


平成 16 年 2 月 27 日

氏名 加藤 敬行 

21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科
応用化学専攻、化学システム工学専攻、
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成15年度リサーチ・アシスタント報告書

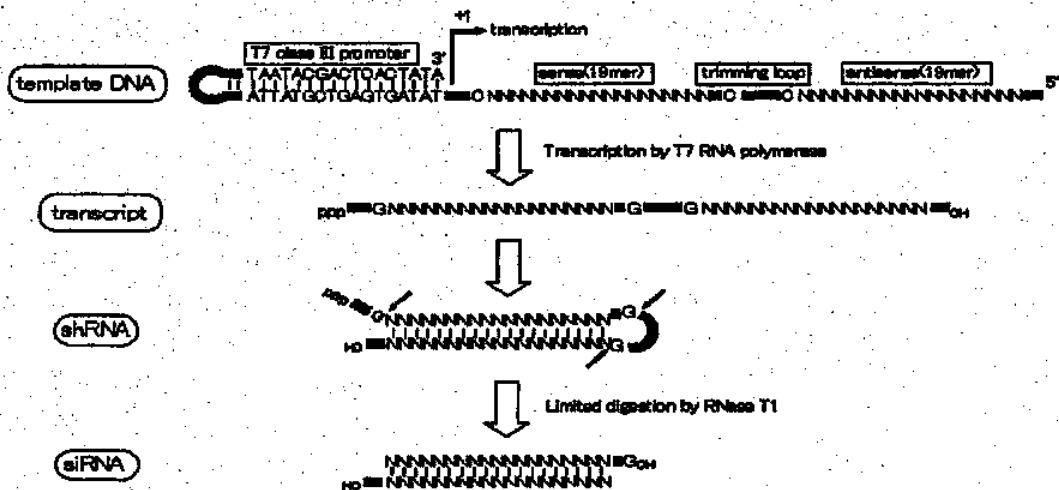
ふりがな 氏名	かとう たかゆき 加藤 敬行	生 年 月 日
所属機関名	東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 渡辺研究室	
所在地	千葉県柏市柏の葉5-1-5新領域生命棟301	
申請時点での 学 年	博士3年	
研究題目	新規転写合成 siRNA を用いた RNAi 活性予測アルゴリズムの開発	
指導教官の所属・氏名	新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 構造生命工学分野 鈴木勉 講師	

I 研究の成果 (1000 字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

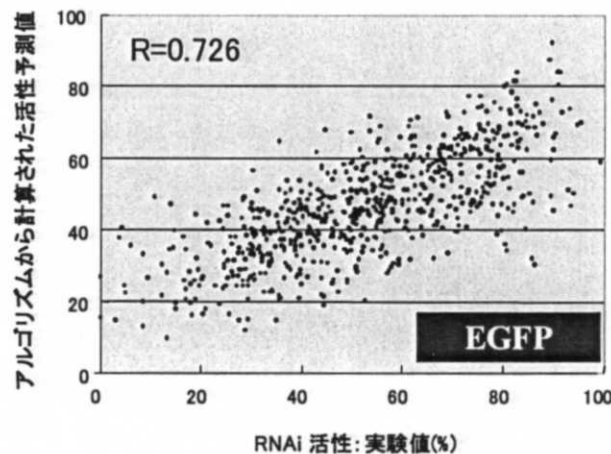
RNAi とは細胞内に 2 本鎖 RNA を導入すると、その配列に特異的にターゲット遺伝子の発現抑制が引き起こされる現象である。近年、RNAi の手法は機能未知遺伝子の機能解析や医薬品の開発などの様々な分野において応用されているが、現状では有機合成による 2 本鎖 RNA の合成コストが高く、活性の高い siRNA の配列をデザインする方法が確立されていないと言う問題点がある。

そこで本研究では、2 本鎖 RNA の合成コストの軽減を図るために、T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写合成による安価かつ簡便な siRNA の合成法を確立した (図 1)。この方法では、センス鎖とアンチセンス鎖がトリミンググループという配列を介してつながれた配列を鋳型 DNA の T7 プロモーターの下流に配置し、T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写反応をおこなう。このとき、得られる転写産物は自発的なヘアピン形成により short hairpin RNA (shRNA) を形成する。そして次に G 特異的に切断する RNase T1 を加えることで、転写開始部分とトリミンググループ中に配置された G の 3' 側の部分で切断させ、最終的に siRNA が得られる。この方法では、1 本鎖のヘアピン RNA を経由して siRNA を合成するため、鋳型 DNA が 1 本で済み、アニーリングの操作も不要であることから、コストや労力を軽減することができた。また、品質的にも 2 本鎖のアニーリングの効率が高く、活性の高い siRNA が得られることを確認した。



(図 1) 新規 siRNA 転写合成法の概要

次に、活性の高い siRNA のデザインを可能にするための、RNAi 活性予測アルゴリズムを開発した。まず、EGFP mRNA をターゲットとする siRNA の配列と活性との関連性を統計的に解析することで、siRNA の活性に影響を及ぼす因子を同定した。解析の結果から、siRNA の活性はその塩基組成に大きな影響を受けていることが示された。また、siRNA の塩基組成と活性との関係に 3 塩基ごとの周期性があることを見出した。さらに、センス鎖のポジション 10 においては U が最も活性に寄与していることが判明した。そして、これらの情報を元に RNAi 活性予測アルゴリズムを構築し、相関係数 0.7 以上の精度で活性の予測を可能にした (図 2)。外来の EGFP 遺伝子をターゲットとした場合のみならず、内在遺伝子の GAPDH や β -catenin 遺伝子をターゲットとした場合にも予測が有効であることを確認した。これにより、活性の高い siRNA の配列を容易にデザインすることを可能にした。



(図 2) RNAi 活性予測アルゴリズムにより算出した活性予測値と活性実測値との相関性

以上、本研究では siRNA 合成コストの軽減を図り、活性の高い siRNA のデザインを可能にすることで、RNAi 法の有用性を高めることに相当の成果をあげた。また、これまでほとんど明らかにされてこなかった RNAi のメカニズムについて、いくつかの全く新しい知見を得ることができた。

氏 名 加藤 敬行

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

Katoh, T., Susa, M., Suzuki, T., Umeda, N., Watanabe, K., Suzuki, T. Simple and rapid synthesis of siRNA derived from *in vitro* transcribed shRNA. *Nucleic Acids Res Supplement* 3, 249-250 (2003).

氏 名 加藤 敬行

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者(全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

- 1) Katoh, T., Susa, M., Suzuki, T., Umeda, N., Watanabe, K., Suzuki, T. Simple and rapid synthesis of siRNA derived from *in vitro* transcribed shRNA, 3rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 札幌・北海道大学、2003年9月
- 2) 加藤敬行・鈴木勉、” siRNA の配列に基づく RNAi 活性の予測”、第26回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2003年12月