

RNAを発現させ、それが切断標的であるウイルスRNAと結合し、tRNA様の構造をとることで細胞内のRNase Pに認識される。それによりウイルスRNAが切断され、ウイルスタンパク質の発現を制御することが可能になるものと考えられた。

そこで、哺乳動物細胞（COS細胞）にEGSs発現プラスミドベクターと野生型のウイルス遺伝子を導入し、それぞれのベクターから発現したEGS-RNAがHIV-1 RNAと結合し、RNase Pによって標的HIV-1 RNAが切断されることをRT-PCR法にて確認した。図⑤に示すように、EGSs発現ベクターを導入した場合は標的HIV-1のRNA全長が検出されず、切断後の短縮されたRNAのみが検出されたことから、EGSsと標的HIV-1のRNAとの結合によるtRNA様構造をRNase Pが認識し、標的HIV-1のRNAが切断されたことが示唆された。また、この時の培養上清中におけるウイルスタンパク質を測定したところ、その産生を90%以上抑制していることも確認された（図④）。

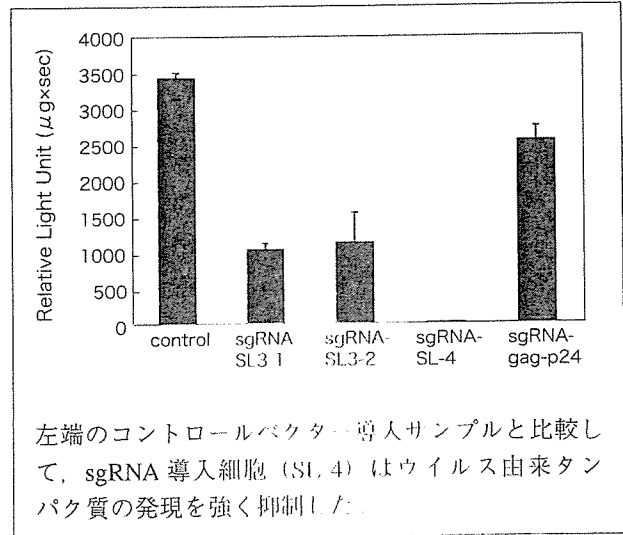
ここで非常に興味深いのは、RNase Pが認識するEGSsと標的RNAが形成するtRNA様構造には多様性があるという点である。図②に示したように、本研究で用いたEGSsは多様な構造を形成するにもかかわらず、標的RNAの切断ならびにウイルスタンパク質の発現を抑制することが示唆された。

#### IV. tRNase ZLによるウイルス遺伝子の発現制御

次に、筆者らがtRNase ZLを利用してHIV-1の発現を制御した例を紹介する<sup>11)</sup>。

tRNase ZLはsmall-guide RNA (sgRNA) と標的RNAが作るtRNA前駆体様の構造を認識して、標的RNAの3'側を切断する機能をもっている。この機能を利用してHIV-1遺伝子を切断するために、sgRNAを発現するプラスミドベクターを構築し、ウイルス感染標的細胞に導入した場合においてウイルス遺伝子を切断するかどうかについて検討した。ここで標的としたウイルス

図⑥ ウイルス由来タンパク質の発現量を定量



遺伝子は、sgRNAが結合した時にtRNA前駆体様の構造をとることが予測される5'側LTR領域と、構造遺伝子をコードするgag遺伝子領域の一部（p24領域）とした。これらの遺伝子に結合するsgRNAを発現するベクターを、野生変異型ウイルスベクターにレポーター遺伝子を組み込んだpNL-lucベクターとともに細胞に導入し、ウイルス由来のタンパク質発現量を測定した。その結果、sgRNAの標的遺伝子によって、ウイルス発現制御に違いがみられた（図⑤）。同時にウイルスRNAの切断についても確認したところ、その活性はsgRNAの標的遺伝子配列に左右されることが示唆された（図⑥）。また、tRNase ZLによるウイルス遺伝子の切断は、ウイルスタンパク質の発現を2週間以上にわたって抑制することも確認された。

以上のことから、sgRNAの標的遺伝子の配列ならびに二次構造は、tRNase ZLのRNA切断能に重要であることが示唆された。

#### おわりに

現在、ウイルス感染症に対する治療法の主力である抗ウイルス剤は、薬剤耐性ウイルスの出現や薬剤間の交差耐性などによる有効性の減少が問題となっている。また、副作用も非常に強いことから、ウイルス遺伝子に特異的に働く薬剤（物質）の検索が急務とされている。本稿で紹介した生体

内 RNA プロセッシング機構を利用したウイルス発現制御が実現すれば、これらの問題を解決するこ

とができるのではないかと期待される。

#### 用語解説

1. HIV-1: AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) の病因ウイルス。AIDS は 1981 年にアメリカで最初に報告された後天性免疫不全症候群で、1983 年にその原因ウイルスとして human immunodeficiency virus (HIV) が同定された。

HIV-1 はレンチウイルス科に属し、1 型と 2 型がある。2 型 (HIV-2) の流行地が西アフリカやインドの一部、ヨーロッパの一部であるのに対して、1 型 (HIV-1) は全世界で流行している。

#### 参考文献

- 1) 柳川弘志: RNA 学のすすめ, 講談社, 1990.
- 2) Robertson HD, Altman S, et al: J Biol Chem 247, 5243-5251, 1972.
- 3) Nashimoto M, Sakai M, et al: Biochem Biophys Res Commun 178, 1247-1252, 1991.
- 4) Nashimoto M: Nucleic Acids Res 20, 3737-3742, 1992.
- 5) Nashimoto M: Nucleic Acids Res 23, 3642-3647, 1995.
- 6) Nashimoto M: Nucleic Acids Res 21, 4696-4702, 1993.

- 7) Nashimoto M, Kominami R: Biochem Biophys Res Commun 176, 1163-1169, 1991.
- 8) Takaku H, Minagawa A, et al: Nucleic Acids Res 32, 4429-4438, 2004.
- 9) Schiffer S, Rosch S, et al: EMBO J 21, 2769-2777, 2002.
- 10) Banor JS, Miyano-Kurosaki N, et al: Bioorg Med Chem Lett 14, 4941-4944, 2004.
- 11) Habu Y, Miyano-Kurosaki N, et al: Nucleic Acids Res 33, 235-243, 2005.

#### 参考図書

- ・ Handbook of Experimental Pharmacology, Erdmann VA, Brosius J, et al ed, Springer, 151-171, 2005.

#### 参考サイト

- ・ 千葉工業大学工学部生命環境科学科  
<http://www.it-chiba.ac.jp/faculty/eng/lifescience.html>
- ・ NIDA (National Institute on Drug Abuse)  
<http://www.drugabuse.gov/NIDAHome.html>

#### 黒崎直子

1990 年 杏林大学保健学部卒業

1992 年 同大学院保健学研究科修士保健学修士 (ヒト神経芽細胞腫に対するモノクローナル抗体の作製と、その性状解析の研究)  
東京医科歯科大学大学院医学研究科入学  
微生物学専攻 (HTLV-1 遺伝子の発現・増殖機構の解明に関する研究)

1996 年 東京医科歯科大学大学院医学研究科修士  
医学博士  
財団法人エイズ予防財団リサーチレジデント

1998 年 千葉工業大学専門研究員

2002 年 千葉工業大学講師

アンチセンス核酸を用いた抗 HIV-1 剤の開発およびウイルスに対する免疫治療法の開発に関する研究



RNAi Therapeutics, 2006: 69-78 ISBN: 81-7895-245-9  
Editors: Hiroshi Takaku and Naoki Yamamoto

6

## Short hairpin RNA synthesized by phage polymerase do not induce interferon in hepatitis C virus subgenomic replicons

Hiroyuki Hamazaki<sup>2,3</sup>, Saneyuki Ujino<sup>1</sup>, and Hiroshi Takaku<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Life and Environmental Sciences and <sup>2</sup>High Technology Research Center, Chiba Institute of Technology, 2-17-1 Tsudanuma Narashino, Chiba 275-0016, Japan; <sup>3</sup>Japanese Foundation for AIDS Prevention, Toranomom, Minato-ku, Tokyo, 105-0001, Japan

### Abstract

*RNA interference (RNAi) is a cellular process that induces gene silencing by which small duplexes of RNA specifically target a homologous sequence for cleavage by cellular ribonucleases. Here, to test the RNAi method for blocking hepatitis C virus (HCV) RNA replication, we created four short hairpin RNAs (shRNAs) targeting the HCV internal ribosome entry site/Core gene transcript using T7 RNA polymerase.*

*shRNA suppressed the replication of HCV RNA in the HCV replicon. On the other hand, short interfering RNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system trigger a potent induction of interferon- $\alpha$  and - $\beta$  in a variety of cells. We examined whether the shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system activated double-stranded RNA-dependent protein kinase, 2'-5' oligoadenylate synthetase, or interferon-regulatory factor-3. Our results demonstrated that the T7-transcribed shRNA did not activate these proteins in Huh-7 cells and the HCV replicon. These shRNAs are a promising new strategy for anti-HCV gene therapeutics.*

## Introduction

RNA interference (RNAi) occurs in a variety of organisms, including *Caenorhabditis elegans* [1], *Trypanosoma brucei* [2], plants [3], *Drosophila* [4], planaria [5], zebrafish [6], and mouse embryos [7]. In most of these organisms, the injection of a double-stranded RNA (dsRNA) longer than 500 bp specifically suppresses the expression of the gene with the corresponding DNA sequence, but has no effect on genes with unrelated sequences.

RNAi is initiated by the RNase III-like nuclease Dicer, which promotes progressive cleavage of long dsRNAs into 21 to 27 nucleotide (nt) short interfering RNAs (siRNAs) with two nt 3'-overhangs. Subsequently, the siRNAs are incorporated into an RNA-induced silencing complex (RISC), identified in *Drosophila*, and the protein-RNA effector nuclease complex recognizes and destroys the target mRNAs [8-10].

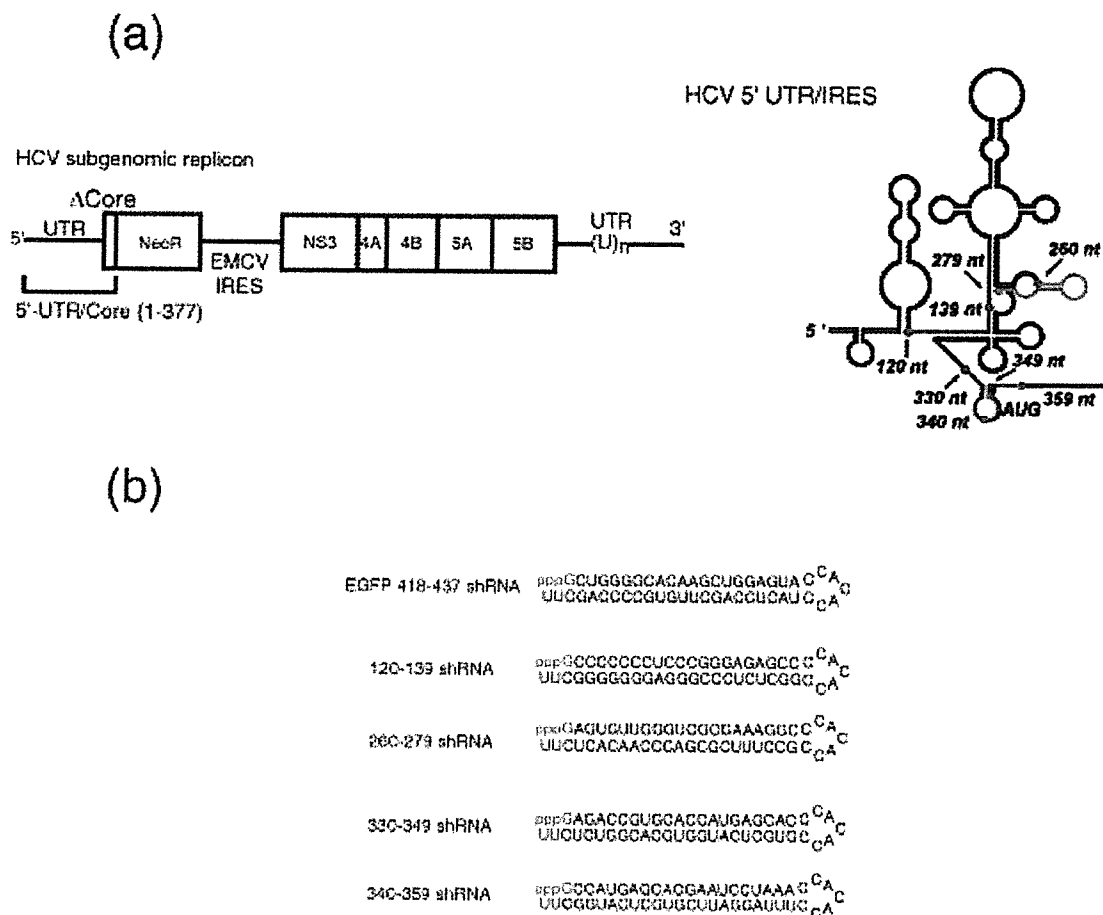
Hepatitis C virus (HCV) is one of the main causes of liver-related morbidity and mortality [11]. The virus establishes a persistent infection in the liver, leading to the development of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinomas [11]. HCV replication occurs in the cytoplasm and is associated with membranes that appear to be derived from the endoplasmic reticulum. Genomic HCV RNA is translated to produce a 3000-amino acid polypeptide that is processed into at least 10 proteins. The nonstructural proteins 3, 4A, 4B, 5A, and 5B form a replicase complex that promotes transcription of a genomic (-) strand intermediate. This serves as a template for the production of (+) strands that are either translated or packaged into virions as genomic RNAs [12, 13]. A satisfactory treatment for HCV infection has yet to be developed, however, because studies of HCV have been hampered by the lack of a stable cell-culture system and a small animal model. One recently reported HCV replicon is a selectable sub-genomic HCV RNA, which replicates efficiently and continuously in human hepatoma Huh-7 cells [14, 15]. HCV RNA replication is also sensitive to RNAi [16-18].

On the other hand, it was previously reported that dsRNA triggers the production of type I interferon (IFN), and activates dsRNA-dependent protein kinase (PKR) [19] and 2'-5' oligoadenylate synthetase (2'-5'OAS). Furthermore, two recent studies demonstrated that the mechanism of the IFN response might include recognition of the siRNAs by Toll-like receptor-3 (TLR-3) [20]. One simple method for limiting the risk of inducing an IFN response is to use the lowest effective dose of short hairpin RNA (shRNA) vector, as advocated by Bridge et al. [21]. Recently, Kim et al. reported that siRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system can trigger the potent induction of IFN- $\alpha$  and - $\beta$  in a variety of cells [22]. These results demonstrated an association between the sequence specific-inhibition via the RNAi mechanism without stimulating the TLR-3 signal pathway, PKR [23], or 2'-5'OAS by HCV proteins, because the TLR-3-adaptor protein TRIF is cleaved by HCV nonstructural 3/4A protease [24]. On the other hand, the nonstructural 5A protein might bind with PKR and block dimerization, which inhibits the activation of eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  [25, 26].

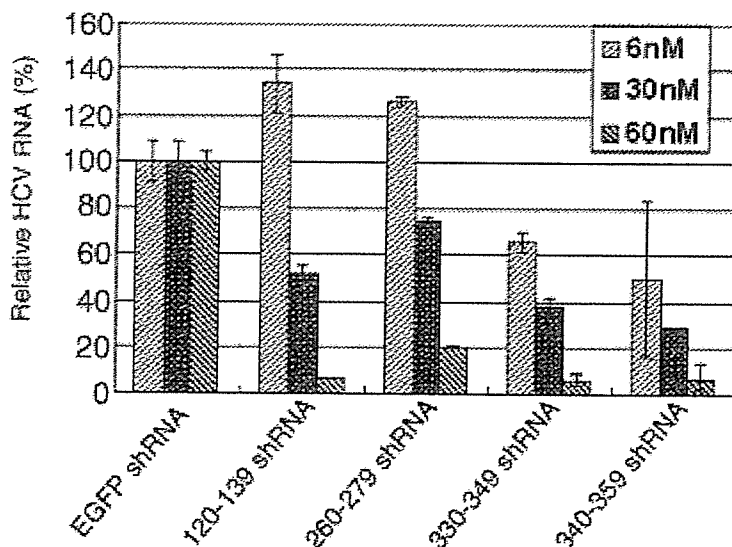
In the present study, we synthesized four shRNAs targeting the HCV internal ribosome entry site (IRES)/Core gene transcript using T7 RNA polymerase. The greatest inhibitory effects occurred with both HCV 330-349-shRNA and HCV 340-359-shRNA, as the target of the HCV RNA. We also examined whether the shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system activated PKR, 2'-5'OAS, or IFN-regulatory factor-3 (IRF-3). shRNA synthesized using T7 RNA polymerase did not, however, activate these proteins in Huh-7 cells and HCV replicons.

### **Inhibition of HCV RNA replication of synthesized shRNAs using T7 RNA polymerase in the HCV replicon**

The present study examined whether HCV RNA replication was inhibited by an RNAi mechanism. We synthesized four shRNAs targeting the HCV IRES/Core gene transcript using T7 RNA polymerase (Fig. 1a) and verified the sequences using 18% polyacrylamide gel electrophoresis (data not shown). The sequences are shown in Fig. 1b. To assess the inhibitory effects of the shRNAs on the intracellular replication of HCV, we used HCV replicons. Transfection of the shRNA into the HCV replicons (Fig. 1a), which stably express the HCV subgenome, indicated that the 330-349-shRNA and 340-359-shRNA both inhibited HCV RNA replication in a dose-dependent manner (Fig. 2). On the other hand, the control, EGFP-shRNA, did not induce efficient inhibition (Fig. 2). These findings suggest that targeting the region that includes the AUG of the HCV IRES/Core is effective.



**Figure 1.** shRNA-targeted regions of the HCV subgenomic replicons and shRNA sequences. (a) Schematic representation of HCV subgenomic replicons and shRNA targeted regions on HCV 5'-UTR/IRES secondary structure. (b) Sequences of shRNAs synthesized by phage polymerase. The control shRNA:EGFP-shRNA.



**Figure 2.** Inhibition of HCV replication by shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system in the HCV replicons. The effect of transfection with shRNAs or control EGFP HCV replication was measured by RT-PCR of HCV RNA 48 h after transfection. All values are shown as the percentages of the EGFP negative control.

## shRNA stimulates TLR-3 in Huh-7 cells but not in the HCV replicons

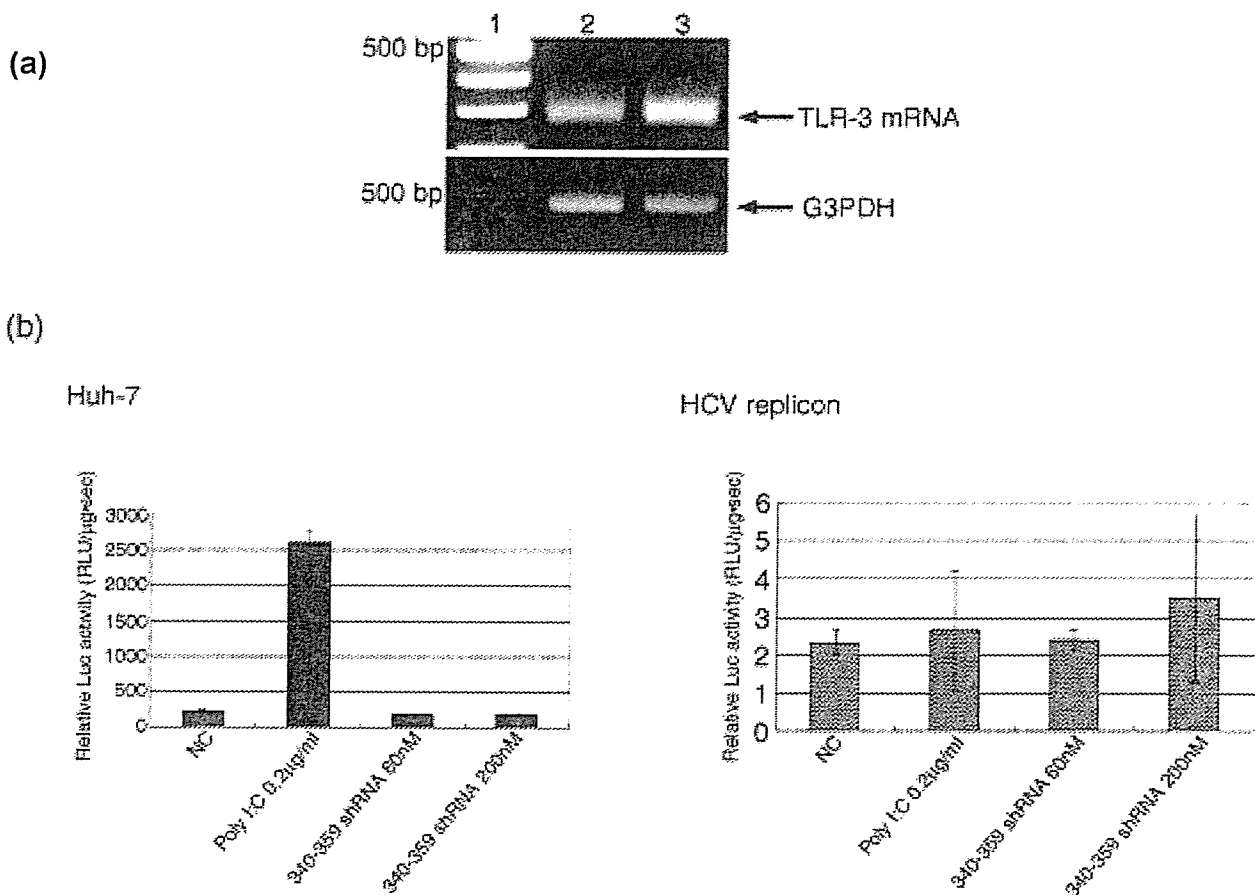
To date, in mammals, 11 TLRs have been identified that recognize pathogen-associated molecular patterns, such as bacterial cell wall materials, bacterial or viral genomic DNA and RNA, and small molecules. At least four TLRs (TLR-3, 7, 8, and 9) recognize and respond to mono-, oligo-, and polynucleotides of natural and/or synthetic origin. TLRs 3, 7, and 8 recognize viral and synthetic single-stranded and double-stranded RNAs, such as poly I:C and siRNA [27]. It was previously reported that dsRNA triggered production of type I IFN, activation of PKR, and activation of 2'-5'OAS. Recently, Kim et al. demonstrated that siRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system can trigger the potent induction of IFN- $\alpha$  and - $\beta$  in a variety of cells [22].

TLR-3 recognizes dsRNA, which is commonly produced during viral replication, and is required for the full induction of IFN- $\alpha/\beta$  and pro-inflammatory cytokines in response to exogenous stimulation by synthetic dsRNA or virus-derived dsRNA. Similar to TLR-4, TLR-3 activation can induce IFN- $\alpha/\beta$  expression via a MyD88-independent, TRIF-, NAP1-, and TBK1- dependent signaling pathway [28].

Therefore, we examined whether the shRNAs synthesized using T7 RNA polymerase induced type I IFN in Huh-7 cells and HCV replicons. First, we analyzed the expression of TLR-3 mRNA. Total cellular RNA was isolated from the cells and analyzed by RT-PCR using specific TLR-3-detection primers. TLR-3 mRNA was detected in all of the cells (Fig. 3a). Next, we examined whether 340-359-shRNA synthesized using T7 RNA polymerase activated IRF-3 in Huh-7 cells and HCV replicons. We assessed the trigger for IRF-3 phosphorylation by 340-359-shRNA in Huh-7 cells and HCV replicons. For this analysis, we constructed a Luciferase reporter gene-expression vector (pIRF-3/Luc reporter) with an IRF-3 binding region (5'-GAAACCGAAACT-3') in the pGL3-basic vector [29]. The pIRF-3/Luc and 340-359-shRNA were then co-transfected into Huh-7 cells and the HCV replicons using Lipofectamine 2000. IRF-3 activation was monitored using a luciferase assay (Fig. 3b). The internal control, polyI:C, simultaneously induced phosphorylation of IRF-3 and Luc gene expression in the Huh-7 cells. In contrast, the 340-359-shRNA mediated neither the phosphorylation of IRF-3 nor Luc gene expression in these cells. Both polyI:C and the 340-359-shRNA, however, failed to trigger the phosphorylation of IRF-3 and Luc gene expression in HCV replicons (Fig. 3b). The results suggested that shRNAs did not induce activation of IRF-3 in Huh-7 cells and HCV replicons.

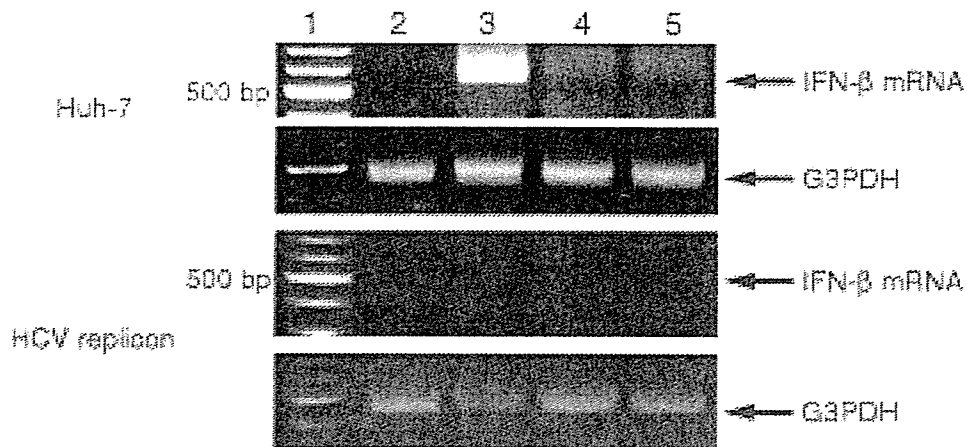
Huh-7 cells and HCV replicons that were transfected with the 340-359-shRNA were also used to evaluate the induction of IFN- $\beta$  gene expression. The

transcribed IFN- $\beta$  mRNA was detected using RT-PCR analysis with an appropriate primer. IFN- $\beta$  mRNA expression was detected in polyI:C-transfected Huh-7 cells (Fig. 4, lane 3), but not in cells transfected with the 340-359-shRNA (Fig. 4, lanes 4 and 5). In contrast, IFN- $\beta$  mRNA expression was not observed when either the 340-359-shRNA (Fig. 4, lanes 4 and 5) or polyI:C (lane 3) were transfected into HCV replicons. Recent analyses of potential mediators of induction of the IFN response revealed that the initiating 5'-triphosphate is required for IFN induction in HEK 293 and HeLa cells [22]. Our synthesized shRNAs, however, did not induce IFN in Huh-7 cells and HCV replicons. Huh-7 cells might be less sensitive to dsRNA than HEK 293 and HeLa cells.



**Figure 3.** Activation of IRF-3 after transfection of Huh-7 cells and HCV replicons with shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system. (a) RT-PCR analysis of TLR-3 mRNA expression in Huh-7 cells and HCV replicons. The RT-PCR assay for TLR-3 mRNA was performed using TLR-3 mRNA-specific primers with concurrent amplification of G3PDH mRNA. The RT-PCR-amplified products were fractionated by electrophoresis on a 2.0% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane 1, DNA ladder; lane 2, Huh-7 cells; lane 3, HCV replicons. (b) Huh-7 cells and HCV replicons transfected with either polyI:C (0.2  $\mu$ g) or the 340-359-shRNA (60 nM or 200 nM) were treated with 0.5  $\mu$ g pIRF-3/Luc plasmid. After 24 h, the cell lysates were prepared and assayed for luciferase activity. NC: pIRF-3/Luc.





**Figure 4.** RT-PCR analysis of IFN- $\beta$  mRNA expression in Huh-7 cells and HCV replicons. The RT-PCR-amplified products were fractionated by electrophoresis on a 2.0% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane 1, DNA ladder; lane 2, negative control; lane 3, polyI:C (10  $\mu$ g); lanes 4 and 5, 340-359-shRNA (60 nM and 200 nM, respectively).

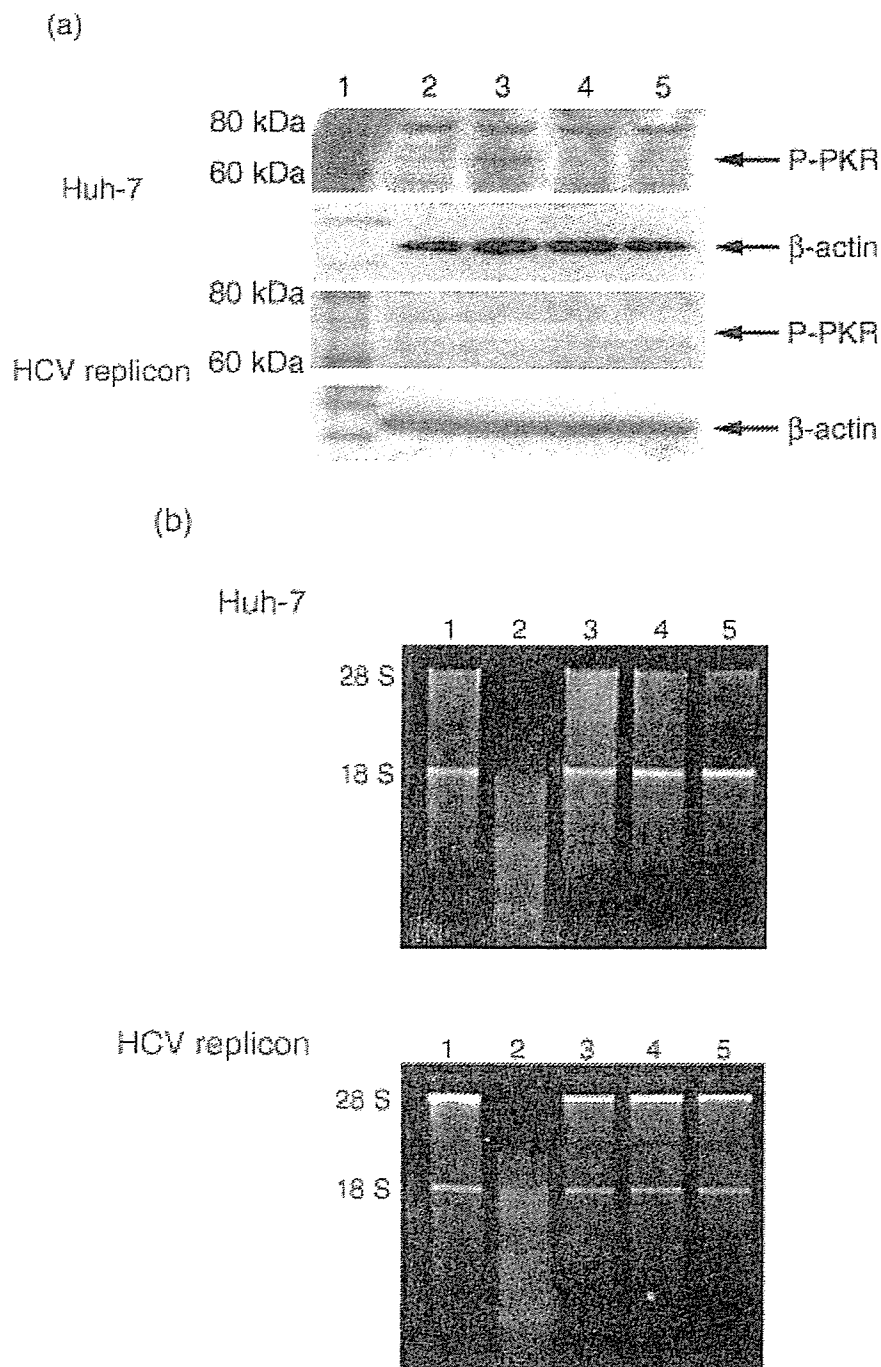
### Detection of PKR phosphorylation induced by synthesized shRNAs using T7 RNA polymerase

Activation of PKR by viral dsRNA and synthesized dsRNA results in autophosphorylation and subsequent phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  subunit, causing general inhibition of cellular protein synthesis. In addition to its role as a translational inhibitor, PKR is also a component of signal transduction pathways that regulate events such as cell growth and stress responses [30].

To investigate the association of these transductional pathways in relation to the inhibition of HCV replication, we analyzed the phosphorylated PKR activity induced by the 340-359-shRNA in Huh-7 cells and HCV replicons. The levels of phosphorylated PKR activity were detected with a Western blot assay. Phosphorylated PKR activity was detected in polyI:C-transfected Huh-7 cells as an internal control (Fig. 5a, lane 3), whereas no such activity was detected in the cells transfected with the 340-359-shRNA (Figure 5a, lanes 4 and 5). In addition, no phosphorylated PKR activity was detected in HCV replicons transfected with either polyI:C (Fig. 5a, lane 3) or the 340-359-shRNA (Fig. 5a, lanes 4 and 5).

### Detection of activated RNase L following transfection with synthesized shRNAs using T7 RNA polymerase

Activation of 2'-5'OAS by viral dsRNA and synthesized dsRNA results in autophosphorylation and subsequent activation of RNase L, causing general inhibition of cellular protein synthesis [31]. Thus, the RNase L induced by the synthesized shRNAs might have degraded the HCV RNA. Therefore, we examined



**Figure 5.** Activation of PKR and RNase L with shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system. (a) After 24 h, the Huh-7 cells and HCV replicons were lysed with lysis buffer. The lysates (80  $\mu$ g protein /lane) were assayed by Western blot analysis with antibodies against phosphorylated PKR or  $\beta$ -actin as a control. The protein bands were visualized using the ECL method (Amersham). Lane 1, biotinylated protein marker; lane 2, negative-control cells; lane 3, cells transfected with 10  $\mu$ g polyI:C; lanes 4 and 5, cells transfected with 340-359-shRNA (60 nM and 200 nM, respectively). (b) An RNase L assay was performed for Huh-7 cells and HCV replicons. Lane 1, negative control; lane 2, p5A2 p5 A2 p5 A (1  $\mu$ M); lanes 3 and 4, 340-359-shRNA (60 nM and 200 nM, respectively); lane 5: Huh-7 cells and HCV replicons, polyI:C (10  $\mu$ g).

whether synthesized shRNAs activated RNase L in Huh-7 cells and HCV replicons using a ribosomal RNA-cleavage assay to investigate the induction of RNase L activity in the target cells. The cells were transfected with either 340-359-shRNA or polyI:C using Lipofectamine 2000. The positive control contained the phosphorylated 2'-5'OAS. Total RNA was extracted with TRIzol and analyzed using a ribosomal RNA-cleavage assay with 1.0% agarose gel electrophoresis. RNase L activity was detected after the addition of the positive control (phosphorylated 2'-5'OAS) to both Huh-7 cells and HCV replicons (Fig. 5b, lane 2). In contrast, no RNase L activity was detected in cells that were transfected with the 340-359-shRNA (Fig. 5b, lanes 3 and 4). Notably, RNase L activity was not stimulated in Huh-7 cells and HCV replicons that were transfected with polyI:C as an internal control Fig. 5b, lane 5). In addition, polyI:C induced negligible RNase L activity in HeLa cells (data not shown). These results demonstrated that the shRNA vector did not induce RNase L activity in Huh-7 cells, HeLa cells, or HCV replicons.

## Conclusion

We demonstrate that shRNAs targeting the HCV IRES/Core gene transcript using T7 RNA polymerase inhibited RNA replication in HCV replicons. In addition, our study revealed that the 330-349-shRNA and 340-359-shRNA inhibit the replication of HCV RNA via an RNAi mechanism without stimulating the TLR-3 signal pathway, PKR, or 2'-5'OAS. This suggests that RNAi might be an effective method for blocking HCV RNA replication in infected cells.

## Acknowledgments

This work was supported by a Grant-in-Aid for High Technology Research (HTR) from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan, and by a Grant-in-Aid for AIDS research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan (H17-AIDS-002). H.H. has been a Research Fellow of the Japanese Foundation for AIDS Prevention.

## References

1. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C., 1998 *Nature*, 391, 806-811.
2. Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E., and Englund, P.T., 2000 *J. Biol. Chem.*, 275, 40174-40179.
3. Vaucheret, H., Beclin, C., and Fagard, M., 2001 *J. Cell Sci.*, 114, 3083-3091.
4. Kavi, H.H., Fernandez, H.R., Xie, W., and Birchler, J.A., 2005 *FEBS Lett.*, 579, 5940-5949.
5. Alvarado, A.S., and Newmark, P.A., 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5049-5054.

6. Dodd, A., Chambers, S.P., and Love, D.R., 2004 *FEBS Lett.*, 561, 89-93.
7. Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., and Schultz, R.M., 2000 *Development*, 127, 4147-4156.
8. Scherer, L.J., and Rossi, J.J., 2003 *Nat. Biotech.*, 21, 1457-1465.
9. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Plasterk, R.H.A., and Fire, A., 2001 *Cell*, 107, 465-476.
10. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D. 2002 *Mol. Cell*, 10, 537-548.
11. McHutchison, J.G., and Patel, K., 2002 *Hepatology*, 36, 245-252.
12. Bartenschlager, R., and Lohmann, V., 2000 *J. Gen. Virol.*, 81, 1631-1648.
13. Clarke, B., 1997 *J. Gen. Virol.*, 78, 2397-2410.
14. Blight, K.J., Kolykhalov, A.A., and Rice, C.M., 2000 *Science*, 290, 1972-1974.
15. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. 1999 *Science*, 285, 110-113.
16. Wilson, J.A., Jayasena, S., Khvorova, A., Sabatons, S., Rodrigue-Gervais, I.G., Arya, S., Sarangi, F., Harris-Brandts, M., Beaulieu, S., and Richardson, C.D., 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 2783-2788.
17. Randall, G., Grakoui, A., and Rice, C.M., 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 235-240.
18. Yokota, T., Sakamoto, N. Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M., and Mizusawa, H., 2003 *EMBO Rep.*, 4, 602-608.
19. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R. G., 2003 *Nat. Cell Biol.*, 5, 834-839.
20. Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., Weissman, and D., 2004 *J. Immunol.*, 172, 6545-6549.
21. Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.-L., and Iggo, R., 2003 *Nat. Genet.*, 34, 263-264.
22. Kim, D.H., Longo, M., Han, Lundberg, Y. P., Cantin, E., and Rossi, J.J., 2004 *Nat. Biotech.*, 22, 321-325.
23. Hsu, L.-C., Park, J.M., Zhang, K., Luo, J.-L., Maeda, S., Kaufman, R.J., Eckmann, L., Guiney, D.G., and Karin, M., 2004 *Nature*, 428, 341-345.
24. Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter Jr., R., Ikeda, M., Lemon, S. M., and Gale Jr., M., 2003 *Science*, 300, 1145-1148.
25. Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., and Hotta, H., 2004 *J. Gen. Virol.*, 85, 959-969.
26. Vyas, J., Elia, A., and Clemens, M.J., 2003 *RNA*, 9, 858-870.
27. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A., 2001 *Nature*, 413, 732-738.
28. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, and T., Seya, T., 2003 *Nat. Immunol.*, 4, 161-167.
29. Lin, R., Genin, P., Mamane, Y., and Hiscott, J., 2000 *Mol. Cell. Biol.*, 20, 6342-6353.
30. Streitenfeld, H., Boyd, A., Fazakerley, J.K., Bridgen, A., Elliott, R.M., and Weber, F., 2003 *J. Virol.*, 77, 5507-5511.
31. Silverman, R.H., Zhou, A., Auerbach, M.B., Kish, D., Gorbachev, A., and Fairchild, R.L., 2002 *Viral Immunol.*, 15, 77-83.

# RNA 医療工学： ウイルス感染症の治療への応用 (HIV への戦略)

*keywords* RNA 干渉 (RNAi)、siRNA、RNase P、tRNA ZL、EGSs、HIV-1

黒崎 直子

千葉工業大学工学部

高久 洋

千葉工業大学工学部

## はじめに

RNA は異なる 4 種類の塩基 (アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、ウラシル (U)) が連鎖した一本鎖やループ上の構造をしており、その骨格にリン酸と糖 (リボース) をもつ。

RNA の研究は、分子生物学が登場した 1960 年代にスタートし、初めは DNA の遺伝情報が発現されたたんぱく質が合成される過程に働く伝令 RNA (mRNA)、転移 RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA) の構造と機能についてであった。このとき、DNA の情報が RNA へ転写される仕組みや、転写された RNA の情報がリボソームに運ばれる仕組み、また 3 つの塩基が 1 種のアミノ酸に翻訳される仕組みなどが明らかにされた。1980 年代にはいると、Altman と Cech らによって、RNA 鎖を切断したり、連結する反応を触媒する RNA (リボザイム) が発見

され、RNAの機能がにわかに注目を集めだした<sup>1,2)</sup>。その後、真核生物のmRNAは、遺伝子発現に必要な部分のみを切り取ってつないでいくというスプライシングのメカニズムが明らかとなった。

1990年代には、RNAの機能解明はさらに発展し、1998年にはFireらが、線虫で二本鎖RNAが配列特異的なRNAに結合してその遺伝子の発現を抑制する、RNA干渉(RNA interference: RNAi)という現象を発見した<sup>3)</sup>。その後、21～23塩基にプロセシングされた二本鎖RNAがmRNAを切断する機構<sup>4)</sup>や、RISC(RNA-induced silencing complex)の存在<sup>5)</sup>、Dicerのクローニング<sup>6)</sup>を経て、2001年にElbashirらにより、哺乳類細胞でもshort interfering RNA (siRNA)による配列特異的な遺伝子の発現抑制が可能であることが証明された<sup>7)</sup>。

しかし、30塩基対ほどの長さのRNA断片を哺乳類細胞に導入するとインターフェロンが誘導され、細胞死を招く結果となった。

また、2001年には、20塩基対程度の短いRNAであれば、哺乳類細胞でも遺伝子の発現を抑制する効果が得られることが明らかとなった<sup>8)</sup>。

## 1. RNA干渉とは

RNA干渉(RNAi)は、siRNAと呼ばれる21～23塩基の二本鎖RNAによって配列特異的に遺伝子の発現を制御する現象である。

RNAiの分子機構は、まず細胞内に導入された二本鎖RNA(double strand RNA: dsRNA)がRNase IIIスーパーファミリーに属するDicerにより、3'末端に2塩基のオーバーハングをもつ21～23塩基のsiRNAに切断される。このsiRNAは、RISCにとりこまれて一本鎖になり、それによって活性化されたRISCは配列特異的に標的mRNAを切断する。この一本鎖siRNAの配列特異性はきわめて高く、わずか数

塩基でも標的 mRNA と相補性をもたないミスマッチがあると RNAi 効果は減少する。

Dicer がどのようにして二本鎖 RNA を認識し、siRNA に分解するのか、その作用機序の詳細は明らかとなっていない。また、RISC もその複合体の構成要素は一部は明らかになっているが、mRNA を切断するたんぱく質本体についてはまだ不明である。

Dicer や RISC は、ともにヒトをはじめとする哺乳類に広く存在することが判明した。しかし、哺乳類では外来性の長い二本鎖 RNA はインターフェロンを誘導するため、RNAi 効果を得ることは難しいと考えられていた。ところが、2001 年に Tuschl らによって、3'末端に 2 塩基オーバーハングさせた 21 塩基の siRNA を合成して生体内に導入すると、インターフェロンの誘導を回避することが明らかとなった<sup>8)</sup>。その後、さまざまな合成 siRNA が開発され、これらは遺伝子の機能解析、創薬、難治性疾患の新規治療法などの研究に応用されるようになった。

## 2. RNAi 実験

RNAi 実験においては、siRNA を細胞内に存在させることが重要な課題である。これには、siRNA をあらかじめ作製しておいてそれを細胞内へ導入する方法と、siRNA 発現ベクターを構築してそれを細胞内に導入して細胞内で発現させる 2 つの方法がある。前者としては、siRNA を化学的に合成する方法や、微生物由来の RNase III やヒト由来の Dicer を用いて長鎖の二本鎖 RNA を切断して siRNA 混合物を作製する方法がある。また後者の方法では、目的に応じてプラスミドベクターやウイルスベクターなどが用いられる。

RNAi実験は、これから実験を始めようとする研究者にとって、自分の研究にどの手法が最適なのかを判断することが難しいほど、この数年間で多くの手法やノウハウが論文に掲載されるようになっていく。すぐに遺伝子のノックダウンをみたいのか、細胞のなかでsiRNAを発現させて遺伝子をノックダウンしたいのかで実験方法が異なる。また、すぐにノックダウンをみたい場合でも、ノックダウンが重要でsiRNAの配列が重要でない場合と、ノックダウンに有効な配列を知りたい場合が考えられる。RNAi効果の持続は数日でよいから、すぐにRNAi効果をみたい場合や、有効な配列の情報よりもまずノックダウン効果を望む場合は、*in vitro*で標的遺伝子の二本鎖RNAを合成し、二本鎖RNAを酵素で特異的に切断したsiRNAを用いてノックダウンするようにする。

ちなみに、ノックダウンに有効な配列の情報を知りたい場合は、合成二本鎖siRNAを用いるが、この場合、siRNAのデザインが鍵を握ることから、各社が公開しているsiRNAアルゴリズムサイトを参考にするとよい。

次に、細胞内でsiRNAを発現させたい場合は、ノックダウンの期間によって手法が異なる。一過性(数日から数十日)に細胞内でsiRNAを発現させてRNAi効果をみたい場合で、導入効率よりベクター作製の簡便性を重視するときは、Naked vectorを用いるとよい。siRNA発現用のシンプルなベクターが市販されており、RNAポリメラーゼIII(Pol III)系プロモータも種類があるので(human U6、human H1、mouse U6など)、好みのものを選択して細胞内でsiRNAを発現させることが可能である<sup>9~12)</sup>。また、作製したsiRNA発現ベクターから必要な部分を切りだしてアデノウイルスベクターに寄せ換えることもで



きる。

それに対して、*in vivo* で RNAi 実験を行いたい場合は、効率よく細胞内へ siRNA 発現ベクターを導入する必要があることから、アデノウイルスベクターを使用するのがよい<sup>13)</sup>。市販されている siRNA 発現用組み換えアデノウイルスは静止期の細胞にも効率よく感染し、siRNA を発現させることができる。そして、細胞内で持続的に siRNA を発現させて遺伝子発現抑制細胞を作製したい場合は、レトロウイルスベクターを使用する<sup>14)</sup>。この組み換えレトロウイルスを目的の細胞に感染させることで、遺伝子を持続的にノックダウンさせることができる。

ちなみに、レトロウイルス、アデノウイルスともに遺伝的に複製能を欠失させているので安全に取扱うことができる。レトロウイルスベクターは、宿主の染色体に組み込まれる特性をもつので持続的な発現に有効である。また、アデノウイルスベクターは力価が高く、感染域が広いので高効率遺伝子導入や *in vivo* での導入に有用である。

### 3. RNase P と tRNase

RNAi 法以外にも特定の遺伝子の発現を制御する方法がある。代表的な方法は、アンチセンス法やリボザイムなどである。これらの手技は、すべて合成核酸が直接、標的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。このほかに、RNA とたんぱく質の複合体によって、その発現を制御するリボヌクレアーゼ P (RNase P) や tRNase がある。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'末端と 3'末端の両端が切りそろえられて成熟 tRNA となる。RNase P は、その tRNA 前駆体の 5'末端側を切断するエンドリボヌクレアーゼである。

このRNase Pはさまざまな生物種に広く分布している。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、酵母やヒトなど真核生物で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成分とたんぱく質成分の両者が必要であると考えられていたが、Altmanらが*E. coli*や枯草菌のRNase PのRNA成分が、試験管内の反応で前駆体tRNAを特定の部位で切断すること、またヌクレアーゼたんぱく質には切断活性がないことを発見した<sup>15)</sup>。

Altmanらは、変異チロシンtRNAの遺伝子をもつバクテリオファージ $\phi$ 80からtRNA前駆体分子を分離し、これを切断して成熟チロシンtRNAにする酵素を検索し、細胞内の各器官が壊れない条件でチロシンtRNA前駆体に特異的な切断酵素を部分精製した。この前駆体切断酵素を<sup>32</sup>P標識チロシンtRNA前駆体に加えて反応させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて生成物を解析することによって酵素の特異性を調べた。その結果、tRNA前駆体と5'末端断片のほかに、成熟tRNAに似たサイズのRNAが得られた。これをRNA分解酵素T<sub>1</sub>で分解すると、成熟tRNAの3'末端にUCA<sub>OH</sub>（トリヌクレオチド）が付加されたことから、この酵素すなわちRNase PがtRNA前駆体を切断して5'末端断片を切り出すことが明らかになった。

RNase PはtRNA前駆体のヌクレオチドのみを切断し、ほか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。

さらに Altman らは、RNase P を、RNA 成分 ( $M_1$ RNA) とたんぱく質成分 (C5 たんぱく質) に分離し、それぞれの切断活性を検討した。その結果、 $M_1$ RNA も C5 たんぱく質も単独では切断活性をもたないが、両者をあわせると活性が回復すること、またその際の反応溶液中のイオン濃度をかえることによって、RNA 成分のみでも活性は低いものの tRNA 前駆体を切断することを明らかにした。

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 tRNA 3' processing endoribonuclease (tRNase Z) が哺乳動物細胞中にも存在することを発見した<sup>16, 17)</sup>。その後、tRNase Z は、tRNA 前駆体 (67 残基の tRNA<sup>Arg</sup>、66 残基の tRNA<sup>Ala</sup>) 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-たんぱく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<sup>18~20)</sup>。

tRNase Z は ELAC1/ELAC2 ファミリーに属する。そのうち ELAC1 たんぱく質は 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のに対して、ELAC2 たんぱく質は 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<sup>21, 22)</sup>。

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 に非常に類似している。そのため、生体内のヌクレアーゼである 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 は基質の 5' 末端側を切断し、tRNase ZL は基質の 3' 末端側を切断する。

#### 4. ウイルス感染症に対する機能性 RNA の応用<sup>23)</sup>

AIDS や C 型肝炎をはじめとしてその病因となるウイルス遺伝子が解明されている疾患に関しては、遺伝子発現の制御が可能な RNAi のみならず RNase P や tRNase ZL など新規治療薬となる可能性が高い。

本稿では、エイズ感染症の病原ウイルスである human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) を標的 RNA とし、このウイルス RNA の一部を特異的に認識する二本鎖 RNA や EGSs を作製して、RNase P と tRNase ZL を用いてウイルス RNA を切斷することで、ウイルスたんぱく質の発現制御を試みた結果を示す。

#### 5. RNAi によるウイルス遺伝子の発現制御<sup>24, 25)</sup>

当研究室において、HIV-1 の構造遺伝子の発現をアンチセンス DNA や RNA より高い抗 HIV 効果が期待される RNAi の作用で制御することに成功した例を示す。具体的には、HIV-1 の *gag* および *env* 遺伝子と相同配列をもつ二本鎖 RNA を作成し、その抗ウイルス効果を検討した。

当初、全長 500 塩基対の二本鎖 RNA を作成するために、標的の *gag* および *env* 遺伝子をそれぞれ 3 分割し、T7/SP6 プロモータを用いて合計 6 種類の二本鎖 RNA を合成した。それらを COS 細胞に導入して抗 HIV-1 活性を検討したところ、COS 細胞に一過性に導入した場合、90% 以上の高い抗 HIV-1 活性がみられた。合成 RNA のうちもっとも強くウイルスたんぱく質の発現を抑制したものは *env* の中央部を標的として作製した二本鎖 RNA で、細胞内における *env* の mRNA 量の減