別紙7

「RNA と生体機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成21年度終了研究課題－

研究総括 野本 明男

1. 研究領域の概要

本研究領域は、RNA 分子の多様な機能を明らかにし RNA の生命体維持に関する基本原理についての理解を深めると同時に、RNA 分子の医療応用等に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術シーズの創出を目指している。

具体的には、生命現象を支え制御する RNA の新たな機能を探索する研究、および既知の RNA 機能の活用を目指した研究が対象である。後者の研究には、機能性 RNA のデザインや機能向上を目指す技術、機能性 RNA により細胞機能を制御する技術、1分子レベルで特異的 RNA を検出する技術、RNA を標的組織・細胞に送達するドラッグ・デリバリー・システム技術などに関するものが含まれ、先端医療技術等への機能性 RNA 分子の新たな活用技術の開発へとつながることが期待される研究が対象となる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記のとおり。

1) 選考は「RNA と生体機能」領域に設けた選考委員 11 名と研究総括で行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 面接選考においては、申請者の研究の主体性、研究のねらい、研究計画の妥当性、将来性等を中心に審査する。研究構想が本研究領域の趣旨に合っていること、高い独創性と新規性に富むことを重視する。長い歴史を持つ RNA 研究の新展開には、これまでの伝統的研究を大切に生かしつつ、新しい視点を大胆に取り込む姿勢を重視する。

4. 選考の経緯

書類審査は各応募課題につき領域アドバイザー3 名が担当し評価を行い、この評価と研究総括の評価をあわせて書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考会での評価および総合選考により採用者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	116 名	24 名	11 名

5. 研究実施期間

平成 18 年 10 月～平成 22 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議：7 回

研究報告会：1回

研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問：

研究開始時に研究総括、技術参事、事務参事が研究者とその上司を訪問した。上司にさきがけ研究実施にあたっての協力を依頼した。研究室、研究設備等を確認し、研究環境の説明を受け、研究実施に支障がないことを確認した。事務的な手続きについての説明もおこなった。

さらに、3年目を迎える研究者を技術参事が訪問し、研究の進捗状況についての研究総括からのメッセージを伝えると共に、今後2年間の目標、問題点と課題などを話し合い、結果を研究総括に伝えた。その他、研究者の異動時には研究総括以下のサイトビジットを再度実施した。

7. 評価の手続き

研究者による研究報告書と自己評価を基に、研究総括が領域アドバイザーの協力を得ながら実施した。領域

会議での討議や研究報告会の参加者の意見も参考にした。

（評価の流れ）

平成 21 年 12 月　　研究報告会開催
平成 22 年 2 月　　研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 22 年 3 月　　研究総括による評価
平成 22 年 3 月　　研究期間終了

8．評価項目

（1）研究計画書の目標と研究課題に対する達成度
（2）外部発表(学術論文、口頭発表など)、プレスリリースと特許などから見た研究成果と発信状況
（3）学術賞、学会招待講演、新聞記事など外部からの評価状況
（4）達成した研究成果の科学、技術、社会への貢献度

9．研究結果

近年になり、リボザイム、miRNA、RNA の分子擬態、その他多くの機能性 non-coding(nc)RNA の発見により、RNA は蛋白質と同等の機能を持つ分子でもあると認識されるようになってきた。今や RNA は、遺伝情報発現や代謝の制御に働く必須の分子であると同時に、 発生、分化、疾患の発症など高次複合形質の動態にも深く関与していることが明らかであるが、その研究は緒についたばかりともいえる。

本研究領域では、生命現象における RNA の新たな機能を探索する研究を対象とすると共に、明らかとなっている機能性 RNA を活用し、医療応用等を含めた RNA テクノロジーに関する研究を対象として幅広い研究課題が採択されている。広範な専門分野の研究者間やアドバイザーとの切磋琢磨および協調した研究推進により著明な進展が各課題にみられた。研究者毎に研究のねらい、結果および評価を以下に述べる。

〇井川　善也　　研究者

機能を持つ人工 RNA の創製は、基礎化学、生物学、さらには医療やバイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。これまで、創製法として、「立体構造的知見に基づく合理的な分子設計（デザイン法）」と「ランダム配列ライブラリーからの進化工学を用いた選択（セレクション法）」の2つのアプローチが試みられてきた。本研究では、これら創製法の長所を組み合わせた「Design and Selection 法（DS 法）」を基盤とし、機能性人工 RNA の創製を行った。その結果、DS 法により新規な人工リボザイムの構築に成功し、さらにペプチド連結反応を促進するモジュール型 RNA の創製に成功したことは高く評価出来る。今後、さらに天然の機能性 RNA の機能レベルに迫る人工 RNA 分子の創製に向けた研究への展開を期待する。

〇伊藤　耕一　　研究者

mRNA 上のコドンの内、終止コドンは tRNA ではなく、ペプチド鎖解離因子と呼ばれるタンパク質に認識される。ペプチド鎖解離因子は、tRNA 擬態タンパク質として知られている。本研究では、真核細胞における、終止コドンを介した mRNA 動態制御機構の解明を目指した。真核細胞の翻訳終結においては、ペプチド鎖解離因子 eRF1 と解離因子サブユニット eRF3 が結合した複合体が機能することが明らかになっていた。そこで、本研究では、eRF1-eRF3 の複合体構造を X 線結晶解析と X 線小角散乱法を組み合わせて解明し、複合体構造に見られた特徴的部位の機能解析を行い、終止コドン認識システムなど、解離因子固有の機能解明を進めたものである。本研究で明らかとなった成果が、今後終止コドンと共役する生命機能をターゲットとした応用研究の基盤となることを期待する。

〇上野　義仁　　研究者

パイ電子に富むベンゼン環の特性を活用し、高機能化した人工 RNA 分子の開発を目指した研究を展開した。まず、ヌクレオシドの糖部をベンゼン環で置換したヌクレオシドアナログ（ベンゼンーリン酸骨格からなる）をステム部分に持つモレキュラービーコンを作製した。この RNA は、ヌクレアーゼに対する抵抗性が向上し、ステム部分は核酸と二本鎖を形成しないため、蛍光強度が変化するといった問題点を改善することができた。また、siRNA の末端の鎖の配向性を制御することによりヌクレアーゼ抵抗性とし、Ago タンパク質に取り込ませた。この修飾 siRNA は 0.1nM の濃度で in vitro においてC型肝炎ウイルスの複製を阻害した。このように、パイ電子に富むベンゼン環を活用した人工 RNA の開発を行い有効に働く可能性を示した功績は高く評価される。今後医療への応用なども視野に入れた大きな展開を期待する。

○影山　裕二　　研究者

本研究では、ショウジョウバエ mRNA 型 non-coding RNA 遺伝子群のうち 6 個の遺伝子の機能を解析することにより、RNA 分子の新たな機能を発見することを目指した。その中で、MRE29 遺伝子はアクチン細胞骨格の再構成制御機構を介して細胞の形態形成（denticle 形成）に関与していることを明らかにし、細胞の形態から MRE29 遺伝子を polished rice (pri)と再命名した。さらに pri が転写因子（E74 および E75A）を介した変態期の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。ところが、その後 pri の 10 個の ORF の内、5’側の 4 個の ORF は翻訳されていること、この pri 遺伝子産物が pri 遺伝子活性を担っていることなどが判明した。Denticle 形成のマスター遺伝子 shavenbaby (svb)産物（転写因子）は pri 存在下で活性を持つようになることも明らかにした。当初の目標であった mRNA 型 non-coding RNA の解析とはならなかったが、MRE29 に関する多くの細胞機能を明らかにした点は非常に高く評価出来る。ORF のうち3個はわずか１１アミノ酸からなる短鎖ペプチドをコードしており、真核生物では最も小さな遺伝子産物の発見でもあった。今後の大きな研究展開に結びつくものと期待する。

○田原　浩昭　　研究者

RNA interference (RNAi) とは細胞に 2 本鎖 RNA (dsRNA) を導入した場合に相同配列を持つ遺伝子の発現抑制が生じる現象である。線虫を研究材料とし、生化学的および遺伝学的手法を組み合わせた解析により RNAi のサイレンシング効率に関連する反応についての理解を深めることを目標とした。そのために、サイレンシングシグナルの増幅に重要な役割を果たす RNA 依存 RNA ポリメラーゼの生化学的性質を解明すること、および配列特異的 mRNA 切断活性の性質を明らかにし、その活性を担う因子を同定することを目指した。その結果、RNAi の機能発現機構について、外来の RNA によって誘導される反応機構のモデルの提唱に至った。RNAi に関連する酵素活性を見るための無細胞反応系の開発などを含む優れた技術により、当初の目的をほぼ達成したことは、大変立派である。さらに、内因性の反応についての興味ある研究を展開中であり、今後に期待する。

○泊　幸秀　　研究者

生物の重要な機能の多くが、small RNA (siRNA や miRNA)によって制御を受けていることが明らかとなっている。このような制御は RNA 単独ではなく、複数のタンパク質と複合体を作って行われる。本研究では、このような複合体がどのようにしてつくられるかを主にショウジョウバエの系を使用して、明らかにすることを目的とした。その結果、二本鎖 RNA にミスマッチが存在するか否かで取り込むタンパク質が異なることを明らかにした。この取り込みの機構は完全には明らかとなっていないが、取り込みに ATP が必要であること、二本鎖が一本鎖になるとき（unwinding）には ATP を必要としないことなどを明らかにし、人工的な miRNA 遺伝子を設計することも可能にした。さらに、混乱を極めていた miRNA による翻訳抑制の仕組みを見事に整理し、Ago1 と Ago2 の働きに大きな違いが存在することを解明した。本研究は、世界的にとくに競争の激しい当該分野において、世界をリードする日本発の研究成果であり、大きく発展していくことを期待する。

○朝長　啓造　　研究者

機能性 RNA 分子を利用した研究と医薬品の開発には、RNA を生体内の適所に安全に運ぶための効率的なデリバリーシステムの構築が不可欠と考えられる。ボルナ病ウイルス（BDV）は、神経親和性を持ち、細胞核で持続感染する。この特性を生かし、独創的な RNA ウイルスベクターの開発を目標とした。まず、ウイルスの RNP がクロマチンに結合していること、核膜のなくなる分裂期の細胞では、濃縮したクロマチンに接合しており、分裂後期では RNP が娘染色体とともにそれぞれの細胞核へと運ばれることを示し、感染細胞のなかで BDV ゲノムが安定に維持されるメカニズムが存在することを示した。GFP の発現がマウスおよびラットの海馬や大脳皮質領域の神経細胞で少なくとも 8 ヶ月は安定に続くことを示した。また、miRNA を発現するベクターの作製にも成功したことから BDV をベクターとして使えることを示した。現在、アミロイドを分解するネプリライシン遺伝子を挿入したベクターを作製し、有用性についての検討を行っている。最終目標をクリアーしたことは高く評価できる。さらに、本研究遂行の過程で、BDV の N 遺伝子が宿主ゲノムにインテグレートされることを見出したことは、驚くべき成果である。宿主ゲノムの進化のメカニズムや BDV の新たな病原性発現機構に新知見をもたらしたことを高く評価している。今後のさらなる発展を期待する。

○中村　崇裕　　研究者

植物のオルガネラゲノム（葉緑体、ミトコンドリア）にコードされる遺伝子の発現は、核にコードされる遺伝子によって、主に RNA の段階で制御されている。このような制御のために、植物は多くの PPR タンパク質ファミリー（35

アミノ酸からなるPPRモチーフの約10個の繰り返しで構成）を持つ。PPRタンパク質それぞれは別の配列を持つオルガネラRNAに結合し、切断、編集、スプライシング、翻訳などのRNAプロセシングに関わる。そこで、PPRモチーフの配列とRNA認識の関係を明らかにし、任意のRNA配列に結合し、切断するRNA調節酵素を開発することを目的とした。PPRとRNAの相互作用は非常に複雑であり、PPR配列とRNAの相互作用の一般則を見出すことは出来なかったが、本研究で、RNA 結合に能動的に働く幾つかのアミノ酸を同定することに成功したこと、さらに、一部のPPRタンパク質中のDYWモチーフはRNA切断酵素であることを証明したこと、また雄性不稔を稔性へと回復させるPPRタンパク質はミトコンドリア不稔原遺伝子からのRNAを切断していることなどから、PPRタンパク質の機能に関する理解が深まったことは評価される。今後の研究の進展を期待する。

○中村 貴史 研究者

難治性悪性腫瘍の早期診断法および新規治療法の確立を目指し、これに RNA とウイルスの特性を活用することを目指した。まず RNA をゲノムとして持つ弱毒化麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた抗体ディスプレイライブラリーを構築し、新規抗体医薬開発を目標とした。抗体ライブラリーの性能故に難航したが、ライブラリーを換えることにより進行し始めた。次に、ワクシニアウイルスワクチン株ゲノムに特定のマイクロRNA標的配列を挿入し、癌細胞のみを破壊する新規癌ウイルス療法の開発を行い、大変順調に進行した。LC16m8 株は、B5R 遺伝子に変異があり、正常細胞での増殖性が著しく減弱している。B5R はウイルスの弱毒化だけでなく、腫瘍溶解性とも関係している。そこで、本研究では、ウイルスを、癌細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないように改良した。肺癌、膵臓癌、メラノーマなどの癌細胞で発現が低下している let7a miRNA に注目し、この miRNA の標的配列（22塩基）を B5R 遺伝子の 3’ UTR に挿入した。この組換えワクシニアウイルスは、let7a miRNA の低下している癌細胞では B5RmRNA の分解は起こらず、発現し癌細胞を溶解させるが、正常細胞では B5RmRNA の分解が起こり細胞は破壊されない。良く考えられた見事な実験であり、ウイルスを使いこなしている点は高く評価できる。今後の応用への展開を期待する。

○沼田 倫征 研究者

遺伝情報の翻訳過程において、tRNAによる正しいコドンの認識は、適正な蛋白質を生合成する上で極めて重要である。本研究では、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応する tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシド、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジンの形成反応メカニズムを解明する目的で、関与する二種類の酵素（GidA と MnmE）のX線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った。その結果、主に GidA が tRNA との相互作用に関わること、GidA は触媒部位においてチミジル酸合成酵素と類似のメカニズムでウリジンの5位を修飾すること、MnmE に 5,10-メチレン THF が結合することなどを明らかにした。この成果により、新しい反応メカニズムを提唱することができたことは評価される。今後は、これら両酵素の複合体結晶、さらには tRNA も加えた三者複合体結晶を得て、検証が進むことを期待する。

○藤原 俊伸 研究者

DNA から RNA として転写された遺伝情報の発現は、様々な RNA 結合タンパク質による複雑かつ巧妙な転写後遺伝子発現調節機構により制御され、高次生命現象を規定する。そこで、真核生物のリボソーム生合成制御と細胞周期が連携するしくみ、および神経細胞特異的な翻訳制御機構を、そこに関わる RNA 結合タンパク質を同定し解明することを目的として研究を行った。その結果、前者のメカニズムについては、転写ではなく rRNA プロセシングの不具合のため細胞周期が G1 期でアレストすることを明らかにした。後者については、HuD が翻訳伸長因子 eIF4A および poly(A)との結合を介し、翻訳開始複合体に結合し、cap 依存的翻訳を促進することを発見した。翻訳因子ではない RNA 結合タンパク質による eIF4A を介した翻訳開始促進機構の新たな提唱である。いずれの研究も大きな発見に結びついており、今後の発展を期待する。

10. 評価者

研究総括 野本 明男 東京大学 名誉教授

領域アドバイザー

伊庭 英夫	東京大学	医科学研究所 教授
大野 睦人	京都大学	ウイルス研究所 教授
奥野 哲郎	京都大学	大学院農学研究科 教授
堅田 利明	東京大学	大学院薬学系研究科 教授
坂本 博	神戸大学	大学院理学研究科 教授
塩見 春彦	慶応義塾大学	医学部 教授

杉本　亜砂子　理化学研究所　発生・再生科学総合研究センター　チームリーダー
永田　恭介　　筑波大学　大学院生命科学研究科　教授
古市　泰宏　　（株）ジーンケア研究所　会長
松藤　千弥　　東京慈恵会医科大学　医学部　教授
水本　清久　　北里大学　名誉教授

（参考）

（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	0	68	68
口　頭	82	59	141
その他	12	3	15
合　計	94	130	224

※平成 22 年 3 月 31 日現在

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計
9	3	12

国内特許４月出願確定分１件を含む

（3）受賞等

・泊　幸秀
国際ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム キャリアディベロップメントアワード（平成 20 年 6 月）

・沼田　倫征
財団法人手島工業教育資金団　平成 18 年度手島記念研究賞 （平成 19 年 2 月 28 日）

（4）招待講演

国際　13 件
国内　20 件

別紙

「RNA と生体機能」領域　研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職 （応募時所属）	研究費 （百万円）
井川　善也 （兼任）	「純和製リボザイム DSL」を基盤とした RNA 工学の開発 （九州大学大学院工学研究院）	九州大学大学院工学研究院 准教授 （同上　助教授）	43
伊藤　耕一 （兼任）	終止コドンを介した mRNA 動態制御機構の解明と応用 （東京大学医科学研究所）	東京大学医科学研究所　准教授 （同上　助教授）	39
上野　義仁 （兼任）	パイ電子充填型人工核酸の創製と活用 （岐阜大学工学部生命工学科）	岐阜大学工学部生命工学科 准教授 （同上　助教授）	43
影山　裕二 （専任）	ショウジョウバエをモデル系とした mRNA 型 non-coding RNA の解析 （岡崎統合バイオサイエンスセンター発生遺伝学研究部門）	（独）科学技術振興機構 さきがけ研究者 （奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科　助手）	49
田原　浩昭 （専任）	線虫を用いた RNAi 反応機構の遺伝生化学的解析 （京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット）	（独）科学技術振興機構 さきがけ研究者 （京都大学医学研究科科学技術振興助教授）	38
泊　幸秀 （兼任）	RNAi 複合体形成の生化学的解析 （東京大学分子細胞生物学研究所）	東京大学分子細胞生物学研究所 准教授（米国マサチューセッツ州立大学医学部ポスドク）	55
朝長　啓造 （兼任）	リボウイルス創薬：ウイルスに学ぶ RNA 分子の可能性とその応用 （大阪大学微生物病研究所）	大阪大学微生物病研究所　准教授 （同上　助教授）	46
中村　崇裕 （兼任）	PPR 蛋白質ファミリーの解析と RNA 調節酵素への応用 （高等研究機構　若手研究者養成部門　）	高等研究機構　若手研究者養成部門　准教授 （名古屋大学遺伝子実験施設 博士研究員）	47
中村　貴史 （兼任）	RNA ゲノムを用いた悪性腫瘍の診断・治療法の開発 （東京大学医科学研究所治療ベクター開発室）	東京大学医科学研究所 特任准教授 （オンコリスバイオファーマ（株） 主任研究員）	42
沼田　倫征 （兼任）	RNA による生命反応制御機構の構造的基盤の解明（産業技術総合研究所生物機能工学研究部門）	産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門　研究員 （東京工業大学大学院 生命理工学研究科　助手）	48
藤原　俊伸 （兼任）	細胞周期とリボソーム生合成制御の連携システムの解明 （神戸大学大学院工学研究科　応用化学専攻生物化学工学分野）	神戸大学大学院工学研究科　准教授 （同上　自然科学研究科　助手）	48

研究課題別評価書

1．研究課題名
「純和製リボザイム DSL」を基盤とした RNA 工学の開発

2．氏名
井川　善也

3．研究のねらい
「機能性生体高分子のテーラーメイドな創製」は、RNA に限らず広く生体高分子の研究において、基礎化学・生物学的に、さらに医療・バイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。従来、その創製法としては、「立体構造的知見に基づく合理的な分子設計（デザイン法）」と「ランダム配列ライブラリーからの進化工学を用いた選択（セレクション法）」という、原理が異なる2つのアプローチが試みられてきたが、両手法は固有の長所と短所を有している。本研究では、両手法を融合化することで短所を克服し、長所を組み合わせた次世代の機能性生体高分子の人工創製法である「Design & Selection 法（DS 法）」を基盤とし、以下の2課題について研究を行った。（1）新規な機能性 RNA の創製による DS 法の汎用性の実証。(2)DS 法により創製されたリボザイムのモジュール集積構造を活かした高機能化。

4．研究成果
（1）新規な機能性 RNA の創製による DS 法の汎用性の実証
（A） DS 法による新規モジュール集積型リボザイム YFL の創製および機能・構造解析
Design & Selection法の有用性は本研究以前に高機能なリガーゼ・リボザイムDSLの創製により実証されていたが、その汎用性の実証には、複数の異なる機能性RNAの人工創製例が必要である。本研究では、DSLリボザイムと類似のRNA構造体を骨格構造として、DS法により、β-NMNを脱離基とする人工リボザイムの創製を行い、YFLと命名した新規リボザイムの創製に成功した。YFLリボザイムはDS法に基づくモジュール集積型の構造を有し、その触媒ユニットはβ-NMN依存的なRNA断片間の連結反応を 10^5倍加速することを明らかにした。さらに機能・構造相関の解析より、YFLリボザイムは連結反応の脱離基としてβ-NMNだけでなく、ピロリン酸も利用できることを明らかにした。RNAワールド仮説においてリガーゼあるいはポリメラーゼリボザイムは、核酸型の脱離基を用いるタイプからピロリン酸を用いるタイプへと進化した可能性が提唱されている。YFLリボザイムの脱離基特性はこの仮説の実証モデルの初めての例である。生化学的な構造解析より、YFLリボザイムの触媒ユニットは 3 および 13 塩基からなる小さな内部ループで構成されていることを明らかにした。従来の人工リガーゼ・リボザイムにない単純な触媒ユニットは、3’-末端の一本鎖領域による干渉（不活性構造の形成）に敏感であり、その干渉を低減するために、3’-末端のヘアピン構造（図2）が重要な役割を果たしている事を明らかにした。

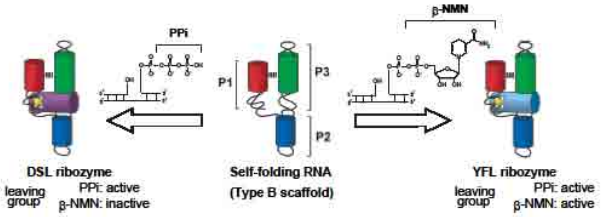


図 1　DSL、YFL リボザイムのモジュール構成

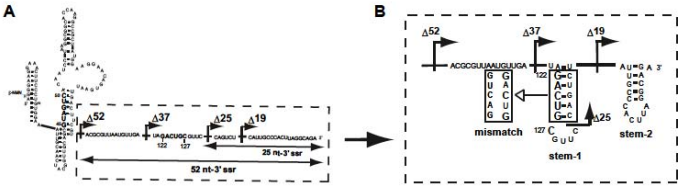


図 2　YFL リボザイムの活性構造。3 領域が stem-1’ヘアピンを形成し、不活性構造を誘起する配列（R41-46）を遮蔽する。

（B） モジュール集積型 RNA によるペプチド連結システムの構築および機能解析

mRNA の遺伝情報をペプチド配列に翻訳する過程の主役であるリボソームは mRNA 配列に対応してアミノアシル tRNA を配置し、ペプチド結合の形成を促進する。近年の構造解析からリボソーム上でのペプチド結合生成の加速機構は近接効果が主たる駆動力であり、反応加速におけるリボソームの役割は mRNA 配列依存的に二つの反応基質を正しく配置する鋳型機能であることが明らかになりつつある。RNA–RNA 間の高次相互作用モジュールと RNA–ペプチド相互作用モジュールを DS 法により集積することで、リボソーム類似の鋳型効果を発揮する RNA を構築し RNA 上でのペプチド形成反応のモデル系を創製した。モジュール集積型 RNA として、天然リボザイムの構造ドメイン、人工創製された RNA 構造体を用い、DS 法により2組のペプチド認識モチーフを導入した。ペプチドのみでは反応がほとんど進行しない条件下、人工 RNA の添加により連結反応は大きく促進された。鋳型のプラットフォームとして用いる RNA 構造体としては人工創製された自己組織能をもつ tectoRNA(図3）が最も優れていることを明らかにした。この結果は、リボソーム、スプライセオソーム等、高次機能を有する RNP の RNA 成分が複数の RNA 分子から構成されることと関連して興味深い。

図3 tectoRNAを基盤とする人工RNP

（2）DS 法により創製されたリボザイムのモジュール集積構造を活かした高機能化

（A） モジュール工学による DSL リボザイムのターンオーバー能力の最適化

DS 法により最初に創製された人工リボザイム DSL は基質ユニットと触媒ユニットが共有結合で連結されているが、両ユニット間の認識モチーフを非共有結合相互作用モチーフである GNRA ループ/レセプターで置き換えることにより、基質ユニットと触媒ユニットの物理的分割が可能となる。基質と触媒ユニット間の認識が2組の GNRA ループ/レセプター相互作用に担われる transDSL リボザイムは、人工リガーゼ・リボザイムとしては例外的にターンオーバー能力を有する。2組の GNRA ループ/レセプター相互作用モジュールの組み合わせを系統的に変化させ、ターンオーバー能が最大となる組み合わせを探索した。その結果、GGAA/R(1)とGAAA/R(11nt)の2種のモジュールを上部および下部にそれぞれ導入した transDSL リボザイムは、1分間に約1回、総計 500 ターンオーバーの触媒能を示した。この値は類似の反応を触媒する蛋白質酵素には及ばないが、生成物阻害を受け易いリガーゼ・リボザイムとしては卓越した値である。

(B) モジュール工学による DSL リボザイムの基質認識モチーフの改変

トランス型人工リボザイム DSL（transDSL）はそのモジュール性に基づき、二組の相互作用モジュールを介して基質ユニットと触媒ユニット間の分子認識を達成している。transDSL リボザイムに対するモジュール工学の適用範囲を検討するため、二組の相互作用モジュールに対し、GNRA ループ/レセプター・モジュール、ワトソン–クリック塩基対モジュール、C–loop/レセプター・モジュールを系統的に導入し、その活性への影響を検討した。その結果、ワトソン–クリック塩基対モジュールを上部ユニットに有する変異体（図4、*trans*DSL–upBP）のみ活性が見られないものの、その他の相互作用モジュールの組み合わせは、いずれも触媒活性を保持していた。この結果は DSL リボザイムの基質認識ユニットに対し、モジュール工学が有効かつ柔軟に適用できることを示している。また、下部モジュールとして１１塩基対を有する変異体（*trans*DSL–S2E)はターンオーバー能を保持する事も明らかにした。これは以前に報告された下部モジュールとして１０塩基対を有する類似の変異体がターンオーバー能を示さないのと異なり、ワトソン–クリック塩基対モジュールについても適切な分子設計により、高次機能を付与できることを示唆している。

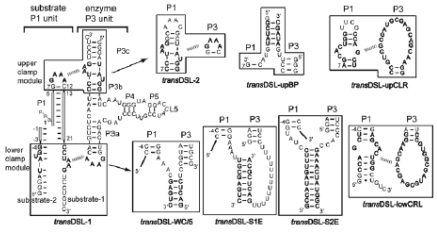


図4 基質認識モジュールの交換

５．自己評価

研究期間内にDS法により新規な人工リボザイムYFLの構築と機能解析、およびペプチド連結を促進するモジュール型 RNA の創製に成功したことは、DS 法の汎用性の実証として一定の成果と考えている。本研究期間中に DS 法の適用例が他グループからも報告されていることを考えると、「DS 法の RNA 工学の汎用法としての確立」という当初目的はかなり達せられたと言える。しかしながら、バイオセンシングなど「役立つツール」の創製まで至らなかった事は力不足であった。現在進展中の課題には応用展開に有望な結果が得られつつあるため、それらの完成により本研究の当初目的の完全な達成を目指したい。

６．研究総括の見解

機能を持つ人工 RNA の創製は、基礎化学、生物学、さらには医療やバイオ工学などへの応用面からも重要な課題である。これまで、創製法として、「立体構造的知見に基づく合理的な分子設計（デザイン法）」と「ランダム配列ライブラリーからの進化工学を用いた選択（セレクション法）」の２つのアプローチが試みられてきた。本研究では、これら創製法の長所を組み合わせた「Design and Selection 法（DS 法）」を基盤とし、機能性人工 RNA の創製を行った。その結果、DS 法により新規な人工リボザイムの構築に成功し、さらにペプチド連結反応を促進するモジュール型 RNA の創製に成功したことは高く評価出来る。今後、さらに天然の機能性 RNA の機能レベルに迫る人工 RNA 分子の創製に向けた研究を加速して欲しい。

７．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（１）論文（原著論文）発表　*Corresponding author

1. Y. Fujita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Tailoring RNA modular unit on a common scaffold: a modular ribozyme with a catalytic unit for β-nicotinamide-activated RNA ligation. *RNA* **15**, 877-888 (2009).
2. J. Ishikawa, S. Matsumura, L. Jaeger, T. Inoue, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Rational optimization of the DSL ligase ribozyme with GNRA/receptor interacting modules. *Arch. Biochem. Biophys.* **490**, 163-170 (2009).
3. N. Kashiwagi, K. Yamashita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Designed RNAs with two peptide binding units as artificial templates for nativ chemical ligation of RNA binding peptides. *ChemBioChem* **10**, 2745-2752 (2009)
4. Y. Fujita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** Evolutionary optimization of a modular ligase ribozyme: a small catalytic unit and a hairpin motif masking an element that could form an inactive structure. *Nucleic Acids Res.* **38**, in press (2010)
5. J. Ishikawa, N. Isomoto, Y. Fujita, H. Furuta and **Y. Ikawa*** The *trans*DSL ligase ribozyme can utilize various forms of modules to clamp its substrate and enzyme units. *Biosci. Biotech. Biochem.* **74**, in press (2010).

（２）総説

1. 井川善也　RNA 医薬としてのリボザイムの現状と展望
「核酸医薬の最前線」（CMC 出版）, p176-186 (2009)
2. 井川善也　RNA ワールドへの逆進化　「最新 RNA と疾患研究」（遺伝子医学 MOOK）（メディカル DO）, p198-202 (2009)

（３）招待講演

1. RNA Technology through Design & Evolution　56th Global Seminar, Joint Seminar on "DNA/RNA Nanobio"（福岡, H20 年 9 月 5 日）
2. RNA Science & Technology through Design & Evolution　Prof. Jean-Marie Lehn

Symposium III (福岡, H20 年 10 月 17 日)

3. RNA モジュール工学:分子デザインと進化工学の複合法による機能性 RNA の人工創製　第 23 回日本薬物動態学会年会(若手研究者シンポジウム)(熊本, H20 年 11 月 1 日)
4. Toward a reciprocal evolution system between RNA and peptides as an artificial model for the early RNP world　The 6th international symposium on nucleic acids chemistry (高山, H21 年 9 月 28 日)
5. RNP ワールドの単純モデル系としてのデザイン型 RNA-ペプチド複合体　第 82 回日本生化学会年会 シンポジウム (生命の起源と初期進化)(神戸, H21 年 10 月 21 日)

(B)本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

1. S. P. Ohuchi, **Y. Ikawa** and Y. Nakamura　Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3600-3607 (2008).
2. **Y. Ikawa**, S. Moriyama and H. Furuta　Facile syntheses of BODIPY derivatives for fluorescent labeling of the 5' and 3' ends of RNAs.　*Anal. Biochem.* **378**, 166-170 (2008).
3. **Y. Ikawa**, T. Shiohara, S. Ohuchi and T. Inoue　Concerted effects of two activator modules on the group I ribozyme reaction.　*J. Biochem.(Tokyo)* **145**, 429-435 (2009).
4. N. Kashiwagi, H. Furuta and **Y. Ikawa**　Primitive templated catalysis of a peptide ligation by self-folding RNAs.　*Nucleic Acids Res.* **37**, 2574-2583 (2009).
5. S. Matsumura, R. Ohmori, H. Saito, **Y. Ikawa** and T. Inoue　Coordinated control of a designed trans-acting ligase ribozyme by a loop-receptor interaction. *FEBS Lett.* **583**, 2819-2826 (2009)

研究課題別評価書

1．研究課題名
終止コドンを介した mRNA 動態制御機構の解明と応用

2．氏名
伊藤　耕一

3．研究のねらい
現存する生命は、終止コドンに様々な意味を付け加え多様な新機能性を獲得してきましたが、そのメカニズムは未解明です。終止コドンは、核酸であるtRNAではなく、ペプチド鎖解離因子と呼ばれるtRNA擬態タンパク質によって解読されます。本研究では、真核細胞におけるペプチド鎖解離因子の関わる多彩なRNA制御機能を解析し、RNAとタンパク質の世界をつなぐ生命原理の基盤を明らかにし、さらにその応用を目指します。

4．研究成果
我々は、tRNAの機能・構造を模倣することで、終止コドンの解読を媒介するタンパク質因子、ペプチド鎖解離因子をtRNA擬態タンパク質として位置づけ、その分子機構解明のための研究をすすめてきた。これまで先行して行ってきたバクテリア解離因子の研究から、タンパク質が実際にtRNA様の機能性を発揮する分子機構が数々明らかになっている。バクテリアの終止遺伝暗号解読は、（1）終止コドン特異性を示す解離因子がリボソームの遺伝暗号解読部位（DC）において、担当するコドンの解読を行うという点、（2）リボソームのペプチド転移活性中心部位（PTC）の活性化を伴うという点でtRNAに類似する一方、（3）翻訳伸長因子EF-Tuのようなキャリアタンパク質を必要としないという点で根本的な相違点が見られる。その後の機能・構造解析では、リボソーム機能時のバクテリアペプチド鎖解離因子の構造は、tRNAの主要な機能部位を模倣しつつ、単独でリボソームに結合し機能する特殊な構造を発達させたことが明らかになってきた。

一方、真核生物の翻訳終結においては、上記の、tRNAによる遺伝暗号解読機能との共通点（1）（2）を示す、ペプチド鎖解離因子eRF1に加え、（3）に関しても、EF-Tu（真核生物ではEF-1α）に高い相同性をもち、必須な第二の解離因子サブユニットeRF3が存在しeRF1と結合することで複合体を形成し機能するという共通点が明らかになっている。

バクテリアと真核生物の解離因子は、アミノ酸配列上の相同性が乏しく、反応の詳細も上述のように異なり、進化の途上全く異なる経路で確立したシステムと考えられた。このように真核生物の終止コドン解読機構は最後に残された未解明の遺伝暗号解読機構といえる。同時に、終止コドンの認識を介して引き起こされる遺伝子発現制御であるリコーディング機構や、NMDなどのmRNA品質管理機構を解明し、新規タンパク質合成や制御や疾病治療等、医工学的に応用する期待が高まっており、eRF1およびeRF3の機能構造解明を急ぐ必要があった。

我々は、まず、真核生物解離因子の複合体構造解明を試み、eRF1-eRF3の複合体構造をX線結晶解析と、X線小角散乱法を組み合わせた補完手法で解明した。複合体構造に見られた

特徴的部位の機能解析を実施し、検証した結果、これまでに明らかにしていた単体立体構造からでは理解できなかった解離因子固有の機能モードを分子レベルで解明する決定打を得ることに成功した。以下のように要約される。

【1】真核生物eRF1-eRF3複合体のEF-Tu・tRNAシステム形態擬態性

eRF1とeRF3・GTPの複合体は、EF-Tu・tRNA・GTP複合体に酷似する立体構造をとり、tRNA同様に、eRF1のコドン解読部位と、大サブユニット側のペプチド鎖転移活性中心で機能するGGQモチーフがtRNA機能部位と対応して配向する（図A参照）。EF-Tu様のキャリアGタンパク質を必要としないバクテリアとは全く異なり、真核生物では終止コドンの解読も、リボソームへの解読因子の運搬と終止コドンのプルーフリーディングといったtRNAと同様なGタンパク質制御システムを持つことが強く示唆される。

【2】eRF1のコドン認識機能ポケットの同定

新規eRF1結晶構造上のtRNAのアンチコドン対応部位にヌクレオチド結合部位（ATPポケット）を同定した（図A）。この結合部位のアミノ酸残基置換により、終止コドン2番目と3番目の塩基特異性を改変することが可能になった。また、3つの終止コドンのうち、異なる終止コドン特異性を保持する二つの変異体型ヒトeRF1を同時に酵母内で発現することにより、真核生物においてバクテリアライクな終止コドン運用が実現可能なことを示した（"Dual eRF1 System"）。Dual eRF1 Systemは、本研究において、真核生物で初めて実現可能なことが示されたバクテリア様終止コドン認識システムであり、終止コドン特異的なリコーディングを個別に解析したり、リコーディング機構を応用した新規なタンパク質産生に活用することができる。また、この技術を用いる事で、1アミノ酸残基が異なるだけのeRF1どうしの比較解析でコドン認識状態(Cognate vs Non-cognate)の比較解析が可能になった。自然界に存在する変則的遺伝暗号認識を示すeRF1はこのポケット部位の制御を行う事で変則性を獲得したものと考えられる。

【3】複合体上に見いだされた2カ所の主要なeRF1-eRF3結合インターフェース領域

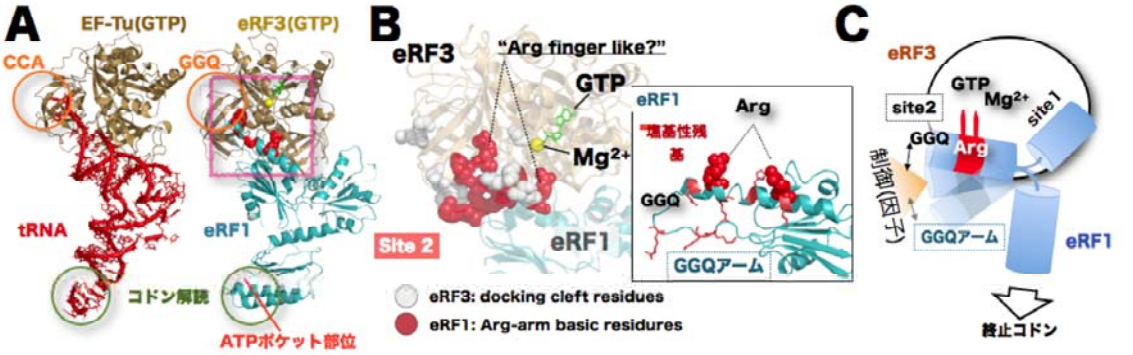
eRF1とeRF3の結合部位は、eRF3上の2箇所（Site1, Site2；図C）に明確に分割され、細胞質ではSite1での結合のみが優先的にグアニンヌクレオチド非依存的に起きている。Site2には、tRNAのCCAアームに対応するeRF1の可動性ドメイン（GGQアーム）が結合しうるが、細胞質中のeRF3は、GDPフォームに偏っておりリボソーム上で初めてGTPの結合促進が起きると想定されている。そのため、eRF1の可動性の高いドメイン間連結構造によりGGQアームはフリーな可動性を維持する。この可動構造により、tRNAシステムのような、リボソーム上で正しい終止コドン認識とGTPase活性発現がカップルした機能が実現可能になると考えられると当時に、リボソームAサイトで終止コドン認識を行った後で、accommodationステップとして、tRNAがCCAアームを向けPTCの活性化によるペプチド転移を受けるのと同様な機能性が発揮できるのだと思われる。

【4】eRF1タンパク質によるeRF3-GAP機能モデル

Site2にGGQアームが結合した後のeRF3のGTPase活性発現は、eRF1のArg-richアームからeRF3の活性中心方向に突き出た、保存性アルギニン残基が重要である（図B）。これは、Ras-RasGAPタンパク質間のGTPase活性化機構において、RasGAPからRasの提示されることで

電化の中和とGTPaseの促進化を引き起こすアルギニン残基（Arg-finger）を想起させる。このことによりコドン認識が正しく起きてもGGQアームがSite2にアクセスしない限り、リボソーム上でのGTPase活性が正しく促進されないため、これまでに示唆されてきた解離因子に結合する。機能制御因子はこの構造上の遊びをターゲットにする可能性が高い（図C）。これにより、アミノアシル化がなくともリボソーム上で３者複合体が適切に形成されたときに初めてGTPaseが誘引されることが合理的に説明できる。

上記、【３】【４】で示された構造と機能モデルは、これらの結合インターフェースが、本研究で目標にしてきた、eRFの機能性をターゲットとする創薬研究の重要部位であることを示唆するものである。



（A）伸長因子EF-Tu・tRNA（GTP）の立体構造（左）と、本研究で得られたeRF1・eRF3（GTP）の立体構造モデル。 eRF1・eRF3(GTP)の立体構造は、全体として酷似した形態をとり、真核生物においては、バクテリアよりも終止コドンの解読がtRNAに類似することを強く示唆した。本研究では、tRNA（左）に示した、コドン解読部位（緑〇）であるアンチコドンに対応した部分にATP分子が結合した立体構造を取得し、その機能解析を行い、この部位は実際にコドン識別に関与することを示すことができた。（B）（C）詳細は本文参照。

5. 自己評価

本研究では、「なぜ、どのようにタンパク質が終止コドンを解読するのか？」に答えるために、真核生物ペプチド鎖解離因子eRF1およびeRF3の複合体構造を解明することで、そこから得られた新しい翻訳終結機能モデルや、新概念・モデルの実証を行ってきた。新知見によるモデルは、これまでにバクテリア研究で得られていた解離因子のtRNA擬態性の通常概念を破る側面を示しており、これまでの相違点を包括的に説明することができる。タンパク質がタンパク質合成のために、RNAではなし得なかった巧みな制御機能構造を進化させた筋道は印象深く、特にGTPaseの活性化機構は、その他の生理機能に関わる数多くのGTP結合性タンパク質の機能性を考える上で重要な手かがりを提供できたと思う。これらは、今後終止遺伝暗号と共役する生命機能をターゲットとする、医工学的応用のターゲット部位として重要であると考えられる。

6. 研究総括の見解

mRNA上のコドンの内、終止コドンはtRNAではなく、ペプチド鎖解離因子と呼ばれるタンパク質に認識される。ペプチド鎖解離因子は、tRNA擬態タンパク質として知られている。本研究では、真核

細胞における、終止コドンを介したmRNA動態制御機構の解明を目指した。真核細胞の翻訳終結においては、ペプチド鎖解離因子eRF1と解離因子サブユニットeRF3が結合した複合体が機能することが明らかになっていた。そこで、本研究では、eRF1-eRF3の複合体構造をX線結晶解析とX線小角散乱法を組み合わせて解明し、複合体構造に見られた特徴的部位の機能解析を行い、終止コドン認識システムなど、解離因子固有の機能解明を進めたものである。本研究で明らかとなった成果は、今後終止コドンと共役する生命機能をターゲットとした応用研究の基盤として貢献するものと期待される。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Zhihong Cheng,Kazuki Saito,Andrey V. Pisarev,Miki Wada,Vera P. Pisareva,Tatyana V. Pestova,Michal Gajda, Adam Round,Chunguang Kong,Mengkiat Lim, Yoshikazu Nakamura, Dmitri I. Svergun, Koichi Ito, and Haiwei Song Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1 Genes & Development 23: 1106-1118 (2009)

2. Kodama, H., Ito, K., Nakamura, Y. The role of N-terminal domain of translational release factor eRF3 for the control of functionality and stability in S. cerevisiae Genes Cells. 5 639-650 (2007).

.

②著書

1. 翻訳調節における翻訳終結制御機構の新知見
伊藤 耕一 実験医学 25(1), 19-24, 2007

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Oanh Thi Phuong Kim, Aki Sakurai, Kazuki Saito, Koichi Ito, Kenji Ikehara, Terue Harumoto Ciliates use both variant and universal genetic codes: Evidence of omnipotent eRF1s in the class Litostomatea Gene. 417 51-58 (2008)

研究課題別評価書

1．研究課題名
パイ電子充填型人工核酸の創製と活用

2．氏名
上野　義仁

3．研究のねらい
パイ電子に富むベンゼン環の特性を活用した高機能化した RNA 検出分子および RNA 発現抑制分子の開発を目的とした。具体的には、ベンゼン−リン酸骨格から成る核酸アナログが、天然の核酸とは二重鎖構造を形成しないがアナログ同士では安定なハイブリッドを形成することに着目した、高機能化した RNA 検出用のモレキュラービーコン（MB）の開発を目的とした。このものを基盤上に固定化することで RNA 診断あるいは DNA 診断に応用可能なチップを作成することが可能となる。

また、ベンゼン−リン酸骨格から成る核酸アナログとタンパク質との疎水性相互作用に着目した、ベンゼン−リン酸骨格をダングリングエンドに導入した新規 siRNA（small interfering RNA）の開発を目指した。ベンゼン−リン酸骨格をダングリングエンド部位に導入することにより、これまでのダングリングエンド部位における制約を回避した、将来的に、核酸医薬への応用も可能な高機能化した siRNA の創製が可能となる。

4．研究成果
筆者は、本研究を開始するに当たり、DNA の構成単位であるヌクレオシドの糖部を、糖とは全く異なるベンゼン環で置換した核酸塩基−ベンゼンから成るヌクレオシドアナログを基本単位としたベンゼン−リン酸骨格から成る核酸アナログの開発に成功していた（図１）。本ヌクレオシドアナログは、ベンゼン環と塩基部位が直接結合していることから両者の間に二面角を持つ。オリゴマー中においても、ベンゼン−リン酸骨格に対して各塩基が角度を持って配向し、相補鎖中の各塩基と効果的に水素結合していると推察される。実際に、ベンゼン−リン酸骨格から成る本核酸アナログは、天然の核酸とは二重鎖を形成しないが、アナログ同士で熱的、熱力学的に安定なハイブリッドを形成することが明らかとなっている。

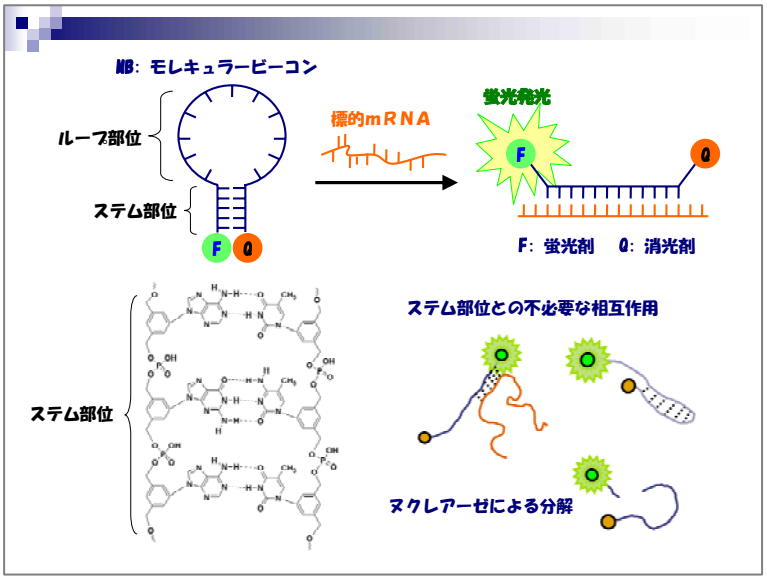


図１　ベンゼン−リン酸骨格から成る核酸アナログの構造とステム部位にアナログを導入したモレキュラービーコン（MB）による標的 mRNA の検出。

一方、モレキュラービーコン（MB）はステム&ループ構造から成るヘアピン型核酸で、この状態では蛍光剤から発せられた蛍光は消光剤によって消光されている。しかし、ループ部位に相補な核酸が存在すると二重鎖を形成しステム部位が解離するため、消光剤が蛍光剤から離れ蛍光が観察され

る。これにより、標的 DNA および RNA を検出することが可能となる。MB を RNA 検出に利用する際の問題点として、MB 自身が細胞内に存在するヌクレアーゼにより分解され、RNA 非存在下においても蛍光を発しバックグラウンドが上昇しまうこと、また、ステム部位とループ部位あるいは標的以外の RNA との不必要な相互作用により蛍光強度が変化してしまうこと等が挙げられる。

本研究では、これらの問題点を解決すべく、ベンゼン−リン酸骨格から成る核酸アナログをステム部位に導入したMBを設計・合成し、その性質について検証した（図1）。ベンゼン−リン酸骨格から成る核酸アナログは、天然の核酸とは二重鎖を形成しないがアナログ同士では安定なハイブリッドを形成することから、本アナログをステム部位に導入することで上述した問題点を解決できると考えた。その結果、アナログをステム部位に導入することにより、ヌクレアーゼに対する抵抗性が向上すること、また、ステム部位の不必要な相互作用により蛍光強度が変化すると言った問題点を改善できることが明らかとなった。

続いて、ベンゼン環に各種芳香環を結合させたビアリール型ユニットをリン酸ジエステル結合で連結させた蛍光性色素集積体の合成並びにビアリール型ユニットをステム部位に導入したMB の合成と、その RNA 検出能について検討した（図2）。各ビアリール型ユニットは、ベンゼン環と芳香環との間に二面角を持つことから、これらをリン酸ジエステル結合で連結することにより各種芳香環をベンゼン−リン酸骨格に沿って水平に集積することが可能となる。

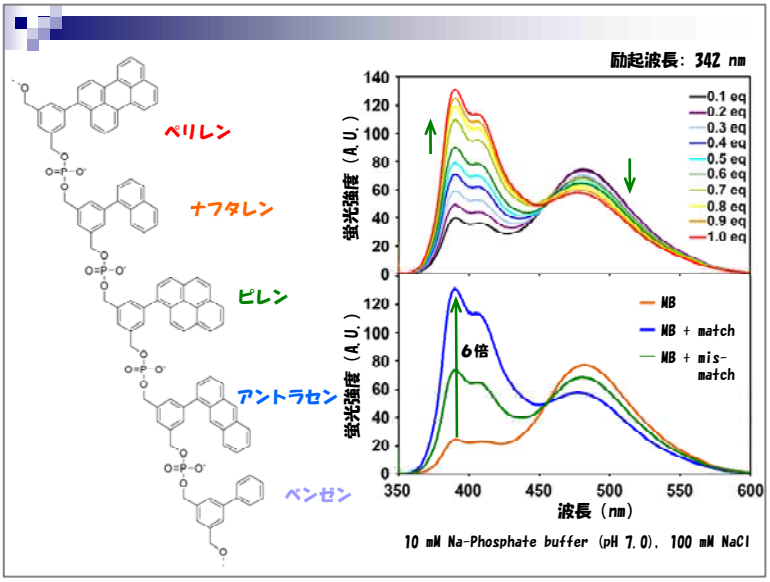


図2　ビアリール型ユニットをリン酸ジエステル結合で連結した蛍光色素集積体の構造とステム部位にビアリール型ユニットを導入したモレキュラービーコン（MB）による標的 mRNA の検出。

合成した蛍光性色素集積体の蛍光特性を検証した。その結果、ビアリール型ユニットの種類、数、配列を変えることにより、単一の励起波長で 380〜650nm 間の様々な波長の蛍光を生じさせることが可能であることが分った。また、ビアリール型ユニットを導入した DNA 二重鎖の性質を検証した。その結果、ビアリール型ユニットを導入することにより二重鎖の熱的、熱力学的安定性が向上すること、また、その安定化は芳香環の疎水性相互作用によるものであることが明らかとなった。ピレンを導入したビアリール型ユニットを DNA の中央に集積させることにより、エキシマー発光が観察され、その強度はユニットの数に伴い増大した。

続いて、ビアリール型ユニットの本特性を MB に応用した。即ち、ピレン型ビアリールユニットをステム部位に導入することで、モノマーおよびエキシマー発光により一塩基多型を検出可能なエンドフリーの MB を創製出来ると考えた（図2）。薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子を標的とした。その結果、ピレン型ビアリールユニットを MB のステム部位に導入することで、モノマーおよびエキシマー発光により *CYP2C9* 中の一塩基多型を検出することが可能であることが分った。本MB はエンドフリーのため、末端の水酸基を介してMBをさらに修飾することが可能であり、今後、様々な応用が可能になる。

RNA 特異的な核酸アナログを開発する過程で図3に示す糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを合成した。本アナログは、400nm を中心に強い蛍光を持ち、メタノール中での蛍光量子収率は 0.83 であった。また、その蛍光強度は溶媒の極性に依存し、極性溶媒中では強く

非極性溶媒中では低下した。本アナログを用いた一塩基多型の検出について検討した。即ち、本アナログをバルジ型に鎖の中央に導入した DNA プローブを設計・合成した。アナログに隣接する塩基が相補塩基と塩基対を形成する場合には、自由度の高い糖部開環型の三環性アナログは二重鎖外にフリップアウトし、水中に露出するため蛍光を発する。一方、隣接する塩基が、標的塩基とミスマッチの場合には、よりインターカレートし易い三環性アナログが二重鎖内に入り込み疎水性条件下に置かれるため蛍光が消光する。これにより一塩基多型を検出可能と考えた。薬剤耐性に関与する MDR1 の遺伝子を標的とした。標的が DNA 鎖、RNA 鎖いずれにおいても隣接する塩基が標的塩基とマッチ配列の場合に最も蛍光が強くなることが判明した。

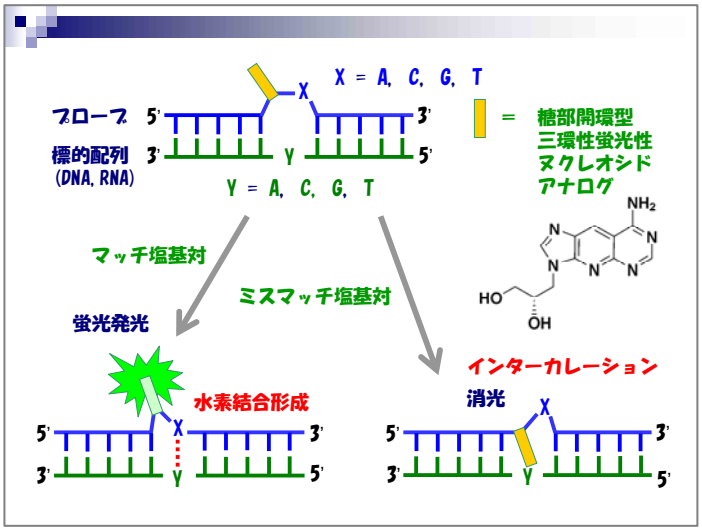


図3　糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出。

このことから本三環性アナログを用いることにより DNA および RNA 鎖中の四種の一塩基多型を検出可能であることが明らかとなった。また同時に、隣接塩基と標的塩基が T(U):G ペアーの場合においても蛍光強度が増大した。これは、T(U)、G 塩基間における wobble 型の塩基対形成に起因するものである。これに関しては、今後解決法を検討して行く予定である。

siRNA(small interfering RNA)は、疾患に関与する遺伝子の塩基配列が明らかであれば、siRNA を論理的に設計・合成できることから、核酸医薬としての期待が高い。X線結晶構造解析の結果より、siRNA の 3′ −末端ダングリングエンド二塩基は、Ago タンパク質中の Paz ドメインに存在する疎水性ポケットに入り込み認識されていることが明らかになっている。

siRNA のヌクレアーゼ耐性の向上および RNAi 誘導活性の増強を目的とし、ダングリングエンド部位に各種ビアリール型ユニットを導入した siRNA を設計・合成し、そのタンパク質発現抑制活性について検証した。その

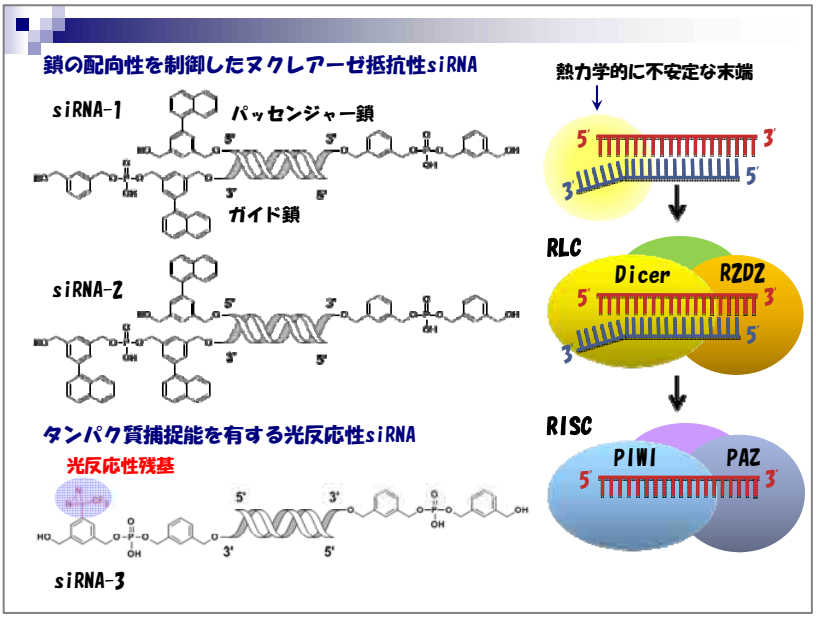


図4　ビアリール型ユニットを導入することにより鎖の配向性を制御したヌクレアーゼ抵抗性 siRNA 並びに光反応性残基を導入したタンパク質捕捉能を有する siRNA の構造。

結果、ベンゼンおよびナフタレン型ビアリールを導入した siRNA の活性はチミジンを導入したものと同等かそれ以上であったのに対し、フェナントレン、ピレン型ビアリールを導入した siRNA では活性が大幅に減弱した。このことからPazドメインの疎水性ポケットにはナフタレン型ビアリール程度までの大きさが許容されることが明らかとなった。

これらの結果を基に、センス鎖の 5′ −末端ならびにアンチセンス鎖の 3′ −末端にナフタレン型ビアリールを導入した siRNA を設計・合成した（図4）。両鎖にこれらのユニットを導入することにより、導入した末端部位の二重鎖の熱力学的安定性が上昇しアンチセンス鎖の選択性が向上すること、さらにセンス鎖の 5′ −末端にビアリール型ユニットを導入することでセンス鎖の 5′ −末端リン酸化が抑制され、センス鎖によるオフターゲット効果が抑制されると考えた。センス鎖の 5′ −末端領域に U:A 塩基対が多く存在する配列を用いて活性を検証した。その結果、未修飾の siRNA では活性が全く見られないのに対し、修飾 siRNA では 30nM においてタンパク質の発現を効果的に抑制した。本修飾 siRNA は、0.1nM の濃度で in vitro において C 型肝炎ウイルス（HCV）の複製を効果的に抑制した。また、3′ −末端ダングリングエンドのベンゼン-リン酸骨格部位に光反応性残基を導入した siRNA を設計・合成し（図4）、その機能について検証した。その結果、本修飾 siRNA は、RNA 干渉に関与するタンパク質を解析する上で有用なプローブであることを明らかにした。

5. 自己評価

二分子の芳香族化合物を直接結合させることにより生じる二面角を利用した新しいヌクレオシドユニットとして、ベンゼン環に直接核酸塩基及び各種芳香族化合物を結合させたビアリール型のヌクレオシドアナログを設計・合成し、このものをモレキュラービーコン及び siRNA に導入することにより、設計したビアリール型ユニットの有用性、即ち、本ユニットを導入することによりそれぞれの分子を高機能化することが可能であることを示すことに成功した。また、糖部開環型の新規三環性ヌクレオシドアナログを含む蛍光性核酸プローブ、及び光反応性残基を導入したクロスリンク能を有する siRNA を設計・合成し、in vitro の系において、それぞれの分子の有用性を示すことに成功した。

一方で、当初計画していた合成したモレキュラービーコン、核酸プローブのマイクローアレーへの応用、及び siRNA の in vivo への応用研究は不十分なものであった。これらに関しては、今後引き続きチャレンジして行きたいと考えている。また、研究期間中の研究成果の論文化に関するアクティビティーが必ずしも十分なものではなかった。得られた成果は今後出来るだけ早く論文化して行きたい。

6. 研究総括の見解

ベンゼン環の特性を活用し、高機能化した人工 RNA 分子の開発を目指した研究を展開した。まず、ヌクレオシドの糖部をベンゼン環で置換したヌクレオシドアナログ（ベンゼン−リン酸骨格からなる）をシュテム部分に持つモレキュラービーコンを作製した。この RNA は、ヌクレアーゼに対する抵抗性が向上し、シュテム部分は核酸と二本鎖を形成しないため、蛍光強度が変化するといった問題点を改善することが出来た。また、siRNA の末端の鎖の配向性を制御することによりヌクレアーゼ抵抗性とし、Ago タンパク質に取り込ませた。この修飾 siRNA は 0.1nM の濃度で in vitro においてC型肝炎ウイルスの複製を阻害した。このように、パイ電子に富むベンゼン環を活用した人工 RNA の開発を行い有効に働く可能性を示した功績は高く評価している。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

(1)論文（原著論文）発表 ***Corresponding author**

1. Yoshihito Ueno*, Koshi Kawada, Tomoharu Naito, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Hye-Sook Kim, Yusuke Wataya, Yukio Kitade, “Synthesis and silencing properties of siRNA possessing lipophilic groups at their 3′ -termini”, Bioorg. Med. Chem., 16, 7698-7704

(2008).

2. Yoshihito Ueno*, Miki Hirai, Kayo Yoshikaw, Yoshiaki Kitamura, Yoko Hirata, Kazutoshi Kiuchi, Yukio Kitade, “Synthesis and properties of siRNA containing 5′-amino-2′,5′-dideoxy-2′α-fluororibonucleosides”, Tetrahedron, 64, 11328-11334 (2008).
3. Yoshihito Ueno*, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade, “Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs”, Bioorg. Med. Chem., 17, 1974-1981 (2009).
4. Yoshihito Ueno*, Akihiro Kawamura, Keiji Takasu, Shinji Komatsuzaki, Takumi Kato, Satoru Kuboe, Yoshiaki Kitamura, and Yukio Kitade, “Synthesis and properties of a novel molecular beacon containing a benzene-phosphate backbone at its stem moiety”, Org. Biomol. Chem., 7, 2761-2769 (2009).
5. Yoshihito Ueno*, Shinji Komatsuzaki, Keiji Takasu, Satoru Kawai, Yoshiaki Kitamura, and Yukio Kitade, “Synthesis and properties of oligonucleotides containing novel fluorescent biaryl units”, Eur. J. Org. Chem., 28, 4763-4769 (2009).

（2）特許

研究期間累積件数：2件

発　明　者：上野義仁、北出幸夫
発明の名称：RNA 選択的ハイブリダイズ試薬及びその利用
出　願　人：独立行政法人科学技術振興機構
出　願　日：平成 20 年 3 月 11 日
出願番号：PCT/JP2009/054675

発　明　者：上野義仁、北出幸夫
発明の名称：オリゴヌクレオチド誘導体、ラベル化剤及びその利用
出　願　人：独立行政法人科学技術振興機構
出　願　日：平成 20 年 11 月 14 日
出願番号：PCT/JP2009/068785

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

（1）論文

1. Tadamiki Tsuruta, Kentaro Oh-hashi, Yoshihito Ueno, Yukio Kitade, Kazutoshi Kiuchi, Yoko Hirata*, “RNAi knockdown of caspase-activated DNase inhibits rotenone-induce DNA fragmentation in HeLa cells”, Neurochemistry International, 50, 601-606 (2007).
2. Yoshihito Ueno*, Takumi Inoue, Mahito Yoshida, Kayo Yoshikawa, Aya Shibata, Yoshiaki Kitamura, Yukio Kitade, “Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing benzene-phosphate backbones in their 3′-overhang regions”, Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 5194-5196 (2008).
3. Yoshihito Ueno*, Kayo Yoshikawa, Yoshiaki Kitamura, Yukio Kitade, “Effect of incorporation of alkyl linkers into siRNAs on RNA interference”, Bioorg. Med. Chem. Lett., 19, 875-877 (2009).

研究課題別評価書

1．研究課題名
ショウジョウバエをモデル系とした mRNA 型 non-coding RNA の解析

2．氏名
影山　裕二

3．研究のねらい
真核生物のゲノムからはおびただしい数の non-coding RNA が転写されていると考えられている。これら non-coding RNA の多くは、比較的高分子（500 nt～）で、3’末端に poly(A)鎖を含み、しばしばスプライシングを受けることから、mRNA 型 non-coding RNA と呼ばれている。mRNA 型 non-coding RNA は、その存在量の多さから、生物学的に重要な分子であると推測されているが、それらが本当にタンパク質をコードしていないのかどうかも含めて、その生物学的役割についてはほとんど解析が進んでいない。
ショウジョウバエでは、32 個の mRNA 型 non-coding RNA 候補遺伝子（MRE 遺伝子）が同定されており、そのほとんどが組織特異的な発現様式を示すことが明らかになっている。細胞分化や行動・記憶などの高次生命現象を指標に、ショウジョウバエ遺伝学の多彩な手法を駆使した解析を行うことにより、mRNA 型 non-coding RNA の機能を明らかにすることができると期待される。本研究課題では、ショウジョウバエ mRNA 型 non-coding RNA 遺伝子群のうち 6 個に焦点を絞り、その機能を詳細に解析することにより、従来の研究では明らかにされてこなかった RNA 分子の新たな機能の発見を目指した。

4．研究成果
i) *MRE29/polished rice* 遺伝子の生理機能の同定
ショウジョウバエには32個のmRNA型non-coding RNA候補遺伝子（MRE遺伝子）があり、そのうちの6個（MRE3, 16, 29, 31, 32, 33）は転写産物のほぼ全長を含む完全長cDNAがクローニングされている。これら6個のMREについてRNAi系統を作成し、その表現型を解析したところ、MRE29のRNAi系統が胚性致死を示すことが明らかとなった。なお、これまでの研究により、MRE29は胚発生期においては表皮、消化管および気管に発現していることを明らかにしている。
MRE29遺伝子について転写領域を完全に欠失した変異系統を作成し、その表現型を解析したところ、幼虫表皮にある細胞突起（ventral denticleおよびdorsal hair）が完全に消失しており、呼吸器官である気管にみられる細胞突起（taenidium）に著しい異

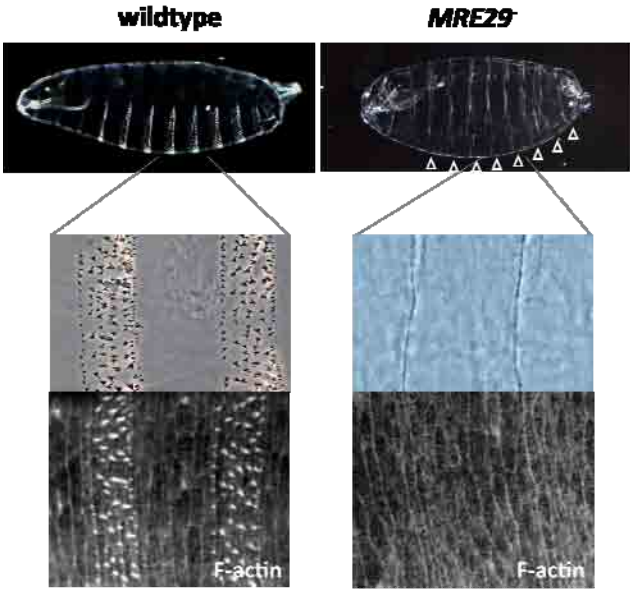


図1．胚発生期における *pri* 表現型
pri 変異体（右）では、野生型（左）にみられる腹部幼虫表皮の細胞突起（上段矢頭および中段）が欠失しており、細胞突起直下に観察されるはずのアクチン束も消失する（下段）。

常が見られた(図1)。これらの表現型から、*MRE29*遺伝子を*polished rice*(*pri*)と再命名した。*pri*変異体では上記の細胞突起形成に必須とされているアクチン束構造が完全に消失しており、アクチン細胞骨格の再構成制御機構を介して細胞の形態形成に関与していると結論づけられた。

*pri*は胚発生期ばかりでなく、幼虫から蛹にかけての変態期に強く発現するが、*pri*変異の遺伝学的モザイク個体が変態期に致死であることから、変態期の成虫原基の発生においても*pri*が必須であることが示された。さらに変態期特異的に致死となる*pri*の対立遺伝子を作成して解析を行ったところ、変態期において脱皮ホルモンのシグナル伝達に中心的な役割を果たす転写因子群の一部(E74およびE75A)の発現が減少していた。このことから、*pri*が転写因子を介した変態期の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(図2)。

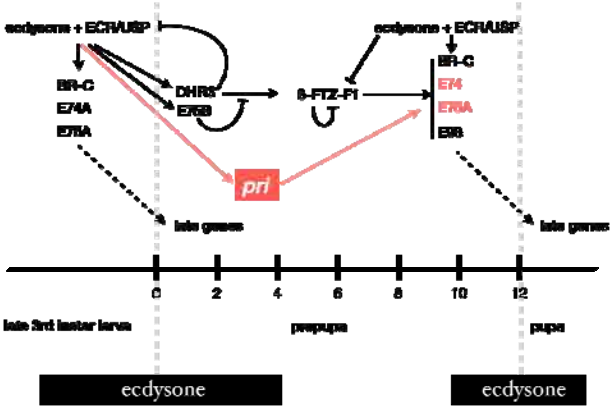


図2. 変態期における *pri* の機能
変態期には、脱皮ホルモン ecdysone の受容体 EcR を起点とした転写因子の遺伝子発現制御カスケードが形成されている。*pri* は、従来知られていた DHR3/FTZ-F1 経路とは独立に、E74 および E75A の発現を制御しており、前蛹期/蛹期の移行に重要な役割を果たしている。

ii) 真核生物で最小の ORF の発見

*pri*遺伝子産物がnon-coding RNAであるかどうかを検証するため、*pri* cDNA中の各ORFにEGFP ORFを挿入したコンストラクトをそれぞれ作成し、ショウジョウバエ培養細胞に導入すると、5'側の 4 つのORF(11-32 アミノ酸長)との融合コンストラクトでは蛍光が観察されることから、これら 4 つのORFが実際に翻訳されていると考えられた。いずれのORFについても、ORF断片のみを含むトランスジーンが*pri*表現型をほぼ回復することができ、また全てのORFにフレームシフトを導入したトランスジーンでは遺伝子活性が完全になくなることから、これらのORFが遺伝子活性に必要十分であり、個々のORFが機能的に冗長であることが判明した。これらのORFは極端に短いため、近縁種のゲノム配列を元にした通常のアミノ酸配列の類似性解析では高いスコアを示さないが、核酸配列の類似性を元に手動で近縁種ゲノム配列のアラインメントを行うと、核酸配列よりもむしろアミノ酸配列の類似性が高いことが明らかとなった。また、これら 4 つのORFはLDPTG[Q/T]Yという共通のアミノ酸配列を含んでおり、機能の冗長性とよく一致する。以上の結果から、*pri*遺伝子は機能的に冗長な 4 つの短鎖ペプチドをポリシストロニックにコードするユニークな遺伝子であることが明らかになった(図3)。これらORFのうち 3 個はわずか 11 アミノ酸からなる短鎖ペプチドをコードしており、これは真核生物では最も小さいものである。

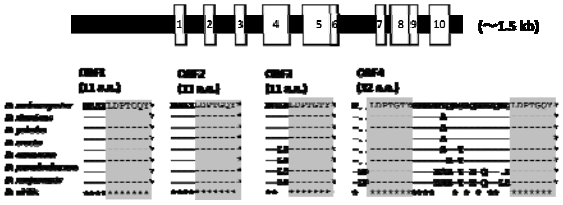


図3. *pri* 遺伝子の ORF
pri mRNA は約 1.5 kb であり、10 個の ORF を含む。このうち 5'側の 4 個の ORF は翻訳され、遺伝子産物として機能する。これらの遺伝子産物は LDPTG[Q/T]Y という 7 アミノ酸の共通配列を含んでいる。

iii) *pri* 遺伝子産物の分子機能

*pri*遺伝子産物(PRIペプチド)の分子機能を明らかにするため、幼虫表皮のdenticle形成に

焦点を絞り、*pri*表現型のさらに詳細な解析を行った。denticle形成のマスター遺伝子*shavenbaby*(*svb*)は転写因子をコードしており、その標的遺伝子である*miniature*や*shavenoid*の発現を制御することが知られている。一連の解析により、a) *pri*変異体では*svb*の発現には変化がみられないにもかかわらず、*miniature*および*shavenoid*の発現はほぼ完全に消失すること、b) SVBタンパク質は核内においてドット状に局在しているが、PRIペプチド存在下では核質全体に検出されること、c) 培養細胞を用いた転写レポーターアッセイから、SVB単独では転写抑制因子として機能するが、PRIペプチド存在下では転写活性化因子として機能すること、d) SVBにはN末端を大きく欠いたアイソフォームが存在し、このアイソフォームはPRIペプチド依存的にみられることが判明し、PRIペプチドはSVBタンパク質の活性制御を介して細胞突起形成に関与することが明らかとなった(図4)。

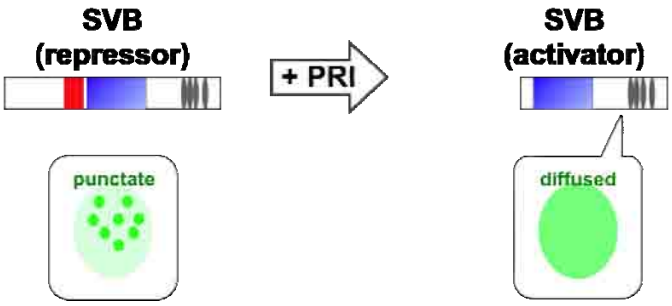


図4. PRI ペプチドの機能
Shavenbaby は転写抑制ドメイン(赤)、転写活性化ドメイン(青)、Zn フィンガー型 DNA 結合ドメイン(灰)を含む転写制御因子である。PRI ペプチド非存在下では転写抑制因子として機能するが、PRI ペプチド存在下では N 末端が欠失し、転写活性化因子となる。

5. 自己評価

研究計画にあった 6 個の MRE 遺伝子に対する RNAi 系統および強制発現系統の作成と表現型の解析については、各系統の致死性や形態異常の有無の観察に関しては計画通り達成された。しかしながら、個々の遺伝子に関する詳細な解析については、*MRE29/pri* に関する解析以外では、*MRE32* 変異体の DNA マイクロアレイ解析と大まかな表現型の解析が行われたのみであり、目標とした 6 個全ての遺伝子に関する解析は達成できなかった。また、non-coding RNA の翻訳性の有無に関しては *MRE29/pri* のみについて行われており、それ以外の遺伝子についての解析は行われていない。これらは計画当初に予想していなかった短鎖ペプチド遺伝子の発見に伴い、並行的に複数の遺伝子を解析するのではなく、特定の遺伝子の詳細な解析に発展的に研究を展開したことに起因している。*pri* 遺伝子の遺伝学的解析については予想外の成果を上げることができた一方で、他の MRE 遺伝子群の解析については未解決のままであり、特に non-coding RNA として働く MRE の同定と分子機能の解析については全く進展がみられず、今後の大きな課題として残された。

6. 研究総括の見解

真核生物のゲノムからは、多くの non-coding RNA が転写されている。ここでは、ショウジョウバエの mRNA 型 non-coding RNA のうち MRE29 に着目し、その機能解析を行った。その結果、この遺伝子は、アクチン細胞骨格の再構成制御機構を介して細胞の形態形成(denticle 形成)に関与していることを明らかにした。細胞の形態から、MRE29 遺伝子を polished rice (pri)と再命名した。さらに pri が転写因子(E74 および E75A)を介した変態期の遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。ところが、その後 pri の 10 個の ORF の内、5'側の 4 個の ORF は翻訳されていること、この pri 遺伝子産物が pri 遺伝子活性を担っていることなどが判明した。Denticle 形成のマスター遺伝子 shavenbaby (svb)産物(転写因子)は pri 存在下で活性を持つようになることも明らかにした。最初の目標である mRNA 型 non-coding RNA の解析とはならなかったが、MRE29 に関する多くの細胞機能を明らかにした点は非常に高く評価出来る。ORF のうち3個はわずか11アミノ酸からなる短鎖ペプチドをコードしており、真核生物では最も小さな遺伝子産物であった。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Takefumi Kondo, Hashimoto, Y., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S. and Kageyama, Y. Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. ***Nat. Cell Biol.*** 9: 660-665. (2007)

②著書

1. Yoshiko Hashimoto, Kondo, K. and Kageyama, Y. Lilliputians get into the limelight - novel class of small peptide genes in morphogenesis. Develop. Growth Diff. 50: S269-276. (2008)

2. 近藤武史、影山裕二 short ORF にコードされる短鎖ペプチドの機能
蛋白質・核酸・酵素 53: 20-27 (2008)

3. 影山裕二、近藤武史 臨床に必要な神経薬理・科学:ポリシストロニックにコードされる短鎖ペプチド Clinical Neuroscience 26 (3): 242-243 (2008)

4. 影山裕二、佐藤仁泰
無敵のバイオテクニカルシリーズ・RNA 実験ノート 稲田利文・塩見春彦 編(羊土社)
第3章 4. ショウジョウバエにおける RNAi の誘導 pp109-117. 2008 年 3 月

5. 影山裕二
分子昆虫学 ―ポストゲノムの昆虫研究― 畠山正統他 編(共立出版) 第2章 3. 性決定 pp. 68-79、5. Non-coding RNA による分子制御 pp. 118-128. 2009 年 8 月

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Satoko Aratani., Kageyama, Y., Nakamura, A., Fujita, H., Fujii, R., Nishioka, K. and Nakajima, T. MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila*.
Int. J. Molec. Med. 21: 469-476. (2008)

2. Yasuo Agawa, Sarhan, M., Kageyama, Y., Akagi, K., Takai, M, Hashiyama, K, Wada, T., Handa, H., Iwamatsu, A., Hirose, S. and Ueda, H. *Drosophila* Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. ***Molec. Cell. Biol.*** 27: 8739-8747. (2007)

研究課題別評価書

1．研究課題名

線虫を用いた RNAi 反応機構の遺伝生化学的解析

2．氏名

田原　浩昭

3．研究のねらい

RNA interference（RNAi）とは細胞に 2 本鎖 RNA（dsRNA）を導入した場合に相同配列を持つ遺伝子の発現抑制が生じる現象である。様々な真核生物において遺伝子発現を制御するする新しい手段として、基礎研究において盛んに利用されているのみならず将来の医療や植物育種等への RNAi の応用が期待されている。又、RNAi は転移因子やウイルスに対する防御反応と類似した現象であることが分かってきている。このように、RNAi は基礎および応用の両面で興味深い現象であり、RNAi の反応機構を詳しく解析して理解することが求められている。

本研究では、線虫 *C. elegans* をモデル生物として生化学と遺伝学を組み合わせた複合的な解析を行うことによって、RNAi のサイレンシング効率に密接に関連する反応について新たな理解を得ることを目指した。特に、以下の課題に重点を置いて研究を進めることにした。① RNAi におけるサイレンシングシグナルの増幅装置に相当すると考えられる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRP）の生化学的性質を解明する。② 一般的な RNAi においては配列特異的な mRNA 切断活性が誘導されると考えられており、RdRP を持たない生物ではサイレンシング効率の鍵を担う中心的反応として研究がなされている。RdRP を持つ線虫においても mRNA 切断活性の性質を明らかにし、その活性を担う因子を同定する。

4．研究成果

(1) <u>背景</u>

RNAi および類似現象においては、標的遺伝子と相同な 20–25 塩基長（nt）の small interfering RNA（siRNA）が中間産物として重要な役割を果たしていることが知られている。

線虫や植物そして菌類における遺伝学的な研究は、RNAi および類似現象の機構に Argonaute 蛋白や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRP）等が関与していることを明らかとしてきた。又、ショウジョウバエや哺乳類細胞における研究では、試験管内で RNAi を再現する無細胞反応系が構築されて活用され、以下の 2 つの活性が明らかとなっている。導入された dsRNA は、Dicer の RNase III 活性によって 5’ 末端にモノ燐酸を持ち 3’ 末端が突出している 2 本鎖 siRNA（初期型）へと断片化される。siRNA はエンドヌクレアーゼ活性を持つ Argonaute 蛋白と一緒に RNA-induced silencing complex（RISC）と呼ばれる複合体を形成し、RISC は標的 mRNA を配列特異的に認識して切断する（Slicer 活性）。

現在、標的遺伝子と相同な小分子 RNA が関与する多様な遺伝子発現抑制現象も、RNAi と広義に呼ばれるようになってきている。又、典型的な RNAi の経路は標的 mRNA の不安定化を生じるが、内在性の RNAi 反応の一種として染色体の標的領域のヘテロクロマチン化を誘導する経路も存在することが分裂酵母等の研究で分かっている。

(2) <u>線虫の RNAi 反応機構を解析するための無細胞反応系の開発</u>

これまでに本研究者は線虫 *C. elegans* をモデル生物として用いて RNAi について遺伝学的な解析を行い、RNAi に必要な因子を複数同定してきた。研究の次の段階として、RNAi 反応機構における左記の RNAi 必要因子の上下関係および RNA の流れを明らかにしたいと考えた。そこで、線虫の細胞抽出液を用いて RNAi に関連する酵素活性を試験管内で解析するための無細胞反応系を独自に開発して、これまで単離されてきた RNAi 欠損変異体と組み合わせた解析を行うことによって、RNAi 反応機構の概略を遺伝生化学的に記述することにした。

開発した無細胞反応系が適切に機能することを確かめるために、まず RNAi 反応の初期に働く Dicer の活性を調べたところ、長い dsRNA を 23–24 nt の 2 本鎖 siRNA へ断片化する活性を確認できた。ちなみに線虫に一つだけ存在する Dicer 蛋白は DCR-1 と呼ばれ、DCR-1 と dsRNA 結合蛋白である RDE-4 の複合体が初期型 siRNA の産生を担っていることが知られている。

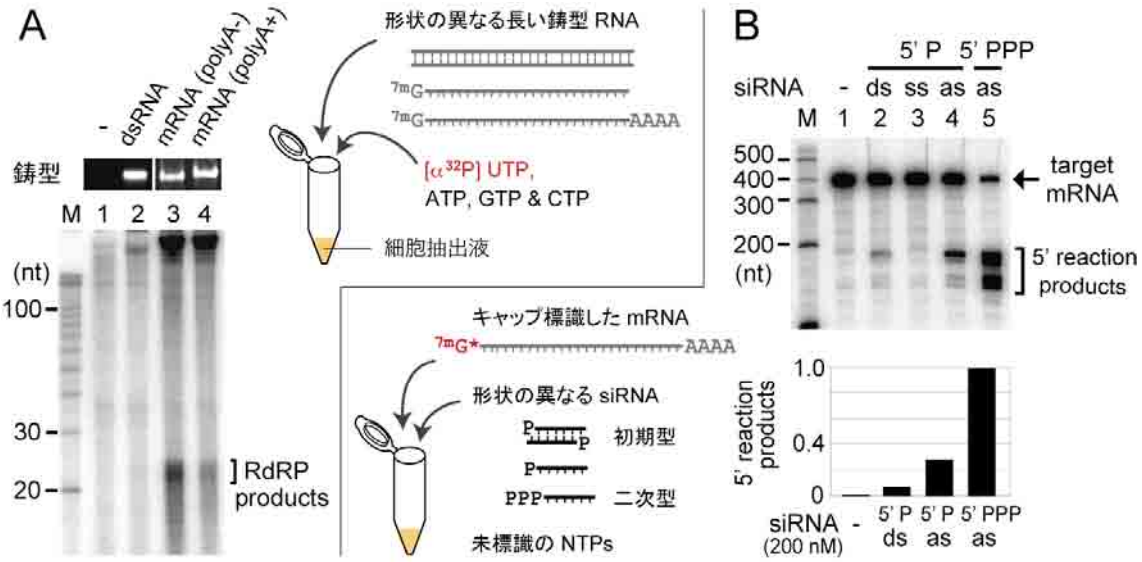


図 1 線虫の細胞抽出液を用いた無細胞系で検出した RdRP 活性および Slicer 活性

A) 長い 1 本鎖 RNA を鋳型として小分子 RNA を合成する RdRP 活性を検出した。細胞質の高分子量画分に対して内在性核酸を除去する処理を行い、その後に各種の鋳型 RNA (dsRNA、正常な mRNA、poly-A を欠いた mRNA) を導入して RI 標識したヌクレオチド存在下で反応させた。
B) 形状の異なる siRNA は mRNA を配列特異的に切断する Slicer 活性を異なる強度で誘導した。モノ燐酸化された 2 本鎖 siRNA、モノ燐酸化された 1 本鎖 siRNA、トリ燐酸化された 1 本鎖 siRNA を細胞質画分へ導入して、標識した mRNA に対して反応させた。レーン 5 の 5' 反応産物が複数のバンドとなっているのは、mRNA が Slicer 活性で切断を受けた後にエキソヌクレアーゼ様活性の攻撃を受けていることを示唆している。
ds (2 本鎖)、ss (センス 1 本鎖)、as (アンチセンス 1 本鎖)。

(3) サイレンシングシグナルの増幅装置に相当する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの生化学的性質の解明

植物や菌類等では、double-psi ・-barrel (DPBB) 構造の活性ドメインを持つ RdRP が RNAi および類似現象におけるサイレンシングシグナルの増幅に関与している。DPBB 構造を持つ RdRP は線虫やナメクジウオにおいても存在しているが、脊椎動物や昆虫では見つかっていない。

線虫が持つ RdRP 活性の生化学的性質を明らかにすることを目的として細胞抽出液へ鋳型 RNA を導入する実験を行い、RdRP 活性を反映すると考えられる 21–23 nt の小分子 RNA の産生を検出した(図 1A)。その RdRP 活性の鋳型としては、dsRNA よりもむしろ mRNA のような長い 1 本鎖 RNA が適しているという結果を得た。線虫においては、RdRP のコア蛋白をコードする遺伝子が 4 つ存在している。無細胞反応系を用いた解析によって、RdRP の変異体の一つであり RNAi に異常を示す *rrf-1* では小分子 RNA を合成する RdRP 活性が 10% もしくはそれ以下に減少していることが分かった。幾つかの他グループの最近の研究は、線虫において *in vivo* で RNAi が生じる際に蓄積する siRNA の多くが 5' 末端にトリ燐酸を持つことを明らかにしており、その知見は蓄積する siRNA の多くは mRNA を鋳型として RdRP 活性によってプライマー非依存的に合成された二次型 siRNA であることを意味している。つまり、二次型 siRNA の 5' 末端形成はモノ燐酸化末端を持つ切断産物を生じる Dicer には依存していない。生じてくる新たな疑問は、二次型 siRNA の 3' 末端形成も Dicer (DCR-1) 非依存的な反応であるのかという問題である。本研究者らは、小分子 RNA を産生する RdRP 活性は *dcr-1* 変異体由来の抽出液においても存在するという実験結果を得た。

次に、RRF-1 の蛋白複合体について解析を行った。RRF-1 複合体中にヘリカーゼの一つで

ある DRH-3 が存在することを見つけたが、DCR-1 の存在は検出できなかった。ちなみに DRH-3 は DExH 型ヘリカーゼであり、その構造は Dicer のヘリカーゼ領域や哺乳類においてウイルスセンサーとして働く RIG-I と類似している(図 2A)。又、免疫沈降した RRF-1 複合体は、鋳型 mRNA に対して相補的なトリ燐酸化 siRNA をプライマー非依存的に合成する RdRP 活性を実際に示すことを確認した(プライマー伸長活性は検出できなかった)。RRF-1 複合体が合成した小分子 RdRP 産物をクローニング解析したところ、93% の RdRP 産物の 5' 末端が G でスタートしており、96% の RdRP 産物は鋳型 RNA の末端ではなく内部配列に合致していた。以上の解析結果は、Dicer 活性とは独立した様式で、RRF-1 が DRH-3 の協力を得て mRNA 派生物を鋳型として二次型 siRNA を合成することを意味している。

(4) 線虫の RNAi において配列特異的な mRNA 切断活性を担う主要因子の同定

ハエや哺乳類では、Dicer 産物であるモノ燐酸化 siRNA によって標的 mRNA を切断する Slicer 活性が誘導されることが示されている。線虫をモデル生物とした遺伝学的な研究は RNAi 関連因子を他生物にさきがけて数多く同定してきたが、Slicer 活性についての生化学的な情報は全く存在しない状況であった。

本研究者らは、数種類の異なる形状の合成 siRNA を細胞抽出液へ導入して、標的 mRNA を配列特異的に切断する Slicer 活性を誘導することを試みた。Slicer 活性はモノ燐酸化された 2 本鎖 siRNA (初期型) によって弱く、モノ燐酸化された 1 本鎖 siRNA によって中程度に誘導された。興味深いことに、RdRP 産物を模したトリ燐酸化された 1 本鎖 siRNA (二次型) が最も強力に Slicer 活性を誘導することが判明した(図 1B)。又、モノそしてトリ燐酸化 siRNA によって誘導される Slicer 活性はそれぞれ異なる蛋白に対応していることが、ゲル濾過解析によって示唆された。

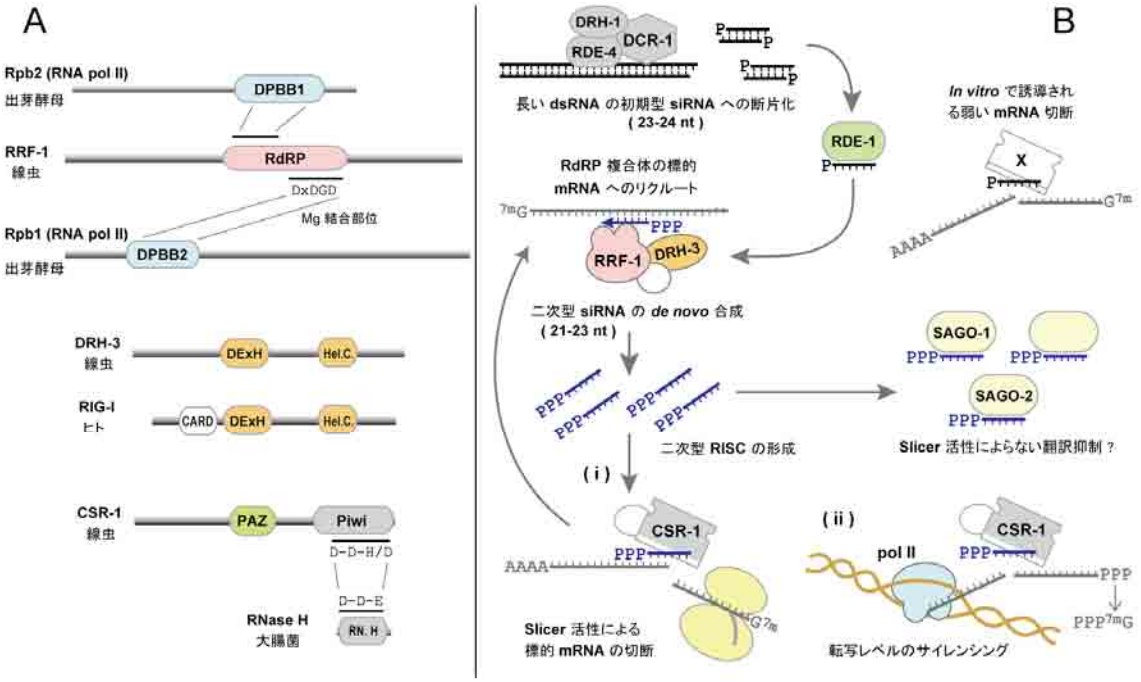


図 2 線虫における二次型 siRNA の産生と活性に関連する因子、そして RNAi 機構のモデル

A) RRF-1、DRH-3、CSR-1 のドメイン構造。RRF-1 は細胞型 RdRP ドメインを持つ。アカパンカビの細胞型 RdRP である QDE-1 の立体構造が解明されており、その活性ドメインの構造は転写を担う DNA 依存性 RNA ポリメラーゼのコア酵素が持つ DPBB 構造と類似性を示す。DRH-3 は DExH 型ヘリカーゼのドメインを持つ。CSR-1 は、PAZ そして Piwi ドメインを持つ Argonaute 蛋白の一つである。Piwi ドメインの構造は RNase H 等と類似していることが知られている。

B) 線虫の RNAi 反応機構のモデル。モノ燐酸化 siRNA は *in vitro* において Slicer 活性を弱く誘導するが、その活性は初期型 siRNA と相互作用することが知られている Argonaute である RDE-1 とは対応しない。我々の *in vitro* 実験は、CSR-1 が二次型 siRNA と一緒に標的 mRNA の切断に働くことを示唆する (i)。*csr-1* 変異体は RNAi のみならず染色体の分配にも異常を示すことから、CSR-1 が内在性小分子 RNA と一緒に転写レベルのサイレンシングにも関与している可能性も考えられる (ii)。二次型 siRNA の一部は、Slicer 活性に必要な D-D-H/D モチーフを持たない Argonaute (SAGO) と相互作用していることも知られている。

次に、様々な RNAi 欠損変異体から細胞抽出液を調製して Slicer 活性を調べる実験を行った。

その結果、本研究者らが作製した Argonaute 変異体の一つである *csr-1(fj54)* においては二次型 siRNA による Slicer 活性がひどく損なわれていることが分かった。大腸菌で作製した CSR-1 リコンビナント蛋白はモノ燐酸化された 1 本鎖 siRNA と一緒に弱く、そして二次型に相当するトリ燐酸化された 1 本鎖 siRNA と一緒に強く Slicer 活性を示した。つまり、CSR-1 が二次型 siRNA によって誘導される Slicer 活性を担っていると考えられる。

以上の研究結果に基づき、“線虫の RNAi における標的転写産物の不安定化においては、初期型よりもむしろ RdRP による増幅産物である二次型 siRNA が主要な役割を果たしているというモデルを提唱した（図 2B）”。

5. 自己評価

遺伝学と生化学を組み合わせた複合的な解析によって、線虫という生物種における RNAi の機構について、外来の RNA によって誘導される反応の概略を提示する研究ができたと考えている。しかしながら、初期型の siRNA が RdRP を標的 mRNA へ選択的にリクルートする仕組みが未だ不明である等、未解明の問題も存在している。又、線虫と他生物における RNAi 反応機構は類似した蛋白因子を用いているが、RNA の流れについてはかなりの違いが見受けられることも、本研究および関連する他グループの研究によって分かってきた。他生物と保存性の非常に高い機構が浮かび上がってくることを期待していたことから、少し残念に思っている。

今後は、生化学的な研究から生理学的な研究へ立ち戻って、広い意味で RNA が関与する他生物でも共通性の高い生命現象の解明に再び挑戦したいと考えている。

6. 研究総括の見解

線虫を研究材料とし、生化学的および遺伝学的手法を組み合わせた解析により RNAi のサイレンシング効率に関連する反応についての理解を深めることを目標とした。そのために、サイレンシングシグナルの増幅に重要な役割を果たす RNA 依存 RNA ポリメラーゼの生化学的性質を解明すること、および配列特異的 mRNA 切断活性の性質を明らかにし、その活性を担う因子を同定することを目指した。その結果、RNAi の機能発現機構について、外来の RNA によって誘導される反応機構のモデルの提唱に至った。RNAi に関連する酵素活性を見るための無細胞反応系の開発などを含む優れた技術により、当初の目的をほぼ達成したことは、大変立派である。さらに、内因性の反応についての興味ある研究を展開中であり、今後も大変楽しみである。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., & **Tabara, H.*** *In vitro* analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO J.* 26, 5007-5019 (2007).

研究課題別評価書

1．研究課題名
RNAi 複合体形成の生化学的解析

2．氏名
泊　幸秀

3．研究のねらい
タンパク質の鋳型としては使われることのない、小さな RNA（small RNA）が、遺伝子発現の制御に大きな役割を演じており、生物の発生や形態形成、癌化など重要な生物学的機能を緻密にコントロールしていることが明らかになってきました。小さな RNA の中でも特に、small interfering RNA と micro RNA は、共に特異的なターゲット遺伝子の発現を抑制することで細胞機能の制御を行います。これらの小さな RNA は、単独で働くのではなく、複数のタンパク質と複合体を作って、初めてその機能を発揮できます。本研究は、このような複合体がどのようにして作られるのかに着目し、小さな RNA の働く仕組みを明らかにすることを目指します。

4．研究成果
<u>small RNAの振り分け機構</u>

siRNA と miRNA は、その由来こそ違いますが、共に RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる、複数のタンパク質と一本鎖の small RNA から成るエフェクター複合体を通して、特異的な標的遺伝子の発現抑制を行います。RISC を通して、miRNA は通常不完全に相補的な結合部位を複数個持つターゲット mRNA の翻訳抑制を引き起こすのに対し、siRNA は相補性の高い結合部位を一つでも持つターゲット mRNA の切断・分解を引き起こします。RISC の中で中心的役割を果たすのは、Argonaute と呼ばれるタンパク質です。私たちが主な実験材料として用いているショウジョウバエには、Argonaute1 (Ago1)、Argonaute2 (Ago2)という二種類の Argonaute が存在しますが、一般に miRNA は Ago1 を含む RISC に、siRNA は Ago2 を含む RISC に取り込まれます。

ショウジョウバエでは、miRNA と siRNA は、それぞれ Dicer-1、Dicer-2 という別々の酵素によって生成されるため、それぞれの生合成経路と Argonaute へ取り込まれる経路は連動していると、もともと考えられてきました。しかし、私たちは、マサチューセッツ州立大学 Phillip Zamore 研究室との共同研究により、miRNA と siRNA は、それらの生合成経路とは独立して、能動的にそれぞれの Argonaute に振り分けられているということを明らかにしました。この時重要になるのが、miRNA と siRNA の生合成過程における small RNA 二本鎖中間体、すなわち Dicer による切断を受けた直後の miRNA/miRNA*二本鎖と siRNA 二本鎖という中間体の構造です。私たちは、様々な生化学的実験を通して、small RNA 二本鎖の中心付近にミスマッチが存在する場合は Ago1 に、そうでない場合は Ago2 に振り分けられているということを見いだしました。この際、私たちが以前定義した RISC-loading complex (RLC, Ago2 を含む RISC に small RNA を「積み込む」働きをしている複合体で、RISC 形成の上流に位置する)が、結合強度の差を利用して、ミスマッチの位置を見分ける役割を果たします。統計的に見ると、天然に存在する miRNA/miRNA*二本鎖には、中心部分にミスマッチが存在することが多く、RLC は siRNA 様のものを積極的に Ago2 に送り込み、miRNA 様のものを排除する「門番」の役割を果たしていると言えます。同時に、天然に存在する miRNA の中には、Ago1 だけでなく Ago2 にも取り込まれるものが存在するという予測が立てられましたが、実際、そのようなものが数多く報告されています。この研究成果は 2007 年 Cell 誌に 2 つの連報論文として発表しました。

miRNAはどのようにしてエフェクター複合体を形成するのか?

miRNA は、ゲノムから長い前駆体として転写(DNA から RNA が作られること)されたあと、2 段階の切断を受け、最終的に 22 塩基程度の長さの成熟体 miRNA が作り出されます。この途中で miRNA/miRNA＊（スター）二本鎖と呼ばれる 22 塩基程度の長さの RNA がペアに成ったような中間体が作られます。miRNA/miRNA＊二本鎖のうち、一方の鎖のみが選択的に RISC に取り込まれ(この鎖が成熟体 miRNA に相当します)、もう一方の鎖は RISC には取り込まれずに分解されてしまいます(この鎖が miRNA＊鎖に相当します)。

私たちは miRNA 経路のモデルと位置づけられるショウジョウバエの Ago1 というタンパク質に着目し、RISC の形成過程を、アガロースネイティブゲルと呼ばれる生化学的な手法によって直接検出できるシステムを初めて確立しました。そして、miRNA が Ago1 に取り込まれ RISC が作られるまでの道筋を詳しく調べました。その結果、miRNA/miRNA＊は、まず二本鎖のままの状態で Ago1 へと取り込まれることが分かりました。その際、エネルギーである ATP が必要であること、また、miRNA/miRNA＊鎖のミスマッチ(塩基対が形成されないこと)が中心部分(9-11 番目)に存在すると、Ago1 により効率よく取り込まれることが明らかとなりました。私たちは以前、RNA 干渉を引き起こす small interfering RNA (siRNA)が Ago2 を核とする RISC に取り込まれる際には、中心部分のミスマッチが嫌われるということを見いだしていましたが、Ago1 と Ago2 は全く逆の(相補する)「好み」を持っているということになります。

次に、miRNA/miRNA＊鎖から miRNA 鎖のみが選択され miRNA＊鎖が分解される過程(この過程のことを unwinding [巻き戻し]と呼びます)を調べました。これまで、unwinding には ATP を利用して、二本鎖 RNA をほどく様な巻き戻し酵素(helicase)が関わっていると考えられてきましたが、驚くべきことに、実際には ATP は全く必要なく、miRNA/miRNA＊二本鎖の 2-8 番目(seed 領域)あるいは 12-15 番目(3'-mid 領域)の塩基にミスマッチが存在することことが、成熟型 Ago1-RISC の形成に必要であることが分かりました。興味深いことに、unwinding の際に「ミスマッチが必要」な領域は、miRNA が標的 mRNA を認識する際に「塩基対形成が必要」な領域と、全く同じものでした。これは、miRNA/miRNA＊から miRNA が選択される過程と、miRNA が標的 mRNA を認識する過程が、鏡写しの関係にあるということを表しています。つまり、これは、これまでは全く別物であると考えられてきた 2 つの過程が、共に Argonaute というタンパク質の中で RNA が取り得る特殊な構造により説明できるということであり、従来の考え方を大きく変えることになります。

さらに私たちは、ショウジョウバエ Ago1 についての知見をもとに、ヒトに 4 種類存在する Argonaute についても、二本鎖の取り込みと巻き戻しという 2 つのステップに着目し、解析を行いました。その結果、ショウジョウバエ Ago1 と同様、miRNA が複合体を形成するためには、特定の領域(seed 領域および 3'-mid 領域)にミスマッチが必要であることが分かりました。この性質はヒト Argonaute の 4 種類すべてに共通のものでした。また、ミスマッチを持たない siRNA の場合には、ヒトの 4 種類の Argonaute のうち RNA を切断する活性をもつもの(Argonaute2)のみでしか効率よく複合体が形成されないことが明らかになりました

今回の発見により、miRNA が RISC を形成する複雑な過程が初めて明らかになったと同時に、miRNA 遺伝子が特定の領域に持つミスマッチが重要な役割を果たしていることを見いだしました。実際、天然に存在する miRNA 遺伝子の構造を調べたところ、ほとんどのものが、今回我々が見いだした RISC 形成に必要な要件(特定の領域にミスマッチが存在すること)を満たしており、それは様々な生物種で保存されていることが分かりました。すなわち、なぜ miRNA 遺伝子が進化の過程において特定の領域に多くのミスマッチを持ち続けているのかということを、生化学的に説明することが可能になったわけです。さらに、これを応用することで人工的

な miRNA 遺伝子を設計することも可能になると考えられます。これらの研究成果は、2009 年と 2010 年、Nature Structural and Molecular Biology 誌に 2 報の論文として発表しました。

miRNAによる翻訳抑制のしくみ

miRNA が標的 mRNA の翻訳を抑制するしくみに関しては、数多くの報告がなされてきましたが、1. cap 構造認識段階での阻害　2. cap 構造認識後の後期翻訳開始段階での阻害　3. 翻訳伸長段階での阻害　4. poly(A)の短縮と mRNA の不安定化　5. P-body (mRNA の分解と貯蔵を司る細胞質顆粒)への移行　等、様々な仮説が提唱されており、混乱を極めています。前述の通り、ショウジョウバエでは、miRNA はその中間体の構造に従って、Ago1 と Ago2 の間に分配されます。私たちは、miRNA が取り込まれる Argonaute の種類によって、その翻訳抑制作用が異なるのではないか、という仮説を立てました。ショウジョウバエの「small RNA 振り分け機構」を利用すれば、その生合成を考慮しなくとも、ミスマッチの位置をデザインすることで、Ago1-RISC と Ago2-RISC を、ほぼ排他的に形成させることが可能となります。私たちは、独自に開発した in vitro 系を使うことで、Ago1 と Ago2 による作用を個別に評価し、それらの翻訳抑制の様式を丹念に調べました。その結果、1. Ago1 は標的 mRNA の poly(A)を分解するが、Ago2 はしない　2. Ago1 は(poly(A)分解と独立して)cap 認識後の段階を阻害するが、Ago2 は cap を認識する eIF4E と eIF4G との相互作用を特異的に阻害する 3. Ago1 の働きには P-body 構成要素である GW182 が必要であるが、Ago2 には必要ではない　という様に、Ago1 と Ago2 の働きには大きな違いがあるということが明らかになりました。よって、これまでの矛盾した結果の少なくとも一部は、別々の Argonaute の活性を混同して評価していたためであると考えられます。この研究成果は 2009 年 Molecular Cell 誌に発表しました。

5. 自己評価

小さな RNA がエフェクター複合体を形成する過程に着目し、小さな RNA が働く仕組みを解明するという当初の目的に対しては、この 4 年間でかなりの進展を達成できたと考えています。ただし、これですべてが明らかになったわけでは決して無く、例えば「二本鎖 RNA として生まれた小さな RNA が、どのようにして複合体の中核である Argonaute タンパク質に取り込まれるのか」という根本的疑問に対する答えはまだ得られていません。よって、今後もこの経路に注目しながら、小さな RNA が働く仕組みの全体像に迫って行きたいと考えています。

6. 研究総括の見解

重要な生物の機能の多くが、small RNA (siRNA や miRNA)によって制御を受けていることが明らかとなっている。このような制御は RNA 単独ではなく、複数のタンパク質と複合体を作って行われる。本研究では、このような複合体がどのようにしてつくられるかを主にショウジョウバエの系を使用して、明らかにすることを目的とした。その結果、二本鎖 RNA にミスマッチが存在するか否かで取り込むタンパク質が異なることを明らかにした。この取り込みの機構は完全には明らかとなっていませんが、取り込みに ATP が必要であること、二本鎖が一本鎖になるとき(unwinding)には ATP は必要ないことなどを明らかにし、人工的な miRNA 遺伝子を設計することも可能にした。さらに、混乱を極めていた miRNA による翻訳抑制の仕組みを見事に整理し、Ago1 と Ago2 の働きに大きな違いが存在することを解明した。本研究は、世界的にとくに競争の激しい当該分野において、世界をリードする日本発の研究成果として、特に高い評価を与えたい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1.Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, *Tomari Y. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol.* 2010

Jan;17(1):17-23.

2.Kawamata T, Seitz H, *Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. ***Nat Struct Mol Biol.*** 2009 Sep;16(9):953-60.

3.Iwasaki S, Kawamata T, *Tomari Y. *Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. ***Mol Cell.*** 2009 Apr 10;34(1):58-67.

4.*Tomari Y, Du T, *Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNA. ***Cell.*** 2007 Jul 27;130(2):299-308.

②特許

研究期間累積件数:1 件

発 明 者:川俣朋子、依田真由子、泊幸秀
発明の名称:small RNA 二本鎖およびヘアピン型 RNA の設計方法
出 願 人:東京大学
出 願 日:2009 年 6 月 29 日
出願番号: 特願 2009-146466

③受賞

1. 国際ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム キャリアディベロップメントアワード (H20.6)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

Forstemann K, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct Argonaute protein complexes after their production by Dicer-1. ***Cell.*** 2007 Jul 27;130(2):287-297.

研究課題別評価書

1．研究課題名
リボウイルス創薬：ウイルスに学ぶ RNA 分子の可能性とその応用

2．氏名
朝長　啓造

3．研究のねらい
近年、機能性 RNA 分子を利用した研究と医薬品の開発が世界各国で精力的に進められている。特に、非コード小分子 RNA である short interfering RNA や short hairpin RNA を利用したターゲット遺伝子の発現抑制と microRNA を用いた翻訳制御は、がんや難治性疾患の治療ならびに感染症への応用が期待されている。機能性 RNA 分子の研究は、生命科学の発展に寄与するのみならず、創薬や再生医療へと応用可能な RNA テクノロジーを生み出すと考えられる。一方で、RNA 分子を創薬として実用化するためには、いまだ解決すべき問題が残されている。それは、壊れやすい RNA 分子を細胞内で長期間安定に発現させる技術開発に加えて、RNA を生体内の適所に安全に運ぶための効率的なデリバリーシステムの構築と考えられる。

本研究のねらいは、特異な性状を持つ RNA ウイルスの感染動態を利用することにより、機能性 RNA 分子を効率かつ持続的に発現でき、生体への適用にも優れた新規 RNA ウイルスベクターを開発することにある。私たちが研究対象としているボルナ病ウイルス（Borna disease virus: BDV）は、マイナス鎖一本鎖の RNA をゲノムに持つ神経細胞親和性のウイルスである。BDV は細胞核で持続感染するという他のウイルスでは見られない特徴を持っている。本研究では、細胞核における BDV の複製と持続感染のメカニズムを分子レベルで解明することで、細胞内で RNA を長期に安定化させる技術基盤の構築を目指した。また、独自に開発した組換え BDV 作製技術を応用することで、これまでにない独創的な RNA ウイルスベクターの開発に挑戦した。本研究の最終目標は、BDV の特性を利用したリボウイルス創薬の確立にある。

4．研究成果
1）ボルナ病ウイルスの持続感染機構に関する研究成果

数多く存在する動物由来 RNA ウイルスの中で、細胞核を複製の場として利用するウイルスはボルナウイルス科とオルソミクソウイルス科の 2 科だけである。しかしながら、この 2 科の RNA ウイルスの間には、感染様式に違いがある。オルソミクソウイルス科に属するウイルスが感染細胞への強い細胞傷害性と細胞死の誘導を特徴としているのに対し、ボルナウイルス科に属する BDV は非細胞傷害性の増殖と持続感染を性状としている。この独特な感染様式から、BDV は細胞核に寄生できる唯一の RNA ウイルスであると考えられている。私たちは、動的な環境にある細胞核において BDV がゲノム RNA を安定に維持するメカニズムについて解析を行った。

はじめに、細胞核におけるウイルスゲノム RNA の動態を明らかにするために、ゲノム RNA を含むウイルスのリボヌクレオ蛋白質複合体（RNP）の核内局在について解析した。BDV 持続感染細胞には、核内に BDV 主要抗原のドット状構造物（viral speckle of transcripts: vSPOT）が観察された（図 1a、矢印）。vSPOT は、ゲノムならびにアンチゲノム RNA を含み、複製の場あるいはゲノム RNA の成熟の中心であると考えられた。共焦点レーザー顕微鏡ならびにクロマチン結合解析法を用いた観察により、vSPOT はクロマチンに接合して形成されることが明らかとなった。また、核膜が消失した分裂期の細胞では、RNP が濃縮したクロマチンに接合している様子が観察された。興味深いことに、分裂後期では RNP が娘染色体とともにそれぞれの細胞核へと運ばれることが示された（図 1b）。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いた解析から、BDV RNP はヌクレオプロテイン（N）蛋白質とコアヒストンとの結合を介してクロマチンに接合していると考えられた。また、染色体上の RNP は複製能力を持つことも確かめられた

次に、クロマチン上での RNP の複製制御機構について、BDV のリン酸化（P）蛋白質と結合する

クロマチン結合性 DNA 構造変換因子、HMGB1（High-mobility group box protein 1）、に着目して解析を行った。HMGB1 は核内に豊富に存在する蛋白質であり、DNA の構造変換を介して転写を促進する働きを持っている。shRNA を用いて HMGB1 をノックダウンした結果、ノックダウン細胞ではクロマチンに局在する P 蛋白質が減少し、ウイルス mRNA の発現レベルが顕著に低下することが判明した。また、クロマチン上における RNP の安定性も低下することが明らかとなった。さらに、生細胞を用いた観察から、HMGB1 は vSPOT への出入りを頻繁に繰り返していることも確かめられ、BDV はクロマチン上での複製に HMGB1 との相互作用を利用していることが示唆された。

以上の解析により、BDV は細胞周期を通じてクロマチンに局在することで、安定したゲノム RNA の保持と複製制御を成し遂げていると考えられた（図 1c）。本研究により、細胞内における一本鎖 RNA の安定化に関して有用な知見が得られた。

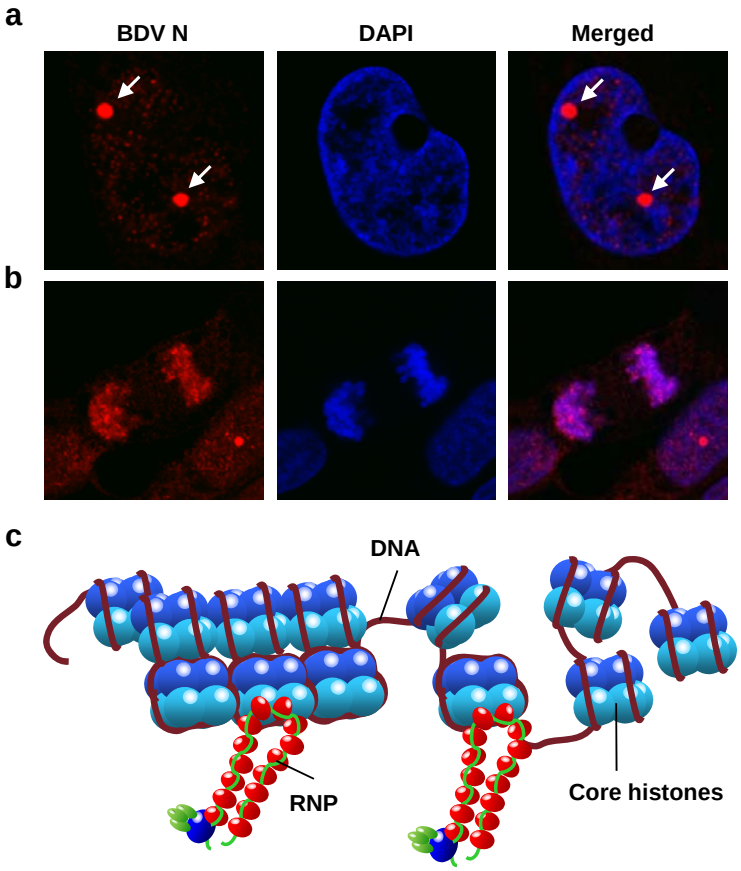


図1. クロマチンを利用したボルナ病ウイルスの核内安定化機構. (a) BDV持続感染細胞核に見られるドット状構造物（vSPOT; 矢印）. 間期の細胞核. BDV RNPは抗BDV N抗体（赤）で, クロマチンはDAPI（青）で染色を行った. (b) 分裂後期のBDV持続感染細胞像. BDV RNPは染色体とともに娘細胞の核へと運ばれる. (c) BDV RNPは細胞周期を通じて, コアヒストンを介してクロマチンに接合できる.

2）ボルナウイルス N mRNA の逆転写と宿主染色体へのインテグレーションに関する研究成果

私たちの研究成果により、BDV の生活環はクロマチンに高い依存性を示すことが明らかとなった。一方、BDV をウイルスベクターとして利用するためには、BDV 複製が宿主染色体に与える影響についてより詳細に理解する必要があると考えられる。そこで、感染細胞における BDV ゲノムの存在様式について検討を行った。BDV が持続感染した様々な哺乳類細胞より DNA を抽出して、DNase あるいは RNase 処理を行ったのちに BDV 特異的プライマーを用いて PCR を行った。その結果、ヒト由来 OL 細胞、293T 細胞ならびにイヌ由来 MDCK 細胞において、DNase 感受性の BDV DNA が検出された（図 2a）。一方、サル由来 Vero 細胞ならびにラット由来 C6 細胞では確認されなかった。また、BDV が感染したマウス脳においては、感染後約 30 日目より BDV DNA が産生されることが判明した。詳細な解析の結果、検出された DNA は BDV mRNA を鋳型に作り出されていることが明らかとなった（図 2b）。

次に、検出された BDV DNA が染色体外に存在するものなのか、あるいは宿主ゲノムにインテ

グレーションされたものかを明らかにするために、Alu-PCR 法を用いた解析を行った。BDV 持続感染細胞から抽出した高分子 DNA を Alu 配列と BDV に特異的なプライマーで増幅を行った。その結果、感染後約 30 日目より特異的バンドが検出され、BDV DNA が宿主ゲノムにインテグレーションされている可能性が示された。さらに、novel Alu-PCR 法と inverse PCR 法を用いて、染色体上における BDV DNA の構造を解析した結果、インテグレーションされた BDV DNA は、その 3' 末端に poly A 様配列を有しており、多くの配列で 5' 側が欠損していることが判明した。また、一部の配列ではその両末端に特異的な繰り返し配列があることが確認された。これらの観察結果により、核内で転写された BDV mRNA は、宿主のレトロトランスポゾン（LINE1 など）の作用により、宿主ゲノムにインテグレーションされることが示唆された（図 2c）。

一方、すべての真核生物のゲノムデータベースを解析した結果、ヒトをはじめとする多くの哺乳類において、BDV の N 遺伝子と相同性の高い配列が存在することが明らかとなった。このことは、ボルナウイルス RNA の逆転写と宿主ゲノムへのインテグレーションが過去の感染で実際に起こったことを示している。これらの結果は、ボルナウイルスの持続感染が宿主ゲノムに遺伝的な新奇性をもたらす可能性を示しており、BDV の新たな病原性機構の存在が示唆された。

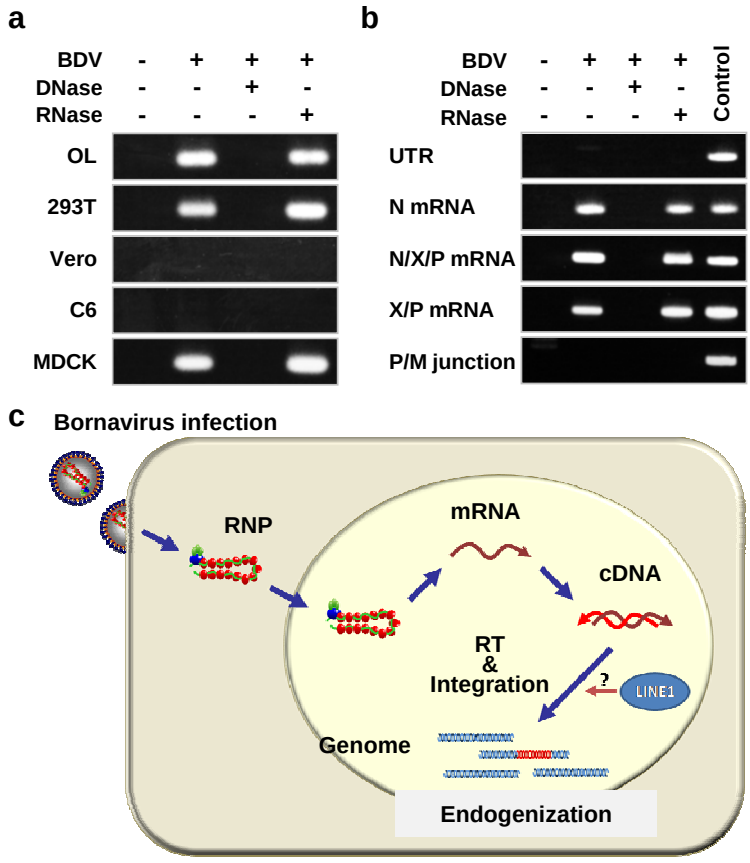


図2. ボルナ病ウイルスの新規病原性機構. (a) 哺乳類由来細胞における BDV DNAの産生. DNaseに感受性DNAがOL, 293Tならびに MDCK細胞で観察された. (b) BDV由来DNAはmRNAの産生と相関して検出された. (c) ボルナウイルスのmRNAは細胞核内で, レトロトランスポゾン（LINE1）の作用により宿主ゲノムにインテグレーションされると考えられた.

3）ボルナ病ウイルスを利用した新規ウイルスベクターの開発に関する研究成果

私たちは、BDV のゲノム RNA を発現するプラスミドと N、P、L 蛋白質を発現するプラスミドの計 4 種類を 293T 細胞に導入することで組換え BDV を産生させるリバースジェネティクス技術を独自に確立している。そこで、この技術を応用することで BDV のゲノム内に外来遺伝子をコードする BDV ベクターの開発を試みた。

はじめに、BDV ゲノム内における外来遺伝子の挿入部位について検討を行った。GFP 遺伝子をゲノム上のさまざまな領域に挿入して、その発現効率を解析した結果、P 遺伝子と M 遺伝子の間の非コード領域（P/M）への挿入において、外来遺伝子が効率的に発現されることが明らかとな

り、組換えウイルスの産生も可能であることが示された（図 3a）。P/M 間に GFP 遺伝子を挿入した BDV ベクターから産生された組換え BDV（BDV-P/M GFP）は、ゲノムの 5’ 末端に GFP 遺伝子を持つウイルス（BDV-5’ GFP）よりも、GFP の発現効率が高く、長期にわたり安定に GFP を発現することが示された。また、P/M 間領域は、5’末端と比較してより大きな外来遺伝子の挿入が可能であることも明らかとなった。さらに、BDV P/M ベクターの外来遺伝子発現の持続性を確認するために、BDV-P/M GFP をマウスおよびラットの脳へ接種を行った。その結果、少なくとも 8 ヶ月間は GFP の発現が海馬あるいは大脳皮質領域の神経細胞で観察され、外来遺伝子の持続的発現が可能なベクターであることが示された（図 3b）。

次に、より効率的で安全性の面でも優れたウイルスベクターの確立を目標に BDV P/M ベクターの改良を行った。主な改良点は、以下の 3 点である。① 病原性と伝播能力を欠損させるために、エンベロープ（G）蛋白質をコードする G ORF の開始コドンに変異を導入した。② 複製効率を上昇させるために、ポリメラーゼ（L）遺伝子内に存在するイントロン配列を欠損させた。③ 外来遺伝子の挿入能力を上げるために、M 遺伝子を欠損させた。①および②の変異を持つ組換え BDV（BDV-dGLL-P/M）（図 3a）は、G 遺伝子を恒常的に発現する Vero 細胞を用いることで回収が可能であった。一方、上記のすべての変異を持つ組換えウイルス（BDV-dGdMLL-P/M）（図 3a）は、G と M 遺伝子を恒常的に発現する細胞を用いて回収した。面白いことに、BDV-dGLL-P/M は、培養細胞内での伝播能力を欠いていたが、持続感染を維持する能力は保持しており、外来遺伝子を長期間、安定に発現できることが示された。BDV-dGdMLL-P/M も培養細胞において持続的な感染が確認されている。以上の結果より、BDV を利用して安全性が高く、効率的で持続性の発現が可能な新規 RNA ウイルスベクターの基本技術の確立に成功した。

確立した BDV ベクターの応用についても検討を行っている。これまでに、P/M 間にアミロイド β ペプチドを分解する中性エンドペプチターゼであるネプリライシン（NEP）遺伝子を挿入したベクターを作成した。NEP をコードしている組換え BDV からは機能性 NEP が発現することが確認された。現在、アミロイド β ペプチドを蓄積するトランスジェニックマウスを用いて、NEP 発現 BDV ベクターの有用性について検討を行っている。

また、本研究の最終目標であった機能性 RNA 分子を持続的に発現するベクター開発も試みた。P/M 間領域に microRNA （miRNA）を産生する配列を挿入することで、RNA ウイルスとしては初めての機能性 RNA 発現ベクターの作製を試みた（BDV-dGLL-P/M-miR）（図 3a）。具体的には、miRNA-155 （miR155）をコードしているゲノム領域をマウスゲノムよりクローニングし、BDV ベクターの P/M 間領域に挿入した。リバースジェネティクス技術により、そのアンチゲノム鎖に miR155 配列を持つ組換え BDV（BDV-P/M miR155）を作成し、Vero 細胞への感染を行った。その結果、感染細胞において成熟 miR155 の発現が確認され、ターゲット配列を持つ遺伝子の翻訳を有意に抑えることが明らかとなった。また、他の遺伝子に対する miRNA 配列の導入も成功しており、miRNA を発現する組換え BDV が感染したマウス脳内では、ターゲット遺伝子の発現が低下していることも示されている。

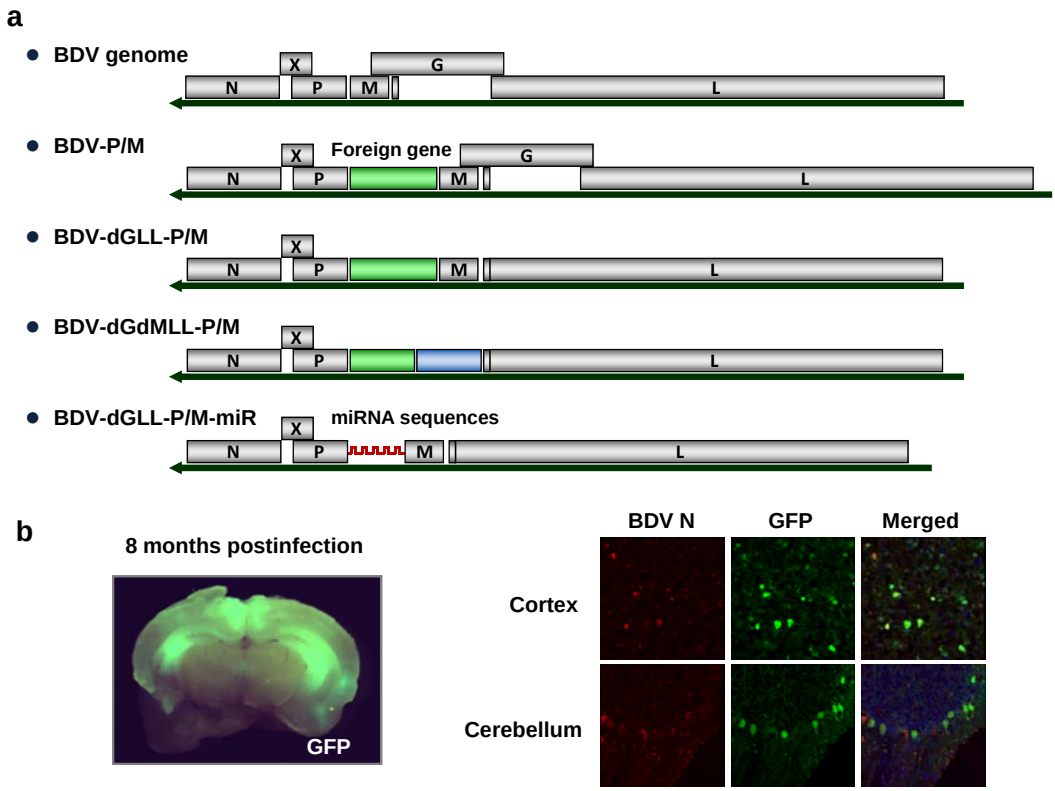


図3. ボルナ病ウイルスを利用した新規ウイルスベクターの開発. (a) BDVベクターの遺伝子構造. BDVゲノムのP遺伝子とM遺伝子の間に外来遺伝子を挿入した(BDV-P/M). G遺伝子を欠損させるとともに、L遺伝子内のイントロンを削った(BDV-dGLL-GFP). M遺伝子も削ることで外来遺伝子の挿入効率を上昇させた(BDV-dGdMLL-GFP). P-M間にmiRNAを発現できる配列を挿入することでmiRNAを発現できるベクターを構築した(BDV-dGLL-P/M-miR). (b) GFP発現組換えBDV P/Mウイルスを感染させたマウス脳. GFPの発現は少なくとも接種後8ヶ月間は脳内で観察されている.

5. 自己評価

本研究の最終目標は、BDVを利用して機能性RNA分子を発現できる新規RNAウイルスベクターを開発することあった。上記4-3)で示したように、これまでにBDVベクターの基本技術の開発は成功し、実験的なレベルではあるがmiRNAを発現するベクターの作製にも成功している。これらの新規の技術に関しては、既に特許出願済みであり、研究成果の②でも示したように、今後のさらなる改良と応用は間違いなく期待できる。BDVを用いたウイルスベクターの開発という観点からは、本研究の目標は達成され、高く評価できると考える。

一方、RNAを細胞内で安定化する技術構築に関しては、クロマチン動態を利用したBDVの持続感染機構の証明で終わっている。現在、BDV RNAがRNPとして核内で安定化する機構を他のRNA分子にも応用できるかを試みている最中であり、今後の課題となっている。また、特許との関連もあるが、研究期間内で発表できなかった論文があるのも反省点の一つである。現在、精力的に執筆中であり、1年以内には数報を発表したいと考えている。

6. 研究総括の見解

ボルナ病ウイルス(BDV)は、神経親和性を持ち、細胞核で持続感染する。この特性を生かし、独創的な RNA ウイルスベクターの開発を目標とした。まず、ウイルスの RNP がクロマチンに結合していること、核膜のなくなる分裂期の細胞では、濃縮したクロマチンに接合しており、分裂後期で

は RNP が娘染色体とともにそれぞれの細胞核へと運ばれることを示し、感染細胞のなかで BDV ゲノムが安定に維持されるメカニズムが存在することを示した。BDV ベクターの開発は順調に行われ、GFP の発現がマウスおよびラットの海馬や大脳皮質領域の神経細胞で少なくとも 8 ヶ月は安定に続くことを示した。また、miRNA を発現するベクターの作製にも成功した。現在、アミロイドを分解するネプリライシン遺伝子を挿入したベクターを作製し、有用性についての検討を行っており、最終目標をクリアーしたことは高く評価できる。さらに、本研究遂行の過程で、BDV の N 遺伝子が宿主ゲノムにインテグレートされることを見出したことは、驚くべきことであった。宿主ゲノムの進化のメカニズムや BDV の新たな病原性発現機構に新知見をもたらしたことを非常に高く評価したい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM and Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. **Nature** 463:84-87 (2010)
2. Watanabe Y, Ohtaki N, Hayashi Y, Ikuta K and Tomonaga K. Autogenous translational regulation of the Borna disease virus negative control factor X from polycistronic mRNA using host RNA helicases. **PLoS Pathog.** 5:e1000654 (2009)
3. Honda T, Horie M, Daito T, Ikuta K and Tomonaga K. Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at cell surface. **J. Virol.** 83:12622-12625 (2009)

②特許

研究期間累積件数:3 件

発 明 者:朝長 啓造
発明の名称:ボルナ病ウイルスを利用するベクターおよびその利用
出 願 人:国立大学法人大阪大学
出 願 日:平成 20 年 7 月 24 日
出願番号: 特願 2008- 191285

発 明 者:朝長 啓造、大東 卓史
発明の名称:ボルナ病ウイルスを利用するベクターおよびその利用
出 願 人:国立大学法人大阪大学
出 願 日:平成 21 年 3 月 31 日
出願番号: 特願 2009-87608

発 明 者:朝長啓造、大東卓史、本田知之
発明の名称:ボルナ病ウイルスを利用するベクターおよびその利用
出 願 人:国立大学法人大阪大学
出 願 日:平成 22 年 3 月 17 日
出願番号: PCT/JP/2016/054600

③著書

1. 朝長 啓造. 細胞核とRNAウイルス:ボルナウイルスの核輸送と持続感染のメカニズム. 「ウイルス研究の現在と展望」 **蛋白質 核酸 酵素 増刊号.** 52: 1168-1174 (2007)
2. 渡邊 洋平, 朝長 啓造. ボルナウイルス感染症. **人獣共通感染症.** p106-113. (2007)
3. 朝長 啓造. ボルナウイルスの核輸送とゲノム動態.「感染症のサイエンス」**実験医学 増刊号.** 27:1514-1521. (2009)

4. 朝長 啓造. ボルナウイルス. **臨床と微生物.** 36:233-238. (2009)

（シンポジウム・招待講演）

1. Tomonaga K.: A novel discovery toward understanding the interaction between bornaviruses and mammalian hosts. BDV workshop 2009, University of Freiburg, Freiburg, Germany (2009)
2. Tomonaga K. Bornavirus infection: discovery of a novel interaction between RNA virus and the nucleus. The 3rd International CVRDC-RIMD Joint Symposium, Gwangju, Korea (2009)
3. 朝長 啓造: 細胞核におけるボルナウイルスの持続感染 ーRNAウイルスの未知なる動態ー. 第6回湯河原ウイルス学キャンプ. 湯河原 (2009)
4. 朝長啓造, 堀江真行, 本田知之, 鈴木善幸, 小林由紀, 押田龍夫, 大東卓史, 林 陽平, 生田和良, 五條堀 孝: 内在性ボルナウイルスエレメントとRNAウイルスの内在化プロセス. ワークショップ「レトロエレメントのダイナミズム」 第147回日本獣医学会学術集会 栃木(2009)
5. Tomonaga K, Matsunaga H, and Ikuta K. Bornavirus infection: mechanisms of virus-induced neurological disorders and possible link to chronic fatigue syndrome. International Symposium on Viruses in CFS & Post-viral Fatigue. Baltimore USA (2008)
6. 朝長 啓造: 静かに広がる慢性ウイルス感染症: ボルナ病ウイルスの病原性とその不思議なウイルス性状. 第 2 回人獣共通感染症セミナー. 宮崎大学, 宮崎 (2008)
7. 朝長 啓造: ウイルス感染による高次脳機能障害とグリア細胞. 21世紀COEプログラム「脳の機能統合とその失調」大学院特別プログラム「グリア研究の最前線」東京医科歯科大学 東京 (2007)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Hayashi Y, Horie M, Daito T, Honda T, Ikuta K and Tomonaga K. Heat shock cognate protein 70 controls Borna disease virus replication via interaction with the viral non-structural protein X. **Microbes Infect.** 11:3940-3402 (2009)

2. Lee B-J, Matsunaga H, Ikuta K and Tomonaga K. Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. **Antiviral Res.** 80:380-384 (2008)

研究課題別評価書

1．研究課題名

PPR 蛋白質ファミリーの解析と RNA 調節酵素への応用

2．氏名

中村　崇裕

3．研究のねらい

植物オルガネラ（葉緑体、ミトコンドリア）ゲノムにコードされる遺伝子の発現は、核にコードされる遺伝子によって、主に RNA の段階で制御されている。このような制御のために、植物が 500 個もの新規の蛋白質ファミリー、PPR（pentatricopeptide repeat）蛋白質、を進化の過程で独自に獲得してきたことがゲノム配列情報より明らかになった（シロイヌナズナ全蛋白質遺伝子の 1/50）。

500 個の PPR 蛋白質はそれぞれが別の配列をもつオルガネラ RNA に結合し、切断、編集、スプライシング、もしくは翻訳、などの様々な RNA プロセシングに関わることが明らかになってきた。殆どの PPR 蛋白質は 35 アミノ酸から成る PPR モチーフの約 10 個の繰り返しで構成されており、性質の異なる PPR モチーフの組み合わせによって、配列特異的な RNA アダプターとして働くと考えられている。しかし、ゲノム配列情報の計算科学的な手法で見いだされたモチーフであるため、その配列と機能の相関関係は全く不明である。

そこで本研究では、この植物特異的な蛋白質の分子機能を明らかにすると共に、その機能の根幹をなす各 PPR モチーフの RNA 結合特性の解明、および PPR モチーフを人工的に組み上げることで、任意の RNA 配列に結合し、切断する RNA 調節酵素を開発するための基盤技術の確立を目指した。

4．研究成果

A. PPR 蛋白質の分子機能

i) 配列特異的な RNA 切断酵素として働く PPR 蛋白質

約 15%の PPR 蛋白質には、PPR モチーフの連続のほかに、C 末端に約 100 アミノ酸の機能未知の保存モチーフが見いだせる。このモチーフは、アスパラギン酸(D)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)が C 末端に保存されているため、DYW モチーフと呼ばれている。DYW モチーフは、RNA 編集（RNA での塩基の置換）との進化的な相関関係が見いだされたため、RNA 編集の触媒酵素だと推測されていた。

この DYW モチーフの酵素化学的な解析を行ったところ、実際には新規の RNA 切断酵素ドメインであることを明らかにした（論文 2）。また、12 個の PPR モチーフ、1 個の DYW モチーフで構成される PPR 蛋白質、CRR2、の解析を行い、PPR 部分で RNA の認識、DYW 部分で切断を行う配列特異的な RNA 切断酵素であることを試験管内で再現することができた。

ii) RNA 編集に関わる PPR 蛋白質の進化

植物オルガネラでは、RNA 上で C が U に変換される RNA 編集が多く見いだせる（葉緑体 30 個、ミトコンドリア 500 個）。この複数の RNA 編集を経ることでオルガネラ遺伝子の情報は正しく発現する。また、RNA レベルでの遺伝情報の補完という現象であることからも、その意義、分子機構に関する研究が活発に行われている。

植物では、オルガネラ RNA 編集の部位指定に PPR 蛋白質で働くことが明らかになってきたが、編集を触媒する酵素は未だ発見されていない。近年、いくつかの PPR 蛋白質が持つ DYW モチーフが、編集酵素実体であるとの仮説が提唱されたが、研究成果 i)で示したとおり、いくつかの DYW モチーフは RNA 切断酵素として働くことを既に見いだしていた。

今回、新たに RNA 編集に必要な蛋白質として PPR 蛋白質(CRR22、28)を遺伝学的に同定したが、この PPR 蛋白質は RNA 切断に働く DYW モチーフを有していた。そのため、一部の DYW モチ

ーフが当初の仮説通り、RNA 編集酵素である可能性が考えられた。しかし、解析を行ったところ、今回同定した CRR22、CRR28 の DYW モチーフは既に RNA 切断活性を失っていること、in vivo での RNA 編集における機能に DYW モチーフは必要ないことが明らかになった。また、CRR22、CRR28 の DYW モチーフは、RNA 切断に働く CRR2 の DYW モチーフの機能を相補できないことが明らかになった（論文 1）。

このことから、最初は RNA 切断に働いていた DYW をもつ PPR 蛋白質が、RNA 編集に流用されるようになり、機能的に必要でなくなった DYW モチーフは変異により酵素的な活性が失われていること、さらに DYW 部分が消失することで、アダプター部分の PPR モチーフのみで構成される PPR 蛋白質が RNA 編集に働くように進化してきたことが示唆された。

iii) 細胞質雄性不稔の稔性回復因子として働く PPR 蛋白質

細胞質雄性不稔（CMS）とは、細胞質（主にミトコンドリア）遺伝子の変異に起因する現象であり、ヒトでは無精子症に相当する。CMS は、雑種強勢を利用した F1 採種を効率よく行うための農業上の重要形質であり、多くの作物の育種に利用されている。ある種の親株の核に存在する稔性回復因子（Rf）によって、異常ミトコンドリア遺伝子による CMS の効果は打ち消され、稔性が回復する。この CMS・Rf 相互作用のメカニズムの解明は、有用農作物の作出手段としてだけでなく、核と細胞質の相互作用のモデルとして世界中で研究対象となっている。

近年、いくつかの植物で稔性回復遺伝子が同定され、多くの場合、PPR 蛋白質をコードしていることが明らかになった。代表的な CMS の研究材料である BT 型 CMS イネの稔性回復因子である Rf1 は、不稔原遺伝子であるミトコンドリア *atp6-orf79* RNA からの *orf79* の発現を抑えることで、稔性を回復する。この Rf1 の分子機能を解析したところ、Rf1 は *atp6-orf79* RNA に結合し、その切断を誘導することで、*orf79*RNA とリボソームとの結合阻害、切断された *orf79* RNA の分解促進、の2段階で ORF79 蓄積を妨げていることを明らかにした（論文 3）。

B PPR 蛋白質の RNA 結合能の解析と利用

ほとんどの PPR 蛋白質は平均 11 個の PPR モチーフが連続した単純な構造を持つが、それぞれが異なる基質 RNA に結合する。この配列特異的な RNA 結合能は、蛋白質を構成する PPR モチーフそれぞれの性質、および組み合わせに依存すると考えられている。過去の研究で、PPR 蛋白質と RNA との結合を実験的に検出するためには 2 個の PPR モチーフが必要であることがわかっていた。

そこで、2 個の PPR モチーフから成る一連の部分長蛋白質を、HCF152 を含めた合計 3 種類の PPR 蛋白質より調製し（約 20 個）、それぞれの蛋白質の RNA への結合親和性、各塩基（A、C、G、U）への認識特異性を解析することで、RNA との結合親和性が強い PPR モチーフ、配列認識特異性が強い PPR モチーフを同定した。次に、統計処理および蛋白質の構造モデリングを行い、RNA との結合表面を予測し、結合表面に現れる全てのアミノ酸に変異を導入した。

その結果、5 箇所のアミノ酸において、機能欠失型の変異体を得ることができた。さらに変異導入を行い、上記 5 箇所のうち、3 箇所において、機能獲得型の変異体を得ることができた。よってこの 3 箇所のアミノ酸に依存して、PPR モチーフの RNA 結合能が成立していることを明らかにした（論文・特許出願、準備中）。

また、いくつかの塩基に特異的に結合する PPR モチーフを同定した。その結果、同じウリジン（U）に結合するモチーフでも、RNA との結合に働くと考えられる 3 箇所のアミノ酸は非常に多岐であることが明らかになった。

5. 自己評価

A. PPR 蛋白質の分子機能について

2000 年に初めて同定された植物特有の成分である PPR 蛋白質について、本研究でいくつかの機能解析を行ったことで、その分子機能の概要をつかむことができたと考えている。PPR 蛋白質の解析は主に遺伝学手手法で行われることが多く、その蛋白質科学的な特徴を解析した報告例は非常に少ない。本研究期間中に報告した事例は、PPR 蛋白質の分子機能、植物における役割を理解する上で、重要な知見を提供していると考えている。

B. PPR 蛋白質の RNA 結合能の解析と利用
PPR モチーフの RNA 結合能に関しては全く知見がなかった。本研究で RNA 結合に能動的に働くいくつかのアミノ酸を同定することができた。これは、PPR モチーフが RNA 結合ドメインとして機能するための条件を明らかにしたものであり、非常に重要な知見だと考えている。PPR モチーフとよく似た TPR モチーフ(34 アミノ酸;蛋白質-蛋白質相互作用に働く)との機能的差異、進化を考察する上でも重要な知見である。しかし、PPR 蛋白質と RNA との結合の原子レベルでの理解、目標に掲げた任意の配列に結合・切断する人工タンパク質の開発には、本研究期間中には到達できなかった。以後も、同研究開発を継続したいと考えている。

6. 研究総括の見解
植物のオルガネラゲノムにコードされる遺伝子の発現は、核にコードされる遺伝子によって、主に RNA の段階で制御されている。このような制御のために、植物は多くの PPR タンパク質ファミリー(35 アミノ酸からなる PPR モチーフの約 10 個の繰り返しで構成)を持つ。PPR タンパク質それぞれは別の配列を持つオルガネラ RNA に結合し、切断、編集、スプライシング、翻訳などの RNA プロセシングに関わる。そこで、PPR モチーフの配列と RNA 認識の関係を明らかにし、任意の RNA 配列に結合し、切断する RNA 調節酵素を開発することを目的としてきた。PPR と RNA の相互作用は非常に複雑であり、最終的な PPR 配列と RNA の相互作用の規則は不明であるが、本研究で、RNA 結合に能動的に働く幾つかのアミノ酸を同定することに成功したことは評価できる。さらに、本研究により、一部の PPR タンパク質中の DYW モチーフは RNA 切断酵素であることを証明し、また雄性不稔を稔性へと回復させる PPR タンパク質はミトコンドリア不稔原遺伝子からの RNA を切断していることなども明らかにし、PPR タンパク質の機能に関する理解を深める貢献をした。

7. 主な論文等
A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの
①論文

1. Kenji Okuda, Anne-Laure Chateigner-Boutin, Takahiro Nakamura, Etienne Delannoy, Mamoru Sugita, Fumiyoshi Myouga, Reiko Motohashi, Kazuo Shinozaki, Ian Small, Toshiharu Shikanai Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. ***Plant Cell*** 21, 146-156 (2009)

2. Takahiro Nakamura, Mamoru Sugita A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endo-ribonuclease activity. ***FEBS Lett.*** 582, 4163-4168 (2008)

3. Tomohiko Kazama, Takahiro Nakamura, Masao Watanabe, Mamoru Sugita, Kinya Toriyama Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. ***Plant J.*** 55, 619-628 (2008)

②特許
研究期間累積件数:2 件

発 明 者:中村崇裕、小林啓子
発明の名称:PPR モチーフを利用した RNA 結合蛋白質の改変方法
出 願 人:九州大学
出 願 日:2010 年 3 月 11 日
出願番号: 特願 2010-55155

発 明 者:中村崇裕、杉田護

発明の名称：RNA 切断活性を有するタンパク質及びその利用
出　願　人：名古屋大学
出　願　日：2006 年 12 月 5 日
出願番号: 特願 2006-328869

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの
①論文

1. Takahiro Nakamura, Kumiko Naito, Naoto Yokota, Chieko Sugita, Mamoru Sugita
Cyanobacterial non-coding RNA, Yfr1, is required for growth under multiple stress conditions.
Plant Cell Physiol. 48, 1309-1318 (2007)

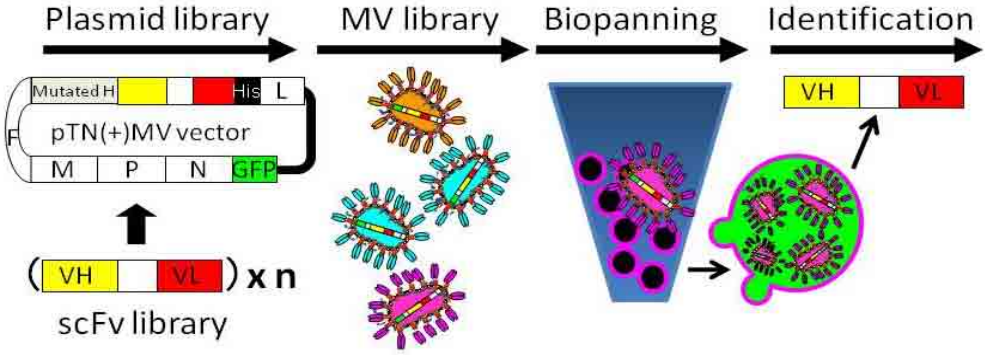
研究課題別評価書

1．研究課題名
RNA ゲノムを用いた悪性腫瘍の診断・治療法の開発

2．氏名
中村　貴史

3．研究のねらい
癌は日本における死亡原因で最も多い病気であり、特に現行の治療法に対して極めて高い抵抗性を示す難治性悪性腫瘍の早期診断法、および新規治療法の確立が望まれている。そこで本研究では、RNAとウイルスの特性に着目し、1）RNAをゲノムとしてもつ弱毒化麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革新的抗体ディスプレイライブラリーを構築し、その技術を用いて新規抗体医薬の開発を目指す。2）純国産ワクシニアウイルスワクチン株ゲノムに特定のマイクロ RNA 標的配列を挿入したマイクロ RNA 制御増殖型ワクシニアウイルスを構築し、癌細胞のみを破壊する新規癌ウイルス療法の開発を目指す。

4．研究成果
研究項目１



麻疹ウイルスの特性を利用した Virobody ライブラリー開発の概略

A麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた革新的抗体ディスプレイライブラリーの構築

弱毒化麻疹ウイルスのリバースジェネティクス法により、一本鎖抗体（scFv）をウイルス表面 H 蛋白上に提示し、かつ元来のウイルス親和性を排除することによって、scFv が持っている特異性と親和性を介して特定の標的腫瘍細胞にのみ感染させる技術を開発した。そこで、このテクノロジーを応用し、ウイルスに scFv を提示させた革新的ディスプレイライブラリー、“ウイルス(Virus) + 抗体ライブラリー(Antibody Library) = ビロボディライブラリー(Virobody Library)”を構築する。

最初に、より多様性の高いscFv提示麻疹ウイルスライブラリーを調整するため、より効率の良いプラスミドライブラリーの構築法と、リバースジェネティクスによるウイルスレスキュー法を最適化する必要があった。従来のライゲーション反応によるプラスミドライブラリーの構築では、目的とするプラスミドの獲得効率が悪く、同時に不安定なものであった。そこでλファージの部位特異的組換え反応を利用したプラスミドライブラリーの構築法の開発を試みた。その結果、この構築法では、非常に効率よく、安定して目的とするプラスミドを獲得することが可能となった。一方、従来の麻疹蛋白発現ヘルパー細胞を用いたリバースジェネティクスによるウイルス回収は非常に低い効率であった。この問題を解決するため、非増殖型T7ポリメラーゼ発現 5 型アデノウイルス（Ad5-T7）、又は非増殖型T7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスDIs株（DIs-T7）を構築し、Ad5-T7、又はDIs-T7を293-αHis細胞に感染後、この感染細

胞へ麻疹ウイルス感染性cDNAとT7プロモーター下にあるウイルス蛋白発現ヘルパープラスミドをトランスフェクションし、その2日後にVero-αHis細胞を加えた。その結果、レスキュー効率は大幅に向上し、1cm^{2}あたり1x10^{4}TCID50というウイルス産生に達した。

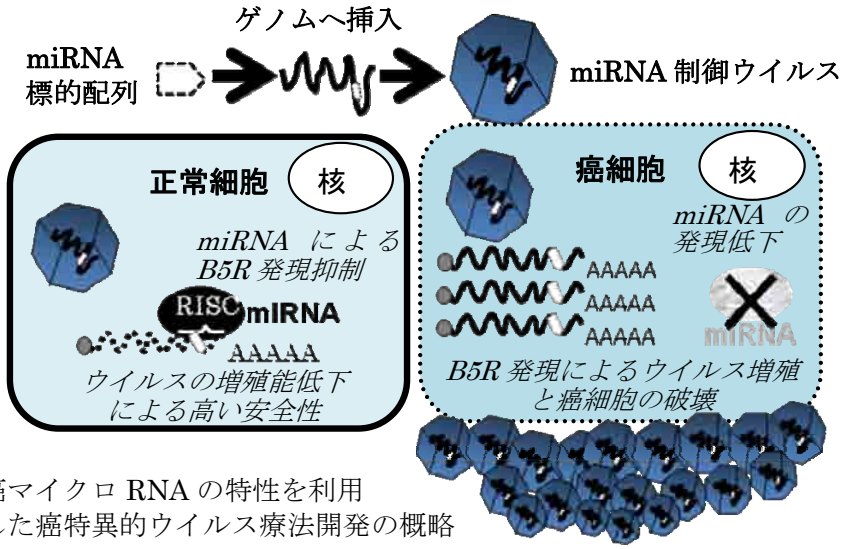
B麻疹抗体ディスプレイライブラリーからの癌特異的抗体スクリーニング

上皮成長因子受容体(EGFR)、又はユビキチンに対する既知の scFv を、それぞれ麻疹ウイルスゲノムに挿入したプラスミドを構築し、さらに前者には緑色蛍光タンパク質(GFP)を、後者には赤色蛍光タンパク質(DsRed)を、ウイルス感染細胞において発現するように麻疹ウイルスゲノムへ挿入した。そして、各プラスミド(EGFR: ユビキチン)を1:1から1:1000の割合で混合し、上述 A で開発したリバースジェネティクス法にて麻疹ウイルスをレスキュー、増殖させた。その各ウイルスライブラリーを EGFR 発現腫瘍細胞(ヒト乳癌細胞 MDA-MB231)に直接感染させてバイオパニングを行った。その結果、1:1からのライブラリーでは、MDA-MB231 細胞において広範な GFP 発現と細胞融合が観察されたが、DsRed 発現を伴う細胞融合は見られなかった。一方1:1000のライブラリーにおいても、1:1と比べると顕著に少なかったが、GFP 発現と細胞融合は確認された。

次に、GFP 発現と細胞融合が見られたウイルスプラークより、ウイルス RNA を回収し、RT-PCR 法により scFv 遺伝子を増幅し、クローニング後、scFv 遺伝子のシークエンスを行った。その結果、10クローン中、7個が EGFR scFv であった。これらの結果より、ユビキチンを介してのみ感染する麻疹ウイルスの中に、1:1000という割合で、ごく少量含まれている EGFR を介してのみ感染する麻疹ウイルスも、その標的分子 EGFR を発現している腫瘍細胞でのバイオパニングによって簡単に分離できることを確認した。

上述Aで開発したプラスミド構築法より、イギリスGeneservice Ltdから提供されているヒトscFv合成ライブラリーIとライブラリーJを、それぞれ麻疹ウイルスゲノムに挿入したプラスミドライブラリーを構築した。IとJを合わせた麻疹ゲノムscFvライブラリーサイズ は、約5x10^{6}であった。このプラスミドライブラリーから麻疹ウイルスライブラリーを構築し、ヒト膵臓癌PancI細胞に感染させてバイオパニングを行った。しかしながら、同定されたscFv抗体の親和性は抗体単体として機能するほど高くはなかった。そこで、複数ドナーの新鮮な末梢血リンパ球から合成したcDNAよりscFv遺伝子ライブラリーを調整し、これらを提示する麻疹ウイルスライブラリーによるバイオパニング、癌特異的抗体の同定を試みている。

研究項目2



癌マイクロ RNA の特性を利用
した癌特異的ウイルス療法開発の概略

A癌細胞のみを特異的に破壊するマイクロRNA制御増殖型ワクシニアウイルスの構築

現在世界中において、生きたウイルスを利用して癌を治療する癌ウイルス療法に関する前臨床研究、および臨床治験が積極的に行われている。これは、ウイルスが本来持っている癌細胞に感染後、癌組織内で増殖しながら死滅させるという性質（腫瘍溶解性）を利用する新しい癌治療法である。純国産ワクシニアウイルス LC16m8 は、B5R 遺伝子にフレームシフト変異が見られ、この蛋白が機能しなくなるため、正常細胞での増殖性が著しく減弱している弱毒化ワクチン株である。一方、B5R はウイルスの弱毒化だけではなく、腫瘍溶解性とも深く関与していることを見出してきた。これより、癌細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないように LC16m8 を改良できれば、強力な腫瘍溶解性による抗腫瘍効果と高い安全性を兼ね備えたウイルス療法になり得る。

そこで、正常細胞と癌細胞におけるマイクロ RNA(miRNA)の発現プロファイリングにより、正常細胞に比べて、肺癌、膵臓癌、およびメラノーマなどの癌細胞で発現が低下している let7a miRNA に注目した。相同組換え法を用いて、LC16m8 株からその変異 B5R 遺伝子を完全に欠失させたウイルス LC16m8Δに、全長 B5R 遺伝子を再挿入し、その遺伝子の 3’非翻訳領域（UTR）に miRNA の標的配列（22塩基）を4回繰り返して挿入した。

この let7a miRNA 制御増殖型ワクシニアウイルスは、let7a 高発現 Hela 細胞において B5R の発現が低下し、そのウイルス増殖と殺細胞効果は B5R 遺伝子欠失 LC16m8Δと同等であった。一方 let7a 低発現 A549 細胞では、B5R の高発現と、それに伴うウイルス増殖と殺細胞効果の増強が見られた。さらに、let7a が結合できないよう標的配列に変異を加えた場合、let7a の発現に関わらず両方の細胞で同等のウイルス増殖・殺細胞効果を示した。また、Hela 細胞の let7a を Decoy RNA によって特異的にノックダウンした Hela－let7ako 細胞への感染では、let7a 発現 Hela-NC 細胞で抑制された B5R の発現が回復し、それに伴うウイルス増殖と殺細胞効果を示した。

以上より、この miRNA 制御型ウイルスでは、let7a マイクロ RNA 制御機構による遺伝子発現調節と同調して、正常細胞における B5R 発現は抑制されるが、癌細胞では miRNA が低下しているので、癌特異的に B5R を発現することを証明した。

Bマイクロ RNA制御増殖型ワクシニアウイルスの抗癌作用と安全性

5 x 10^6個のヒト膵臓癌細胞株BxPC3 を免疫不全ヌードマウスの右腹側の皮下に移植し、その腫瘍直径が約 0.6cmに到達した時、10^7pfuのウイルスを腫瘍内に 0 日、3 日、6 日目と合計 3 回投与した（各群 5 匹）。let7a miRNA制御増殖型ワクシニアウイルス（LC16m8Δ-B5R$_{let7a}$/LG）は、LC16m8 の親株でB5Rが機能するウイルス（LC16mO/LG）、及びlet7a miRNAの標的配列に変異をもつウイルス（LC16m8Δ-B5R$_{let7a\ mut}$/LG）と同等に、強力な抗癌作用を示した（図1上）。しかしながら、LC16mO/LG、又はLC16m8Δ-B5R$_{let7a\ mut}$/LGを投与マウスでは、治療60日後までに急激な体重減少によって全てのマウスが死亡した。それに対しLC16m8Δ-B5R$_{let7a}$/LGは、治療60日後で5匹中4匹のマウスにおいて完全な腫瘍の消失が観察され、100%のマウスが生存していた（図1下）。

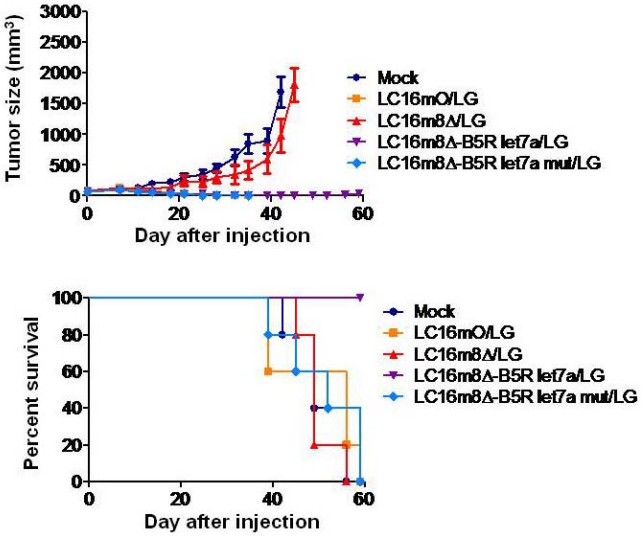


図1　BxPC3 担癌マウスに対する癌ウイルス療法
（上図；腫瘍増殖曲線、下図；生存曲線）

次に、このBxPC3 担癌マウスにおいて27日、52日後にルシフェリンを投与して、ウイルス感染・増殖細胞を非侵襲的にモニターした。LC16mO/LG と LC16m8 Δ−B5R$_{let7a\ mut}$/LGの投与マウスでは、27日後に全身の正常組織でウイルス増殖が見られ、52日後と時間経過に従ってウイルス増殖は増加し、それに伴う急激な体重減少によって死亡した。それに対しLC16m8 Δ−B5R$_{let7a}$ /LGの投与マウスでは、27日後のウイルス増殖は移植した癌細胞のみに限局し、完全に腫瘍が消失したマウスを含め、正常組織におけるウイルス増殖は見られなかった。さらに、52日後の腫瘍が消失したマウスにおいて、ウイルスは完全に消失していた（図2）。

以上の結果より、マイクロRNA 制御ワクシニアウイルスは、癌細胞では B5R を発現するが、正常細胞では B5R を発現しないため、強力な腫瘍溶解性による抗腫瘍効果と高い安全性を兼ね備えたウイルスとなった。

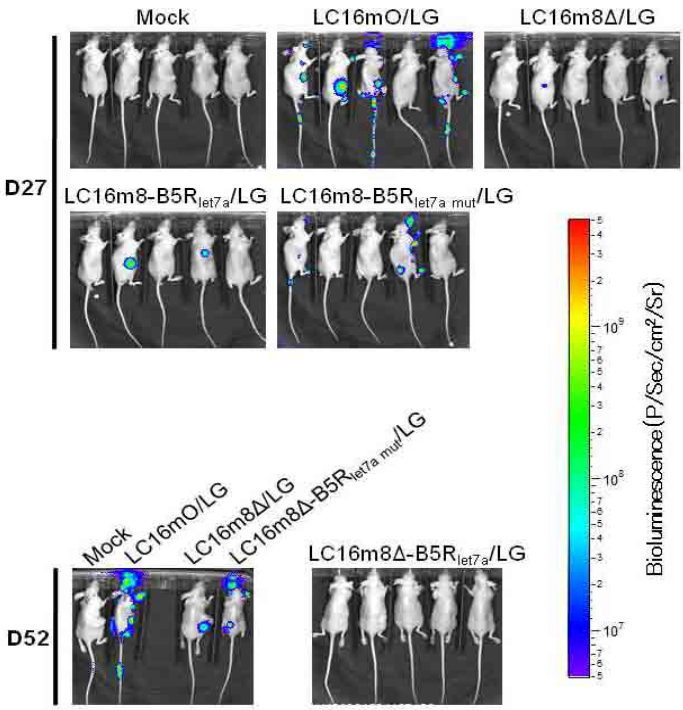


図２　let7a 制御ウイルスの腫瘍特異的増殖性（各ウイルスは、感染細胞内でルシフェラーゼを発現するので、ウイルス投与 27、52 日後における BxPC3 担癌マウス体内のウイルス分布をルシフェリンの投与によって非侵襲的にモニターした。増殖ウイルス数は赤色ほど多く、紫色ほど少ないことを示す。）

5．自己評価

研究項目1に関しては、当初の目標に対して50%程度の達成率であるが、同時に問題点とその解決策を研究期間内で見いだしていることより、それらは今後の展開として取り組んでいく。一方、研究項目2に関しては、当初の目標に対して100%の達成率であり、今後は臨床応用を視野に入れた研究へと発展させる。

6．研究総括の見解

難治性悪性腫瘍の早期診断法および新規治療法の確立を目指し、RNA とウイルスの特性を活用することが目的である。まず RNA をゲノムとして持つ弱毒化麻疹ウイルスに一本鎖抗体を提示させた抗体ディスプレイライブラリーを構築し、新規抗体医薬の開発を目指した。第2に、ワクシニアウイルスワクチン株ゲノムに特定のマイクロ RNA 標的配列を挿入し、癌細胞のみを破壊する新規癌ウイルス療法の開発を目指した。第1の開発計画は、抗体ライブラリーの性能故に難航したが、ライブラリーを換えることにより進行し始めた。これからも進めて欲しい。第2の開発計画は大変順調に進行している。LC16m8 株は、B5R 遺伝子に変異があり、正常細胞での増殖性が著しく減弱している。B5R はウイルスの弱毒化だけでなく、腫瘍溶解性とも関係している。そこで、本研究では、ウイルスを、癌細胞では B5R を発現するが、正

常細胞ではB5Rを発現しないように改良した。肺癌、膵臓癌、メラノーマなどの癌細胞で発現が低下しているlet7a miRNAに注目し、このmiRNAの標的配列（22塩基）をB5R遺伝子の3'UTRに挿入した。この組換えワクシニアウイルスは、let7a miRNAの低下している癌細胞ではB5RmRNAの分解は起こらず、したがって癌細胞は溶解するが、正常細胞ではB5RmRNAの分解が起こり細胞は破壊されない。良く考えられた見事な実験であり、ウイルスを使いこなしている点は、賞賛に値する。

7．主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Meng X, Nakamura T, Okazaki T, Inoue H, Takahashi A, Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M, Yanagi Y, Tani K. Enhanced Antitumor Effects of an Engineered Measles Virus Edmonston Strain Expressing the Wild-type N, P, L Genes on Human Renal Cell Carcinoma. Mol. Ther. 2010 Mar;18(3):544-51.

②特許

研究期間累積件数：1件
発　明　者：中村貴史、引地美奈、木所　稔、志田　壽利、田原秀晃
発明の名称：マイクロRNA制御組換えワクシニアウイルスおよびその使用
出　願　人：東京大学、国立感染症研究所、北海道大学
出　願　日：2010年4月9日
出願番号：特願2010-090662

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

2. Takeda M, Ohno S, Tahara M, Takeuchi H, Shirogane Y, Ohmura H, Nakamura T, Yanagi Y. Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM-knockin mice. J. Virol., 2008 Dec;82(23):11979-84.
3. Hasegawa K, Hu C, Nakamura T, Marks JD, Russell SJ, Peng KW. Affinity thresholds for membrane fusion triggering by viral glycoproteins. J. Virol., 2007 Dec; 81(23):13149-57.
4. Wei J, Wahl J, Nakamura T, Stiller D, Mertens T, Hampl W, Debatin KM, Beltinger C. Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas. Gene Therapy, 2007 Nov;14(22):1573-86.
5. Wei J, Wahl J, Nakamura T, Stiller D, Mertens T, Hampl W, Debatin KM, Beltinger C. Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas. Gene Therapy, 2007 Nov;14(22):1573-86.

②特許

研究期間累積件数：1件
発　明　者：押村光雄、香月康宏、加藤基伸、中村貴史、松岡隆之
発明の名称：　高効率のミクロセル融合法
出　願　人：鳥取大学、東京大学、株式会社 chromocenter
出　願　日：2010年3月3日
出願番号：特願2010－047109

③著書

1. Nakamura T, Russell SJ. Chapter 31 of Rescue and Propagation of Tropism-modified Measles Viruses. Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, A Laboratory Manual, editors: Theodore Friedmann & John Rossi. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2007; 371-380.
2. Nakamura T, Russell SJ. Chapter 18 of Engineering Oncolytic Measles Viruses for Targeted Cancer Therapy. Molecular Targeting in oncology, editors: Kaufman, Howard L.; Wadler, Scott; Antman, Karen. Humana Press 2008; 431-445.

研究課題別評価書

1．研究課題名

RNA による生命反応制御機構の構造的基盤の解明

2．氏名

沼田　倫征

3．研究のねらい

遺伝情報の翻訳過程において、tRNA は mRNA にコードされたヌクレオチド配列情報をアミノ酸配列情報に変換するアダプター分子として機能する。従って、tRNA による正しいコドンの認識は、適正な蛋白質を生合成する上で極めて重要である。tRNA によるコドンの認識は、コドン−アンチコドン間の塩基対の形成によりなされているが、その際、tRNA のアンチコドンに存在する修飾ヌクレオシドが、正しいコドンの認識に重要な役割を果たすことが知られている。特に、tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシドは、コドン第三塩基との対合に関わることから、コドンの縮重（揺らぎ）と密接に関わっている。5−カルボキシメチルアミノメチル−2−チオウリジンは、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応する tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシドであり、これら tRNA のアンチコドンが正確にコドンを認識し結合する上で不可欠である。つまり、5−カルボキシメチルアミノメチル−2−チオウリジンは、リボソームにおける蛋白質合成反応において、誤ったアミノ酸の取り込みを抑制するという重要な役割を担っている。5−カルボキシメチルアミノメチル−2−チオウリジンの 5 位のカルボキシメチルアミノメチル化修飾には、二種の酵素（GidA と MnmE）が関与する。両酵素は複合体を形成することが知られており、さらに、葉酸（THF）化合物由来の炭素原子とグリシンがカルボキシメチルアミノメチル基の骨格を形成することが推定されている。しかしながら、その詳細な修飾反応メカニズムに関してはあまり理解されていない。本研究では、GidA と MnmE の X 線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析から、カルボキシメチルアミノメチル化修飾反応における両酵素の役割を解明することを目的とする。

4．研究成果

v（1） GidA の構造解析

本研究では、高度好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 GidA の結晶構造解析を行った。まず、GidA の大腸菌内における大量発現系を構築し、各種クロマトグラフィーを用いた精製スキームを確立した。精製した酵素を用いて結晶化条件をスクリーニングした結果、幾つかの条件で GidA の結晶を得ることに成功し、単波長異常分散法によってその結晶構造を決定した（図 1a）。その結果、GidA にはフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）が補酵素として結合しており、変異体解析と併せ FAD のフラビン環結合部位周辺が GidA の活性部位であることが明らかとなった（図 1b）。FAD 結合部位近傍には種間で高度に保存されたシステイン（Cys48）が存在していた（図 1b）。Cys48 をセリンに置換した変異体を作製し、*gidA* 欠損大腸菌変異株を用いた *in vivo* 相補実験から、Cys48 がカルボキシメチルアミノメチル化反応において触媒残基として機能することを明らかにした。

カルボキシメチルアミノメチル化反応には GidA および MnmE が関与し、両酵素は複合体を形成することが報告されている。しかしながら、tRNA が両酵素とそれぞれ相互作用するのか、また、どちらか一方の酵素のみと特異的に相互作用するのかは明らかではない。そこでゲルシフト解析を行ったところ、tRNA が GidA と強固に相互作用することが明らかとなり、GidA と MnmE が形成する複合体において、GidA が主に tRNA との結合に関わることを示唆した。GidA には活性部位を中心とした広範な塩基性領域が存在しており、変異体解析から、この塩基性領域が tRNA との結合に関わることが明らかとなった。これらの結果から、修飾反応過程において tRNA のアンチコドン一文字目のウリジンが、触媒に関わる Cys48 の近傍に配置されることが予想され、GidA がチミジル酸合成酵素と類似の反応メカニズムでウリジンの 5 位を修飾することを示唆した。

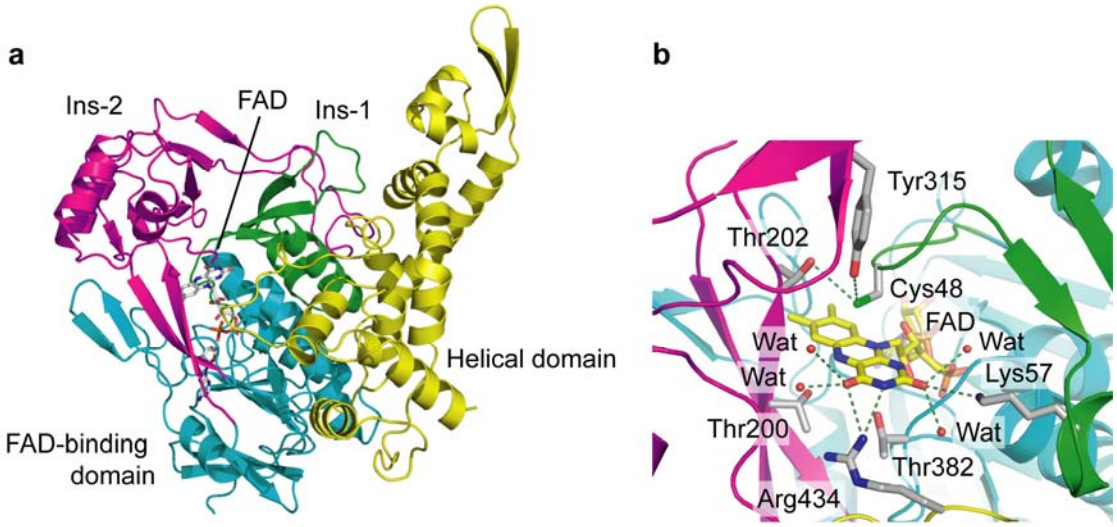


図 1. GidA の結晶構造。全体構造(a)と活性部位の詳細構造(b)を示す。FAD のフラビン環の上に位置する Cys48 が触媒残基である。

（2） MnmE の構造解析

高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 MnmE を大量精製、結晶化し、その結晶構造を決定した(図 2a)。構造解析の結果、MnmE は三つのドメイン(N 末端ドメイン、ヘリカルドメイン、GTPase ドメイン)から構成されており、N 末端ドメインを介して二量体化することが明らかとなった。立体構造の相同性から、MnmE の二量体化した N 末端ドメインの構造は、THF 結合モジュールと類似することが明らかとなった。構造を詳細に解析した結果、N 末端ドメイン同士が会合する分子境界付近に、深いクレフトが形成されており、そのクレフトに強い電子密度が観察された。N 末端ドメインが THF 結合モジュールと類似していること、さらに、カルボキシメチルアミノメチル化修飾には THF 誘導体が炭素源として利用されることを勘案すると、この電子密度の正体がカルボキシメチルアミノメチル化修飾に利用される THF 化合物であることが推定された。そこで、質量分析法によって、MnmE に結合している物質を解析したところ、5,10-メチレン THF 及びその分解産物である THF が検出された。これらの結果より、カルボキシメチルアミノメチル化修飾には 5,10-メチレン THF が基

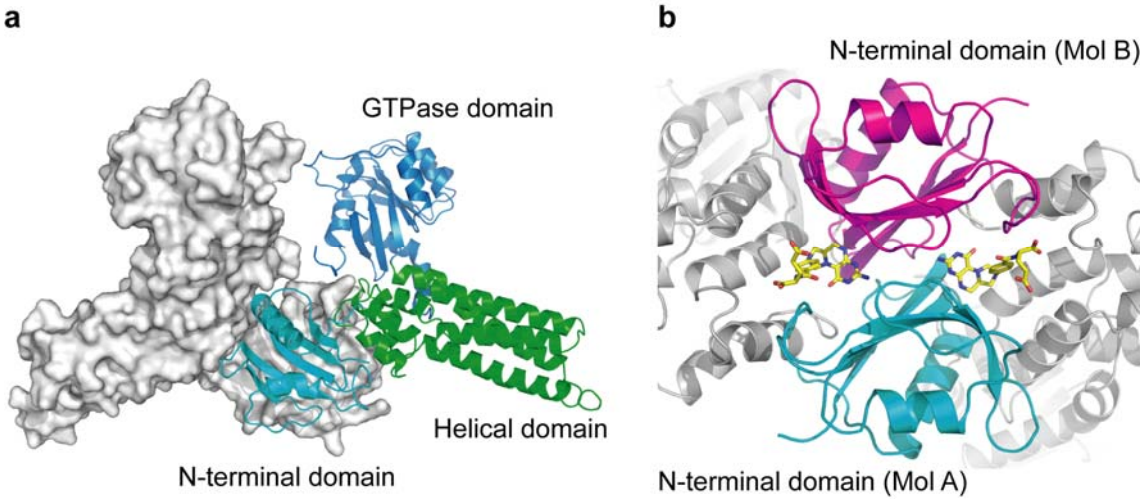


図 2. MnmE の結晶構造。(a)MnmE の二量体構造。N 末端ドメインを介して二量体化している。(b)5,10-メチレン THF との相互作用部位。

質として利用されることを示唆した。また、MnmE の結晶を 5,10−メチレン THF を含む溶液に浸潤させ、複合体の結晶構造を決定するとともに（図 2b）、*mnmE* 欠損大腸菌変異株を用いた *in vivo* 相補実験から、5,10−メチレン THF 近傍に位置する保存されたリジン残基が、カルボキシメチルアミノメチル化修飾に不可欠であることを示した。ただ、このリジン残基の役割は、現段階では明らかになっておらず、その解明は今後の大きな課題である。

（3） カルボキシメチルアミノメチル化修飾における GidA と MnmE の役割

これまでに、カルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる GidA と MnmE は複合体を形成すること、また最近になって、カルボキシメチルアミノメチル基の骨格は 5,10−メチレン THF 由来のメチレン炭素とグリシンから構成されることが報告されている。しかしながら、如何にして tRNA アンチコドン１文字目のウリジンに、このような非常に複雑な側鎖を導入しているのかといった機構は明らかではない。本研究における GidA と MnmE の構造機能解析から、(i) 主に GidA が tRNA との相互作用に関わること、(ii) GidA の触媒部位においてチミジル酸合成酵素と類似の反応メカニズムでウリジンの 5 位を修飾すること、(iii) MnmE に 5,10−メチレン THF が結合することが明らかとなっている。これらの結果に基づき以下の考察を行った。まず、MnmE の活性部位においてグリシンと 5,10−メチレン THF が反応し、イミン誘導体（カルボキシメチルアミノメチル基前駆体）を形成する。次いで、このイミン誘導体が GidA の触媒部位に輸送され、ウリジンに取り込まれて 5−カルボキシメチルアミノメチルウリジンが生成する。この仮説を検証するためには、GidA と MnmE との複合体の結晶構造を決定する必要性があるが、現在のところ、良質な複合体結晶が得られておらず、その解明は今後の課題である。

５．自己評価

tRNA アンチコドン１文字目のカルボキシメチルアミノメチル化修飾に関わる酵素 GidA と MnmE の構造機能解析を通して、これら酵素の役割を明らかにし、新しい反応メカニズムを提唱できたことは評価できると考えられる。しかし、その反応メカニズムを検証するためには、さらに様々な実験が必要であり、特に、GidA と MnmE との複合体構造さらには tRNA も含む三者複合体の構造情報の取得が不可欠である。これまでに複合体構造を解析すべく、その結晶化を行ってきたが、構造解析に適した良質な複合体結晶は得られていない。今後も引き続き果敢に結晶化に取り組み、複合体構造を決定することによって、反応機構を明らかにしたいと考えている。また当初、さきがけ研究では、tRNA の修飾メカニズムの解明に加えて、ncRNA や RNP の結晶構造解析も進める予定であった。しかしながら、これらについては結晶までは作製できたものの、分解能が悪く、結果として結晶構造を決定することが出来なかった。この点においては、当初の目標をあまり達成できておらず、反省すべき点である。

６．研究総括の見解

mRNA 上のコドン認識には、tRNA 上のアンチコドンによる正しいコドン認識が求められる。その際、tRNA のアンチコドンに存在する修飾ヌクレオシドが、正しいコドンの認識に重要な役割を果たすことが知られている。特に、tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシドは、コドンの第三塩基との対合に関わるので、コドンの揺らぎと密接に関わっている。本研究では、グルタミン酸、リジン、グルタミン等のアミノ酸に対応する tRNA のアンチコドン一文字目に存在する修飾ヌクレオシド、5−カルボキシメチルアミノメチル−2−チオウリジンの形成反応メカニズムを解明する目的で、関与する二種類の酵素（GidA と MnmE）のX線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った。その結果、主に GidA が tRNA との相互作用に関わること、GidA は触媒部位においてチミジル酸合成酵素と類似のメカニズムでウリジンの５位を修飾すること、MnmE に 5,10−メチレン THF が結合することなどを明らかにした。この成果により、新しい反応メカニズムを提唱することが出来たことは評価出来る。今後は、これら両酵素の複合体結晶、さらには tRNA も加えた三者複合体結晶を得て、さらなる解析を行い、検証する必要がある。

7．主な論文等

（A）さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表　＊ Corresponding author

1. Osawa, T., Ito, K., Inanaga, H., Nureki, O., Tomita, K. and **Numata, T.*** (2009) Conserved cysteine residues of GidA are essential for biogenesis of 5-carboxymethylaminomethyluridine at tRNA anticodon. *Structure* **17**, 713-724.
2. Osawa, T., Inanaga, H. and **Numata, T.*** (2009) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the tRNA-modification enzyme GidA from *Aquifex aeolicus*. *Acta Crystallogr. Sect. F***65**, 508-511.

（2）受賞

1. 財団法人手島工業教育資金団　平成 18 年度手島記念研究賞 （平成 19 年 2 月 28 日）

（3）学会発表

1. 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNA 揺らぎ塩基の修飾に関わる酵素の構造機能解析（1）」 日本農芸化学会 2009 年度大会、福岡、2009 年 3 月
2. 大澤拓生、伊藤耕一、稲永英子、沼田倫征 「tRNAアンチコドンの修飾に関わる酵素GidAにおいて保存されているシステインは 5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン生合成に不可欠である」 第 9 回日本蛋白質科学会年会、熊本、2009 年 5 月

（B）本研究課題に関連した成果で主なもの

（1）論文（原著論文）発表

1. Ikeuchi, Y., Kimura, S., **Numata, T.**, Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T. and Suzuki, T. (2010) Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea. ***Nat. Chem. Biol.*** 6, 277-282

研究課題別評価書

1．研究課題名
細胞周期とリボソーム生合成制御の連携システムの解明

2．氏名
藤原　俊伸

3．研究のねらい
DNA から RNA として転写された遺伝情報の発現は、様々な RNA 結合タンパク質による複雑かつ巧妙な転写後遺伝子発現調節機構により制御され、高次生命現象を規定する。そして、転写後遺伝子発現調節のうち、mRNA をはじめとする RNA の適切な部位への輸送および、局所における翻訳の制御は、遺伝子の発現を時空間的に制御する機構として最適である。RNA 結合タンパク質がこのような転写後遺伝子発現の調節における主役として働いている。特に、分化・発生等の高次な細胞機能においては mRNA 上の制御信号、microRNA とともに RNA 結合タンパク質の働きが鍵を握っている。本研究のねらいは、このような RNA 結合タンパク質の働きにより、①真核生物のリボソーム生合成制御と細胞周期とを連携するしくみ、②神経細胞特異的な翻訳制御機構を解明することである。

4．研究成果
（1）細胞周期とリボソーム生合成制御との連携機構に関する研究の成果
本研究開始前までに、種を超えて高度に保存されている RNA 結合タンパク質・RBD タンパク質の機能解析を線虫 *C. elegans* をモデル生物として行い、これまで酵母においてのみ報告されていた RBD タンパク質の rRNA 前駆体プロセシング活性が、多細胞真核生物においても保存されていることを最初に証明し、線虫における rRNA 前駆体のプロセシング経路の概要も初めて明らかにした。この経路は線虫のデータベース WORM BASE に登録されている。
さらに、線虫の初期発生は、簡略化された細胞周期を持つ卵割期から中期胞胚変移（MBT）を経て形態形成期へと続く。この MBT に至り初めて細胞周期に G1 及び G2 期が現れ、体細胞型の細胞周期に近づく。そして、本研究者は rRNA 前駆体のプロセシングは、線虫において MBT に相当する時期まで抑制されていることを発見した。線虫では、rRNA 前駆体は受精直後より新たに転写されることが知られている。このことは、胚発生の初期では rRNA 前駆体の転写とそのプロセシングが連動しないということを意味する。そこで、タンパク質生産装置であるリボソームの安定供給は細胞の維持や増殖、そして発生・分化に必須であるという概念から「細胞内あるいは細胞外の環境に応答した積極的なリボソーム生合成制御システムが存在する」という仮説を立てた。
この命題を検証するために、哺乳類の培養細胞を用いた実験系の構築を試み、徳島大学との共同研究で、WDR55 という核小体に局在する機能未知であったタンパク質が rRNA 前駆体の切断に必須なタンパク質であり、その機能を阻害することで細胞周期が G1 期で停止することを証明し、仮説が実証された（**図１＆２**）。現在その分子機構を哺乳類の培養細胞を用いて解析している。また、*C.elegnas* より初めて U3 snoRNA を同定し、報告している（**図 3**）。さらに、これまで高等真核生物にのみ見いだされていた U8 snoRNA の線虫ホモログを生化学的に同定し、その機能解析を行った。
（2）RNA 結合タンパク質による神経細胞特異的な翻訳制御機構に関する研究の成果
Hu タンパク質群は、発生過程の神経系に強く発現している RNA 結合タンパク質である。これまでの本研究者のグループを含む国内外の研究により、神経細胞特異的に発現のみられる 3 種のマウス Hu タンパク質(HuB、HuC、HuD)を、神経成長因子・NGF により神経細胞に分化するラット副腎褐色細胞腫由来細胞（PC12 細胞）に過剰発現させると、NGF 非存在下にも関わらず神経細胞への分化が誘導されることが判明している。さらに、全組織で発現がみられる HuR は分化誘導能を持たないことから、神経細胞特異的に発現がみられる 3 種の神経細胞特異的 Hu タンパク質は

神経分化を正に制御する因子であることが示唆されている。Hu タンパク質は標的 mRNA へ結合してその安定化をはかり、さらには翻訳を促進することで神経系の細胞の運命決定に関与していると考えられており、Hu タンパク質による翻訳制御機構の解明は、神経細胞の分化機構を明らかにする上で必須であるが、その分子機構はこれまで知見が乏しかった。

そこで、Hu が poly(A)に結合すること、そして翻訳が活発に行われている polysome 画分に存在することから、「Hu は翻訳機構に直接関わる」と予測した。さらに、「翻訳制御がこのタンパク質の機能の本質であり神経分化誘導能に必要である」という仮説を立てた。Hu と類似した特徴を持つ因子として PolyA binding protein (PABP)が挙げられる。そこで、Hu の機能を PABP のアナロジーで考え、翻訳開始複合体と相互作用するかどうかを検証した。Cap 構造の認識から開始される翻訳開始複合体の形成は翻訳の律速段階であり、タンパク質合成を正あるいは負に調節するうえでこの過程を制御することは効率がよく、実例も数多くある。そして、HuD の変異タンパク質および cap アナログカラムを用いた生化学実験により、HuD が polyA および eIF4A との結合を介して、翻訳開始複合体と相互作用することを明らかにした（**図4**）。

次に、HuD が本当に翻訳機構に関与するのかどうかを、培養細胞抽出液を用いて cap-poly(A) mRNA からの翻訳を in vitro で再現できる実験系を構築し、検証した。この in vitro 翻訳系では既存のウサギ網状赤血球ライセートを用いた翻訳系とは異なり、cap 依存的な翻訳をレポータータンパク質の発現を指標に厳密に定量することができる。microRNA による翻訳制御機構の解析など、今後の拡張性を考え、線虫や組織など培養細胞以外の抽出液を用いた翻訳系もこの系の応用で構築することに成功している。そして、この翻訳系に野生型および様々な変異体 HuD タンパク質を加えることで、HuD が polyA および eIF4A との結合を介して、翻訳開始複合体と相互作用し、翻訳を正に制御することを発見した。次に PC12 細胞および N1E-115 細胞を用いて翻訳活性化能と分化誘導能との関係を検証しました。その結果、HuD の翻訳活性化機能が神経細胞への分化に必須であることが明らかになり、仮説が正しいことが示された。

図１　WDR55とpre-rRNAプロセシング

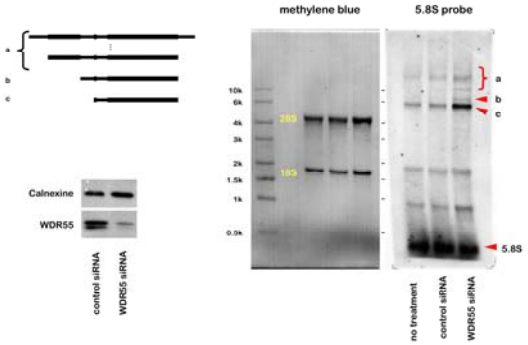


図２　WDR55と細胞周期

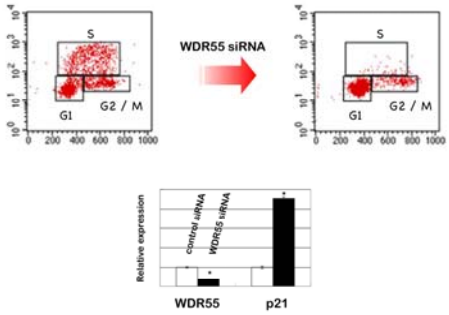


図３　*C.elegnas*におけるU3 snoRNA

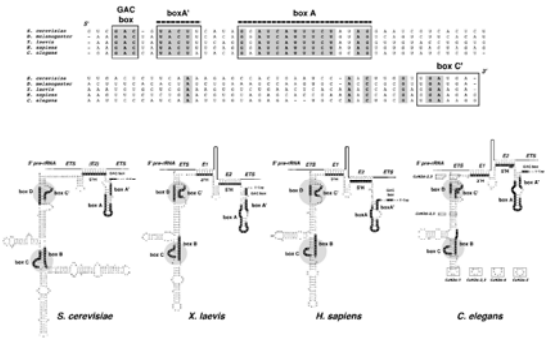
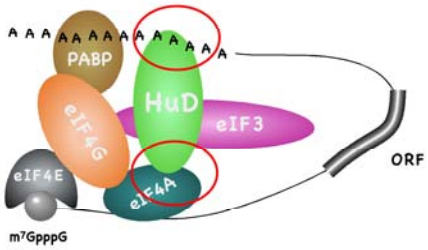


図４　HuDの翻訳開始複合体結合モデル



5．自己評価

RRM 型 RNA 結合モチーフを持つ RNA 結合タンパク質をプローブとし、線虫をモデル生物として用いた研究は困難を極めた。しかしながら、その過程において、線虫を高純度に大量調製する手法を開発し、その結果これまで未同定であった U3 snoRNA を同定することができた。そして、哺乳類の培養細胞を用いた研究により、転写の不具合ではなく rRNA プロセシングの不具合が P53 を介した細胞周期の停止を引き起こすことを明らかにすることができた。今後、どのような因子がセンサーとして機能しているかを突きとめたい。

一方、同じ RRM 型 RNA 結合モチーフを持つ神経細胞特異的 RNA 結合タンパク質の機能解析を行った結果、本研究者は、HuD が翻訳伸長因子 eIF4A および poly(A)との結合を介して、翻訳開始複合体に結合し、cap 依存的翻訳を促進することを発見している。翻訳因子ではない RNA 結合タンパク質による eIF4A を介した翻訳開始促進機構に関する初めての例である。また、HuD による PC12 細胞の分化誘導能は eIF4A の機能に依存することも明らかにした。この結果は、神経分化に必須なタンパク質合成（翻訳）機構の存在を示しており、今後この翻訳機構を応用することにより、ES 細胞や iPS 細胞を人工的に神経細胞へと分化させる手法の開発や、発症・進行のメカニズムが不明で有効な薬がない神経変性疾患治療のための創薬へとつながるものと期待される。

6．研究総括の見解

真核生物のリボソーム生合成制御と細胞周期が連携するしくみ、および神経細胞特異的な翻訳制御機構を、そこに関わる RNA 結合タンパク質を同定し解明することを目的として研究を行ってきた。その結果、前者のメカニズムについては、転写ではなく rRNA プロセシングの不具合のため細胞周期が G1 期でアレストすることを明らかにした。何がセンサーとなっているかは今後の問題である。後者については、HuD が翻訳伸長因子 eIF4A および poly(A)との結合を介し、翻訳開始複合

体に結合し、cap 依存的翻訳を促進することを発見した。翻訳因子ではない RNA 結合タンパク質による eIF4A を介した翻訳開始促進機構の新たな提唱である。いずれの研究でも、大きな発見に結びついており、今後の発展が望まれる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C. and Toshinobu Fujiwara.
   The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a poly(A)- and eIF4A-dependent manner Molecular Cell 36. 1007-1017 (2009)
2. Iwanami, N., Higuchi, T., Sasano, Y., Fujiwara, T., Hoa, VQ., Okada, M., Talukder, SR., Kunimatsu, S., Li, J., Saito, F., Bhattacharya, C., Matin, A., Sasaki, T., Shimizu, N., Mitani, H., Himmelbauer, H., Momoi, A., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M. and Takahama Y.
   WDR55 is a nucleolar modulator of ribosomal RNA synthesis, cell cycle progression, and teleost organ development. PLoS Genet. 4. e1000171 (2008)
3. Sasano, Y., Hokii, Y., Inoue, K., Sakamoto, H., Ushida, C. and Fujiwara, T.
   Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in Caenorhabditis elegans. Biochimie 90. 898-907 (2008)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Hayashi, S., Akiyama, S., Tamaru, Y., Takeda, Y., Fujiwara, T., Inoue, K., Kobayashi, A., Maegawa, S., Fukusaki,, E. A novel application of metabolomics in vertebrate development . Biochem. Biophys. Res. Commun. 386. 268-22 (2009)
2. Mizutani, T., Osaka, T., Fujiwara, T. and Shahidzzman, M.
   Biochemical selenocysteine synthesis and the phylogenic study.
   Yakugaku Zasshi 128. 989-996 (2008)