

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770133

研究課題名(和文) ヒト全マイクロRNA発現ベクターライブラリの構築と  
それを用いた標的制御機構の解明研究課題名(英文) Analysis of the microRNA regulatory mechanisms based on  
the development of human microRNA expression vectors

研究代表者

内藤 雄樹 (NAITO YUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：60451829

研究成果の概要(和文)：

マイクロRNA(miRNA)の機能を解明するための基盤を構築すると同時に、miRNAによる遺伝子の発現制御ネットワークの全体像を理解するために、ヒトmiRNAの発現ベクターライブラリの構築およびmiRNAの活性を定量的にモニタリングできる「miRNAセンサー」の構築をおこなった。またmiRNAの標的認識と類似の機構で起こるsiRNAのオフターゲット効果(副作用)が少ないsiRNAを設計できるウェブサーバsiDirect 2.0を構築し公開した。

研究成果の概要(英文)：

The human microRNA(miRNA) expression vectors and the miRNA sensors were developed in order to investigate the regulatory mechanisms of miRNAs. We present siDirect 2.0 webserver, which provides functional siRNA design with the reduction of the seed-dependent, miRNA-like off-target effects of an siRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロRNA(miRNA)は、約20塩基の小さなnon-coding RNAの一種であり、相補的な配列をもつmRNAを認識して翻訳抑制やmRNA分解を誘導する。研究開始当初、ヒトでは約600種のmiRNAが同定されており、その一部は発生・分化をはじめとする生命現象のさまざまな過程で下流遺伝子の制御をおこなっていることが知られている。し

かしながら、大部分のmiRNAは標的遺伝子が特定されておらず、機能が明らかになっていない。

一方、miRNAはseedとよばれる7塩基の領域(5'末端から2~8番目)を利用して標的となるmRNAの3'UTRを認識することが知られているが、これと同様にsiRNAもseed(ガイド鎖の5'末端から2~8番目)と相補的な配列がmRNAの3'UTRにある場合、本

来の標的とは無関係なそれらの遺伝子が意図せず抑制される場合がある。siRNA は人為的に標的遺伝子を抑制する手法として広く利用されており、本来の標的以外の遺伝子がこのように意図せず抑制される「オフターゲット効果」は、siRNA を用いる上で大きな課題のひとつと考えられている。このように、miRNA の標的認識・作用の機構は、siRNA のオフターゲット効果の機序と密接に関連している。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロ RNA (miRNA) の機能を解明するための基盤を構築すると同時に、miRNA による遺伝子の発現制御ネットワークの全体像を理解することを目的として、ヒト全 miRNA の発現ベクターライブラリの構築および miRNA の活性を定量的にモニタリングできる「miRNA センサー」の構築をおこなう。また siRNA のオフターゲット効果を防ぐ知見が得られた場合は、研究代表者等が構築・公開している siRNA 設計システム siDirect に取り入れ改良をおこなう。

## 3. 研究の方法

miRNA 発現ベクターの構築は、miRBase より取得した前駆体 miRNA (pre-miRNA) 配列をゲノムにマッピングし、その前後約 200 塩基対を含む領域を PCR で増幅するためのプライマーを作成した。ヒトのゲノム DNA を鋳型に PCR で当該領域を増幅し、発現ベクターに挿入して miRNA 発現ベクターを構築した。一方、miRNA センサーの構築

は、成熟 miRNA の標的配列を合成 DNA オリゴヌクレオチドで作成し、これらをルシフェラーゼ遺伝子の下流部分に挿入した (図 1)。

## 4. 研究成果

マイクロ RNA (miRNA) の機能を解明するための基盤を構築すると同時に、miRNA による遺伝子の発現制御ネットワークの全体像を理解するために、ヒト miRNA の発現ベクターライブラリの構築および miRNA の活性を定量的にモニタリングできる「miRNA センサー」(図 1) の構築をおこなった。我々のグループでは、siRNA の seed (ガイド鎖の 5' 末端から 2~8 番目) 領域と mRNA が対合するときの熱力学的安定性の強さが、オフターゲット効果の大きさと強い相関があることを明らかにしている。さまざまな配列の seed をもつ多数の siRNA を用いて、それぞれのオフターゲット効果をレポーター実験により比較し、またマイクロアレイを用いたプロファイリングをおこなった結果、siRNA の seed と標的 mRNA とが対合するときの融解温度 (melting temperature:  $T_m$ ; 以下、seed の  $T_m$  と呼ぶ) が高い siRNA はオフターゲット効果が大きく、seed の  $T_m$  が低い siRNA はオフターゲット効果が小さかった。すなわち、seed の  $T_m$  が低い siRNA を選択することが、オフターゲット効果を低減させるポイントとなる。本研究ではこの結果を取り入れ、seed の  $T_m$  が低く、オフターゲット効果が弱いと予測される siRNA を設計できるようなウェブサーバ「siDirect 2.0」(図 2, <http://siDirect.RNAi.jp/>) を構築し、公開した。

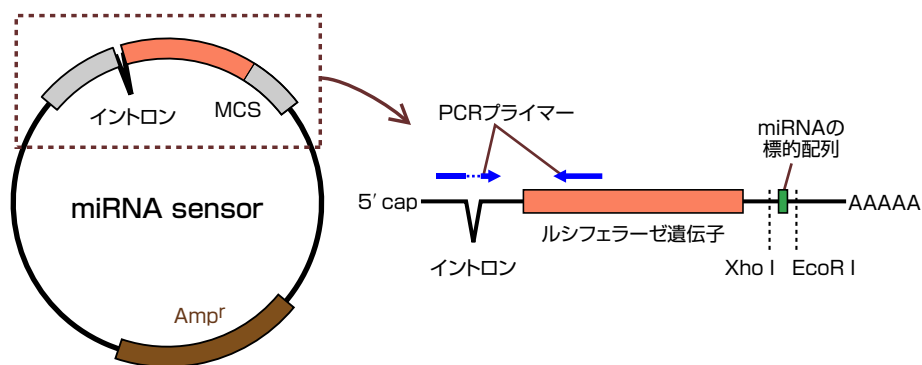


図1 ● miRNAセンサーの概要。ルシフェラーゼ遺伝子の3' UTRにあるマルチクローニングサイト (MCS) に、miRNAの標的配列を挿入した。

# A



siDirect version 2.0 highly effective, target specific siRNA online design site.

Enter an accession number and retrieve sequence:  
NM\_012131

or Paste in a nucleotide sequence:

```
>gi|297515473|ref|NM_012131.2 Homo sapiens claudin 17 (CLDN17), mRNA
CCACTCCGAATTCACCAAGCTTCAAGAGCAAGGCAATGCCATTTATCCCTTCAAAATGCTGGCGTGC
TTCTGGTTCCTGGATGGTGGGCACTCTTCCCAACACCTTCTGCTCAGTGGAGATCAGCTTT
TTGTGGCAGCAACTATTGTTCTTTGAGAGGCTCTGGAGGCGCTCTGGATGAATTCGACACCAAGCC
AGGCTCCGGTTCAATGCAACTTCTATAGCTCTGTTGGCTCTCCGCTCCCTGGGAACAGCCCGGG
CCCTCATCTGTGGCTTCTCTCTCTGATGCTGCTTATGGCATCTCTGGCATGAAGCAGCT
CCAGTCCAGGCTCTAAGCAGAGGCAAGCAATACCTTCTGGAACTTCCAGAGCTCTTCTCATCTG
CCGGCATCTCTGTTGATTCGGCTGAGCTGGACGCAATATATCATCAGAGATCTTCAACCCAG
CCATCACAATGCTCAGAACAGAGCTCGGAGCAGCACTTTCCCTGGCTGGCAAGCCGCTGCTCTCT
CTTCATTTGGAGGGGCTCTGCTTTTGGATTTTGGCTGCGACAGAAAGAGCAGGGGTACAGATATCCA
GCTCCGCTACCGTCTGCCACACAGATAGCAAGCAAGAAATACCAAGATCTGATTAAGACCTCCACA
TTCTATCTAATCCCTCTTTTGGCTCCAAAG
```

Options:

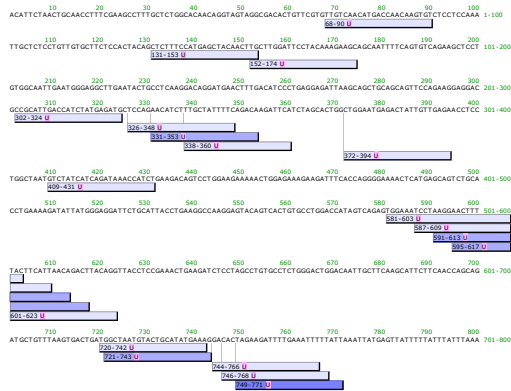
# C

## Effective siRNA candidates

target position	target sequence	RNA oligo sequence 21nt guide (5'-3') 21nt passenger (5'-3')	functional siRNA sequence (U-T)	seed-duplex stability (Tm): guide passenger	specificity check: minimum number of mismatches against any off-targets
68-90	TTCTCCACATGACCAACCACT	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	16.7 °C 20.5 °C	2 (detail) 3 (detail)
131-153	CTCTTCCATGACATGACACT	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	19.0 °C 20.1 °C	2 (detail) 3 (detail)
153-174	TGCTGGATGCTCTCAAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	19.2 °C 20.1 °C	2 (detail) 3 (detail)
302-324	CCGATGACATCTATGATGAT	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	17.8 °C 20.5 °C	4 (detail) 3 (detail)
328-340	TGCGACACATCTTCTGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	19.7 °C 19.2 °C	2 (detail) 2 (detail)
351-353	AACATCTTCTTATTCTGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	12.2 °C 12.0 °C	2 (detail) 2 (detail)
338-360	TTGCTATTTTTCAGAGATGCA	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	19.2 °C -4.3 °C	3 (detail) 2 (detail)
372-394	CTGAAATGACATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	12.1 °C 20.4 °C	2 (detail) 3 (detail)
409-431	GTCTATGATGATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	20.0 °C 17.4 °C	3 (detail) 3 (detail)
581-603	TGGAATCTTCAAGGACTTTT	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	13.3 °C 18.7 °C	2 (detail) 2 (detail)
587-609	TCTAAGGACTTTTCTTCTG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	14.6 °C 19.9 °C	2 (detail) 2 (detail)
591-613	AAGAACTTTTCTTCTGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	8.9 °C 13.3 °C	2 (detail) 2 (detail)
595-617	ACTTTTCTTCTGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	11.8 °C 4.9 °C	3 (detail) 3 (detail)
621-643	TACTTCAATGACATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	21.4 °C 8.9 °C	3 (detail) 2 (detail)
720-742	TGGTATGATGATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	21.1 °C 11.6 °C	3 (detail) 2 (detail)
723-745	GCCATGATGATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	14.9 °C 8.5 °C	3 (detail) 2 (detail)
744-766	GACATGATGATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	7.7 °C 18.9 °C	2 (detail) 2 (detail)
748-770	CATGATGATGATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	7.4 °C 20.2 °C	2 (detail) 2 (detail)
749-771	TAGATGATGATGATGATG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	AGGUCGAGGCAAGGACAGCA GACACGACGACACAGAGG	12.0 °C 5.3 °C	2 (detail) 2 (detail)

click

## Graphical view of effective siRNA candidates



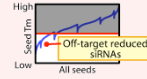
# B

## Options:

Functional siRNA selection algorithm by:

Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res 32, 936-948 (2004) Link

Minimization of seed-dependent off-target effects   
 Seed-duplex stability: Max Tm 21.5 °C  
(for reducing seed-dependent off-target effect)  
Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res 36, 7100-7109 (2008) Link



Specificity check: Homo sapiens (human) non-redundant database

Hide less-specific siRNAs

## Other options

- Target range: from start to end
- Avoid contiguous G's or C's  nt or more (for chemically synthesized siRNA)
- Avoid contiguous A's or T's  nt or more (for shRNA vectors with pol III promoter)
- GC content: from 0 % to 100
- Custom pattern: NNNNNNNNNNNNNNNNNNN
- Exclude pattern:
- Only show siRNAs that match all checked criteria

# D

## Similar Sequences

16	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	hs08222   HsF5166 Human interferon beta-1 (IFN-beta-1) mRNA, complete cds. NM_002786.2   Homo sapiens interferon, beta 1, fibrinoblast (IFNB1), mRNA
17	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
18	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
19	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
20	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
21	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
22	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
23	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
24	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
25	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
26	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
27	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
28	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
29	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
30	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
31	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
32	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
33	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
34	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
35	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
36	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
37	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
38	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
39	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
40	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
41	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
42	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
43	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
44	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
45	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
46	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
47	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
48	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
49	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
50	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
51	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
52	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
53	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
54	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
55	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
56	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
57	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
58	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
59	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
60	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
61	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
62	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
63	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
64	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
65	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
66	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
67	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
68	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
69	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
70	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
71	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
72	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
73	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
74	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
75	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
76	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
77	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
78	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
79	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
80	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
81	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
82	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
83	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
84	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
85	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
86	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
87	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
88	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
89	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
90	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
91	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
92	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
93	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
94	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
95	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
96	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
97	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
98	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
99	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)
100	GCTTGGATTCCTCAAGAAG	BV48613   HsF516818038 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZ686N06224 (from clone DKFZ686N06224)

図2 ● siRNA設計ウェブサーバ, siDirect 2.0 (http://siDirect2.RNAi.jp/).

A) トップページ. siRNAを設計したい遺伝子名またはアクセス番号, あるいは塩基配列を入力する. B) siRNA設計オプション. C) 設計されたsiRNAリスト. 上段にはsiRNA配列リスト

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Naito Y, Ui-Tei K. (2011) Designing functional siRNA with reduced off-target effects. *Methods in Molecular Biology in press*. 査読あり
- ② Narikawa K, Nishi K, Naito Y, Yonezawa S, Mazda M, Ui-Tei K. (2010) Genome-wide identification and analysis of miRNAs complementary to upstream sequences of mRNA transcription start sites. *Gene Silencing: Theory, Techniques and Applications*, 287-319. 査読あり
- ③ Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, Ui-Tei K. (2009) siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics* **10**, 392. 査読あり
- ④ Ui-Tei K, Nishi K, Naito Y, Zenno S, Juni A, Saigo K. (2009) Reduced base-base interactions between the DNA seed and RNA target are the major determinants of a significant reduction in the off-target effect due to DNA-seed-containing siRNA. *Proceedings of the 2009 Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2009)*, 298-304. 査読あり
- ⑤ Naito Y, Nishi K, Juni A, Ui-Tei K. (2009) Functional shRNA expression system with reduced off-target effects. *Proceedings of the 2009 Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2009)*, 291-297. 査読あり
- ⑥ Ui-Tei K, Naito Y, Zenno S, Nishi K, Juni A, Tanaka A, Saigo K. (2009) Bipartite roles of the central region of the siRNA guide strand in RNA interference due to modified siRNA with a DNA seed arm. *Research Advances in Nucleic Acids Research* **3**, 1-17. 査読あり
- ⑦ Ui-Tei K, Naito Y, Nishi K, Juni A, Saigo K. (2008) Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res.* **36**, 7100-7109. 査読あり
- ⑧ Ui-Tei K, Zenno S, Naito Y, Takahashi F, Nishi K, Juni A, Tanaka A, Saigo K. (2008) DNA-modified siRNA-dependent gene silencing with reduced off-target effect is induced through a pathway parallel to that for siRNA-mediated RNA interference. *Proceedings of the 2008*

*Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2008)*, 339-345. 査読あり

- ⑨ Naito Y, Saigo K, Ui-Tei K. (2008) Evaluation of published rational siRNA design algorithms using firefly luciferase gene as a reporter. *RNA interference research progress*, 3-11. 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 内藤 雄樹. 高いゲノム多様性をもつ HIV-1 を標的とする至適 siRNA の設計. 第20回日本数理生物学会年会 2010/09/16 札幌.
- ② Naito Y, Yoshimura J, Morishita S, Ui-Tei K. siDirect 2.0: an Updated Website to Select Functional, Target-specific siRNA with Reduced Seed-dependent Off-target Effect for Mammalian Functional Genomics. *The 19th CDB Meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology"* 2010/05/10 Kobe.
- ③ 内藤 雄樹, 吉村 淳, 森下 真一, 程 久美子. siDirect2.0: a website updated to select functional siRNA with reduced off-target effect for functional genomics. 第32回日本分子生物学会年会 2009/12/11 横浜.

[図書] (計1件)

- ① Naito Y, Saigo K, Ui-Tei K. (2009) Experimental validation of published siRNA design algorithms. *Small Interfering RNA: New Research*, 185-194, Nova Science Publishers.

[その他]

siDirect 2.0 ウェブサーバ  
<http://siDirect2.RNAi.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 雄樹 (NAITO YUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教  
研究者番号：60451829

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし