

Fig. 2 Persistence of RNAi activity in mouse postmitotic neurons (a) and during myogenic differentiation of mouse C2C12 cells (b). The Photinus and Renilla luciferase genes and synthetic siRNA duplexes against the Photinus luciferase gene or a non-silencing siRNA duplex as a control were cotransfected into cells. RNAi activity was examined by a dual-luciferase assay at various days after transfection up to 3 weeks. Open and solid bars indicate the data in the presence of the non-silencing siRNA duplex and siRNA duplex conferring RNAi, respectively.

eIF2C3そしてeIF2C4遺伝子の発現も筋肉組織(細胞)で低いことを見出した。そして、そのようなRNAiに関連する遺伝子の発現が低い筋肉細胞であっても、RNAiが誘導されることを単離した筋線維細胞を用いて証明した¹¹⁾。

一方、細胞増殖の観点から見た場合、神経細胞や筋肉細胞は、最終分化を完了し、細胞分裂を停止した細胞として捉えることができる。一般的に、増殖している(細胞分裂を繰り返している)哺乳動物細胞に合成siRNA二量体を導入してRNAiを誘導した場合、そのRNAi活性は一時的で、だいたい2~4日間ぐらい強い活性が維持され、その後は、細胞分裂の回数の増加と共にRNAi活性は次第に消えてゆく。これは、siRNA導入によって細胞内に成立した活性型RISCの一細胞当たりの数が、細胞分裂に伴って減少するためと考えられている。では、神経細胞や筋肉細胞のような細胞分裂を止めた細胞ではどうであろうか? これに答えるために、われわれは、ホタル・ルシフェラーゼレポーター遺伝子とそれをターゲットとする合成siRNA二量体を使ったRNAi誘導系を用いて、哺乳動物細胞のRNAi活性の持続性について解析した。その結果、哺乳動物神経

細胞では、誘導した強いRNAi活性が少なくとも3週間にわたって持続することを見出した(Fig. 2a)¹²⁾。それに対して、筋肉細胞に分化させたマウスC2C12細胞を用いた実験では、誘導したRNAi活性は誘導後1週間ほど持続し、その後、徐々に活性を失っていった(Fig. 2b)¹³⁾。これらの結果から、哺乳動物のRNAi活性の持続性は、細胞間や組織間で違いがあることが示された。上記でも述べたように、神経細胞・組織や筋肉細胞・組織でRNAiを応用する場合、これらの知見、すなわち、これらの細胞におけるRNAiの特徴は有用な情報になると考えられる。

III. 治療に向けたRNAi応用の課題

培養細胞を用いた*in vitro*の実験でRNAiを強く誘導するsiRNA二量体を選定できても、実際にそれらを使った個体レベルでのRNAi誘導となると更にいくつかの問題を解決しなければならない。そのような問題点を挙げてみると、1) siRNA二量体の生体内での安定性、2) siRNA二量体の目的組織・細胞へのデリバリー、3) RNAi活性の持続性などが挙げられる。これらについて、まず、siRNA二量体の生体内、特に血清内での安

定性については、siRNAの化学修飾などによってその安定性を向上させることが可能になってきている。また、長期間のRNAi活性のためには、合成siRNA二量体を使ったRNAi誘導ではなく、shRNAを発現させる発現ベクターを使ったRNAi誘導法が用いられてきている。これらのRNAi誘導法やその活性の維持については、それぞれの対象や目的にあった方法を選択することが望ましいと考える。さて、今後最も必要とされている技術は、siRNA二量体（shRNA発現ベクターも含む）の目的細胞・組織へのデリバリーである。このデリバリーシステムの確立が、*in vivo* RNAiの応用の実現に必須であり、今後この方面での発展が大いに望まれる。

謝辞：本稿執筆の機会を与えていただきました国立精神・神経センター、神経研究所、武田伸一郎長に感謝いたします。

文 献

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery MK et al : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 : 806-811, 1998
- 2) Vaucheret H, Beclin C, Fagard M : Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* 114 : 3083-3091, 2001
- 3) Boshier JM, Labouesse M : RNA interference : genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2 : E31-36, 2000
- 4) Sharp PA, Zamore PD : Molecular biology. RNA interference. *Science* 287 : 2431-2433, 2000
- 5) Fire A : RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15 : 358-363, 1999
- 6) Elbashir SM, Harboth J, Lendecke W et al : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001
- 7) Hohjoh H : RNA interference (RNAi) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS Lett* 521 : 195-199, 2002
- 8) Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K et al : siDirect : highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32 : W124-129, 2004
- 9) Matsuda S, Ichigatani Y, Okuda T et al : Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase. *Biochim Biophys Acta* 1490 : 163-169, 2000
- 10) Nicholson RH, Nicholson AW : Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome* 13 : 67-73, 2002
- 11) Sago N, Omi K, Tamura Y et al : RNAi induction and activation in mammalian muscle cells where Dicer and eIF2C translation initiation factors are barely expressed. *Biochem Biophys Res Commun* 319 : 50-57, 2004
- 12) Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H : Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett* 558 : 89-95, 2004
- 13) Caplen NJ, Taylor JP, Statham VS et al : Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum Mol Genet* 11 : 175-184, 2002
- 14) Harper SQ, Staber PD, He X et al : RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 5820-5825, 2005
- 15) Rodriguez-Lebron E, Denovan-Wright EM, Nash K et al : Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* 12 : 618-633, 2005
- 16) Xia H, Mao O, Eliason SL et al : RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10 : 816-820, 2004
- 17) Miller VM, Xia H, Marrs GL et al : Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 7195-7200, 2003
- 18) Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL et al : Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference : an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 32 : 661-668, 2004
- 19) Abdelgany A, Wood M, Beeson D : Allele-specific silencing of a pathogenic mutant acetylcholine receptor subunit by RNA interference. *Hum Mol Genet* 12 : 2637-2644, 2003
- 20) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM et al : Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11 : 429-433, 2005
- 21) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC et al : Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11 : 423-428, 2005

Medical Application of RNA Interference to Neuronal and Muscular Diseases

Hirohiko HOHJOH

National Institute of Neuroscience, NCNP

RNA interference (RNAi) is the process of sequence-specific posttranscriptional gene silencing triggered by double-stranded RNAs (dsRNAs) homologous to the silenced genes. In terms of rapid and potent induction of RNAi by exogenous dsRNAs, RNAi become a powerful reverse genetic tool for suppressing the expression of a gene of interest in various species including mammals. In mammals including human, either direct introduction of chemically synthesized 21-25 nucleotide small interfering RNA (siRNA) duplexes

into cells or generation of siRNA duplexes using short-hairpin RNA (shRNA) expression vector is often used for induction of RNAi, and its applications is expanding to various fields of science ; therapeutic application of RNAi in medical fields is particularly promising. I herein describe the potential utility of RNAi technique against neuronal and muscular diseases and properties of RNAi activities in neuron and muscle cells which could be useful for realizing such an application of RNAi.

二本鎖RNAワールドの開扉

—ノーベル医学生理学賞2006に寄せて

北條浩彦／ほうじょうひろひこ
国立精神・神経センター神経研究所

「ついに……」「やはり(そうか)」「当然!」, と10月2日のノーベル医学生理学賞の発表のニュースが流れたとき多くの人がそう思ったに違いない。スウェーデンのカロリンスカ研究所は2006年のノーベル医学生理学賞をRNA干渉(RNA interference: RNAi)を発見した米スタンフォード大学医学部のアンドリュー・ファイアー教授と米マサチューセッツ大学医学部のクレイグ・メロー教授に贈ると発表した。1998年のRNAiの発見(彼らの論文発表¹⁾)から8年という短い期間で受賞に至ったことは、この発見がサイエンス(科学)に与えた大きな影響と貢献を物語っている。

RNAiは、二本鎖RNAによって誘導される配列特異的な遺伝子発現の転写後抑制機構である。実は、この現象自体は、1998年よりも以前にすでにとらえられていた。植物の“co-suppression”, 菌類の“quelling”とよばれていた現象がそれである²⁾。ファイアー、メロー両教授の功績は、この不思議な現象が、抑制を受ける遺伝子と相同の二本鎖RNAによって誘導されることを線虫を用いた研究から発見したことにある。1998年の春、科学雑誌『ネイチャー』に掲載されたその論文を読んだとき、アンチセンス鎖のRNAよりも二本鎖RNAのほうがはるかに遺伝子発現抑制効果が高いという彼らのデータをにわかには信じられなかったことを思い出す。その当時の知識・常識では、たとえ二本鎖RNAによって(RNAiが)誘導されるにしても、その不思議な発現抑制メカニズムを理解し、そして想像することはできなかった。今日、RNAiの大筋のメカニズムは解明され、RNAiの存在は周知の事実となっている。無名の新人だったRNAiは、この短い期間でサイエンスの市民権を得て、その名前は広く人びとに知られるようになったのである。われわれが共有している概念的なものの見方や考え方が革命的に(突然)

変わることをパラダイムシフトとよぶが、今回のRNAiの発見はまさにそれであり、その後のめざましい発展と影響をみても、ファイアー、メロー両教授の功績がノーベル賞に値することはいうまでもない。

サイエンス分野に大きなインパクトと影響を与えたRNAiについて、その発見から今日に至る発展について簡単に紹介したい。

■RNAiの発見から分子メカニズムの解明

(1999年～)

線虫でみつかった二本鎖RNAが誘導する不思議な現象、RNAi、をきっかけに、さまざまな生物でRNAiの検証が行われた。さらに、そのメカニズムについてもショウジョウバエ・線虫のRNAiを中心に精力的に解析が進められた。この不思議な現象の分子メカニズムの一端が解かれたのは、1999～2000年に報告されたショウジョウバエの胚または細胞抽出液を使った*in vitro*のRNAi反応系の確立とそれを用いた研究成果に負うところが大きい³⁻⁵⁾。そして二本鎖RNAを消化するRNase III酵素のDicerの発見、Dicer消化によって生じる短い二本鎖RNAである、small interfering RNA (siRNA)二量体の発見、そしてRNAiの活性中心であるRNA-induced silencing complex (RISC)の発見に貢献した。これらの成果、すなわちRNAiにかかわる分子の存在とその酵素科学的反応の証明は、RNAiを単なる不思議な現象から、細胞内にたしかに存在する新規の生化学的反応経路として実体化させた。そして、ヒトを含む高等生物においてもRNAiの反応経路が存在する可能性を強く暗示させたのである。

■哺乳動物RNAi研究の夜明け(2001年～)

さまざまな生物種でRNAiの現象が報告され、研究が進む中、ヒトを含めた哺乳動物のRNAi研究は進んでいなかった。2000年に哺乳動物の卵母細胞と初期胚でRNAiが観察されたが、その他の細胞(とくに体細胞)については報告がなかった。これは、二本鎖RNAがかかわるもうひとつの反応経路が深くかかわっていたからである。初期胚や未分化細胞以外の哺乳動物細胞は、二本鎖RNAによって誘導される抗ウイルス反応とよばれるウイルス感染に対するディフェンス機能があ

り、これによってアポトーシスが誘導されていたのである。哺乳動物の RNAi を誘導するためにはこのディフェンス機能を回避する必要があった。2001 年の春、ついに、これを回避する画期的なブレイクスルーがトゥシュル博士らのグループによって報告された⁶⁾。それが今日、一般的に用いられている化学合成した siRNA 二量体を細胞内に直接導入するという方法である。この方法によってほぼすべての哺乳動物細胞に RNAi を誘導することが可能となり、哺乳動物の RNAi は飛躍的に発展した。RNAi 技術をヒトを含めた哺乳動物に広げ、その後の RNAi 研究に大きく貢献したことを考えると、トゥシュル博士のこの発見もノーベル賞に匹敵する功績であったといえる。

■RNAiの応用と発展(2001年～)

RNAi は学問的な興味だけでなく、その応用面においても計りしれない可能性をもっていた——つまり二本鎖 RNA によって RNAi を操り、目的の遺伝子を自由自在に発現抑制させることを可能にする画期的な手法として考えられた。トゥシュル博士らの方法⁶⁾によって、その可能性がヒトを含めた哺乳動物までにも広がると、その応用研究、とくに医療応用を目的とした研究は過熱さを増し、激しい研究・開発競争が繰広げられるようになった(現在も続いている)。そのなかで、発現ベクターを用いた RNAi 誘導法や siRNA ライブラリー、そして修飾 siRNA などが開発され、それらに伴い、RNAi は従来のノックアウト技術に変わる簡便な遺伝子発現抑制技術(ノックダウン技術)として広く一般の研究にも利用されるようになっていった。

こうした RNAi の応用と発展から、さらに新しい潮流も生まれてきた。それがマイクロ RNA に代表される小さな non-coding RNA の研究である⁷⁾。これら新規の RNA 分子は、新しい視点から

生物・生命現象を解明(理解)する術を提供すると期待されている。また、RNAi 機構と密接に関連するマイクロ RNA の研究は、RNAi の真の生物学的意義を明らかにすると期待される。

■おわりに

RNAi の発見から現在の RNAi 技術の普及そして新しい研究局面へと、ひとつの発見をきっかけに、これらが短期間で目まぐるしく発展・展開してきた。その過酷な研究競争のなか、暗い出来事もあったが、いまだに RNAi も含めた小さな RNA がかわる未知なる機能への探究心は衰えていない。未開であったこの研究分野の扉が、ファイヤー、メロー両教授によって(8年前に)開かれたばかりである。これからさらにどのような新しい発見そして展開がもたらされるのか……、今後のこの研究分野の発展をおおいに期待し、注目している。

文献

- 1) Fire, A. et al. : Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391** : 806-811, 1998.
- 2) Boshier, J.M. and Labouesse, M. : RNA interference : genetic wand and genetic watchdog. *Nat. Cell Biol.*, **2** : E31-36, 2000.
- 3) Tuschl, T. et al. : Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.*, **13** : 3191-3197, 1999.
- 4) Hammond, S.M. et al. : An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404** : 293-296, 2000.
- 5) Zamore, P.D. et al. : RNAi : double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101** : 25-33, 2000.
- 6) Elbashir, S.M. et al. : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411** : 494-498, 2001.
- 7) Ambros, V. : The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431** : 350-355, 2004.

* * *

3. マイクロ RNA の特徴と病態関連性

北條浩彦

マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質をコードしない小さな機能性 RNA 分子であり、相補的または一部相補的なメッセンジャー RNA (mRNA) に対してその発現を制御する。この miRNA が携わる遺伝子発現制御機構は、生物の発生・分化・増殖などさまざまな生命現象に関わっている。さらに最近、疾患との関連も明らかになりつつあり、この新しい生体機能性 RNA 分子の重要性そして注目が高まってきている。

はじめに

マイクロ RNA (miRNA) は、ゲノム上にコードされた non-coding RNA 遺伝子であり、そこから発現する約 22 ヌクレオチド (nt) の小さな機能性 RNA 分子は、相補的または一部相補的なメッセンジャー RNA (mRNA) に対してそれらの発現を制御する働きを担っている。この機能性 RNA は、1993 年に Ambros ら¹⁾ のグループによってはじめて報告されたが、今日のように特に注目されるようになったのは、'98 年の RNA interference (RNAi : RNA 干渉)²⁾ の発見以降であ

る。RNAi の発見後、その不思議なメカニズムや小さな RNA がもつ未知の機能に関する研究が精力的に進められ、その加速度的な進展の中、RNAi と密接に関連する内在性の機能性 RNA 分子として miRNA が改めて注目されてきた。miRNA は、RNAi と同様に線虫をはじめショウジョウバエ、脊椎動物そして植物とさまざまな生物種で観察されている。その数は 300 種類を軽く超えているが、最近のバイオインフォマティクスを駆使した解析からは、ヒトゲノム上において約 1,000 種類もの miRNA が存在すると予想されている。さらに注目すべきことは、タンパク質をコードしない non-coding RNA であるにもかかわらずその配列は生物種間でよく保存されている (後述)。このような特徴から miRNA はさまざまな生物種において重要な働きをする RNA 遺伝子であると考えられている。事実、miRNA は発生、分化、増殖などさまざまな生命現象に携わっていることが明らかになっている。さらに最近では疾患との関連も明らかになってきている。本稿では、この新しい生体機能分子である miRNA の特徴、疾患も含めたさまざまな生命現象との関連、そして miRNA を指標とした新しい視点からの研究アプローチについて紹介したい。

[キーワード&略語]

機能性 RNA, non-coding RNA, メッセンジャー RNA (mRNA), 翻訳抑制, RNA interference (RNAi)

miRNA : microRNA (マイクロ RNA)
 pri-miRNA : primary-miRNA
 pre-miRNA : precursor-miRNA
 siRNA : small-interfering RNA
 RISC : RNA-induced silencing complex
 shRNA : short hairpin RNA
 nt : nucleotide

microRNA (miRNA) properties and association of miRNA with diseases
 Hirohiko Hohjoh : National Institute of Neuroscience, NCNP (国立精神・神経センター神経研究所)

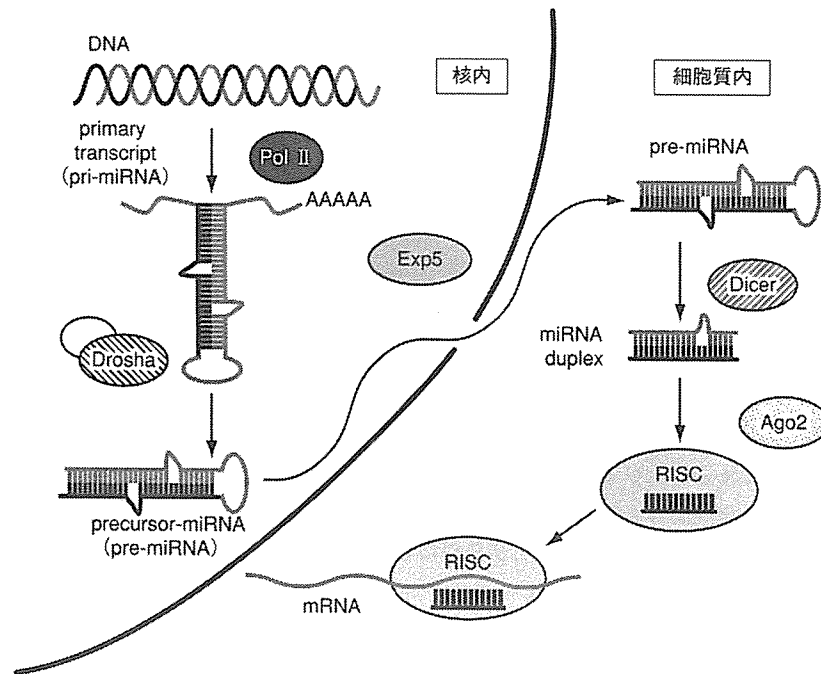


図1 マイクロRNAの成熟プロセス

マイクロRNAは、ゲノム上に存在する non-coding RNA 遺伝子であり、RNAポリメラーゼII (Pol II) によって転写される。その後、マイクロプロセッサー (Drosha), Dicerによるプロセッシングを受けて成熟したマイクロRNAとなる。成熟したマイクロRNAはRNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、機能性RNAとして働く

① miRNAの成熟プロセスとmiRNAの特徴

miRNAは、ゲノム上にコードされた non-coding RNA 遺伝子であるが、そこから機能性RNA分子として成熟するまでにはさまざまなプロセスを経る。まず、miRNAを理解するために、その成熟プロセスとmiRNAの特徴について解説する。

1) miRNAの成熟プロセス (図1)

ゲノム上に数百~1,000近く存在するmiRNA遺伝子は、それぞれ独自のプロモーターを有し、RNAポリメラーゼII (Pol II) によって転写される。その中には、複数のmiRNA遺伝子がクラスターを形成しポリシストロニックな転写ユニット^{※1}として転写されるものもある。初期転写産物は数百~数千ntの長い前駆体RNA (primary miRNA: pri-miRNA) として転写され、Drosha/Pashaを含むマイクロプロセッサーと呼ばれる複合体によって切断され約60~100ntの

precursor-miRNA (pre-miRNA) となる。その後、pre-miRNAはExportin 5 (Exp5) によって核内から細胞質内に輸送され、細胞質内でさらに、RNAi活性で重要な働きをするDicerによってプロセスされmiRNA duplexとなる。そして、機能性RNA分子として働く成熟miRNA鎖がRNA-induced silencing complex (RISC)^{※2}に取り込まれ、そのmiRNA分子に基づく遺伝子発現抑制が惹起される。RISCもDicer同様、RNAi活性の重要な因子であり、しかもRNAi

※1 ポリシストロニック転写ユニット

1つの転写ユニットの中に複数の遺伝子が存在する状態。つまり、複数の遺伝情報(遺伝子)が1つの転写産物(mRNA)の中に存在した状態で転写される。原核生物ではこのような発現様式は珍しくないが、真核生物では珍しい。真核生物のポリシストロニックな転写を示す代表的な例は、LINE-1レトロトランスポゾンがコードするopen reading frame-1と2(ORF1とORF2)タンパク質である。ちなみに、1転写ユニットに1遺伝子が存在する場合をモノシストロニックとよぶ。

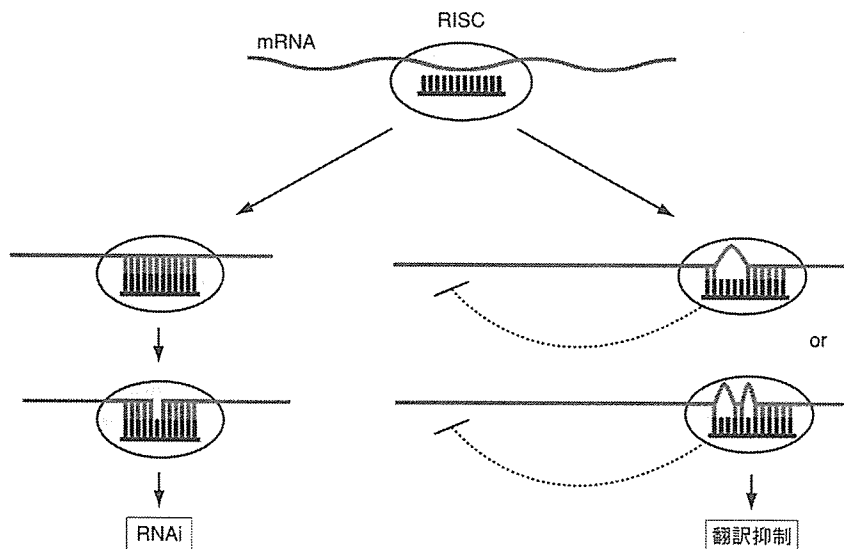


図2 マイクロRNAが携わる遺伝子発現抑制

RISCに取り込まれたマイクロRNAは2通りの遺伝子発現抑制に携わる。1つはRNAiで、もう1つは翻訳抑制である。マイクロRNAと高い相補性を有するmRNAに対してはRNAiが誘導され（左側の経路）、一部相補的なmRNAに対しては翻訳抑制が起こる（右側の経路）

活性の中心的働きを担うリボ核タンパク質複合体である。

2) miRNAによる遺伝子発現抑制

RISC内に取り込まれた成熟miRNA分子は、2つの発現抑制に携わると考えられている。1つは、RNAiと同じターゲットmRNAを配列特異的に切断する活性（RNAi活性）であり、もう1つは、未だ詳細な分子機構はわかっていないのだが、ターゲットmRNAを翻訳レベルで阻害する働きである（図2）。これらの活性は、miRNAとターゲットmRNAとの相補性やその様式に依存すると考えられている。つまり、miRNAと高い相補性を有するターゲットmRNAに対してはRNAiが誘導され、一部（部分的）相補的なターゲットmRNAに対しては翻訳抑制が誘導される。ここで重要なのは、部分的な相補性の程度・様式にはさまざまなものがあることであり、したがって、1種類の

miRNAが複数のmRNAに対して発現抑制を惹き起すと考えられている。事実、線虫では、1種類のmiRNAに対して複数のターゲットmRNAが同定されている（表1）。このようなきわめてユニークな遺伝子発現制御機構に携わるmiRNAは、新しい生体機能分子といえる。

3) pre-miRNAのヘアピン構造と機能性miRNAの配列

miRNAの成熟過程の特徴に、pri-, pre-miRNAが示すshort hairpin RNA (shRNA) 構造がある。これは図3Aに示すような構造であり、このような構造によってマイクロプロセッサー（核内）やDicer（細胞質内）からのプロセスを受け、miRNA二量体ができる。図3Aでもわかるように、miRNAのshRNA構造は生物種間で若干の違いがあるものの機能性RNA分子として働く成熟したmiRNAの配列を比べると非常によく保存されている（図3B）。Non-coding RNAであるmiRNAのこのような非常に高い配列保存性は、miRNAの特徴の1つであり、生命活動にとって重要な役割を担っていることを暗示している。

4) miRNA遺伝子の発現様式

独自の転写ユニットをもつmiRNA遺伝子は、各組

※ 2 RISC

RNAの切断活性（スライサー活性）をもつAgo2タンパク質を中心としたリボ核タンパク質複合体。取り込んだ小さなRNA（small-interfering RNA (siRNA) やmiRNA）の配列に基づくRNAi活性や翻訳抑制を惹起する。

表1 マイクロRNAと生命機能との関連

miRNA/ターゲット遺伝子	機能	文献
C. elegans		
<i>lin-4/lin-14</i>	発生のタイミングを制御	Lee et al. (1993) ¹⁾
<i>lin-4/lin-28</i>	〃	Moss et al. (1997) ⁹⁾
<i>let-7/lin-41</i>	〃	Slack et al. (2000) ¹⁰⁾
<i>let-7/lin-57</i>	〃	Abrahante et al. (2003) ¹¹⁾ Lin et al. (2003) ¹²⁾
<i>lisy-6/cog-1</i>	神経細胞の運命決定	Johnston and Hobert (2003) ¹³⁾
<i>miR-273/diel</i>	〃	Chang et al. (2004) ¹⁴⁾
Drosophila		
<i>bantam/hid</i>	細胞死, 細胞増殖	Brennecke et al. (2003) ¹⁵⁾
<i>miR-14/caspase (?)</i>	細胞死, 脂肪貯蔵	Xu et al. (2003) ¹⁶⁾
Manuscript		
<i>miR-1/Hand2</i>	心臓の発生	Zhao et al. (2005) ¹⁷⁾
<i>miR-1/HDAC4</i>	筋形成	Chen et al. (2006) ¹⁸⁾
<i>miR-133/SRF</i>	筋形成	Chen et al. (2006) ¹⁸⁾
<i>miR-196/Hoxb8</i>	四肢発生	Hornstein et al. (2005) ¹⁹⁾
<i>miR-375/Myotrophin</i>	インスリン分泌	Poy et al. (2004) ²⁰⁾
<i>miR-181/?</i>	造血細胞の運命決定	Chen et al. (2004) ²¹⁾
<i>miR-134/LimK1</i>	樹状突起棘の発達調節	Schratt et al. (2006) ²²⁾

織そして発生・分化過程で特異的な発現パターンを示す。すなわち、miRNA 遺伝子はタンパク質をコードする遺伝子同様、組織特異的、発生・分化過程特異的な発現制御を受けている。その中には、ある組織や細胞に特に強く発現し、それらを特徴づけるようなmiRNAも観察されている(図4)。

② miRNA とエピジェネティクス

miRNAは、その作用機序から、タンパク質をコードする遺伝子の発現を多様化させる1つのエピジェネティック因子として考えることも可能である。また、ヒトゲノム上に存在する約22,000個の(タンパク質をコードする)遺伝子発現も、miRNAによってさらに複雑に制御され多様化を獲得しているかもしれない。これらについては今後のさらなる研究成果を待つとして、すでに知られているエピジェネティックなメカニズムがmiRNAの配列変換や発現制御に関わっている例も知られている。Lucianoら³⁾は、ヒト、マウスのpre-miR-22(miR-22前駆体)が二本鎖RNAアデノシンデアミナーゼ^{*3}によってA(アデニン残基)からI(イノシン残基)へのRNAエディティング^{*4}を受けていることを報告している。また、Seitzら⁴⁾は、

マウス12番染色体(ヒト14q32に相当する遺伝子座)上にあるmiR-127とmiR-136遺伝子がインプリンティングの制御を受けていることを明らかにしている。これらのmiRNAは母方から伝わった染色体上にある遺伝子から発現し、父方から伝わった染色体からはそれらの反対鎖にコードされているレトロトランスポゾン様遺伝子、*Rtl1*が発現している。このようなエピジェネティクスによる作用は、miRNAによる遺伝子発現制御機構をさらに多様化させると考えられる。

③ miRNA とターゲット遺伝子、そして疾患との関連性

miRNA 遺伝子(群)の同定に伴って、それらのタ

※3 二本鎖RNAアデノシンデアミナーゼ

哺乳動物のRNAエディティングに関わる酵素。二本鎖RNAを認識して、アデニン残基をイノシン残基に変換する。グルタミン酸受容体遺伝子などは、この酵素によってRNAエディティングを受けている。

※4 RNAエディティング

RNAの転写後、転写されたRNAが塩基置換や塩基の挿入・欠失を受けて配列が変わること。RNAスプライシングなどと同様、RNAの転写後プロセッシング機構の1つである。

表2 マイクロRNAと疾患との関連

miRNA (s)/ターゲット遺伝子	関連する疾患および特徴	文献
miR-155/?	リンパ腫で発現増幅	Eis et al. (2005) ²³⁾
miR-15, miR-16/?	白血病で発現減少	Calin et al. (2002) ⁵⁾
Let-7/let-60 (RAS)	肺癌で発現減少	Johnson et al. (2005) ²⁴⁾
miR-17-92 cluster/?	肺癌で発現増幅	Hayashita et al. (2005) ⁶⁾
	リンパ腫で発現増幅	He et al. (2005) ⁷⁾
	腫瘍形成の促進と悪性化	He et al. (2005) ⁷⁾

ターゲット mRNA (遺伝子) の探索や候補ターゲット遺伝子の予測も精力的に行われている。特に最近ではインフォマティクスを駆使した *in silico* の解析により、miRNA 遺伝子も含めたデータの充実が進んでいる。表1に、miRNA とそのターゲット遺伝子の対応が明らかになったもの、そしてその生物学的役割をまとめた。表にも記したように、これらのmiRNAによる遺伝子発現制御は発生、分化、増殖とさまざまな生命現象に関わっている。さらに、最近注目されている関連は、miRNA と疾患との関係である。特に癌化との密接な関連が明らかになりつつあり、それらについていくつかの報告を挙げて解説する(表2)。

Bリンパ腫、慢性リンパ球性白血病そして肺癌では、表2に示すようなmiRNA 遺伝子の発現変化が報告されている。慢性リンパ球性白血病で観察されるmiR-15/miR-16の発現減少については、それらmiRNA 遺伝子クラスターを含む遺伝子座の欠失が関与していることも示されている⁵⁾。さらに最近、13q31に存在する *miR-17-92* 遺伝子クラスターの発現量の増幅とリンパ腫や肺癌との関連が明らかになってきている^{6) 7)}。特に注目すべき報告は、Heら⁷⁾によるもので、*miR-17-19b* 遺伝子クラスターを過剰発現させたモデルマウスは、*c-myc* 発癌遺伝子によって誘導される腫瘍形成が速められ、さらに悪性化して早く死に至ることが示されている。この *miR-17-19b* 遺伝子クラスターを過剰発現させたモデルマウスでは、腫瘍形成を抑制するアポトーシスが減少していることも観察されている。これらの報告は、miRNA が癌形成に関わる重要な調節(修飾)因子であることを強く示唆している。

miRNA の発現解析が、癌の早期発見に貢献する可能性も示されてきている。Luら⁸⁾は、ビーズ(miRNA に対するDNAプローブが付いたビーズ)を使った

miRNA 発現プロファイル解析によって、多様な癌細胞を識別することが可能であることを示唆している。これらのmiRNA の発現変化は、細胞の形態変化が起こる前から捉えることが可能であり、癌の早期発見・分類に大きく貢献することが期待される。このようなmiRNAに関する新しい発見は、タンパク質をコードする遺伝子ばかりでなく、miRNAのようなnon-coding 遺伝子も疾患の発病・病態に関わる重要な因子として十分考慮すべきであることを示唆している。

上記でも記したように今日のmiRNAのデータベースの充実に伴い、miRNAの発現を包括的に捉える解析はますます発展すると考えられる。そして、そのような解析を強力にサポートするDNAマイクロアレイ技術(DNAチップ技術)の進歩、そしてそれらを用いたmiRNA発現プロファイル解析とその発現プロファイルに基づく疾患との関連解析が今後さらに重要視されると考えられる。

おわりに

miRNAが今日のように注目されるようになったのはここ2~3年のことであり、その理解や技術面での進歩はまだまだ発展過程にあるといえる。しかしながら、miRNAによる新規の遺伝子発現制御機構やそれらが携わるさまざまな生命現象、そして疾患との関連が明らかになるにつれ、この新しい生体機能性RNA分子の生命活動への重要な関わり(貢献)は疑いのないものになってきている。また、さまざまな生命現象に対して、miRNAという新しい分子指標を用いた研究戦略は、まったく新しい視点からの研究アプローチとなり、われわれに新規の知見を提供してくれると期待される。多くの関連を秘めたこの機能性RNA分子の今後の研究発展そして成果が、医療分野をはじめさまざまな分野に貢献することを期待する。

文献

- 1) Lee, R. C. et al. : Cell, 75 : 843-854, 1993
- 2) Fire, A. et al. : Nature, 391 : 806-811, 1998
- 3) Luciano, D. J. et al. : Rna, 10 : 1174-1177, 2004
- 4) Seitz, H. et al. : Nature Genet., 34 : 261-262, 2003
- 5) Calin, G. A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 : 15524-15529, 2002
- 6) Hayashita, Y. et al. : Cancer Res., 65 : 9628-9632, 2005
- 7) He, L. et al. : Nature, 435 : 828-833, 2005
- 8) Lu, J. et al. : Nature, 435 : 834-838, 2005
- 9) Moss, E. G. et al. : Cell, 88 : 637-646, 1997
- 10) Slack, F. J. et al. : Mol. Cell, 5 : 659-669, 2000
- 11) Abrahante, J. E. et al. : Dev. Cell, 4 : 625-637, 2003
- 12) Lin, S. Y. et al. : Dev. Cell, 4 : 639-650, 2003
- 13) Johnston, R. J. & Hobert, O. : Nature, 426 : 845-849, 2003
- 14) Chang, S. et al. : Nature, 430 : 785-789, 2004
- 15) Brennecke, J. et al. : Cell, 113 : 25-36, 2003
- 16) Xu, P. et al. : Curr. Biol., 13 : 790-795, 2003
- 17) Zhao, Y. et al. : Nature, 436 : 214-220, 2005
- 18) Chen, J. F. et al. : Nature Genet., 38 : 228-233, 2006
- 19) Hornstein, E. et al. : Nature, 438 : 671-674, 2005
- 20) Poy, M. N. et al. : Nature, 432 : 226-230, 2004
- 21) Chen, C. Z. : Science, 303 : 83-86, 2004
- 22) Schratt, G. M. et al. : Nature, 439 : 283-289, 2006
- 23) Eis, P. S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 : 3627-3632, 2005
- 24) Johnson, S. M. et al. : Cell, 120 : 635-647, 2005

<著者プロフィール>

北條浩彦：1990年九州大学大学院医学系研究科博士課程修了，理学博士，'91年東京大学医科学研究所助手，'92年米国国立衛生研究所（NIH），国立癌研究所（NCI）生化学研究室研究員，'97年東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室助手，2002年より現職，国立精神・神経センター神経研究所室長。