

マイクロRNA：生合成調節機構と 遺伝子発現調節ネットワークの理解

鈴木 洋[†]

RNA干渉の発見は、遺伝子機能解析手法の可能性を飛躍的に拡大するとともに、non-coding RNAに関する生物学の発展を促進する起爆剤となった。マイクロRNA (microRNA : miRNA) は内在性のRNAサイレンシング機構を担う代表的なshort non-coding RNAであり、遺伝子の発現制御ネットワークを巧みに調節するとともに、さまざまな疾患の分子病態でも重要な役割を果たしている。miRNAはどのように産生されるのか、そして、どのように遺伝子発現を調節するのか：その生合成と遺伝子発現制御に関する研究はRNAバイオロジーにおけるさまざまなコンセプトを提示してきた。本稿では、miRNAのユニークな生合成調節機構と遺伝子発現調節機構に関するこれまでの知見を紹介し、未解決の問題とmiRNA生物学から核酸医薬への発展の可能性について議論する。

1. はじめに

生命とは何か？ 答えを一つに限定することはもちろん難しいが、生命の一つの側面として、生命とはゲノム情報から遺伝子調節ネットワークを恒常的・自律的に構築しているシステムである、といっても大きな間違いはないだろう。ここで、セントラルドグマを想起すると、ゲノム・DNA→RNA→タンパク質→ネットワークという流れを考えることになるのであるが、このように矢印(→)を一方向におくことは、ノンコーディングRNA (non-coding RNA) がきわめて盛んに研究されている現状では、もはや不正確であるといわざるをえない。

細胞内には、タンパク質へと翻訳されないRNA (non-coding RNA : ncRNA) が大量に存在する。ncRNA群はそ

の機能、長さなどの観点からさまざまなカテゴリーに分類されるが、これらのncRNAの中で低分子RNAの代表の一つであるmicroRNA (miRNA) は、遺伝子発現の制御において重要な役割を果たしている。miRNAによる遺伝子発現の調節という概念は1993年にすでに報告されているが^{1,2)}、今日のmiRNA研究は、1998年のFire, MelloらによるRNA干渉 (RNA interference : RNAi) の報告を起点として³⁾、再発見が促され飛躍的に進んだといえる。RNAiは、二本鎖RNAの導入により二本鎖RNAと相補的な塩基配列を持つmRNAが分解される現象であり、20~30塩基からなる内在性の短鎖ncRNAによって制御される遺伝子発現調節機構と合わせてRNAサイレンシングと総称される^{4,5)}。RNAiの報告以後、20塩基程度の低分子RNAの探索が行われ⁶⁻⁸⁾、今日miRNAを含む一連の低分子RNAがさまざまな生物種で同定されている。現在、ヒトではすでに1500種以上のmiRNAが報告されている。さらに、miRNAはさまざまな生理現象、および、悪性腫瘍を含むさまざまな疾患の分子病態に関与しており、精力的に研究が行われている^{9,10)}。

本稿では、miRNAのユニークな生合成調節機構と遺伝子発現調節機構に関するこれまでの知見を紹介し、未解決の問題とmiRNA生物学から核酸医薬への発展の可能性について議論する。

2. miRNAの生合成機構

miRNAは21~25塩基程度の短鎖ncRNAであり、内在

東京大学大学院医学系研究科分子病理学 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

Dissecting microRNA biogenesis and microRNA-mediated regulation of gene network

Hiroshi I. Suzuki[†] (Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

[†] 現所属：マサチューセッツ工科大学 コーク癌総合研究所 (500 Main St., 76-417, Cambridge, MA 02139, USA.) [Present address : David H. Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, 500 Main St., 76-417, Cambridge, MA 02139, USA.]

本総説は2014年奨励賞を受賞した。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870413

© 2015 公益社団法人日本生化学会

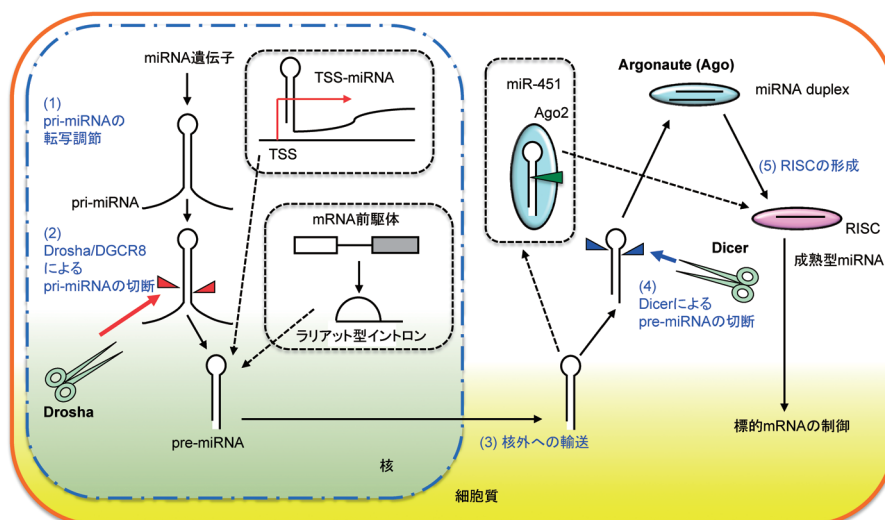


図1 miRNAの標準的な生合成機構の概略図

標準的なmiRNAの生合成過程は、(1)転写によるpri-miRNAの合成、(2)核内でのpri-miRNAの切断、(3)pre-miRNAの核外輸送、(4)細胞質でのpre-miRNAの切断、(5)RISCの形成、の各ステップからなる。点線部に、DroshaやDicerを必要としないmiRNA群の生合成経路を示す。(図は文献55より改変)

性のRNAサイレンシング機構を担う代表的な低分子RNA群である^{4, 5, 11}。標準的なmiRNAの産生過程は、(1)転写によるprimary miRNA (pri-miRNA)の合成、(2)核内でのpri-miRNAの切断、precursor miRNA (pre-miRNA)の産生、(3)pre-miRNAの核外輸送、(4)細胞質でのpre-miRNAの切断、miRNA duplexの産生、(5)RNA誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex : RISC)の形成、の各ステップからなる^{4, 5, 11}。これらの過程をmiRNAプロセッシングと総称する(図1)。

miRNAの前駆体となる最初の転写産物は、タンパク質へ翻訳される遺伝子と同じように、核内において、miRNA遺伝子が主にRNAポリメラーゼIIにより転写されることによって産生される。これらのヘアピン構造を含む一次転写産物は、primary miRNA (pri-miRNA)と呼ばれる。哺乳動物の約半分のmiRNAは、タンパク質をコードする遺伝子のイントロン領域に存在する。次に、核内でRNaseIIIであるDroshaがpri-miRNAのヘアピン基部を切断することにより、中間産物であるヘアピン構造をした60~70塩基のmiRNA前駆体 (precursor miRNA : pre-miRNA)が産生される^{12, 13}。DroshaはDGCR8および複数の補助因子と複合体を形成し、ヘアピン構造と一本鎖構造の分岐点から約11塩基離れた部分でヘアピン構造を切断する^{12, 13}。Bartelらのグループは、pri-miRNAのヘアピン内部・周囲の特徴的な配列の配置が効率よいプロセッシングに重要であることを報告している¹⁴。このようにして産生されたpre-miRNAは、主に、exportin-5 (XPO5)により核から細胞質に輸送され、別のRNaseIIIであるDicerによって切断され、21~24塩基の二本鎖RNA (miRNA/miRNA* duplex)となる。二本鎖RNAは後述するAgoタンパク質に取り込まれ、片側のRNA鎖 (miRNA鎖、ガイド鎖、成熟型miRNA)だけが最終的にAgoタンパク質と安

定な複合体を形成し、RNA誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex : RISC)を形成する¹⁵。最終的に、この一本鎖化された成熟型miRNAが遺伝子発現制御のガイド役として働く。

一方で、イントロン自体がpre-miRNAとなるmirtronや、最近報告されたTSS-miRNA (transcriptional start site miRNA)などの産生はDroshaを必要とせず、また、赤血球で発現の高いmiR-451のプロセッシングはDicerを必要としないことも報告されており、miRNA生合成経路には多様性が認められる(図1の点線部)^{11, 16, 17}。

3. miRNAによる遺伝子発現調節機構とその特徴

miRNAによる遺伝子調節で中心的な役割を果たすのが、Argonauteファミリーに属するAgoタンパク質である(図2)^{15, 18}。miRNAとAgoタンパク質の複合体であるRISCは、RISCに取り込まれたmiRNAと部分的に相補的な配列を有する標的mRNAと結合し、一般的にはその標的mRNAのタンパク質への出力を抑制する。

さまざまな生物種には複数のAgoが存在し[ヒト・マウスで4種 (Ago1~4)、ショウジョウバエで2種]、それぞれのAgoは、標的mRNAの切断活性、miRNA/siRNA (small interfering RNA)の取り込みなどの観点から異なる特徴を有する^{15, 18}。哺乳類では、Ago2だけがRNA切断活性 (スライサー活性)を有し、siRNAによる標的mRNAの切断を誘導する。Ago1, 3, 4はスライサー活性を有していないが、これは、スライサー活性を担うPIWIドメインの活性中心のアミノ酸が保存されていないことと、N末端の配列の違いによる¹⁹⁻²²。ショウジョウバエではmiRNAはAgo1に、siRNAはAgo2に選択的に取り込まれるが、ヒトではmiRNAはAgo1~4すべてに取り込まれており、Ago1,

3, 4もAgo2と同様にmiRNAによる遺伝子抑制機能を仲介している¹⁸⁾。

動物細胞におけるmiRNAによる標的mRNAの認識は、主にseed配列と呼ばれる5'末端のわずか7~8塩基と標的mRNAの主に3'非翻訳領域(3' UTR)の相補的塩基配列との間における塩基対形成によって行われる^{4, 23)}。しかし、一方で、CLIP (cross-linking immunoprecipitation) などの網羅的解析手法の発展とともに、miRNAの結合部位は5' UTRおよびタンパク質コード領域にも存在することが明らかとなっている²⁴⁻²⁶⁾。miRNAによる標的mRNAの

認識は配列特異的であるが、seed配列がきわめて短いこともあり、miRNAとmRNAの対応は「多対多」であり、1種類のmiRNAは複数のmRNAを標的とし、逆に、1種類のmRNAは複数のmiRNAによって制御されることになる^{4, 23, 27)}。miRNAによる遺伝子発現制御のメカニズムとして、(1)標的mRNAの不安定化、(2)翻訳開始の阻害、(3)翻訳開始以降の阻害などのメカニズムがこれまでに提案されている(図2)。哺乳類での解析では、これらのメカニズムの相対的な寄与が詳細に検討されており²⁸⁻³⁰⁾、miRNAによる遺伝子発現抑制は、主にmRNAの不安定化によるものであることが提案されている。

4. miRNAと疾患の関係：がんにおける意義

miRNAは多数の標的遺伝子を調節することにより、さまざまな転写因子と同じように、多様な細胞種の正常分化において重要な役割を持つ。細胞機能におけるmiRNAの多様な役割を反映して、miRNAはさまざまな疾患でも重要な役割を果たしている。本稿では、miRNAとがんの関係について注目する。

1) 悪性腫瘍におけるmiRNAの役割

がんとmiRNAの関係は、miRNAによるがん抑制遺伝子・がん遺伝子の制御、がん抑制遺伝子・がん遺伝子によるmiRNAの制御の大きく二つの視点から、検証が行われてきた。慢性リンパ性白血病(chronic lymphocytic leukemia: CLL)で発現低下がみられるmiR-15a/miR-16-1がBcl-2を制御すること、肺がんが発現低下がみられるlet-7がRasがん遺伝子を阻害すること、リンパ腫や肺がんで過剰発現が認められるmiR-17-92クラスターががん遺伝子のように悪性腫瘍を促進するといった重要な報告が2000

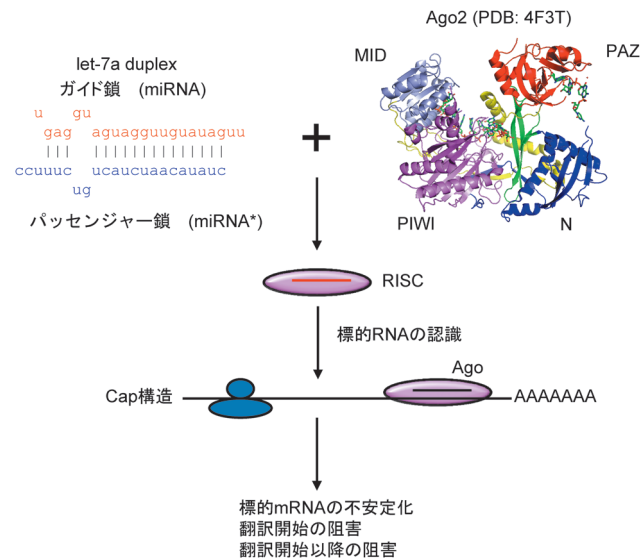


図2 miRNAによる遺伝子発現制御のコンセプト

RISCは、配列特異性決定因子としてのmiRNAとAgoタンパク質が核となって形成される。miRNAによる遺伝子発現制御は、miRNAによる標的RNAの選択と、Agoを介した(非選択的な)抑制を介して実行される。Ago2の構造は、PDB ID 4F3Tを使用した。

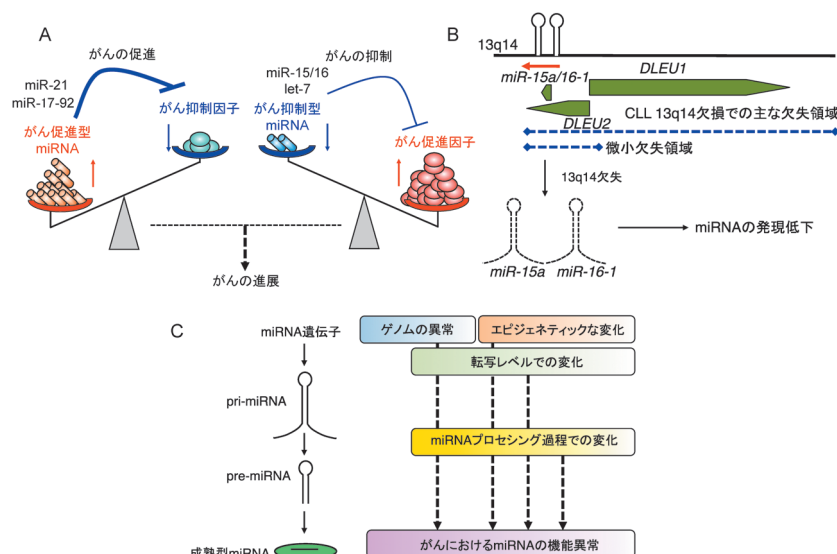


図3 がんにおけるmiRNAの役割

(A)がん抑制因子、がん促進因子としてのmiRNAの役割。(B)CLLにおけるmiR-15a/miR-16-1の関与。(C)がんにおけるmiRNAの機能異常をもたらすさまざまな要因。

年代前半になされている^{9, 10, 31-34)}。さまざまながん種で発現の異常を示すmiRNAが報告されており³⁵⁾、これらのmiRNAは、それぞれ標的となるがん抑制因子およびがん促進因子の遺伝子発現を抑制することにより、がん促進因子およびがん抑制因子のように振る舞うと考えられている(図3A)。

2) がん抑制因子・がん促進因子としてのmiRNA

がんにおけるmiRNAの役割を考える上で、慢性リンパ性白血病(CLL)とmiRNAの関係は欠かすことができない。CLLでは13q14領域の欠失が高頻度で認められるが、2002年、Calin, Croceらのグループは、DLEU2, miR-15a, miR-16-1の三つのncRNAが同部位に存在することを報告した³⁶⁾。CLLでは、miR-15a/miR-16-1の発現低下によってBcl-2の上昇が誘導されアポトーシス抵抗性が惹起されるというモデルが提案された(図3B)。これらのmiRNAについては欠損マウスモデルが作製され、病態形成における意義が個体レベルで検証されている³⁷⁾。miR-15a/miR-16-1欠損モデルは、単クローン性B細胞リンパ球増加症、CLL、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫というヒトでのCLLに関連した病態がみられることなどから、ヒトCLLの特徴を忠実に再現しており、悪性腫瘍におけるmiRNAの寄与を示した重要なモデルである。

一方、miRNA研究の初期に同定されたがんに関係する重要な他のmiRNAとして、miR-17-92クラスターがあげられる。びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫などのリンパ腫では13q31領域の増幅がしばしば認められるが、これらの腫瘍では同領域に含まれるmiR-17-92クラスターが腫瘍促進において重要な役割を持っていることが示されている³¹⁾。

3) がんにおけるmiRNAの発現異常の原因

がんにおけるmiRNAの発現異常の機序として、染色体異常、エピジェネティックな機序、転写レベルでの変化などに加えて、miRNAプロセシングの異常も関与していることが示唆されている(図3C)^{10, 11, 38, 39)}。

各がん種におけるmiRNAの発現プロファイルにより腫瘍で発現上昇・発現低下を示すmiRNAがそれぞれ同定されているが、一方で、ヒトの悪性腫瘍ではmiRNAの広範な発現量減少がしばしばみられることが報告されている^{35, 39)}。これに対応して、DroshaやDicerといったmiRNAプロセシングの中核分子を発現低下させると、細胞の形質転換と腫瘍形成が促進されることが報告されている⁴⁰⁾。さらに、マウス発がんモデルでの検討により、Dicerのホモ欠損は発がんを抑制するがヘテロ欠損は発がんを促進することから、Dicerはハプロ不全がん抑制因子として機能していることが示唆されており、卵巣がんや肺がんなどでは、Dicerの低発現と予後不良の相関も報告されている^{41, 42)}。これらの知見は、miRNAによる遺伝子発現調節が細胞の腫瘍化抑制において全体として重要な役割を果

たしていることを示唆している。また、がんでは、pre-miRNAの核外輸送を担うXPO5、および、Dicerの補助因子であるTRBP2の遺伝子変異がみられることもある^{43, 44)}。

5. p53によるmiRNAの制御

1) p53によるmiRNAの発現調節

p53は代表的ながん抑制遺伝子であり、多くのヒトがんにおいてp53経路の異常が認められる。DNA損傷にตอบสนองしてp53はp21, PUMAといったさまざまな標的遺伝子を活性化することにより、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導する。p53の中心的な機能は転写活性化因子としての役割でありさまざまなp53の標的遺伝子が同定されているが、p53によって転写制御を受けるmiRNAとしてmiR-34ファミリー、miR-194-2/miR-192, miR-194-1/miR-215クラスター、miR-17-92クラスターなどがある(図4左)。miR-34ファミリー(miR-34a, b/c)は、p53によって転写活性化されるmiRNAである⁴⁵⁾。p53はmiR-34遺伝子群のプロモーターのp53結合配列に結合し、pri-miRNAを誘導することでmiRNAの発現を上昇させる。miR-34はCDK4, E2Fファミリーといった細胞周期関連因子を介してp53の増殖抑制機能に貢献していることが想定されている。

2) p53によるmiRNAプロセシングの制御

p53は転写活性化因子としての機能以外にも、ミトコンドリアにおけるアポトーシスの直接的な制御、DNA修復因子との相互作用によるDNA修復機構の制御などのさまざまな機能を持つことが示されている。これまでに、我々は、p53がDrosha複合体と相互作用し、miRNAプロセシング過程を制御することを見いだしている(図4右)⁴⁶⁾。

我々は、DNA傷害に伴うmiRNAの発現変化を検討し、miR-34以外に、miR-15/-16/-143/-145などのmiRNAの発現レベルもDNA傷害によって上昇することを見いだした。発生段階やがんにおいて、一次転写産物であるpri-miRNA

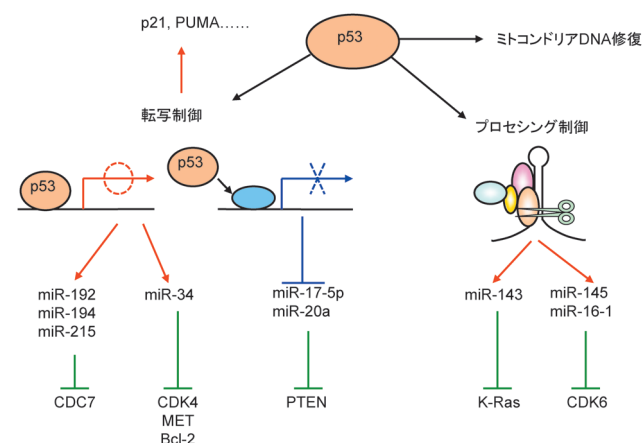


図4 p53によるmiRNAの制御

左にp53によるmiRNA遺伝子の転写制御、右にp53によるmiRNAプロセシングの制御を示す。

と成熟型 miRNA の間で広範囲な調節が示唆されていることを考慮し³⁹⁾, pri-miRNA, pre-miRNA, 成熟型 miRNA の発現量を比較した結果, これらの miRNA について, pri-miRNA の発現レベルが変化しないにも関わらず, pre-miRNA, 成熟型 miRNA が上昇することが認められた. この結果は, pri-miRNA の発現制御と独立して miRNA 産生の制御が行われている可能性を示唆するものであった. Drosha 複合体は p68/p72 と呼ばれる DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼなどの補助因子を伴うが, 一方で, p68/p72 はさまざまな転写因子のコファクターとして働くことも知られている. 検討の結果, DNA 損傷に応答して, p53 が p68/p72 依存性に Drosha 複合体と相互作用し, Drosha のプロセシング機能を促進することが明らかとなった. また, 悪性腫瘍でみられる変異型 p53 の一部が野生型 p53 とは逆に miRNA のプロセシングを阻害することも見いだされた. miR-16/-143 といった DNA 傷害によって誘導される miRNA は増殖抑制機能を持っており, これらの miRNA 群も p53 の増殖抑制機能を補完していると考えられる³⁸⁾. また, 最近の報告により, p53 の 120 番目のリシンのアセチル化が Drosha との会合を促進し, pri-miRNA のプロセシングを促進することも報告されている⁴⁷⁾.

6. miRNA 生合成のファインチューニング

miRNA は遺伝子発現のファインチューナーと称されるが, miRNA の生合成自体もファインチューニングを受けていることが次々と報告されている (図 5)^{5, 48)}. TGF- β (transforming growth factor- β) シグナル伝達を担う Smad は p53 と類似のメカニズムで miRNA のプロセシングを制御する⁴⁹⁾. さらに, Lin28, hnRNP A1, KSRP といったさまざまな RNA 結合タンパク質が特定の miRNA のプロセシング

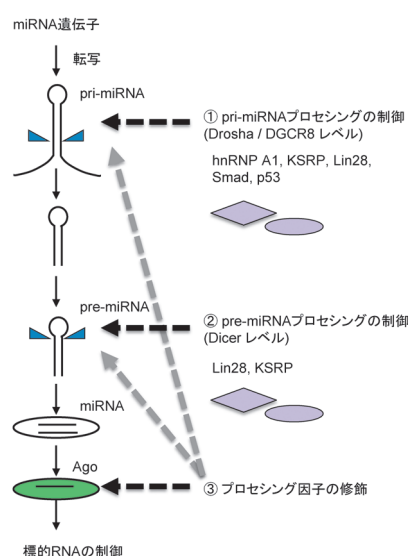


図5 miRNA 生合成経路のさまざまな制御機構
miRNA の生合成 (および機能) は, 転写レベル, プロセシングレベルでさまざまな制御を受ける.

を制御することも報告されている. Lin28 は, がん抑制因子である let-7 のプロセシングを, Drosha, Dicer レベルで特異的に阻害する. Lin28 は Lin28A と Lin28B の二つの遺伝子が知られているが, Lin28A は, pre-let-7 へ結合することにより, TUT4 による pre-let-7 の 3' 末端のポリウリジニル化, および Dis3l2 エキソヌクレアーゼによる pre-let-7 の分解を誘導しプロセシングを阻害する⁵⁰⁻⁵²⁾. 一方で, Lin28B は Lin28A と異なり主に核内で pri-let-7 のプロセシングを抑制することが報告されているが, Lin28A と Lin28B は同様の生化学的特徴を持っていることもあり, そのメカニズムの差異については議論の余地が残っている⁵³⁾. また, RNA エディティングによる miRNA 前駆体の修飾や, EGFR による Ago2 のリン酸化などを介して, miRNA の生合成や活性が調節されることも報告されている.

7. MCPIP1 による miRNA 生合成の負の制御

RNAi 機構/miRNA 生合成機構に関係する分子群は, 多くの生物種で幅広く保存されている. RNAi は植物や無脊椎動物において主要な抗ウイルス応答として機能するが, 哺乳類では, インターフェロン経路が非常に強力な抗ウイルス応答として存在しており, RNAi 機構の生理的意義における進化的変遷がうかがえる. また, miRNA を産生する過程の調節機構に比べて, miRNA 前駆体・成熟型 miRNA のターンオーバーの調節機構については不明な点が多い.

続いて, 我々は, 哺乳類において, 免疫応答に関係し, また RNA 結合ドメインを有する遺伝子が miRNA 生合成の調節に関与する可能性を検討した. 結果として, 免疫応答の制御に関わる MCPIP1 (Zc3h12a) という分子が, miRNA の活性および生合成を強力に抑制することを見いだした (図 6)⁵⁴⁾. 検討の結果, MCPIP1 は, 細胞質でエンドリボヌクレアーゼとして pre-miRNA のターミナルループ部分を切断・分解することにより, Dicer と拮抗し miRNA の生合成を阻害することが明らかとなった. 肺がんなどでは Dicer の発現低下が予後不良と関係することが報告されているが, 肺がんのトランスクリプトーム解析により, MCPIP1 と Dicer が拮抗関係にあり, Dicer とは逆に MCPIP1 の高発現と予後不良が相関することも見いだされた. MCPIP1 は炎症応答によって発現調節を受ける分子であり, MCPIP1 は炎症応答とがんにおける miRNA 生合成機能不全を結びつける分子といえるかもしれない⁵⁵⁾.

8. がんにおける miRNA の多面的な役割: がん微小環境の制御

従来の研究では, 個々の miRNA の, 細胞周期, 細胞死, 転移能といったがん細胞の特性そのものに与える影響 (細胞自律的な機能) に焦点がおかれていたことが多かったが, 近年, miRNA の細胞非自律的な機能にも注目が集

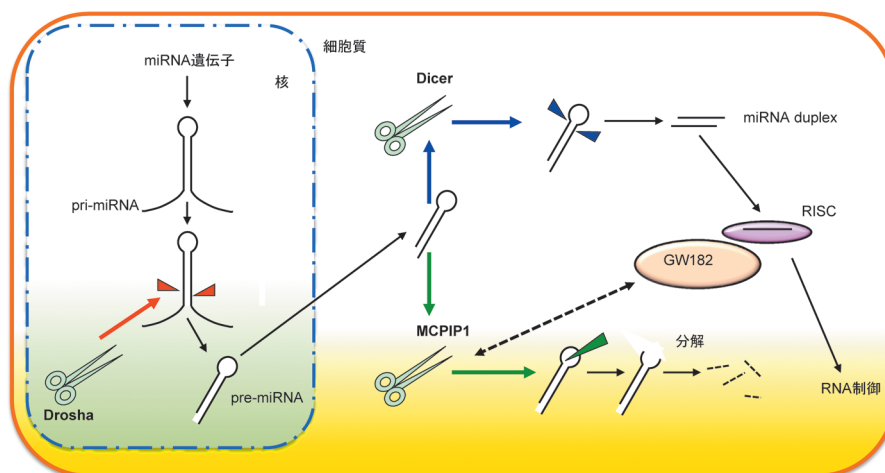


図6 MCPIP1によるmiRNAプロセシングの抑制

MCPIP1は、細胞質でpre-miRNAのターミナルループ部分を切断・分解することにより、Dicerと拮抗しmiRNAの生合成を阻害する。(図は文献55より改変)

まっており、がん微小環境や血管新生におけるmiRNAの意外な働きも明らかになってきている⁵⁶⁾。がんで発現低下がみられるmiR-126について、miR-126ががん細胞から分泌される血管新生促進因子を抑制することにより、血管新生と転移を抑制することが示されている⁵⁷⁾。また、我々も、NPM-ALK陽性悪性リンパ腫(未分化大細胞型リンパ腫)で高発現するmiR-135bがGATA3やSTAT6といったTh2細胞分化のマスター因子を抑制することにより、リンパ腫細胞をTh17細胞様の免疫形質に偏向させ、炎症性サイトカインの分泌亢進・がん微小環境における炎症応答の促進を誘導することを見いだしている⁵⁸⁾。さらに、miRNAは、より直接的に細胞間のコミュニケーションで重要な役割を持っていることが明らかになっており、特に、エクソソームに含まれた分泌型miRNAは大きな注目を集めている⁵⁹⁾。

9. miRNAネットワークを理解する

1) mRNA/miRNAのペアリング統合解析

miRNAによる遺伝子抑制は、配列相補性以外に、seed領域付近のAU塩基の割合、3' UTR内における標的配列の位置などによって影響される^{4, 23, 60)}。定量的解析により、miRNAが主に標的mRNAの発現量を低下させることでタンパク質の発現を抑制していることが提案されている(mRNA destabilization scenario)。このことは、mRNAの発現プロファイルが、対応するmiRNAの発現または活性の変化を反映していることを示唆するものである(図7)²⁷⁻³⁰⁾。しかし、mRNA destabilization scenarioは一つのmiRNAを多量に発現、あるいは強く抑制した場合、または少数の組織特異的なmiRNAに注目した場合にみられる現象であり、複数のmiRNAが小さな変動幅で変化するような疾患のトランスクリプトームの解析で果たして同様に適用できるかどうかは不明であった。

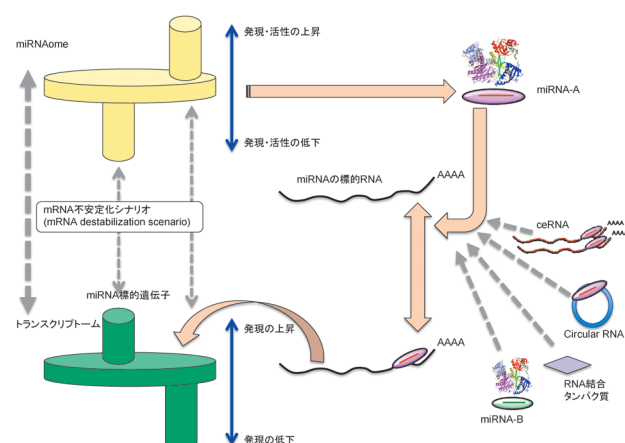


図7 miRNAネットワークの理解

miRNAの機能は、産生された後も、competing endogenous RNA (ceRNA)、circular RNA、RNA結合タンパク質などのさまざまな影響を受ける。

我々は、mRNAプロファイリングのデータからmiRNAの活性を推定するアプローチを構築し、その結果をペアとなるmiRNAプロファイリングのデータと比較することでmRNA destabilization scenarioが現実的な状況でも広く適用可能であるかどうかを検証した^{61, 62)}。結果として、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)と、遺伝子セット内のmiRNA標的遺伝子のenrichmentを評価する手法(Functional Assignment of miRNAs via Enrichment: FAME)を組み合わせる手法を考案した(GSEA-FAME analysis: GFA)。悪性リンパ腫における解析で、GFAと他の手法を比較した結果、GFAにより、miRNAの発現パターンと、mRNAプロファイルから推定されるmiRNAの活性パターンの間により強い相関を見いだすことができた。これは、mRNA destabilization scenarioの現実的な局面における実証といえる。

2) mRNA/miRNA統合解析の有用性

mRNA プロファイリングやmiRNA プロファイリングといった網羅的解析の大きな目的の一つは、多数の情報から対象となる生物学的過程をより特徴づける情報を抽出することにあるといえる。がんの分野では、特定の遺伝子シグネチャーを抽出し、これを用いてがんの分類や予後予測を行うことが盛んに行われている。mRNA/miRNAのペアリング解析において、miRNAのプロファイリングと活性予測の双方で大きな変動を示すマーカーが、より頑健なバイオマーカーとして機能する可能性を検討し、発現量のプロファイリングに加えてmiRNA-mRNAネットワークの関係性を考慮することで、より頑健なバイオマーカーをゲノムワイド発現解析から抽出できる可能性を見いだしている⁶²⁾。

10. More read, More mystery

1) miRNA とは何か：miRNA 生合成の謎

近年の次世代シーケンサーによる低分子RNA解析は、成熟を遂げつつあるmiRNA研究に、新しい問いを生み出している。これらの解析により、新しいmiRNAが同定されるとともに、生体内にあるmiRNAの不均一性 (isomiR) の存在、塩基付加・欠失) が明らかになっている。また、RISCの形成では、miRNA duplexからガイド鎖が最終的にAgoタンパク質に残り、もう一方の鎖 (miRNA*鎖、パッセンジャー鎖) はAgoタンパク質より取り除かれる。従来的には、5'末端がより不安定な側の鎖がRISCに取り込まれ (熱力学的安定性ルール)、miRNA鎖とmiRNA*鎖のバイアスが生じることになるが、miRNA鎖、miRNA*鎖の定義は絶対的なものではなく、miRNA*鎖と定義されているものかなりの割合でRISCに取り込まれ機能する場合があることがわかっており、次世代シーケンサーによる解析はこれをはっきり支持している^{63, 64)}。ガイド鎖とパッセンジャー鎖を決定づける分子生物学的ルールとメカニズムは何なのか。この古くて新しい謎は、miRNAとは何か、二本鎖RNAを起点とするRNA干渉でどちらのRNAが機能するか、という根源的な問題と直結しており、核酸医薬の最適化を考える上でも重要である。

2) miRNA regulon: 発現と機能の間に

さまざまなアプローチでmiRNA/mRNAプロファイリングを解析することはmiRNAの機能を明らかにする上で重要であるが、一方で、miRNAの産生からmiRNAが実際に機能するまでの間に、さまざまな調節機構が介在してmiRNA/RNA結合タンパク質/標的mRNA間のネットワークを形成していることが明らかになりつつある (図7)。competing endogenous RNA (ceRNA) コンセプトやcircular RNAなどに代表されるRNA間でのクロストークが現在注目を集めている。ceRNAについては、miRNAとmRNAのコピー数の相対比を考慮した際に実際にその

ような現象が起こっているのかについて議論が盛んに行われているが⁶⁵⁻⁶⁷⁾、転写後調節レベルで、miRNAと他のmiRNAの間で同様の現象が起こっている可能性は十分にあるだろう。

11. おわりに

本稿では、miRNAの生合成調節機構と遺伝子発現調節機構に関するこれまでの知見を紹介した。RNA干渉の治療応用にはドラッグデリバリーの問題などいまだ解決すべき問題点が多いが、近年、miRNAの導入や抑制による治療応用の可能性が報告されつつある⁶⁸⁾。miRNAの生合成のさらなる理解は治療応用の可能性を拡大するために必須であり、特に、前述した低分子RNAの非対称性の問題については、今後の研究の発展が期待される。また、miRNA-mRNAネットワークの解析は、遺伝子発現におけるファインチューナーという言葉だけでは語りきれないmiRNAの新しい生物学的意義もさらに明らかにしてゆく可能性を秘めている。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究成果は、東京大学大学院医学系研究科分子病理学教室で、宮園浩平先生の指導のもと行われたものです。宮園浩平先生、共同研究者の方々、そして、現所属のPhillip A. Sharp先生にこの場を借りて深く感謝致します。

文 献

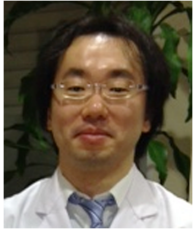
- 1) Lee, R.C., Feinbaum, R.L., & Ambros, V. (1993) *Cell*, **75**, 843-854.
- 2) Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993) *Cell*, **75**, 855-862.
- 3) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., & Mello, C.C. (1998) *Nature*, **391**, 806-811.
- 4) Bartel, D.P. (2004) *Cell*, **116**, 281-297.
- 5) Ha, M. & Kim, V.N. (2014) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 509-524.
- 6) Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001) *Science*, **294**, 853-858.
- 7) Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., & Bartel, D.P. (2001) *Science*, **294**, 858-862.
- 8) Lee, R.C. & Ambros, V. (2001) *Science*, **294**, 862-864.
- 9) Calin, G.A. & Croce, C.M. (2006) *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 857-866.
- 10) Croce, C.M. (2009) *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 704-714.
- 11) Suzuki, H.I. & Miyazono, K. (2011) *J. Biochem.*, **149**, 15-25.
- 12) Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., & Hannon, G.J. (2004) *Nature*, **432**, 231-235.
- 13) Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Dora-totaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004) *Nature*, **432**, 235-240.
- 14) Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., & Bartel, D.P. (2013) *Cell*, **152**, 844-858.
- 15) Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G.J. (2004) *Science*, **305**, 1437-1441.
- 16) Kim, V.N. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 376-385.

- 17) Zamudio, J.R., Kelly, T.J., & Sharp, P.A. (2014) *Cell*, **156**, 920–934.
- 18) Su, H., Trombly, M.I., Chen, J., & Wang, X. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 304–317.
- 19) Schurmann, N., Trabuco, L.G., Bender, C., Russell, R.B., & Grimm, D. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 818–826.
- 20) Hauptmann, J., Dueck, A., Harlander, S., Pfaff, J., Merkl, R., & Meister, G. (2013) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 814–817.
- 21) Faehnle, C.R., Elkayam, E., Haase, A.D., Hannon, G.J., & Joshua-Tor, L. (2013) *Cell Reports*, **3**, 1901–1909.
- 22) Nakanishi, K., Ascano, M., Gogakos, T., Ishibe-Murakami, S., Serganov, A.A., Briskin, D., Morozov, P., Tuschl, T., & Patel, D.J. (2013) *Cell Reports*, **3**, 1893–1900.
- 23) Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., & Bartel, D.P. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 91–105.
- 24) Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., & Rigoutsos, I. (2008) *Nature*, **455**, 1124–1128.
- 25) Loeb, G.B., Khan, A.A., Canner, D., Hiatt, J.B., Shendure, J., Darnell, R.B., Leslie, C.S., & Rudensky, A.Y. (2012) *Mol. Cell*, **48**, 760–770.
- 26) Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., & Tollervey, D. (2013) *Cell*, **153**, 654–665.
- 27) Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., & Johnson, J.M. (2005) *Nature*, **433**, 769–773.
- 28) Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., & Bartel, D.P. (2008) *Nature*, **455**, 64–71.
- 29) Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., & Bartel, D.P. (2010) *Nature*, **466**, 835–840.
- 30) Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H., & Bartel, D.P. (2014) *Nature*, **508**, 66–71.
- 31) He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., & Hammond, S.M. (2005) *Nature*, **435**, 828–833.
- 32) O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., & Mendell, J.T. (2005) *Nature*, **435**, 839–843.
- 33) Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., & Slack, F.J. (2005) *Cell*, **120**, 635–647.
- 34) Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., & Croce, C.M. (2005) *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1793–1801.
- 35) Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., & Golub, T.R. (2005) *Nature*, **435**, 834–838.
- 36) Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C.M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15524–15529.
- 37) Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., & Dalla-Favera, R. (2010) *Cancer Cell*, **17**, 28–40.
- 38) Suzuki, H.I. & Miyazono, K. (2010) *J. Mol. Med (Berl)*, **88**, 1085–1094.
- 39) Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., & Hammond, S.M. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 2202–2207.
- 40) Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., & Jacks, T. (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 673–677.
- 41) Kumar, M.S., Pester, R.E., Chen, C.Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D.G., Golub, T.R., & Jacks, T. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 2700–2704.
- 42) Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M., Deavers, M.T., Mourad-Zeidan, A., Wang, H., Mueller, P., Lenburg, M.E., Gray, J.W., Mok, S., Birrer, M.J., Lopez-Berestein, G., Coleman, R.L., Bar-Eli, M., & Sood, A.K. (2008) *N. Engl. J. Med.*, **359**, 2641–2650.
- 43) Melo, S.A., Roper, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., Ferreira, B., Liu, C.G., Villanueva, A., Capella, G., Schwartz, S. Jr., Shiekhata, R., & Esteller, M. (2009) *Nat. Genet.*, **41**, 365–370.
- 44) Melo, S.A., Moutinho, C., Roper, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., Yamamoto, H., Schwartz, S. Jr., & Esteller, M. (2010) *Cancer Cell*, **18**, 303–315.
- 45) He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A., & Hannon, G.J. (2007) *Nature*, **447**, 1130–1134.
- 46) Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009) *Nature*, **460**, 529–533.
- 47) Chang, J., Davis-Dusenbery, B.N., Kashima, R., Jiang, X., Marathe, N., Sessa, R., Louie, J., Gu, W., Lagna, G., & Hata, A. (2013) *EMBO J.*, **32**, 3192–3205.
- 48) Siomi, H. & Siomi, M.C. (2010) *Mol. Cell*, **38**, 323–332.
- 49) Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., & Hata, A. (2008) *Nature*, **454**, 56–61.
- 50) Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., & Kim, V.N. (2008) *Mol. Cell*, **32**, 276–284.
- 51) Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., & Kim, V.N. (2009) *Cell*, **138**, 696–708.
- 52) Chang, H.M., Triboulet, R., Thornton, J.E., & Gregory, R.I. (2013) *Nature*, **497**, 244–248.
- 53) Piskounova, E., Polyarchou, C., Thornton, J.E., LaPierre, R.J., Pothoulakis, C., Hagan, J.P., Iliopoulos, D., & Gregory, R.I. (2011) *Cell*, **147**, 1066–1079.
- 54) Suzuki, H.I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y.L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2011) *Mol. Cell*, **44**, 424–436.
- 55) Suzuki, H.I. & Miyazono, K. (2012) *The Enzymes*, **32**, 163–183.
- 56) Suzuki, H.I., Katsura, A., Matsuyama, H., & Miyazono, K. (2014) *Oncogene*. 10.1038/onc.2014.254
- 57) Png, K.J., Halberg, N., Yoshida, M., & Tavazoie, S.F. (2012) *Nature*, **481**, 190–194.
- 58) Matsuyama, H., Suzuki, H.I., Nishimori, H., Noguchi, M., Yao, T., Komatsu, N., Mano, H., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2011) *Blood*, **118**, 6881–6892.
- 59) Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010) *Cancer Sci.*, **101**, 2087–2092.
- 60) Lewis, B.P., Burge, C.B., & Bartel, D.P. (2005) *Cell*, **120**, 15–20.
- 61) Suzuki, H.I., Matsuyama, H., Noguchi, M., Yao, T., Komatsu, N., Mano, H., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2013) *Leukemia*, **27**, 2107–2111.
- 62) Suzuki, H.I., Mihira, H., Watabe, T., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2013) *Nucleic Acids Res.*, **41**, e62.
- 63) Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E., Blleloch, R., Schroth, G.P., Nusbaum, C., & Bartel, D.P.

- (2010) *Genes Dev.*, **24**, 992–1009.
- 64) Yang, J.S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., & Lai, E.C. (2011) *RNA*, **17**, 312–326.
- 65) Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P.P. (2011) *Cell*, **146**, 353–358.
- 66) Denzler, R., Agarwal, V., Stefano, J., Bartel, D.P., & Stoffel, M. (2014) *Mol. Cell*, **54**, 766–776.
- 67) Bosson, A.D., Zamudio, J.R., & Sharp, P.A. (2014) *Mol. Cell*, **56**, 347–359.
- 68) Janssen, H.L., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D., Kauppinen, S., Levin, A.A., & Hodges, M.R. (2013) *N. Engl. J. Med.*, **368**, 1685–1694.

著者寸描

●鈴木 洋 (すずき ひろし)



マサチューセッツ工科大学コーク癌総合研究所客員研究員。医学博士。

■略歴 1979年大阪府生まれ，愛媛県育ち。2004年東京大学医学部医学科卒業。3年の臨床研修を経て，10年同大学院医学系研究科早期修了（宮園浩平教授），分子病理学分野特任助教。14年より現所属（Phillip A. Sharp教授）。

■研究テーマと抱負 RNAバイオロジーに焦点をおいた，遺伝子発現調節ネットワークの理解，悪性腫瘍などの分子病態の理解，新規治療法の開拓。Sciences for precision medicineを目指している。