

小さな RNA の暗号解読に成功
～右利き・左利きの謎を解明：
プレシジョンメディシン時代の核酸医薬へ新たな一歩～

1. 発表者：

鈴木 洋 （研究当時：東京大学大学院医学系研究科分子病理学 特任助教、
現所属：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）
宮園 浩平（東京大学大学院医学系研究科分子病理学 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆長く不明であった生体内の遺伝子の制御において重要な役割を持つ小さな RNA（マイクロ RNA、注1）の産生、特に RNA の右利き左利き、に関する中心的な原理を発見しました。
- ◆マイクロ RNA 産生・RNA 干渉の起点となる 2 本鎖 RNA から、どちらの 1 本鎖 RNA がマイクロ RNA として機能するかについて、普遍的な原理と対応するメカニズムの解明、さらにこれを予測・制御する数理的モデルの構築に成功しました。
- ◆RNA 干渉の起点となる 2 本鎖 RNA の運命を決定するしくみが明らかになったことで、RNA 干渉を利用した核酸医薬（注2）の合理的開発・最適化が可能になると期待されます。

3. 発表概要：

マイクロ RNA と呼ばれる小さな RNA はタンパク質の設計図となる他の RNA を抑制することで、さまざまなタンパク質の産生を調節するというユニークかつ重要な機能をもっています。また、マイクロ RNA のメカニズムの原点となる RNA 干渉は、病気に関係する遺伝子を直接的に調節するための核酸医薬における主要アプローチの 1 つとしても期待されています。一方で、RNA 干渉は 2 本の対になった RNA が起点となる分子機構ですが、そのどちらの RNA が機能するか（右利き・左利き）については未だ正確なメカニズムが不明であり、このことは核酸医薬において RNA 干渉の作用・副作用を十分に制御できないことを意味します。

東京大学大学院医学系研究科の鈴木洋特任助教（研究当時／現所属：マサチューセッツ工科大学コーク癌総合研究所）、宮園浩平教授らの研究グループは、長く不明であった生体内の遺伝子の制御において重要な役割を持つ小さな RNA（マイクロ RNA）の産生、特に RNA の右利き左利きに関する中心的な原理を発見しました。研究グループは、どちらの 1 本鎖 RNA がマイクロ RNA として機能するかについて、普遍的な原理と対応するメカニズムの解明、さらに、これを予測・制御する数理的モデルの構築に成功しました。本研究により RNA 干渉の起点となる 2 本鎖 RNA の運命を決定するしくみが明らかになったことで、マイクロ RNA の生体における役割のより正確な理解、および、RNA 干渉を利用した核酸医薬の合理的開発・最適化が可能になると期待されます。

本成果は国際科学誌 *Nature Structural & Molecular Biology* に、2015 年 6 月 22 日午前 11 時（米国東部時間）にオンライン版で発表されます。本研究は東京大学大学院医学系研究科とマサチューセッツ工科大学との共同研究により行われました。なお、本研究は日本学術振興会、文部科学省の科学研究費補助金などの支援を受けて行われました。

4. 発表内容：

<研究の背景>

我々の体を構成する細胞の中で、マイクロ RNA と呼ばれる小さな RNA はタンパク質の設計図となる他の RNA を抑制することで、さまざまなタンパク質の産生を調節するというユニークかつ重要な機能をもっています。マイクロ RNA はがんなどのさまざまな病気にも関わっていることが明らかになっており、注目されています。特に、マイクロ RNA のメカニズムの原点となる RNA 干渉（2006 年ノーベル医学生理学賞）は、遺伝子の機能を抑制する手法として世界中の生物学研究・医学研究で利用されているだけでなく、病気に関係する遺伝子を直接的に調節するための核酸医薬における主要アプローチの 1 つとしても期待されています。マイクロ RNA・RNA 干渉を応用した病気の診断法や治療法の研究が世界中で進められています。

ところで、マイクロ RNA は、細胞内で前駆体となる 2 本鎖 RNA からどちらかの 1 本鎖 RNA がマイクロ RNA として選択されることによって機能します（図 1 A）。2 本の RNA の内、それぞれの RNA は異なる遺伝子を制御するため、どちらの RNA が機能するかは、マイクロ RNA および RNA 干渉の特異性を考える上で非常に重要です（図 1 A）。意図していない側の RNA が機能することによって目的としない遺伝子を抑制することで副作用が発生するという事態が発生します。ところが、生体内のマイクロ RNA の詳細な解析が行われ、生体内のマイクロ RNA は、種類によって、一方の RNA だけ機能したり（右利き）、もう一方の RNA だけ機能したり（左利き）、あるいは、両方の RNA が機能したりしており（両利き）、どちらの RNA が機能するか（マイクロ RNA の非対称性）は実は千差万別であることが明らかになってきました（図 1 B）。この複雑なマイクロ RNA の右利き左利きのパターンを説明できるしくみはいまだ不明であり、このことは、核酸医薬の起点となる小さな RNA の作用・副作用をこれまでの研究で蓄積された経験則では十分に調節できないことを意味しています。

<研究内容>

①マイクロ RNA の右利き左利きパターンの一般的な特性の解明

本研究グループは、生体内のマイクロ RNA の詳細な解析に基づき、まず、2 本鎖 RNA の配列が非常に似ているにも関わらず、右利き左利きのパターンが大きく異なるマイクロ RNA グループに注目しました。このマイクロ RNA グループについてどちらの RNA が優先的に機能するかを検討した結果、このマイクロ RNA グループについて、まず一方の RNA（図 1：5p タイプ・右手型マイクロ RNA）が常に強く機能しており、もう一方の RNA（図 1：3p タイプ・左手型マイクロ RNA）は RNA 2 本鎖の両端のほどけやすさ（相対的な熱力学安定性の違い）に依存してさまざまな強さの活性を示すことを見出しました。さらに、このマイクロ RNA グループの右手型マイクロ RNA が 4 つの塩基の内、U または A で始まることから、以下のような仮説をたてました。

仮説：マイクロ RNA の右利き左利きを決定する分子ルールは 2 つあり、1 つ目のルールでは、マイクロ RNA の先端が U か A であった場合に、G か C で始まる場合よりも、成熟型マイクロ RNA として強く機能する（5'塩基選択ルール）、2 つ目のルールでは、マイクロ RNA の先端がほどけやすいほど、強く機能しやすい（熱力学安定性ルール）、そして、最終的な右利き左利きのパターンは 2 つルールの重ね合わせによって決定される（図 2 A）。

この仮説によりマイクロ RNA の右利き左利きのパターンは図 2 B のように予想され、大規模なマイクロ RNA の解析結果は、予測と非常によく合致するものでした（図 2 C）。これらの

解析の結果より、複雑なマイクロ RNA の右利き左利きのパターンは、マイクロ RNA の先端の塩基が UAGC のどれであるかというデジタル変換のパターンと、マイクロ RNA の両端のほどこやすさというアナログ変換のパターン、両者の重ね合わせを反映するものであることが明らかになりました。

②マイクロ RNA の右利き左利きパターンを決定するメカニズム

マイクロ RNA は、細胞内で Argonaute、Ago と呼ばれるタンパク質（注 3）と複合体を形成することにより、機能します。Ago タンパク質は、2 本鎖 RNA を取り込み、ここから 1 本の RNA が除去されることで最終的な Ago タンパク質と 1 本鎖 RNA の複合体が形成されます。Ago タンパク質は、2 本鎖の RNA の両端を MID ドメインと PAZ ドメインと呼ばれる構造（注 4）ではさみこむことが知られています（図 3）。

詳細な解析の結果、成熟型 1 本鎖 RNA の先端（5' 端）に結合する MID ドメインの中で、RNA の塩基と相互作用する部分が 5' 塩基選択ルールを遂行するセンサーとなり、RNA のリン酸と相互作用する部分が熱力学安定性ルールを遂行するセンサーとなっていることが明らかになりました。この 2 つのセンサーが同時に 5' 塩基選択ルールと熱力学安定性ルールを遂行することで 5' 塩基選択ルールと熱力学安定性ルールの重ね合わせという特徴的なパターンが発生すると考えられます。これらの結果は、これらのセンサー部分に変異を挿入した Ago タンパク質の解析からも支持されました。

③RNA 干渉の右利き左利きパターンの数理的モデルの構築

ここまでの解析により、Ago タンパク質の MID ドメインが RNA の両端のほどこやすさを検出していることが明らかになりました。Ago タンパク質には MID ドメインが 1 つあり、これにより RNA 両端の片側の絶対的な熱力学的安定性を検出できることは説明できますが、では、両端のほどこやすさ、つまり、相対的なほどこやすさの違いはどのように検出されているのでしょうか。この問題は、生化学における酵素反応速度理論を右利き左利きパターンにあてはめることにより、説明できます。MID ドメインと RNA の片側の相互作用は 1 対 1 の関係であっても、酵素反応速度理論により相対的なほどこやすさの違いが検出可能になることが、数理モデルの構築により示唆されました。さらに、この数理モデルを、次世代シーケンサーによる生体内のマイクロ RNA の詳細な解析、および、生体内のマイクロ RNA の活性に関するデータにあてはめたところ、生体内のマイクロ RNA の挙動が非常によく説明できることが明らかになりました。

④マイクロ RNA の右利き左利きパターンとがんの関係

マイクロ RNA は細胞の分化といった重要な生命現象、および、がんなどのさまざまな病気にも関わっていることが知られています。がんでは、さまざまなマイクロ RNA の発現の異常が報告されていますが、近年の研究により、マイクロ RNA 自身の変異や、マイクロ RNA の配列の個人差が、がんのリスクやがんの予後と関係することも報告されています。マイクロ RNA の右利き左利きパターンとがんの関係について解析を行い、がんでは変異が発見されたマイクロ RNA の配列異常、がんのリスクと関係するマイクロ RNA 配列の個人差が、マイクロ RNA の右利き左利きパターンを変化させることを見出しました。このことは、右利き左利きパターンの異常がマイクロ RNA の機能の異常に関係していることを示唆するものです。

<社会的意義・今後の展開>

本研究により、マイクロ RNA 産生・RNA 干渉の起点となる 2 本鎖 RNA から、どちらの 1 本鎖 RNA がマイクロ RNA として機能するかについて、普遍的な原理と対応するメカニズムが明らかになり、マイクロ RNA の非対称性を予測・制御する数理的モデルの構築にも成功しました（図 4）。本研究により RNA 干渉の起点となる 2 本鎖 RNA の運命を決定するしくみが明らかになったことで、マイクロ RNA の生体における役割のより正確な理解、および、RNA 干渉を利用した核酸医薬の合理的開発・最適化が可能になると期待されます。特に、来たるプレジジョンメディシン時代（精密個別化医療）では病気に関係する遺伝子の正確な機能解析、および、病気に関係する遺伝子を対象にしたスピーディーな核酸医薬の開発が重要であり、本研究により RNA 干渉を応用した核酸医薬の開発が加速することが期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Structural & Molecular Biology」（オンライン：2015年6月22日）

論文タイトル：Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes

著者：Hiroshi I. Suzuki*, Akihiro Katsura, Takahiko Yasuda, Toshihide Ueno, Hiroyuki Mano, Koichi Sugimoto, and Kohei Miyazono*

鈴木洋*、桂彰宏、安田貴彦、上野敏秀、間野博行、杉本耕一、宮園浩平*

DOI 番号： 10.1038/nsmb.3050

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科分子病理学 特任助教（研究当時）

（現所属：マサチューセッツ工科大学コーク癌総合研究所）

鈴木 洋

500 Main St., 76-417, Cambridge, MA 02139

電話 617-821-0466

e-mail: hisuzuki-tky@umin.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科分子病理学

教授 宮園 浩平

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

電話 03-5841-3345

ファックス 03-5841-3354

e-mail: miyazono@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）マイクロRNA（microRNA, miRNA）

マイクロRNAは二十数塩基からなる1本鎖RNAであり、タンパク質の設計図とならないRNAの1種です。マイクロRNAは、まずDNA・ゲノムから一次転写産物として作られた後、核内と細胞質内で、DroshaとDicerという2つの「はさみ」に相当するRNA切断タンパク質によってそれぞれ切断されることで2本鎖RNAとなり、2本のRNAの内、片側だけがAgoタンパク質に取り込まれて機能します。マイクロRNAは、主に、相補的な配列を持ったタンパク質の設計図であるRNAと相互作用し、タンパク質への産生を抑制します。厳密には、2本鎖RNAの内、ヘアピンの5'側のマイクロRNAを5p型マイクロRNA、3'側のマイクロRNAを3p型マイクロRNAと呼びますが、本資料では便宜上、5p型を右手型、3p型を左手型と記載しています。RNAにはアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、ウラシル（U）の4種の塩基があり、マイクロRNAもこれらの4種の塩基の組み合わせで構成されます。

（注2）核酸医薬

病気に関係する特定の遺伝子を直接的に標的にした治療法は、分子標的治療と総称され、さまざまな病気・さまざまな遺伝子に対して世界中で分子標的治療薬が開発されています。中でも、低分子化合物・抗体を利用した低分子医薬品や抗体医薬品についてはすでに多くの治療薬が使用されています。核酸医薬は、分子標的治療の比較的新しい分野であり、DNAやRNAの構成成分である核酸を用いた医薬品を用いて、直接的に病気に関係する遺伝子を制御しようとするアプローチです。RNA干渉は、研究分野で特定の遺伝子を抑制する手法としてすでに広く使用されていますが、核酸医薬の分野でも主要なアプローチの1つとして期待されています。

（注3）Argonaute, Ago

マイクロRNAが遺伝子発現を抑制する上で必須のタンパク質であり、遺伝子抑制の実行因子です。Agoタンパク質は、2本鎖RNAを取り込み、片側のRNAが除去されることで、最終的に、Agoタンパク質-1本鎖RNA複合体ができます。完成したAgoタンパク質-1本鎖RNA複合体が、標的遺伝子の発現を抑制します。

（注4）MIDドメインとPAZドメイン

Agoタンパク質は、複数の部分的な構造から成り立っています。Agoタンパク質は、2本鎖RNAを取り込み、また、最終的に残った成熟型マイクロRNAを保持する際に、成熟型マイクロRNAの先端（5'端）をMIDドメインと呼ばれる構造で、末端（3'端）をPAZドメインと呼ばれる構造で保持することが知られています。

8. 添付資料：

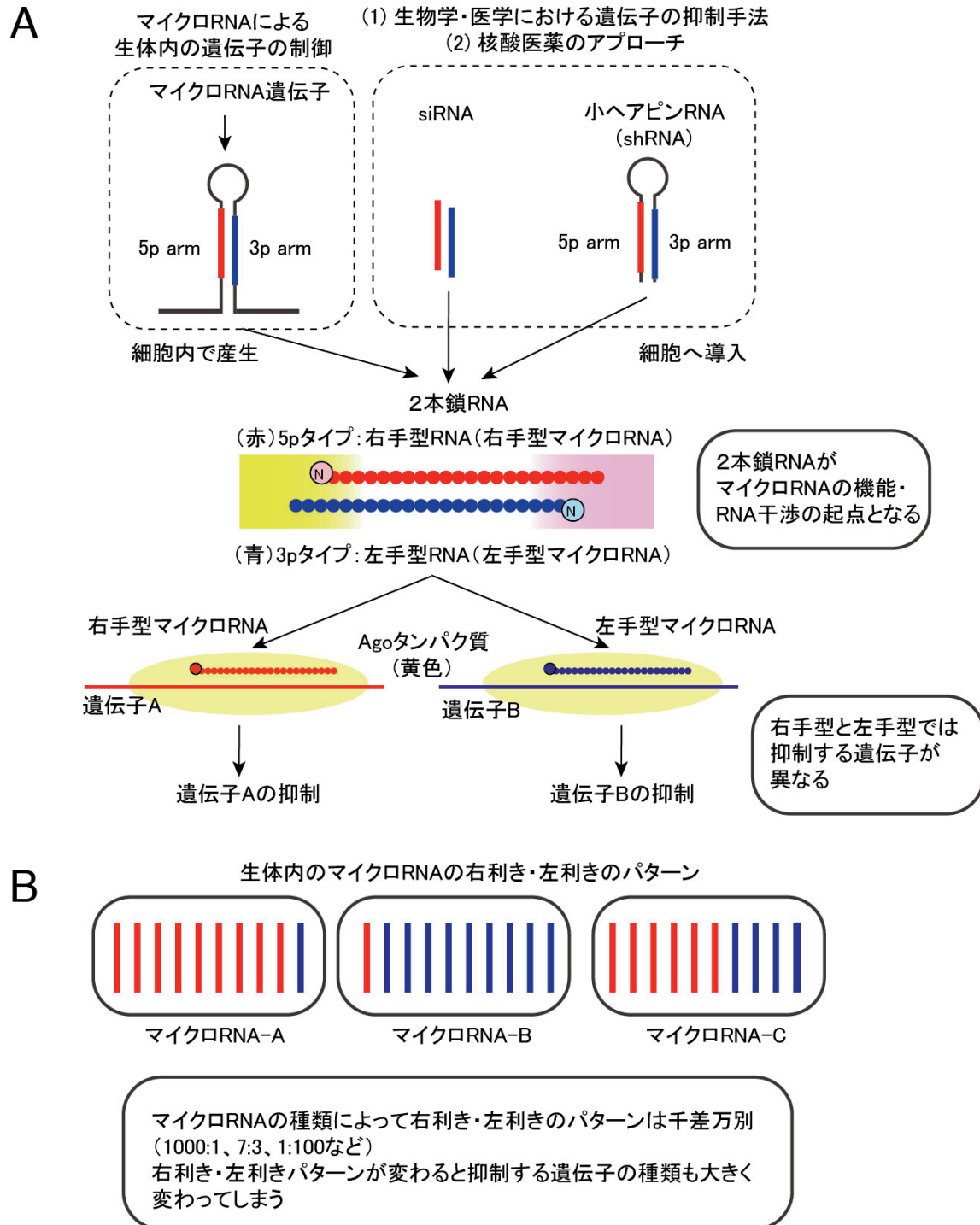


図1：小さなRNA（マイクロRNA）の右利き・左利きの重要性（A）と、
右利き・左利きに関する謎（B）

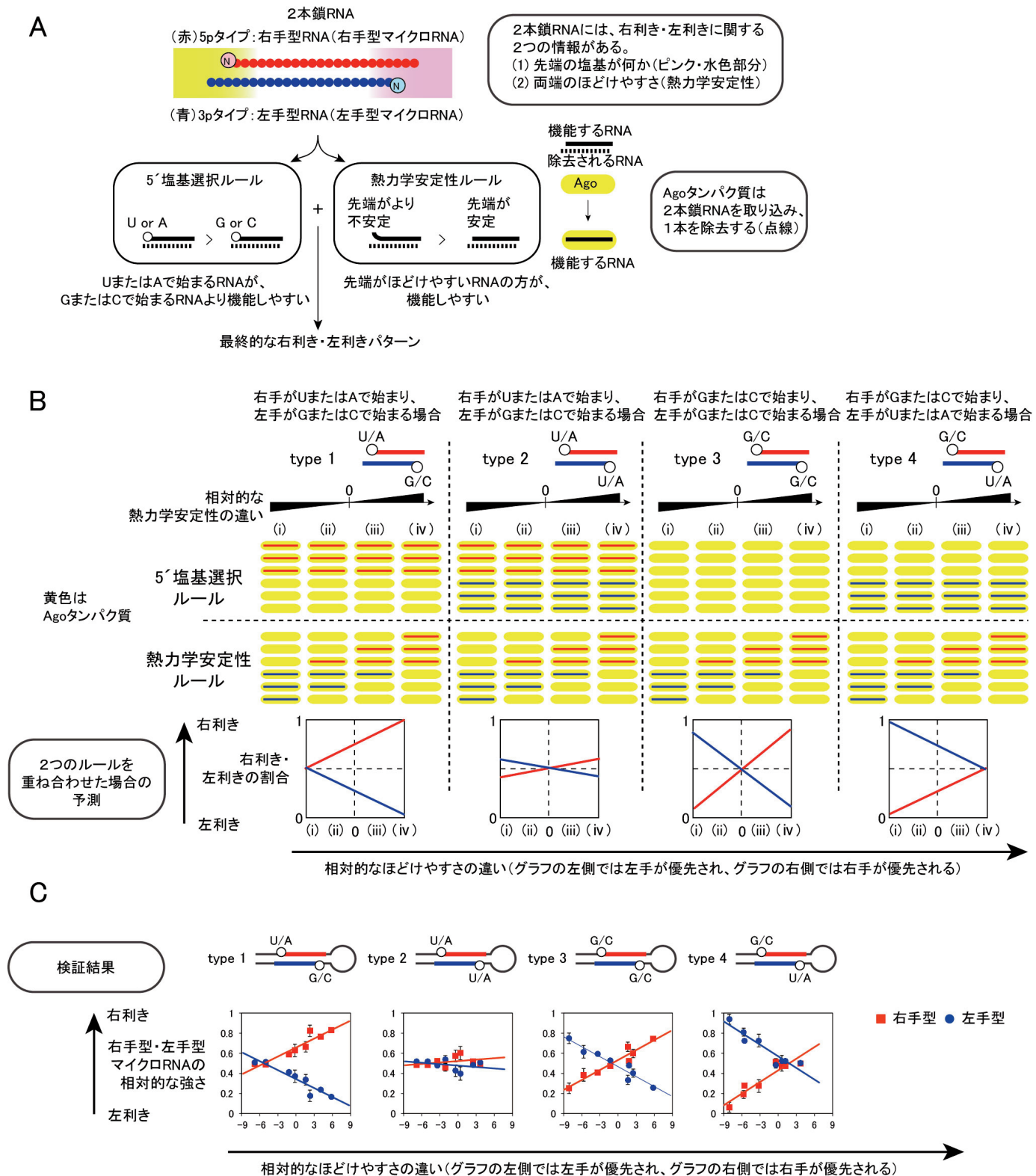


図2: 小さなRNA (マイクロRNA) の右利き・左利きに関する仮説 (A)、仮説に基づく予測 (B)、検証結果 (C)

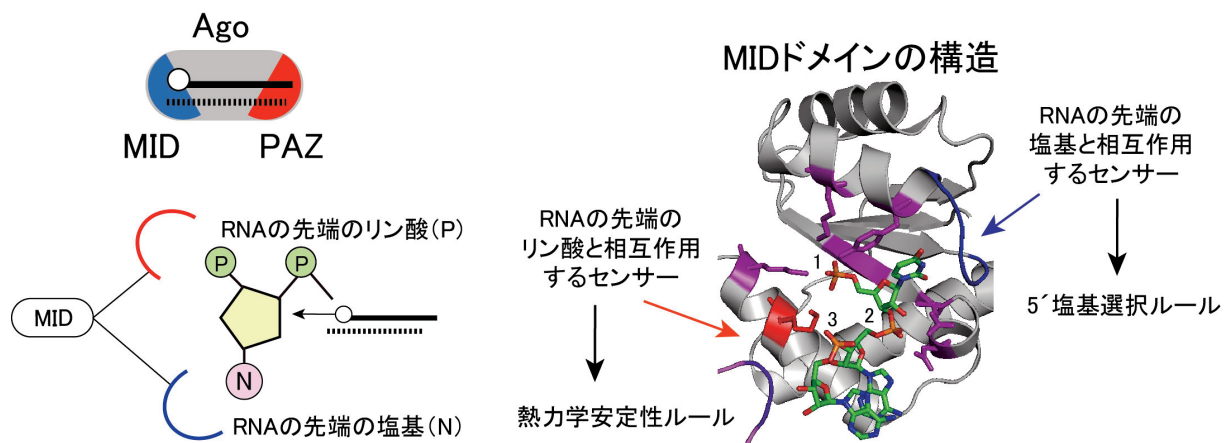


図3：右利き左利きを決定する分子メカニズムの解明

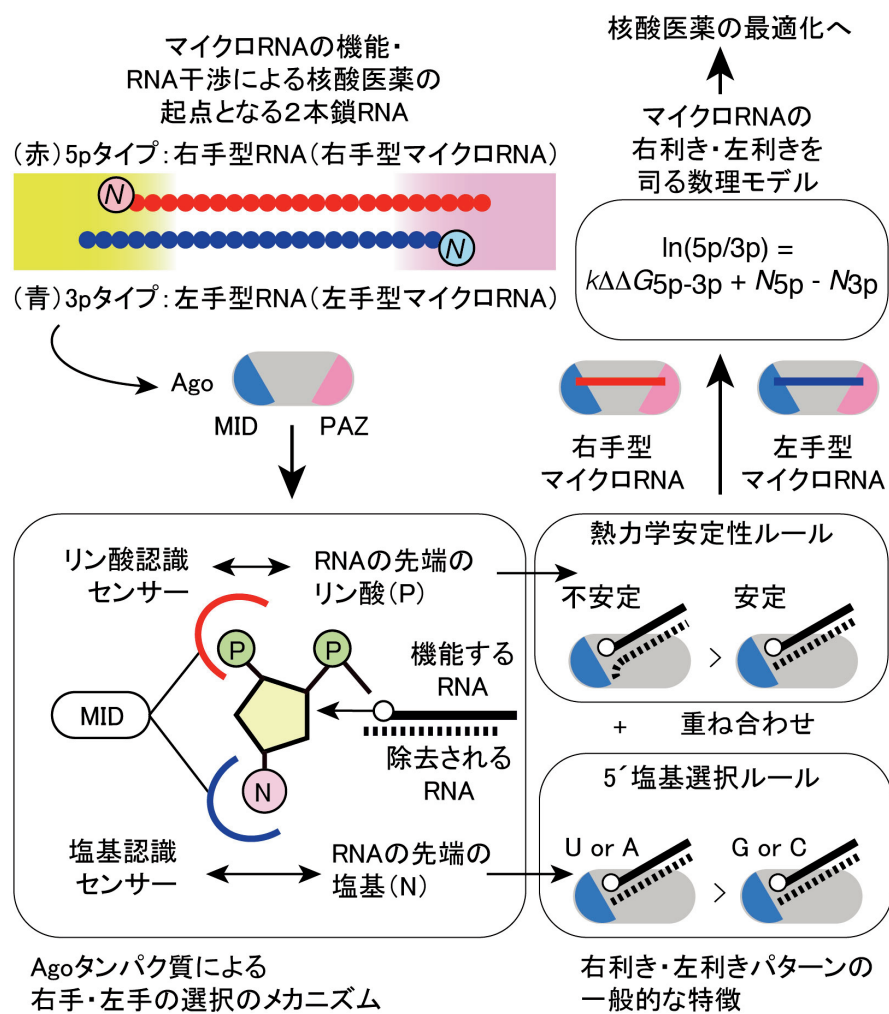


図4：本研究のまとめ