

## P-093

### Designing of Effective Small Interfering RNA (siRNA): Double Strand RNA with a Unilateral 2-nt 3'-Overhang on the Antisense Strand

Shizuyo Sutou<sup>1</sup>, Toshiyuki Kudo<sup>1</sup>, Kenji Kawano<sup>2</sup>, Yasuomi Takagi<sup>2</sup>, Malgorzata Sierant<sup>3</sup>, Makoto Miyagishi<sup>4</sup>, Masayuki Sano<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Shujitsu University; <sup>2</sup>iGENE Therapeutics Inc.; <sup>3</sup>Polish Academy of Sciences; <sup>4</sup>International Medical Center of Japan; <sup>5</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Symmetrical short interfering RNAs (siRNAs) with 2-nt overhangs at both ends have been widely used, and it has been believed that when the 3'-end is thermodynamically less stable than the 5'-end, the antisense strand is preferentially incorporated into RISC. However, a 2-nt overhang at the antisense strand seem to be more important. We designed basically four types of siRNAs: (1) symmetric blunt ends (b-b), (2) symmetric 2-nt overhangs (o-o), (3) asymmetric 2-nt antisense strand overhang (o-b), and (4) asymmetric 2-nt sense strand overhang (b-o). Results indicated that siRNAs with a unilateral 2-nt 3'-overhang on the antisense strand (o-b) were more effective than other siRNAs, irrespective of the thermodynamic stabilities at terminal ends. Moreover, we showed that sense strand modifications, such as deletions or DNA substitutions, of siRNAs with a unilateral overhang on the antisense strand have no negative effect on the antisense strand selection. Our findings provide useful guidelines for the design of potent siRNAs and contribute to understanding the crucial factors in determining strand selection.

活性の高い短鎖干渉 RNA (siRNA) のデザイン: アンチセンス鎖の 3' 末端に 2 塩基突出を有する片プラント二本鎖 RNA がよい

須藤鎮世<sup>1</sup>、工藤季之<sup>1</sup>、河野憲司<sup>2</sup>、高木康臣<sup>2</sup>、マルゴザタ シェラント<sup>3</sup>、宮岸真<sup>4</sup>、佐野将之<sup>5</sup>

<sup>1</sup>就実大学、<sup>2</sup>(株) iGENE、<sup>3</sup>ポーランド科学アカデミー、<sup>4</sup>国立国際医療センター、<sup>5</sup>産総研 (AIST)

従来、短鎖干渉 RNA (siRNA) は両端に 2 塩基の突出を有する二本鎖 RNA が用いられ、熱力学的に 5'-末端が 3'-末端より安定であると、アンチセンス鎖が RISC により取り込まれ易いとされてきた。平滑末端 (b-b) あるいは両端に 2 塩基の突出を有する (o-o) 対照型、およびセンス鎖 (b-o) あるいはアンチセンス鎖 (o-b) に 2 塩基の突出を有する非対照型の二本鎖 RNA を合成し、活性を測定した。その結果、アンチセンス鎖に 2 塩基の突出を有する非対照型の二本鎖 RNA (o-b) が、両端の熱力学的安定性に関係なく、他の 3 型より活性が高かった。さらに、この非対照型の二本鎖 RNA (o-b) のセンス鎖の 3' 末端から数塩基を取り除いても、また、これらを DNA で置換しても、活性の減少は見られなかった。これらの知見は活性の高い siRNA を設計するうえで有意義であるとともに、二本鎖 RNA の一方の鎖が RISC に取り込まれる機構を解明するうえで参考となるだろう。

## P-094 (O-6)

### Discrimination of the DNA reactive mechanisms by gene expression profiling *in vitro*

Rina Tsugiyama, Hirofumi Miyajima, Kazuo Omi  
Chiaki Kondo, Takeki Uehara, Mikiyori Torii  
Shionogi & Co., Ltd.

The development of experimental approaches, e.g. toxicogenomics, capable of distinguishing a wide range of genotoxic mechanisms is expected to improve risk assessment. We have been searching for useful marker genes which can discriminate compounds based on the mechanisms of DNA reactivity by expression alteration.

Exponentially growing human lymphoblastoid TK6 cell cultures were exposed for 4-h to seven DNA reactive compounds: mitomycin C, methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate, cisplatin, etoposide, hydroxyurea and methotrexate, two non-DNA reactive compounds: colchicine and adenine. Microarray gene expression analysis was conducted using Affymetrix GeneChip. Cytotoxicity and genotoxicity were evaluated by counting the number of cells and the micronucleated cells, respectively, after an additional 20-h recovery period.

We found some marker genes capable of discriminating DNA reactive from non-DNA reactive compounds. We also verified the utility of these marker genes using other compounds by quantitative real-time PCR.

### 遺伝子発現変動による DNA 反応性メカニズムの判別

次山里奈、宮島博文、小見和夫、近藤千晶、上原健城、  
鳥井幹則  
塩野義製薬 (株)

化合物の作用メカニズムを考慮したアプローチ (トキシコゲノミクスなど) の発展によって遺伝毒性のリスク評価の向上が期待される。そこで我々は遺伝子発現解析により、DNA 反応性メカニズムの差異を反映するマーカー遺伝子の探索を行ってきた。

対数増殖期のヒトリンパ球細胞株 TK6 細胞に DNA 反応性 7 化合物 (mitomycin C, methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate, cisplatin, etoposide, hydroxyurea, methotrexate) 及び非 DNA 反応性 2 化合物 (colchicine, adenine) を 4 時間作用させたサンプルについて Affymetrix 社 Gene Chip を用いて遺伝子発現解析を行った。細胞毒性と遺伝毒性は、処理後 20 時間回復培養を行った際の細胞増殖率及び小核誘発頻度により評価した。

遺伝子発現解析の結果、化合物を DNA 反応性グループ及び非 DNA 反応性グループに判別するマーカー遺伝子を抽出した。さらに別の化合物について定量性リアルタイム PCR を行い、抽出マーカー遺伝子の有用性を確認した。