

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20630

研究課題名(和文) 複雑な細胞環境におけるsiRNA-AGO複合体の分子動態の解明

研究課題名(英文) Molecular dynamics of siRNA-AGO complexes in complex cellular environments

研究代表者

小林 芳明 (Kobayashi, Yoshiaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：20907381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの生化学的解析からsmall interfering RNA (siRNA) は、シード領域(5'末端から数えて2-8番目のヌクレオチド)で標的mRNAを認識することが明らかになっていたが、その位置による役割はよく分かっていなかった。申請者は、ヒト細胞を用いてsiRNAの活性を測定することで、siRNAのシード領域が2-5番ヌクレオチドと6-8番ヌクレオチドの2つの機能ドメインに分かれることを見出した。2-5番ヌクレオチドはRNAi活性には大きく寄与しないドメインである一方、6-8番ヌクレオチドはRNAi活性の程度を規定するドメインであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、従来の生化学的解析のみでは明らかにできなかったsiRNAの作用機序を実際の細胞内環境を反映した解析により明らかにした。siRNAのシード領域のうち、6-8番ヌクレオチドはRNAi活性の程度を規定するドメインであることから、今後活性の強弱を制御する手法の開発が期待される。また、siRNAは薬としての応用が期待されているものの、その作用機序に立脚した医薬品の設計が不十分であることから、本成果はsiRNAの治療応用に向けた知見を広げるものであると示唆される。

研究成果の概要(英文)：Previous biochemical analyses have revealed that small interfering RNA (siRNA) recognized target mRNAs via the seed region (nucleotides 2-8 counting from the 5' end of siRNA), but the role of the seed region by its position was not well understood. By measuring siRNA activity in human cells, we found that the seed region of siRNA is divided into two functional domains, nucleotides 2-5 and 6-8. Nucleotides 2-5 are domains that do not contribute significantly to RNAi activity, while nucleotides 6-8 are the domains that determine the degree of RNAi activity.

研究分野：RNA生物学

キーワード：siRNA RNAi Argonaute2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の細胞内では、ゲノム DNA から mRNA が転写され、mRNA からタンパク質が翻訳されることによって、DNA のもつ遺伝情報の機能が発揮される。しかしながら、近年、ゲノムからはタンパク質をコードする mRNA だけでなく、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA が多く転写され、RNA のままで機能を発揮することが明らかになってきた。このようなノンコーディング RNA の中でも、約 21 塩基程度の小さな二本鎖 RNA である small interfering RNA (siRNA) は、RNA 干渉 (RNAi) という塩基配列特異的に遺伝子を切断する抑制機構をもつ。この RNAi 法は、1998 年に線虫で発見された現象であるが、ヒトでもその機構が保存されており、遺伝子機能の解析に用いられてきた。また、配列特異性の高さから、臨床応用に向けた研究が盛んにおこなわれてきており、2018 年には、RNAi 法を利用した siRNA が米国で初めて医薬品として認められた。

siRNA の作用機序はいくつかのステップに分けられる。siRNA は、Argonaute2 (AGO2) タンパク質に取り込まれた後、片方の鎖が取り除かれ一本鎖化する。この時、シードとよばれる領域 (5' 末端から数えて 2~8 番目のヌクレオチド) が AGO タンパク質と強く相互作用しており、その塩基部分がタンパク質表面に対し露出している。そのため、このシード領域は標的 mRNA と最初に塩基対合する足場となっている。一方で、9 番目以降のヌクレオチドは露出していない。この時、シード領域の塩基対合が引き金となり、9 番目以降の塩基が対合可能となるため、AGO2 タンパク質の酵素活性すなわちにより標的 mRNA が切断される (RNAi 活性) と想定されている。このような siRNA の作用機序は、これまで *in vitro* な生化学的解析および構造解析により明らかにされてきた。しかしながら、実際の細胞内環境を反映した解析がほとんどおこなわれておらず、いくつかの問題点が挙げられる。例えば、細胞内には多種の RNA 結合タンパク質が存在しており、同じ標的 RNA に対し、AGO2 タンパク質と競合的に相互作用する可能性がある。以上の観点から、従来が生化学的解析のみでは siRNA-AGO2 複合体の作用機序を真に理解することは難しく、細胞内環境を模倣する新たなアプローチが必要であると考えた。

2. 研究の目的

多種の RNA 結合タンパク質が存在する複雑な細胞環境において、それらの RNA 結合タンパク質が siRNA-AGO 複合体の抑制活性に与える影響を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

申請者は、実際の細胞内での siRNA の作用機序を理解するため、ヒト培養細胞およびルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた RNAi 活性の測定実験をおこなった。また、マイクロアレイ実験により内在遺伝子に対する siRNA の抑制効果を解析した。さらに構造シミュレーションによる情報科学的手法を用いて、siRNA-AGO2 複合体の構造解析をおこなった。

4 . 研究成果

レポーターアッセイおよびマイクロアレイ解析の結果、siRNA のシード領域が 2-5 番ヌクレオチドと 6-8 番ヌクレオチドの 2 つの機能ドメインに分かれることを見出した。2-5 番ヌクレオチドは RNAi 活性には大きく寄与しないドメインである一方、6-8 番ヌクレオチドは RNAi 活性の程度を規定するドメインであることを見出した。また構造シミュレーションを用いた情報科学的解析の結果、6-8 塩基の中でも 7 番目の塩基は 8 塩基目の立体配置を塩基対合しやすい向きに調整していると示唆された。さらにマイクロアレイ解析により、siRNA の標的遺伝子（標的 RNA）の候補を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Yoshiaki、Fukuhara Daiki、Akase Dai、Aida Misako、Ui-Tei Kumiko	4. 巻 7
2. 論文標題 siRNA Seed Region Is Divided into Two Functionally Different Domains in RNA Interference in Response to 2'-Ome Modifications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 2398 ~ 2410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c06455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Yoshiaki、Tian Shen、Ui-Tei Kumiko	4. 巻 13
2. 論文標題 The siRNA Off-Target Effect Is Determined by Base-Pairing Stabilities of Two Different Regions with Opposite Effects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 319 ~ 319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13020319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Yoshiaki、Tian Shen、Ui-Tei Kumiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Thermodynamic stabilities in the siRNA seed and non-seed regions regulate siRNA off-target effect in opposite direction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research Aspects in Biological Science	6. 最初と最後の頁 117 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.9734/bpi/rabs/v2/6153F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama Shohei、Kusakabe Takashi、Zou Xinyi、Kobayashi Yoshiaki、Asano Yoshimasa、Wang Qingbo S.、Ui-Tei Kumiko	4. 巻 2637
2. 論文標題 SNPD-CRISPR: Single Nucleotide Polymorphism-Distinguishable Repression or Enhancement of a Target Gene Expression by CRISPR System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3016-7_4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lyu Fangjie, An Seongjin, Kobayashi Yoshiaki, Nomura Kohei, Baba Rintaro, Abe Naoko, Hiraoka Haruka, Hashiya Fumitaka, Shu Zhaoma, Ui-Tei Kumiko, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi	4. 巻 74
2. 論文標題 A 2'-O-methylated uridine analog, 2'-O-(methylthiomethoxy)methyl uridine, for siRNA applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128939 ~ 128939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Song Jiaxuan, Kobayashi Yoshiaki, Asano Yoshimasa, Sato Atsushi, Taniguchi Hiroaki, Ui-Tei Kumiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Knockdown of 15-bp Deletion-Type v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 mRNA in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells Repressed Cell Growth In Vitro and Tumor Volume In Vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3162 ~ 3162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14133162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小林 芳明, 浅野 吉政, 程 久美子	4. 巻 93
2. 論文標題 siRNAが働く仕組みと医薬品としての研究開発の現状	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 循環器内科 = Cardioangiology / 循環器内科編集委員会 編	6. 最初と最後の頁 346 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小林芳明, 田申, 福原大輝, 赤瀬大, 相田美砂子, 程久美子
2. 発表標題 2'-O-Me修飾したsiRNAのseed領域は2つの機能ドメインをもつ
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木ゆりあ, 小林芳明, 程久美子
2. 発表標題 トリプレットリピート病の原因遺伝子における一塩基多型を識別する小分子干渉RNA (SNPD-siRNA) の構築とマカド・ジョセフ病由来細胞における検証
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大山隼礼, 小林芳明, 程久美子
2. 発表標題 PIK3CAがん原遺伝子の一塩基変異を識別して抑制する小分子干渉RNA(SNPD-siRNA)の有効性の検証
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seongjin An, Yoshiaki Kobayashi, Kohei Nomura, Akase Dai, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, Misako Aida, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 BaseとSugar修飾を利用したsiRNAのoff-target効果の回避
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiaki Kobayashi, Daiki Fukuhara, Dai Akase, Misako Aida, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 The siRNA Seed Region Is Composed of Two Functionally Different Domains Which Have Different Effects On RNA Interference and Off-target Activities in Response to 2'-OMe Modifications.
3. 学会等名 The Fourth RAS Initiative Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kumiko Ui-Tei, Yoshiaki Kobayashi, Yoshimasa Asano, Hiroaki Taniguchi
2. 発表標題 SNPD-siRNA: an siRNA Specifically Suppresses the Expression of a Target Gene with Single Nucleotide Mutation.
3. 学会等名 The Fourth RAS Initiative Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshimasa Asano, Yoshiaki Kobayashi, Sato Atsushi, Hiroaki Taniguchi, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 Development of siRNA for KRAS and BRAF mutations using a cancer cell-derived Xenograft.
3. 学会等名 The Fourth RAS Initiative Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kumiko Ui-Tei, Yoshiaki Kobayashi, Yoshimasa Asano
2. 発表標題 Molecular design of single nucleotide polymorphism-distinguishable SNPD-siRNA 1塩基変異を区別して遺伝子発現を抑制する SNPDsiRNA の分子設計
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seongjin An, Yoshiaki Kobayashi, Kohei Nomura, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, Dai Akase, Misako Aida, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 The 2' -formamide modification in the siRNA seed region reduces off-target effects by two different mechanisms 2' -formamide 修飾をseed領域にもつsiRNAは2つの異なるメカニズムによってoff-target効果を減弱させる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshinori Ohyama, Yoshiaki Kobayashi, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 Verification of SNPD-siPIK3CA targeting single nucleotide mutation in PIK3CA oncogene in breast cancer-derived cells PIK3CA がん原遺伝子の一塩基多型を識別する小分子干渉RNA (SNPD-siPIK3CA)のがん細胞に対する効果の検証
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soto Okubo, Yoshiaki Kobayashi, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 Development of siRNA which specifically represses the expression of oncogenic fusion gene がんの原因となる融合遺伝子の特異的に抑制する小分子干渉RNAの開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromu Matsui, Yoshiaki Kobayashi, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 Development of the CRISPR system to regulate TERT expression utilizing single nucleotide mutations in the promoter region プロモーター領域における一塩基変異を識別してTERT遺伝子の発現を制御するCRISPRシステムの構築
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yoshiaki Kobayashi, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 Verification of CRISPR-Cas9 system for sequence-specific regulation of the gut microbiota CRISPR-Cas9システムによる塩基配列特異的な腸内細菌叢制御の検証
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiaki Kobayashi, Yoshimasa Asano, Atsushi Sato, Hiroaki Taniguchi, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 Specific knockdown of KRAS mutant gene using SNPD-siRNA repressed cell proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo
3. 学会等名 CBI学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seongjin An, Yoshiaki Kobayashi, Kohei Nomura, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, Dai Akase, Misako Aida, Kumiko Ui-T
2. 発表標題 Prediction of Structural Change of siRNA by 2'-formamide, a Newly-synthesized Chemical Modification, via Density Functional Theory.
3. 学会等名 CBI学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林芳明, 佐藤淳, 浅野吉政, 谷口博昭, 程久美子
2. 発表標題 1塩基の違いを区別して特異的に抑制するsingle-nucleotide polymorphism-distinguishable siRNA (SNPD-siRNA)の開発とその機能解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会・若手シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安成鎮, 小林芳明, 野村浩平, 木村康明, 阿部洋, 赤瀬大, 相田美砂子, 程久美子
2. 発表標題 2'-formamide修飾をseed領域にもつsiRNAは塩基の向きを変えることで off-target効果を減弱させる
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会・若手シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野吉政、小林芳明、佐藤淳、谷口博昭、程久美子
2. 発表標題 Cell-derived Xenograftモデルを用いたKRASやBRAFの変異部位を対象としたsiRNAの有効性の検証
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大山隼礼、小林芳明、程久美子
2. 発表標題 PIK3CAがん原遺伝子の一塩基多型を識別する小分子干渉RNA (SNPD-siRNA)の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiaki Kobayashi, Daiki Fukuhara, Dai Akase, Misako Aida, Kumiko Ui-Tei
2. 発表標題 The siRNA seed region is divided into two functionally different domains in RNA interference in response to 2'-OMe modifications.
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 浅野吉政、小林芳明、程久美子（編集：横田 隆徳）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 204
3. 書名 核酸医薬 本領を發揮する創薬モグリティ	

1. 著者名 小林芳明、程久美子 (編集: MEDCHEM NEWS編集委員会)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 じほうMEDCHEM NEWS	5. 総ページ数 60
3. 書名 日本薬学会医薬化学部会機関誌「MEDCHEM NEWS」31-4号「ESSAY特集」	

1. 著者名 小林芳明, 程久美子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 736
3. 書名 Clinical Neuroscience_核酸医薬と神経疾患	

1. 著者名 小林芳明, 程久美子 (小比賀聡, 井上貴雄監修)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 シーエムシー・リサーチ	5. 総ページ数 290
3. 書名 核酸医薬・mRNA医薬の製造分析の基礎と基盤技術開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------