

審査の結果の要旨

氏名 加藤 敬行

本論文はRNA干渉 (RNAi) のメカニズムの解明を目的とし、siRNAの配列と活性との関連性を統計的に解析することによりRNAi活性に影響を及ぼす因子の同定を試みたものである。また、解析の結果をもとにRNAi活性予測アルゴリズムを構築し、RNAi法の利便性の向上を図ったものである。

まず、第1章では本研究の背景を述べている。RNAiとは細胞内に2本鎖RNAを導入すると、その配列に特異的にターゲット遺伝子の発現抑制が引き起こされるというものである。当初、ヒトをはじめとする哺乳動物の細胞においては、長い2本鎖RNAを導入すると非特異的なmRNAの分解とタンパク質合成のシャットダウンが生じてしまうという問題があったが、短い2本鎖RNA (siRNA)を導入することにより哺乳動物細胞においても特異的な遺伝子発現抑制を実現できるようになった。そのため、RNAiの手法は医薬品の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。しかしながら、RNAiのメカニズム自体についてはいまだに未知の部分が多く、技術的にも完成されたものではないため、これらの研究を進めてゆくためには解決しなくてはならない問題点もいくつか考えられる。特に、siRNAの活性はその配列やターゲットとなる遺伝子の違いによって大きく異なるため、有効なsiRNAの配列をデザインすることが困難であることが挙げられる。そこで、本論文においてはsiRNAの活性に影響を及ぼす因子を同定することを第一の目的として掲げている。

第2章では、siRNAの配列と活性との関連性を高精度に解析するための条件検討を行なっている。まず、解析に使用するsiRNAの合成法については、より高品質なsiRNAを合成する手法として、ヘアピンRNAを経由してsiRNAを合成する新規転写合成法の確立を行なっている。この方法では、センス鎖とアンチセンス鎖がトリミング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、T7 RNAポリメラーゼを用いて転写反応をおこなう。このとき、得られる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。そして次にG特異的に切断するRNase T1を加えることによって、転写開始部分のGとトリミンググループ中に配置されたGの3'側の部分で切断させ、最終的にsiRNAを得ることができる。この方法では、1本鎖のヘアピンRNAを経由してsiRNAを合成するため、鋳型DNAが1本で済み、アニーリングの操作が不要であるなどの利点がある。また、品質的にも2本鎖のアニーリングの効率が高く、活性の高いsiRNAが得られることを確認している。また、siRNAを細胞内に導入する際の最適な条件についても検討を行なっている。

第3章では、実際にEGFP mRNAをターゲットとするsiRNAの配列と活性との関連性を統計的に解析することで、siRNAの活性に影響を及ぼす因子の同定を試みている。さらに、その情報をもとにしてRNAi活性予測アルゴリズムを構築している。解析の結果から、siRNAの活性はその塩基組成に大きな影響を受けていることが示された。塩基組成値のパラメーターはA : U : G : C = 0.4 : 0.35 : 0.15 : 0.1としたときに活性との相関係数が最も高くなる (相関係数 = 0.601) と述べた。また、siRNAの塩基組成と活性との関係に3塩基ごとの周期性があることを見出し、特にセンス鎖5'末端から $3n+1$ 番目のポジションにおいてはAやU

が活性に大きく寄与していることを明らかにした。さらに、センス鎖のポジション10においてはUが最も活性に寄与していることが判明した。そしてこれらの情報を元にRNAi活性予測アルゴリズムを構築し、相関係数0.7以上の精度で活性の予測を可能にした。外来のEGFP遺伝子をターゲットとした場合のみならず、内在遺伝子であるGAPDHや β -catenin遺伝子をターゲットとした場合にも予測が有効であることを確認している。これにより、活性の高いsiRNAの配列を容易にデザインすることを可能にした。

最後に、以上の解析の結果から得られた知見をもとにRNAiのメカニズムについての見解を示している。細胞内に導入されたsiRNAは、RISC複合体に取り込まれたのちセンス鎖3'末端側から1本鎖に解離するとされているが、センス鎖3'末端にA・Uが多い場合に活性が高くなる傾向がみられることは、この解離のステップに影響している可能性がある。そこで、siRNA両末端の熱力学的安定性と活性との関係について考察を行なっている。また、siRNAの塩基組成と活性との関係に3塩基ごとの周期性があることを見出したが、RISC複合体の構成成分の1つであるTRBP分子がそのような3塩基周期性の認識に関わっていることを示した。

以上、本論文ではRNAi活性に影響を及ぼす因子として、siRNAの塩基組成、配列の3塩基周期性、センス鎖3'末端の熱力学的安定性が重要であることを明らかにした。そして、siRNAの3塩基周期性の認識にはTRBPが関与していることを示した。また、この知見を元にRNAi活性を予測するアルゴリズムを作成し、高い精度でRNAi活性を予測することを可能にし、実用面においてもRNAi法の利便性の向上に貢献した。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。