

PAPER

化学修飾small interfering RNA (siRNA)による遺伝子サイレンシング

Gene Silencing by Chemically Modified Small Interfering RNA (siRNA)

新貝 恭広¹⁾
Yasuhiro Shinkai柏原 慎一¹⁾
Shinichi Koshihara藤井 啓史¹⁾
Hirohumi Fujii峰松 剛¹⁾
Go Minematsu吉永 尚平²⁾
Shouhei Yoshinaga苗村 円佳¹⁾
Madoka Naemura神武 洋二郎³⁾
Yojiro Kotake藤井 政幸^{*4)}
Masayuki Fujii

■Abstract

For clinical applications of small interfering RNA (siRNA), chemical structure of siRNA should be optimized to be taken up into cells effectively, resistant to nuclease digestion, incorporated into RNA induced silencing complex (RISC) rapidly and correctly. They should also have minimized off-target effect and maximized turn over number. In this study, we investigated RNA interference (RNAi) efficiencies of siRNAs bearing 5'-amino-5'-deoxythymidine (T*) at 5'-end. The results showed that T* at the 5'-end of the sense strand did not interfere the processes of RISC loading complex (RLC) formation, loading to RISC or cleavage of the passenger strand by human argonaute2 (hAgo2) at all. On the other hand, T* at the 5'-end of the antisense strand gave a fatal damage to siRNA to show almost no silencing effect probably because RISC was destabilized by an electrostatic repulsion between the cationic charge of the ammonium group of T* and the cationic residues in MID domain pocket of hAgo2. These results strongly suggest that a modification of 5'-end of a sense strand with T* will suppress an off-target effect.

Key Words; siRNA, chemical modification, gene silencing, hAgo2, RISC

はじめに

日本発の核酸医薬を開発しようとする機運が製薬企業、医療関係者、核酸化学研究者の間で高まっている。その意気込みの現れとして、20年の歴史を持つアンチセンスDNA/RNA研究会を発展的に継承した日本核酸医薬学会が2014年4月に設立された。日本の核酸化学研究者は前述のアンチセンスDNA/RNA研究会を舞台として核酸医薬開発に向けてハイレベルな研究を展開し、数々の成果を上げてきたが、気が付けば、核酸医薬の実用化においてはアメリカに大きな差をつけられてしまった。オールジャパンで総力を挙げて日本発の核酸医薬を創製したい。

アンチセンスオリゴDNA/RNA、siRNA、miRNAミミック、RNAアプタマー、いずれも、核酸医薬として実用化されるには、生体内で化学的にも生物化学的にも十分に安定で、免疫誘導を起こさず、非特異的な結合や毒性もなく、狙った特定の細胞だけにデリバリーされて、細胞内に効率よく侵入し、細胞核、ミトコンドリア、細胞質など細胞内の所定の箇所に能動輸送されて、細胞内の標的分子

と親和性良く特異的に結合して、副作用なく目指した作用だけを發揮する、そんな核酸医薬分子の設計が必要となる。¹⁾ (Figure 1) 核酸医薬の本体となるオリゴDNA/RNAにこれらの機能を付与するためには、生物学的分子基盤に立脚した上で、化学修飾、コンジュゲート、複合体、それぞれに積み上げられた成果のエッセンスを組み合わせた多機能分子の構築が課題である。

我々の研究グループでは、1993年頃より核酸—ペプチドコンジュゲートの合成法の研究に着手し、任意のアミノ酸配列を有するペプチド、無保護糖鎖などのコンジュゲートの簡便合成を可能にする固相フラグメント縮合法を開発した。²⁾ そして、合成したアンチセンス核酸—シグナルペプチドコンジュゲートは遺伝子導入試薬を用いることなく単独で細胞内に侵入し、かつ、細胞核内および細胞質への細胞内局在化制御可能であることと標的遺伝子発現抑制効果が顕著に増強されることを示した。³⁾ その中で、核酸結合性ペプチドのデザインにも力を注ぎし、当初は意図していなかったsiRNAの細胞内導入に有効なペプチドRL7

1) 近畿大学大学院産業理工学研究科産業理工学専攻

2) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科

3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 准教授 ykotake@fuk.kindai.ac.jp

4) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 教授 mfuii@fuk.kindai.ac.jp

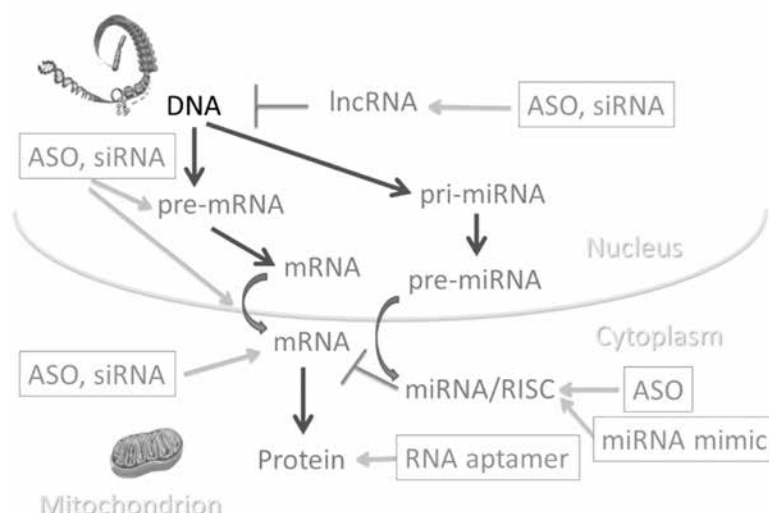


Figure 1. 遺伝子発現機構と核酸医薬の標的

を見出した。⁴⁾ 最近では、2012年に解明されたヒトアルゴノート2タンパク質のX線結晶構造解析の結果をもとに、化学修飾によりオフターゲット効果を回避できるsiRNAの分子デザインに成功した。⁵⁾

結果と考察

2012年にRISCの中核をなすヒトアルゴノート2 (hAgo2) のX線結晶構造が解明され、合理的な分子デザインに基づく化学修飾が可能になった。⁵⁾ また、それまでに得られた化学修飾siRNAのサイレンシング効果が合理的に説明できるようになった。⁶⁾ その中で、リン酸化されたガイド鎖5'-末端がhAgo2のMIDドメインのカチオン性アミノ酸が多く集まるポケットに取り込まれて安定化されていることが明らかとなった。

我々のグループでは、センス鎖、アンチセンス鎖の5'-末端に5'-アミノ-5'-デオキシチミジン(T*) (Figure 2) を導入したsiRNAを合成し、そのサイレンシング効果への影響を評価した。

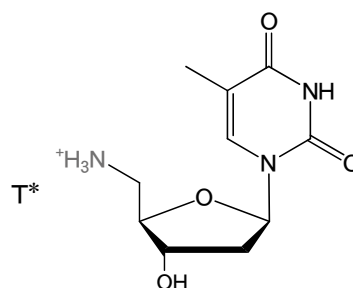


Figure 2. T*の構造

HeLa細胞のゲノムに組み入れたEGFP遺伝子を標的として、各siRNAによるサイレンシング効果を比較した。EGFP-HeLa細胞 (3 x 10⁵ cells/ml.) を10%FBSを含むMEM培地中で、200 nMのsiRNAをHiPerfFectを用いて細胞導入し、5% CO₂雰囲気下、37°Cで24h培養したのち、EGFPの蛍光をマイクロプレートリーダーにより定量解析した。その結果をFigure 3に示す。

5'-末端の化学修飾とサイレンシング効果

siRNA3/2(T/U), siRNA5/2 (T*/U) はsiRNA1/2(U/U)よりも、また、siRNA3/4 (T/T)、siRNA5/4 (T*/T) はsiRNA1/4 (U/T)よりもサイレンシング効果が低下した。この結果は、センス鎖5'-Tによりセンス鎖5'-末端側の塩基対が熱力学的に不安定化し、センス鎖が選択される確率が向上したためと考えられる。同様に、センス鎖5'-T*もTと同程度にセンス鎖5'-末端側の塩基対が熱力学的に不安定化し、センス鎖が選択される確率が向上したためと考えられる。すなわち、センス鎖5'-T*はRISC形成を妨げず、センス鎖5'-T*によりアンチセンス鎖が選択される確率が向上した訳ではないという結果であった。鎖選択はDicer

sense strand

RNA1; 5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

RNA3; 5'-TACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

RNA5; 5'-T*ACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

antisense strand

RNA2; 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

RNA4; 5'-TCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

RNA6; 5'-T*CAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

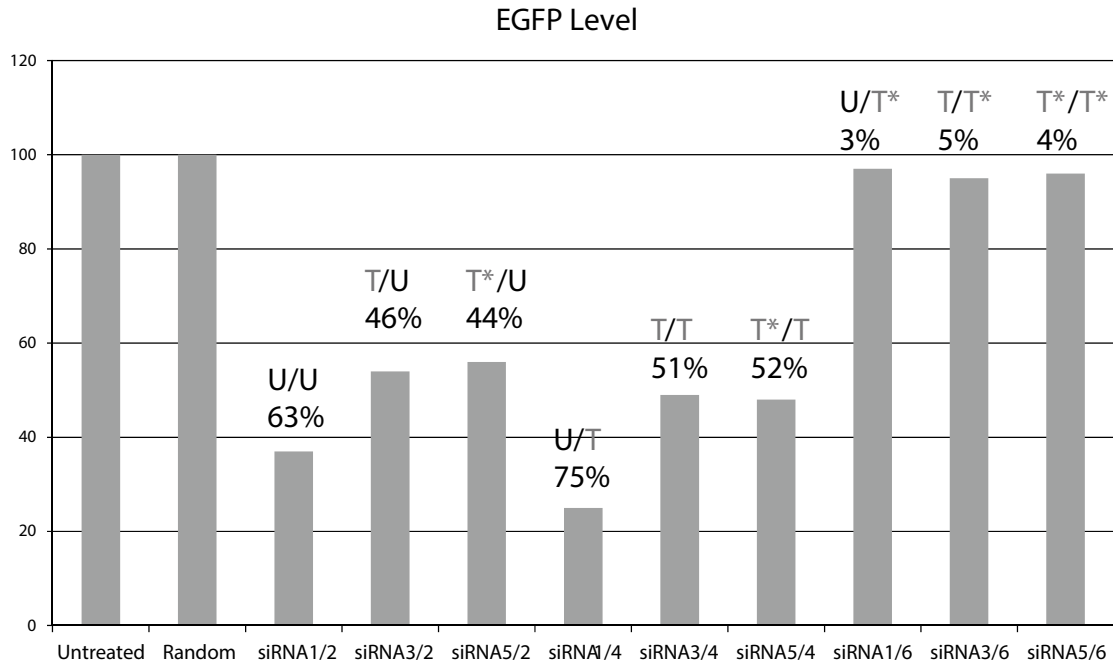


Figure 3. 5' -アミノ-5' -デオキシチミジン(T*)を有するsiRNAによるEGFPのサイレンシング

EGFP-HeLa 3×10^5 cells/ml, [siRNA] = 200 nM transfected by HiPerFect, 10% FBS, 5% CO₂, 37°C, 24h.

との結合、あるいはRISC ローディングコンプレックス (RLC) の形成の際に決まっていると考えられる。

次に、siRNA1/4 (U/T) はsiRNA1/2 (U/U) よりも、siRNA3/4 (T/T) はsiRNA3/2 (T/U) よりも、そして、siRNA5/4 (T*/T) はsiRNA5/2 (T*/U) よりもサイレンシング効果が向上した。これはアンチセンス鎖5'-Tによりアンチセンス鎖5'-末端側の塩基対が熱力学的に不安定化し、アンチセンス鎖が選択される確率が向上したためと考えられる。

さらに、siRNA5/2 (T*/U) はsiRNA3/2 (T/U) と、siRNA5/4 (T*/T) はsiRNA3/4 (T/T) とそれぞれほぼ同等のサイレンシング効果を示した。このことにより、センス鎖5'-T*はRLCの形成および Ago2への積み込みを阻害しないと言える。したがって、センス鎖5'-T*によりアンチセンス鎖が選択される確率が向上する訳ではないという結果となった。これもやはり、鎖選択はDicerとの結合、あるいはRLCの形成の際に決まっていることを支持する結果であった。

最後に、siRNA1/6 (U/T*), siRNA3/6 (T/T*), siRNA5/6 (T*/T*) は全くサイレンシング効果を示さなかった。Figure 4に示す通り、アンチセンス鎖5'-T*はhAgo2のMIDドメインカチオンポケット中のアミノ酸残基と静電反発を起こすため、1本鎖化後にRISCを不安定化し、サイレンシング効果を消失させたためと考えられる。この結果より、センス鎖5'-末端にT*を導入することによ

り、センス鎖の引き起こす off-target 効果は回避できると言える。

5'-末端の熱力学的安定性とサイレンシング効果

Table 1には杉本教授らの最近接塩基対モデル⁷⁾により算出したセンス鎖5'-末端側およびアンチセンス鎖5'-末端側それぞれの3塩基対分の熱力学的パラメーターとサイレンシング効果をまとめた。ただし、TrA/rArUに対するパラメーターは入手できないため、TdA/rArUに対するパラメーターを使用している。また、T*rA/rArUの塩基対の安定性はTrA/rArUと変わらないものとして、TdA/rArUに対するパラメーターを使用している。

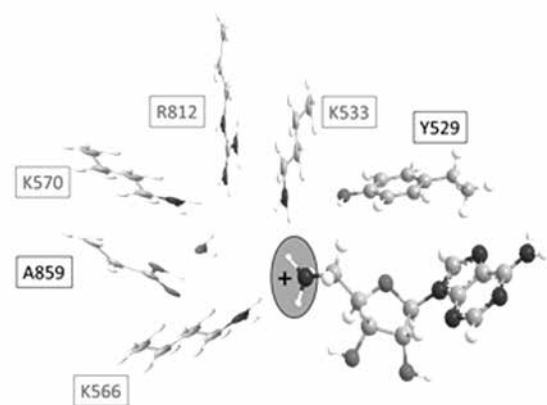


Figure 4. hAgo2 MID ドメイン中のT*

Table 1. T および T*を有するsiRNAのサイレンシング効率と熱力学的パラメーター

| AS | S | U | T | T* |
|----|--------------------------------|------|------|------|
| U | $\Delta\Delta G_{37}^\ddagger$ | -0.9 | -1.4 | -1.4 |
| | RNAi (%) | 63 | 46 | 44 |
| T | $\Delta\Delta G_{37}^\ddagger$ | +0.1 | -0.4 | -0.4 |
| | RNAi (%) | 75 | 51 | 52 |
| T* | $\Delta\Delta G_{37}^\ddagger$ | +0.1 | -0.4 | -0.4 |
| | RNAi (%) | 3 | 5 | 4 |

ΔG^\ddagger ; kcal/mol

siRNA1/2 (U/U) ではセンス鎖末端側の ΔG^\ddagger は -3.2kcal/mol、アンチセンス鎖末端側の ΔG^\ddagger は -4.1kcal/mol となりました。すなわち、センス鎖5'-末端側が -0.9kcal/mol だけ不安定な状態となっており、センス鎖がガイド鎖として選ばれる方がやや有利な状況となっている。アンチセンス鎖5'-T*以外のケースではサイレンシング効果は両末端塩基対の熱力学的安定性に依存していることがわかる。⁸⁾ 一方で、アンチセンス鎖5'-T*を有する siRNA1/6 (U/T*)、siRNA3/6 (T/T*)、siRNA5/6 (T*/T*) のサイレンシング効果は両末端塩基対の熱力学的安定性に全く依存することなく、完全にサイレンシング効果が消滅した。

結論

以上の結果より、Figure 5に示す通り、センス鎖5'-末端のUをT*に置換したことの効果はほとんどサイレンシング効果に反映されておらず、センス鎖5'-末端のアミノ基の

影響はDICER/TRBPの結合、RISC ローディングコンプレックスの形成、RISCへの積み込み過程でほとんどないといえる。しかしながら、T*を有するアンチセンス鎖がRISCに取り込まれた場合には、おそらくはunwindingによる1本鎖化の後にRISCが不安定化し、サイレンシング効果は失われたと解釈することができる。すなわち、センス鎖5'-末端にT*を導入することにより、センス鎖の引き起こす off-target 効果は回避できると考えられる。

今後の展望

生物学的な分子基盤に立脚した合理的分子デザインにより、生体内で化学的にも生物化学的にも十分に安定で、免疫誘導を起こさず、非特異的な結合や毒性もなく、狙った特定の細胞だけにデリバリーされて、細胞内に効率よく侵入し、細胞核、ミトコンドリア、細胞質など細胞内の所定の箇所に能動輸送されて、細胞内の標的分子と親和性良く特異的に結合して、副作用なく目指した作用だけを發揮する核酸医薬分子を構築することが可能であると期待できる。化学修飾、コンジュゲート、複合体、それぞれに積み上げられた成果のエッセンスを組み合わせ、日本オリジナルの核酸医薬を創製したい。

謝辞

この研究の一部は日本学術振興機構科学研究費補助金基盤研究 (C) 25410182により補助されています。

References

1. van Ommen, G.-J.B. and Aartsma-Rus, A. (2013)

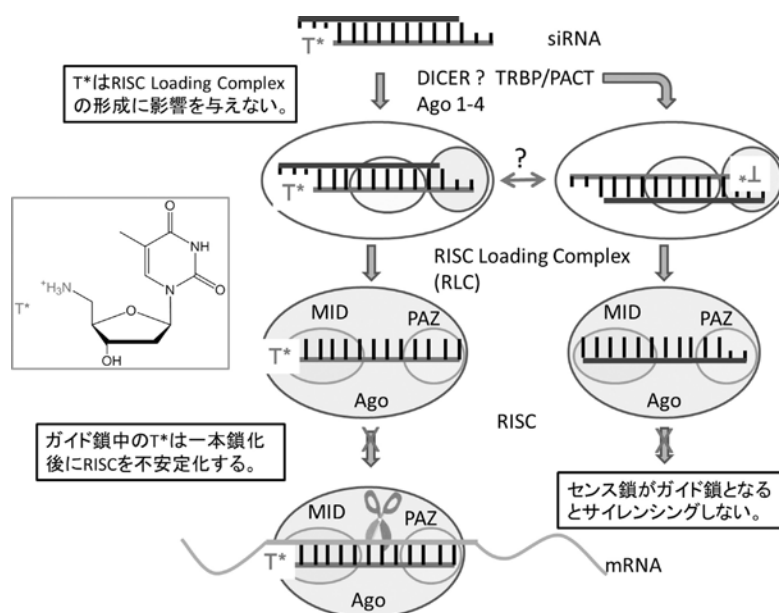


Figure 5. T*を有するsiRNAのサイレンシング経路

- Advances in therapeutic RNA-targeting. *New Biotechnology* 30, 299-301. Gavrilov, K., and Saltzman, W.M. (2012) Therapeutic siRNA: Principles, Challenges, and Strategies. *YALE j. Biology And Medicine*, 85, 187-200. Burnett JC, Rossi JJ. (2012) RNA-based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects. *Chemical Biology*. 19 (1) 60-71.
2. Kubo, T., Morikawa, M., Ohba, H., Fujii, M. (2003) Synthesis of DNA-peptide conjugates by solid-phase fragment condensation. *Organic Letters*, 5, 2623-2626. Murao, S. and Fujii, M. (2009) Organic synthesis and antisense effects of oligonucleotide-peptide conjugates. *Current Organic Chemistry*, 13, 1366-1377.
 3. Kubo, T., Zhelev, Z., Rumiana, B., Ohba, H., Doi, K. and Fujii, M. (2005) Controlled intracellular localization and enhanced antisense effect of oligonucleotides by chemical conjugation. *Organic Biomolecular Chemistry*, 3, 3257-3259.
 4. Fujii, M., Fujiaki, S. and Obata, J. (2012) Non-toxic cellular uptake of siRNA by small peptides. *Peptide Science*, 2012, 233-234.
 5. Takashina, A., Kayano, H., Emi, T., Murakami, K., Ogawa, N., Ariyoshi, J., Yamayoshi, A. and Fujii, M. (2014) Cationic charge on siRNA and RNAi effect, *Proceedings of the XXI Round Table on Chemical Biology of Nucleic Acids*, 2014, 143.
 6. Schirle, NT. and MacRae, IJ. (2012) The crystal structure of human argonaute2. *Science*, 336 (6084) 1037-1040. Elkayam, E., Kuhn, CD., Tocilj, A., Haase, AD., Greene, EM., Hannon, GJ., Joshua-Tor, L. (2012) The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, 150 (1), 100-110.
 7. Sugimoto, N., Nakano S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., Sasaki, M. (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry*, 34 (35), 11211-11216.
 8. Ui-Tei, K., Nishi, K., Takahashi, T., and Nagasawa, T., (2012) Thermodynamic control of small RNA-mediated gene silencing. *Frontiers in Genetics*, 3, 1-12. Hibio, N., Hino, K., Shimizu, E., Nagata, N., and Ui-Tei, K., (2012) Stability of miRNA 5' terminal and seed regions is correlated with experimentally observed miRNA-mediated silencing efficacy, *Scientific Reports*, 2, 1-10.