

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.

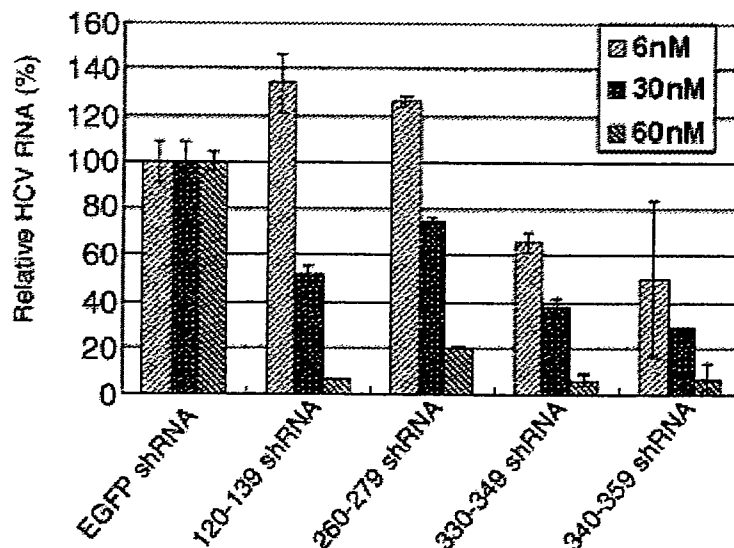


Figure 2. Inhibition of HCV replication by shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system in the HCV replicons. The effect of transfection with shRNAs or control EGFP HCV replication was measured by RT-PCR of HCV RNA 48 h after transfection. All values are shown as the percentages of the EGFP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

transcribed IFN- β mRNA was detected using RT-PCR analysis with an appropriate primer. IFN- β 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- β 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.

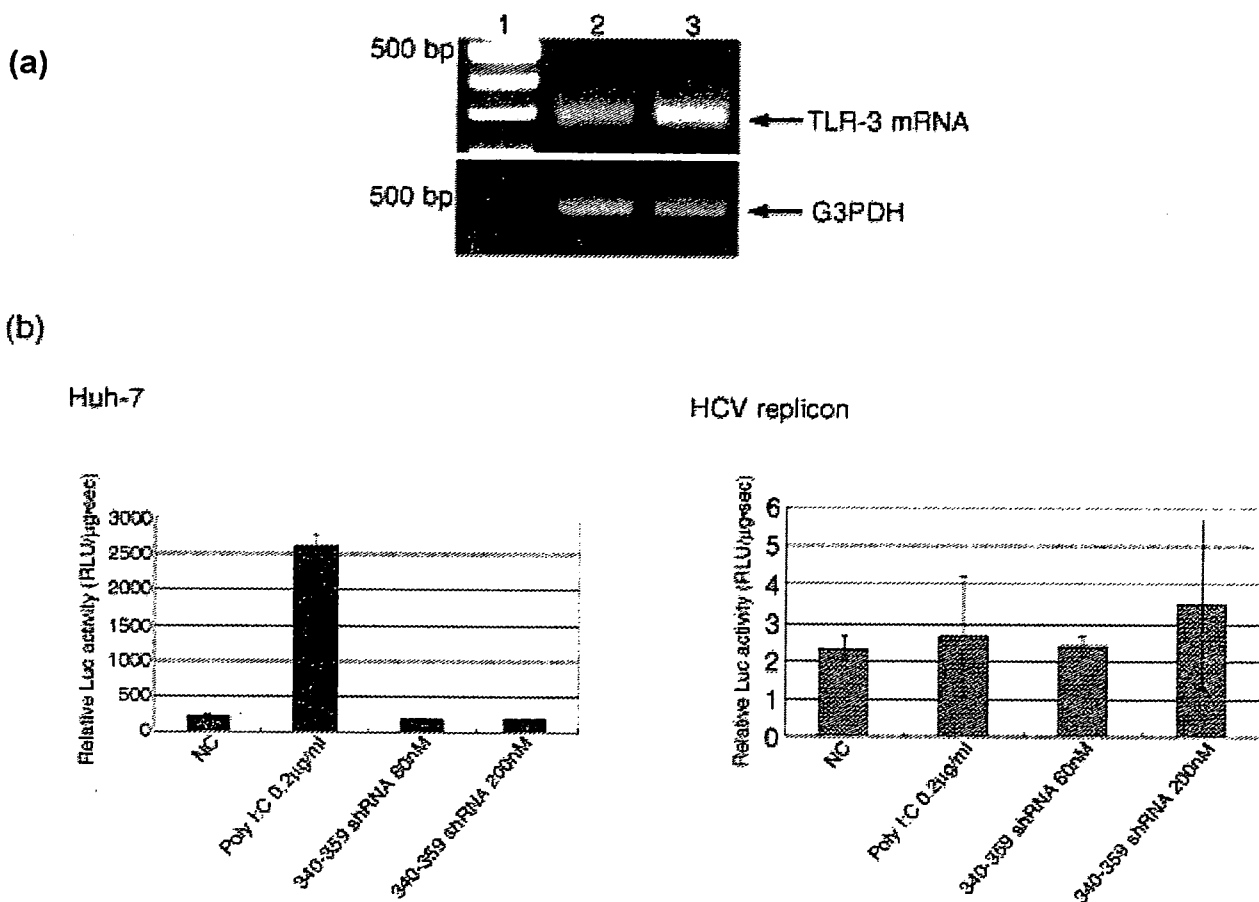


Figure 3. Activation of IRF-3 after transfection of Huh-7 cells and HCV replicons with shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system. (a) RT-PCR analysis of TLR-3 mRNA expression in Huh-7 cells and HCV replicons. The RT-PCR assay for TLR-3 mRNA was performed using TLR-3 mRNA-specific primers 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 μ g) or the 340-359-shRNA (60 nM or 200 nM) were treated with 0.5 μ g pIRF-3/Luc plasmid. After 24 h, the cell lysates were prepared and assayed for luciferase activity. NC: pIRF-3/Luc.

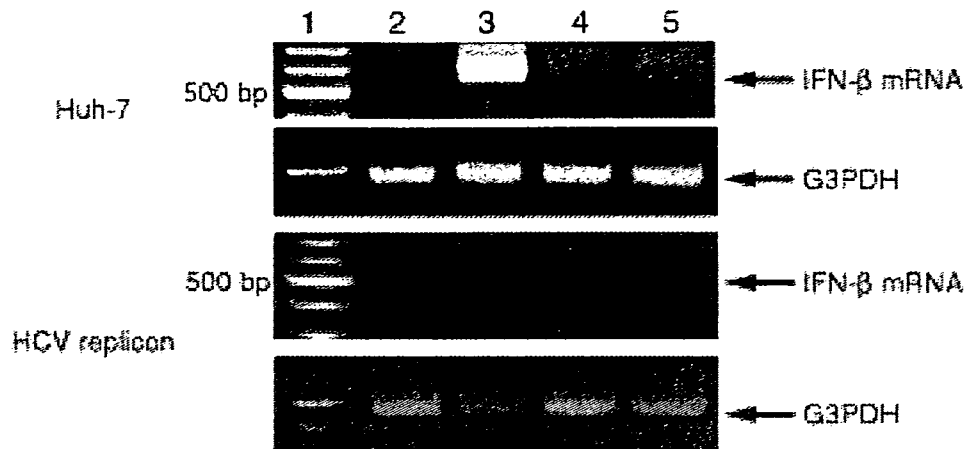


Figure 4. RT-PCR analysis of IFN- β mRNA expression in Huh-7 cells and HCV replicons. The RT-PCR-amplified products were fractionated by electrophoresis on a 2.0% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane 1, DNA ladder; lane 2, negative control; lane 3, polyI:C (10 μ g); lanes 4 and 5, 340-359-shRNA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

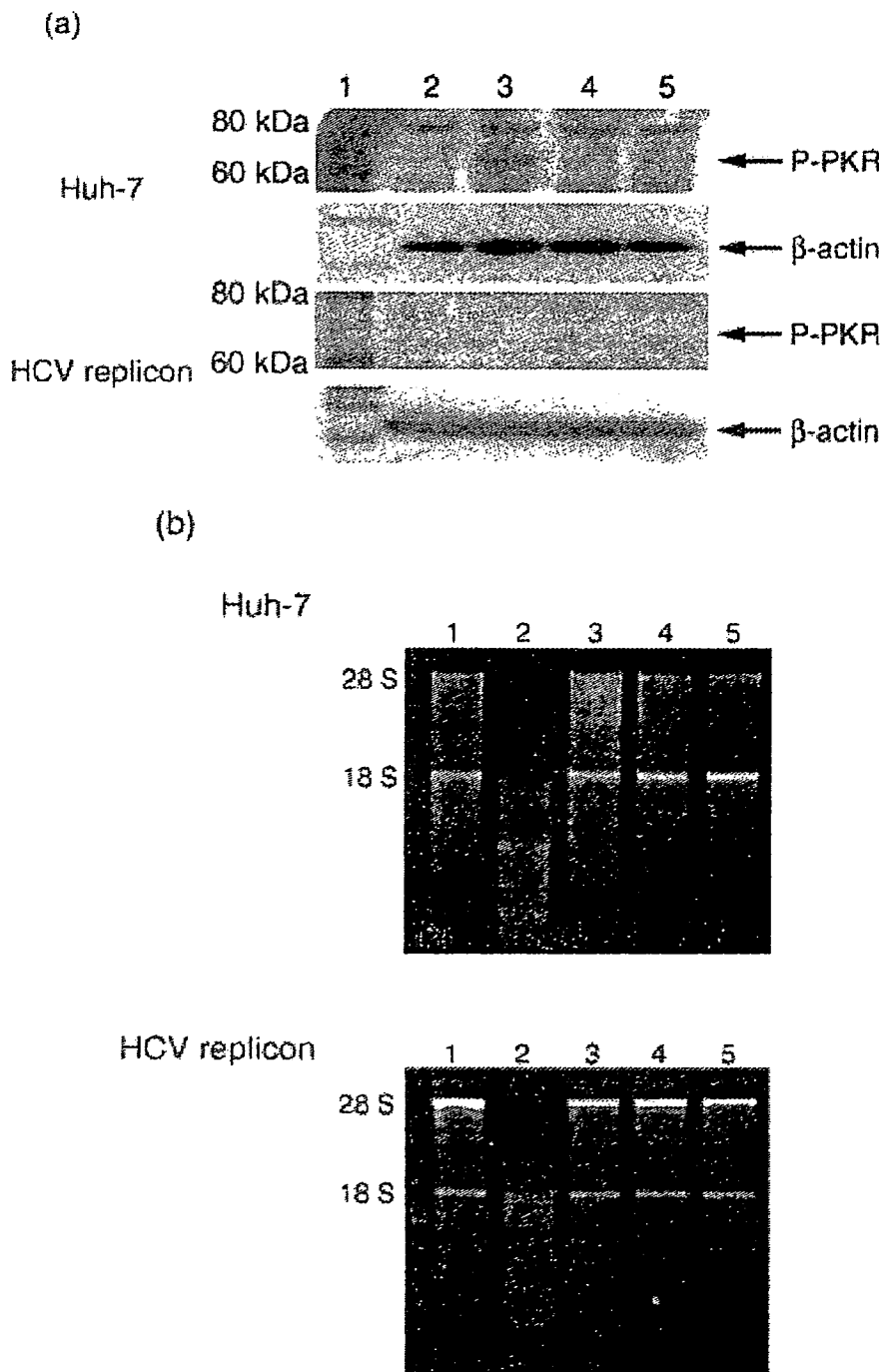


Figure 5. Activation of PKR and RNase L with shRNAs synthesized using the T7 RNA polymerase system. (a) After 24 h, the Huh-7 cells and HCV replicons were lysed with lysis buffer. The lysates (80 μ g protein /lane) were assayed by Western blot analysis with antibodies against phosphorylated PKR or β -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 μ 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 μ 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 μ 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., Medzhltov, 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^{1,2)}。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³⁾。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⁴⁾や、RISC(RNA-induced silencing complex)の存在⁵⁾、Dicerのクローニング⁶⁾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⁷⁾。

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⁸⁾。

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⁸⁾。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^{9~12)}。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¹³⁾。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¹⁴⁾。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 Z

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。これらの手法は、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 Z 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¹⁵⁾。

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³²P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T₁で分解すると、成熟tRNAの3'末端にUCA_{OH}（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^{16, 17)}。その後、tRNase Z は、tRNA 前駆体 (67 残基の tRNA^{Arg}、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-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^{18 ~ 20)}。

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^{21, 22)}。

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²³⁾

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 を切断することで、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^{24, 25)}

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

少もみられた。特に二本鎖 RNA は、一本鎖アンチセンス RNA に比較して高い抗 HIV-1 活性が得られた。さらに、感染させた健常人の末梢血リンパ球 (PBMCs) においても、*env* の二本鎖 RNA は 14 日間にわたり一本鎖アンチセンス RNA より高く HIV-1 の発現を抑制した。

このように、長鎖二本鎖 RNA は一本鎖アンチセンス RNA より効果的な抗 HIV-1 活性を示したが、哺乳動物細胞において二本鎖 RNA の導入によりインターフェロン反応が誘導され、RNAi の特異的な効果が減少されるという欠点がみられた。

そこで、30 塩基以下の短い二本鎖 RNA を作製した。合成長鎖二本鎖 RNA のうち、もっとも強い抗 HIV-1 活性がみられた *env* の中央部を標的として、3'オーバーハングがある 22 塩基の短い二本鎖 RNA を T7 プロモータを用いて合成し、その抗ウイルス効果を検討した。COS 細胞において *env*-siRNAs は 90 % 以上の抗 HIV-1 活性を示し、特に gp120 の V3 ループと CD4 binding site を標的とした siRNAs からはもっとも高い抗 HIV-1 活性がみられた。また、短い二本鎖 RNA は短い一本鎖 RNA より 2 倍から 13 倍も強く HIV-1 発現を抑制した。さらに、そのときの細胞内における標的遺伝子の mRNA を RT-PCR 法によって検出したところ、83 % 以上の *env* の mRNA 量の減少がみられた。対照群としての siRNAs-ran では抗 HIV-1 活性がほとんどみられなかったことから、siRNAs による特異性が高い RNAi 効果が示された。

これらの結果から、われわれは HIV-1 に対する二本鎖 RNA によって一本鎖 RNA より効果的に HIV-1 の発現を阻害することを見出した。HIV-1 の構造遺伝子である *gag* および *env* を標的とした二本鎖 RNA によるウイルス発現制御は、*env* の中央部を標的したものでもっとも高い効果が得られた。また、短い二本鎖 RNA (siRNAs) を用いる

ことで、さらに高い特異性で HIV-1 の増殖が抑制できることが示唆された。

以上のことから、400～500塩基の二本鎖RNAはエンドヌクレアーゼで短く切断され、標的RNAと作用する場合において多くの領域をカバーするため高い抗ウイルス効果が期待できる。ただし、siRNAの場合はピンポイントで標的RNAに作用するため、そのデザインには

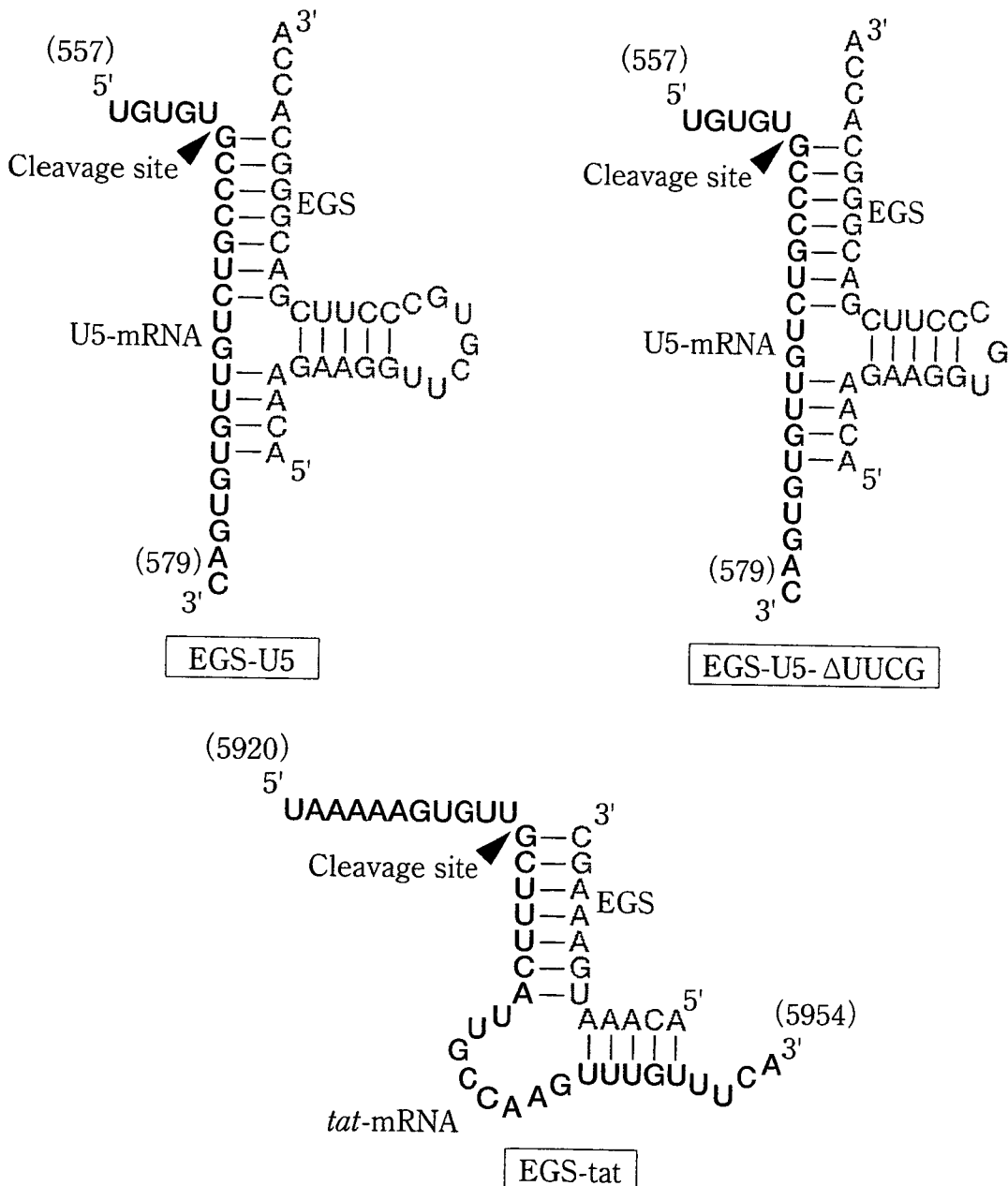


図1 EGS (灰字部分) と標的配列 (黒字部分)

注意が必要であると考えられる。

6. RNase P によるウイルス遺伝子の発現制御²⁷⁾

RNase P で切断する標的遺伝子として HIV-1 の 5'末端側の 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 1)。EGSs は核内に留まらないように tRNA プロモータまたは U6 プロモータを利用して動物細胞内で EGS-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、ウイルスたんぱく質

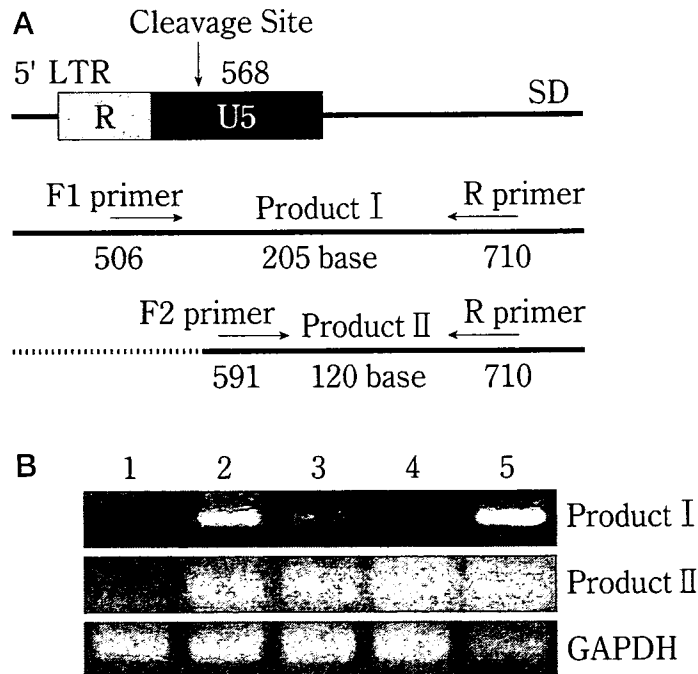


図2 RNase P による標的 RNA の切断を RT-PCR 法にて標的 RNA を検出した結果

A : RT-PCR のプライマー設定部位。Product I ; 全長 RNA を検出するプライマー、Product II ; 切断部位下流の RNA を検出するプライマー。

B : 標的 RNA の検出結果。レーン 1 ; EGS 非導入、レーン 2 ; コントロールベクター導入、レーン 3 ; EGS-U5-DUUCG 導入、レーン 4 ; EGS-U5 導入、レーン 5 ; EGS-tat 導入

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-1RNA と結合し、RNase P によって標的 HIV-1RNA が切断されることを RT-PCR 法にて確認した。図 2 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 のみ検出されたことから、EGSs と標的 HIV-1 の RNA 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。また、このときの培養上清中におけるウイルスたんぱく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が確認された (図 3)。

ここで非常に興味深いことは、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 1 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たんぱく質の発現

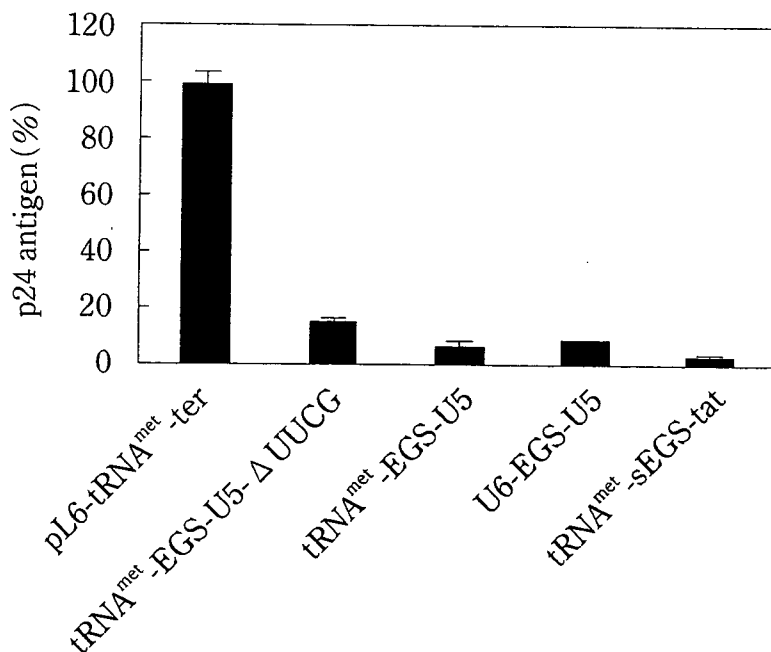


図 3 ウイルスたんぱく質発現量

左端のコントロールベクター導入サンプルと比較して EGS 導入細胞ではウイルスの発現をどれも強く抑制した

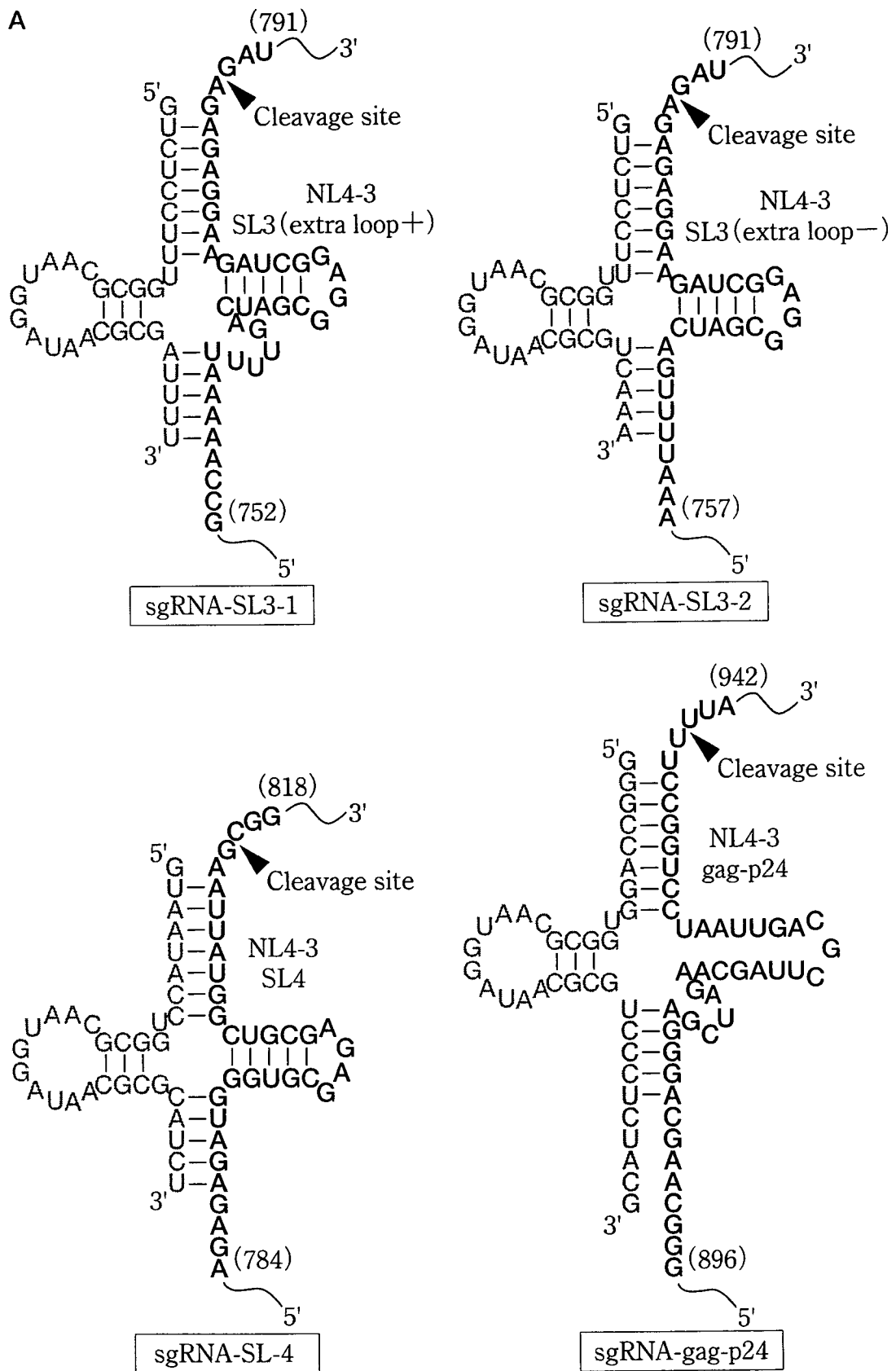


図 4

A : sgRNA とその標的遺伝子 (図 4B、C は次ページに続く)