

siRNA の効果的な配列と設計

Tushl らのグループはショウジョウバエの抽出物を用いた *in vitro* の実験によって、21～23 塩基の RNA がターゲット配列認識のガイド RNA として働くことによって RNAi が引き起こされることを発見し、そのガイド RNA は siRNA (short interfering RNA) と名づけられました (Elbashir SM. *et al.* 2001a)。その後 siRNA として合成 RNA が利用できることが明らかとなり、さらに siRNA は非常に高い配列特異性を持つことや構造的長をもつことが明らかとなってきました (Elbashir SM. *et al.* 2001b, Elbashir SM. *et al.* 2001c)。

近年、siRNA 配列の配列特異性や構造的長に関する研究が行われ、dsRNA センス鎖の 3' 側が 5' 側に比べ AU rich である配列が狙った遺伝子に対して高い RNAi 効果を示すと報告がありました (Khvorova A. *et al.* 2003, Schwarz DS. *et al.* 2003)。最近では、siRNA 配列の具体的な設計法がいくつか提案され、高確率で RNAi を引き起こす配列がわかってきています (Hsieh AC. *et al.* 2004, Reynolds A. *et al.* 2004, Ui-Tei K. *et al.* 2004)。

そこで、タカラバイオではこれらの生物学的な知見や設計に関する報告をふまえ、さらに豊富な siRNA を用いた実験データを解析することで、より効果的な独自の設計法を構築しています。

設計した配列を siRNA 発現ベクターを用いた実験系に使用する場合には、既に述べた要因の他にも注意すべき点があります (Kawasaki H. *et al.* 2003, Miyagishi M. *et al.* 2002)。ベクターの系では siRNA の転写に RNA polymerase III (polIII) 系のプロモーター系が使われることが多いのですが、この場合その特異性から転写開始の塩基はプリン (G or A) が好ましいとされています。また、4 塩基以上連続した T 配列では polIII 系の転写は停止してしまいますので、TTTT や AAAAA のような配列は含まないようにする必要があります。

RNAi による遺伝子抑制実験を行う際には狙った遺伝子特異的に遺伝子抑制を起こさせる必要があることが一般的だと思います。このために設計された siRNA 配列は対象遺伝子に特異的な配列である必要があります (Jackson AL. *et al.* 2003, Saxena S. *et al.* 2003)。特異性を確認するためには通常 BLAST によるホモロジーサーチを使います。ホモロジーサーチによって他の遺伝子に相同性の無い配列を選択することになります。ホモロジーサーチを行う際のデータベースとしては NCBI の nr (non-redundant nucleotide sequence database) が良く使われるようですが、さまざまな生物種における、mRNA 配列だけでなくゲノムを含むさまざまな配列が混在していますので結果の解釈には注意が必要です。同じく NCBI の EST 配列や良くキャラクタライズされた遺伝子配列をクラスタリングしたデータベースである Unigene をホモロジーサーチに利用しても良いでしょう。

最後に何箇所 (何個) の配列を設計すべきかという点について触れて起きます。どんなに効果的な siRNA 配列の設計法を用いても例外は存在しますし、まだまだ新しい知見が加え続けられている状態でもあります。従って、設計した配列が 100% 機能するとはかぎりませ

んし、また、抑制の程度も配列によって異なっています。さらに、対象配列にtranscript variantやSNPの存在する可能性もありますし配列自体の信頼性の問題もあります。このような場合siRNAは非常に高い配列特異性を持っていますので抑制効果に大きな影響がでると考えられます。さらに、遺伝子抑制の結果得られた表現系が予期せぬ（ホモロジーサーチを行っても未知の配列が存在するかもしれません）遺伝子も抑制された結果である可能性もあります。これらのことを考え合わせるとsiRNAは複数設計して比較実験を行うのが良いと考えられます。さらに、ネガティブコントロール実験も行ったほうが良いと思われまます。ネガティブコントロールには、ホモロジーサーチにより既知の遺伝子に対して相同性のないことが確かめられたRNA配列などが使用されます。

参考文献

- Elbashir SM. *et al.* (2001a) *Genes Dev.* Jan 15;**15**(2):188-200.
- Elbashir SM. *et al.* (2001b) *Nature.* May 24;**411**(6836):494-8.
- Elbashir SM. *et al.* (2001c) *EMBO J.* Dec 3;**20**(23):6877-88.
- Hsieh AC. *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* Feb 09;**32**(3):893-901.
- Jackson AL. *et al.* (2003) *Nat. Biotechnol.* Jun;**21**(6):635-7.
- Kawasaki H. *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* Jan 15;**31**(2):700-7.
- Khvorovova A. *et al.* (2003) *Cell.* Oct 17;**115**(2):209-16.
- Miyagishi M, Taira K. (2002) *Nat. Biotechnol.* May;**20**(5):497-500.
- Reynolds A. *et al.* (2004) *Nat. Biotechnol.* Mar;**22**(3):326-30.
- Saxena S. *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 2003 Nov 7;**278**(45):44312-9.
- Schwarz DS. *et al.* (2003) *Cell.* Oct 17;**115**(2):199-208.
- Ui-Tei K. *et al.* (2004) *Nucleic Acids Res.* Feb 09;**32**(3):936-48.