96 穴プレートを用いて同時に 96 種類の siRNA を合成できるため、多検体を迅速に供給することも可能である。また、同時に siRNA と shRNA の 2 種類の分子が供給可能であるという利点もある。

RNAi 活性予測アルゴリズムについては、相関係数 0.7 以上の精度で活性を予測でき、高い活性をもつ配列の選択を可能にした。siRNA の活性の高さは全体の塩基組成と配列に影響を受けていることが示されたが、このことは RNAi のメカニズムを解明する上でも重要である。siRNA は RISC 複合体に取り込まれ、センス鎖 3' 末端から 1 本鎖に解離するが、センス鎖 3' 末端に A・U が多いほうが活性が高くなることは、このステップに影響

している可能性がある。また、ポジション 10 においては U が活性に寄与しているが、RISC によるターゲットのクリベージサイトが 9 番と 10 番の間の位置にあることから、10 番に U があることで切断活性を高めている可能性も考えられる。さらに、塩基配列に 3 塩基の周期性が見られる点は、RISC と siRNA との相互作用に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。Fig. 8 は蛍光相関分光法によって TRBP と siRNA との相互作用の強さを解析した結果であるが、配列に 3 塩基の周期性をもつ siRNA のほうが、TRBP との結合力が高いことが示された。このことは、TRBP が siRNA の活性の高さの決定に何らかの形で寄与していることを示唆している。RNAi のメカニズムは多くのステップからなる複雑な反応であり、今後さらに活性予測の精度を高めてゆくためには、活性に影響を及ぼす因子が一連の反応のどのステップに効いているのかをさらに詳細に解明してゆく必要があると考えられる。

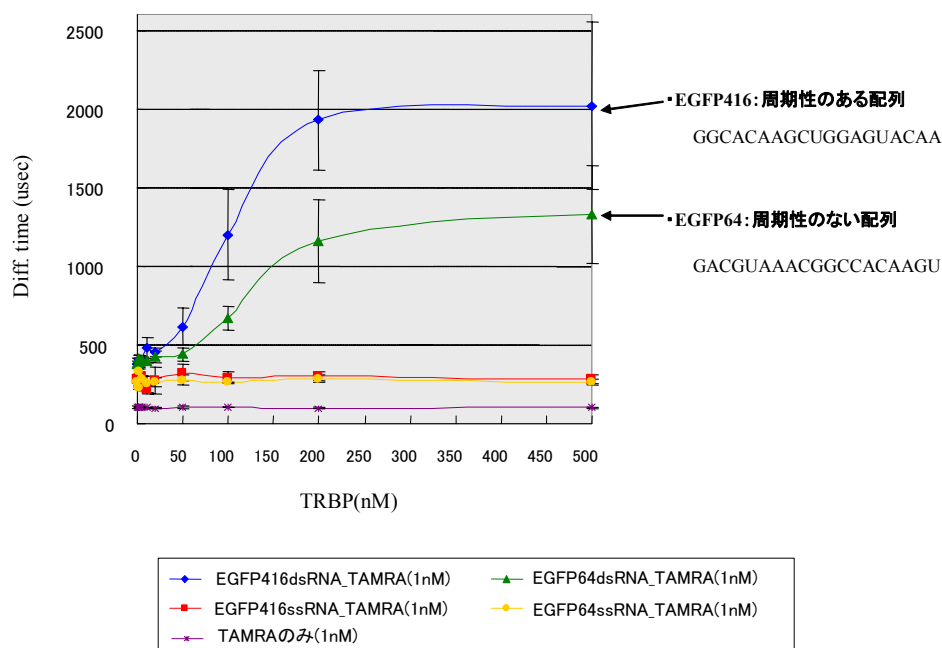


Fig.8 蛍光相関分光法(FCS)による TRBP-siRNA 相互作用解析  
siRNA センス鎖の 3' 末端を TAMRA によりラベルし、TRBP を加えた際の並進拡散時間(Diff. time)を測定した。