

**Figure 5.** Pitavastatin suppresses apoB48R expression in THP-1 macrophages via RhoA-dependent mechanism. **A**, THP-1 macrophages were preincubated in the presence of pitavastatin (pita) at the indicated concentrations for 24 hours, then the expression of apoB48R on THP-1 macrophages was detected with immunoblotting (blots are representative of 4 separate experiments). **B**, THP-1 macrophages were preincubated in the absence (-) or presence (+) of GGPP (10  $\mu$ mol/L, 24 hours) or FPP (10  $\mu$ mol/L, 24 hours), then incubated in the absence (-) or presence (+) of pitavastatin (pita, 5  $\mu$ mol/L, 24 hours) prior to immunoblotting (blots are representative of 3 separate experiments). **C**, THP-1 macrophages were preincubated in the presence (+) or absence (-) of pitavastatin (pita, 5  $\mu$ mol/L, 24 hours), then RhoA activity in THP-1 macrophages was determined using RhoA pull-down assay, as described in Methods (blots are representative of 3 separate experiments). **D**, THP-1 macrophages were incubated in the presence (+) or absence (-) of C3 exoenzyme (30  $\mu$ g/ml, 48 hours), then the expression of apoB48R on THP-1 macrophages was detected with immunoblotting (blots are representative of 3 separate experiments). **E**, THP-1 macrophages were preincubated as in (D) and then incubated with (+) or without (-) RLP (20 mg chol/dl, 24 hours). Photos are representative oil red O staining results of 3 separate experiments. Bar graphs show cellular lipid contents in THP-1 macrophages ( $n=3$ ). \* $P<0.05$  vs C3(-), RLP(-); # $P<0.05$  vs C3(+), RLP(+).

apoB48R expression and lipid accumulation induced by RLPs in human peripheral blood macrophages (Figure 1, available online at <http://atvb.ahajournals.org>), which were similar to the effects seen in THP-1 macrophages.

## Discussion

It is known that excessive RLPs enter vascular walls, where they are taken-up by macrophages and induce foam cell formation in those cells. TRL remnants are found in atherosclerotic plaques;<sup>18</sup> however, the mechanisms by which RLPs

induce foam cell formation have not been fully elucidated. The LDL receptor, known to bind RLPs, nearly disappears during the differentiation of monocytes into macrophages, whereas apoB48R is constantly present during the differentiation process, in striking contrast to LDL receptor families. Because apoB48R is detected in the reticulo-endothelial system, but not in hepatic cells, we focused on this unique remnant receptor and examined its role in RLP-induced macrophage foam cell formation. ApoB48R is found in human atherosclerotic plaques,<sup>7</sup> suggesting its involvement in the uptake of TRLs by macrophages. ApoB48R binds the apoB48 of dietary TRL (CM and CM remnant) or the apoB48-equivalent domain of apoB100 in hypertriglyceridemic VLDL.<sup>17</sup> Dietary TRLs, which lack the C-terminal domain of apoB100 that binds to the LDL receptor, cannot bind to the LDL receptor via apoB48, the major apoB species formed in the intestine. Thus, apoB48R may account for, at least in part, the observed direct macrophage uptake of TRLs in vivo and for foam cell formation seen in humans with elevated TRLs.<sup>19,20</sup>

The present results showed that gene silencing of apoB48R by siRNA directly leads to a successful inhibition of RLP-induced foam cell formation. Because apoB48R is an apoE-independent receptor in human and murine monocyte-macrophages,<sup>21,22</sup> we conducted experiments using  $\beta$ -VLDL devoid of apoE, which were also able to induce macrophage foam cell formation. Interestingly, the effect of apoB48R siRNA was more prominent in the case of  $\beta$ -VLDL treatment. Taken together, our findings indicate that apoB48R is involved in the uptake of RLP and foam cell formation, independent of an apoE-mediated pathway. Further, because the expression levels of apoB48R do not diminish after the cells accumulate extensive lipids, macrophages may allow further uptake of these lipoproteins by this pathway, as is the case with scavenger receptors. The relatively low affinity of nascent VLDL for apoB48R may account for the fact that they do not induce monocyte foam cell formation.

We also showed that pitavastatin inhibits RLP-induced foam cell formation. The expression levels of remnant receptors in THP-1 macrophages in the presence of pitavastatin were examined. Neither LDL receptor nor LRP were detected in those macrophages after treatment, indicating that pitavastatin does not affect the differentiation process once THP-1 cells have fully differentiated into macrophages. In the present study, the expression level of apoB48R was significantly reduced by treatment with pitavastatin and it also significantly reduced foam cell formation induced by RLP or  $\beta$ -VLDL loading.

Further, the effect of pitavastatin on other receptors related to RLP uptake was also examined. Pitavastatin did not affect LDL receptor and LRP. CD36, a scavenger receptor considered to be involved in atherogenic lipoprotein uptake, is also reported to be modulated by pitavastatin.<sup>23</sup> However, the effect of pitavastatin on CD36 was relatively small at the concentrations used in the present study, compared with its effect on apoB48R. It has been reported that statins have no effect on acyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) activity<sup>24</sup> and downregulate rather than upregulate ABCA1 in macrophages in vitro.<sup>25</sup> Considering that the gene silencing of apoB48R by siRNA significantly reduced RLP-induced foam cell formation (Figure 3), we believe that apoB48R is involved in the uptake of RLPs and that pitavastatin

decreased RLP uptake by macrophages at least in part by modulating apoB48R-dependent mechanism, although yet-unknown mechanism(s) may be involved in this process.

It is known that statins downregulate GGPP, an isoprenoid intermediate. Isoprenoids are important for post-translational modification of proteins, such as the small GTP-binding proteins. It has been reported that many of the cholesterol-independent effects of statins may be mediated by the inhibition of Rho GTPase. Thus, in the present study, we investigated whether apoB48R expression is modulated by RhoA-dependent pathway. The pitavastatin-mediated reduction of apoB48R expression was restored in the presence of GGPP, which bypass the HMG-CoA reductase-RhoA pathway. Moreover, C3 exoenzyme, a specific RhoA inhibitor, reduced apoB48R expression. Therefore, it may be possible that RhoA plays a role as a positive regulator of apoB48R expression and that pitavastatin decreases apoB48R expression by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA.

The regulation of apoB48R expression remains unclear, although peroxisome proliferator-activated receptors were recently reported to inhibit apoB48R expression.<sup>26</sup> As shown in Figure 2, apoB48R was not regulated by sterol content or the state of differentiation of human and murine monocyte-macrophages. Our results are the first to show that pitavastatin suppresses apoB48R via a RhoA-dependent mechanism, independent of sterol content or state of differentiation. Further, we found that pitavastatin decreased the expression of apoB48R in human peripheral blood macrophages and RLP-induced foam cell formation. Based on these findings, we considered that this mechanism also potentially occurs in vivo.

In conclusion, our data indicate that foam cell formation induced by RLP is, at least in part, mediated by an apoB48R-dependent pathway. Therefore, apoB48R may be a novel therapeutic target for atherogenesis, particularly in hypertriglyceridemic patients.

### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge support (10178102) and special coordination funds from the Ministry of Education, Science, Technology, and Culture of Japan. We also thank Dr Gianturco and Dr Bradley for providing the rabbit anti-human apoB48R antibody. The authors express their sincere appreciation to Naoko Tomie, Keiko Takahashi, and Noriko Nitta for their technical assistance.

### References

- McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, Schaefer EJ. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2001;154:229–236.
- Karpe F, Taskinen MR, Nieminen MS, Frick MH, Kesaniemi YA, Pasternack A, Hamsten A, Syvanne M. Remnant-like lipoprotein particle cholesterol concentration and progression of coronary and vein-graft atherosclerosis in response to gemfibrozil treatment. *Atherosclerosis*. 2001;157:181–187.
- Kawakami A, Tanaka A, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M. Atorvastatin attenuates remnant lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelium under flow conditions. *Circ Res*. 2002;91:263–271.
- Kawakami A, Tanaka A, Chiba T, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circulation*. 2003;108:2679–2688.
- Gianturco SH, Bradley WA, Gotto AM, Jr, Morrisett JD, Peavy DL. Hypertriglyceridemic very low density lipoproteins induce triglyceride synthesis and accumulation in mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest*. 1982;70:168–178.
- Fujioka Y, Cooper AD, Fong LG. Multiple processes are involved in the uptake of chylomicron remnants by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res*. 1998;39:2339–2349.
- Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:7488–7493.
- Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*. 1998;97:1440–1445.
- Yoshida M, Sawada T, Ishii H, Gerszten RE, Rosenzweig A, Gimbrone MA, Jr., Yasukochi Y, Numano F. Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1165–1171.
- Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, Tanaka A, Tada N, Nakamura H, Campos E, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunofluorescence mixed gels. *Clin Chim Acta*. 1993;223:53–71.
- Koite L, Bergeron N, Havel R. Quantification of apolipoproteins B-100, B-48, and E in human triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res*. 1995;36:890–900.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411:494–498.
- Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, Miyagishi M, Taira K, Isobe M, Mizusawa H, Yoshida M. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310:1062–1066.
- Fisher TL, Terhorst T, Cao X, Wagner RW. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:3857–3865.
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J*. 1999;18:578–585.
- Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5810–5814.
- Gianturco SH, Ramprasad MP, Song R, Li R, Brown ML, Bradley WA. Apolipoprotein B-48 or its apolipoprotein B-100 equivalent mediates the binding of triglyceride-rich lipoproteins to their unique human monocyte-macrophage receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:968–976.
- Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, Kotite L, Kunitake ST, Havel RJ, Kane JP. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1767–1774.
- Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Fainaru M, Brecht WJ, Lindquist PA. Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. Factors that modify tissue-specific uptake. *J Biol Chem*. 1989;264:9571–9582.
- Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Inerarity TL. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem*. 1989;264:17931–17938.
- Gianturco SH, Lin AH, Hwang SL, Young J, Brown SA, Via DP, Bradley WA. Distinct murine macrophage receptor pathway for human triglyceride-rich lipoproteins. *J Clin Invest*. 1988;82:1633–1643.
- Gianturco SH, Ramprasad MP, Lin AH, Song R, Bradley WA. Cellular binding site and membrane binding proteins for triglyceride-rich lipoproteins in human monocyte-macrophages and THP-1 monocytic cells. *J Lipid Res*. 1994;35:1674–1687.
- Han J, Zhou X, Yokoyama T, Hajjar DP, Gotto AM, Jr., Nicholson AC. Pitavastatin downregulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *Circulation*. 2004;109:790–796.
- Cignarella A, Brennhansen B, von Eckardstein A, Assmann G, Cullen P. Differential effects of lovastatin on the trafficking of endogenous and lipoprotein-derived cholesterol in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1322–1329.
- Sone H, Shimano H, Shu M, Nakakuki M, Takahashi A, Sakai M, Sakamoto Y, Yokoo T, Matsuzaka K, Okazaki H. Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316:790–794.
- Haraguchi G, Kobayashi Y, Brown ML, Tanaka A, Isobe M, Gianturco SH, Bradley WA. PPAR(alpha) and PPAR(gamma) activators suppress the monocyte-macrophage apoB-48 receptor. *J Lipid Res*. 2003;44:1224–1231.

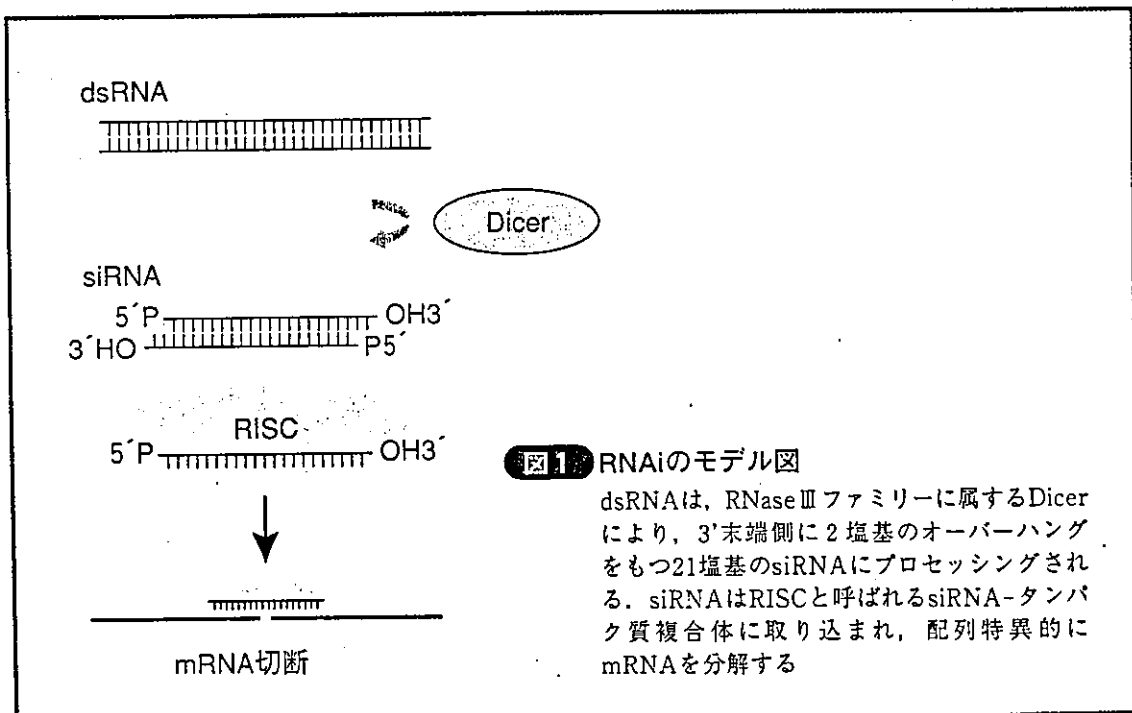
# 1 章 RNAi法の基礎知識—原理とメカニズム

## 1 RNAiのメカニズム

明石英雄 宮岸 真 川崎広明 多比良和誠

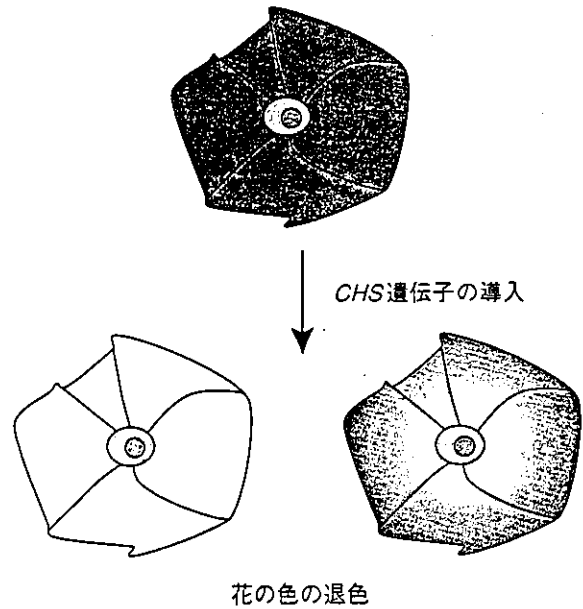
### ✦ はじめに：RNAiとは何か

1998年、最初に線虫で報告されたRNA interference (RNAi, RNA干渉) は、二本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA) によってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である<sup>1)</sup> (図1)。その後、RNAiは、線虫を含め、昆虫、植物、菌類などのさまざまな生物種間で保存されている現象であることが示され、生物共通の核酸レベルの防御システムであることが示唆されている<sup>2)</sup>。RNAiを利用したノックダウン法は、簡便であり、しかも遺伝子発現の抑制に大きな効果が期待できるため、非常に話題を呼んでおり、近年、おびただしい数の文献が発表されてきている。当初、哺乳動物細胞への応用は難しいとされてきたが、最近、哺乳動物細胞に対する応用方法も確立されつつあり、医療分野にも大きく期待されるものとなってきた<sup>3)</sup>。本項では、このRNAiと呼ばれる興味深い現象について、その原理と生物学的役割について概説したい。



## 図2 CHS遺伝子のコサプレッションによる花の色の退色

センスCHS遺伝子を導入すると、その外来CHS遺伝子が働かないばかりか、内在のCHS遺伝子もコサプレッションにより抑制され、花の色の退色が起こる。不思議なことに、CHS遺伝子の転写は通常通り行われていたが、mRNAの蓄積は見られなくなった。そのため、外来遺伝子に対応するmRNAのみが、転写後何らかの機構で選択的に分解されていることが示唆された



## RNAを介したサイレンシング

遺伝子の発現が何らかの形で抑制されることを、遺伝子のサイレンシングという。サイレンシングは、転写時サイレンシング (Transcriptional gene silencing: TGS) と転写後サイレンシング (Post-transcriptional gene silencing: PTGS) の大きく2種類に分けられる。TGSは、DNAからmRNAが転写されなくなることによってサイレンシングを起こす現象で、遺伝子のメチル化やクロマチンの構造変化などが関わっているといわれている。PTGSは、転写は通常通り行われるが、mRNAが何らかの原因で分解されるか、あるいは翻訳が阻害されることにより、遺伝子の発現が抑えられる現象である。

遺伝子のサイレンシングは、その研究背景の違い、生物種によって異なった呼び名で呼ばれてきた。植物、線虫、ショウジョウバエで、内在の遺伝子と相同性のある遺伝子またはその遺伝子の一部を導入し、その発現が抑えられることは、コサプレッション (Co-suppression: 共抑圧という意味) と呼ばれる。コサプレッションは、その相同配列がプロモーターあるいは転写調節配列である時はTGS、転写領域である時はPTGSレベルで起こる。ケリング (Quelling: 鎮圧という意味) は、菌類の同様な現象で、PTGSレベルで起こる。

RNAを介したサイレンシングの現象として最初に報告されたのは、1990年、植物のカルコン合成酵素 (CHS) 遺伝子のコサプレッションであると思われる (図2) <sup>4) 5)</sup>。カルコン合成酵素は、花の色の主要な成分であるアントシアニンを合成するために、重要な働きをする酵素として知られている。濃い花の色を作り出すために導入したCHS遺伝子によって、内在のCHS遺伝子の発現が抑制され、逆にまだらに色が抜けたり、白い花ができるというこの不思議な現象は、長い間その機構はわからなかった。どうやってサイレンシングされる遺伝子とサイレンシングされない遺伝子を見分けているのであろうか?

その導入した遺伝子を詳細に解析した結果、回文配列 [ある同じ配列がお互いに逆向きにつながっているもの (Inverted repeat)] が関係していること<sup>6)</sup>、遺伝子のメチル化をしばしば伴っていること<sup>7)</sup>、CHS mRNA内部の二重鎖を形成する部分の分解物が関与していること<sup>8)</sup>などが明らかにされてきた。これらの現象の解明に重要な鍵を与えたのが、線虫における二重鎖RNA (dsRNA) によるRNAiの報告<sup>1)</sup>、および1999年のBaulcombeのグループによる、コサプレッションを起こしている植物にだけ25塩基前後の小さなセンスおよびアンチセンスRNAが含まれているとい

う報告<sup>9)</sup>であった。コサプレッションとして報告されているものには、RNAiに見られる現象と非常に類似したものが多く観察されており、また共通の因子が関与していることが明らかになっている。

## RNAiの発見

RNAiは、dsRNAによってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。dsRNAによって遺伝子のサイレンシングができることが最初にわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、GuoとKemphuesは*par-1*と呼ばれる遺伝子をアンチセンスRNAで抑制する実験を行った<sup>10)</sup>。アンチセンスRNAをインジェクションすると、予想通り*par-1*の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンスRNAも同様に*par-1*の発現を抑制し、*par-1*変異株の表現形を示した。多くの研究者がこの矛盾に関心を示した。

1998年に、FireとMelloらによってその謎が解き明らかされた<sup>11)</sup>。アンチセンスRNAとセンスRNAを、それぞれRNAポリメラーゼを用いて試験管内で合成する時、ほんの少しであるが非特異的に逆向きのRNAができてしまう。そのコンタミネーションによってできるdsRNAが遺伝子サイレンシングの本体であったのである。Fireらはゲル電気泳動で精製したアンチセンスRNAおよびセンスRNAは遺伝子の発現を抑制できないこと、また、アンチセンスRNAとセンスRNAをアニールさせたdsRNAが非常に効率よく遺伝子の発現を抑制できることを明らかにした。

その後、RNAiは線虫をはじめ、トリパノソーマ、ヒドラ、プラナリア、菌類、ショウジョウバエ、植物などのさまざまな生物細胞種において効果的な遺伝子発現ノックアウト法として用いられてきており、また詳細な機構もここ1、2年でしだいに明らかになりつつある<sup>11)</sup>。これまで観察されたRNAiの一般的な性質として、遺伝子の抑制効果はその二重鎖領域の長さに依存する、ということがある<sup>12)</sup>。100塩基対 (base pair: bp) 以下

のdsRNAは効果が低く、500 bp程度以上あれば90%程度標的遺伝子の発現を抑える。また、配列特異性はほぼ厳密であるが<sup>13)</sup>、相同性が高く同じ配列をもったmRNAはもちろん分解される。

## RNAiのメカニズム解明に向けて -RNAiの配列特異性を担う siRNA

Tuschl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*の系を構築し<sup>14)</sup>、RNAiのメカニズム解明に関連する非常に重要な一連の実験を行った。長いdsRNAが21~23塩基のRNAに分解されることを観察し、それらの分解されたRNAによりターゲットmRNAが21~23塩基の間隔で切断されることを示した<sup>15)</sup>。このRNAの長さは、18~24塩基にわたっていたが、ほぼ80%が21~23塩基であった。このことから、21~23塩基のRNAがターゲット配列認識のためのガイドRNAとして働いていることが示唆され、それは実際に、化学合成した21~22 bpのdsRNAを用いて、ターゲットmRNAの切断が行われることにより示された<sup>14)</sup>。またそのガイドRNAは、TuschlらによりsiRNA (short interfering RNA) と名付けられた。

siRNAの配列特異性は非常に高く、21塩基中わずか数個の配列のミスマッチにより、効果はほとんど見られなくなった。siRNAの長さは21塩基、オーバーハングは2塩基のものが最も効果が高く、4塩基以上のオーバーハングは効果がほとんど見られなかった。標的mRNAの切断サイトは、siRNAのガイドRNA側の5'末端側から正確に10~11塩基のところであり、siRNAにより厳密に制御されていた<sup>16)</sup>。

生成したsiRNAには、5'末端側にモノリン酸と3'末端側に水酸基が存在した。化学合成したsiRNAは、通常5'末端、3'末端とも水酸基である。この5'末端水酸基のsiRNAでも有効であり、5'末端リン酸基のsiRNAの方が、若干効果が高いか同程度であった<sup>16) 17)</sup>。詳細に検討すると、合成siRNAの5'末端水酸基は、胚抽出物中で速やかにリン酸化された。リン酸化を防ぐため、5'末端をメトキシ基 (CH<sub>3</sub>O) にすると、RNAi効果は完全

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<sup>18)</sup>。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<sup>16) 19)</sup>。

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<sup>20) ~22)</sup>。

## 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<sup>13)</sup>。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<sup>23)</sup>。線虫<sup>24)</sup>、ヒト<sup>25)</sup>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<sup>23)</sup>。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<sup>26)</sup>。またゼブラフィッシュ<sup>27)</sup>、マウス<sup>28)</sup>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3 a)。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Mg<sup>2+</sup>依存的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<sup>29)</sup>。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3 a) 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<sup>30)</sup>、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<sup>23) 31)</sup>、2つのRNase III領域 (R III a, R III b領域)、dsRBDをもつ、およそ200 kDの非常に大型のRNase IIIである<sup>23)</sup> (図3 a)。dsRNAはDicerにより、末端部から21塩基のsiRNAに分解される<sup>32)</sup>。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<sup>30)</sup>。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 III a, R III b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 III a, b領域が単独でRNase活性をもつことが明らかになった<sup>33)</sup>。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<sup>34)</sup>。最近の研究によると、PAZ領域は一本鎖RNAおよび二本鎖

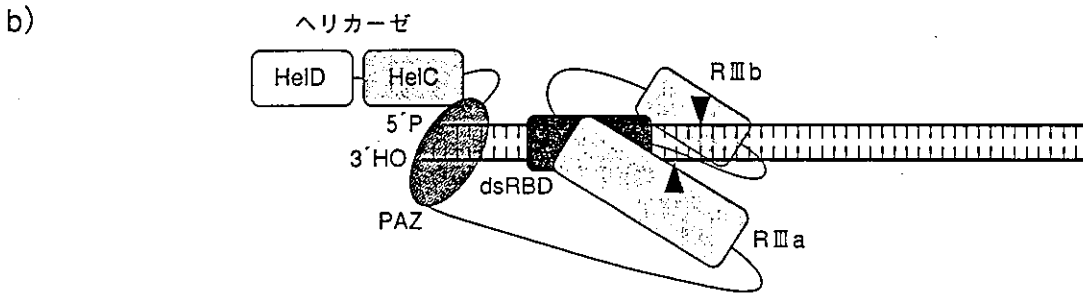
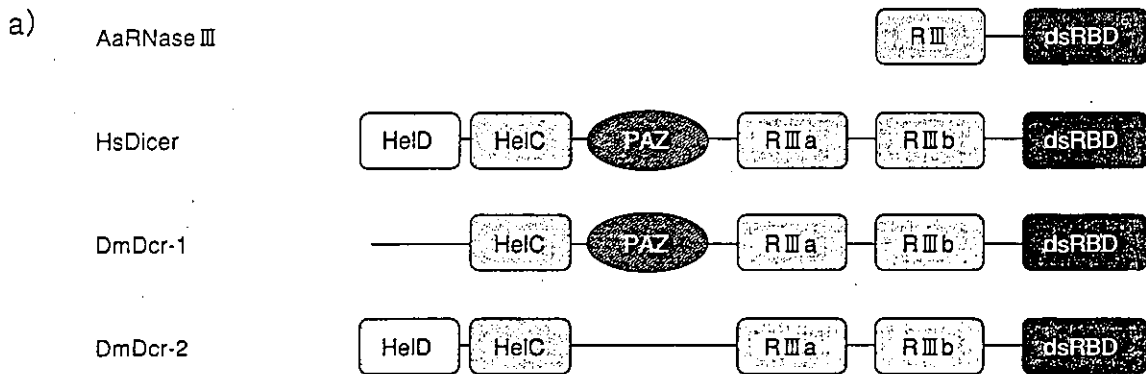


図3 DicerによるdsRNA認識のモデル図

- 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, 安定化されると考えられている (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<sup>35) ~38)</sup>, 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<sup>33) 36) 37) 39) 40)</sup> (図3b)。

### RNAiに関連するその他の遺伝子

主にアカパンカビ (*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<sup>41)</sup>。

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

ONAUITE-2と名付けられた<sup>42)</sup>。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, アカパンカビで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<sup>43)</sup>。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, アカパンカビQDE-1, シロイヌナズナ

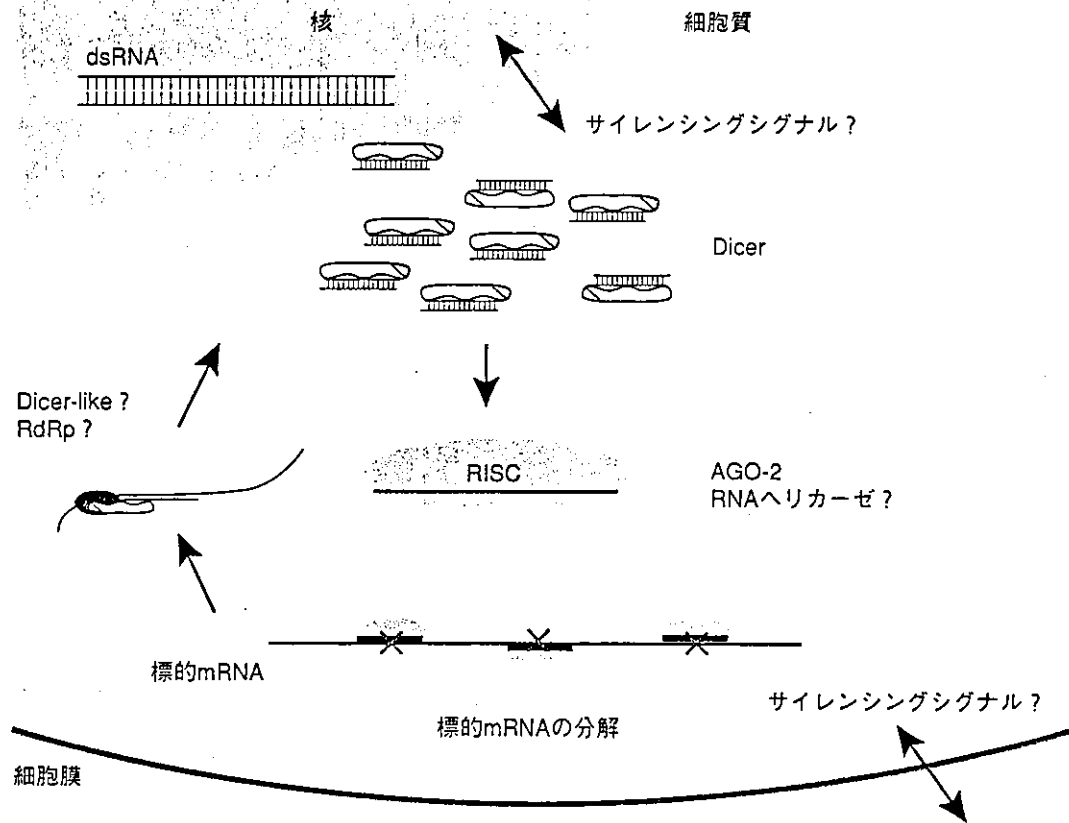


図4 RNA経路と関わるタンパク質のモデル図

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<sup>44)</sup>。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)<sup>45)~48)</sup>。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<sup>49)</sup>、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<sup>19)~21)</sup>、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<sup>19)~21) 50)</sup>、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<sup>51)</sup>。線虫DRH-1 (DICER RELATED HELICASE), DRH-2<sup>52)</sup>, MUT-14 (MUTATOR)<sup>47)</sup>, SMG-2, シロイソナズナSDE-3, アカバシバ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Dmp68<sup>53)</sup> が見つかった。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<sup>2) 54)</sup>。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<sup>34)</sup>。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<sup>42) 55)</sup>。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<sup>56)</sup>、siRISC活性を示さない250 kDの複合体画分に存在した<sup>55)</sup>。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<sup>53)</sup>。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<sup>53) 55)</sup>。

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<sup>18)</sup>。しかし、この活性型RISCは、精製過程でほかの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<sup>57) 58)</sup>。

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<sup>59)</sup>。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<sup>57) 58) 60)</sup>。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<sup>57) 58)</sup>。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<sup>57) 58) 60)</sup>、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<sup>58)</sup>。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<sup>58)</sup>。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<sup>21)</sup>。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<sup>43)</sup>。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<sup>61) 62)</sup>、以降eIF2C1, eIF2C2をそれぞれhAGO1, hAGO2と呼ぶ<sup>43)</sup>。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<sup>63)</sup>。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<sup>21)</sup>。

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<sup>39)</sup>。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Mg<sup>2+</sup>依存の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<sup>64)</sup>。RISC活性はMg<sup>2+</sup>依存性であり<sup>65)</sup>、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<sup>66)</sup>。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<sup>-/-</sup>) マウス線維芽細胞 (mouse embryo fibroblast: MEF) 株を樹立した。Ago2<sup>-/-</sup>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<sup>71)</sup>。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) が発生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<sup>24)</sup>。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。

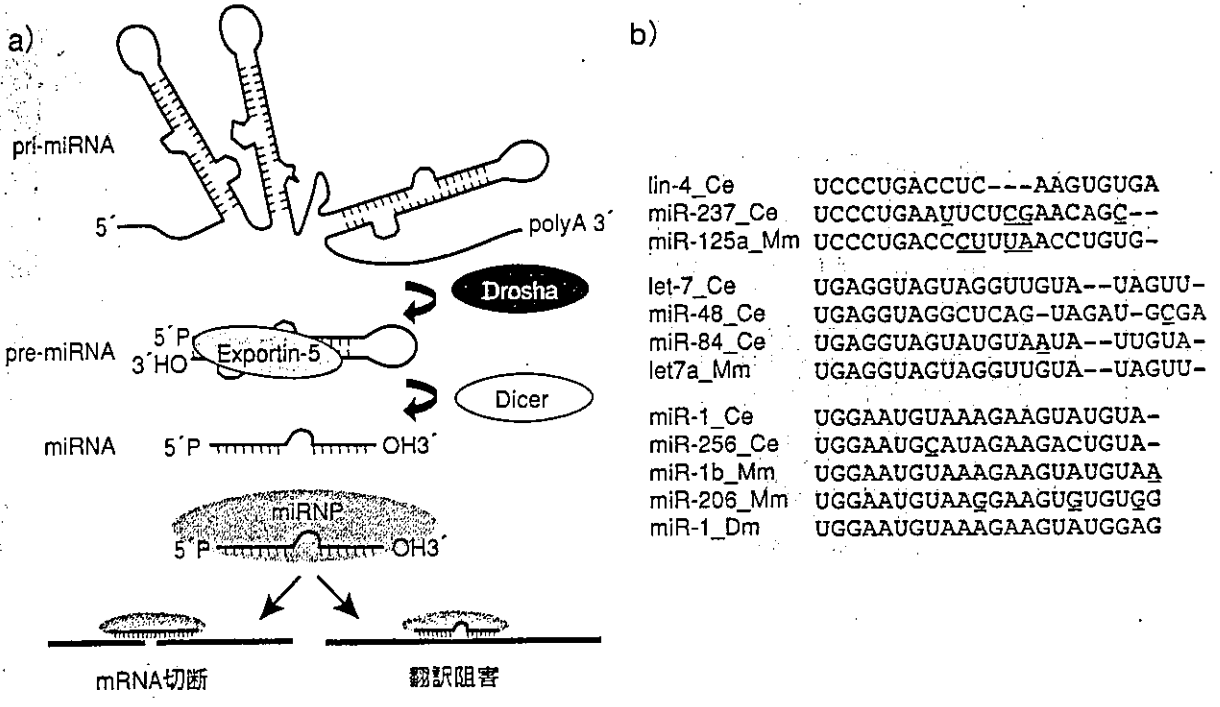
## ■ 内在のsiRNA/miRNAファミリー

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<sup>70)</sup>。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<sup>69) 75)</sup>。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<sup>78) ~80)</sup> (2章-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應用され、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<sup>81) ~91)</sup>。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<sup>91)</sup>。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<sup>92)</sup>。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<sup>93) ~96)</sup>。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<sup>87)</sup>。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<sup>97)</sup>。後に、RISCが、hAGO2, GEMIN3, GEMIN4と共沈することが報告された<sup>98)</sup>。



**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<sup>99) 100)</sup> (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<sup>101)</sup>。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<sup>98)</sup>。

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<sup>102)</sup> (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<sup>103)</sup>。

最近、ヒトウイルスにコードされているmiRNA<sup>104)</sup>、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<sup>105)</sup>。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<sup>106)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>107)</sup>。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<sup>108)</sup>。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<sup>109)</sup>。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を示された<sup>48)</sup> <sup>110)</sup>。RdRpである *sgs2/sdel*、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<sup>111)</sup> <sup>112)</sup>。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<sup>113)</sup>。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<sup>114)</sup>。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<sup>48)</sup>。

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<sup>115)</sup>。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<sup>116)</sup>。その数は10種類以上にのぼり<sup>117)</sup>、siRNAの蓄積<sup>118)</sup>、RISCへの取り込み<sup>119)</sup> ~<sup>123)</sup>、SASシグナル<sup>124)</sup>、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<sup>125)</sup>。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

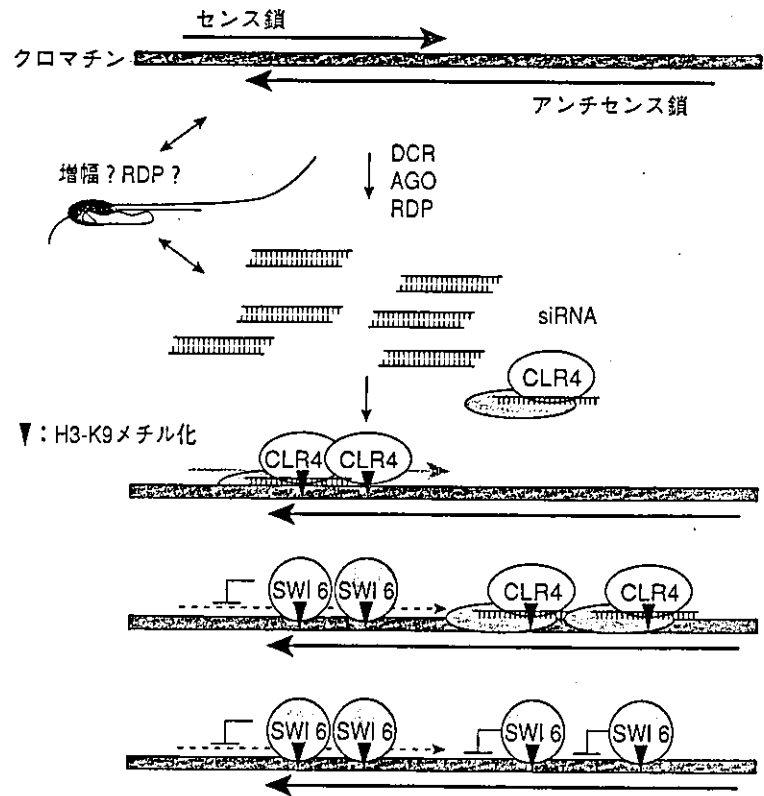
最近、小さなRNAを介するが、mRNA切断あるいは翻訳阻害ではない、新たな現象が分裂酵母、テトラヒメナから報告された。以下、および次の「その3」では、RNAi経路がゲノムのダイナミックな編成に関わっていることを窺わせる現象を概説したい。

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はヒストンに堅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<sup>126)</sup>。

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<sup>127)</sup>．

これまで，例えば，植物のdsRNA配列特異的なDNAメチル化<sup>7) 128)</sup>，線虫でトランスポソンの沈静化あるいはポリコムグループタンパク質とRNAi経路の関連<sup>129)</sup>，マウスにおけるH3-K9メチル化とそれに伴うRNAの存在<sup>130)</sup> 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<sup>131)</sup>．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) <sup>132) 133)</sup>．

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<sup>137)</sup>。 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<sup>143)</sup>、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<sup>137)</sup>。

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もち、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<sup>138)</sup>。

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<sup>144)</sup>。

## ❑ 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<sup>63) 145)</sup> やマイクロアレイなどの方法を利用して<sup>146) 147)</sup>、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) Metzloff, M. et al. : *Cell*, 88 : 845-854, 1997
- 9) Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. : *Science*, 286 : 950-952, 1999
- 10) Guo, S. & Kemphues, 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) Boutla, 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) Blaszczuk, 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) Holen, 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) Houbaviv, 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



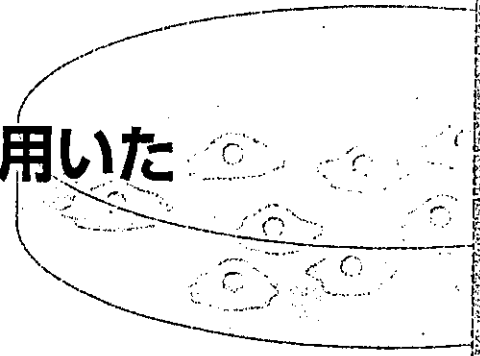


- 95) Yi, R. et al. : *Genes Dev.*, 17 : 3011-3016, 2003
- 96) Gwizdek, C. et al. : *J. Biol. Chem.*, 278 : 5505-5508, 2003
- 97) Paushkin, S. et al. : *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14 : 305-312, 2002
- 98) Hutvagner, G. & Zamore, P. D. : *Science*, 297 : 2056-2060, 2002
- 99) Rhoades, M. W. et al. : *Cell*, 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) Madireddi, 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

## 6 哺乳類細胞

### 2) tRNAプロモーターを用いた siRNA発現システム

川崎広明 多比良和誠

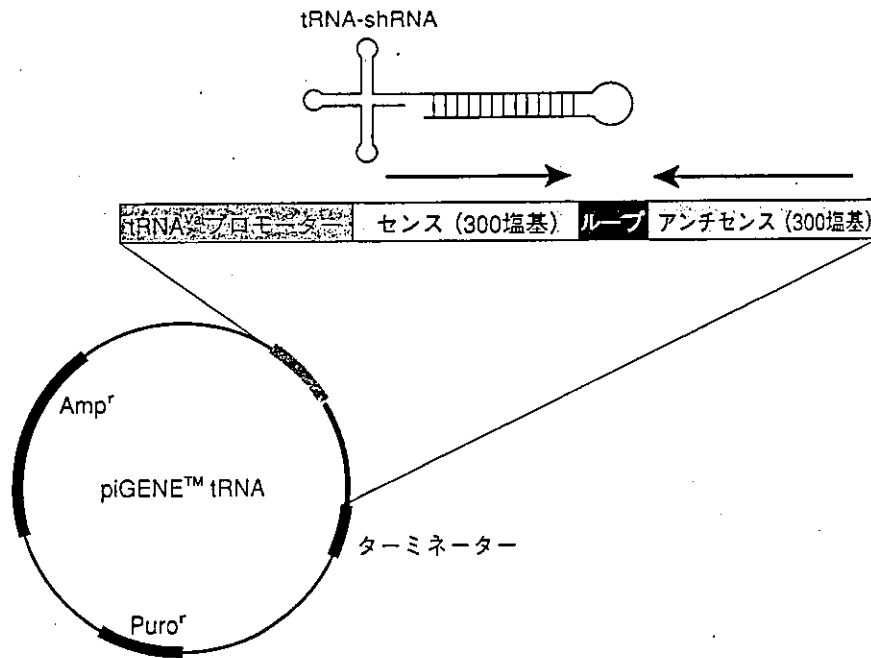


#### はじめに

二本鎖RNAが誘導する遺伝子サイレンシングは広義の意味でRNAiと呼ばれており、線虫、ショウジョウバエ、植物においてよく研究されている<sup>1)~3)</sup>。一方、哺乳動物細胞では、長鎖の二本鎖RNAがdsRNA依存的プロテインキナーゼ (PKR) を活性化することが知られており、RNAiの存在については悲観的であった。ところが、RNAiを誘導する活性化分子が22~23塩基の二本鎖RNA (siRNA) であることがわかり、合成のsiRNAを哺乳動物細胞に導入するとPKRを活性化せずに効果的なRNAiを誘導することがわかった<sup>2)~4)</sup>。この発見は分子生物学において一つのブレイクスルーとなり、今日多くの研究者が合成siRNAを用いて遺伝子の機能解析やウイルスや癌などの疾患に関する研究を行っている。しかし、これらの研究において細胞内で長期的にsiRNAの効果を持続させたい場合、合成siRNAでは明らかに不利であると思われる。

そこで多くの研究グループが、siRNA発現ベクターの開発を試みた<sup>5)~7)</sup>。siRNA発現ベクターのプロモーターとしては、短いRNAを発現させるのに有利であることからPol IIIプロモーターが採用されている。その中でもU6やH1プロモーターが用いられ、dsRNAの発現タイプとしては、タンデムタイプとステムループタイプが用いられている。一方RNAiは、われわれと他グループの研究から細胞質で起こることが明らかとなった<sup>7)~9)</sup>。ここで先にあげた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おり、RNAiを誘導させるには何かしらの方法で細胞質に輸送する必要がある。例えばループ配列などをマイクロRNAのモチーフに設計することで転写産物を細胞質に輸送することは可能であるが<sup>7)</sup>、この構造が同様の構造を形成するプレカーサーmicroRNAの輸送に対してドミナントネガティブに働き、発生・分化に影響を与える可能性も考えられる。

そこでわれわれは、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ので紹介したい。



**図1** piGENE™ tRNAベクターの構造

tRNAプロモーターの下流にステムループ型のdsRNAをコードする遺伝子配列を連結している。ステムの長さは、センス、アンチセンスともに30塩基である。ループの長さは約12塩基程度であり、Xho I サイトが導入してある

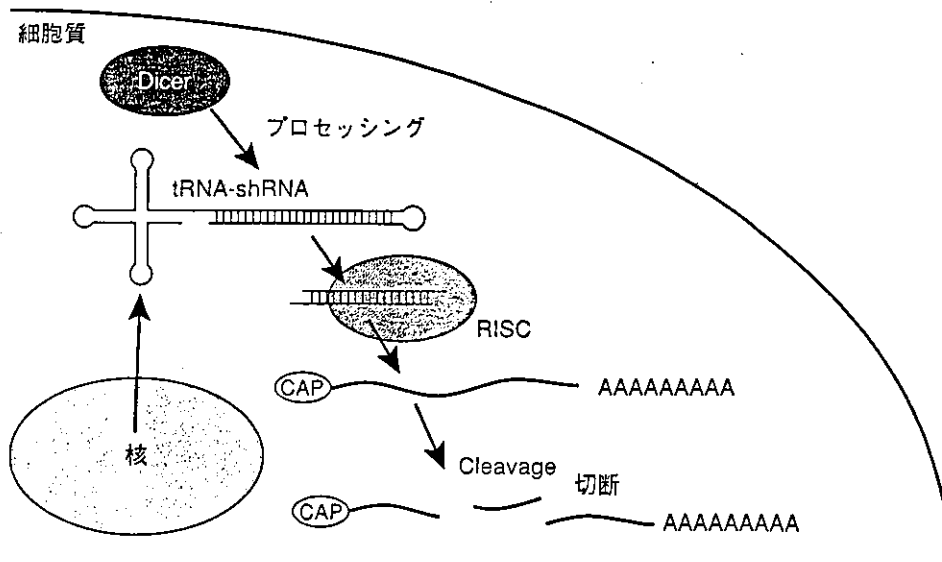
## ■ tRNAプロモーターの特徴

- ・転写産物が細胞質に局在する
- ・U6プロモーターの場合では、ヒトの細胞を用いる時にはヒトのU6プロモーターを、マウスの細胞の時はマウス由来のU6プロモーターを用いた方がより効果的な抑制効果を期待できるが、このヒト由来のtRNAプロモーターの場合では、ヒトとマウスの両方で共通の抑制効果が見られる。
- ・U6プロモーターの場合では、転写開始がGで始まるため、設計の段階でGまたはA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

われわれは、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。その理由としては、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、リボザイムの細胞内効果を機能させるために非常に有益であった<sup>10)</sup>。

## ■ 原理と概略

tRNAプロモーターを用いたステムループ型siRNA発現ベクター (piGENE™ tRNA) の構造を図1に示す。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



**図2 piGENE™ tRNAベクターのRNAi誘導システム**

piGENE™ tRNAベクターのRNAi誘導システムとしては、まず転写されたtRNA-shRNAが細胞質に輸送される。その後tRNA-shRNAは、Dicerによって短く切断されて、siRNAが生成する。このsiRNAは、RISCに取り込まれ標的RNAの切断を導く

送されてDicerに認識される(図2)。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。Dicerによって切断されたsiRNAはRISCによって取り込まれアンチセンス鎖のみとなる。このsiRNA-RISC複合体が標的mRNAを切断する。

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<sup>3)</sup>、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。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。siRNAの標的配列として他遺伝子と相同性の低い領域を選択することで特異的に標的遺伝子をノックダウンすることが可能である。それでは、tRNAプロモーターを用いたsiRNA発現ベクターを構築してみよう。

**準備するもの**

- ・ piGENE™ tRNAプラスミド：株式会社iGENEより市販
- ・ ステムループ遺伝子のテンプレート：以下の一本鎖DNAを合成する  
 5'-標的のセンス鎖 (30 mer)-AAAAC TCGAGAAAA (ループシークエンス *Xho*I サイトを含む)-標的のアンチセンス鎖 (30 mer)-GGT ACC CCG GAT ATC TTT TTTT-3'  
 例えば、テロメラーゼ遺伝子の場合  
 5'-GTGCAGTTACCTGTCCAACATGGTGACC-AAAAC TCGAGAAAA-GGTCAC-CGTGTTGGGCAGGTAGCTGCGCACGGTACCCCGGATATCTTTT-3'
- ・ siRNA増幅用プライマー  
 Forward primer (テンプレート配列により配列変更が必要)  
 5'-CCAACTTTGAGCTC (全てに共通：Sac I サイト入り)-(標的のアンチセンス鎖20 mer)-3'