

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

RNAi耐性ウイルス株の出現に対処する第二
世代のRNAi医薬品の開発に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高久 洋

平成19(2007)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
RNAi 耐性ウイルス株の出現に対処する第二世代の RNAi 医薬品の開発に関する研究	1
高久 洋	
II. 分担研究報告	
1. 第二世代 RNAi ベクターによる免疫誘導回避の検討に関する研究	5
橋本 香保子	
2. 新たな第二世代 RNAi ベクターシステムと HIV-1 発現抑性能についての評価に関する研究	7
黒崎 直子	
3. 第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価とそのメカニズムの解析に関する研究	9
山本 典生	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	1 1
IV. 研究成果の刊行物・別刷	1 4

研究要旨

現在認可を受けている抗 HIV 剤のうちヌクレオシド類似体などの逆転写阻害剤やプロテアーゼ阻害剤は薬剤耐性 HIV-1 変異体の出現とともに長期服用による副作用の問題を抱えている。これらの化学療法剤に代わる治療法として、RNA interference (RNAi) 法を用いた遺伝子治療が考えられている。

しかし、最近 siRNA で HIV-1 感染細胞を約一ヶ月処理したところ HIV-1 遺伝子に変異と欠損が起こり、RNAi 効果が消失することが報告された。このように短期治療ではどの薬剤より強力な抗エイズ薬となりうと思われるが、現在実際に治療に用いられているような薬剤と同じ RNAi 耐性ウイルス株の問題が生じた。そこで本研究では、RNAi の高い機能を生かしつつ、長期にわたってウイルス産生を抑制出来るような遺伝子医薬品の開発を遂行する。具体的には、HIV の複製に重要で高い保存領域であると考えられる HIV-1 non-coding 領域(DIS)を標的とした shRNA 発現レンチウイルスベクターを作製し、これを安定的に持続発現する細胞株を構築した。これに HIV-1 を感染させると長期間に渡り抗 HIV-1 効果が持続することを確認した。また、従来の siRNA はインターフェロンを誘導するが、これらに対処できる新規の siRNA を見いだしたので、それらの作用機構を培養細胞系で明らかにした。

分担研究者：橋本 香保子（千葉工業大学工学部 講師）

黒崎 直子（千葉工業大学工学部 講師）

山本 典生（東京医科歯科大学医学部助手）

A. 研究目的

本研究は第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価を行うと共にその発現メカニズムを詳細に解析することを目的とする。現在使われている抗 HIV 剤は逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が中心であるが、それぞれ薬剤耐性株の出現という問題を抱えている。この問題を解決するひとつの方法は、これらの薬剤とは異なる作用点を持ち薬剤耐性株に対しても有効なアプローチを含めた新規治療法を開発することであり、RNAi を用いた遺伝子治療は有力なアプローチと考えられる。しかし、Phage Polymerase により合成された RNA は、IFN を誘導し、非特異的な効果で標的遺伝子の発現を抑制することが問題となっている。そこでこの問題を解決するために、本研究では shRNA の 5'側に G 残基を含む RNA(pppG(n)-shRNA)を付加することで IFN の産生を回避することを見出した。この手法で HIV-1 の二量化に重要な DIS(dimerization initiation site)を標的とした shRNA(pppG-shRNA/DIS)を合成し、HIV-1 抑制効果と IFN 誘導について検討した。また同 shRNA をレンチウイルスベクターに組み込み、その抗 HIV-1 活性および変異ウイルスの出現についても検討した。さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発し、シングルラウンドインフェクション系を用いて評価した。

B. 研究方法

shRNA は HIV-1 の PBS(primer binding site)下流にある DIS 領域において 21 塩基を標的としたものを 5 種類 T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した。shRNA は HeLa CD4⁺細胞に導入した際の IFN 産生と CPE をそれぞれ検討した。つぎに shRNA(100pmol)を HIV-1 発現プラスミド

(pNL-luc または pNL4-3)と共に HeLa CD4⁺細胞へ導入し、48 時間培養後の細胞内のルシフェラーゼ活性または上清中の p24 蛋白質量を測定した。また、ウエスタンブロット法にて各種ウイルスタンパク質(Pr55gag, vif, tat, nef)の発現も確認した。つぎに、これらの shRNA 配列を組込んだレンチウイルスベクターを作製し、Sup T1 細胞に感染させた。そこに野生株ウイルスを感染させ、感染阻害効果ならびに耐性ウイルス株の出現について検討した。

Jurkat 細胞に CS-TAR, CS-vif, CS-vif-TAR を M.O.I.=20 で感染し、数日培養した後に wild-type HIV-1 (HXB2)、薬剤耐性 HIV-1(HXB2 をバックボーンとして持ち、なおかつ薬剤耐性変異を持ったクローン)をそれぞれ感染させ、p24 を測定した。薬剤耐性 HIV-1 としては、nRTI(nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor)耐性ウイルスとして M41L(AZT, d4T 耐性)、K65R(d4T, ddI, ddC, abacavir, tenofovir 耐性)、T215Y(AZT, d4T 耐性)を用い、PI(protease inhibitor)耐性ウイルスとして D30N(nelfinavir 耐性)、G48V(saquinavir 耐性)、L90M(indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir 耐性)を用いた。

また、env 欠損 VSV-G-pseudotyped NL4-3 (NL4-3 delta env/VSV-G)を用いたシングルラウンドインフェクション系を用いて、第二世代 RNAi ベクターの作用点を real-time PCR 法により解析した。測定には ABI7700 sequence detector system を用いた。

(倫理面への配慮)

HIV-1 の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起こらないよう配慮した。

C. 研究結果

T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した ppp(n)-shRNA は n=0,1 では IFN-βの産生と CPE が見られたが、n=2 以上ではそれらのサイドリアクションは見られなかった。

DIS 領域を標的とした shRNA と pNL-luc を細胞に導入したところ、5 種類全てにおいてルシフェラーゼ活性が抑制され、特にステムループを標的とした shRNA では約 80%の抑制効果を示した。つぎに pNL4-3 と最もルシフェラーゼ活性を抑制した shRNA と vif を標的とした shRNA を細胞に導入し、上清中の p24 発現量を測定したところ、両者共に約 80%の減少が見られた。また、細胞内のウエスタンブロット法にてウイルスタンパク質 (Pr55gag, vif, tat, nef) の発現確認したところ、vif の shRNA は vif タンパク質のみ発現を抑制したが、DIS の shRNA は 4 種類のタンパク質全ての発現を抑制した。またこの shRNA を組込んだレンチウイルスベクターを感染させた細胞は野生型ウイルスを感染させても約 50 日間にわたり、ウイルスの発現が見られなかった。

CS-vif-TAR は Wild-type HIV-1 と同様、6 種類の薬剤耐性 HIV-1 についてもウイルスの増殖を強く抑制した (約 90% の抑制)。CS-vif や CS-TAR でも抑制活性はあるが、CS-vif-TAR ほどではなかった (CS-vif では 60%程度の抑制、CS-TAR では 50%程度の抑制)。以上から TAR-decoy と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。

また、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、real-time PCR 法によってウイルス DNA および RNA の定量を行った。CS-vif-TAR, CS-vif では逆転写されたウイルス DNA の量が半分ほどに減少した。CS-TAR ではライフサイクル前期過程における減少はほとんど認められなかった。RNA については、CS-vif-TAR で最も減少しており、ついで CS-vif, CS-TAR の順であった。

D. 考察

shRNA の 5'側の G 残基数が 2 または 3 で IFN 産生を回避することが示唆された。また、shRNA の標的遺伝子を DIS とすることは高い HIV-1 産生阻害効果を示し、複数のウイルスタンパク質を同時に抑制することが期待されることが示唆された。

さらに CS-vif-TAR が種々の薬剤耐性 HIV-1 に対して有効であることが明らかとなった。このことは、従来の HAART と本研究で用いている第二世代 RNAi ベクターを組み合わせることで、より効果の高い治療法が開発可能であることを意味している。このような新しい治療法の開発は極めて重要であると考えられる。

また、CS-vif-TAR の作用点は、ウイルスライフサイクルにおける前期と後期にあり、前期と後期の中でも後期が主な作用点であることが明らかとなった。前期過程で sh-vif によるウイルス RNA の分解がそれほど効率よく起こらないのは、ウイルス RNA が速やかに逆転写されてしまうからであろう。以上の結果より TAR decoy による転写抑制と shRNA-vif による RNA 分解の相乗効果によってウイルス複製が強く抑制されていると考えられる。

E. 自己評価

1) 達成度について

Phage Polymerase により合成された RNA が IFN を誘導

し、非特異的な効果で標的遺伝子の発現を抑制する問題を本手法では完全に解決する方法論を確立したことで、今後の臨床応用への期待が高まる。また、DIS 領域は同時に複数のウイルスタンパク質の発現を抑制することを見出したので、この領域が新たな抗ウイルス遺伝子としての重要な箇所であることが明らかとなった。

また、種々の薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価については複数の薬剤耐性 HIV-1 に対して第二世代 RNAi ベクターが有効であることを示せたことから、目標を達成することができたと考えている。さらに第二世代 RNAi ベクターの作用点についての解析については、CS-vif-TAR の作用点がウイルスライフサイクルにおける前期と後期にあり、両者の中でも後期が主な作用点であることを示すことができた。以上のことから全体として、今年の研究目標はクリアできたと判断している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

エイズは現在でも非常に多数の患者が世界中にあり、HIV-1 感染症は人類が解決すべき大きな問題である。HIV-1 は非常に変異を起こす率が高いことが知られており、それが薬剤耐性を獲得しやすいことにつながっている。薬剤耐性株の問題を解決するには、作用点異なる治療戦略を含んだ新たな併用療法を開発することが有効であるが、本研究で用いた第二世代 RNAi ベクターはその候補として重要な位置を占めるのではないかと考えられる。エイズが国際的・社会的に大きな問題であることを考えれば、本研究の国際的・社会的意義の大きさは明らかである。

3) 今後の展望について

今後は shRNA を将来臨床応用への足掛かりとするために、免疫学的アプローチとして、shRNA/decoy-RNA または shRNA/EGSs の自然免疫誘導シグナルの解析を行う予定である。さらにレンチウイルスベクターに組込んだ shRNA/decoy-RNA または shRNA/EGSs を HIV 感染マウスモデルである hu-PBL-SCID マウスへ Ex vivo で投与し、生体内における抗 HIV-1 活性および安定性、発現効率、発現部位、体内代謝、安全性を検討する (平成 19 年度より熊本大岡田教授が感染マウスモデルでの実験を遂行するために本研究に参画する)。

なお、次年度は最終年度でもあるのでこれまでの研究成果を取りまとめ総括する。

F. 結論

5'側に 2 つ以上の G 残基を付加することにより、これまで問題視されてきた shRNA の非特異的な遺伝子抑制とサイトカインの産生を抑えることができることが明らかとなった。また shRNA の新たな標的として DIS 領域が同時に複数のウイルスタンパク質の発現を抑制するだけでなく、耐性ウイルスの出現も避けられることが明らかとなった。以上のことから、本研究によって作製された第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法の開発が可能であることを意味する。

また、TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR が、多剤耐性変異株を含む薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制すること、および抗ウイルス効果の作用点が主に後期過程にあることが明らかとなった。HIV-1 感染症の世界的な広がりや薬剤耐性株出現という問題を考えると、このような新しい治療法の開発は国際的にも社会的にも極めて大きな意義を持つものと考えられる。

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特願 2006-016808

バキュロウイルスベクターを利用した HIV 感染症治療薬（平成 18 年 1 月 25 日）

2. 特願 2006-275715

バキュロウイルスベクターを利用した肝障害の予防・治療剤（平成 18 年 10 月 6 日）

H. 研究発表

原著論文

1) Nagawa T., Habu Y., Matsumoto N., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Long term transgene expression and inhibition of HIV-1 replication by a Cre/loxP-EBNA-1oriP HIV-1 dependent ribozyme vector: applications for HIV-1 gene therapy. *J.RNAi Gene Silencing*, **2**, 145-153.

2) Ikeda M., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Suppression of HIV-1 replication by a combination of endonucleolytic ribozymes (RNase P and tRNase ZL). *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.*, **25**, 427-437.

3) Kitajima M., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **343**, 378-384.

4) Hamazaki H., Ujino S., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H. (2006) Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **343**, 988-994.

5) Hamazaki H., Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H. (2006) Inhibition of HCV replication in HCV replicon by siRNAs. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* **25**, 801-805.

6) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* **25**, 795-799.

7) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori T., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems. *Antiviral Chem. Chemother.*, **17**, 241-249.

8) Kaneko H., Suzuki H., Abe T., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Inhibition of HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector-transduced ribozyme in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **349**, 1220-1227.

9) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Kusunoki A., Mouri

Y., and Takaku H. (2006) HIV gene therapy using RNA virus systems. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **50**, 79-80.

著書

1) 黒崎直子, 羽生勇一郎, 高久洋 (2006.1) 生体内 RNA プロセッシング(RNase P/tRNase ZL 誘導型ガイド RNA テクノロジー) 遺伝子医学 MOOK 4 RNA と創薬 編集: 中村義一 (株) メディカルドゥ p152-157.

2) Hamazaki H., Ujino S., and Takaku H. (2006) Short hairpin RNA synthesized by phage polymerase do not induce interferon in hepatitis C virus subgenomic replicons. *RNAi Therapeutics*. Eds. Takaku H., and Yamamoto N. *Transworld Research Network, India*, in press.

学会発表

国内

1. Kitajima M., Abe T., Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., Takaku H. : Induction of NK cell-dependent anti-tumor immunity by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. 第 36 回日本免疫学会 大阪 (2006.12)

2. 酒井亮, 宮武克年, 篠原可奈, 山本紘士, 斎藤諒, 宮澤悠樹, 黒崎直子, 高久洋, 中山俊憲, 板倉光夫, 橋本香保子: 抗原タンパク質提示に関与する分泌小胞輸送分子複合体の解析. 第 36 回日本免疫学会 大阪 (2006.12)

3. 鈴木友幸, 橋本香保子, 鈴木等, 酒井亮, 斎藤諒, 宮澤悠樹, 黒崎直子, 高久洋: 昆虫病原性バキュロウイルスの感染が誘導する自然免疫活性の解析. 第 36 回日本免疫学会 大阪 (2006.12)

4. 権代拓麻, 山口和也, 黒崎直子, 高久洋: Phage Polymerase により合成された shRNA による HIV-1 抑制効果とサイドリアクションの検討. 第 20 回日本エイズ学会 東京 (2006.11-12)

5. 羽生勇一郎, 木下幸一, 杉山隆一, 堀正樹, 黒崎直子, 高久洋: Ribonuclease 誘導型ガイド RNA 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 抑制. 第 20 回日本エイズ学会 東京 (2006.11-12)

6. 早船正哲, 黒崎直子, 毛利友香, 高久洋: レンチウイルスベクターを用いた DNazyme の発現とその抗 HIV-1 活性. 第 20 回日本エイズ学会 東京 (2006.11-12)

7. 野口耕世, 石津賀夫, 黒崎直子, 高久洋: shRNA 発現機構の開発. 第 16 回アンチセンスシンポジウム 京都 (2006.11)

8. 早船正哲, 楠秋子, 毛利友香, 黒崎直子, 高久洋: HIV-1 変異株産生を回避する DNazyme の発現ベクターの構築とその抗 HIV-1 活性. 第 16 回アンチセンスシンポジウム 京都 (2006.11)

9. 宇治野真之, 黒崎直子, 下遠野邦忠, 高久洋: 17-AAG による HCV 増殖抑制効果の検討とウイルスに対する Hsp90 の作用機序の解析. 第 54 回日本ウイルス学会 名古屋 (2006.11)

10. 鈴木等, 金子央賢, 黒崎直子, 下遠野邦忠, 松浦善治, 高久洋: shRNA 発現バキュロウイルスベクターは HCV コア蛋白質の発現を抑制する. 第 54 回日本ウイルス学会 名古屋 (2006.11)

11. 大成亜季, 黒崎直子, 高久洋: HIV-1 non-coding 領域 (DIS) を標的とした shRNA による HIV-1 産生阻害効果の検討. 第 54 回日本ウイルス学会 名古屋 (2006.11)

12. 斎藤大史, 石川麻由子, 大野亜希子, 黒崎直子, 高

久洋：RNAi による A 型および B 型インフルエンザウイルスの増殖抑制。第 54 回日本ウイルス学会 名古屋 (2006.11)

13. 北島雅之、阿部隆之、黒崎直子、谷口克、中山俊憲、高久洋：AcMNPV による NK 細胞依存的抗腫瘍免疫の誘導。第 65 回日本癌学会 横浜 (2006.9)

14. 加藤恵次郎、羽生勇一郎、黒崎直子、高久洋：非特異的配列により HIV-1 増殖効果を示す RNA の解析。第 16 回抗ウイルス化学療法研究会 福島 (2006.5)

15. 鈴木等、金子央賢、黒崎直子、下遠野邦忠、松浦善治、高久洋：shRNA 発現バキュロウイルスベクターによる HCV コア蛋白質発現抑制についての検討。第 16 回抗ウイルス化学療法研究会 福島 (2006.5)

国際会議

1. Abe T, Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Matsuura Y., and Takaku H. Baculovirus (CpG motifs) induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus A and B infection in mice. The Second International Conference on Influenza Vaccines for the World, Vienna, Austria (2006.10)

2. Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Nakayama T., and Takaku H. : Induction of Innate immunity by Baculovirus. 2006 ISCGT Japan, Chiba Japan (2006.10)

3. Gondai T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Lack of interferon(IFN) Response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2-3)-shRNA. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)

4. Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Short Hairpin siRNA Constructs Targeted to the HCV Core Protein Confer HCV RNA Suppression. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)

5. Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Ikeda M., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 Replication by a Combination of RNaseP and 3'tRNase-associated External Guide Sequences (EGSs) in Mammalian Cells. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)

6. Hamazaki H., Ujino S., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Inhibition of Hepatitis C virus RNA Replication by Short Hairpin RNA Synthesized T7 RNA Polymerase in

Hepatitis C virus Subgenomic Replicons. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)

7. Suzuki H., Kaneko H., Tamai N., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., and Takaku H.: Suppression of HCV RNA replication by baculovirus-mediated shRNA expression vectors. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Cairns, Australia (2006.8)

8. Ujino S., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Shimotohno K., and Takaku H.: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, affects hepatitis C virus (HCV) protein suppression. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Cairns, Australia (2006.8)

9. Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.: Non-interferon(IFN) induction by shRNA synthesized by phage polymerase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)

10. Ujino S., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, affects hepatitis C virus (HCV) protein suppression. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)

11. Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Nakayama T., and Takaku H.: Induction of anti-tumor immunity by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)

12. Habu Y., Barnor J., Yamamoto N., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., Ishikawa K., Yamamoto N., Ofori-Adjei D., and Takaku H.: The second Generation RNAi Drug Agent Which Deals with RNAi Escape HIV-1 Variants. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)

13. Saitoh H., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H.: Inhibition of Influenza Virus A and B Production by RNA Interference. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)

14. Takaku H., Abe T., Takahashi H., and Miyano-Kurosaki N.: Baculovirus (CpG Motifs) Induces an Innate Immune Response and Confers Protection From Lethal Influenza Virus A and B Infection in Mice. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)

研究要旨

これまで Phage Polymerase により合成された siRNA は、インターフェロン(IFN)を誘導し、非特異的な効果で標的遺伝子の発現を抑制することが知られていたが、shRNA の 5'オーバーハングに G 残基を付加することで IFN 産生を回避することを見出した。この手法で合成した HIV-1 の Dimerization Initiation Site (DIS)領域を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS)は配列特異的に遺伝子発現を抑制し、細胞変性効果も回避することができた。

A. 研究目的

Phage Polymerase により合成された siRNA は、インターフェロン(IFN)を誘導し、非特異的な効果で標的遺伝子の発現を抑制することが知られている。本研究では、shRNA の 5'オーバーハングに G 残基を付加することで IFN 産生を回避することを発見した。そこで HIV-1 の Dimerization Initiation Site (DIS) 領域を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS) を合成し、その HIV-1 発現抑制効果と shRNA による副反応について検討した。

B. 研究方法

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした pppG(n)-shLuc3 (n=0,1,2,3)を T7 RNA ポリメラーゼを用いて *in vitro* 転写合成した。それを HeLa CD4⁺細胞へ導入したときの副反応を IFN-β産生、CPE 解析、MTS assay にて検討した。

つぎに、HIV-DIS を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNADIS)とルシフェラーゼ遺伝子を標的とした shRNA(pppG(n)-shRNALUC) (n=0,1,2,3)を T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成した。合成した pppG(n)-shRNADIS と pNL4-3 を HeLa CD4⁺細胞に導入し、細胞変性効果(CPE)ならびに 48 時間後の p24 抗原量を定量した。

また、ウイルス非感染下で shRNA 導入による副反応も IFN-β産生、CPE 解析、MTS assay にて検討した。

C. 研究結果

pppG(n)-shLuc3 (n=0,1,2,3)を HeLa CD4⁺細胞へ導入した結果、n=0,1 では IFN-β産生、CPE、細胞生存率の低下が見られたが、n=2 および 3 ではそのような現象はみられなかった。そこで、IFN-β産生を産生しなかった n=2 の pppG(n)-shDIS を合成し、HIV-1 抑制効果を検討したところ、約 70%の抗 HIV-1 活性が得られた。また、shRNA 導入後の IFN-β産生、CPE、細胞生存率の低下はみられなかった。

D. 考察

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした shRNA の 5'オーバーハングに含まれる G 残基数が、2 または 3 で IFN-βの産生を回避することができることが示唆された。また、G 残基数を 2 として DIS を標的とした shRNA を細胞に導入した場合も IFN は産生されず、p24 抗原の産生は抑制されたことから、pppG(n)-shRNADIS は非特異的な RNA 発現制御ではなく、配列特異的な遺伝子発現を抑制することができることが示唆された。

E. 結論

Phage Polymerase により合成された shRNA は、IFN の産生を回避し、標的細胞に傷害を与えることなく、標的配列特異的にその発現を制御することを確認した。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hasegawa A., Miki T., Hosokawa H., Hossain MB., Shimizu C., Hashimoto K., Kimura MY., Yamashita M., Nakayama T.(2006) Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. J Immunol. 176, 2546-2554.

2. 学会発表

- 1) Gondai T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Lack of interferon(IFN) Response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2-3)-shRNA. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 2) Kitajima M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., Nakayama T., and Takaku H.: Induction of anti-tumor immunity by the baculovirus Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)
- 3) Hashimoto K., Miyatake K., Takaku H., Miyano-Kurosaki N., Nakayama T., Itakura M.: The unique transport

molecules, Sec8 molecules in exocyst complex expressed in the dendritic cells, implicate the rheumatoid arthritis. 9th International Conference on Dendritic Cells. Edinburgh, UK (2006.9)

4) 酒井亮、宮武克年、篠原可奈、山本紘士、斎藤諒、宮澤悠樹、黒崎直子、高久洋、中山俊憲、板倉光夫、橋本香保子：抗原タンパク質提示に関与する分泌小胞輸送分子複合体の解析。第36回日本免疫学会 大阪 (2006.12)

5) 鈴木友幸、橋本香保子、鈴木等、酒井亮、斎藤諒、宮澤悠樹、黒崎直子、高久洋：昆虫病原性バキュロウイルスの感染が誘導する自然免疫活性の解析。第36回日本免疫学会 大阪 (2006.12)

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究要旨

第二世代 RNAi ベクターシステムとして HIV-1 non-coding 領域(DIS)に対する shRNA 発現ベクターを作製し、長期的 HIV-1 増殖抑制効果とそれに伴う変異ウイルス株の出現について検討を行った。shRNA の標的をウイルスゲノムの二量体開始領域とすることで、ウイルス変異株の出現を抑制し、長期的にウイルス産生抑制効果を持続させることが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

RNAi は強力な遺伝子干渉ツールとして利用されているが、RNA ウイルスを標的とした場合、ウイルス配列に高頻度に変異が起こる問題を抱えている。本研究は第二世代 RNAi ベクターシステムとして HIV-1 non-coding 領域(DIS)に対する shRNA 発現ベクターを作製し、長期的 HIV-1 増殖抑制効果とそれに伴う変異ウイルス株の出現について検討を行った。

B. 研究方法

第二世代 RNAi ベクターは、HIV-1 non-coding 領域(DIS)を標的とした shRNA を発現するレンチウイルスベクター(CS-U6-DIS, CS-U6-vif, CS-U6-lacZ)を作製し、それぞれを Sup T1 細胞に moi=20 で感染させ、stable 細胞を樹立した。それぞれの細胞に HIV-1_{NL4.3} を moi=0.1 で感染させた後、経時的に HIV-1 増殖抑制能について評価をした。

また、ウイルス RNA の shRNA 標的部位の配列を解析し、shRNA 耐性株の出現についても同時に検討した。

C. 研究結果

vif-shRNA の stable 細胞株では HIV-1 感染後 14 日目まで高いウイルス産生阻害効果を示していたが、21 日目から培養上清中のウイルス量が増加しはじめ、49 日目では抗ウイルス活性は失われた。それに対して、DIS-shRNA の stable 細胞株では 49 日目においても強い抗ウイルス活性がみられた。

また、培養上清中のウイルス遺伝子配列を解析したところ、vif-shRNA は 21 日目から HIV-1 標的配列の変異が出現しはじめ、35 日目には標的配列外の遺伝子配列にも変異や欠損がみられた。それに対して、DIS-shRNA は 49 日目でも変異ウイルスの出現はみられなかった。

D. 考察

vif-shRNA の stable 細胞株では 21 日目から HIV-1 標的配列の変異が出現しはじめ、RNAi の塩基配列特異性から HIV-1 産生阻害効果を失っていたことが示唆された。それに対し、DIS-shRNA の stable 細胞株では標的塩基配列の変異が生じないため HIV-1 産生阻害効果が長期間保たれることが示唆された。これは、本研究で用いた DIS 領域の配列が HIV-1 複製過程において大きく関与するために、他の遺伝子配列よりも高度に保存された配列を有しているためであると考えられる。

E. 結論

DIS-shRNA は長期間野生型 HIV-1 の発現を抑制することや耐性ウイルスの発現を生じない可能性が高いことが明らかとなった。このことから DIS を HIV-1 に対する RNAi の標的とすることで、他の遺伝子を標的とするよりも長期間抗ウイルス活性を保つことが示唆された。以上のことから、本研究によって作製された第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法の開発が可能であることを意味する。

E. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
なし

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

論文発表

- 1) Miyano-Kurosaki N., Kurosaki K., Takaku H., Hayafune M., Endo T., A. Tomoda A. (2006) 2-Aminophenoxazine-3-one suppresses the growth of mouse malignant melanoma B16 cells transplanted into C57/Bl6Cr Slc mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **29**, 2197-2201.
- 2) Ikeda M., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., and Takaku H. (2006) Suppression of HIV-1 replication by a combination of endonucleolytic ribozymes (RNase P and

combination of endonucleolytic ribozymes (RNase P and tRNase ZL). *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **25**, 427-437.

- 3) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. **25**, 795-799.
- 4) Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori T., and Takaku H. (2006) Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems. *Antiviral Chem.Chemother.*, **17**, 241-249.

(著書)

黒崎直子、羽生勇一郎、高久洋 (2006.1) 生体内 RNA プロセッシング(RNase P/tRNase ZL 誘導型ガイド RNA テクノロジー) 遺伝子医学 MOOK 4 RNA と創薬 編集: 中村義一 (株) メディカルドゥ p152-157.

学会発表

海外

- 1) Gondai T., Miyano-Kurosaki N., Hashimoto K., and Takaku H.: Lack of interferon(IFN) Response to T7 Transcribed pppG(n)(n=2-3)-shRNA. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 2) Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Ikeda M., and Takaku H.: Inhibition of HIV-1 Replication by a Combination of RNaseP and 3'tRNase-associated External Guide Sequences (EGSs) in Mammalian Cells. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Bern, Switzerland (2006.9)
- 3) Gondai T., Yamaguchi K., Miyano-Kurosaki N., and Takaku

H.: Non-interferon(IFN) induction by shRNA synthesized by phage polymerase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan (2006.6)

- 4) Habu Y., Barnor J., Yamamoto N., Hashimoto K., Miyano-Kurosaki N., Ishikawa K., Yamamoto N., Ofori-Adjei D., and Takaku H.: The second Generation RNAi Drug Agent Which Deals with RNAi Escape HIV-1 Variants. 19th International Conference on Antiviral Research, Puerto Rico, USA (2006.5)
- 5) Barnor J.S., Miyano-Kurosaki N., Takaku H. Development of novel second-generation anti-HIV shRNAs for HIV gene therapy application. HIV DART 2006, Cancun, Mexico (2006.12)

国内

- 1) 権代拓麻、山口和也、黒崎直子、高久洋: Phage Polymerase により合成された shRNA による HIV-1 抑制効果とサイドリアクションの検討。第 20 回日本エイズ学会 東京 (2006.11-12)
- 2) 羽生勇一郎、木下幸一、杉山隆一、堀正樹、黒崎直子、高久洋: Ribonuclease 誘導型ガイド RNA 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 抑制。第 20 回日本エイズ学会 東京 (2006.11-12)
- 3) 野口耕世、石津賀夫、黒崎直子、高久洋: shRNA 発現機構の開発。第 16 回アンチセンスシンポジウム 京都 (2006.11)
- 4) 大成亜季、黒崎直子、高久洋: HIV-1 non-coding 領域(DIS) を標的とした shRNA による HIV-1 産生阻害効果の検討。第 54 回日本ウイルス学会 名古屋 (2006.11)

研究要旨

薬剤耐性株に対して第二世代 RNAi ベクターが有効かどうかの評価を行うことを目的とした。第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発した。その結果、TAR-decoy と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。また、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするために、プライマー配列にタグをつける等の工夫を加えることで、非特異的増幅を大幅に減少させた特異性の高い新規 real-time nested PCR 法の開発に成功した。

A. 研究目的

本研究は第二世代 RNAi ベクターの薬剤耐性 HIV-1 に対する抗ウイルス効果の評価を行うと共にその抗ウイルス効果発現メカニズムを詳細に解析することを目的とする。現在使われている抗 HIV 剤は逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤が中心であるが、それぞれ薬剤耐性株の出現という問題を抱えている。この問題を解決するひとつの方法は、これらの薬剤とは異なる作用点を持ち薬剤耐性株に対しても有効なアプローチを含めた新規治療法を開発することであるが、RNAi を用いた遺伝子治療は有力なアプローチと考えられる。そこで、種々の薬剤耐性株に対して第二世代 RNAi ベクターが有効かどうかの評価を行うこととした。さらに、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、特異性の高い新規 real-time nested PCR 法を開発し、シングルラウンドインフェクション系を用いて評価した。

B. 研究方法

Jurkat 細胞に CS-TAR, CS-vif, CS-vif-TAR を M.O.I.=20 で導入し、数日培養した後に wild-type HIV-1 (HXB2), 薬剤耐性 HIV-1(HXB2 をバックボーンとして持ち、なおかつ薬剤耐性変異を持ったクローン)をそれぞれ感染させ、p24 を測定した。薬剤耐性 HIV-1 としては、nRTI(nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor)耐性ウイルスとして M41L(AZT, d4T 耐性)、K65R(d4T, ddI, ddC, abacavir, tenofovir 耐性)、T215Y(AZT, d4T 耐性)を用い、PI(protease inhibitor)耐性ウイルスとして D30N(nelfinavir 耐性)、G48V(saquinavir 耐性)、L90M(indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir, atazanavir 耐性)を用いた。

また、env 欠損 VSV-G-pseudotyped NL4-3 (NL4-3 delta env/VSV-G)を用いたシングルラウンドインフェクション

系を用いて、第二世代 RNAi ベクターの作用点を real-time PCR 法により解析した。測定には ABI7700 sequence detector system を用いた。

(倫理面への配慮)

HIV-1 の感染実験は P3 で行い、環境中への拡散が起こらないよう配慮した。

C. 研究結果

CS-vif-TAR は Wild-type HIV-1 と同様、6 種類の薬剤耐性 HIV-1 についてもウイルスの増殖を強く抑制した(約 90% の抑制)。CS-vif や CS-TAR でも抑制活性はあるが、CS-vif-TAR ほどではなかった(CS-vif では 60%程度の抑制、CS-TAR では 50%程度の抑制)。以上から TAR-decoy と vif shRNA を結合させた small RNA は薬剤耐性株に対しても非常に有効であることが分かった。

また、第二世代 RNAi ベクターが、ウイルスライフサイクル上のどの点に作用することで抗ウイルス効果を発揮するのか明らかにするため、real-time PCR 法によってウイルス DNA および RNA の定量を行った。CS-vif-TAR, CS-vif では逆転写されたウイルス DNA の量が半分ほどに減少した。CS-TAR ではライフサイクル前期過程における減少はほとんど認められなかった。RNA については、CS-vif-TAR で最も減少しており、ついで CS-vif, CS-TAR の順であった。

D. 考察

CS-vif-TAR が種々の薬剤耐性 HIV-1 に対して有効であることが明らかとなった。このことは、従来の HAART と本研究で用いている第二世代 RNAi ベクターを組み合わせることで、より効果の高い治療法が開発可能であることを意味している。このような新しい治療法の開発は

極めて重要であると我々は考える。

また、CS-vif-TAR の作用点は、ウイルスライフサイクルにおける前期と後期にあり、前期と後期の中でも後期が主な作用点であることが明らかとなった。前期過程で sh-vif によるウイルス RNA の分解がそれほど効率よく起こらないのは、ウイルス RNA が速やかに逆転写されてしまうからであろう。TAR decoy による転写抑制と sh-vif による RNA 分解の相乗効果によってウイルス複製が強く抑制されていると考えられる。

E. 結論

本研究によって TAR-decoy と vif sh RNA を組み合わせた CS-vif-TAR が、多剤耐性変異株を含む薬剤耐性 HIV-1 の増殖を強く抑制すること、および抗ウイルス効果の作用点が主に後期過程にあることが明らかとなった。

以上のことは、第二世代 RNAi ベクターと従来の HAART を組み合わせることで、より効果の高い新規治療法が開発可能であることを意味する。HIV-1 感染症の世界的な広がりや薬剤耐性株出現という問題を考えると、このような新しい治療法の開発は国際的にも社会的にも極めて大きな意義を持つものと研究分担者は考える。

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

G. 健康危険情報

特に無し

H. 研究発表

論文発表

1) Yamamoto T, Miyoshi H, Yamamoto N, Yamamoto N, Inoue

J, Tsunetsugu-Yokota Y., Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. Blood. 2006 Nov 15;108(10):3305-12.

2) Shigeta S, Mori S, Yamase T, Yamamoto N, Yamamoto N.

Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. Biomed Pharmacother. 2006 Jun;60(5):211-9.

3) Horiuchi S, Yamamoto N, Dewan MZ, Takahashi Y, Yamashita A, Yoshida T, Nowell MA, Richards PJ, Jones SA, Yamamoto N., Human T-cell leukemia virus type-I Tax induces expression of interleukin-6 receptor (IL-6R): Shedding of soluble IL-6R and activation of STAT3 signaling. Int J Cancer. 2006 Mar 23

4) Yamamoto N, Tanaka C, Wu Y, Chang MO, Inagaki Y, Saito Y, Naito T, Ogasawara H, Sekigawa I, Hayashida Y., Analysis of human immunodeficiency virus type 1 integration by using a specific, sensitive and quantitative assay based on real-time polymerase chain reaction. Virus Genes. 2006 Feb;32(1):105-13.

口頭発表

国内

1) 山本典生、山本直樹

NAF-1 による HIV-1 複製抑制メカニズムの解析

第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会 2006 年 12 月 3 日

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高久 洋	生体内RNAプロセシング(RNase P/tRNase ZL誘導型ガイドRNAテクノロジー)	中村義一	RNA工学の最前線	(株)メデイカルドゥ	日本	2006	p152-157
Takaku H.	Short hairpin RNA synthesized by phage Polymerase do not induce interferon in hepatitis C virus subgenomic replicons.	Takaku H. Yamamoto N.	RNAi Therapeutics	Transworld Research Network	India	2006	P67-78
高久 洋	RNA医療工学: ウイルス感染症の治療への応用(HIVへの戦略)	河合剛太 金井昭夫	機能性Non-coding RNA	(株)クバプロ	日本	2006	P203-219
黒崎 直子	生体内RNAプロセシング(RNase P/tRNase ZL誘導型ガイドRNAテクノロジー)	中村義一	RNA工学の最前線	(株)メデイカルドゥ	日本	2006	p152-157
Miyano-Kurosaki N.	Suppression of HIV-1 replication by shRNA.	Takaku H. Yamamoto N.	RNAi Therapeutics	Transworld Research Network	India	2006	P43-53
黒崎 直子	RNA医療工学: ウイルス感染症の治療への応用(HIVへの戦略)	河合剛太 金井昭夫	機能性Non-coding RNA	(株)クバプロ	日本	2006	P203-219
Yamamoto N.	RNAi and SARS.	Takaku H. Yamamoto N.	RNAi Therapeutics	Transworld Research Network	India	2006	P79-99

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagawa T., Habu Y., Matsumoto N., Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Long term transgene expression and inhibition of HIV-1 replication by a Cre/ loxP EBNA-oriP HIV-1 dependent ribozyme vector: applications for HIV-1 gene therapy.	J.RNAi Gene Silencing	2	145-153	2006
Ikeda m., Habu Y., Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Suppression of HIV-1 replic ation by a combination of endonucleolytic ribozymes (RNase P and tRNase ZL).	Ncleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	25	427-437	2006
Kitajima H., Hamazaki H., Miyano-Kurosaki N., Takaku H.	Characterization of baculovirus <i>autographa</i> <i>californica</i> multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mammalian cells.	Biochem. Biophys.Res. Comm.	343	378-384	2006
Hamazaki H., Ujino S., Miyano- Kurosaki N., Shimotohno K., Takaku H.	Inhibition of hepatitis C Virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons.	Biochem. Biophys.Res. Comm.	343	988-994	2006
Hamazaki H., Takahashi H., Miyano-Kurosaki N., Shimotohno K., Takaku H.	Inhibition of HCV replication in HCV replicon by siRNAs.	Ncleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	25	801-805	2006
Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Takaku H .	Silencing of HIV-1 gene expression by siRNAs in transduced cells. .	Ncleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	25	795-799	2006
Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Park W.S., Moori T., Takaku H.	Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems.	Antiviral Chem. Chemother.	17	241-249	2006
Kaneko H., Suzuki H., Abe T., Miyano- Kurosaki N., Takaku H.	Inhibition of HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector- transduced ribozyme in mammalian cells.	Biochem. Biophys.Res. Comm.	349	1220-1227	2006
Hayafune M., Miyano-Kurosaki N., Kusunoki A., Mouri Y., Takaku H.	HIV-1 gene therapy using RNA systems.	Nucleic Acids Res.Symp.Ser.	50	79-80	2006
Hasegawa A., Miki T., Hosokawa H., Hossain MB., Shimizu C., Hashimoto K., Kimura MY., Tamashita M., Nakayama T.	Impaired GATA3- dependent chromain remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice.	J.Immunol.	176	2546-2554	2006

Yamamoto T., Miyoshi H., Yamamoto N., Yamamoto N., Inoue J., Tsunetsugu -Yokota Y.	Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3- overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages.	Blood	108	3305-3312	2006
Shigeta S., Mori S., Yamase T., Yamamoto N., Yamamoto N.	Anti-RNA virus activity of polyoxometalates.	Biomed Pharmacother	60	211-219	2006
Horiuchi S., Yamamoto N., Dewan MZ., Takahashi Y., Yamada A., Yoshida T., Nowell MA., Richard PJ., Jones S A., Yamamoto N.,	Human T-cell leukemia virus type-1 Tax induces expression of interleukin-6 receptor (IL-6R): Shedding of soluble IL-6R and activation of STAT3 signaling.	Int.J.Cancer	119	823-830	2006
Yamamoto N., Tanaka C., Wu Y., Chang MO., Inagaki Y., Saito Y., Naito T. , Ogasawara H., Sekigawa I., Hayashida Y.	Analysis of human immunodeficiency virus type-1 integration by using a specific, sensitive and quantitative assay based on real-time polymerase chain reaction.	Virus Genes	32	105-113	2006

研究成果の刊行物・別刷

3. RNA 工学プラットフォーム

4) 生体内 RNA プロセッシング (RNase P/tRNase ZL 誘導型ガイド RNA テクノロジー)

黒崎直子・羽生勇一郎・高久 洋

生体内プロセッシング酵素は tRNA 前駆体を切断することにより、RNA の機能を制御するものである。この酵素にはリボヌクレアーゼ P (RNase P) や tRNase Z などがある。これらは、基質 RNA と特異的に結合する特定の二次構造を有する RNA を認識し、基質 RNA の 5' 末端または 3' 末端を切断する。この機能を利用して、既知の疾患遺伝子の RNA を切断し、その発現を特異的に抑制することで新しい治療法の開発が期待できる。このように、生体内プロセッシング酵素は遺伝子の機能を追求するという目的だけに利用されるのではなく、疾患遺伝子の発現抑制という医学的な役割も十分期待される。

はじめに

これまで知られている生体触媒は物質レベルで4つのタイプ (I - IV) に分類される¹⁾。タイプ I はタンパク質だけで触媒活性をもっているタンパク質型である。これには、硫酸エステル、リン酸エステル、ペプチド、DNA、RNA などの分解を触媒する各種加水分解酵素がある。中には補酵素を必要とするものもあるが、ほとんどがタンパク質だけで触媒活性をもっている。タイプ II はタンパク質-RNA (補酵素) 型で、加水分解酵素以外のすべての酵素が含まれる。具体的には、生体物質の酸化還元反応を触媒する酸化還元酵素、二重結合を残す反応を触媒するリアーゼ、異性体間の転換反応を触媒する転移酵素、生体物質の合成反応を合成する合成酵素などがある。また、補酵素は小さいながら触媒反応には積極的に関与している。タイプ III は RNA 型で、これだけで触媒

活性をもっている。例えば、自己スプライシングする RNA やウイロイドなどがこのタイプに属する。最後のタイプ IV は RNA-タンパク質複合体であり、tRNA が機能をもつ分子に成熟する過程に関与するリボヌクレアーゼ P などである。これは、RNA 側に触媒活性があり、タンパク質側には触媒活性がなく、RNA にタンパク質が加わって効率が上がるものである。

I. RNase P と tRNase Z

特定の遺伝子機能を解明するためには、その遺伝子の発現をいかに制御するかが重要なポイントである。これまでの遺伝子発現制御の方法としては、主にアンチセンス法やリボザイムなどが用いられていたが、最近では RNA の干渉作用を利用した RNAi (RNA interference) 法を用いて遺伝子の発現を制御することで、その機能を解明する研究が盛んに行われている。

key words

RNase P, tRNase Z, リボザイム, アンチセンス法, RNAi, EGSs, sgRNA, HIV-1

これらの手法はすべて、合成核酸が直接的に遺伝子に作用することで遺伝子発現制御を行うものであるが、リボヌクレアーゼ P (RNase P) や tRNase Z は RNA とタンパク質の複合体によりその発現を制御することができる。

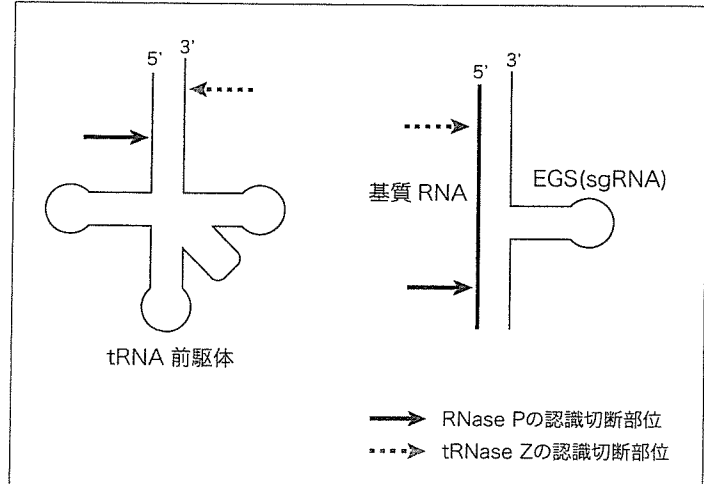
tRNA は、その対応する遺伝子から tRNA 前駆体として転写された後、5' と 3' の両端が切りそろえられ成熟 tRNA となる。RNase P は、その tRNA 前駆体の 5' 側を切断するエンドヌクレアーゼである (図 1)。RNase P は色々な生物種に広く分布しており、これまでに大腸菌や枯草菌などの細菌、好熱菌・好酸菌・好塩基菌などの古細菌、酵母やヒトなどの真核生物にもその存在が確認されている。

RNase P が生体内でエンドヌクレアーゼ活性を示すためには、RNA 成分とタンパク質成分の両者が必要であると考えられていたが、1983 年に Altman らが、大腸菌や枯草菌の RNase P の RNA 成分は試験管内の反応で前駆体 tRNA を特定の部位で切断できること、またヌクレアーゼタンパク質には切断活性がないことを発見した²⁾。

RNase P は tRNA 前駆体のヌクレオチドのみを切断し、他のヌクレオチドは切断しない性質をもっている。また、tRNA 前駆体は基質となるヌクレオチド配列が異なるにもかかわらず、これらを認識して特異的に切断することができる。ただし、変異を起こして立体的に正常な構造がとれない tRNA 前駆体の場合は、切断速度が非常に遅くなる。

RNase P の二次構造の共通性は、tRNA 前駆体と結合して切断するためとタンパク質成分との結合に必要なために、保存されていると考えられる。細胞内では、タンパク質が一般に触媒として使われている。タンパク質が RNA を認識して結合し、触媒作用を現す。自己スプライシングするリボザイムの場合は他の因子を要求せず、自分自身で自己の切断・連結を行う分子内自己触媒である。しかし、RNase P の場合は分子間の反応を触媒するので、真の酵素である。

図 1 tRNA 前駆体と EGS (sgRNA) の作用機序

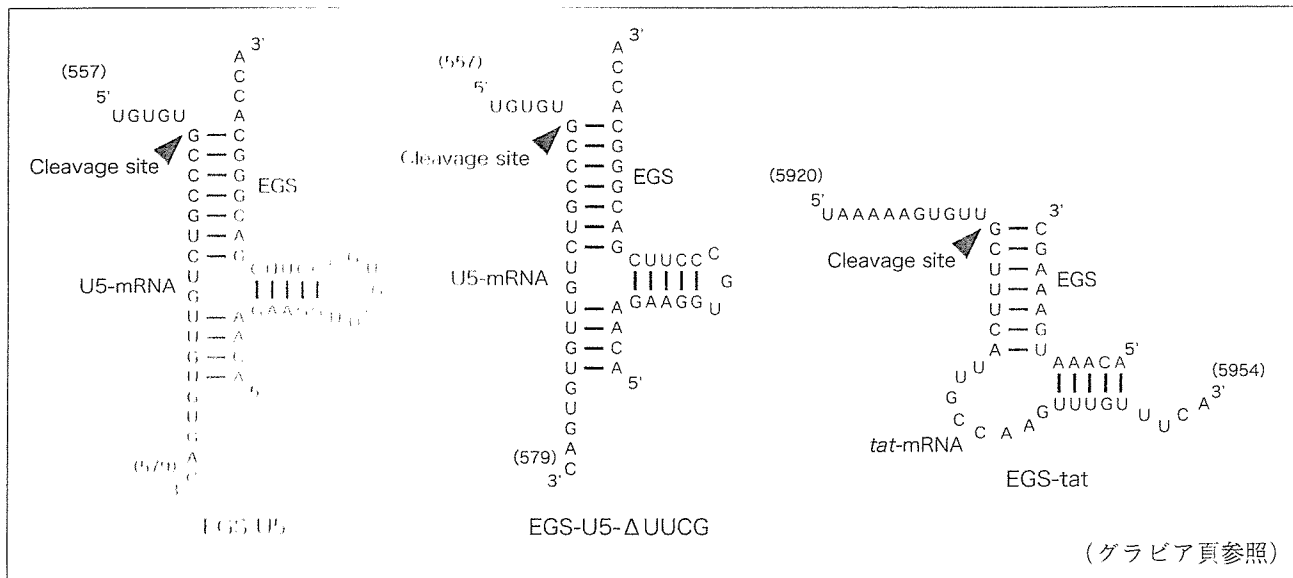


一方、1991年に梨本らはマウス FM3A 細胞抽出物より、試験管内においてスペルミジン存在下で配列特異的に RNA を切断する酵素である tRNase Z (tRNA 3' processing endoribonuclease) が哺乳動物細胞中にもあることを発見した³⁾⁴⁾。その後、tRNase Z は tRNA 前駆体 (67 残基の tRNA^{Asp}, 66 残基の tRNA^{Ala}) の 3' 末端を特異的に切断することや、ほとんどの哺乳類の細胞に存在し、RNA-タンパク質複合体によって基質 RNA の CCA 配列下流を切断することがわかってきた⁵⁾⁷⁾。tRNase Z は ELAC1/ELAC2 ファミリーに属し、そのうち ELAC1 タンパク質は 300 ~ 400 残基のアミノ酸からなる tRNase ZS で、原核細胞・真核細胞などに存在する。一方、ELAC2 タンパク質は 800 ~ 900 残基のアミノ酸からなる tRNase ZL で、これは真核細胞のみに存在している⁸⁾⁹⁾。

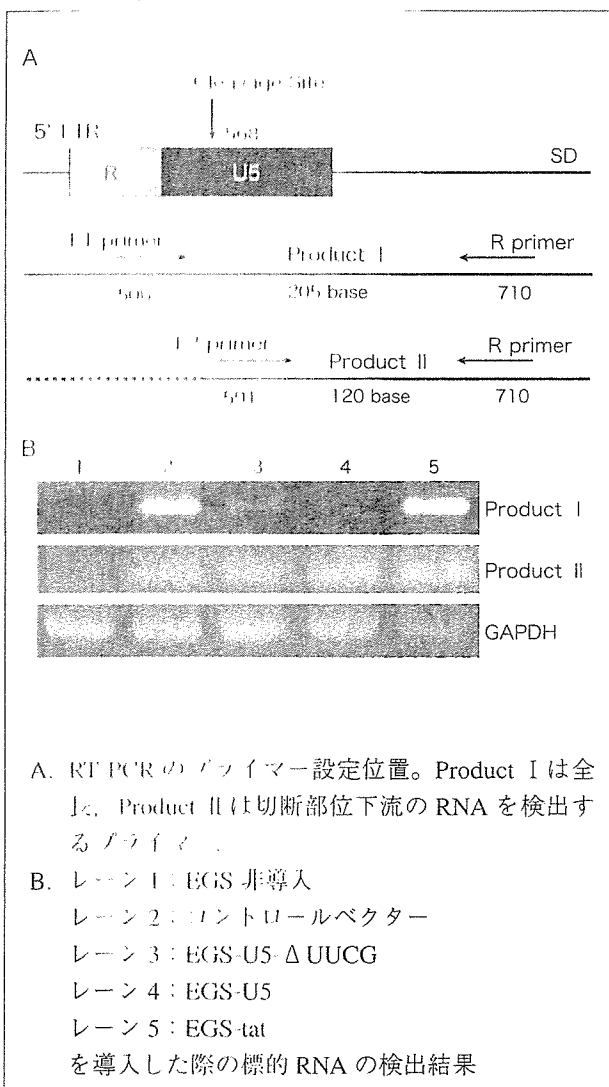
II. RNase P と tRNase ZL の新たな遺伝子治療法への応用

RNA 分子 (external guide sequences : EGSs) が標的遺伝子 (基質 RNA) と結合することによって形成される RNA の二次構造は、tRNA に非常に類似した構造を形成する。そして生体内のスクレアーゼである RNase P や tRNase ZL がこれらの構造を認識し、基質 RNA 部分が切断される。RNase P は基質 RNA の 5' 側を切断し、tRNase ZL は基質 RNA の 3' 側を切断する。

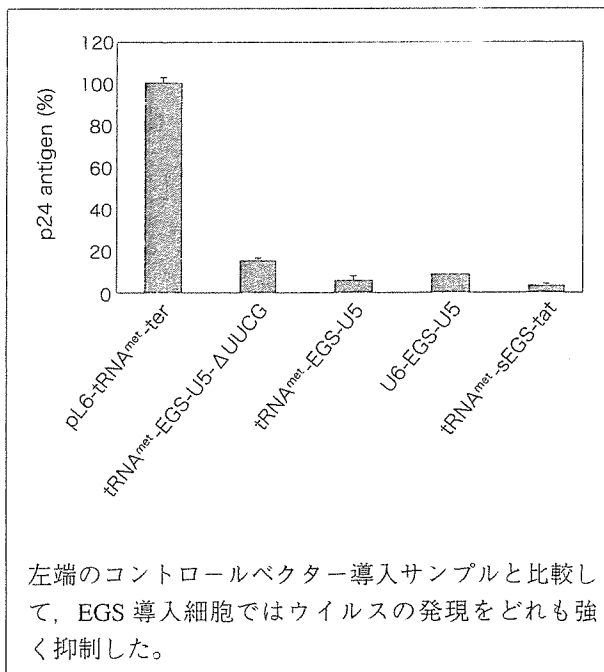
図② EGS (赤字部分) と標的配列 (黒字部分)



図③ RNase Pによる標的RNAの切断をRT-PCR法にて検出

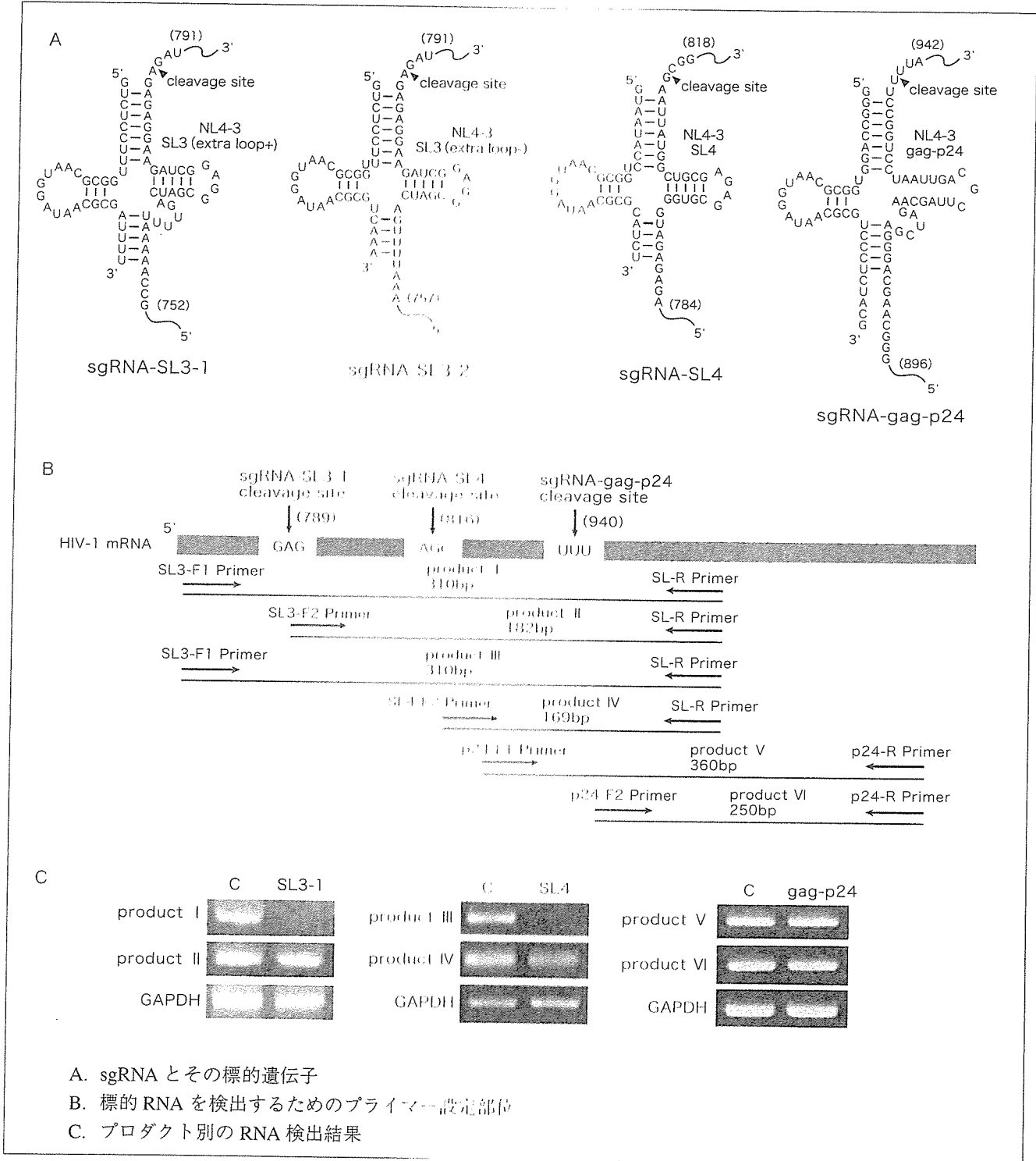


図④ ウイルスタンパク質発現量



これらの機能を利用して、エイズ感染症の病原ウイルスである HIV-1 (human immunodeficiency virus type-1)^{用解1)}を基質RNAとし、このウイルスRNAの一部を特異的に認識するEGSsを作製して、RNase PとtRNase ZLを用いてウイルスRNAを切断することで、ウイルスタンパク質の発現制御を試みた。本稿ではその結果を示す。

図⑤ HIV-1 に対する sgRNA とウイルス RNA の切断



Ⅲ. RNase P によるウイルス遺伝子の発現制御¹⁰⁾

RNase P で切断する標的遺伝子は、HIV-1 の5'側 LTR (long terminal repeat) 領域、ならびに遺伝子発現調節因子の一部をコードする *tat* 遺伝子

領域を設定した。初めに、これらの領域に特異的に結合する EGSs を設計し、それを哺乳動物細胞内で発現可能なプラスミドベクターに組み込み、動物細胞内に導入した (図②)。EGSs は核内にとどまらないように、tRNA プロモーターまたは U6 プロモーターを利用して、動物細胞内で EGS-