

に見られなくなった。この5'リン酸化はRNAi経路に入るのに不可欠であり、ATP依存的に、内在の未だ同定されていないキナーゼによって行われていることが示された¹⁸⁾。3'末端に関しては、2'水酸基を、2'-デオキシ、2'-O-メチル、デオチン、2', 3'-ダイデオキシシトシン、アミノプロピルホスホエステルに変えてもsiRNAの活性には影響がなかった^{16) 19)}。

これらのショウジョウバエの胚において検証されたsiRNAの構造要求性は、哺乳動物細胞においても、ヒト子宮癌由来のHeLa S3細胞抽出物の*in vitro*の系で再検討された。HeLa S3細胞では、siRNAの長さの制約は甘く、20~29塩基までは高い切断活性を示したことから、3'末端のオーバーハングは4塩基までは活性に影響がないこと以外は、ほぼショウジョウバエの場合と同様であった^{20) ~22)}。

■ dsRNAをsiRNAにプロセッシングする酵素：Dicer

生成したsiRNAには、5'末端モノリン酸と3'末端水酸基が存在すること、および、3'側に2塩基のオーバーハングがあることから、RNase IIIがそのプロセッシングを担っていることが示唆された¹³⁾。後に、この切断酵素はショウジョウバエの細胞で同定され、Dicerと名付けられた²³⁾。線虫²⁴⁾、ヒト²⁵⁾においても、DicerのホモログはdsRNAをプロセッシングする酵素として同定された。DicerはRNase IIIファミリーに属し、進化的に線虫、ショウジョウバエ、植物、菌類、哺乳動物などさまざまな種間で保存されており、生物共通の何らかの重要な機構を担っていることが示唆されている²³⁾。例えば、植物シロイヌナズナのショウジョウバエDicerホモログであるDCL-1 (Dicer-LIKE) /EMB76/SIN1/SUS1/CAFの変異株は、葉、花などの形成に異常が見られている²⁶⁾。またゼブラフィッシュ²⁷⁾、マウス²⁸⁾では、Dicer欠損体は胚性致死であることが示されている。

Dicerの数は生物種で異なり、線虫、ヒト、酵母では1つ、ショウジョウバエで2つ、シロイヌナズナでは4つ同定されている。複数あるDicer

は、それぞれ微妙に異なっている。例えば、ショウジョウバエで2種類あるDicerのうち、DmDcr-1のみPAZ (PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE) 領域をもち、DmDcr-2のみDEXHボックスヘリカーゼ領域をもつ (図3a)。後述するように、これらのDicerは、それぞれ異なる役割を担っている場合があることが示されている。

RNase IIIは、マイコプラズマから動物まで広く保存されているMg²⁺依存のエンドリボヌクレアーゼであり、高次構造をとるリボソームRNAやmRNAの成熟、分解などに関与している²⁹⁾。大腸菌のRNase IIIはRNase III領域 (R III領域) とdsRNA結合領域 (dsRNA Binding Domain: dsRBD: 図3a) から成る、およそ25 kDのエンドリボヌクレアーゼである。おそらく疎水性相互作用を利用した安定化により二量体を形成し³⁰⁾、2つのR III領域を用いてdsRNAを3'側に2塩基突出した11塩基のdsRNAに分解する。それに対し、ヒトDicerはN末端から順に、ヘリカーゼ領域、PAZ領域^{23) 31)}、2つのRNase III領域 (R IIIa, R IIIb領域)、dsRBDをもつ、およそ200 kDの非常に大型のRNase IIIである²³⁾ (図3a)。dsRNAはDicerにより、末端部から21塩基のsiRNAに分解される³²⁾。2001年に、超好熱細菌*Aquifex aeolicus*のRNase III (Aa-RNase III) のX線結晶構造解析が報告され、RNase III領域の活性中心アミノ酸が決定されていた³⁰⁾。そこから得られた情報に基づいて、Fillipowiczらは、R III活性中心アミノ酸に変異を入れたヒトDicerを作り出した。3'末端に2塩基突出をもつdsRNAを基質とした場合、dsRNA R IIIa, R IIIb領域に変異を入れたものはそれぞれ3'側プロセッシング、5'側プロセッシングのみ行われなくなったことから、DicerによるdsRNA認識の非対称性と、R IIIa, b領域が単独でRNase活性をもつことが明らかになった³³⁾。初期の研究では、PAZ領域を通して別のPAZ領域をもつタンパク質 (ARGONAUTEファミリー) と相互作用し、ヌクレアーゼ複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) の形成を誘導すると考えられていた³⁴⁾。最近の研究によると、PAZ領域は一本鎖RNAおよび二本鎖

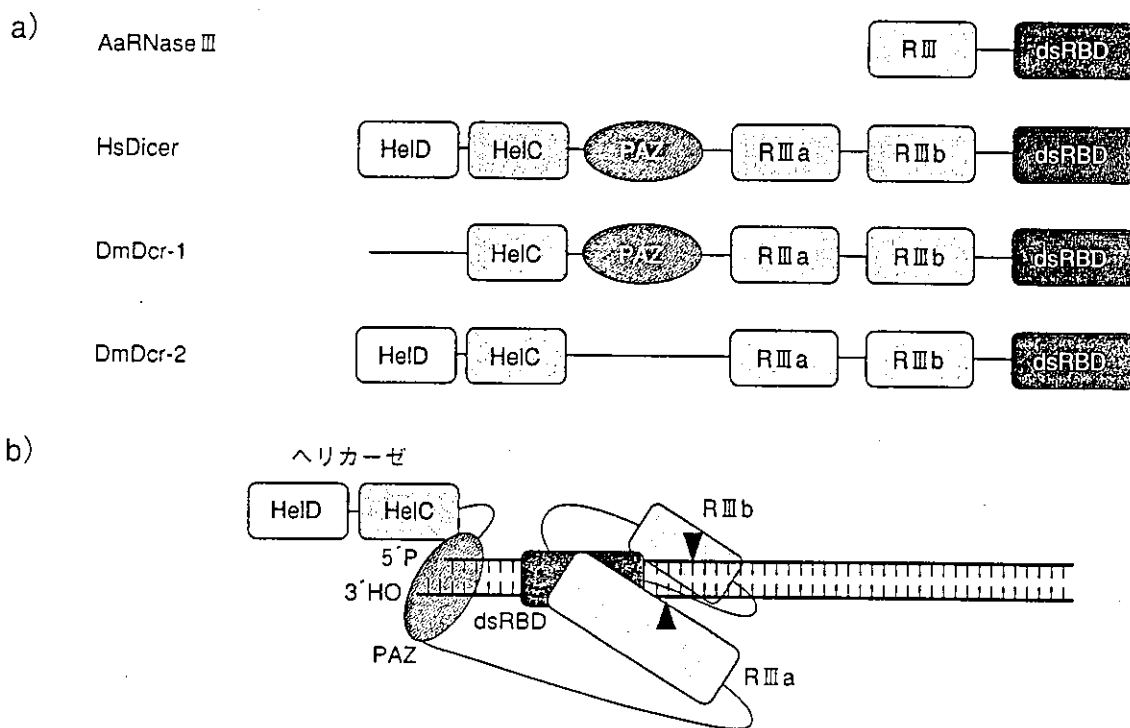


図3.3 DicerによるdsRNA認識のモデル図

- a) 超好熱細菌RNase III (Aa-RNase III), ヒト (HsDicer), ショウジョウバエDicer (DmDcr-1, DmDcr-2) タンパク質の構造. HelC, HelDはそれぞれCヘリカーゼ領域, DExHヘリカーゼ領域を示す
- b) ヒトDicerとdsRNAの相互作用. PAZ領域はdsRNAの3'末端を認識し固定される. RIIIaとRIIIbは凹凸を介したボール・ソケット型疎水性相互作用により, 安定化されと考えられている (文献30, 33). dsRNAあるいはヘアピン型RNAは, その開放末端から順に21塩基ずつプロセッシングされていく

RNA結合能をもち^{35) ~38)}, おそらくsiRNAの3'末端2塩基突出塩基を認識して固定していることが示唆されている^{33) 36) 37) 39) 40)} (図3b)。

RNAiに関連するその他の遺伝子

主にアカバシカビ (*Neurospora crassa*), 線虫 (*Caenorhabditis elegans*), シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) でRNAi効果が見られないノックアウト個体が見つかり, 関係する遺伝子も複数同定されてきている. RNAiに関わる遺伝子には種を超えた共通性が見られ, 現在, Dicer, PAZ領域をもつタンパク質をはじめ, RNA依存的RNAポリメラーゼ (RdRp), RNAヘリカーゼ, 3', 5'-エキソヌクレアーゼなどが同定されている⁴¹⁾.

ショウジョウバエで, PAZ領域をもつタンパク質がRISCに含まれるものとして同定され, ARG

ONAUTE-2と名付けられた⁴²⁾. ショウジョウバエは, AGO-1 (ARGONAUTE), AGO-2, PIWI, AUBERGINE/STINGの, 少なくとも4つのARGONAUTEファミリーに属するタンパク質をもっており, それぞれ発生段階において非常に重要な役割を果たしている. AGO-2のホモログはシロイヌナズナでAGO-1, アカバシカビでQDE-2 (QUELLING DEFECT), 線虫ではRDE-1 (RNAi DEFECTIVE) であり, それぞれのノックアウト個体はRNAiを示さないことがわかっている⁴³⁾. このAGOタンパク質に関しては命名が種ごとに異なり, 混乱するかもしれないが, 種が違えば名前が同じでも別物である.

RdRpは, 一本鎖 (single-stranded: ss) RNAからdsRNAを作るのに必要な酵素であり, 線虫AGO-1, アカバシカビQDE-1, シロイヌナズナ

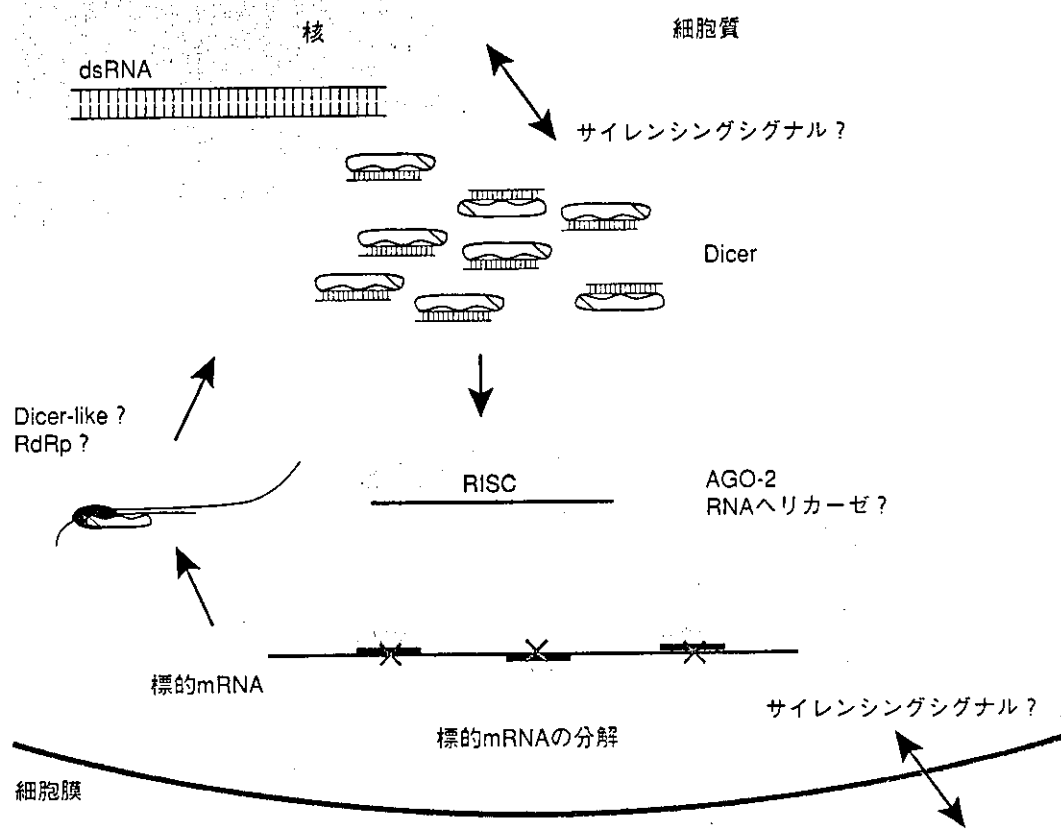


図4 RNA経路と関わるタンパク質のモデル図

細胞外から導入された、あるいは細胞内で転写されたdsRNA配列特異的に、mRNAが分解される。詳細は本文参照。siRNA配列特異的な情報の、細胞内における細胞質から核への伝達機構、あるいは細胞間の伝達機構はまだはっきりとわかっていない

SGS-2 (SUPPRESSOR of GENE SILENCING) /SDE-1 (SILENCING DEFECTIVE) が見つかった。RNAiには、RNAからの新規なRNAの合成が必要であることが示唆され、サイレンシングの開始、維持に重要な役割を果たすと考えられている⁴⁴⁾。線虫、植物において、RdRpによって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、その結果、新たなsiRNAが増幅されることが報告されている(図4)^{45)~48)}。一方、ショウジョウバエ、哺乳動物細胞においては、RdRpホモログはゲノムに存在しないこと⁴⁹⁾、RdRpのプライマーとなるためには3'末端の水酸基が必要であるが、siRNAの3'末端の修飾はRNAiに影響がないこと^{19)~21)}、細胞抽出物中、あるいは細胞中で、siRNAによる標的mRNA

の切断箇所は1カ所であることなどから^{19)~21)}⁵⁰⁾、おそらくこの増幅機構は存在しないと考えられる。

RNAヘリカーゼは、RNAの高次構造を解く酵素であり、dsRNAを特定の段階でssRNAにするのに必要であると思われるが、実際にどの段階で働いているのかは明らかでない⁵¹⁾。線虫DRH-1 (DICER RELATED HELICASE)、DRH-2⁵²⁾、MUT-14 (MUTATOR)⁴⁷⁾、SMG-2、シロイヌナズナSDE-3、アカバシカビQDE-3、単細胞緑藻類クラミドモナス (*Chlamydomonas Reinhardtii*) MUT-6、ショウジョウバエDmp68⁵³⁾ が見ついている。MUT-6欠損株では、トランスポゾン由来の異常なRNAの蓄積が見られ、MUT-6はRNA分解に何らかの形で関与していると思われる。

RNAiの生物学的役割は、トランスポゾン、さ

らにウイルス、ウイルソイドなどからの、核酸レベルでの防御機構であるといわれている^{2) 54)}。上記の遺伝子は、RNAi、トランスポソンの沈静化、またはその両方に必要であるが、現在のところ、どの生物においても関わる遺伝子、詳細なタンパク質同士の相互作用などのデータは揃っておらず、はっきりしたモデルを示すことはできていない。

RISC活性をもつ複合体とsiRNA

RISCは、RNAiの切断活性を担うsiRNA-タンパク質複合体であり、最初Hannonのグループによって、ショウジョウバエ後期胚由来S2 (Schneider 2) 細胞抽出物から精製された³⁴⁾。その後、ショウジョウバエ、ヒト細胞において、RISCの構成タンパク質、あるいはRISCと相互作用するタンパク質が、複数のグループによって報告されている。以下、siRNAの配列特異的な切断活性をRISC活性、RISC活性をもつ複合体をRISCということにする。

Hannonのグループは、約500 kDのRISCから、SDS-PAGEでタンパク質バンドを切り出し、質量分析計にかけることにより、RISCの構成タンパク質として130 kDのAGO-2、80 kDのdFMR1 (FRAGILE×MENTAL RETARDATION)、およそ60 kDのVIG (VASA INTRONIC GENE) を同定した^{42) 55)}。不思議なことに、胚においてRNAiに必要であると報告されていたショウジョウバエAGO-1は⁵⁶⁾、siRISC活性を示さない250 kDの複合体画分に存在した⁵⁵⁾。日本の塩見らのグループも、S2細胞抽出物中のdFMR1と複合体を形成するタンパク質に、AGO2、Dmp68ヘリカーゼが含まれていることを報告した⁵³⁾。このうち、Dmp68はRNAi経路に直接関わっていることが示された。また、dFMR1は、RNAiには必要ではないが、AGO2、Dicerと相互作用することが示された^{53) 55)}。

Zamoreのグループによってショウジョウバエの胚抽出物から精製されたRISCは、Hannonのグループの報告より小さいものであった。siRNAは、最初、dsRNAの状態では360 kDの不活性な複合体に存在し、siRNAの二本鎖から一本鎖への解離に

伴って、230 kD以下の活性型RISCが生成されると報告している¹⁸⁾。しかし、この活性型RISCは、精製過程ではかのRISC構成要素から剥がれて分離されたものである可能性がある^{57) 58)}。

ごく最近、RISCの形成開始過程が詳細に報告された。Wangらのグループは、ショウジョウバエS2細胞抽出物を用いて長いdsRNAからsiRNAを生成する活性をもつ画分を精製し、およそ190 kDのDCR-2と36 kDの線虫RDE-4ホモログタンパク質R2D2を分離した⁵⁹⁾。R2D2変異体はDCR-2による長いdsRNAからのsiRNA生成には影響を与えなかったが、RNAiを起こすことができなかった。その後、Zamoreのグループ、CarthewとSontheimerのグループにより、さらに詳細な解析がなされた^{57) 58) 60)}。放射線ラベルしたsiRNAをショウジョウバエ胚抽出物中で処理し、ゲルシフトアッセイを行ったところ、大きさの異なる3つ以上のタンパク質-siRNA複合体が形成された。RNAi効果を示さない*dcr-2*変異体から調製した胚抽出物中では、これらの複合体の形成は見られなかった。速度論的な解析から、小さな複合体から大きな複合体が形成されていることが示唆された^{57) 58)}。最初、二本鎖siRNAを含むRISC活性を示さないDCR-2/R2D2/siRNA複合体が形成され、途中の段階でDCR-1、ARGONAUTEタンパク質ARMITAGEとAUBERGINEなどを介し^{57) 58) 60)}、最終的に一本鎖siRNAを含む沈降係数80Sの大きなRISCが形成される⁵⁸⁾。このRISC画分には、DCR-2、R2D2を含むAGO2、dFXR、TSN、VIGなどのこれまで報告されていた因子が存在することが示された⁵⁸⁾。しかし、RISC画分にはsiRNAから形成されるすべての複合体が含まれると考えられるため、これらの因子がRISC以外の複合体の因子である可能性は存在する。

哺乳動物細胞においても、Tuschlのグループにより、同様な生化学的な手法によるRISCの精製が行われた。HeLa S3細胞抽出物で、siRNAの3'末端をビオチンでラベルし、ストレプトアビジンカラムによってsiRNAが相互作用している複合体を回収、精製したところ、RISCはおよそ160 kDの画分に存在した。この最小RISCの構成タンパク

質の一部が同定され、ともに約100 kDのeIF2C1 (EUKARYOTIC INITIATION FACTOR), eIF2C2/GERp95 (GOLGI ENDOPLASMIC RETICULUM) であった²¹⁾. eIF2C2, eIF2C1はともにショウジョウバエAGO-2ホモログであり、PAZ領域とPIWI領域をもつことを特徴とするARGONAUTEタンパク質ファミリーに属す⁴³⁾. 翻訳開始因子という名前とは反し、このタンパク質によっては、翻訳は促進されないと考えられているので^{61) 62)}, 以降eIF2C1, eIF2C2をそれぞれhAGO1, hAGO2と呼ぶ⁴³⁾. 後に、hAGO2の含まれている画分のみRISC活性をもつことが示されている⁶³⁾. そのRISCには二本鎖siRNAではなく一本鎖RNAが含まれていた. 一本鎖の5'末端がリン酸化された19~29塩基のアンチセンスRNAは、それのみでもRISCに取り込まれ、RISC活性を再構築できることが示された²¹⁾.

RISCと構成タンパク質の同定については、まだ見解が統一されていない。RISCは1種類ではなく、取り込んだsiRNAを核とした、RISC活性をもつ最小コンポーネントと、細胞内でさまざまな活性を付与するためのアクセサリタンパク質から成っているのかもしれない。不思議なことに、最小RISCが精製されているのにもかかわらず、いずれの報告においてもその切断活性の本体 (Slicer) は同定されていなかった。また、その構成タンパク質にもSlicerらしきヌクレアーゼは報告されていなかった。つい最近、このSlicerは未だ発見されていない新規なタンパク質、あるいは複合体ではなく、これまで解析された因子の中に存在することが示唆された。以下に、このSlicerについての重要な知見を概説する。

RISC活性の本体は？

Science誌に、超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* の ARGONAUTE タンパク質 (PfAGO) の X 線結晶構造解析が報告された³⁹⁾。この結果は、PAZ 領域、PIWI 領域のこれまで知られていなかった新たな役割を示唆し、また Slicer の同定に迫るものであった。

PfAGOは、N末端、PAZ領域、中間領域、

PIWI領域から成る（図5a）。N末端、中間領域、PIWI領域は三日月様構造をとり、ちょうどPIWI領域の上にPAZ領域が位置した（図5b）。PfAGOのPAZ領域は、アミノ酸配列情報からはPAZ領域であるとは特定できなかったが、これまで解析されたショウジョウバエAGO1、AGO2、hAGO1のPAZ領域と構造的に重なり合った。特にsiRNAの2'オーバーハングに結合する芳香環側鎖の位置がよく保存されていたことから、RNAの3'末端結合能を有することが推測された。驚いたことに、PIWI領域の三次構造は、RNase Hに酷似していた。RNase Hは、RNA-DNA二重鎖のRNA側を、5'末端リン酸基、3'末端水酸基をもつRNAに切断するMg²⁺依存的エンドリボヌクレアーゼとして知られている。PfAGOのPAZ領域からN末端領域にかけて、+に帯電した溝が認められた。この溝は、リン酸基あるいは2'-OHによって-に帯電したRNAの基質結合部位であると考えられた。そこで彼らは、hAGO1の結晶構造解析から予想されたPfAGO1のsiRNAの3'末端結合部位を固定し、溝に沿ってdsRNAを5'側に伸ばしていった。すると、PIWI/RNase H領域の活性部位はちょうどsiRNAの3'末端から11~12塩基のところに位置した（図5b矢頭）。

結晶構造解析から推測されたPfAGOの性質は、RISCの性質と多くの部分で一致する。RISCはRNA-RNA二重鎖の一方のRNAを切断するという違いがあるものの、その切断産物はやはり5'末端リン酸基、3'末端水酸基をもつRNAである⁶⁴⁾。RISC活性はMg²⁺依存적であり⁶⁵⁾、前述したようにsiRNAのちょうど真ん中部分で標的RNAを切断する。また、RISC活性をもつ複合体からは、例外なくARGONAUTEタンパク質が検出されている。

Joshua-TorとHannonのグループは、PfAGOから得られた情報をもとに、哺乳動物細胞でARGONAUTEがSlicerであるという仮説を裏付けるようなデータを報告した⁶⁶⁾。彼らは、*Ago2*ノックアウトマウスからsiRNAによってRNAiを起こさない*Ago2*ノックアウト (*Ago2*^{-/-}) マウス線維芽細胞 (mouse embryo fibroblast: MEF) 株を樹立した。*Ago2*^{-/-}MEFにhAGO2を導入すると

前述したように、線虫においてRDE-1は、RISCの構成要素であることが示唆されており、その変異株はRNAiを起こさないことが知られていた⁷⁷⁾。rde-1のホモログは線虫のゲノム上に23個あるが、それらの発現をRNAiにより抑制すると、*alg-1*、*alg-2* (Argonaute like genes) が発現に関わる表現型を示した。*alg-1*、*alg-2*のRNAi株では、*lin-4* mRNAが70塩基の前駆体の状態で蓄積し、*let-7* stRNAの量が減少したことから、stRNAのプロセッシングあるいは安定性に関与する因子であることが示唆された。しかし、どちらの遺伝子もRNAiには影響を与えなかった²⁴⁾。RNAiの経路とstRNAの生成過程の経路において、Dicerのように共通する因子と、ALG-1、ALG-2のようにstRNAの経路特異的に関与している因子が存在することは非常に興味深い。現在のところ、その翻訳制御の詳細な機構はほとんど明らかでなく、今後の詳細な研究が待たれる。

✦ 内在のsiRNA/miRNAファミリー

1993年に発見された最初の小さなRNAである*lin-4*は、線虫以外の生物で保存されていることが全く認められなかった⁷⁰⁾。そのため、このような小さなRNAの存在はほとんど見過ごされてきた。この状況は、2000年に発見された2つめのstRNAである*let-7*が、遺伝子およびその発現パターンともに非常に広範な生物種で保存されているという発見によって一変した⁶⁹⁾ ⁷⁵⁾。2001年10月に、3つのグループが同時に、ショウジョウバエ、線虫、ヒトで、合わせてほぼ100種類の21~22塩基の小さなRNAファミリーが存在することを報告した。それらの小さいRNAは、stRNAと同じ種類のRNAではあるが、すべてが発生の時期特異的なRNAではないと考えられたので、microRNA (miRNA) と名付けられた⁷⁸⁾~⁸⁰⁾ (2章-図6-6参照)。

miRNAに特徴的であるのは、前駆体RNAと考えられる配列の二次構造予測をすると、すべてdsRNA領域を含むステムループ構造をとることである (図7a)。miRNAは、おそらくdsRNAに誘導されるさまざまな遺伝子発現を防ぐために、塩基対のミスマッチを含むバルジ構造をもった数十

~数百塩基の長い前駆体RNAとして転写され、Dicerによってプロセッシングされる。最近では、このようなmiRNAの二次構造の特異性と、広範な生物で保存されているという仮定のもとに開発されたmiRNA予測プログラムによって多くのmiRNAの存在が予測され、また実験的にその存在が証明されている。これらはマウス、植物、線虫、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエに应用され、また現在同定されているmiRNA遺伝子は、200以上にも及んでいる⁸¹⁾~⁹¹⁾。ヒトにおいてmiRNAの種類は、全遺伝子のおよそ1%にあたる200~250程度という予測が報告されている⁹¹⁾。miRNAは、*lin-4*、*let-7*のように発生の時期特異的に発現するものに加え、組織特異的に発現するもの、恒常的に発現するものなど、さまざまな発現様式が見られたことから、広範な生命現象に関与していると考えられている。

ヒトのmiRNA経路について、いくつかのことが明らかになっている。miRNAは、場合によっては複数のmiRNAを含む長いRNA (primary miRNA: pri-miRNA) として転写される (図7a)。pri-miRNAは、核内でDroshaと呼ばれるRNase IIIファミリーに属する酵素によって、70塩基前後のヘアピン型RNA (pre-miRNA) にトリミングされる⁹²⁾。その後、ヘアピン型RNA特異的輸送因子Exportin-5に結合し、細胞質へと輸送される⁹³⁾~⁹⁶⁾。細胞質pre-miRNAは、Dicerによって21塩基のmiRNA二重鎖に切断された後、miRNPと呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、おそらく翻訳を阻害することによって遺伝子発現を調節する (図7a)。Dreyfussのグループによって、ヒトHeLa S3細胞抽出物から生成されたmiRNPは非常に多くの種類のmiRNAを含み、そのうち40種類の配列が同定された。また、miRNPの構成タンパク質として、hAGO2、105 kDのGEMIN3、120 kDのGEMIN4が同定された⁸⁷⁾。GEMIN3、GEMIN4は、GEMIN2、4、5とともに、脊髄性筋萎縮症の原因タンパク質SMN (SURVIVAL of MOTOR NEURON) とSMN複合体を形成することが知られている⁹⁷⁾。後に、RISCが、hAGO2、GEMIN3、GEMIN4と共沈することが報告された⁹⁸⁾。

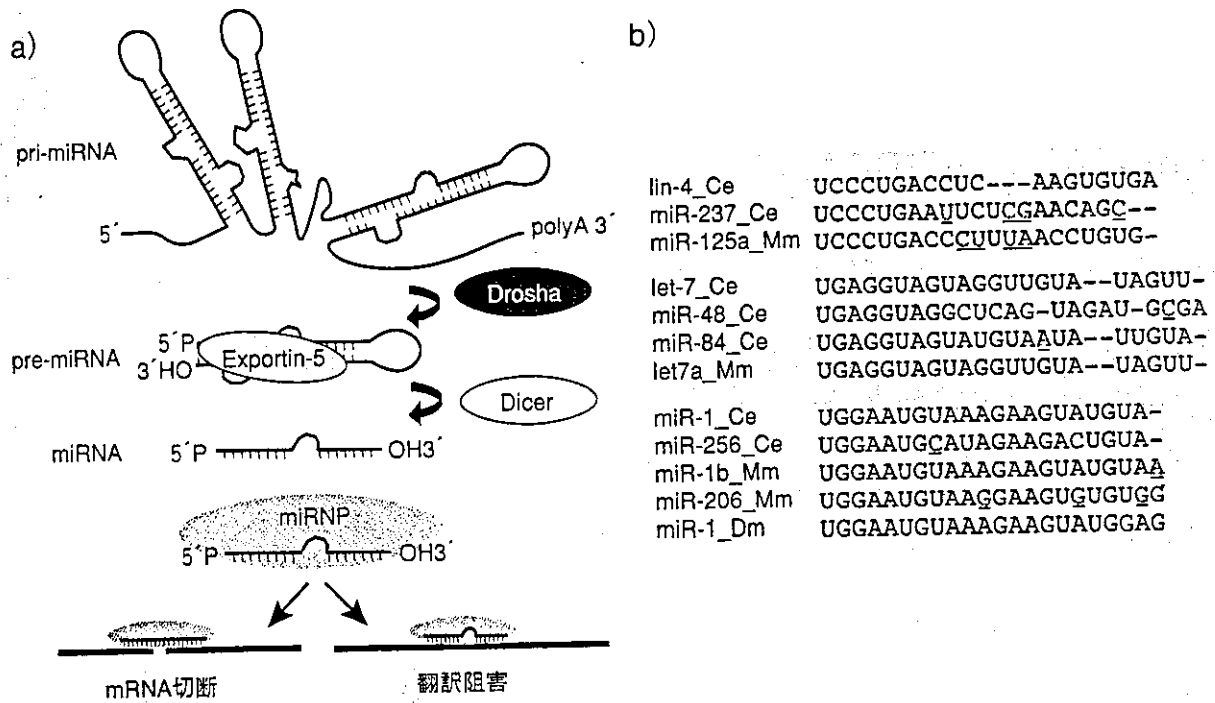


図7 stRNA/miRNAファミリーとその経路のモデル図

- a) ヒトmiRNA経路のモデル図。70塩基程度のdsRNA領域を含むstRNA/miRNA前駆体 (Pre-miRNA) から、Dicerによって一本鎖のstRNA/miRNAにプロセッシングされる。stRNA/miRNA以外の部分は、速やかに分解される。miRNAはRISC様のmiRNPに取り込まれると考えられるが、詳細な機構はまだ明らかになっていない
- b) stRNA/miRNAサブファミリー。黒は一致している配列、下線はプリン/ピリミジンで保存されている配列、赤色は保存されていない配列。Ce：線虫，Mm：マウス，Dm：ショウジョウバエ（文献105より図を改変）

RISCとmiRNPが同一物であるかどうかはまだ明らかでないが、少なくともいくつかのコンポーネントは共有していると考えられる。実際、植物のmiRNAの多くは完全に特定のmRNA配列と相補的であり、そのmiRNAは翻訳阻害ではなく、siRNAと同様の形式で標的mRNA配列を配列特異的に切断した^{99) 100)} (図7a)。哺乳動物細胞では標的と完全相補のmiRNAはほとんど同定されていないが、ホメオボックス遺伝子HoxB8とmiR-196の関係でmiRNAによる切断が示されている¹⁰¹⁾。これは、少なくとも一部は、RISCあるいはRISC様の複合体に取り込まれることを示唆している⁹⁸⁾。

miRNAの標的認識の5'末端側から2～8塩基の部分は、それによって種間あるいは特定の種においてmiRNAサブファミリーが形成されており、標的遺伝子の抑制に重要な働きをしていると考えられている¹⁰²⁾ (図7b)。現在、アポトーシス、脂

肪代謝、造血細胞の分化、神経の対称性、葉の形成、花の形成とその時期決定など多くの生物現象がmiRNAによって制御されていることが報告されている¹⁰³⁾。

最近、ヒトウイルスにコードされているmiRNA¹⁰⁴⁾、線虫でmiRNAのようにヘアピン構造をとらない20～21塩基のRNAが発見された¹⁰⁵⁾。小さなdsRNAが転写因子と共同でヒト神経細胞の分化を誘導する例も報告されている¹⁰⁶⁾。これらの小さなRNAが実際にどこまで、どのような生命現象に関わっているのか、今後の研究の進展が期待される。

RNAiの生物学的役割—その1

植物の抗RNAウイルス感染 vs. RNAウイルスの抗サイレンシング機構

一度RNAウイルスに感染した植物は、その後近

縁種のRNAウイルスに感染しにくくなる。このような交叉防御の現象は、1920年代から知られていた²⁾。そこで、RNAウイルス感染を防ぐために、弱毒RNAウイルスをあらかじめ植物に感染させて耐性をつける、ヒトでいうワクチン処理のようなことも可能であった。また、RNAウイルスを覆うコートタンパク質 (coat protein: CP) を発現させるだけでもその感染を効果的に防ぐことができた¹⁰⁷⁾。植物の一部に感染したRNAウイルスは、そのうち全身に広がろうとする。そのRNAウイルスが侵入してきたことを全体に知らせるような機構が存在することが明らかになっている¹⁰⁸⁾。以下、全身獲得性サイレンシング (Systemic acquired silencing: SAS) と呼ぶ。

Vaucheretらは、サイレンシングを起こしたタバコにサイレンシングを起こしていないタバコを接木すると、接木されたタバコも100%サイレンシングされることを示した¹⁰⁹⁾。また、VoinnetとBaulcombeらにより、タバコの葉の数個の細胞から開始されたサイレンシングが、原形質連絡、葉脈、師部を通じて全体に広がることが示された⁴⁸⁾ ¹¹⁰⁾。RdRpであるsgs2/sde1、ヘリカーゼsde3をノックアウトした植物では、全身獲得性サイレンシングは起こらなかった¹¹¹⁾ ¹¹²⁾。全身獲得性サイレンシングの伝達物質は、サイレンシングに関係しない25塩基のRNAであることが示唆されている¹¹³⁾。Lucasらは、カボチャ (*Cucurbita maxima*)、キュウリ (*Cucumis sativus*) など5種類の植物の樹液からトランスポゾン由来RNA、いくつかのすでに同定されているmiRNAを検出した。ウイルスを感染させたカボチャとCPサイレンシングカボチャからはそれぞれウイルスあるいはCP由来siRNAが検出された。さらに、ssRNAに特異的に結合するCmPSRP1がSASシグナルを担っているタンパク質として同定された¹¹⁴⁾。このSASシグナルは数カ月以上持続し、効果的にウイルスに対する免疫機構として働いていることが示されている⁴⁸⁾。

一方、植物ウイルスは植物のRNAサイレンシングに対して対抗する手段を進化させてきた。サイレンシング抑制タンパク質の存在である¹¹⁵⁾。ウイルスの感染能を決定するタンパク質の多くが抑制

タンパク質として同定されている¹¹⁶⁾。その数は10種類以上にのぼり¹¹⁷⁾、siRNAの蓄積¹¹⁸⁾、RISCへの取り込み^{119) ~123)}、SASシグナル¹²⁴⁾、などのさまざまなレベルでサイレンシング現象を抑制するものが観察されている。

植物の防御機構として、病原体の特定の遺伝子に対応する抵抗性遺伝子を持ち、その遺伝子産物間の相互作用を通して、動物細胞のアポトーシスに似た過敏反応死などに代表される抵抗反応が誘導され、病原体を隔離させることが知られていた¹²⁵⁾。しかし、植物は動物の免疫系のような、生体防御のために特化した細胞・組織をもたないので、ウイルスのような変異の入りやすい病原の場合、1遺伝子1病原の戦略だけでは対応できない。そのような問題を補完するのが、病原体由来のRNAがそのまま侵入シグナルとして用いられるRNAiであると考えられる。おそらく植物はRNAiを防御という面で最も進化させてきた生物であり、植物ウイルスはその強力なRNAサイレンシングに対抗するための遺伝子を発達させてきたのであろう。

■ RNAiの生物学的役割—その2

分裂酵母におけるヘテロクロマチン制御

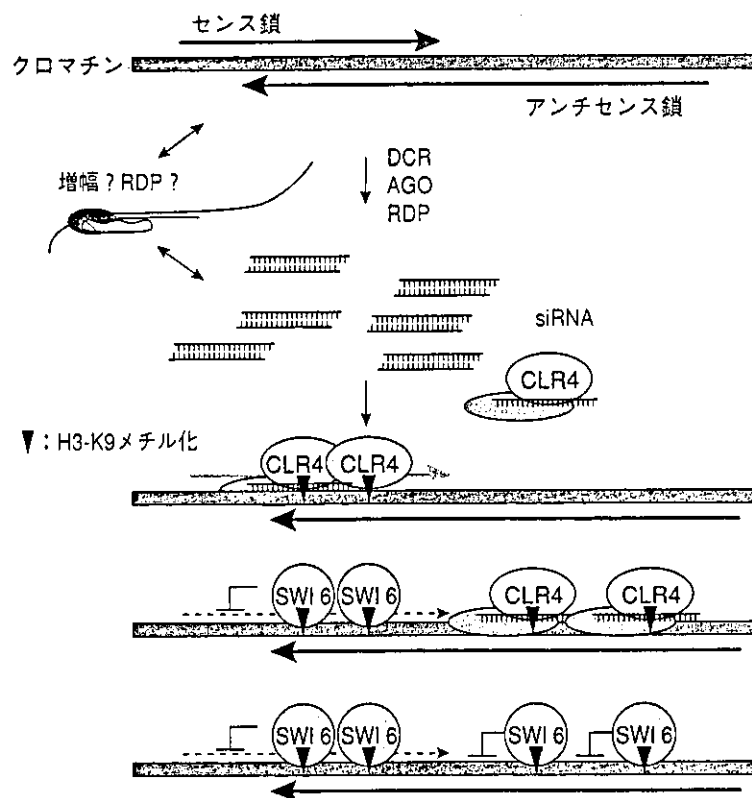
最近、小さなRNAを介するが、mRNA切断あるいは翻訳阻害ではない、新たな現象が分裂酵母、テトラヒメナから報告された。以下、および次の「その3」では、RNAi経路がゲノムのダイナミックな編成に関わっていることを窺わせる現象を概説したい。

真核細胞のクロマチンは、転写の活発なユークロマチンと、転写が抑制されているヘテロクロマチンに大きく分けることができる。ヘテロクロマチンは、主に繰り返し配列、トランスポゾン、ウイルス由来の配列などから形成されている。この領域は、遺伝子はほとんど見られず、DNAはヒストンに強く巻きついた高次構造をとっている。ヘテロクロマチンは、そのような相同性のある配列同士による組換えを防ぎ、ゲノムの整合性、安定性に寄与していると考えられている¹²⁶⁾。

ヒストンは、すべての真核生物のクロマチンに

図8 分裂酵母における、RNAi経路によるヘテロクロマチン制御のモデル図

センス鎖、アンチセンス鎖が転写されて生成したdsRNAから、DCR、AGO、RDPによって、siRNAが作られる。siRNAの配列特異的にヒストンメチル基転移酵素CLR4が誘導され、ヒストンH3のリジン9がメチル化される。H3-K9メチル化を特異的に認識して、SWI6が結合し、SWI6が結合することによって、ヘテロクロマチン状態が形成される。SWI6、CLR4を介し、さらに周囲にヘテロクロマチンが形成される



見出される塩基性タンパク質である。塩基性アミノ酸であるアルギニンとリジン (K) に富んでおり、この2つのアミノ酸を合わせると、全アミノ酸残基の25%にも達する。すべての真核細胞に、5つの主要な型のヒストン、H1、H2A、H2B、H3、H4が見出されているが、特にH3とH4はアミノ酸配列レベルで高度に保存されている。ヒストンのアミノ酸残基の側鎖は酵素的に修飾を受け、メチル化、ADP-リボシル化、リン酸化、およびアセチル化される。このようなヒストンのアミノ酸残基の修飾によってクロマチンが特徴付けられ、DNA情報はクロマチンの高次構造によって再編成される。H3は、K4、K9、K27、K36でメチル化が起きる。そのうちK9 (H3-K9) のメチル化は、ヘテロクロマチンの形成と遺伝子サイレンシングを引き起こすことが知られている。分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) において、ヘテロクロマチンの制御には、ヘテロクロマチン結合タンパク質SWI6、ヒストンメチル基転移酵素 (Histone methyltransferase: HMT) CLR4が関与している。SWI6は、クロモドメイン

(Chromatin organization modifier domain) を介して、H3-K9メチル化を特異的に認識する。その後、CLR4が結合してH3-K9メチル化が周囲の領域に広がり、境界領域で止まることが知られていた¹²⁷⁾。

これまで、例えば、植物のdsRNA配列特異的なDNAメチル化^{7) 128)}、線虫でトランスポゾンの沈黙化あるいはポリコームグループタンパク質とRNAi経路の関連¹²⁹⁾、マウスにおけるH3-K9メチル化とそれに伴うRNAの存在¹³⁰⁾ などによって、RNAi経路が何らかの形でヘテロクロマチン状態に関与していることが示唆されていた。最近では、哺乳動物細胞でsiRNAによるプロモーター領域のメチル化、H3-K9メチル化も報告されている¹³¹⁾。以下の2つの報告により、分裂酵母のH3-K9メチル化はおそらく小さなRNAを介して行われ、またRNAi経路はヘテロクロマチン形成に必要であることが明らかにされた (図8) ^{132) 133)}。

GrewalらとMartienssenらによって、分裂酵母において、ほかの生物でRNAi経路に重要な役割を果たすDicer (*dcr-1*)、Argonaute (*ago-1*)、

コードする *twil* をクローニングし、その挙動を追った。 *twil* mRNA は、通常に増殖している細胞では検出されず、有性生殖時の、最初の減数分裂の直後にのみ検出された (図 9 A-b, 図 9 B-b~d)。 *twil* ノックアウト細胞は、有性生殖を完了することは観察されたが、その後栄養増殖できなかった。また IES は欠失せず、BES もほとんど欠失されていなかった。 *twil* ノックアウト細胞に HA-タグをつけた Twilp (HA-Twilp) を導入すると、IES、BES が欠失され、野生型と同様に栄養増殖するのが観察された。 HA-Twilp は、有性生殖の間、最初は細胞質、次に親大核、その次に大核原基と局在を移し、その後消失した (図 9 B-b~d)。 *twil*, また、 *pdd1* の発現と並行して、5'リン酸基と3'水酸基をもつ、小さな26~31塩基のRNAの蓄積が観察された (図 9 B-c, d)。このRNAは、 *twil* ノックアウト細胞では検出されなかった¹³⁷⁾。IES由来のセンス、アンチセンスRNAの存在は報告されていたので¹⁴³⁾、この小さなRNAは、RNAi経路によって蓄積したことが考えられる。この小さいRNAに相当する配列は、大核DNAにはほとんど存在せず、小核DNA、つまりIESまたはBESに由来することが示された¹³⁷⁾。

Alliceらにより、PDD1とH3-K9メチル化の関係が調べられた。PDD1は少なくとも2つのクロモドメインを、PDD3は1つのクロモドメインを持ち、それぞれ、*in vitro* でH3-K9と特異的に結合した。 *pdd1* の発現とH3-K9メチル化は同調しており、いずれも有性生殖の接合時にのみ観察された。H3-K9メチル化、PDD1は、小核、古い大核には存在せず、大核原基に存在した (図 9 B-d)。また、DNAハイブリダイゼーションにより、H3-K9メチル化、PDD1は、IES配列と関係していることが明らかになった。H3-K9メチル化は、 *pdd1* ノックアウト細胞ではほとんど見られなかった¹³⁸⁾。

これら2つの報告から、Twilpと小さなRNAは、IES、BESの配列情報を古い大核から新しい大核に伝えており、おそらくPDD1を介し、そのRNAの配列情報に基づくH3-K9メチル化によって、新しい大核のIES、BESの欠失が起こることが示唆されている (図 9 B)。

分裂酵母、テトラヒメナは、ゲノムを脅かすような配列を、siRNAを介した配列特異的なH3-K9メチル化によってマークし、それぞれ、ヘテロクロマチン化、DNA欠失という形で転写を不活性化しているのであろうと考えられる¹⁴⁴⁾。

おわりに

RNAiの機構の研究から、これまで知られていなかった全く新しい内在の経路が存在することが明らかになってきた。また、RNAiを使用することによって、多くの生物現象が解明されてきている。RNAiは、種を超えて高度に保存されているため、それぞれの種で行われた研究が互いに補い合い、非常に早いスピードで研究が進展してきている。RNAiに関わる遺伝子のホモログは保存されているものも多いが、ほかでは全く見られないものもある。それぞれの種において、それらの遺伝子の多くは、発生学的にも重要な役割を果たしており、一つの遺伝子は想像以上に多機能であることを示唆している。それらの機能は、個々の生物において、あるいは独自の進化を遂げており、異なるネットワークに組み込まれている。

小さなRNAによって制御される生物現象の解明は、未開の分野である。植物では転写因子を制御しているものが多く存在していると考えられるが、哺乳動物ではそのような傾向は明らかになっていない。しかし、これらの小さなsiRNA/miRNAが、さまざまな生理現象の上流を制御していると考えられている。今後は、小さなRNAのノックダウン方法^{63) 145)} やマイクロアレイなどの方法を利用して^{146) 147)}、例えば、miRNA標的の網羅的解析やRNAi経路とメチル基転位酵素・ヒストンメチル基転位酵素の関係性などが徐々に明らかになってくるだろうと思われる。

本項が、特に、これから研究を始めようとしている研究者にとって、生命に対する興味あるいは理解の一助となり、また本書に掲載されているプロトコルを実際の研究に応用していただければ、これ以上の幸いはない。



参考文献

- 1) Fire, A. et al. : Nature, 391 : 806-811, 1998
- 2) Waterhouse, P. M. et al. : Nature, 411 : 834-842, 2001
- 3) Elbashir, S. M. et al. : Nature, 411 : 494-498, 2001
- 4) Napoli, C. et al. : Plant Cell, 2 : 279-289, 1990
- 5) van der Krol, A. R. et al. : Plant Cell, 2 : 291-299, 1990
- 6) Muskens, M. W. et al. : Plant Mol. Biol., 43 : 243-260, 2000
- 7) Wassenegger, M. : Plant Mol. Biol., 43 : 203-220, 2000
- 8) Metzlaiff, M. et al. : Cell, 88 : 845-854, 1997
- 9) Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. : Science, 286 : 950-952, 1999
- 10) Guo, S. & Kempthues, K. J. : Cell, 81 : 611-620, 1995
- 11) Cogoni, C. & Macino, G. : Curr. Opin. Genet. Dev., 10 : 638-643, 2000
- 12) Yang, D. et al. : Curr. Biol., 10 : 1191-1200, 2000
- 13) Elbashir, S. M. et al. : Genes Dev., 15 : 188-200, 2001
- 14) Tuschl, T. et al. : Genes Dev., 13 : 3191-3197, 1999
- 15) Zamore, P. D. et al. : Cell, 101 : 25-33, 2000
- 16) Elbashir, S. M. et al. : Embo J., 20 : 6877-6888, 2001
- 17) Boutia, A. et al. : Curr. Biol., 11 : 1776-1780, 2001
- 18) Nykanen, A. et al. : Cell, 107 : 309-321, 2001
- 19) Schwarz, D. S. et al. : Mol. Cell, 10 : 537-548, 2002
- 20) Chiu, Y. L. & Rana, T. M. : Mol. Cell, 10 : 549-561, 2002
- 21) Martinez, J. et al. : Cell, 110 : 563-574, 2002
- 22) Miyagishi, M. & Taira, K. : Nat. Biotechnol., 20 : 497-500, 2002
- 23) Bernstein, E. et al. : Nature, 409 : 363-366, 2001
- 24) Grishok, A. et al. : Cell, 106 : 23-34, 2001
- 25) Hutvagner, G. et al. : Science, 293 : 834-838, 2001
- 26) Schauer, S. E. et al. : Trends Plant Sci., 7 : 487-491, 2002
- 27) Wienholds, E. et al. : Nat. Genet., 35 : 217-218, 2003
- 28) Bernstein, E. et al. : Nat. Genet., 35 : 215-217, 2003
- 29) Nicholson, A. W. : FEMS Microbiol. Rev., 23 : 371-390, 1999
- 30) Blaszczak, J. et al. : Structure (Camb), 9 : 1225-1236, 2001
- 31) Cerutti, L. et al. : Trends Biochem. Sci., 25 : 481-482, 2000
- 32) Zhang, H. et al. : Embo J., 21 : 5875-5885, 2002
- 33) Zhang, H. et al. : Cell, 118 : 57-68, 2004
- 34) Hammond, S. M. et al. : Nature, 404 : 293-296, 2000
- 35) Lingel, A. et al. : Nature, 426 : 465-469, 2003
- 36) Ma, J. B. et al. : Nature, 429 : 318-322, 2004
- 37) Song, J. J. et al. : Nat. Struct. Biol., 10 : 1026-1032, 2003
- 38) Yan, K. S. et al. : Nature, 426 : 468-474, 2003
- 39) Song, J. J. et al. : Science, PMID:15284453, 2004
- 40) Lingel, A. et al. : Nat. Struct. Mol. Biol., 11 : 576-577, 2004
- 41) Matzke, M. et al. : Science, 293 : 1080-1083, 2001
- 42) Hammond, S. M. et al. : Science, 293 : 1146-1150, 2001
- 43) Carmell, M. A. et al. : Genes Dev., 16 : 2733-2742, 2002
- 44) Tuschl, T. : Chembiochem, 2 : 239-245, 2001
- 45) Ahlquist, P. : Science, 296 : 1270-1273, 2002
- 46) Sijen, T. et al. : Cell, 107 : 465-476, 2001
- 47) Tijsterman, M. et al. : Science, 295 : 694-697, 2002
- 48) Voinnet, O. et al. : Cell, 95 : 177-187, 1998
- 49) Zamore, P. D. : Science, 296 : 1265-1269, 2002
- 50) Hoken, T. et al. : Nucleic Acids Res., 30 : 1757-1766, 2002
- 51) Sharp, P. A. : Genes Dev., 15 : 485-490, 2001
- 52) Tabara, H. et al. : Cell, 109 : 861-871, 2002
- 53) Ishizuka, A. et al. : Genes Dev., 16 : 2497-2508, 2002
- 54) Voinnet, O. : Trends Genet., 17 : 449-459, 2001
- 55) Caudy, A. A. et al. : Genes Dev., 16 : 2491-2496, 2002
- 56) Williams, R. W. & Rubin, G. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 6889-6894, 2002
- 57) Tomari, Y. et al. : Cell, 116 : 831-841, 2004
- 58) Pham, J. W. et al. : Cell, 117 : 83-94, 2004
- 59) Liu, Q. et al. : Science, 301 : 1921-1925, 2003
- 60) Lee, Y. S. et al. : Cell, 117 : 69-81, 2004
- 61) Cikaluk, D. E. et al. : Mol. Biol. Cell, 10 : 3357-3372, 1999
- 62) Tahbaz, N. et al. : J. Biol. Chem., 276 : 43294-43299, 2001
- 63) Meister, G. et al. : Mol. Cell, 15 : 185-197, 2004
- 64) Martinez, J. & Tuschl, T. : Genes Dev., 18 : 975-980, 2004
- 65) Schwarz, D. S. et al. : Curr. Biol., 14 : 787-791, 2004
- 66) Liu, J. et al. : Science, PMID:15284456, 2004
- 67) Yang, W. & Steitz, T. A. : Structure, 3 : 131-134, 1995
- 68) Moss, E. G. : Curr. Biol., 11 : R772-775, 2001
- 69) Reinhart, B. J. et al. : Nature, 403 : 901-906, 2000
- 70) Lee, R. C. et al. : Cell, 75 : 843-854, 1993
- 71) Vella, M. C. et al. : Genes Dev., 18 : 132-137, 2004
- 72) Abrahante, J. E. et al. : Dev. Cell, 4 : 625-637, 2003
- 73) Lin, S. Y. et al. : Dev. Cell, 4 : 639-650, 2003
- 74) Moss, E. G. : Curr. Biol., 10 : R436-439, 2000
- 75) Pasquinelli, A. E. et al. : Nature, 408 : 86-89, 2000
- 76) Banerjee, D. & Slack, F. : Bioessays, 24 : 119-129, 2002
- 77) Tabara, H. et al. : Cell, 99 : 123-132, 1999
- 78) Lagos-Quintana, M. et al. : Science, 294 : 853-858, 2001
- 79) Lau, N. C. et al. : Science, 294 : 858-862, 2001
- 80) Lee, R. C. & Ambros, V. : Science, 294 : 862-864, 2001
- 81) Lagos-Quintana, M. et al. : RNA, 9 : 175-179, 2003
- 82) Houbaviy, H. B. et al. : Dev. Cell, 5 : 351-358, 2003
- 83) Grad, Y. et al. : Mol. Cell, 11 : 1253-1263, 2003
- 84) Aravin, A. A. et al. : Dev. Cell, 5 : 337-350, 2003
- 85) Llave, C. et al. : Plant Cell, 14 : 1605-1619, 2002
- 86) Lagos-Quintana, M. et al. : Curr. Biol., 12 : 735-739, 2002
- 87) Mourelatos, Z. et al. : Genes Dev., 16 : 720-728, 2002
- 88) Park, W. et al. : Curr. Biol., 12 : 1484-1495, 2002
- 89) Reinhart, B. J. et al. : Genes Dev., 16 : 1616-1626, 2002
- 90) Lim, L. P. et al. : Genes Dev., 17 : 991-1008, 2003
- 91) Lim, L. P. et al. : Science, 299 : 1540, 2003
- 92) Lee, Y. et al. : Embo J., 21 : 4663-4670, 2002
- 93) Gwizdek, C. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 884-891, 2004
- 94) Lund, E. et al. : Science, 303 : 95-98, 2004

- 95) Yi, R. et al. : Genes Dev., 17 : 3011-3016, 2003
- 96) Gwizdek, C. et al. : J. Biol. Chem., 278 : 5505-5508, 2003
- 97) Paushkin, S. et al. : Curr. Opin. Cell Biol., 14 : 305-312, 2002
- 98) Hutvagner, G. & Zamore, P. D. : Science, 297 : 2056-2060, 2002
- 99) Rhoades, M. W. et al. : Cell, 110 : 513-520, 2002
- 100) Llave, C. et al. : Science, 297 : 2053-2056, 2002
- 101) Yekta, S. et al. : Science, 304 : 594-596, 2004
- 102) Lai, E. C. : Nat. Genet., 30 : 363-364, 2002
- 103) Bartel, D. P. : Cell, 116 : 281-297, 2004
- 104) Pfeffer, S. et al. : Science, 304 : 734-736, 2004
- 105) Ambros, V. et al. : Curr. Biol., 13 : 807-818, 2003
- 106) Kuwabara, T. et al. : Cell, 116 : 779-793, 2004
- 107) Lindbo, J. A. et al. : Plant Cell, 5 : 1749-1759, 1993
- 108) Mlotshwa, S. et al. : Plant Cell, 14, Suppl. : S289-301, 2002
- 109) Palauqui, J. C. et al. : Embo J., 16 : 4738-4745, 1997
- 110) Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. : Nature, 389 : 553, 1997
- 111) Vaistij, F. E. et al. : Plant Cell, 14 : 857-867, 2002
- 112) Himber, C. et al. : Embo J., 22 : 4523-4533, 2003
- 113) Hamilton, A. et al. : Embo J., 21 : 4671-4679, 2002
- 114) Yoo, B. C. et al. : Plant Cell, 16 : 1979-2000, 2004
- 115) Anandalakshmi, R. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 : 13079-13084, 1998
- 116) Voinnet, O. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 14147-14152, 1999
- 117) Silhavy, D. & Burgyan, J. : Trends Plant Sci., 9 : 76-83, 2004
- 118) Mallory, A. C. et al. : Plant Cell, 13 : 571-583, 2001
- 119) Silhavy, D. et al. : Embo J., 21 : 3070-3080, 2002
- 120) Lakatos, L. et al. : Embo J., 23 : 876-884, 2004
- 121) Ye, K. et al. : Nature, 426 : 874-878, 2003
- 122) Vargason, J. M. et al. : Cell, 115 : 799-811, 2003
- 123) Dunoyer, P. et al. : Plant Cell, 16 : 1235-1250, 2004
- 124) Voinnet, O. et al. : Cell, 103 : 157-167, 2000
- 125) Lecellier, C. H. & Voinnet, O. : Immunol. Rev., 198 : 285-303, 2004
- 126) Grewal, S. I. & Elgin, S. C. : Curr. Opin. Genet. Dev., 12 : 178-187, 2002
- 127) Lachner, M. & Jenuwein, T. : Curr. Opin. Cell Biol., 14 : 286-298, 2002
- 128) Mette, M. F. et al. : Embo J., 19 : 5194-5201, 2000
- 129) Dudley, N. R. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 4191-4196, 2002
- 130) Maison, C. et al. : Nat. Genet., 30 : 329-334, 2002
- 131) Kawasaki, H. & Taira, K. : Nature, PMID-15311210, 2004
- 132) Hall, I. M. et al. : Science, 297 : 2232-2237, 2002
- 133) Volpe, T. A. et al. : Science, 297 : 1833-1837, 2002
- 134) Reinhart, B. J. & Bartel, D. P. : Science, 297 : 1831, 2002
- 135) Allshire, R. : Science, 297 : 1818-1819, 2002
- 136) Jenuwein, T. : Science, 297 : 2215-2218, 2002
- 137) Mochizuki, K. et al. : Cell, 110 : 689-699, 2002
- 138) Taverna, S. D. et al. : Cell, 110 : 701-711, 2002
- 139) Turkewitz, A. P. et al. : Trends Genet., 18 : 35-40, 2002
- 140) Madiredi, M. T. et al. : Cell, 87 : 75-84, 1996
- 141) Nikiforov, M. A. et al. : Mol. Cell. Biol., 20 : 4128-4134, 2000
- 142) Smothers, J. F. et al. : Development, 124 : 4537-4545, 1997
- 143) Chalker, D. L. & Yao, M. C. : Genes Dev., 15 : 1287-1298, 2001
- 144) Dernburg, A. F. & Karpen, G. H. : Cell, 111 : 159-162, 2002
- 145) Hutvagner, G. et al. : PLoS Biol., 2 : E98, 2004
- 146) Liu, C. G. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 9740-9744, 2004
- 147) Calin, G. A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 11755-11760, 2004
- 148) Pepper, A. S. et al. : Development, 131 : 2049-2059, 2004
- 149) Cole, E. S. et al. : Dev. Biol., 189 : 215-232, 1997

A Small Modulatory dsRNA Specifies the Fate of Adult Neural Stem Cells

Tomoko Kuwabara,^{1,2} Jenny Hsieh,¹
Kinichi Nakashima,^{1,3} Kazunari Taira,²
and Fred H. Gage^{1,*}

¹Laboratory of Genetics

The Salk Institute

10010 North Torrey Pines Road

La Jolla, California 92037

²Gene Function Research Center

National Institute of Advanced Industrial Science

and Technology (AIST)

Central 4

1-1-4 Higashi

Tsukuba Science City 305-8562

Japan

³Department of Cell Fate Modulation

Institute of Molecular Embryology and Genetics

Kumamoto University

Kumamoto, 860-0811

Japan

Summary

Discovering the molecular mechanisms that regulate neuron-specific gene expression remains a central challenge for CNS research. Here, we report that small, noncoding double-stranded (ds) RNAs play a critical role in mediating neuronal differentiation. The sequence defined by this dsRNA is *NRSE/RE1*, which is recognized by NRSF/REST, known primarily as a negative transcriptional regulator that restricts neuronal gene expression to neurons. The *NRSE* dsRNA can trigger gene expression of neuron-specific genes through interaction with NRSF/REST transcriptional machinery, resulting in the transition from neural stem cells with neuron-specific genes silenced by NRSF/REST into cells with neuronal identity that can express neuronal genes. The mechanism of action appears to be mediated through a dsRNA/protein interaction, rather than through siRNA or miRNA. The discovery of small modulatory dsRNAs (smRNAs) extends the important contribution of noncoding RNAs as key regulators of cell behavior at both transcriptional and posttranscriptional levels.

Introduction

The expression of cell type-specific differentiation genes is thought to depend on both positive and negative gene expression controls, which are implemented throughout the developmental history of cells. Numerous genetic studies provide evidence that cell type-specific gene expression activators and repressors are essential components of the process. In addition to the conventional transcription machinery, gene expression control by small noncoding RNAs, at the posttranscriptional level, appears to be essential (Eddy, 2001; Fire

et al., 1998; Pasquinelli, 2002). Base complementarity allows very small noncoding RNAs to be sequence-specific, and since they act both in *cis* and *trans*, their potential functional roles at specific regulatory stages can be expanded. Noncoding RNA genes, which produce transcripts, can function directly as structural, catalytic, or regulatory RNAs, rather than as expressed mRNAs that encode proteins. Recently, several groups have carried out systematic noncoding RNA gene identification screens (Dostie et al., 2003; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Studies indicate that the prevalence of noncoding RNA genes has indeed been underestimated. Plants, flies, worms, mice, and humans all harbor significant numbers of small RNAs that are likely to play regulatory roles. Although most of the identified noncoding RNAs have unknown functions, their sequences are typically conserved among different species, and many have intriguing expression patterns in different tissues or stages of development. Therefore, noncoding RNAs may have a general role in modulating gene expression in many aspects of development, such as tissue-specific patterning and cell fate specification.

The regulatory mechanisms of gene expression, which determine cell fates giving rise to each lineage, remain largely unknown. Cell fate decisions might involve the regulatory activities of noncoding RNAs. To examine whether noncoding RNAs contribute to cell fate specification of adult neural stem cells, we isolated small, noncoding RNAs from adult hippocampal neural stem cells during lineage-specific differentiation. To identify possible target nucleic acids, public database searches were used for genomic sequences. Among the large number of small noncoding RNAs that appeared, one unique sequence emerged from the "neurogenesis" noncoding RNA pools. This sequence defined the *NRSE/RE1* (neuron restrictive silencer element), which is recognized by the NRSF/REST transcriptional regulator (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995).

In the CNS, neuronal restricted silencing factor/RE-1 silencing transcription factor (NRSF/REST) plays a critical role as a key transcriptional repressor for neuron-specific genes in nonneuronal cells (Chen et al., 1998; Huang et al., 1999; Palm et al., 1998; Schoenherr et al., 1996). NRSF/REST is a krüppel family zinc finger protein and binds specifically to a 21- to 23-base pair (bp) conserved DNA response element (*NRSE/RE1*). *NRSE/RE1* sequences are encoded within a broad range of genes involved in neuronal development and function, including ion channels, neurotransmitter receptors and their synthesizing enzymes, receptor-associated factors, neurotrophins, synaptic vesicle proteins, growth-associated and cytoskeletal and adhesion molecule factors involved in axonal guidance, transport machinery, transcription factors, and cofactors. The consensus *NRSE/RE1* sequence is conserved between *Xenopus*, mouse, rat, chicken, sheep, and human. NRSF/REST mediates transcriptional repression through the association of the N-terminal repressor domain with the mSin3/histone deacetylase-1/2 (HDAC1/2) complex and through the association of C-terminal repressor domain with the CoREST

*Correspondence: gage@salk.edu

complex (by recruitment of MeCP2 or HDACs) (Huang et al., 1999; Lunyak et al., 2002; Naruse et al., 1999).

In this work, we report that the identified, noncoding RNA-containing *NRSE* sequence forms double-stranded RNA (dsRNA) in lengths of about 20 bp, and that the *NRSE* dsRNA activates expression of *NRSE/RE1*-containing genes during an early stage of neurogenesis. The *NRSE* dsRNA modulates the *NRSE/RE1* DNA-NRSF/REST protein machinery to switch neuronal gene expression from a repressed state in stem cells to an active state in early neurons. The *NRSE* dsRNA is necessary and sufficient to direct multipotent neural stem cells specifically down a neuronal lineage, suggesting it can function as an endogenous inducer of neuronal differentiation. The apparent gene activation effects of the *NRSE* dsRNA clearly distinguish it from the gene silencing effects of cellular miRNA/siRNAs and suggest a novel function for noncoding RNAs at a transcriptional level.

Results

Identification of a Neuron-Specific, Small Noncoding RNA from Adult Hippocampal Neural Stem Cells

To investigate the role of small, noncoding RNAs in the differentiation of neural stem cells, 20- to 40-nucleotide (nt) RNAs were cloned from total RNA extracted from adult hippocampal neural stem cells (HCN-A94; Gage et al., 1995). We obtained more than 50 unknown noncoding RNAs and decided to focus on one RNA sequence that contained a match to the 21 nt *NRSE/RE1* DNA sequence in the antisense orientation (*asNRSE*; Supplemental Figure S1 available at <http://www.cell.com/cgi/content/full/116/6/779/DC1>). The *NRSE/RE1* sequence is usually localized within promoter regions of neuron-specific genes and is recognized by the NRSF/REST protein to restrict neuron-specific gene expression; however, the function of a DNA element within an RNA sequence is unclear.

Northern analyses revealed an *asNRSE* RNA corresponding to about 20 nt in length within the neuronal population (cells treated with 1 μ M retinoic acid [RA] and 5 μ M forskolin [FSK] for 4 days). Surprisingly, our control probe for sense-strand revealed an $\sim$ 20 nt sense *NRSE* RNA (*sNRSE*) within the same neuronal population (Figure 1A, probe for sense) suggesting that these RNAs might exist as double-stranded forms within the cell. Low amounts of both sense and antisense RNAs could also be detected within the progenitor population, but the expression levels in the neuronal population were much higher relative to the progenitor population. The expression of low levels of both RNAs within the progenitor cultures could be due to the presence of some cells already committed to specific lineages. Nevertheless, we could not detect any *NRSE* RNAs within an astrocyte population.

To determine which neuronal stages express the dsRNA, a time-course Northern blot analysis was performed after neuronal induction. Cells at 2 and 4 days after induction of neural differentiation (RA+FSK) contained the highest amounts of the *NRSE* dsRNA; as maturation proceeded, the levels of the *NRSE* dsRNA apparently decreased (Figure 1B). These data show that

the *NRSE* dsRNA appeared at an early stage of neurogenesis rather than at more mature stages.

Neuronal Lineage Induction by the *NRSE* dsRNA

To determine the function of the *NRSE* dsRNA, we expressed them in HCN-A94 cells. We made lentiviral vectors with U6 promoter-driven *sNRSE*, *asNRSE* and *NRSE* dsRNA expression cassettes. After infecting progenitor cells with virus, cells were maintained without FGF-2 for 4 days. In control infections (lentivirus with an empty U6 cassette), we did not observe any obvious effects on cell morphology (Figure 2A). Expression of single *sNRSE* or *asNRSE* RNA alone also had no obvious effects (Figure 2A). However, when we introduced both *sNRSE* and *asNRSE* RNA together, significant morphological changes were observed (Figure 2A). These cells extended processes indicative of differentiation and some cells made large but flat clusters with long processes.

We next performed immunocytochemistry with markers of various differentiated neural lineages. Introduction of *NRSE* dsRNA in progenitor cultures resulted in increased immunocytochemical staining of neuron-specific markers, including β III-tubulin (TUJ1), NF200, and calbindin (Figure 2B). Cells containing the *NRSE* dsRNA were completely negative for the astrocyte marker GFAP and oligodendrocyte marker RIP (Figure 2B).

Quantitative Analysis of *NRSE* dsRNA Activity as an Endogenous Inducer of Neuronal Differentiation
We next assessed the effects of noncoding *NRSE* dsRNA, both in progenitor cultures and during lineage-specific differentiation with reporter constructs. Stage-specific promoter-based reporter assays allowed us to quantify the activity of *NRSE* dsRNAs comparatively.

We used a Sox2 promoter-driven luciferase construct as an undifferentiated neural progenitor-specific reporter construct. Luciferase values from cells 4 days after mock virus (control) infection were set as 100% (Figure 2C; the immunostaining is also shown in the right image). No obvious difference was observed for *sNRSE* RNA and *asNRSE* RNA; however, there was a significant decrease in luciferase activity in cells infected with *NRSE* dsRNA.

A β III-tubulin (TUJ1) promoter-driven luciferase construct was used for the neuron-specific reporter construct. RNA-expressing virus-infected progenitor cells were cultured in 1 μ M RA and 5 μ M FSK for 4 days. The luciferase activity increased more than 4 times when compared with the activity in the progenitor culture (data not shown). Many cells stained positive for TUJ1 (control with mock virus infection; Figure 2C); therefore, the luciferase value of the cell at this time point was taken as 100%. Expression of either *sNRSE* RNA or *asNRSE* RNA alone had no obvious effects on neuronal differentiation. In contrast, the *NRSE* dsRNA specifically increased the TUJ1 promoter-luciferase activity more than 2 times relative to control.

The GFAP and MBP promoters were prepared as lineage-specific luciferase assays for astrocyte and oligodendrocyte differentiation, respectively. To induce astrocyte differentiation, cells were treated with a combination of 50 ng/ml BMP-2, 50 ng/ml LIF and 1% FCS.

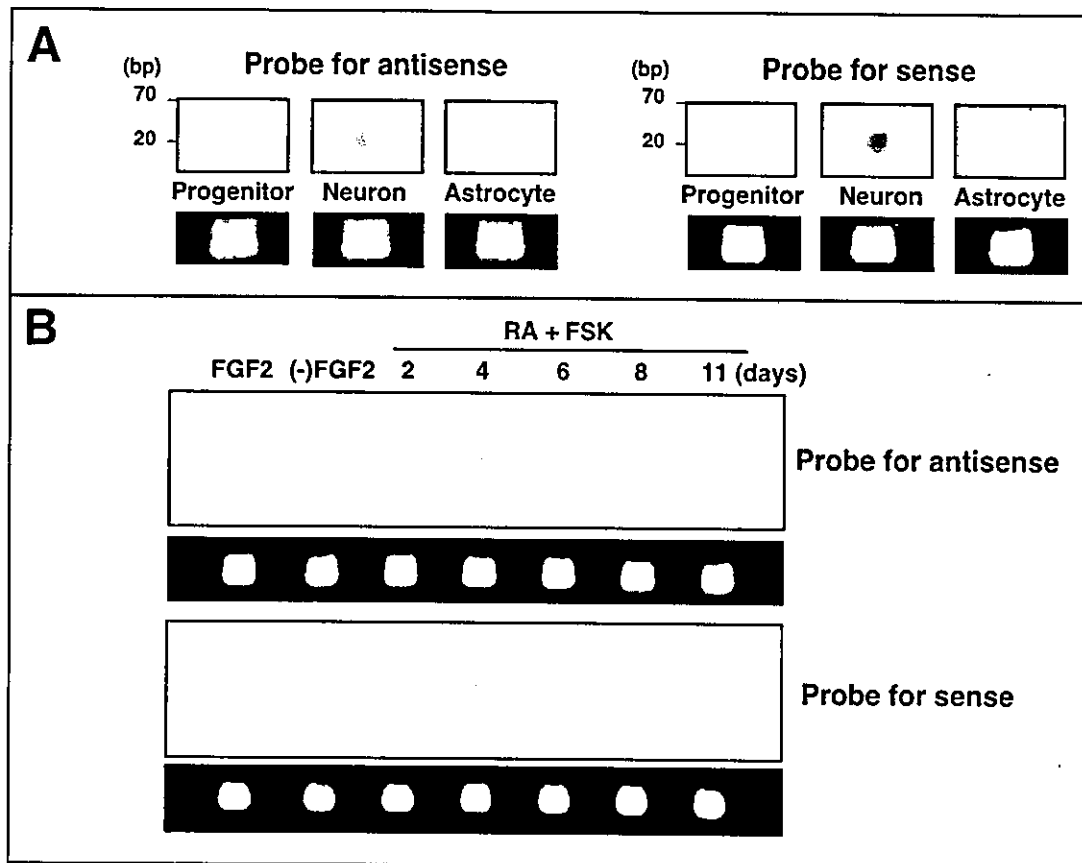


Figure 1. Identification of *NRSE* dsRNA from Adult Hippocampal Neuronal Cells

(A) Northern blot analysis of *NRSE* dsRNA. Both *asNRSE* and *sNRSE* RNA corresponding to approximately 20 nt in length exist in the neuronal population.

(B) Time-course Northern blot analysis after RA/FSK induction. Cells 2 and 4 days after induction of neural differentiation contain the highest amounts of the *NRSE* dsRNA, suggesting that *NRSE* dsRNA appears at an early stage of neurogenesis.

Four days later, the *GFAP*-luciferase activity increased more than 5-fold when compared with the activity in the progenitor culture (data not shown). To induce oligodendrocyte differentiation, FGF2 withdrawal of progenitor cultures results in some spontaneous differentiation. Two days later, the *MBP*-luciferase activity increased more than 3-fold when compared with the activity in progenitor cultures. We did not detect any obvious differences in the cases where *sNRSE* RNA and *asNRSE* RNA were expressed during astrocyte or oligodendrocyte differentiation. However, significant decreases in luciferase activity were detected when the *NRSE* dsRNA was introduced under each differentiation condition. Furthermore, *NRSE* dsRNA-expressing virus-infected cells that remained under each differentiation condition appeared to be neurons (TUJ1 positive, data not shown).

Increased Expression of Neuron-Specific Genes Containing *NRSE/RE1* by the *NRSE* dsRNA

To investigate the mechanism of action of the *NRSE* dsRNA, we first considered whether the *NRSE* dsRNA might function as a miRNA/siRNA. It has been discovered that miRNA/siRNAs exist as 21–25 nt dsRNAs and target cellular mRNAs in a complementary fashion, lead-

ing to a process of posttranscriptional gene silencing (Hutvagner et al., 2001; Pasquinelli, 2002).

Figure 2 demonstrates that neuronal lineage induction is one of the major effects of the *NRSE* dsRNA. If the *NRSE* dsRNA mediated the silencing of the *NRSF/REST* gene itself by a miRNA/siRNA-like function and if *NRSF/REST* functions as a repressor of neuronal gene expression, the repression of neuron-specific genes may be eliminated, resulting in neuronal lineage induction. However, there is no apparent *NRSE* sequence within the *NRSF/REST* mRNA, making it an unlikely target of the *NRSE* dsRNA at the posttranscriptional level. In fact, when total RNAs were extracted from HCN-A94 cells infected with *NRSE* dsRNA-expressing virus for 4 days, reverse transcription (RT) PCR analysis revealed that the introduction of the *NRSE* dsRNA did not appear to change the expression of the *NRSF/REST* itself (Figure 3A, top left).

NRSE sequences are preferentially localized within promoter regions of neuron-specific genes. We performed sequence database search, and found more than 60 *NRSE/RE1* sequences in the mouse genome. We next examined the direct effects of *NRSE* dsRNA on the expression of genes that have the *NRSE/RE1* element in their promoters (*SCG10*, *Synapsin I* *NaCh II*,

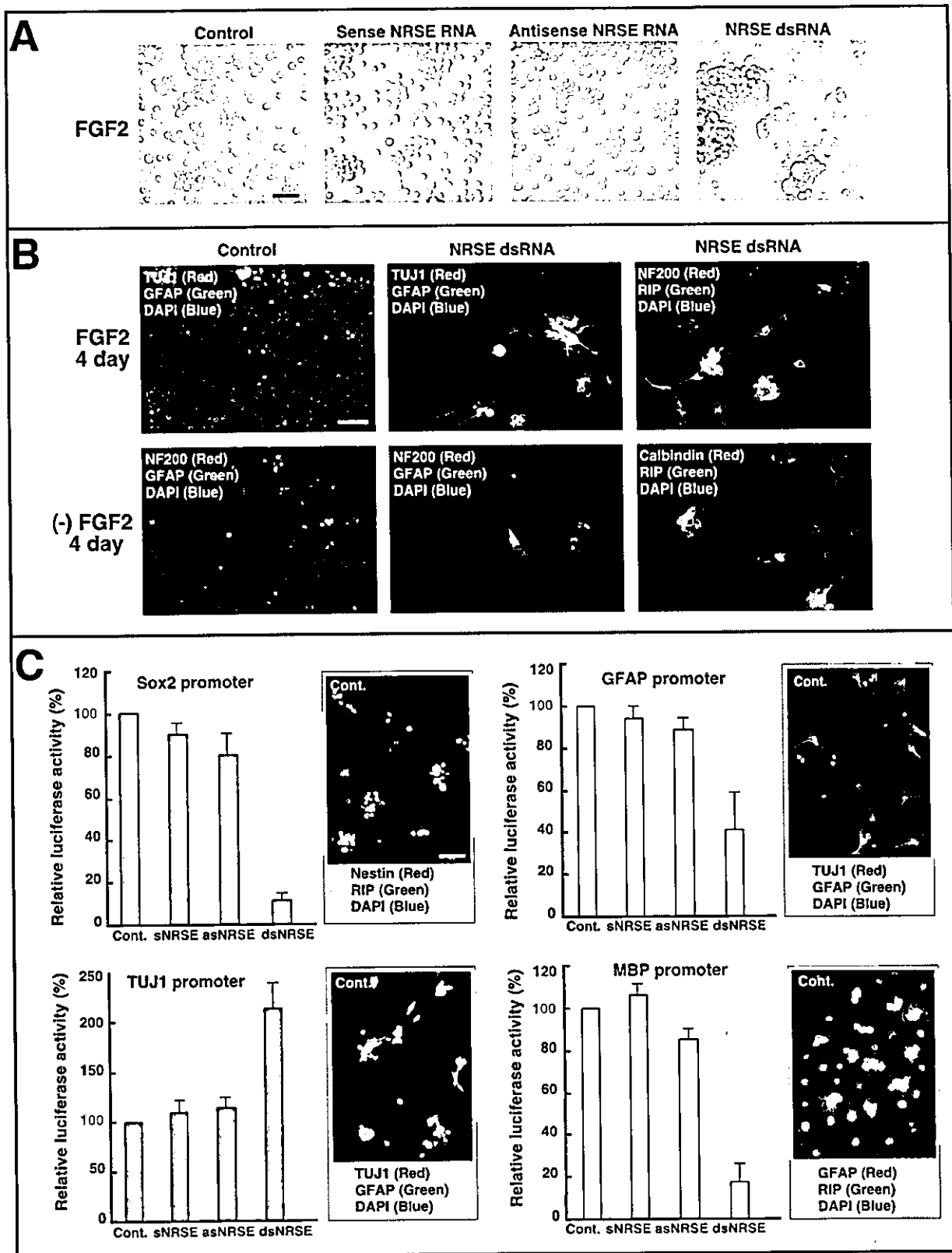


Figure 2. *NRSE* dsRNA Induces Neuronal Differentiation of Progenitor Cells

(A) Neural progenitor cells were infected with either a control virus or viruses expressing sense, antisense or *dsNRSE* RNAs.

(B) Immunocytochemical analysis of cells with *NRSE* dsRNA. Expression of *NRSE* dsRNA in progenitor cultures resulted in increased numbers of neuron-specific marker-positive cells.

(C) Quantitative analysis of *NRSE* dsRNA activity as an inducer of neuronal differentiation. The reporter assay was performed by using lineage-specific gene promoter-driven luciferase constructs. Scale bars are equal to 10 μ m.

M4 mAChR, and *mGluR2*). RT-PCR analysis revealed that the *NRSE* dsRNA increased expression levels of *NRSE/RE1*-containing genes (Figure 3A). In progenitor stages, expression levels of *SCG10*, *Synapsin I*, *NaCh II*, *M4 mAChR*, and *mGluR2* were very low. Upon introduction of *NRSE* dsRNA, significant transcriptional activation was observed (Figure 3A). These gene-activating events appeared to be *NRSE/RE1*-gene specific; no obvious increases in the expression of *GAPDH* and β -actin genes were detected.

To determine how widespread the *NRSE* dsRNA-dependent gene activation was, we monitored the activity with reporter assay using the *mGluR2* promoter. The *mGluR2* promoter containing an *NRSE/RE1* DNA element was fused to EGFP and this construct was transfected into various cell types infected with or without the *NRSE* dsRNA lentivirus. In HCN-A94 progenitor cultures, most of the cells were negative for GFP expression. In contrast, in progenitor cultures with the *NRSE* dsRNA, the number of GFP-positive cells increased (Figure 3B). Neurosphere cultures were prepared from whole brain of 10-day-old ICR strain mice, and primary neural stem cells were derived from ventricular zone, hippocampus, and whole brain of the 129/SvJ strain of adult mice. In all cases, the introduction of *NRSE* dsRNA mediated a substantial increase in *mGluR2* promoter activity (Figure 3B).

Critical Sequence Requirement of Both the *NRSE* dsRNA and *NRSE/RE1* DNA Element for Gene Activation

To investigate the sequence requirement and specificity, we prepared a set of simple reporter constructs. The *NRSE/RE1* element was fused upstream from the 260 bp CMV minimal promoter carrying a TATA box and linked to the luciferase gene (*NRSE-TATA*, Figure 3C). A mutated *NRSE/RE1* element was prepared similarly (*mtNRSE-TATA*). We also made expression cassettes for the *NRSE* dsRNA and a mutated *NRSE* dsRNA (*mtNRSE* dsRNA).

When we introduced TATA-luciferase constructs lacking the *NRSE/RE1* element, no differences in the luciferase activities were detected between cells infected with no RNA (control)-, *NRSE* dsRNA- and *mtNRSE* dsRNA-expressing virus constructs (Figure 3D, gray bars). In contrast, when we introduced *NRSE-TATA*-luciferase constructs, the *NRSE* dsRNA increased the expression levels of *NRSE-TATA*-luciferase gene more than 2.5 times (Figure 3D, orange bars). We next tested the effects of a mutated *NRSE* dsRNA on *NRSE-TATA*-luciferase activity. The mutations changed sequence specificity while preserving dsRNA structure. Interestingly, when the *NRSE* dsRNA was mutated (*mtNRSE* dsRNA), no additional increase relative to control was observed (Figure 3D). On the other hand, the introduction of a mutated *NRSE/RE1* DNA element (*mtNRSE-TATA*) in combination with an intact *NRSE* dsRNA was not enough to induce further gene activation (Figure 3D, green bars). These results show that *NRSE* dsRNA-dependent gene activation requires a critical sequence homology between the *NRSE/RE1* DNA element and the *NRSE* dsRNA.

RNA-Directed Chromatin Changes of *NRSE/RE1*-Containing Genes in Adult Hippocampal Neural Cells

NRSF/REST proteins interact with histone deacetylase (HDAC1) and methyl-CpG binding protein (MeCP2) to form a repressive chromatin state in nonneuronal cells (Huang et al., 1999; Lunyak et al., 2002). To investigate the nature of the transcriptional activation of *NRSE/RE1*-containing genes by the *NRSE* dsRNA, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. The promoter regions of *mGluR2* and *SCG10* genes were assessed as representative *NRSE/RE1*-containing genes, since these genes have been characterized in mechanistic studies of the NRSF/REST repressor complex (Myers et al., 1998; Naruse et al., 1999).

We prepared ChIP samples from HCN-A94 cells during progenitor (with FGF2) and differentiated stages (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes). During stem/progenitor stages, as well as nonneuronal stages (oligodendrocytes and astrocytes), both *mGluR2* and *SCG10* genes were associated with NRSF/REST and HDAC1 (Figure 4A, second and third rows). Notably, NRSF/REST was always found to be associated with endogenous *mGluR2* and *SCG10* promoters, in the region of the *NRSE/RE1* (Figure 4A, second row). In the case of *mGluR2* promoter, in addition to HDAC1, methyl-DNA binding proteins of MeCP2 and MBD1 were found associated with the *NRSE/RE1* region (Figure 4A, fourth and fifth rows). As for the *SCG10* promoter, we observed decreased association of MeCP2 and MBD1, even though this gene is apparently repressed in the nonneuronal state, suggesting diversity of the repression machinery depending on specific gene/promoters containing *NRSE/RE1* elements.

In contrast, clear evidence of derepressed chromatin states was seen for both *mGluR2* and *SCG10* genes in neurons, where decreased association of HDAC1 with the *NRSE/RE1* element was found (Figure 4A, third row, third lane). The CREB binding protein (CBP)/p300 family of transcriptional coactivators possessing histone acetyltransferase activity has been shown to interact with various transcription factors to activate genes (Bannister and Kouzarides, 1996). We detected an increase in the association of CBP, acetylated histone H4, and acetylated histone H3 with both promoters when cells were in a state in which these genes are actively expressed (Figure 4A, sixth to eighth rows, third lanes). SWI/SNF chromatin-remodeling factors, BRG1 and BAF170, were also found to associate with the *NRSE/RE1* element, as part of a possible machinery to remodel the chromatin state for active expression of neuron-specific genes in neuronal cells (Figure 4A, eighth and ninth rows, third lanes).

Importantly, the ChIP assay revealed that, upon the introduction of *NRSE* dsRNA into progenitor cells, there was decreased association of the repressor proteins MeCP2, MBD1, and HDAC1 with the *NRSE/RE1*, resulting in the activation of neuronal genes. The fact that NRSF/REST still occupied the *NRSE/RE1* locus suggests that NRSF/REST may be involved in an alternative chromatin structure with acetylated histones to activate transcription. For this transition step to occur, chromatin-remodeling factors like BAF170 and BRG1, which had previously been shown to bind NRSF/REST (Battag-

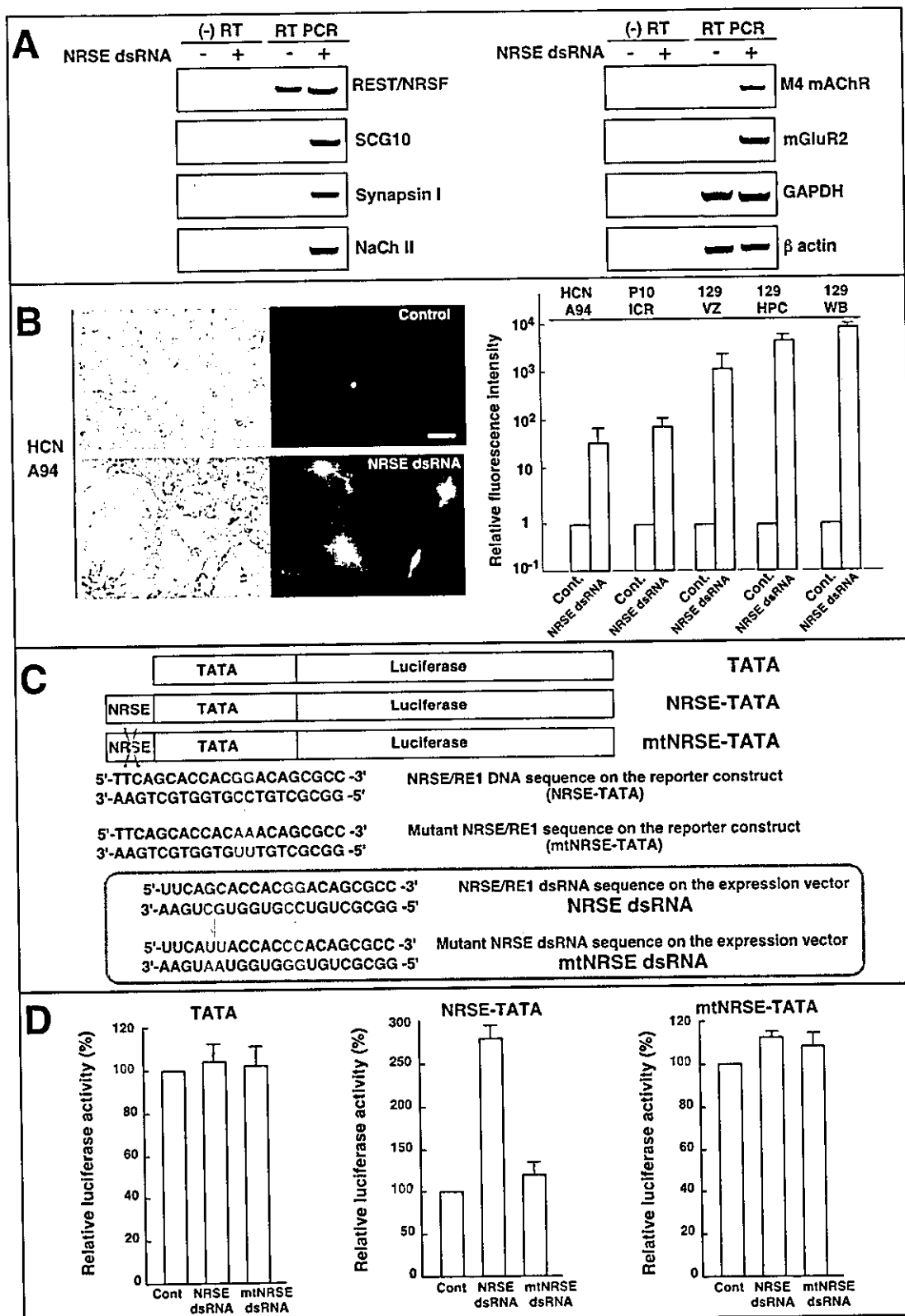


Figure 3. Effect of NRSE dsRNA on the Expression of Neuron-Specific Genes Containing the NRSE/RE1 DNA Element

(A) RT-PCR analysis showed that NRSE dsRNA increased transcription levels of NRSE/RE1-containing genes without affecting the expression of NRSF/REST.

(B) Reporter assay for NRSE dsRNA activity using the mGluR2 promoter-driven EGFP construct. Effects of NRSE dsRNA on gene activation were assessed in neurosphere cultures and primary neural stem cells. Relative fluorescence intensity was plotted on a log scale (right). Scale bar is equal to 10 μ m.

(C) Schematic diagram of the constructs to examine the requirement of sequence specificity of NRSE. The NRSE/RE1 element was fused

lioli et al., 2002), may be required for remodeling the chromatin through their ATPase activity.

We also examined the function of *NRSE* dsRNA in gene-specific activation. HCN A94 cells were treated with either an HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) or with demethylation reagent 5'-aza-cytidine (5AzaC). Endogenous expression levels of mRNAs of mGluR2, NaCh II, *SCG10*, and *Synapsin I* were increased in TSA-treated cells, compared with untreated cells (Supplemental Figure S2 available on Cell website). The treatment with 5AzaC showed significant activation of the M4 AChR, mGluR2, and NaCh II mRNAs. Some of these differences in repression responses among neuronal genes reinforce the idea that there may be diversity in the REST/NRSF regulatory machinery.

NRSF/REST Is Converted from a Transcriptional Repressor to an Activator in the Presence of *NRSE* dsRNA

To determine whether the transactivation of genes by *NRSE* dsRNA was caused by derepression or by a functional switch of NRSF/REST from repressor to activator, we made GluR2 promoter-driven luciferase constructs [wild-type (GluR2-luciferase, Figure 4B) and mutated *NRSE* substituted with random nucleotides (mtGluR2-luciferase, Figure 4B)], and compared the level of luciferase activity with and without expression of *NRSE* dsRNA in adult neural stem cells (Figure 4B). NRSF/REST cannot bind to mutated *NRSE* sequences (Kraner et al., 1992). In the case of the mutated *NRSE* construct (mtGluR2-luciferase), the relative luciferase activity is seen at baseline levels, presumably due to a release of NRSF-mediated repression (derepression). We observed at least a 2-fold increase in the wild-type GluR2-luciferase construct upon introduction of the *NRSE* dsRNA, but not in the mtGluR2-luciferase construct, indicative of an activation effect. This activation was never observed with the introduction of a mutant *NRSE* dsRNA or a control vector; in fact there was an active repression of GluR2-luciferase, consistent with NRSF/REST actions as a repressor. Taken together, these results suggest that: (1) NRSF/REST functions as a repressor in the absence of *NRSE* dsRNA, (2) NRSF/REST converts to an activator in the presence of *NRSE* dsRNA, and (3) the activator function of NRSF/REST is dependent on having both a wild-type *NRSE/RE1* DNA sequence and a wild-type *NRSE* dsRNA.

The Loss of Nuclear Localizing *NRSE* dsRNA Blocks Neuronal Differentiation in Adult Hippocampal Stem Cells

To determine if *NRSE* dsRNA is necessary for neuronal differentiation, we designed a ribozyme (Rz; Figure 5A) that can specifically cleave one of the strands of the dsRNA sequence, thus inactivating the expression of the *NRSE* dsRNA. For ribozymes, additional proteins are not needed for catalysis; they only require Mg^{2+} ions,

which are abundant in cells (Eckstein and Lilley, 1996; Warashina et al., 2000). Since it is important to select the appropriate promoter to express the ribozyme in the compartment of the cell where the target RNA is located (Koseki et al., 1998), we first analyzed the localization of *NRSE* dsRNA by Northern blotting. We found both antisense and sense *NRSE* RNAs dominantly expressed in the nuclear fraction (Figure 5A), reinforcing the finding that *NRSE* dsRNAs are not acting as miRNAs, which target cytoplasmic mRNAs to inhibit their translation. Treatment of progenitor cells with the ribozyme completely abolished expression of the *NRSE* dsRNA. An inactive ribozyme (I-Rz) with one nucleic acid substitution in the catalytic domain was prepared as a negative control and did not affect *NRSE* dsRNA expression.

We introduced both nuclear specific U6-driven functional Rz and I-Rz into HCN A94 cells by lentiviral infection. No obvious effects were detected at the progenitor stage (since *NRSE* dsRNAs are not expressed at this stage) compared with the cells in which the *NRSE* dsRNA had been introduced by lentivirus (Figure 5B). When the culture was switched into the neuronal differentiation condition, in the case of I-Rz, normal neuronal differentiation was observed (Figure 5B, bottom right). However, when the Rz targeting *NRSE* dsRNA was introduced, cells displayed strong antidifferentiation effects even with RA+FSK stimulation and resembled the morphology of cells in progenitor stages (Figure 5B, top right).

To determine the effect of Rz in each differentiation pathway, a cell type-specific promoter-based reporter assay was performed similar to that shown in Figure 2C. Luciferase values from cells 4 days after control mock virus-infection were taken as 100%. Under progenitor culture conditions, Sox2 promoter-driven luciferase values resulted in no difference in the cases of Rz and I-Rz treatment, probably due to the lack of endogenous dsRNA (Figure 5C).

Under the neuronal condition, the level of the *NRSE* dsRNA increased, as well as TUJ1 promoter-driven luciferase activity. Introduction of the Rz in this condition significantly reduced the TUJ1-luciferase activity, whereas the I-Rz had no effect (Figure 5C). Under astrocyte or oligodendrocyte differentiation conditions, no obvious differences were detected in the levels of luciferase driven from the *GFAP* or *MBP* promoter, respectively, upon either Rz or I-Rz introduction (Figure 5C). Mutant *NRSE* dsRNA (mt*NRSE* dsRNA) had no effect on various luciferase assays.

NRSE dsRNA in the Nuclei of Cells Differentiating into Neurons

We next carried out in situ hybridization against *NRSE* dsRNA and immunostaining for NRSF/REST protein simultaneously. As illustrated in Figure 6A, DAPI (blue) and *NRSE* RNA (green) colocalized in the nucleus of HCN-A94 cells in neurons (RA+FSK for 4 days, upper

upstream of TATA box and linked to the luciferase gene. Mutated *NRSE/RE1* DNA element on the reporter construct (mt*NRSE*-TATA) and mutated *NRSE* dsRNA expression construct at a critical recognition site (mt*NRSE* dsRNA) were also prepared.

(D) Sequence requirement of both *NRSE* dsRNA and the *NRSE/RE1* DNA element for gene activation. Luciferase assay showed that *NRSE* dsRNA-dependent gene activation requires a specific sequence homology between the *NRSE/RE1* DNA element and *NRSE* dsRNA.

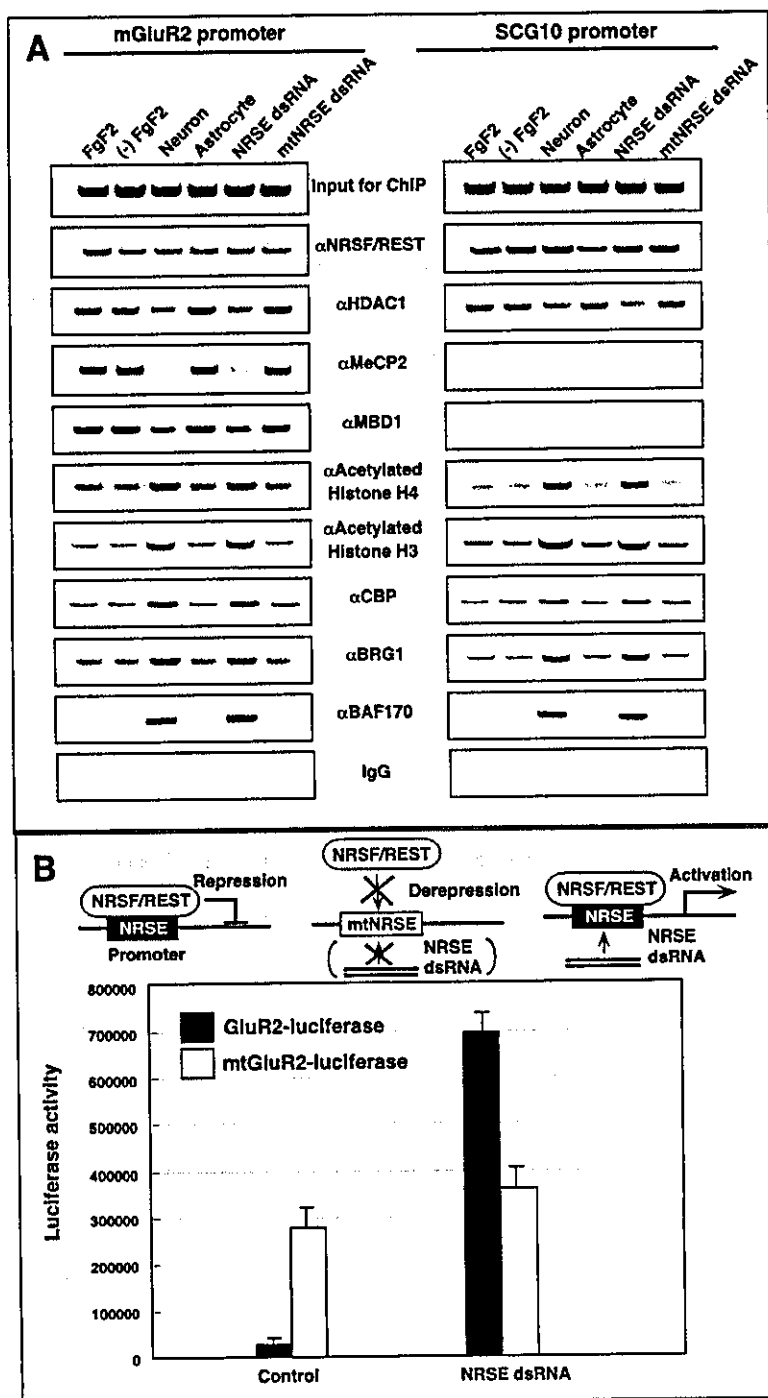


Figure 4. *NRSE* dsRNA-Directed Chromatin Changes of *NRSE/RE1*-Containing Genes

(A) ChIP assay for chromatin regulating factors. (B) Reporter assay for *NRSE* dsRNA function to convert NRSF/REST from a repressor to an activator using the GluR2 promoter-driven luciferase construct. Intact and mutated mGluR2-luciferase constructs were prepared and the level of luciferase activity driven by each promoter in the presence or absence of *NRSE* dsRNA expression was compared.

images). However, colocalization did not occur when DNA was condensed during cell division (white arrow, Figure 6A, upper image). During DNA condensation, *NRSE* RNAs remained in the nuclear domain but appeared to be outside of the condensed chromosomal region (white arrows, Figure 6A, upper image). *NRSE* dsRNA localization in mitotic cells seems to reflect the localization of histone acetylase/proteins, which also appear beyond the condensed chromosomal region. The nature of their actions on transcriptional regulation is in accord with the finding that transcription is repressed during mitosis (Kruhlak et al., 2001). Molecules

smaller than 50~70 kDa can translocate back and forth through the nuclear pore through a process of natural diffusion (Stehno-Bittel et al., 1995). Since *NRSE* dsRNAs are ~20 bp in length (less than 20 kDa), they would likely diffuse throughout the cell. However, *NRSE* dsRNAs were located specifically in the nucleus, suggesting as yet unknown molecule(s) restricting the localization of the dsRNA to the nucleus.

NRSF/REST proteins are mainly localized in the nucleus, regardless of cell division (magenta, Figure 6A). Even though NRSF/REST is expressed in all of the cells, the cells expressing higher amounts of *NRSE* RNAs were