

2. RNAiによる遺伝子機能阻害とそのウイルス感染症治療への応用

簗島 弘¹, 須山 英悟^{1,2}, 川崎 広明^{1,2}, 多比良 和誠^{1,2}

始めに: RNAi とは何か

RNAi (RNA interference) は二本鎖 RNA (dsRNA: double-stranded RNA) が細胞に導入された結果, その相補配列を持つターゲット遺伝子が転写後に発現抑制される生物学的な現象である¹⁾ (図1). この現象は, さまざまな生物種間で広範に保存されており, 遺伝子発現抑制法として簡便で特異性が高く, 効果が大きい注目を集めてきた。当初, 哺乳動物細胞への応用は難しいとされてきたが, 近年, 哺乳動物では, short interfering RNA (siRNA) と呼ばれる21塩基の二本鎖 RNA が遺伝子発現を効果的に抑制できることが示され, 医療分野における応用へも期待されるようになってきた²⁾. 本稿では, RNAi の原理およびウイルス感染症治療への応用について概説したい。

RNAi 現象とその背景

1998年に, Fire らにより報告された RNAi は, dsRNA が引き金となって, そのアンチセンス鎖と相補配列を持つ mRNA が分解されて遺伝子の発現が抑制される現象である¹⁾. その後, RNAi は線虫を始め, ショウジョウバエ, 植物などの様々な生物細胞種において, 簡易な遺伝子発現抑制法として応用されてきたが, 長らく哺乳動物の系ではうまくいかなかった³⁾. RNAi の遺伝子の抑制効果はその

二本鎖領域の長さに依存し百塩基長以下の dsRNA の効果は低いとされたため, 多くの RNAi の研究は数百塩基の dsRNA を導入することにより行われてきた⁴⁾. しかしながら, 哺乳動物細胞では, 長鎖 dsRNA の導入により, インターフェロンのシグナル経路が活性化され, 二つの経路により非特異的な翻訳抑制や mRNA の分解を引き起こす^{5,6)} (図2). インターフェロンは dsRNA 依存的タンパク質キナーゼ (PKR) と 2', 5' オリゴアデニレートシンターゼ (2', 5'-AS) を誘導する. PKR は, dsRNA と結合して活性化し, 翻訳因子 eIF 2 α をリン酸化する. これにより eIF 2 α は他の翻訳因子との不活性型複合体を形成し, 非特異的に翻訳を阻害する. また, 2', 5'-AS も PKR 同様, dsRNA により活性化され, 非特異的 RNA 分解酵素である RNase L を活性化し, 結果として非特異的に RNA が切断される. このため, 動物細胞では長鎖 dsRNA により細胞毒性が生じ, RNAi の応用には否定的であった⁷⁾. しかし, 2001年7月, Tuschl のグループにより, short interfering RNA (siRNA) と命名された短鎖二本鎖 RNA により, 哺乳動物細胞でも RNAi が生じることが示された²⁾. siRNA は, 21塩基という RNA の長さ, 3' 側に数塩基突出している dsRNA の形状を持つ. この報告から, 哺乳動物細胞においても RNAi の存在が明らかとなり, 世界中で合成 siRNA を用いた特異的な遺伝子発現抑制に関する研究が爆発的に波及した。

RNAi の作用機構

RNAi の機構では, 二本鎖 RNA は細胞質で Dicer と呼ばれる RNA スクレアーゼにより21-23塩基の siRNA に分解され, ターゲット配列認識のためのガイド RNA として働くと考えられている. siRNA は, Dicer による切断後, RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体によって取り込まれる⁸⁻¹⁰⁾. RISC は, RNA とタンパク質との複合体であり, その分子量は生物種によって違い, 200kD から500kD と考えられている¹¹⁾. RISC 複合体を形成後, siRNA の二本鎖はアンチセンス鎖だけになり, これが標的配列を見つめるガイドとして機能し,

¹東京大学大学院・工学系研究科・化学生命工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

²産業技術総合研究所・ジーンファンクションセンター RNAi-mediated specific gene silencing and its application to medical treatments of viral infectious disease. Hiroshi Minoshima¹, Eigo Suyama^{1,2}, Hiroaki Kawasaki^{1,2}, Kazunari Taira^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, The University of Tokyo

²Gene Function Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

¹7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

²Central 4, 1-1-4 Higashi, Tsukuba Science City 305-8562, Japan

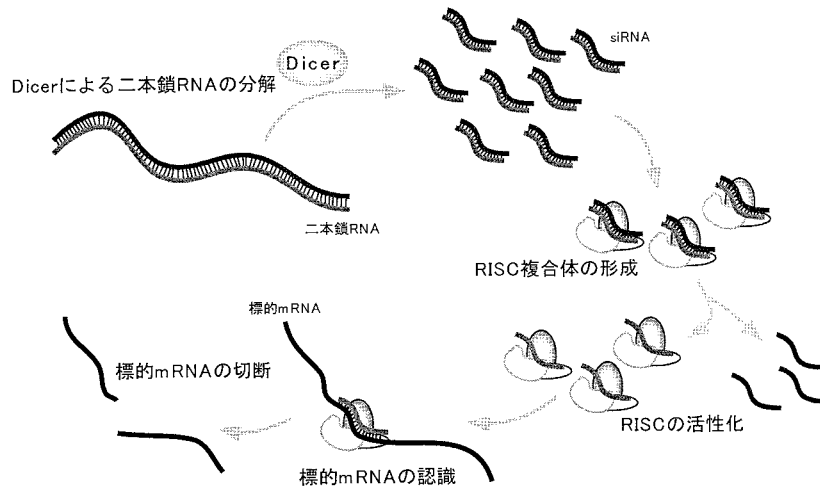


図1 RNAiの概略図

二本鎖RNAは、Dicerによって21-23塩基のsiRNAにプロセッシングされる。siRNAはRISCによって取り込まれ、アンチセンス鎖が標的mRNAのガイドとなって近づきRISCによる切断を導く。

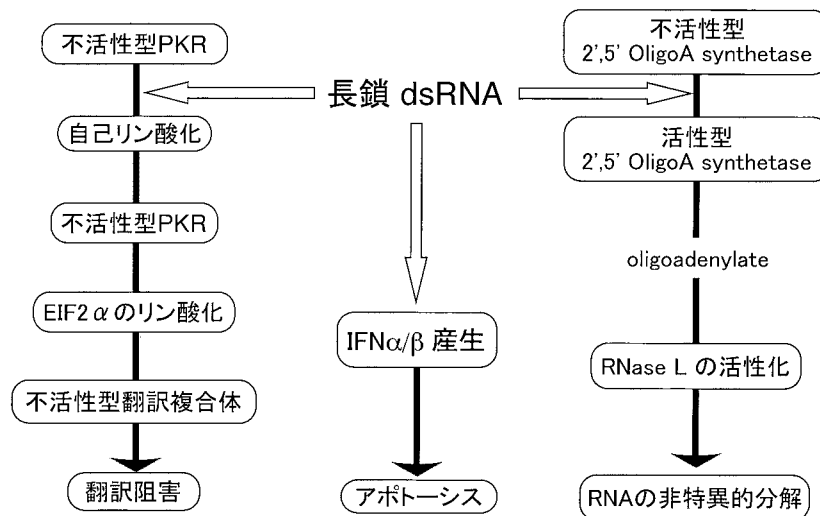


図2 哺乳動物細胞のdsRNAに対する急性応答

長鎖dsRNAは哺乳動物体細胞では複数の抗ウイルスシグナル伝達系を活性化し非特異的な発現抑制を誘導する。PKR(dsRNA-dependent protein kinase)はウイルスゲノムなどの長鎖dsRNAにより活性化され翻訳阻害を誘導する。また、2',5'-ASはdsRNAと結合することにより活性化し、RNase Lを通じてmRNAを非特異的に分解する。また、インターフェロン α , β が誘導され、他のシグナルと共にアポトーシスを誘導する^{6,50)}。

標的mRNAを切断する¹¹⁾(図1)。RISCを構成するタンパク質には不明なものも多く活発な研究が続けられている。RNAiの切断反応において標的RNAはほぼ中央で切断されると報告されているが、切断反応に関わるエンドヌクレアーゼは不明である¹²⁾。また、アカパンカビ、線虫、シロイヌナズナなどでRNAi効果が見られないノックアウト個体が見つかり、現在、RNA依存的RNAポリメラー

ゼ(RNA dependent RNA polymerase: RdRp), RNAヘリカーゼ, 3',5'-エキソヌクレアーゼ, RNase IIIなどのタンパク質がRNAiに関わるものとされている¹³⁾。これらのタンパク質がRNAiにおいて果たす役割は不明な点が多いが、線虫、植物において、RdRpによりsiRNAをプライマーとして標的mRNAに対するアンチセンスRNAが新たに合成され、新たなsiRNAが増幅されることが報告

されている。このため、これらの種において RNAi には、RdRp が RNAi 効果の維持に重要な役割を果たすと考えられている¹⁴⁻¹⁷。一方、ショウジョウバエ、哺乳動物においては、RdRp ホモログはゲノムに存在せず、このような増幅機構はおそらく存在しないと考えられている^{18,19}。RNAi の生物学的役割は、トランスポゾン、ウイルスなどからの、核酸レベルでの防御機構であるといわれるが、RNAi による遺伝子発現抑制機構には未解明な部分が多く、今後の研究が待たれる²⁰。

哺乳動物細胞における RNAi の応用

siRNA を導入すると、他の方法に比べて低濃度で高い遺伝子抑制効果が得られる場合が多い。その理由として、siRNA を取り込んだ RISC が繰り返し標的 RNA を切断すること、siRNA がタンパク複合体中で保護されることにより安定化し活性が持続することが挙げられる^{11,21,22}。また線虫や植物では RdRp を介した siRNA の増幅機構が存在するが、前述のように哺乳動物では RdRp のホモログが存在しないために siRNA の増幅は起こらないと考えられている^{18,19}。しかしそのことが逆に哺乳動物において有利に働いている。例えば、機能ドメインが類似している遺伝子を標的とした場合、たとえ機能ドメインをコードする配列を標的に選択しなくても、RdRp 効果によって機能ドメインを標的としている siRNA を生成してしまう可能性がある。それによってファミリーを形成する遺伝子を全て発現抑制してしまう。そのため哺乳動物細胞において siRNA は、非常に標的 mRNA に対する特異性が高いと考えられる。このため RNAi は、哺乳動物細胞の遺伝子発現を抑制するための標準的手法となりつつある。

siRNA を遺伝子発現法として用いる上で留意すべき点がある。まず、siRNA の発現抑制効果は、標的遺伝子の配列に依存することが報告されている^{9,23-25}。しかしながら、効果が高い siRNA の標的配列を選定する上で統一的な指標は明らかにされておらず、現時点では各研究室ごとに経験的に標的サイトを選択し複数箇所に対する合成 siRNA を作製しなければならない。このため、siRNA の合成や外注のコスト、ならびに労力が少なからず必要となる。また、化学合成した siRNA を哺乳動物細胞に導入した場合、発現抑制効果は、導入後 1 週間ほど有効であるといわれている。このため長期的な抑制効果を評価するためには、合成 siRNA 導入による手法には限界がある。このため、ウイルスをターゲットとした遺伝子治療への応用を考えた場合、siRNA を動物細胞内で安定に発現させるベクターシステムが重要となる。

In vitro dicing 法を用いた siRNA ライブラリーの細胞内効果

siRNA は、21-23塩基の dsRNA であり RISC のガイド

として働き標的 mRNA の切断を導く。そのため合成 siRNA は、特異的な遺伝子発現阻害剤として利用されている。一般的に用いられている合成 siRNA は、21塩基のセンス鎖とアンチセンス鎖から構成され、この二本鎖は、それぞれ 3' 末端側に 2 塩基の突出した構造を形成している。この突出構造は、RISC と相互作用するのに必要であると考えられている。また siRNA は、標的配列によって大きく抑制効果の差が現れることが報告されている^{9,23-25}。そのため、効果の高い siRNA を構築しようとするれば、標的の構造予測や経験則をもとに多種の siRNA を作成し、その抑制効果の一つ一つ試験しなければならない。また植物や線虫のように長鎖の dsRNA を細胞に導入する方が効果的であると考えられるが、先に述べたように長鎖の dsRNA は、哺乳動物細胞では非特異的な遺伝子発現抑制を導いてしまう^{5,6}。そこで我々は、Dicer を siRNA 効果の配列依存性の問題克服に利用することを考案した²³。すなわち、Dicer を試験管内で長鎖の dsRNA と反応させて siRNA ライブラリーを作製し、細胞に導入すれば長鎖の dsRNA によって誘発される非特異的な発現抑制を回避できるはずである。またこのライブラリー中には、多種の配列を標的とした siRNA が含まれており、siRNA 効果の配列依存性の問題解決が期待できる。*In vitro* dicing 法の概略を図 3 に示した。はじめに T7 プロモーターを含んだ上流プライマー及び SP6 プロモーターを含んだ下流プライマーを用いて標的遺伝子を PCR 法で増幅させる。次に上記の各プロモーターから *in vitro* 転写反応を行い、センス、アンチセンス RNA を作製してそれぞれ PAGE にて精製する。これをアニーリングさせることで基質となる長い dsRNA を作り、大腸菌などに作らせたりコンビナント Dicer を用いて、dsRNA のプロセッシング反応を行う。反応後、20-25塩基の siRNA を PAGE を用いて精製し、標的 mRNA に対する siRNA ライブラリーとする (図 3A)。

実際、我々は、H-ras mRNA に対して 10ヶ所の標的サイトに対する siRNA をそれぞれ合成して、RNAi 効果の配列特異性を検討した。その結果、選択した標的配列によって、標的遺伝子の発現抑制に変動が見られた (図 3B)。この結果は、siRNA 効果が標的配列に依存する一つの例である。次に H-ras siRNA の標的サイト 7 から 10 を含む配列領域に対する dsRNA を作成した。この dsRNA を基質としてリコンビナント Dicer による *in vitro* プロセッシング反応を行い、siRNA ライブラリーを作製した。この siRNA ライブラリーを細胞に導入し、H-ras 遺伝子の発現減少を各単独の siRNA と比較検討した。その結果、siRNA ライブラリーは、それぞれの siRNA を単独で導入するよりも、効果的な発現抑制を示した (図 3B)。また H-ras 以外でもピューロマイシンや c-Jun など標的とした siRNA ライブラリーも、同様に良好な siRNA 効果を示

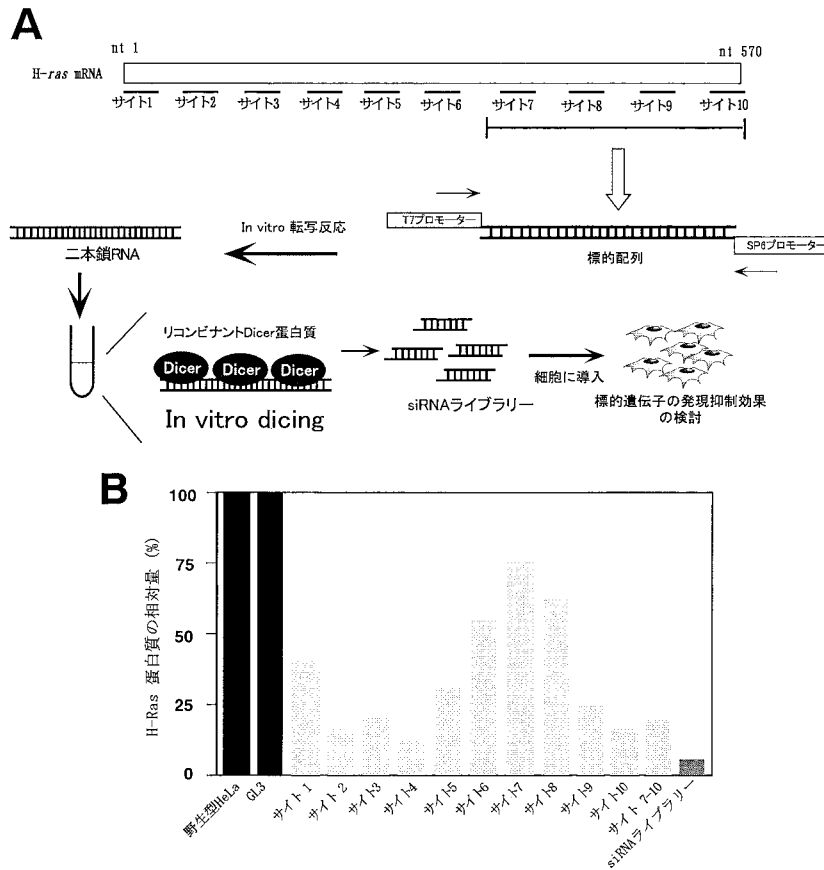


図3 *In vitro* dicing法の概略

(A) *In vitro* dicingによるsiRNAライブラリーの作製の概要: T7及びSP6プロモーターを含んだプライマーを用いて標的遺伝子をPCR法で増幅し, *in vitro* 転写反応を行う。両プロモーターよりセンス, アンチセンスRNAが転写され, これらをアニーリングしてできる長いdsRNAをリコンビナントDicerにより切断し, *in vitro* dicingを行う。(B) H-ras mRNAの10ヶ所の標的サイトに対する各RNAiの効果を検討したところ, RNAi効果の配列特異性が観察された。そこで標的サイト7から10を含む配列領域に対する*in vitro* dicingによるsiRNAライブラリーを作製し, 細胞に導入した。この結果, siRNAライブラリーは各siRNAを単独で導入するよりも, 効率よく発現抑制を示した。

している²³⁾。以上のことから*in vitro* dicing法により作製されるsiRNAライブラリーは, 標的遺伝子の配列に依存することなく非常に効果的にRNAiを誘導するため, 今後, siRNAを用いた医療への応用に期待がもてると考えられる。

より安定した遺伝子抑制を目指して —siRNA発現ベクターの開発—

哺乳動物細胞に合成したsiRNAを用いてRNAiの実験を行う場合, 遺伝子のノックダウン効果は一過的であり, ノックダウン細胞株やノックダウン動物の作製ができないため長期の実験には不向きである。これに対し, 細胞内でsiRNAを産生する発現ベクターは, これらの問題を克服するとともに, ウイルスなどのデリバリーシステムを用いた遺伝子治療への道も開けると考えられる。2001年7月に

Tuschlのグループが21塩基のsiRNAを用いることにより, 哺乳動物細胞で, 効果的にRNAiを引き起こすことが可能であることを示し, siRNAの発現システムの開発が, 世界的な競争となった。そして, 2002年前半に我々のグループを含む7つのグループが, 哺乳動物細胞内でsiRNAを発現させ, RNAiを引き起こすシステムを発表した^{26~33)}。この発現システムを大別するとヘアピンタイプとタンデムタイプの2つのグループに分けることができる(図4)。タンデムタイプでは2つのU6プロモーターからセンスとアンチセンスに相当するRNAが転写され, 細胞内でハイブリダイズして, siRNAを形成する。一方, ヘアピンタイプでは, センス鎖とアンチセンス鎖がループを介して連なるヘアピンRNAを発現する。このRNAは細胞内のDicerによってプロセッシングされ, siRNAとなる。Dicerによって切断されたsiRNAはRISCによって取り込まれ

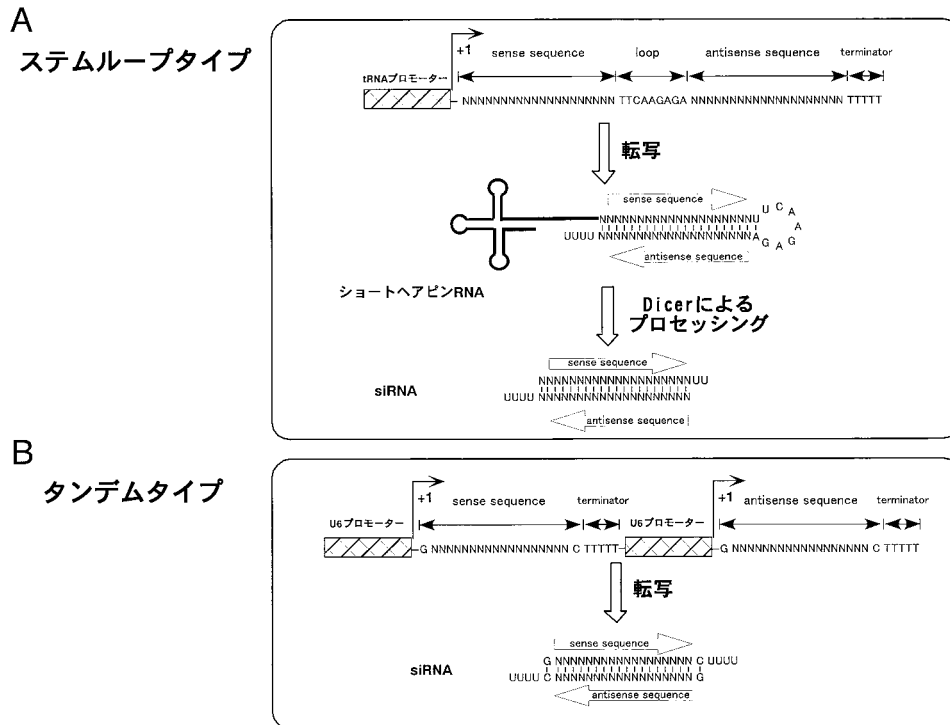


図4 siRNAの細胞内発現ベクター

(A) ステムループタイプの siRNA 発現ベクター：ヘアピン RNA が転写され、Dicer によるプロセッシングを受けて、siRNA が産生される。(B) タンデムタイプの siRNA 発現ベクター：2つの U6 プロモーターからセンス RNA、アンチセンス RNA が転写され、細胞内でアニールし、siRNA が産生される。

アンチセンス鎖のみとなる¹¹⁾。この siRNA-RISC 複合体が標的 mRNA を切断する。同じターゲットに対して、2つのタイプの RNAi ベクターを作製し、比較すると、ヘアピンタイプの方がより高い抑制効果を示した。これは、ヘアピンタイプでは、センス鎖とアンチセンス鎖が分子内に存在するため、効率よく会合でき、細胞内でより安定な 2 本鎖の状態で存在するためと考えられる。siRNA を細胞内で転写させるために、適していると考えられたのは、RNA ポリメラーゼ III (Pol III) によって転写される Pol III 系のプロモーターであった。Pol III 系プロモーターは、tRNA や small nuclear RNA (snRNA) などの、比較的短い配列を転写するのに用いられており、Pol II 系プロモーターと異なり、転写産物に余計な配列が付加されない。中でも、U6 snRNA プロモーター、ヒストン H1 プロモーターは、Pol III 系プロモーターとして例外的に調節配列が転写開始配列の上流にあり、プロモーターの直後に任意の配列が挿入可能なことから、siRNA 発現ベクターのプロモーターとして用いられた。この U6 と H1 プロモーターから転写される RNA は核に局在することが知られている。しかしながら RNAi は細胞質で起こるため、これらのベクター系を用いて RNAi を誘導させるには何かしらの方法で RNA を細胞質に輸送させる必要がある^{22, 34)}。そこで我々は、積

極的に転写産物を細胞質に局在させることが可能な tRNA プロモーターを用いた siRNA 発現システムを開発した³⁵⁾。

我々は、tRNA プロモーターの中でもヒトのバリンの tRNA プロモーターを用いている。このプロモーターシステムは、もともとリボザイムを発現させるために開発されたものであり、リボザイムを細胞内で効果的にを機能させるために非常に有益であった。この tRNA プロモーターの特徴としては、転写産物が細胞質に局在することである³⁶⁾。さらに U6 プロモーターの場合では、野生型の転写開始が G で始まるため、設計の段階でプリン残基から始まる標的配列を選択しなければならないが、tRNA プロモーターの場合はそのような制約はない。

tRNA プロモーターは、転写される遺伝子の内部にプロモーターが存在する。その後、リンカー配列を介して 30 塩基のセンス鎖があり、ループを介して 30 塩基のアンチセンス鎖の配列がありターミネーター配列となる。この場合、転写産物は tRNA 構造の 3' 末端にステムループ配列が付加した構造 (tRNA-shRNA) を形成する。発現システムの概要としては、転写された tRNA-shRNA は細胞質に輸送されて Dicer に認識される (図 4 A)。この際 tRNA 構造の付加は、Dicer の切断活性に影響しないことがわかっ

ている。

現在までに、哺乳動物細胞での siRNA 発現ベクターは、様々なタイプが開発されているが、tRNA, U6, HI プロモーターに関する抑制効果の違いはケースバイケースであると考えられる。しかし共通して以下の基本的な条件を満たす必要がある。1. ステムループ配列が正しく転写される。2. 転写産物が細胞質に輸送される。3. 転写産物が Dicer によって認識される。少なくともこの三点は、効果的な RNAi 誘導に最低限必用であろう。またいくつかの実験系においては tRNA-shRNA の効果が U6 タイプと比較して高いことが観察されている。

一方 siRNA の効果は、標的配列の特性に依存する結果が得られている^{9,23-25}。そのため効果的な siRNA 発現ベクターを作製するには、それぞれのベクター特性をよく理解した上で、いかに効果的な標的サイトを見つけるかがキープポイントであるといえる。

ウイルス治療への応用

植物において、RNAi と RNAi に関連する機構である転写後ジーンサイレンシング (PTGS: Post transcriptional gene silencing) は共にウイルス感染に対する防御機構として働いている²⁰。残念ながら、現在までに脊椎動物において RNAi によるウイルス感染に対する防御機構は報告されていないが、siRNA を用いたウイルス治療技術に大きな期待が寄せられ、HIV-1, C 型肝炎ウイルスを始めとする RNA ウイルスに対して、siRNA, あるいは、siRNA ベクターを用いた報告がなされている^{27,37-42}。2001年、Bitko らにより、一本鎖(-)RNA ウイルスである呼吸器合胞体ウイルスに対して siRNA を用いる試みがなされた⁴³。siRNA は呼吸器合胞体ウイルスの mRNA を標的として設計され、実際にウイルス mRNA 発現の減少が確認された。しかし、ウイルスゲノム自体の減少は見られなかった。Bitko らは、ウイルスゲノムに対して効果が見られなかった理由は、おそらくゲノム RNA がタンパク質複合体により覆われて保護され、siRNA が会合できなかったためであると論じている。また、ヒトの培養細胞系と初代培養 T 細胞において、siRNA により HIV の発現抑制が行われたとの報告が相次いでなされた^{27,37-40}。これらの報告では、siRNA は HIV の LTR 配列と 5つのウイルス遺伝子 (p24, vif, nef, tat, rev) を標的としており、ウイルスレベルを30から50分の1に減少させることに成功した。中でも、哺乳類 pol III プロモーターによる rev を標的とした siRNA 発現ベクターは顕著な効果を示し、siRNA 発現ベクターがウイルス治療に有効であることを示した²⁷。RNA ウイルス自身を標的とした場合に最も懸念されるのは、RNA ウイルス配列の高頻度の変異である、ウイルスによる慢性疾患においては、様々な変異を持つウイルスの集団が形成されており、siRNA による効果が十分に得られな

いことが考えられる。この観点から、Jacque らは1つ以上のミスマッチを有した siRNA は PKR の活性化やウイルス応答性の非特異的な発現抑制とは関係なく、ウイルス抑制能が失われることを示し、変異の入りやすい HIV などのウイルスが容易に siRNA による抑制効果を無効化する可能性を示唆した³⁷。実際にポリオウイルスに対する siRNA を用いた実験では、抑制後、siRNA に耐性を持つゲノムに変異が入ったウイルス集団が選択的に増殖したことが報告された⁴⁴。この選択されたウイルスは、元からポリオウイルス中に存在していたものであることから、siRNA の選択性、特異性が示された結果とも考えられる。ウイルス複製に対する選択圧によって、このような siRNA 耐性の変異ウイルス株が増殖するのを防ぐには、保存された配列を標的とする複数の siRNA を用いることや、異なった治療法と組み合わせることが有効であると考えられる。

RNA ウイルスに対する RNAi の標的配列としては、ほとんどの場合ウイルス自身の配列が選ばれているが、TSG101, NF- κ Bp65サブユニットなどウイルス増殖に必要な内在の因子に対しても大きな効果が得られている^{45,46}。また、CD4, CCR5 レセプターなどの、ウイルスが細胞に進入するための内在のレセプターも有効な標的として期待されている^{38,47,48}。

従来、核酸による遺伝子治療には、デリバリーの問題、即ち、体内に多量に存在する核酸分解酵素による分解を避けて効率よく核酸分子を患部へと輸送するかという大きな問題が付き物であった。興味深いことに、尾静脈注射により siRNA のマウス個体への効率的なデリバリーが可能であるとの報告がなされた⁴⁹。尻尾の静脈に siRNA を注入する手法により、全ての臓器で同様に機能したわけではないが、肝臓、腎臓、脾臓、肺、膵臓において、導入したレポーター活性を特異的に80-90%程度抑制することに成功した。

RNAi は、哺乳動物において非常に有用な遺伝子機能破壊の手法になりつつある。また、ウイルス抑制においても、RNAi 適用の成功例が次々に報告されており、遺伝子治療への応用に大きな期待が寄せられている。しかし、実際に遺伝子治療に用いるためには、デリバリー方法、安定した効果の持続性、そして何よりも安全性が保証されなくてはならない。RNAi の機構の全ては解明されていないことも併せ考えると、基礎と臨床双方の研究、開発が必要とされるであろう。

文 献

- 1) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- 2) Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A.,

- Weber, K. and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494–498.
- 3) Cogoni, C. and Macino, G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 638–643.
 - 4) Yang, D., Lu, H. and Erickson, J. W. (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, **10**, 1191–1200.
 - 5) Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227–264.
 - 6) Gil, J. and Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR) : mechanism of action. *Apoptosis*, **5**, 107–114.
 - 7) Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y. and Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett*, **479**, 79–82.
 - 8) Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363–366.
 - 9) Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188–200.
 - 10) Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293–296.
 - 11) Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, **110**, 563–574.
 - 12) Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877–6888.
 - 13) Tuschl, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem*, **2**, 239–245.
 - 14) Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, **296**, 1270–1273.
 - 15) Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H. and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465–476.
 - 16) Tijsterman, M., Ketting, R. F., Okihara, K. L., Sijen, T. and Plasterk, R. H. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*, **295**, 694–697.
 - 17) Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, **95**, 177–187.
 - 18) Zamore, P. D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, **296**, 1265–1269.
 - 19) Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. and Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1757–1766.
 - 20) Waterhouse, P. M., Wang, M. B. and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**, 834–842.
 - 21) Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. and Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell*, **10**, 537–548.
 - 22) Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**, 2056–2060.
 - 23) Kawasaki, H., Suyama, E., Iyo, M. and Taira, K. (2003). siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 981–987.
 - 24) Hamada, M., Ohtsuka, T., Kawaida, R., Koizumi, M., Morita, K., Furukawa, H., Imanishi, T., Miyagishi, M. and Taira, K. (2002). Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3' ends of siRNAs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **12**, 301–309.
 - 25) Hohjoh, H. (2002). RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS Lett*, **521**, 195–199.
 - 26) Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550–553.
 - 27) Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Eh-sani, A., Salvaterra, P. and Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, **20**, 500–505.
 - 28) Miyagishi, M. and Taira, K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **20**, 497–500.
 - 29) Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. and Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, **16**, 948–958.
 - 30) Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y. and Forrester, W. C. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5515–5520.
 - 31) Tuschl, T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol*, **20**, 446–448.
 - 32) Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I. and Engelke, D. R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*, **20**, 505–508.
 - 33) Yu, J. Y., DeRuiter, S. L. and Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A, **99**, 6047-6052.
- 34) Zeng, Y. and Cullen, B. R. (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna*, **8**, 855-860.
 - 35) Kawasaki, H. and Taira, K. (2003). Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA (Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 700-707.
 - 36) Koseki, S., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., Shioda, T., Nagai, Y., Shimada, T., Ohkawa, J. and Taira, K. (1999). Factors governing the activity *in vivo* of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol*, **73**, 1868-1877.
 - 37) Jacque, J. M., Triques, K. and Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, **418**, 435-438.
 - 38) Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P. and Sharp, P. A. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, **8**, 681-686.
 - 39) Hu, W. Y., Myers, C. P., Kilzer, J. M., Pfaff, S. L. and Bushman, F. D. (2002). Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol*, **12**, 1301-1311.
 - 40) Coburn, G. A. and Cullen, B. R. (2002). Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol*, **76**, 9225-9231.
 - 41) Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M. et al. (2003). Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep*, **4**, 1-7.
 - 42) McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. and Kay, M. A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**, 38-39.
 - 43) Bitko, V. and Barik, S. (2001). Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol*, **1**, 34.
 - 44) Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R. (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, **418**, 430-434.
 - 45) Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L. et al. (2001). Tsg 101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, **107**, 55-65.
 - 46) Surabhi, R. M. and Gaynor, R. B. (2002). RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol*, **76**, 12963-12973.
 - 47) Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S. and Baltimore, D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 183-188.
 - 48) Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. (2002). RNAi targeting an animal virus : news from the front. *Mol Cell*, **9**, 925-927.
 - 49) Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A. and Herweijer, H. (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet*, **32**, 107-108.
 - 50) Kumar, M. and Carmichael, G. G. (1998). Antisense RNA : function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1415-1434.