



研究チームの面々：Long-Cheng Li（左）は、在郷軍人医療センターのチームメンバーと短時間の再会を果たした。左から順に、Li、Emily Noonan、Robert Place、Deepa Pookot、Rajvir Dahiya。

Hitting the on switch

マイクロRNAによる遺伝子活性化をめぐる

Nature Vol.448 (855-858) / 23 August 2007

RNA干渉のまったく新しい側面を示す知見が、サンフランシスコの研究チームによって報告された。革新的な分野にさらに革命を起こそうとする彼らの試みについてErika Checkが取材報告する。

「完璧に見える」。モニター画面を横切る滑らかな軌跡を見つめながら、Robert Placeはそうつぶやいた。「こんなにうまくいくとは思わなかった」。

Placeは、在郷軍人医療センターとカリフォルニア大学サンフランシスコ校（UCSF）に籍を置く分子生物学者で、今しも分光光度計を使って一連の試料の純度を測定しているところだった。どの試料にも、わずか1滴分のマイクロRNA（miRNA）が含まれている。miRNAと

は、遺伝子の発現を抑制する一種の遺伝子制御因子である。あるいは、今のところそういうことになっているとおこう。Placeが没頭しているのは、そのmiRNAの概念を覆すような論文の投稿に絶対必要な最終実験である。彼と同僚であるUCSFのLong-Cheng Liは、細胞内で遺伝子発現を抑制するのではなく促進させる作用をもつmiRNAがあることを見つけたと考えている。

彼らの研究は、生物学で今最もホット

な話題の1つである。RNA干渉の基本概念を揺るがすものかもしれない。RNA干渉の研究では、短いRNAによる遺伝子の発現制御について調べられている。Placeは、自分の行っている実験が他の研究者によって厳しく審査されるはずであり、したがって実験を完璧にやり遂げねばならないことをよく承知している。そして彼自身の見るかぎり、実験は完璧だ。分光光度計は一連の完璧なカーブを表示しており、不純物がないことを示し

C. PICKENS

ている。それは、彼と同僚が落胆と高揚を繰り返した苦節の3年間を経て、やっと手にした報酬といえるかもしれない。

この50年というもの、DNAにばかり注目が集まって、DNAの従兄弟にあたるRNAが生体内で果たしている幅広い役割には目が向けられてこなかった。研究者たちがこのことに気づいたのは、今世紀に入ったころのことだ。古い考え方では、DNAには生命の指令書が書き込まれており、タンパク質はその指令書を実行に移す役で、RNAは両者の橋渡し役に過ぎないとされてきた。現在では、細胞がゲノムに書き込まれている指示書を読み取る機構の制御に、RNAが広くかかわっている可能性が明らかになっている。

RNAに対する認識が大きく変化し始めたのは、1998年のことだ。線虫において、短い2本のRNAの鎖がDNAと同じように対になって、互いにしっかり結合して短い二本鎖を作り、特異的な遺伝子の発現のスイッチを切るという発見がなされたのである¹。RNA干渉という研究領域の誕生である。この発見は2006年のノーベル医学・生理学賞に輝いた。

2001年になって、哺乳類でもRNA干渉が機能していることが発見された²。干渉は、「低分子干渉RNA (siRNA)」または「ショートヘアピンRNA (shRNA)」によって引き起こされることがわかった。どちらの場合も、RISC (RNA-induced silencing complex; RNA誘導サイレンシング複合体) というタンパク質複合体が「ハサミ」として使われ、遺伝子から細胞質のタンパク質産生装置まで情報を送り届ける長いメッセンジャー RNA (mRNA) 分子を切り刻む。生成された低分子RNAは、相補的な塩基配列をもつmRNAを標的にする。RNA干渉では、このmRNAを破壊することで遺伝子からタンパク質生成への過程が途中で止められてしまう。現在、過剰に活性化した遺伝子を活動停止させる必要のある疾患に対して、siRNAやshRNAを用いた臨床試験が行われているところである³。

続いてmiRNAが発見された。miRNAもRNA干渉現象を引き起こすが、siRNA

やshRNAと違って、細胞のDNAにもともとコードされている。ヒトゲノムではこれまでに500種類余りのmiRNAが見つまっている⁴。これらはsiRNAと同じように働くことができ、mRNAの切断に使われるタンパク質複合体も同じである。しかし、大半のmiRNAは、情報伝達を封じるか、分解用の標識付けをするのにとどまっていた、mRNAを切り刻むようなことはしていない(右図を参照)。

これらの技術はいずれもまだ歴史が非常に浅く、登場したのは2004年のことだ。そのころLiは、サンフランシスコ在郷軍人医療センター泌尿器科のRajvir Dahiyaの研究室でRNAの研究を始めていた。当時はLi自身も泌尿器科医の1人として、エピジェネティクスを研究していた。エピジェネティクスとは、ゲノムに安定な修飾を加えることによって、塩基配列を変えずに、遺伝情報の読み取り方を変化させる仕組みである。

Liが特に興味をもったのは、DNAメチル化という、DNAの一部領域にメチル基という化学的な標識を付ける現象だった。メチル基の標識は往々にして近くにある遺伝子を「沈黙」させる。通常であれば腫瘍を抑制するはずの遺伝子がそうした影響を受けると、最悪の結果につながることもある。そこでLiは、この過程を逆行させる方法を見つけ出そうと考え、mRNAを使ってメチル化を制御する方法を試そうと決めた。当時、植物ではすでに10年前に報告がなされていた⁵が、彼が知るかぎり、動物でこの方法はまだ使われていなかった。

予期せぬ活性化

Liは、E-カドヘリンという腫瘍抑制因子タンパク質をコードする遺伝子の上流に位置する、プロモーターとよばれるDNAの発現を調節する配列に相補的な二本鎖RNAの製品を2点購入した。そして、同僚のHong Zhaoがその二本鎖RNAを2系列の前立腺がん細胞に添加して、E-カドヘリンの発現にどう影響を及ぼすかを調べた。3日後、Zhaoはショッキングな結果に驚いた。E-カドヘリンの値が4~

14倍に上昇していたのである。「信じられなかった」とLiはいう。

この研究結果は、これまで低分子の二本鎖RNAについて報告されてきたことを根底から覆すものだった。これまで、遺伝子発現の抑制作用しか報告されていなかったからだ。Liは、RNA干渉に関する教科書の記述を書き換えることになるかもしれない、そして新しい治療法の可能性を開くことにもつながる現象に出くわし、激しく動揺したという。

Liは実験を繰り返したが、何度やっても結果は同じだった。彼は、VEGFとp21という別の2つのがん関連遺伝子も、二本鎖RNAによって活性化されることを見つけた。それは動かぬ証拠のように思えた。少なくとも彼が調べた前立腺がん細胞では、低分子二本鎖RNAによって遺伝子が活性化されたのである。「それは簡単に観察できた。だから、どうしてこんなに長い間気づかれずにいたのか不思議に思えた」とLiは語る。

しかし、これまでだれも気がつかなかったらしい。そこでLiは、ほかの研究者を納得させるためには、スキのない実験を組み立てねばならないと思った。ところが、それがいかにむずかしいかを痛感したのは、2004年8月、Scienceに初めて論文を投稿したときだった。投稿論文はすぐに却下されてしまったのである。彼は、同年12月にNatureにも投稿したが、それも却下され、2005年4月に新しいデータを盛り込んだ論文を同誌に再投稿した。2005年5月にはカリフォルニア州アナハイムで開催された米国癌学会(AACR)の年次総会でその知見を発表したが、会場の反応は冷ややかだった。「懐疑的な質問を山ほどされた」とLiはいう。そして、再投稿からかなり時間が経った2005年12月、Natureからまたしても却下されたのである。何らかの作用機序を示す証拠がなく、結果が十分な説得力をもたない、と通告されたのだという。

Liは研究の進め方に確信をもてなくなっていた。そこへ思いがけなく、Placeという心強い助っ人が、研究室に加わった。2005年10月のことであっ

た。PhDを取得したばかりのPlaceは、Liの知見の目新しさに興奮を覚えた。彼には、しなければならない重要な分子生物学的研究が山積みになっていることがわかった。彼は、この新しい知見に懐疑的な人々を十分に納得させる証拠を得るための実験に取り組んだ。例えば、Liや専属テクニシャン（実験助手）のDeepa Pookotを助けて、免疫プロット法とよばれる分析を完璧に仕上げた。この分析で、タンパク質を検出し、RNA活性化（RNA activation；RNA干渉と逆の作用をさす言葉）によってE-カドヘリンその

他のタンパク質の量がどれくらい上昇するかを調べることができる。

細かい点を詰める

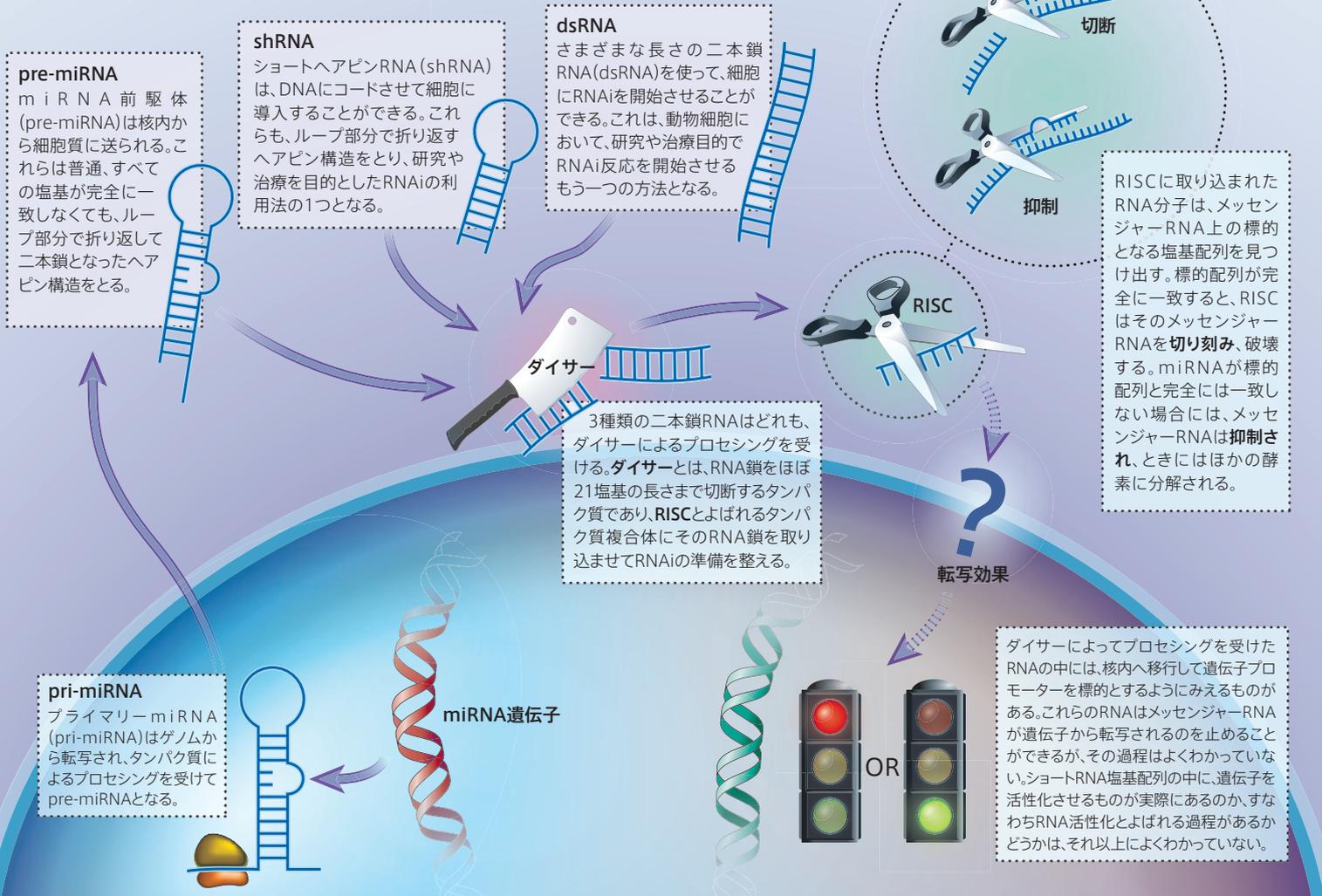
PlaceとLiは、RNAを標的とした遺伝子活性化（RNA活性化）の背景にある仕組みについても考察を始めた。論文を審査した編集者や査読者が問題視する障害だったからである。もし、遺伝子サイレンシング（発現抑制）と同じ道筋でRNA活性化が働いているなら、その効果を引き出したRNAの塩基配列が問題になるはずであり、実際にそうであることを2

人は見つけた。21塩基から成る配列の一端にある塩基5個を変えることで、遺伝子を不活性化できたのである。

PlaceとLiは、ダイサーなど、サイレンシングにかかわっているものと同じ重要なタンパク質のいくつかが、RNA活性化にも使われることを見つけた。ダイサーは、二本鎖RNAを細切れにして、RISCが取り込めるようにするのである。2人はいちばん効率よく機能するRNAを見つけ出そうと、RNA活性化の実験を始めた。「我々は、最適なRNA活性化ができるようにRNA二本鎖の修飾を行い、

干渉を越えて

RNA干渉(RNAi)は過去10年間で最もホットな分野の1つとなってきた。トリガーとよばれる、裏方役のさまざまな短いRNAについて詳細が明らかになるにつれて、RNA干渉が核内でどのように機能して転写を止める(あるいは可能性として、転写を増幅する)かといった、より多くの疑問が出てきている。



二本鎖の化学構造の微調整に取りかかった」とPlaceは回想した。「我々は足並みをそろえて、あうんの呼吸で研究を進めるようになった」。

Liは、Placeによる分子生物学実験の成果も加えた論文を*Science*に再投稿したが、またしても却下されてしまった。Liが受け取った通知には、この研究は「重大なパラダイムシフトを提示していると考えられる」ので、提出された証拠では不十分だとあった。編集部は再び作用機序の説明を求めてきた。

そこで2006年6月にLiは、ニューヨーク州のコールド・スプリング・ハーバー研究所で開催された会議で、RNA制御研究のリーダーたちと話をした。Liの記憶では、ホワイトヘッド生物医学研究所（マサチューセッツ州ケンブリッジ）のDavid Bartelに、RNA活性化（RNA抑制ではなく）があり得るかどうかを尋ねた。Liによれば、Bartelは、そうは思わないといったらしい。Bartelは、そのときの会話を思い出せないといい、「私はおそらく、活性化の証拠が実際のどの程度確実なのかを見極めようとしたのだと思う」と説明した。Liは、そこでは分野外の若手研究者にすぎず、自分の知見を発表することはできなかった。

業を煮やしたLiは、選考基準が*Nature*や*Science*ほど厳しくない、とあるオンライン・ジャーナルに知見を送った。だが、Dahiyaは、この研究が世に知られずに埋もれてしまうのではないかと考え、『全米科学アカデミー紀要』に投稿しようLiを説得した。2006年の8月、Liの研究チームは同紀要に研究論文を投稿し、ようやく突破口を開いた。同紀要は数週間で査読をすませ、この論文を11月のオンライン版に掲載した⁶。その2か月後、Liたちの研究成果の正当性が裏付けられた。ダラスにあるテキサス大学サウスウエスタン医療センターの生化学者David Coreyが率いる別の研究チームが、*Nature Chemical Biology*で、Liたちの成果と基本的にそっくり同じ研究論文を発表したのである⁷。「私たちにとっては本当にありがたいことだった」とPlaceは

語った。「それまではだれもが、私たちのことを変人扱いしていたのだから」。

在郷軍人医療センターに戻ると、Liは、自身の研究室をUCSFに移動する準備をしながらも、Placeと緊密に連携をとって研究を進めた。彼らはすでに、RNA活性化の仮説の裏付けになると期待できる一連の実験を繰り返していた。塩基配列の変化の中には、RNAを役に立たなくさせるものもあれば、RNA活性化をうまく微調整するものもある。この「トリガー」分子は、標的とする塩基配列に正確に適合する必要はなく、また、二本鎖RNAにわずかな調整を施すことで活性化は弱まる。そこでPlaceとLiは、E-カドヘリンを活性化しそうなmiRNAを探し始めた。miRNAの存在によって、RNA活性化が自然現象であるとは実証できないだろうが、miRNAがゲノムにコードされていることを考慮すれば、事例の裏付けにはなると考えられた。

PlaceとLiは、パイオインフォマティクスの手法を使って、ヒトゲノムで、E-カドヘリンのプロモーター配列とほぼ相補的な配列をもつmiRNAを探した。すると、わずかながら候補分子が見つかったので、それらを前立腺がん細胞に導入してみた。この実験はあまりに簡単であり、そううまくことが運ぶわけがないと期待していなかった。ところが、予想に反してうまくいったのである。2人は、miR-373というmiRNAがE-カドヘリンの発現を増大させることを見つけた。「この実験が成功したとき、我々はすっかり興奮してしまった。RNA活性化が自然界に存在する機能である可能性が出てきたからだ」とPlaceはいった。

方向性は間違っていない

ところが、それでもまだ証拠が不十分だった。そこでPlaceは、miRNAの前駆体を設計した。miRNAの生合成モデルによれば、この前駆体はmiRNAそのものと同じように機能するはずであり、実際うまく機能した。Placeはほかに、ダイサーをノックアウトした場合にはmiR-373が機能を止めることや、ダイ

サーがE-カドヘリンのプロモーターに似た配列をもつ別のタンパク質を活性化することも見つけた。これらの実験はすべて、miRNAがこの干渉経路を使って遺伝子を活性化している可能性があるという説を裏付けていた。それは、PlaceとLiのめざす方向が間違っていないことを強く物語っていた。今年8月6日、彼らは研究論文を*Nature Chemical Biology*へ投稿した。

目下の問題は、この研究がどんな受け止め方をされるか、である。David Coreyが証言するように、多くの研究者はRNA活性化についてまだ懐疑的である。「この前、ある会議でRNA活性化について話したとき、この分野の著名な研究者2人が私を激しく非難して、それは間違っているといってきた」とCoreyはいう。「我々は、腹を立てて書いた文章としか思えないような助成金交付の考査評や論文の査読評を受け取った。我々のデータをもっとよく見てほしいものだと思う」。

実際のところ、RNA活性化という考え方はRNA干渉のドグマに反するので、場合によっては劣勢のようにみえる。RNA干渉は、それ自体まだ非常に新しい研究領域なのに、すでにちょっとした硬直化を起こしているようだ。Placeは、生物学のメッセージ・フォーラム（インターネット掲示板）を閲覧していて、ほかの研究者（その多くは大学院生）もRNA活性化の証拠を見つけていることに気づいた。ところが、彼らはその証拠を無視するよう指導されていた。

マサチューセッツ工科大学（米国ケンブリッジ）に研究室をもつノーベル賞受賞者の生物学者、Phillip Sharpは、RNA干渉に関するさまざまな研究を開拓した人物であり、RNAが関与する遺伝子活性化の可能性を認めている。しかし、「私が目にした実験結果からは証明できない」という。彼は、学術誌編集部からの要求を繰り返すかのようにこういった。「もし、彼ら（Liたち）が権威ある学術誌への論文掲載を望むなら、この問題に関する今後の論文で作用機序に取り組むべきだと思う」。

新たな道筋

この分野の研究は日進月歩で、こうした要求は当然であり、何らかの作用機序を示す証拠を示すことが、LiとPlaceが挑むべき大きな課題である。RNA活性化は抑制が姿を変えたものにすぎない、と示唆した研究者もいる。偶然に、上流のリプレッサーがサイレンシングを受けたか、別のサイレンシングRNAを阻害した結果ではないかというのである。Liたちは、実験からこれらの可能性を排除することはできないが、こうした機構が偶然に作用することは現実的ではないと語る。例えば、特定の遺伝子のプロモーターを標的にすることで、その遺伝子の活性化を思い通りに引き出すことが可能だからだ。

すでに知られているサイレンシング経路と、Liたちの観察したRNA活性化現象の間には、興味深い違いがある。サイレンシングは、数時間以内に引き起こされ、およそ7日で終わる。ところが、活性化は数日かかるように見え、数週間にわたって続く。こうした動態の違いは、何か未知の過程が関与していることを示唆していると、Placeはいう。「RNA活性化はRNA干渉を別のよび名でよんでいるだけだといわれるが、明らかに違うものである」。

遺伝子プロモーター領域でRNAによる制御がどのように機能するのかについても、大きな疑問がまだいくつか残っている。従来の干渉経路では、RISCが、siRNAまたはmiRNAを細胞質内にある標的のmRNAのところまで導く。ところが、プロモーター制御のためには、低分子RNAが、DNAが転写される場である核内に進入しなければならない。核内への進入がサイレンシング過程で起こっていることを示す証拠は増えつつあるが、その作用機序もやはり不明である。

2004年に2つの研究グループが、遺伝子プロモーター領域を標的とするsiRNAを核内に送達した場合に、遺伝子の発現を抑制できることを示す論文を発表した。一方のグループは提出した論文をその後撤回したが、もう一方のScienceに発表したグループは⁸、発現抑制に伴っ

て、サイレンシングに関連したエピジェネティックな標識付加があることを示した。その論文の著者の1人であるスクリプス研究所（カリフォルニア州ラホーヤ）のKevin Morrisは、この発現抑制が起こる仕組みを研究し続けており、LiとPlaceの置かれた立場に同情している。「2004年には私も同じ立場だった。半数の人々は研究に賛同してくれたが、残り半数の人々には大ボラを吹いていると思われていた」とMorrisはいう。「実に苛立たしい状況だ」。

確かに苛立たしいことだ。このNews Feature記事の締め切りが迫ったころ、Placeは、miRNA活性化に関する同研究グループの論文原稿が却下されたという知らせを受けた。その理由は、「作用機序の説明がなく、証拠不十分」だからであった。それでもLiは依然として、研究界が態度を変えて自分たちに同意するようになるはずだと確信している。「我々は、RNA活性化が生体に本来備わっている仕組みであると確信している」と彼はいった。Placeは、それを聞いて驚いたようすも見せなかった。「我々は、その作用機序が行き詰まりの根源になるだろうとわかっていた。実証するのが最も

困難な部分だからだ。」しかし彼は、自分の研究グループのデータをほかの研究者に一目見せることさえできれば、その強い証拠で説得できるはずだと予言した。「査読までもち込めれば大丈夫だろう」とPlaceは述べた。

RNA干渉が科学の世界に登場したとき、人工の産物だと片付けられた段階から、革新的パラダイムとしての地位を確立するまで、かなりの時間がかかった。PlaceやLi、そして共同研究者たちが、この革命的パラダイムを書き換えるか、少なくとも改善しようとするとき、彼らの前には同じように苦しい闘いが待ち受けることになる。頑固、自信満々、それとも楽観主義。どうよばれようとも、この研究グループはあきらめようとしないうだろう。 ■

Erika Checkはサンフランシスコに拠点を置くNatureのライター。

1. Fire, A. et al. *Nature* **391**, 806-811 (1998).
2. Elbashir, S. M. et al. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
3. Check, E. *Nature* **442**, 614-615 (2006).
4. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>
5. Wassenegger, M. *Cell* **76**, 567-576 (1994).
6. Li, L. C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 17337-17342 (2006).
7. Janowski, B. A. et al. *Nature Chem. Biol.* **3**, 166-173 (2007).
8. Morris, K. V. *Science* **305**, 1289-1292 (2004).