

論文の内容の要旨

論文題目 哺乳類細胞で有効かつ標的遺伝子に特異的な siRNA 設計法の
確立とその抗ウイルス RNA 干渉法への応用
(Antiviral RNA interference based on the development of the highly
effective, target-specific siRNA design in mammalian cells)

氏 名 内藤 雄樹

RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) とは、細胞に導入した 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA) が、相同な塩基配列をもつメッセンジャー RNA (mRNA) を特異的に切断することによって遺伝子発現を抑制する現象である。RNAi の分子機構は、生体内においてはウイルスやトランスポゾンに対する防御機構の一部と考えられているほか、生体内で多数発現しているマイクロ RNA (microRNA; miRNA) による遺伝子発現の制御において重要な役割を担っている。また人為的に dsRNA を細胞内に導入することによって、任意の遺伝子を簡便にノックダウンできることから、RNAi は遺伝子の機能解析に有効な手法として注目されている。

哺乳類細胞で RNAi 実験をおこなうには、標的遺伝子と相同な、化学合成した約 21 塩基対の短い 2 本鎖 RNA (short-interfering RNA; siRNA) または siRNA を発現するベクターを細胞に導入する方法が一般的に用いられる。しかし siRNA の配列はどのようなものでも細胞内で機能するわけではなく、無作為に設計した siRNA の 7~8 割は RNAi 活性を示さない。さらに、siRNA の長さは約 21 塩基対と短いため、標的遺伝子とはまったく無関係な遺伝子にも相同部分が存在する確率が高く、siRNA がそのような遺伝子を抑制してしまうことがある (オフターゲット効果)。本研究ではまず、特にこれら 2 つの問題点を考慮した、哺乳類細胞に有効かつオフターゲット効果の少ない siRNA の設計法を構築した。哺乳類細胞に有効な siRNA の設計法は、著者らを含む 3 つの研究グループから提唱されている方法の比較検討をおこない、もっとも良い著者らの方法 (Ui-Tei *et al.* 2004, *Nucleic Acids Res.* **32**, 936-948) を用いた。またオフターゲット効果が少ない siRNA を設計するために、標的以外のすべての遺伝子に対して相同性が最小となる siRNA 配列を選択するという情報科学的手法を用いた。21 塩基の相同性検索は、Yamada らのアルゴ

リズム (Yamada *et al.* 2005, *Bioinformatics* 21, 1316-1324) を用いた。本研究で構築した siRNA 設計システムによって、ヒトの全遺伝子をほぼ網羅できるゲノムワイドな siRNA 設計をおこなった。

一方、siRNA の標的は内在性遺伝子に限定されず、細胞に感染したウイルス由来の RNA を標的とすることによってウイルスの増殖を抑制できることが示されている。本研究で構築した siRNA 設計法は、哺乳類細胞に感染するウイルスを標的とする場合にもそのまま適用できると考えられる。しかし HIV-1 や HCV など多くの RNA ウイルスは、著しくゲノム多様性が高く、1 種類の siRNA を単独で用いた場合、その siRNA に耐性をもつ変異ウイルスが容易に出現し得ることが報告されている。そこで本研究では、多様性の高いウイルスを対象として、その高度保存領域を同定し、それらの領域を標的とする siRNA の設計をおこない有効性を評価した。HIV-1 においては、ゲノムの大部分の領域が 21 塩基の単位では保存されておらず、無作為に選択した siRNA のほとんどは HIV-1 を効率よく標的とすることができなかった。しかし解析の結果、5' UTR、プロテアーゼ、インテグラーゼの一部の領域が高度に保存されていることが判明し (図 1)、それらの領域を標的とする有効な siRNA を設計できた。ついで、設計した siRNA の HIV-1 増殖抑制効果を、複数のサブタイプに属する 4 種の HIV-1 感染性分子クローンで検証した。その結果、多くの siRNA が 4 種すべての HIV-1 の増殖を効果的に抑制し、本研究で構築した siRNA 設計法の有効性を確認できた。以上の結果に基づき、ウイルスの配列のなかで高度に保存された領域に、哺乳類細胞で有効かつオフターゲット効果の少ない siRNA を設計するシステムを構築した。そのうち、HIV-1、HCV、インフルエンザウイルス、SARS コロナウイルスの 4 種のウイルスを標的とする siRNA 設計システムを、ウェブサーバ siVirus (<http://siVirus.RNAi.jp/>) として公開した。

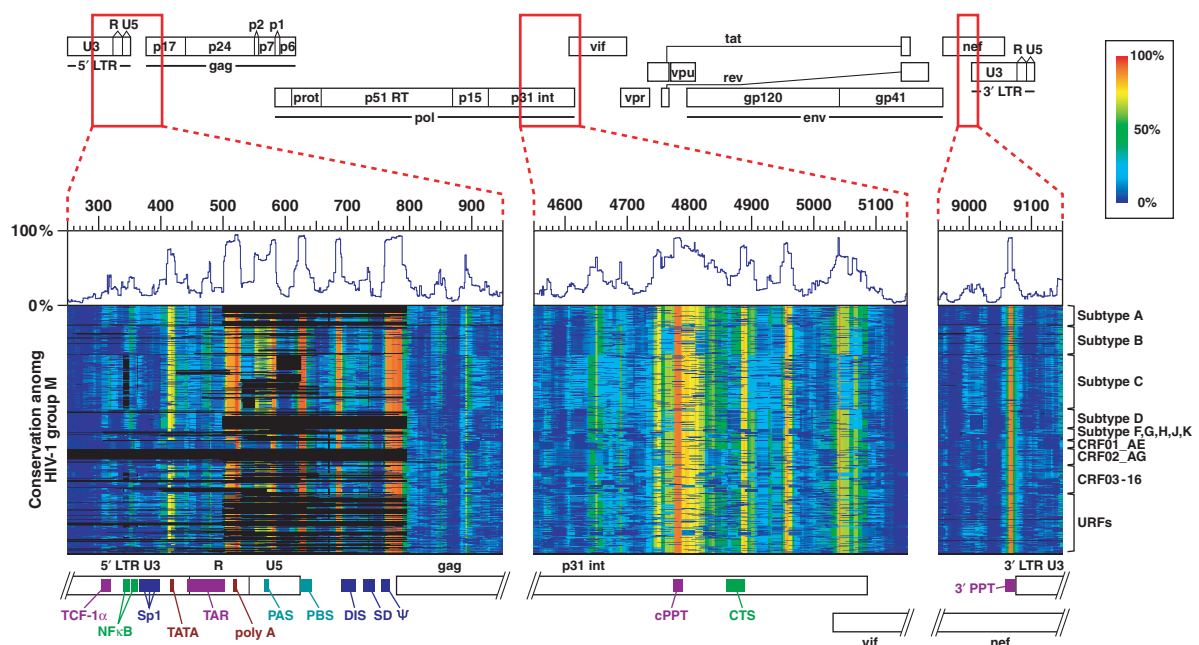


図 1 ● HIV-1 ゲノムを構成する 21-mer の保存度。495 種の HIV-1 配列から生成した 4,417,157 種の 21-mer について保存度を求め、青色 (保存度 0%) から赤色 (保存度 100%) の点で示した。折れ線グラフは各位置における保存度の最大値 (最頻値と一致) を示す。5' UTR、インテグラーゼ遺伝子内における cPPT/CTS 領域、および 3' PPT 領域の拡大図。