

新しい遺伝子ノックダウン法, RNA interference

A new technology of knockdown, RNA interference

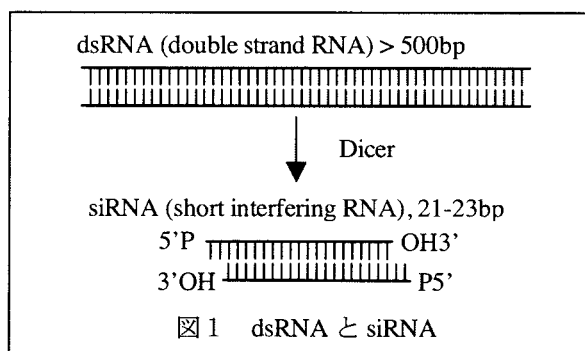
三島 健一

福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室

【はじめに】

RNA interference (RNAi, RNA 干渉)とは, ある遺伝子と相同なセンス RNA とアンチセンス RNA からなる二本鎖 RNA (double-stranded RNA, dsRNA, 図 1) によってその遺伝子の転写産物 (mRNA) の相同部分を配列特異的に分解し, その結果遺伝子発現が抑制される新しい遺伝子ノックダウン法である. この方法は, 1998 年, カーネギー研究所の Andy Fire とマサチューセッツ大学の Craig Mello が, 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて, dsRNA が特異的かつ選択的に効率良く遺伝子の発現を阻害し得ることを初めて示したことから始まった. しかしながら, その長い dsRNA は哺乳動物ではインターフェロン応答による非特異的な阻害効果を示すため, 哺乳動物での RNAi は難しいと考えられていた. 哺乳動物にも RNAi が応用可能になったのは,

長い dsRNA ではなく, 意外にも 21 塩基の非常に短い dsRNA (short interfering RNA, siRNA, 図 1) であることを, 2001 年, Tuschl らによって明らかにされた. この siRNA を用いたノックダウン法は, 従来のアンチセンス法やリボザイム法に比べると, 簡便で, しかも選択性が高く, 遺伝子発現



抑制が強いことから, 全世界のかなり多くの研究施設で遺伝子発現阻害実験のツールとして一般化してきている. 実際に論文に発表された siRNA を試薬としても発売されている. このように, siRNA を用いた RNAi は画期的な方法であり, 急速に普及しつつある. そのため, 科学誌「サイエンス」は 2002 年の「Breakthrough of the year」の中で最も話題になった科学ニュースとして, RNAi 法を第一位に選び, 将来のノーベル賞候補にあげている. 本稿では, RNAi の簡単なメカニズム, 特徴, 方法や医療への応用について紹介したい.

【RNAi の原理と特徴】

RNAi の原理: RNAi の詳細な分子機構については依然不明であるが, おおまかには図 2 に示す分子機構が考えられている. 細胞内に取り込まれた二重鎖 dsRNA は, Dicer (ribonuclease III-like enzyme) という酵素の加水分解によって dsRNA を切断し, 21-23 塩基の長さの siRNA を作り出す. これらの

siRNA には 5'モノリン酸と 3'水酸基が存在し、それぞれの鎖は 3'側に 2 塩基ずれた位置を Dicer によって切断される (図 1) . その結果, siRNA は両端の相方に塩基が 2 つ分だけ突出した形になる. 細胞に siRNA が導入されるとまず 5'末端がリン酸化され, 3'末端は脱リン酸化される. この 5'末端のリン酸化が RNAi を起こすための必須条件である. リン酸化された siRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる酵素複合体に組み込まれ, この中で siRNA の二重鎖がほどけ, 一本鎖のアンチセンス RNA になった活性型の RISC を形成する. この一本鎖にほどく反応は, RNA ヘリカーゼ活性を持つ分子であると予想されているが, まだ同定されていない. 酵素複合体に乗った活性型 RISC は自身の塩基配列にほぼ完全に相補的な配列を持つ mRNA としか結合できない. つまり, 非特異的な阻害効果を示すインターフェロン応答と異なり, 酵素複合体は標的となる特定の mRNA とだけ作用し, 高い選択性を発揮する. 活性型 RISC に標的 mRNA

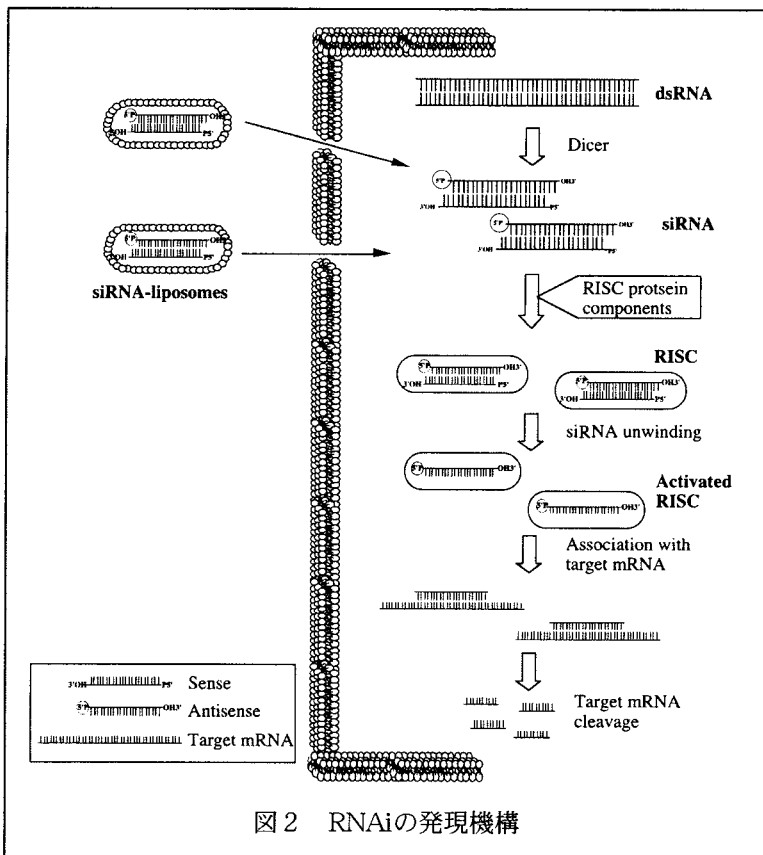


図 2 RNAiの発現機構

が結合すると, その領域の中央部分で 2 つに切断され, 分解される (図 2) .

RNAi の特徴 : 表 1 には, C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) についての, これまでに報告のあったアンチセンスオリゴやリボザイムなどの機能性核酸と RNAi の遺伝子発現阻害効果の比較を示す. アンチセンスオリゴによる遺伝子発現阻害効果を 1 とした場合, RNAi による阻害効果は 10-100 倍効率がよく, 少量で強力である. 発現ベクターを組み込んだ siRNA はさらに高い阻害効率を示す. siRNA の配列特異性は非常に高く, わずか数塩基のミスマッチの導入により効果がみられなくなる場合が多い. この配列特異性は哺乳類細胞ではさらに顕著である. また, 従来のノックアウト法に比べると大幅に実験時間が短縮され, 簡便で安

表 1 肝細胞における機能性核酸による遺伝子発現阻害効果の比較

機能性核酸	効率比	肝臓における必要量 (10 ¹² 細胞)
アンチセンスオリゴ	1	5 x 10 ¹⁶ コピー (10 mg)
DNAザイム	1	5 x 10 ¹⁵ コピー (1 mg)
リボザイム	1	5 x 10 ¹⁵ コピー (1 mg)
CTE-リボザイム	10	5 x 10 ¹⁴ コピー (100 μg)
siRNA	100	5 x 10 ¹³ コピー (10 μg)
siRNAベクター	2000	1-2 x 10 ¹² コピー (0.2-0.4 μg)

アンチセンスオリゴによる阻害効率を 1 とした場合の比較
(渡邊綱正ら, 遺伝子医学, 2003, 7, 338-342, 改変)

価であることが利点である。欠点としては以下のようなことがあげられる。RNA 自体が不安定であることから、siRNA によって阻害効果が見られないときは注意が必要である。siRNA は長期的な実験には不向きで、効果の持続期間が最大で1週間程度である。また、RNAi の効果がない遺伝子があることや神経細胞や免疫細胞で発現する遺伝子には効きにくく、細胞特異性があることなどの問題点があげられる。

【RNAi 法の実際】

siRNA のデザイン : RNAi はスプライシング後の mRNA に対して働くため、プロモーター部分や、イントロン部分では効果を現さず、エクソン部分でのみ有効である。そのため、タンパク質が結合していることが多い 5'末端や 3'末端の UTR とスタートコドンの近くの配列は避ける。まずスタートコドンから 50~100 塩基下流にある最初のアデニン (A) が連続している AA を見つける。できれば AA の後にはグアニン (G) かシトシン (C) の AAG および AAC の塩基配列が望ましい。次に AA に続く 19 塩基が、AA(N19)TT の配列を探す。ない場合には AA(N21)の配列でも代用できる。選択された領域の GC 含量が 50%前後であることが理想だが、少なくとも 30-70%の間になるものを選択する。もし、GC 含量が極端に低かったりあるいは高い場合は別の塩基配列を選ぶ。また、GGG, CCC, TTTT, AAAA などの連続性のある塩基配列は特殊な立体構造をとることから避ける。最後に選択した配列が特定の遺伝子のみを抑制するかを blast-search (NCBI) で確認する。

siRNA のトランスフェクション : RNAi を最適化させるための実験条件として、上記に示した siRNA のデザイン、濃度、暴露時間、品質、細胞への導入率や siRNA を導入する細胞の状態 (細胞の成熟度や密度、serum 条件) があげられる。中でも特異的な遺伝子発現効果を大きく左右するのが、siRNA の細胞への導入効率である。一般的な遺伝子導入法には、物理的方法 (マイクロインジェクション、エレクトロポレーション)、化学的方法 (DEAE デキストラン、リン酸カルシウム、リポソーム、非リポソーム脂質、活性型 dendrimer など)、生物学的方法 (レトロおよびアデノウイルスベクターなど) があげられる。その中で siRNA の導入試薬として、化学的方法であるカチオン脂質リポソーム系の OLIGOFECTAMINE や Lipofectamine2000 (Invitrogen 社)、SureFECTOR や UniFECTOR (B-Bridge 社)、siPORT Lipid (Ambion 社)、ポリアミン系の siPORT Amine (Ambion 社)、非リポソーム系で siRNA 用に開発された TransMessenger Transfection Reagent や RNAiFect Transfection Reagent (Qiagen 社) などがよく使用されている。最近では阻害効率をあげるためウイルスベクターを用いた研究も盛んである。細胞の種類によって各導入試薬の導入率が異なるため、siRNA 導入には細胞にあった試薬を探す必要がある。実際、著者はヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて上記にあげた導入試薬を比較した結果、TransMessenger Transfection Reagent が最も効率よく α -シヌクレインの siRNA を導入できた。

【RNAi 法の医療への応用】

2001 年から哺乳動物に RNAi が応用可能になって、その配列特異性と高い発現抑制効果から、AIDS、癌、遺伝子疾患などの難治性疾患への新しい遺伝子治療への期待が高まってきている。特に、癌についてはマイクロアレイと RNAi の併用によって転移に関係した癌遺伝子が網羅的に調べられ、新たな癌

遺伝子が同定されている。最近, Lieberman らのグループから劇症肝炎のマウスモデルを用いて Fas の siRNA を投与することで死亡率が劇的に減少し, in vivo での siRNA による効果を初めて報告した。

ここでは, アルツハイマー病とパーキンソン病の原因蛋白質に対する RNAi 法について紹介する。

アルツハイマー病の γ -セクレターゼ: アルツハイマー病は, β -アミロイド ($A\beta$) の凝集によって発病すると考えられている。 $A\beta$ は β -アミロイドプレカーサープロテインが γ -セクレターゼによって分解され産生されることからこの酵素に注目が集まっている。 γ -セクレターゼは presenilin-1, nicastrin, APh-1, PEN-2 の 4 つの遺伝子産物の複合体として構成されているが, これらの複合体のそれぞれの構成因子と γ -セクレターゼ活性の関係は不明であった。 岩坪らはショウジョウバエ S2 細胞を用いて, それぞれの複合体の siRNA を作製し, γ -セクレターゼの活性に対する影響を調べた結果, すべての siRNA で活性が消失すること, PEN-2 は presenilin-1 断片の生成に必要であること, 最初に presenilin-1 に NCT, APh-1 が結合して安定化され, その後 PEN-2 によって γ -セクレターゼが活性化されることを RNAi 法を用いて明らかにした。

パーキンソン病の α -シヌクレイン: パーキンソン病は黒質-線状体のドパミン神経の変性に基づく運動機能障害を伴った難治性の神経変性疾患である。 これらの患者脳では Lewy 小体と呼ばれる封入体が見られ, その構成要素が α -シヌクレインであることが明らかにされている。 著者は, α -シヌクレインに対する RNAi の効果について, ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。 既報に従い, α -シヌクレインの塩基配列の 53 番目にあるスタートコドンから, 約 70 塩基以上下流の AA (120 番目, 135 番目, 146 番目) を 3 つ選び, それぞれの最初の A から 21 塩基を選択し, 3 種類の siRNA を設計した。 最初に 3 種類の siRNA が細胞内に導入されているかを確認する目的で, これらの siRNA に Cy3 を用いて赤色にラベル化し, α -シヌクレインとの 2 重免疫染色を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて調べた結果, すべての siRNA は核内近郊に存在していることを確認した。 次に, ウェスタンブロット法を用いて, 3 種類の siRNA 導入 3 日後の α -シヌクレイン蛋白の発現を調べたところ, 146 番目の A から設計した siRNA は約 20% の蛋白発現を抑えた。 RNAi の特徴でも記述したように RNAi は配列特異性が高いことから, 今回の低い抑制率は siRNA の設計を見直す必要があると考えられる。

【おわりに】

創薬研究においては RNAi 法を用いることでこれまで想像できなかったような新薬が登場する可能性を十分に秘めている。 たとえば, 武田薬品工業はすい臓細胞の表面にある GPR40 という蛋白質がインスリン分泌に重要な役割を果たしていることを RNAi を用いて明らかにし, 新しい糖尿病治療薬への期待が高まっている。 このように, RNAi 法の応用は当面, 新薬開発につながる新規有用遺伝子の探索や遺伝子の機能解明が中心になると思われる。 RNA は非常に不安定であることから, siRNA を治療薬として用いる場合には, 患部への輸送が今後大きな問題になると思われる。 安全性の高い siRNA のドラッグデリバリーシステムが完成できれば, この方法は将来のオーダーメイド医療としての新しい遺伝子治療法になると思われる。