

論文の内容の要旨

Identification of two functionally different domains in the seed region of siRNA guide strand and development of a new siRNA design procedure for therapeutic application

(siRNA ガイド鎖 seed 領域の 2 つの機能ドメインの同定と
核酸医薬品開発に向けた新規配列設計法の構築)

氏名 小林芳明

【序論】

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) とは、small interfering RNA (siRNA) と呼ばれる 21 塩基長の小分子二本鎖 RNA が Argonaute (AGO) タンパク質に取り込まれ、ガイド鎖が一本鎖化した後に、全長と相補的な配列をもつ mRNA を標的遺伝子として対合し、AGO の酵素活性により切断する機構である。一方、siRNA には、主として seed 領域 (5' 末端より 2-8 塩基) と部分的に塩基対合することで、本来の標的ではない無関係の mRNA までも抑制するオフターゲット効果が存在する (図 1)。我々の先行研究により、siRNA ガイド鎖の seed 領域全体に 2'-O-methyl

(2'-OMe) 修飾を導入すると、AGO タンパク質上におけるガイド鎖と mRNA 間の塩基対形成が立体的に阻害され、オフターゲット効果が減弱することが明らかになった (Iribe *et al.* 2017)。この時、RNAi 効果は未修飾 siRNA と同程度認められたが、これは seed 領域以外の塩基対合が seed 領域における塩基対合の立体障害を補うためであることが示唆された。しかしながら、ガイド鎖のどのヌクレオチドが立体障害を引き起こし、オフターゲット効果を減弱させてい

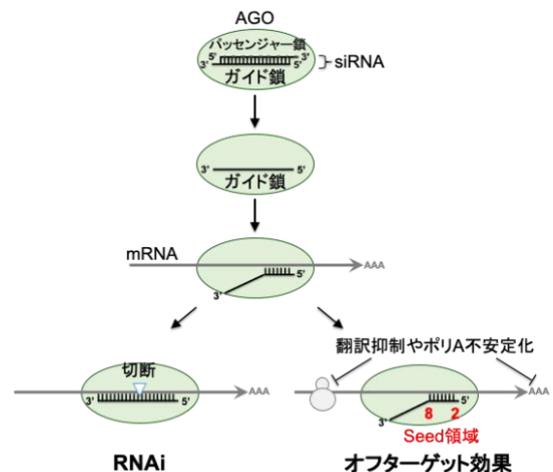


図 1 : siRNA による RNAi とオフターゲット効果

るのか、またその立体障害を補い、RNAi効果を誘導するのに必要なヌクレオチドはどの部分なのかは不明であった。本研究では、seed領域に導入する2'-OMe修飾を5'末端から2塩基目から連続的にふやして、そのRNAi活性およびオフターゲット効果を測定する一連の研究を行った。その結果、siRNAのseed領域が2つの機能ドメインに分かれることを見出した。

近年、siRNAは医薬品としての応用が強く期待され、2018, 2019, 2020年と3年連続して3品目が米国で承認されている (Adams *et al.* 2018, Balwani *et al.* 2020, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03681184>)。これらは希少な難治性疾患原因遺伝子を対象としており、siRNAの標的配列としては、原因遺伝子を野生型と変異型を区別せずに抑制している。一方、多くのがん関連遺伝子における遺伝子変異は、がん化の引き金になったり、がんの浸潤および転移などと関連している。したがって、がん原因遺伝子などに対するsiRNAとしては、野生型と変異型における1塩基の違いを区別して変異型のみを特異的に抑制できることが好ましい。本研究では、変異型のみを特異的に抑制できる新たなsiRNA配列設計アルゴリズムを構築することに成功した。それによって設計したsiRNAを single nucleotide polymorphism distinguishable siRNA (SNPD-siRNA)と命名した。

【方法と結果】

1. siRNA ガイド鎖の seed 領域において 2'-OMe 修飾を連続的に導入した siRNA による RNAi およびオフターゲット効果

siRNA ガイド鎖の 5'末端より 2 番目の塩基から 1 塩基ずつ 2'-OMe 修飾の数を増やした siRNA を合成した。siRNA とその標的配列を 3'UTR にもつルシフェラーゼ遺伝子発現コンストラクトをヒト子宮頸癌由来細胞株 (HeLa 細胞) にトランスフェクションし、siRNA の抑制効果を調べた。その結果、どのような修飾パターンの siRNA も未修飾 siRNA と同程度の RNAi 効果を示すことがわかった。一方、オフターゲット効果は、2-5 塩基目に 2'-OMe 修飾を導入することで最も減弱した。このことから、塩基対形成における立体障害は、シード全体ではなく主に 2-5 塩基目で生じると考えられた。さらに、6 塩基目以降に 2'-OMe 修飾を追加すると、逆にオフターゲット効果を促進する傾向が見られた。

2. siRNA ガイド鎖の 5'末端から 2-5 塩基目または 6-8 塩基目の 2'-OMe 修飾が RNAi およびオフターゲット効果に与える影響

上述した結果より、seed 領域の中でも 5 塩基目を境として、その 5'側と 3'側における 2'-OMe 修飾では RNAi 効果に対する影響が異なる可能性が考えられたため、2'-OMe 修飾を 2-5 および 6-8 塩基に別々に導入し、同様にレポーターアッセイを行った (図 2)。その結果、いずれも未修飾 siRNA と比べて RNAi 効果には変化が見られなかった。しかしながら、オ

オフターゲット効果は、2-5 塩基目の 2'-OMe 修飾でほぼ完全に消失したのに対し、6-8 塩基目の 2'-OMe 修飾では未修飾と同程度であった。このことから、6-8 塩基目の 2'-OMe 修飾は、2-5 塩基目の 2'-OMe 修飾のような立体障害は引き起こさず、オフターゲット遺伝子とも安定な塩基対合を形成できる可能性が示唆された。

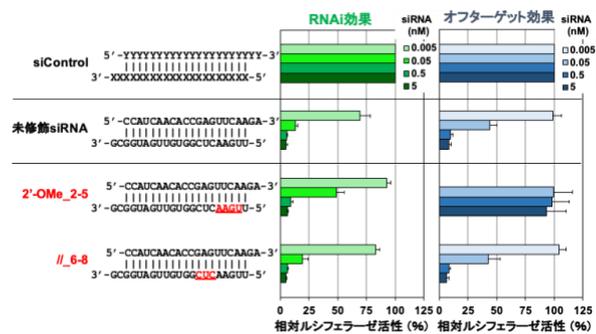


図2：2-5塩基目または6-8塩基目の2'-OMe修飾がRNAiおよびオフターゲット効果に与える影響
 (左)レポーターアッセイに使用したsiRNAの配列を示した。各二本鎖のうち、上がパッセンジャー鎖、下がガイド鎖となる。2'-OMe修飾を導入した配列を赤字および下線で示した。RNAi効果(中央、緑)およびオフターゲット効果(右、青)の測定結果を示した。各siRNAは0.005、0.05、0.5または5 nMの4段階の濃度で使用した。相対ルシフェラーゼ活性が低いほど抑制効果が高いことを表す。

3. siRNA ガイド鎖の 5'末端から 6-8 塩基目の 2'-OMe 修飾がガイド RNA の立体配置に与える影響

ガイド鎖の 5'末端から 2-5 塩基目の 2'-OMe 修飾については、我々の以前の研究 (Iribe *et al.* 2017)から、siRNA は AGO タンパク質に安定に載ることはできるが、塩基の立体配置が変わることで標的とする mRNA と塩基対合ができないことが明らかとなっている。そこで、本研究では 6-8 塩基目の 2'-OMe 修飾が、AGO タンパク質上での siRNA ガイド鎖の立体配置に与える影響を構造シミュレーションにより解析した。シミュレーションには、2014 年に Schirle らによって報告された、ガイド鎖とヒト AGO2 タンパク質の複合体の結晶構造を利用して、6-8 塩基目とそこに近接したアミノ酸残基に着目し、2'-OMe 修飾を可能な全てのパターンで導入して解析した。その結果、少なくとも 7 塩基目に 2'-OMe 修飾が入ると、2'-OMe のメチル基が AGO2 の M364 および I365 残基の側鎖と相互作用して、8 塩基目の立体配置を塩基対合しやすい向きに調整することが示唆された。さらに、レポーターアッセイの結果からも 7 塩基目の 2'-OMe 修飾が RNAi およびオフターゲット効果を促進していることが明らかになった。以上のことから、6-8 の中でも特に 7 塩基目の 2'-OMe 修飾が、AGO タンパク質上のガイド鎖と標的またはオフターゲット遺伝子との塩基対合を安定化し、抑制効果を強めていると考えられた。

4. 新しい siRNA 配列設計アルゴリズムの探索

がん原因遺伝子の 1 つである *kirsten rat sarcoma virus (KRAS)* 遺伝子は、1 塩基が変異することで、がん化の誘導と活性化 (Simanshu *et al.* 2016)、初期の転移形成 (Tie *et al.* 2011) などに関わることが知られている。さらに KRAS の上流にある EGFR に対する抗体医薬品は、変異型 KRAS タンパク質をもつ大腸がんにおいて、抵抗性を示すことがわかっている (Lièvre *et al.* 2006)。また、KRAS ノックアウトマウスは胚性致死である (Koera *et al.* 1997)。以上のことから、1 塩基変異をもつ KRAS は正常な KRAS 遺伝子と区別して抑制する必要があるこ

とが明らかである。そこで、*KRAS* をモデルとし、1塩基変異を区別して抑制する手法を探索した。特に、① mismatchesの位置、②抑制効率の高い5'末端塩基、③2'-OMe修飾の導入の効果の検討という順序で行った。①では、変異部位の野生型配列に対し、siRNAガイド鎖の11塩基目および、5もしくは6塩基目を mismatchesさせることで変異型遺伝子を特異的に抑制できることが明らかになった。②および③では、ガイド鎖の5'末端を uridine もしくは adenosine、パッセンジャー鎖の5'末端を guanosine もしくは cytidine に変換し、6-8に2'-OMe修飾を導入することで、変異型遺伝子への特異的な抑制効果の程度を強めることが明らかになった(図3)。さらに、5もしくは6塩基目の mismatchesの影響は、6-8に2'-OMe修飾を導入する、あるいは6-8のGC含量が多い場合に補償されると考えられた。そこで、6-8のGC含量を0~3まで変化させた siRNA を解析したところ、予想どおりGC含量が1つずつ増えるにつれて変異型遺伝子への抑制効果が促進することが明らかになった。

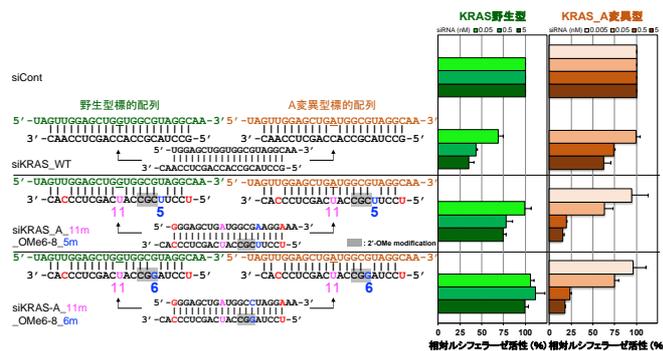


図3: SNP-siRNAの構築(左)レポーターアッセイに使用したsiRNAと*KRAS*野生型あるいはA変異型標的配列との塩基対合様式を示した。各二本鎖のうち、上がパッセンジャー鎖、下がガイド鎖となる。置換した5'末端塩基を赤色で示した。5もしくは6番目および11番目の mismatchesをそれぞれ青およびピンク色で示した。2'-OMe修飾を導入したヌクレオチドを黒背景で示した。野生型(中央、緑)およびA変異型(右、橙)に対する抑制効果の測定結果を示した。各siRNAは0.005、0.05、0.5または5 nMの4段階の濃度で使用した。

【考察と展望】

2'-OMe修飾を用いた siRNA の解析により、siRNA の seed 領域が2-5と6-8塩基目という2つの機能ドメインに分かれることを初めて見出した。2-5塩基目は、オフターゲット遺伝子に対する抑制効果には必須であるが標的遺伝子に対する RNAi 効果には大きく寄与しないドメインであると考えられた。6-8塩基目の3塩基、特に7塩基目は標的遺伝子およびオフターゲット遺伝子の両者に対して抑制効果の程度を規定するドメインであると考えられた。また、mismatchesによって2-5塩基目と6-8塩基目のドメインが分断された時、6-8塩基目のGC含量がRNAi効果に大きく寄与する可能性が考えられた。これは2つのドメイン間で、新たな塩基対合のコンフォメーション変化が起こることを示唆している。さらに、これらの特徴を踏まえ、過去の知見を活用することで新たな siRNA の配列設計法の構築にも成功した。すなわち、最も重要ながん原因遺伝子の1つである *KRAS* を用いて、*KRAS* における1塩基の変異を区別して、正常型にはほぼ影響を与えず、変異型のみを抑制できる siRNA の構築に成功した。本手法は核酸医薬品として siRNA を開発する上で極めて重要な手法となることが期待できる。