

論文審査の結果の要旨

氏名 内藤 雄樹

本論文は緒論、第1章、第2章および文献からなり、第1章では、哺乳類細胞やショウジョウバエ等で有効かつ標的遺伝子に特異的な siRNA 設計法の構築について述べられており、第2章ではそれを基礎とする抗ウイルス siRNA 設計システムの構築および HIV-1 を標的とする RNA 干渉 (RNAi) 法への応用について述べられている。

RNAi とは、細胞に導入した 2 本鎖 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 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 (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、少なくとも哺乳類 RNAi 実験では、無作為に設計した siRNA の 7~8 割は十分に高い 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)。本論文提出者はまず、被標的遺伝子 mRNA との高い塩基配列相同性に依拠したオフターゲット効果 (ミスマッチを含む標的配列に対する RNAi 効果) を、ミスマッチの数と位置及び塩基置換のタイプの関数として調べた。RISC 形成における siRNA 配列の効果を除くために、標的 mRNA 配列を置換した。その結果、(1) 1 塩基の置換の場合、21 塩基配列の中央での置換は、置換塩基によらず大きく RNAi 効果を阻害するが、それ以外、特に末端での塩基置換は、RNAi 効果の阻害をほとんど阻害しないこと、および (2) 3 ヌクレオチド配列以上の置換は、ほとんど RNAi 効果が生じないことを見いだした。特に後者により、3 ヌクレオチド以上の塩基置換を持った配列は、少なくとも標的 RNA の開裂によるオフターゲット効果を受けないことが分かった。この事実と、別途、程等により見いだされた効率的に RNAi 効果を引き起こす siRNA 配列規則を用いて、哺乳類において効率的に RNAi を惹起する siRNA 配列設計法を考案した。本 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 設計が可能であることを示した。後に、21 塩基の相同性検索は、山田らのアルゴリズムを用い、計算効率の飛躍的向上を図った後、共同研究結果をウェブサーバとして公表した。さらに、長い dsRNA から siRNA が、ランダムな場所から切断され生成されると仮定して、長い dsRNA のオフターゲット効果を予測する方法を構築しウェブサーバ dsCheck として公開した。これは、特に長い dsRNA を用いて RNAi を行いことが多い、ショウジョウバエや線虫での、オフターゲット効果の評価すなわち特異的 dsRNA の配列決定に有効である。

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 をも標的とすることができる。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、多分その結果、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する。そこで本論文提出者は、ウイルスゲノムの高度保存領域を標的として選ぶことで、siRNA 耐性の出現を著しく抑制できるのではないかと考え、それらの領域を同定し、それを標的とする siRNA の設計を行った。ウイルスゲノム配列を 21 塩基単位で調べたところ、HIV-1 ゲノムの大部分の領域で保存性が低いことが判明した。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等が高度に保存されていることが判明した。それらの領域を標的とする siRNA を設計し実験を行ったところ、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することができ、構築した siRNA 設計法の有効性が確認された。そこで、同様な原理で各種ウイルスで、21 塩基として高度に保存された領域を特定し、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応用したシステムを構築し、ウェブサーバ siVirus として公開した。これらの研究は、バイオインフォマティクスと実験生命科学の融合の上での大きな寄与と考えられる。

なお、本論文第 1 章の一部は、森下真一、山田智之、松宮孝大、程久美子、西郷薫との共同研究であり、第 2 章の一部は、武部豊、納富香子、小野木利成、西川徹、程久美子、西郷薫との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって分析および検証をおこなったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。