



RNA Network Newsletter

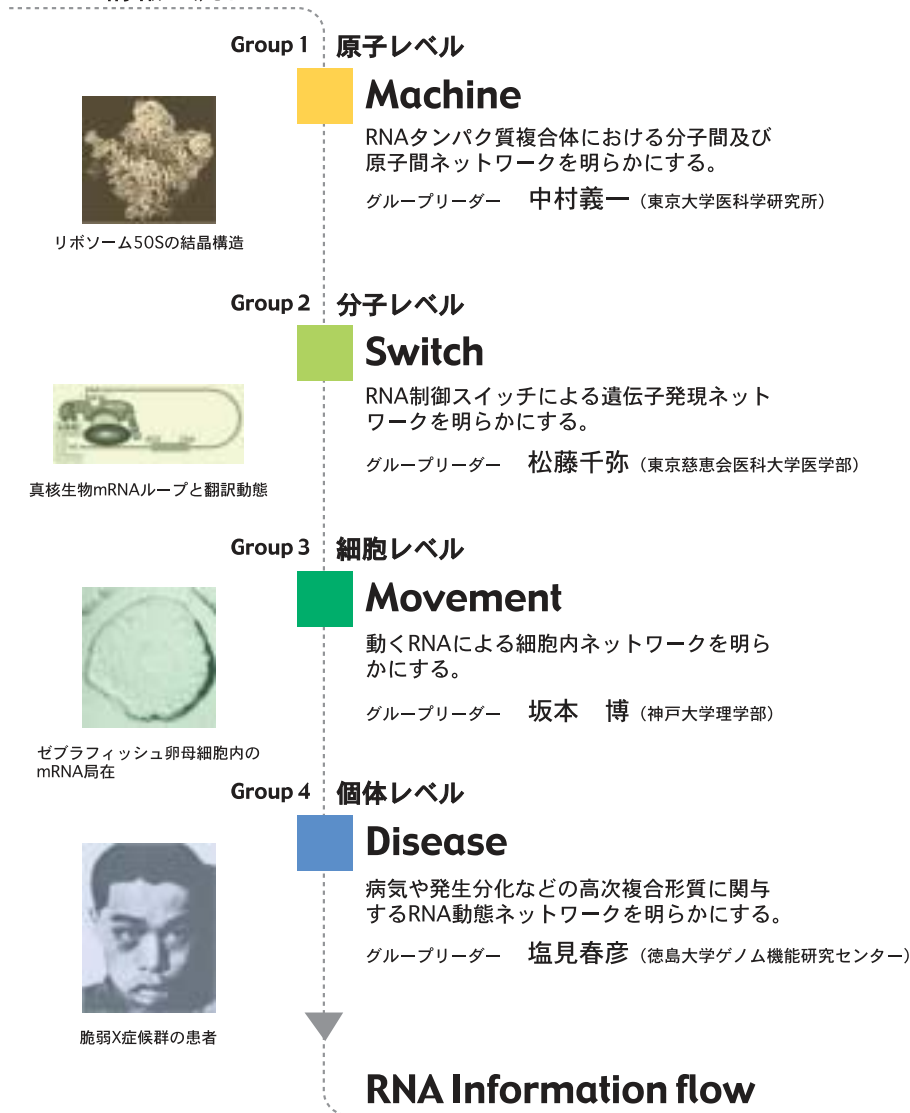
Volume 1. Number 2. January 2003

 *Pseudoknot*

文部科学省科学研究費特定領域研究 **2001—2006**
RNA情報発現系の時空間ネットワーク
Spatiotemporal Network of RNA Information Flow

研究領域の階層性と計画研究グループ構成

RNA情報の流れ



シュードノットは国際RNA Society (<http://www.rnasociety.org/>) のロゴマークにもなっています。これを見るたびに日本的な形だなあと感じていました。ニューズレター創刊号の素晴らしい表紙を見たとき、思わず塩見編集長に「次は組み紐のシュードノットを表紙にしてみませんか」という提案をしてしまったのです。制作者の当てがあつたわけでもなく一時は後悔しましたが、研究室の永坂恵子さんが、群馬県藤岡市在住の組み紐の先生、秋葉元子様を紹介してくれました。さっそくお家に押し掛けると、大きな機械が2台置かれていました。これで細い絹糸を編んだり束ねたりしていくのだそうです。見せていただいた作品群は、全体の造形、細部の精巧さ、糸の輝きの調和が、息をのむような美しさでした。携えていった分子生物学の教科書を使ってRNAの構造とシュードノットのトポロジーについてお話しさせていただき、待つこと1か月。箱をひらくと、芸術家が表現したシュードノットとステムループが現れました。ほとんど同一のステムを貫く2つの曲線の対比の妙にご注目ください。何とこのシュードノットは、2つのステムのスタッキングを保ったまま、らせんのピッチとループサイズを変えることができるのです！細胞の中でこの形がどのように認識され制御スイッチとしてはたらくのか、認識分子になったつもりで見つめています。

なお、組み紐の撮影は研究室の大城戸真喜子さんにお願ひしました。デザインは、創刊号に続いて生命誌研究館の工藤光子さんです。工藤さんが料理してくれた図の原典は、Holland et al, RNA 5: 257 (1999) および Huttenhofer et al, RNA 2: 354 (1996) です。(慈恵医大 松藤千弥)

| | |
|--|----|
| 愛しのパジェロ 中村義一 | 2 |
| 随筆 この頃思うこと 西村 暹 | 3 |
| 連載 私の RNA 研究 志村令郎 | 4 |
| ■ミーティング報告■ | |
| マドリッドの三足鳥 白石英秋 | 7 |
| 国際 RNA 学会に参加して 齋藤都暁 | 9 |
| Translation Control in Cold Spring Harbor Laboratory 2002 藤原俊伸 | 12 |
| 2 nd International Yeast Prion Symposium Colin Crist | 15 |
| ダンディー日誌 神津知子 | 19 |
| ■ RNA Update ■ | |
| 特集①：non-coding RNA と遺伝子発現 渡辺嘉典, 影山裕二, 牛田千里, 程 久美子, 善野修平, 稲田利文 | 22 |
| 特集②：生体防御機構と RNA 田原浩昭, 櫻木淳一, 米崎哲朗, 木俣行雄, 栗原靖之 | 36 |
| 最近のトピックス 吉久 徹, 片平正人 | 49 |
| 随筆 | |
| 10 ミクロンの小宇宙 谷 時雄 | 54 |
| ミトコンドリア研究におけるロマンと社会的役割 太田成男 | 57 |
| ■ New Techniques ■ | |
| 応用研究を哺乳類ミトコンドリアゲノムの基礎研究に応用する 林 純一 | 59 |
| ■海外からの便り■ | |
| 北尾紗織, 桑原(藁科)知子, 藁科雅岐 | 62 |
| ■ Business ■ | |
| 生ごみ処理機の細菌を調べる 関口達彦 | 67 |
| ゲノム創薬における RNAi の利用 鈴木幹生 | 69 |

RNA Network Newsletter

Volume 1. Number 2. January 2003

CONTENTS

愛しのパジェロ

中村 義一 (領域代表)

ある冬の金曜の夕方、仕事をおえたスキー愛好の面々が、2台の車に分乗してなじみのロッジ・アルプ(岩岳)に出発しました。夜半から冬型の気圧配置が強まり、猛烈に気温が低下、中央道の甲府を過ぎたあたりから路面が凍結したので、4輪にチェーン装着でのろのろと塩尻峠を迂回し(今では簡単に通過できる岡谷トンネル開通前の時代)、伊北のインターにたどり着いたのが午前4時頃。ようやく松本をぬけた6時すぎの国道147の路面は見事なアイスバーン。と、突然、車がスピン、2回転して、人家の玄関前であらうじて停止.. ホッ..、それまで黙々と運転を続けてきた川崎一郎氏(当時大学院生、現遺伝研)、「もうだめです、運転できません..」。中央道に入ってから彼1人に運転させ続けた体育会系精神を反省。運転手を交代し10分後、再び、スリップ、車は斜めに路面を滑って、1m下の田んぼに向かって、離陸。車内静寂.. 滞空時間の長さは今でも脳裏に鮮明。これに懲りて、1988年5月に重たい4駆のパジェロを購入し、2~3シーズンごとに全天候型タイヤを全交換、そのかいあって、ほとんど雪面でのスリップはなし。

新車のころ、ある重点領域研究の班会議が2月の奥志賀高原で開催され(たしか遺伝研・嶋本伸雄氏が世話人?)、これ幸いと参加しました。志賀高原の上り坂もチェーン不要で、雪面を心地よく60kmのスピードで疾走していたら、隣から饗場弘二氏(名大)の不安にみちた声、「おい、出しすぎやで!」、よほど怖かったらしい。以来、今日まで、無事故、1違反(駐車)で、14年6ヶ月。どこへ行くにも愛車のパジェロ、特に雪の季節は格別です。稲田利文氏(現名大)は当時の大学院生でしたが、体育会系気質がよくあい、通算6シーズン、未だ新しさの漂うパジェロで一緒に滑りに行ってくれました。体操選手だった彼のスキー上達ぶりは目を見張るものがありました。彼の卒業後、スキー愛好者が次第に減少(悲しい)、ある年の冬、募れども、ラボからの参加者はいなくなり、ただ1人でアルプへ..。これをみかねた稲田氏が奥様と子ども名古屋から馳せ参じてくれたことがありました(感謝)。

パジェロとの14年の年月は、私の助教授時代とも、あるいは私の(解離因子を相手にした)RNA研究の期間とも重なります。同時に、大澤重点(1989-1991、遺伝暗号の可変性)、横山特定(1992-1995、RNA機能構造の新視点)、渡辺特定(1997-2000、RNA動的機能の分子基

盤)、本特定(2001-2006)と連続する日本の4つのRNA研究の歴史とも重なります。1990年1月、ガーデンパレス(東京)で第1回の大澤重点シンポジウムの際、大澤省三先生(当時名大)と志村令郎先生(当時京大)にはパジェロにご乗車、東京駅までお送りしました。乗る前に、「おっ!」と驚かれたようでした(そういえば、後部座席にスキー板の先がはみ出していたので、「乗れないじゃないか」ということだったかも..)。第1回シンポジウムは日本のRNA研究の意気込みに満ちたものでした。その夜は、両先生とも酩酊。「中村君、学問はストイックでなければならない!」とは、忘れられない志村先生の一喝。大澤先生は翌日のご自分の講演修了後、「何をしゃべったか覚えとらん!」。今日の特定領域研究の源流のような気がします。

外国のRNA研究者にもパジェロは活躍。ある年の暮れ、Don Court (NCI) から電話があり、「これから日本に行ってもいいか?」と、気落ちした声。その冬は、Donと一緒に滑りました。同宿の子供達とボディーラングエッジ会話

ではしゃいでいましたが、アメリカに戻ってから、離婚..。その時に購入したパジェロ(アメリカではモンデロ)は、今でも彼の愛車です。その他にも Marianne Grunberg-Manago, Charley

「中村君、学問はストイックでなければならない!」

Yanofsky, Max Gottesman, John Hershey, Nahum Sonenberg, Leif Issakson, Lev Kisselev, John Atkins, Ray Gesteland, Mathias Springer, Richard Buckingham, August Bock, Mans Ehrenberg, John McCarthy, Bob Simons, Chris Tan, Warren Tate, Marv Wickens, Wolfgang Wintermeyer, Lynne Maquat, Margaret Buckingham 等々、恩師や大勢の友人に利用してもらいました。

14年余の間の喜怒哀楽も一緒に積み込んでくれた愛車のパジェロ、ひよっとすると、一番の友かもしれませぬ。整備士の石井さん(西品川三菱)の購入時からのこまめな点検整備で、ここまで長寿を保ってきました。そして、走行距離も24万kmに。「いい音してますね。この分なら30万いけるね! エンジンもどこも万遍なく磨り減っているから寿命がきた時は、す~っと、静かに止まるよ、きつと」、その石井さんも今年の春に退社(14年間ありがとうございました)。東京都のディーゼル規制によりパジェロの余命もあと2年、それまでに30万達成を目標に、今年の冬もアルプへ行かねば..。どうぞスキー愛好の士はご同乗あれ。

でも、「す〜っ」と止まったら、その時は天寿全うの大往生ですから、一緒に祝ってあげて下さい。

(ニュースレターには、こんな他愛もない寄稿もありという見本です。)



プロフィール

1977年京都大学大学院理学研究科修了，理学博士。
1978年より東京大学医科学研究所の助手，助教授を経て，現在，遺伝子動態分野教授。趣味スキー。

中村 義一
(領域代表)

◆ 随筆：RNA and I ◆

この頃思うこと

西村 暹

(万有製薬株式会社 つくば研究所)

なんととっても最近嬉しいニュースは島津製作所の田中耕一氏のノーベル化学賞の受賞である。このことは我々の研究を考える上で強烈なインパクトを与えたように思う。先ず、田中氏のノーベル賞対象になった論文は1987年に書かれた日本語の論文(医用マス研究会講演集，第12巻 P 219 - 222, 1987)で，なんとそれに書かれた英語の Abstract が注目されたという。英語の論文は1988年に発表されたが(Rapid Communication in Mass Spectrometry, Vol. 2, No.8, 151 - 153, 1988)，なんとこの雑誌のインパクトファクターは2にながしだとのことである。ノーベル委員会の識見に感銘すると共に，このことはすばらしい研究をすれば，国やら学閥に左右されることなく成果が認められることもあることを示したもので，田中氏の年齢が43歳ということと田中氏が研究室のボスでなく，実際に研究を考案し実験をした人だということ，世の中大型研究が盛える中で，一般の研究者はなんとなく閉塞感を感じている時，特に日本の若手研究者に勇気と活力を与えてくれたに違いない。ノーベル賞をもらう資格のある人はもらう人の100

研究者は誰でも自分のやっていることを他人に認めて欲しいのである。その意味でやたらとたくさんあるシンポジウムは研究の独創性の発展を抑えていることになる

倍はいるという。誰がもらうかは成果の他に時代の流れや運もあるという。田中氏の研究は丁度ポストゲノム時代にマッチしたとも言える。何はともあれ大変喜ばしい限りである。

世の中は Nature, Science, Cell だとかインパクトファクターに振り回され過ぎているように思える。勿論それも重要だが，我々やメディアはそれに振り回され過ぎているのではないか？インパクトファクターは発表された論文が，その後2年間にどれだけ引用されたかの係数である。したがって，発表当初には独創性の故にあまり世の中に認められなくて，後年評価されるような論文は数字に関係ないことになる。Nature, Science, Cell のインパクトファクターが高い理由の一つは，これらの雑誌が時流にのった仕事を載せるからでもある。私はかつて自分の論文が過去のどのくらい引用されたかを調べたが，面白いことに上位には学士院紀要，Jpn. J. Cancer Res. Nucl. Acids Res. などがある。これらは葛西宏博士とやった8-ヒドロキシグアニンの

発見に関するものが含まれており、priority をとるため日本の雑誌に投稿した。

野依良治博士がノーベル賞受賞後、つくばで講演された時に話されたことだが、引用回数は一面だけを見ているものだ、世の趨勢を批判しておられた。たくさん引用されるということは、たとえば劇場が満員になるようなものだが、だからといって内容が優れているとは限らず、ただミーチャン、ハーチャンが集っている場合もあると言っておられた。(なお野依先生はこういうことを言えるのも私はcitationが多いからだと言っておられたが。) 要は我々自身、又研究を評価する立場にいる人達が実際の研究の内容で研究者を判断することが必要である。

このことと関連して、最近の学会で気になることは、やたらにシンポジウムやワークショップの数が多いことである。聞くところによると、シンポジウムのオルガナイザーは自分から学会に提案し、事務局で選奨とのことである。ややもするとシンポジウムは時流にのったものが多く、また或る程度関連分野を研究している研究者が多くないとシンポジウムは組めない。さらに仲間内だけでシンポジウムを企画しがちである。結果的に興味あることをコツコツ

やっている人は口頭発表の機会が閉ざされてしまうことになる。研究者は誰でも自分のやっていることを他人に認められて欲しいのである。その意味でやたらとたくさんあるシンポジウムは研究の独創性の発展を抑えていることになる。そのような意味でRNA学会の年会は規模が小さく、民主的な運営ですばらしいと思っている。

プロフィール

1960年 東京大学化学系大学院生物化学博士過程(応用微生物研究所第5研究室)修了、理学博士。財団法人癌研究会癌研究所研究員、米国オークリッジ国立研究所生物学部、米国ウィスコンシン州立大学酵素研究所研究員、国立がんセンター研究所ウイルス部分子遺伝研究室長、国立がんセンター研究所生物学部長等を経て、1992年より万有製薬株式会社つくば研究所長。2001年より万有製薬株式会社つくば研究所名誉所長。

西村 暹

(万有製薬株式会社つくば研究所)

◆ 連載 ◆

私の RNA 研究

志村 令郎

(日本学術振興会
ストックホルム研究連絡センター長)

1. はじめに

特定領域研究「RNA 情報発現系の時空間ネットワーク」の領域ニュース編集長の塩見教授から、エッセイ連載物、例えば「RNA: The past, present and future as seen through the eyes of-----」と言った風のものを書くようにという手紙を頂いた。正直なところ私はこの手の文章を書くのが苦手でありまた実際下手なので、お引き受けするのを逡巡したが、RNA 研究は私のライフワークであったし研究を始めてから既に何十年も経た今、昔からの私の研究の歴史を振り返ってみてもよいかも知れないと考えて、敢えて書くことにした。このような訳で以下に数回にわたって書く内容は、私の個人的な RNA 研究の歴史のエッセンスをまとめたも

のであり、そのため時に独断と偏見に満ちた考え方があるかも知れないことを、あらかじめお断りしておく。現在、私はストックホルムに在住しており、こちらでの様々な逸話等をその都度、「スウエーデン便り」として末尾に書かせて頂くことにする。

2. RNA 研究の前夜

私は1956年京都大学理学部植物学科を卒業し、同年、大学院に入学して、植物学専攻の生理学講座に所属したのが研究生活の始まりであった。この時は芦田譲治教授が指導教官で、酵母の銅抵抗性の機構について研究を行った。芦田先生には、当時、農学部の実験遺伝学講座の教授をさ

れていた木原 均先生が紹介して下さい、その門下生となったのであった。芦田研究室では多くのことを教えて頂いたが、研究室全体としてはややまとまりがなく、また研究室の大多数の先輩の大学院生たちの生理学的な研究のやり方に、私はついていけない感じがしていた。そんなこともあって雑誌会では、当時βガラクトシダーゼの研究を始めて間もない J. Monod のフランス語で書かれた論文ばかりを紹介していた。いずれにしても、かなりの跳ね上がりであった私を（自分ではそうは思っていなかったが）、芦田先生が手に負えないと思われた為かどうかわからないが、修士課程を修了した段階でアメリカへ留学することを勧められた。いくつかの留学先があったのであるが、いろいろな状況を考えて当時エール大学からラトガース大学に移ったばかりの H. J. Vogel 教授の研究室に行くことにした。

ニュージャージー州のラトガース大学微生物学研究所（現 Waksman 研究所）の大学院生時代は、本当に苦労した。渡米して大変なカルチャーショックを受けた上に、英語が苦手だった私は、毎日ある講義や試験でノイローゼ状態になっていた。研究面では初めは大腸菌のアミノ酸合成系、特にアルギニン合成系の酵素の生合成に関する制御機構の研究を行い、後に高等植物（ウキクサ）を用いて、リジン生合成経路の同定とその生合成系の酵素、meso-ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素およびその直前に作用するラセマーゼの生化学的な研究を行っていた。それはそれで面白い側面もあり、国際的な情報が入らない日本の大学院修士課程を終えて渡米した私にとっては、随分と新鮮でもあった。しかし私は教養部時代に、奈良女子大の徳永千代子教授のショウジョウバエ遺伝学の講義を聴いて、初めて生物学、特に遺伝学に興味を持つようになったこともあり、また木原 均先生の「これからの遺伝学は、遺伝子や遺伝子の働きをモノのレベルで研究するようになる」というお言葉（これは木原先生にお目にかかった時に個人的に教えて頂いた言葉である）もあって、基礎的な生化学の手法を習った後は、遺伝子の科学の研究をしたいという潜在的な気持ちが強かった。そんなこともあって Ph. D. を取得した後は、その当時まさに世に現れつつあった分子遺伝学の研究に従事したいと思っていた。偶々ラトガース大学の研究所で Informational Macromolecules というシンポジウムが開催され、多くの著名な研究者が講演したが、その中でロックフェラー研究所（現大学）の F. Lipman のグループにいた D. Nathans の蛋白質生合成の講演に私は強い感銘を受けた。Ph. D. を取る数ヶ月前、H. J. Vogel 教授にポストドクで何処へ行きたいかを尋ねられた。彼は私にパスツール研究所の J. Monod 等の著名な研究者の名前を 2~3 挙げ、希望するならばポスト

木原 均先生の「これからの遺伝学は、遺伝子や遺伝子の働きをモノのレベルで研究するようになる」というお言葉もあって、基礎的な生化学の手法を習った後は、遺伝子の科学の研究をしたいという潜在的な気持ちが強かった

ドクとして行くことが出来るようにすると伝えてくれた。特に Vogel 先生は個人的に親しかったこともあって、J. Monod を強く勧めてくれ、事実、パスツール研究所行きを半分手配してくれていた。しかし私は、結局そのすべてを断ってしまったのであるが、この辺のいきさつについては、以前、生命誌研究館発行の雑誌「生命誌」(通巻5号)のサイエンティストライブラリーの中に書いたことがある。

私はその代わりに希望する人として、F. Lipman から独立してジョンスホプキンス大学医学部の Assistant Professor になったばかりの D. Nathans の研究室を挙げたのである。Monod 等に比べて当時未だ比較的無名で若い Nathans の所へ行くと言うのは、ある意味で確かに無謀であり、最初は多くの人に何を考えているのだと嘲笑さえ受けたこともあった。しかし最初のうち慚然とした面持ちだった Vogel 教授も結局は賛成してくれ、当時、研究費が潤沢でなかった Nathans の要請を受け、私が Damon Runyon のフェロウシップを申請するように手配してくれた。このフェロウシップの面接試験を受けて首尾よく取得することが出来ることになり、1963年から Nathans 博士の研究室で研究することになった。

3. RNA 研究の始まり

Nathans 博士の研究室へ最初のポストドクとして行ったことが、結果的に私の RNA 研究の出発点となった。Nathans はそれより少し前、ロックフェラー研究所にいた時、N. Zinder のグループで発見した RNA をゲノムにするバクテリオファージ f 2 の RNA が、in vitro の蛋白質合成系でテンプレートとして働き、f 2 のコート蛋白質が合成されることを発表していた。私に課せられたテーマは、RNA ファージ MS2 の RNA の中に 5-フルオロウラシル (5-FU) を取り込ませ、それによっておそらくミスマッチを生ずる（これはそれ以前に Monod が別の系で予想していた）結果、テンプレートの翻訳に間違いが起こり、異常な蛋白質がつくられるかどうかを検証することであった。5-FU が U 残基の 8 割に置換した RNA は浮遊密度が増大するために単離、精製できることが可能で、その物理的な性質を解析することが出来た。しかし少なくとも in vitro 系では 5-FU を含む mRNA の翻訳の間違いは見出せなかった。この過程でいくつかの興味ある知見が得られ、当時、評判の良かった J. M. B. 等の雑誌にいくつか発表した。それより後で見つけたことであるが、MS2 の感染菌に 5-FU を投与すると RNA の 3' 末端のほうが約 1/3 欠落したファージ粒子が作られるが、この RNA をテンプレートにして in vitro 蛋白質合成系で産物を解析した結果、RNA レプリカーゼの遺伝子が最も 3' 末端側にあることも

明らかになった。

この頃 Nathans のグループでは、ファージ粒子を SDS で可溶化し、それを SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した結果、コート蛋白質のほかにもう一つの蛋白質が粒子あたり一分子存在することを明らかにした。SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、今でこそ当たり前の技術であるが、当時は未だ知られていなかった。蛋白質を可溶化するため出来るだけ非イオン性のデタージェントを多種類試しても駄目で、結局、イオン性の SDS が一番優れていること分かり、夏休みを棒に振って可溶化と電気泳動の条件を決定したのは、今振り返っても良い思い出である。因みに我々の方法とは独立に、Summers らも、ほぼ同時に SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動の方法を確立して、ポリオウイルスの構造蛋白質を分離するのに成功した。なお、我々がファージ粒子中に存在することを見つけた新しい蛋白質は、それ以前に Zinder のグループが遺伝学的な解析から予見していたマチュレイション蛋白質（現在では A 蛋白質と呼称されている）であることが判明した。

その後、私は MS2 ファージのゲノム (RNA) 上の 3 種の遺伝子の位置の解析を始めた。MS2 の RNA を RNase T1 で低温 (0 度) で限定分解し、得られた断片をメッセンジャー RNA にして in vitro 系で蛋白質を合成させ、それを

ゲル電気泳動で解析することによって遺伝子の相対的な位置、つまり (5') コート蛋白質遺伝子—マチュレイション蛋白質遺伝子—RNA レプリカーゼ遺伝子 (3') を決定していったのである。この基本的な考えは、後年、Nathans が制限酵素を用いた SV40 の物理的地図の作成に通ずるものであることを、Nathans がノーベル賞の受賞講演で紹介している。

(第一話 完) — (続く)

スウェーデン便り — (1) —

先日、招かれて王立工科大学の創立 175 周年式典に出席した。国王夫妻ご臨席の下、盛大な式典がストックホルム市庁舎で行われた。名誉学位が格調高く授与され、プログラムの中で < Surprise > と書かれたところまで来ると、生存中の学長 3 人 (現学長と高齢の元学長二人) が紹介され、O sole mio, Love me tender 等、沢山の歌を物凄い調子外れも顧みずに大合唱した。大爆笑とピーピー口笛入りの拍手喝采で迎えられ、アンコール付。日本でこんな状況考えられるだろうか? 勿論、学長を含めて何人かの教授による大学の将来を展望する有意義かつユーモアに富んだ講演もあり、居眠りするのも勿体無い内容であった。なお、この式典は当大学の学生ユニオンが企画、進行したらしい。以上、この地の大学人の奥の深さを感じ入った次第。



カロリンスカ研究所キャンパス内にある日本学術振興会ストックホルム研究連絡センター (2 階) がある建物を背景

プロフィール
1999 年より
日本 RNA 学会会長

志村 令郎

(日本学術振興会ストックホルム研究連絡センター長)

◆ ミーティング報告① ◆

マドリッドの三足鳥

白石英秋 (京都大学大学院生命科学研究所)

この夏、スペインのセビリアで開催されたアラビドプシス・ミーティングに参加して来た。このところいろいろなモデル生物でRNAがらみの新発見が相次いでいるが、アラビドプシスでも、最近RNAの研究史に残るような重要な発見がいくつか為されている。中でも有名なのは、ARGONAUTE1 (AGO1) の発見であろう。*argonaute1(ago1)* 突然変異体は、最初、花の器官や葉の背腹軸が失われた突然変異体として分離された。特に、花を構成する各器官が棒状の形態に変わっており、花の外形がまるでイカのように見えることからこのように名付けられたものである ("argonaut" は、殻を持ったイカの種類)。発見された当初は、この遺伝子の産物の生化学的な機能は不明であったが、別のグループが post-transcriptional gene silencing (PTGS) の抑制突然変異体を分離したところ、それが *ago1* の突然変異体であることが判明し、この遺伝子の産物が PTGS に関与していることが明らかになった。さらに、動物では AGO1 に相同性を持つ遺伝子が RNAi に関与していることが判明し、植物の PTGS と動物の RNAi が進化的に深い関係にあることが示されている。

このように、動物と植物の研究が並行して進められ、両者がよく似たセットの遺伝子群を利用して、いかにして異なる体制をつくりあげているのかが最近つぎ

つぎと明らかにされてきている。RNA 研究からは話題が離れるが、今回ミーティングに参加する途中で立ち寄ったマドリッドでは、動物と植物の変異体の不思議な相同性と、それら変異体に対する人間の感性の、文化を越えた類似性を実感する機会があったので、それについてちょっと紹介してみたい。

セビリアは飛行機の乗り継ぎの便があまり良くないので、マドリッドから出る高速鉄道を利用してセビリア入りすることにした。朝、電車が出る前に少し時間があつたので、駅の近くのソフィア王妃芸術センターに寄ってみることにした。ここは現代美術を中心にしたコレクションを所蔵しており、特に、ピカソのゲルニカを所蔵しているので有名である。ところが、建物に入ってみると中は迷宮のようで、どこにゲルニカが展示されているのかさっぱりわからない。電車が出るまでに時間があまりなかつた焦りもあつて、落

生物学の進展にもなつて、昔の文献にあらわれる、祥瑞生物などの奇形が生じる遺伝的・生理学的な背景も、これから少しずつわかってくるのではないかと密かに期待している

ち着いて場所を確認する余裕がなく、結局、エレベーターに乗ったり降りたりして同じ場所をぐるぐる回るのはめになってしまった。ゲルニカを探し回っている途中、ある展示室の一角に、2体が融合したいわゆる「シャム双生児」のような動物の剥製が展示してあるのに目をひかれた。種名はわからないが熊の仲間のようで、珍しいので剥製にされてソフィア王妃芸術センターに収蔵されたものようである。何度かその前を通るうちに、その動物のシャム双生児の脇に、ハトとニワトリの剥製が置いてあるのに気がついた。何の変哲もない鳥の剥製である。このようなものがなぜ展示してあるのか不思議に思い、近づいて見てみたが、やはりただのハトとニワトリである。時間が無いのでまたゲルニカを探す旅(?)に出たが、しばらくすると、またその剥製のある場所に出てしまった。電車が出る時間が近づいてきたので、そろそろゲルニカを見るのはあきらめて駅に向かおうと思いつつ、剥製の前で少し休もうと腰をかがめて、ふとそのハトとニワトリの剥製の下の方を見て驚いた。なんと、そのハトとニワトリは、2本の足のちょうど真ん中に、どちらも三本目の足が生えているのである！三本目の足は形態的には正常な足とほとんど変わらないが、折り曲げた形になっているので、腰をかがめて下からのぞきこまないと見えなかつたのだ。

この三本足の鳥を見て仰天してしまった。それは、足が三本あることに驚いたというより、三本足の鳥の奇形が実際に存在することに驚いたのである。古代中国では、太陽の中に三本足のカラス(三足鳥)がおり、月には蟾蜍(せんじょ。ヒキガエルのこと)がいると考えられていた。例えば、後漢の王充(A.D.27~91頃)の『論衡・説日』にも、三足鳥と蟾蜍の記述がある。また、三足鳥の出現は、瑞兆とも考えられていた。唐の時代の『唐書百官志』に、当時瑞兆と考えられていたさまざまな動植物のリストが掲載されているが、これを見ると、瑞兆は「大瑞」、「上瑞」、「中瑞」、「下瑞」と、大きく4つのグループに分類されており、三足鳥は「上瑞」に分類されている。瑞兆のリストには、神馬(翼のある馬)や麒麟のように想像上の動物も含まれているが、白象や白狼、白雉のように、実際に出現

したであろうアルビノの動物なども含まれている。このような思想は古代の日本にも伝えられており、例えば、玉虫厨子の須弥山図には三足鳥と蟾蜍のモチーフが描かれている。また、天皇の即位や元旦朝賀の儀式の際には、太陽の中に三足鳥、月の中に蟾蜍が描かれた幢（はた）が立てられる。さらに、平安時代の歴史書である『続日本紀』などを見ると、非常に頻繁に、アルビノなどの祥瑞動物の献上記事が見られる。これまで、三本足のカラスは神馬や麒麟などと同じく想像上の生物と考えられてきたが、ハトやニ

ワトリで三本足の奇形が実際に存在するところをみると、あるいは、むかし実際に三本足のカラスが見つかったことがあり、それがさまざまに言い伝えられて、いつの時代かに太陽の精やら瑞兆やらと言われるようになったのかも知れない。『唐書百官志』の瑞兆のリストを眺めてみると、「大瑞」として、「六足獣」というものも記載されている。これは、もしかすると、ソフィア王妃芸術センターの三本足の鳥の脇に置いてあったシャム双生児のような奇形動物ではなかったか…。

このように器官の数が増えた奇形は植物にも存在しており、古代にはそのような植物の出現も瑞兆と考えられていた。古代の記録によくみられるのは、一つの茎に多数の穂が付いた穀物の形態異常である。このような奇形は多産や豊饒をあらわすものとして珍重され、中国や日本では「嘉禾」と呼ばれて豊作の前兆とみなされていた。日本人の姓の中に「三枝」（さえぐさ）という姓があるが、これも同様の変異植物にちなんでつけられたものと言われている。実は、このような変異はアラビドプシスにも存在している。APETALAI という MADS ボックス遺伝子に突然変異が起こると、嘉禾に類似した表現型があらわれるのである。生物学の進展にともなって、昔の文献にあらわれる、祥瑞生物などの奇形が生じる遺伝的・生理学的な背景も、これから少しずつわかってくるのではないかと密かに期待している。

さて、このように、マドリッドでは予期せず面白いものを見ることができた。ゲルニカも最後にようやく見つけられたものの、こちらは時間が無くてろくに見ることはできず、大急ぎで建物を出てセルビア行きの電車に飛び乗り、アラビドプシス・ミーティングに向かった。アラビドプシスでは、最近、花芽の誘導の際に複数の RNA 結合タンパク質が重要な役割を果たしていることが報告されている。ミーティングでは、花芽誘導に関与する RNA 結合タンパク質のうちの一つ、FCA の発現が、選択的スプライシングによって調節されていることが報告されていた。現在のところ、植物における RNA を介した遺伝子発現調節の研究は非常に限られたものしかおこなわれていない。しかし、アラビドプシスのゲノムプロジェクトが完了した結果、高等植物でも動物と同様に、RNA を介したさまざまな遺伝子発現調節がおこなわれていることが示唆されている。例えば、アラビドプシスには RNA 認識モチーフを持つ遺伝子が 392 種類存在するが、これは、線虫の 137 種類、ショウジョウバエの 283 種類よりも数の上ではまさっている。植物では、RNA を中心にした研究はこれまであまりおこなわれていなかったが、おそらく動物と同様に、形態形成やシグナル伝達のさまざまな局面で、RNA を介した遺伝子発現調節がおこなわれているものと考えられる。筆者も、そのような現象の解明に少しでも貢献できたらと考えている。



上は、穂の先端が複数に分かれた粟の一種（『本草図譜』より）。下は、『延喜式』の「治部・祥瑞」の項。「三足鳥 日之精也」という記述がみえる。『延喜式』は、律令を補足した施行細則のようなもので、延喜 5 年（905）に編纂が開始され延長 5 年（927）に完成した。



セビリアの国際会議場前で

プロフィール

1988年京都大学大学院博士課程修了（指導教官、志村令郎教授）。基礎生物学研究所助手、京都大学理学部助手・講師を経て、1999年より現所属。助教授。

白石英秋

（京都大学大学院生命科学研究所）

◆ ミーティング報告② ◆

国際 RNA 学会に参加して

齋藤 都 暁（神戸大学自然科学研究科）

「元気があれば、なんでもできる」がモットーの坂本研の齋藤です。こんにちは。今年の5月末から一週間ほどアメリカの Wisconsin 大学で行われた国際 RNA 学会に参加してきました。日本にいる諸先輩方と雑談をしていると、「海外の学会は良い刺激になる」とよく言われていたので、果たして実際どのようなものなのか体験してみたいと常々考えていました。そして今年、ある程度結果がまとまってきたという幸運もあり、念願かなって初の国際学会に参加することとなりました。今回は、その時の体験や、学会の様子を書きたいと思います。すでに海外発表を何度も経験されている先輩方にとってはつまらない文章になると思いますが、まだ海外発表をしていない、もしくは、国際学会とはどんな様子なのかを知りたいと思っている前途揚々の若い人たちに（僕も若輩者ですが）、その時の体験や、学会の様子を紹介してみたいと思います。

今回のミーティングの開催地である Wisconsin 大学はア

特に Hentze 博士らのグループによって提唱された potentiation に関する報告に不思議さを感じました。……つまりこれは、転写レベルにおける遺伝子発現変化は、翻訳レベルにおいて更に増強されるということを示唆します

メリカの五大湖から南西に位置する酪農や農業が盛んな都市にあります。気候は、「地球の歩き方」によると、学会が催される6月は、だいたい日本の5月くらいの気温だと書いてありました。それを信じて、日本から厚手の服を何枚か持っていったのですが、実際行ってみたら異常気象とのこと。真夏の暑さくらいで、昼に黙って外にいと、暑さのために頭がボーっとしてくるほどでした。大学は湖のほとりにあり、学会はその湖の近くがメイン会場となっています。第一日は welcoming reception と一つのセッションがありました。セッションの前に、口頭発表は時間厳守との注意があり、ひととおり時間を知らせるブザーの説明があった後、「さらに時間を過ぎた場合は、退場して頂くこととなります」と言った後に、言った本人が引田天功のように、パッと姿を消してました。これには会場中が大ウケでした。これがユーモアというものでしょう、なかなか手の込んだ演出に感動を覚えました。ミーティングには、Joan A. Steitz や Lynne E. Maquat, Harry Noller, Adrian Krainer など、この名前聞

いたことがあるという人達を目のあたりにできました。しかもコーヒブレイクなどでは、いつのまにか隣にいるということもあり（さすがに話はできなかったが）、これが本物かあ、といういたって新参者っぽい感動をしていました。

二日目からは本格的に朝からセッションがあり、昼にポスターセッション、夜にまたセッションと英語づけの生活が始まりました。セッションの構成は例年と同様なようで、Ribozyme や構造, mRNA の代謝経路などの分子レベルの機能解析や、RNAi, 発生, 疾病など高次生命現象に関わる RNA の報告まで幅広い分野を扱っており、たいへん参考になりました。特に Hentze 博士らのグループによって提唱された potentiation に関する報告に不思議さを感じました。それは、酵母にある薬剤を加えた時に変化する mRNA 種とポリソームの会合の状態を既知の遺伝子について網羅的に解析した結果 (cDNA アレイと密度勾配遠心によるポリソーム画分の単離と分析)、転写レベルで減少する遺伝子はリボソームの会合状態も減少しており、そのまた逆に、転写レベルで増量する遺伝子は、リボソームの会合も増強されていたというものでした。つまりこれは、転写レベルにおける遺伝子発現変化は、翻訳レベルにおいて更に増強されるということを示唆します(図)。彼らはこの新しい遺伝子発現制御のことを potentiation と名付け、何か未知の制御メカニズムが存在するのではないのかという報告をしていました。なぜ、核内の DNA 上に結合する様々な蛋白質によって生じる転写効率の変化が、細胞質における mRNA の翻訳の効率、それもリボソームの会合状態にどのような分子機構でつながるのかと考えると、非常に不思議な知見で、しばらくどんな機構が考えられるのかと想像を張り巡らせていました(残念ながら、想像すれども…でしたが)。また、miRNA



会場近くにある湖のほとり。夕方から人がたくさん集まり、憩いの場となっている。

や RNAi を使った他の遺伝子の解析報告が山のようにあったことにも驚きました。このようにして、世界の研究のスピードをまざまざと体感し、出発前に先輩から聞いていた「刺激を受けるよ」の意味を多少の心の痛みと共に、はつきり理解できたのでした。

口頭発表に関しては、英語が十分聞けなくても、図や表など順を追って話が進んでいったので、なんとかできるのですが、ポスターセッションの場合、常に聴衆がいるので、図は見にくかったり、早口だったりとなかなか理解できずに困りました。前回の本冊子における前田博士の文章「英会話上達指南は至難？」にも書いてありましたが、英語を流暢に話す他の外国人に割って入って質問することは非常に難しく、興味があっても図を眺めておしまいになる場合

が多かったように思います。こんな時、英語初心者と感じている人は、ポスターの発表が行われる前に貼ってあるポスターの図をあらかじめ熟読して質問を用意していくといいかもしれません。実際、僕らもそうしたのですが、内容をあらかじめ知っている分、質問もしやすく、相手の返答も聞きやすくなりました

が多かったように思います。こんな時、英語初心者と感じている人は、ポスターの発表が行われる前に貼ってあるポスターの図をあらかじめ熟読して質問を用意していくといいかもしれません。実際、僕らもそうしたのですが、内容をあらかじめ知っている分、質問もしやすく、相手の返答も聞きやすくなりました。ぜひ試してみてください。また今年はポスターが各分野ごとに分かれていたので、効率良く興味あるポスターを探すことができました。

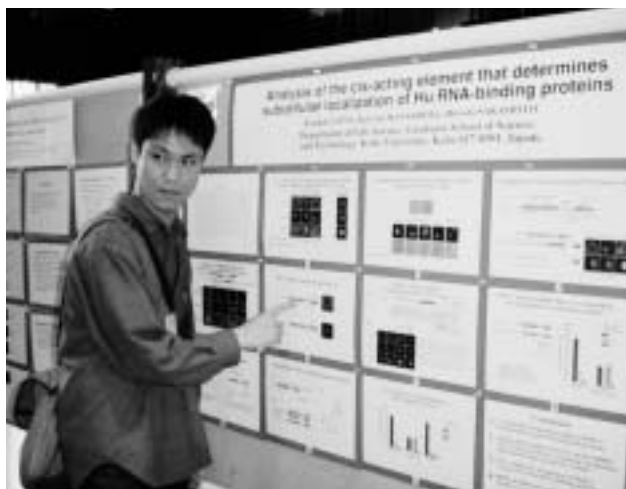
発表を聞くのは、受け身なのでいつでも逃げることはできるのですが、発表をするとなるとそうはいきません。だんだん発表の日が近づくにつれて憂鬱な気分になってきました。出発前はまだ張り切っていたのですが、学会に来て、他の人達のディスカッションするときの会話の早さを知ってしまったために僕のテンションは下がりっぱなしでした。僕の研究室からは、海外での学会を経験していない3人が参加しました。3人共ポスター発表で、学会への出発前日まで念入りに英語のプレゼンの練習をしていました。3人もいれば、誰か一人くらい英語をまともに話せる人がいそうなものですが、僕らは全く話せない三人組でした。旅行英会話程度なら、なんとか伝わるものの、英語でのディスカッションなんてできるのか、という不安でいっぱい、こんな憂鬱な気分の中でも、発表の時間は残酷に近づいてきます。遠くから眺めていると時間前なのに、すでに何人か僕のポスターの前にいました。そんなに早く来なくてもと思いつつ、時間が来たので、「伝わればいいじゃー」と開き直り、気合いを入れて、すでに何人かいるポスターの前に立ちました。ポスターの前に立つと早速、説明してくれとのことなので、練習の通りに一通り説明し、質疑応答となりました。それからは、休みなく人が入れ替わり立ち替わりで、声もたえだえになりながら説明と質問に答えま

した。結局ポスター発表の終了時間を30分すぎた所で(半分くらいのポスターは撤収されていた), ようやく誰もいなくなつて一安心となりました。

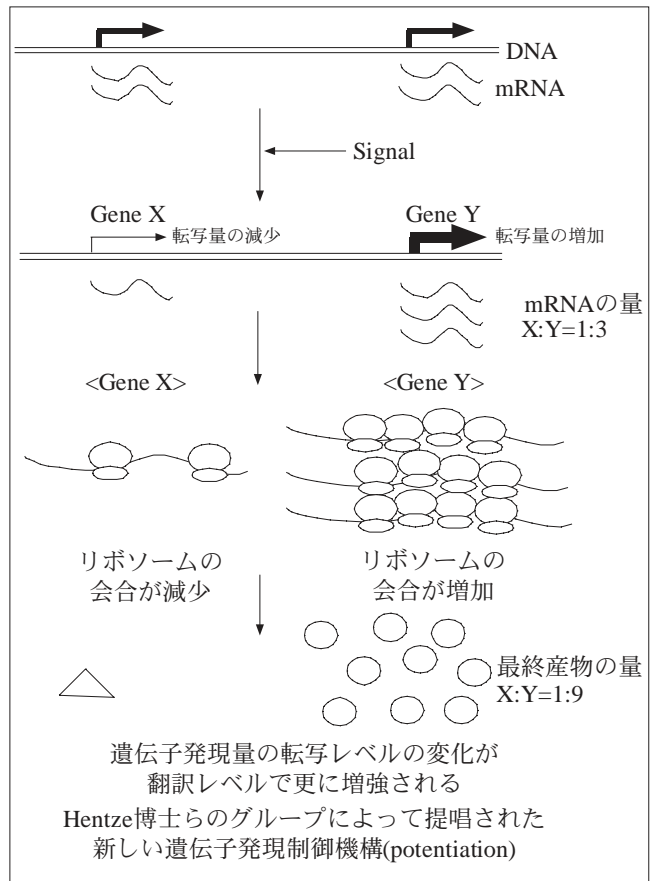
終わってみると早いもので、発表前の不安はどこへやら、という感じでした。発表の時は、確かに聞き取りにくく、何度も質問を聞き直したりしてしまいましたが、相手側もこちらがしゃべられないことを理解しているためゆっくりとした口調で話してもらえます。また、プレゼン途中に「good!」「wonderful!」「excellent!」などという受け答えがタイミング良く入ってくるので、だんだんとテンションが上がっていきました(のせられるので、余計なデータを言わないよう注意!)。今回の発表で、「なんでも気合いだよ、気合い!」というウチのボス(坂本 博)の言葉の意味が良く分かった気がしました(最初は気合いでなんでも解決できたら楽やん、とか思っていました)。

国際学会に参加して、もう一つ気づいたことは、色々な方々と話をする機会が得られるという点です。今年のミーティングには、日本のRNA学会と日程的に近いためなのか、日本からの参加者が少なかったように思いました。ですが、それがかえって良かったのか、普段話す機会のないような方々と話をすることができました。もし、色々な知り合いを作りたいと考えているなら、このような機会を有効に活用すればいいかもしれません。

最後に英会話で恥ずかしい体験話を一つ。学会会場近くにスーパーマーケットらしき店があるのですが、暇になったら良く行ってました。何をかうわけでもなく店内をぐるぐる廻っていると、店員らしき人に不審者と思われたのか「What are you doing? (おまえ何やってんだ?)」と聞かれました。そこで何を勘違いしたのか、「How are you?」と言われたのか思い、「Fine」(これまた馬鹿な応答、普通の会話では使われないらしい)ととっさに答えてしまいました。その後店員は、コイツ危ないとしても感じたのか、げげんな顔をしながら去って行きました。言うまでもないですが、これは恥ずかしかったです。この時でしょうか、恥をかくのは当然、と開き直るきっかけになったのは、おそらくこの経験がポスター発表の時の開き直りに生かされたのかもしれません。たぶん、こんな僕でもなんとか発表し、帰って来られたので、他の英会話に自信がない人もなんと



いかにも発表しているかのような写真(筆者)。まだ人が来ない朝に記念写真を撮った。聴衆はいないので余裕の表情。



かやっているといます。要は、気合い、ですね。

最後に一言。「この道をゆけばどうなるものか 危ぶむなかれ 危ぶめば道はなし 踏み出せば そのひとあしが道となり そのひとあしが道となる 迷わずゆけよ ゆけばわかるさ… (A. 猪木氏の言葉)」まさにその通り。国際学会の紹介をつらつら重ねてきましたが、まずは行って見て直に体験してみましょう。

プロフィール

山形大学理学部卒業後、1999年神戸大学大学院自然科学研究科博士前期課程に入学。現在、同博士後期課程2年の大学院生。

齋藤 都 暁

(神戸大学自然科学研究科)

◆ ミーティング報告③ ◆

Translation Control in Cold Spring Harbor Laboratory 2002

藤原俊伸 (東京大学医科学研究所)

Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) は DNA の二重螺旋構造を解き明かした Watson & Crick の James Watson の研究所です。また、我々が日々実験を行うにあたり必要不可欠な Molecular Cloning を代表とする Manual 等も数多く出版しています。CSHL は、1890 年に設立され、J. Watson の他、7 名のノーベル賞学者を輩出した私立の非営利研究・教育施設です。驚くべき事は、運営資金の半分以上は民間の寄付金によりまかなわれているということです。このように非常に有名な研究所であり、よく Cold Spring Harbor で行われるセミナーコースや学術集会のポスター（ヨットが浮かんでいるあのポスター）を目にすることはありますが、私はそれがアメリカのどこにあるかということに恥ずかしながら知りませんでした。JFK 国際空港からタクシーに乗ること約 1 時間、CSHL はロングアイランドの中央北に位置する、静かな入江と森がある風光明媚な別荘地の中にありました。研究所といっても、正面こそ大きなホールがあるものの、敷地内はいわゆる海外の普通の家が点在するばかり。「どこで実験やってんねん」と思い、近くに行くと窓を覗いてみると、中は実験室だったりします。研究所の奥まで進んでいくと、J. Watson の家があり、その裏手にはたいへん水が綺麗なプライベートビーチもあり、日本では天然記念物になっているカブトガニや小魚がたくさんいます。

翻訳研究は、基本因子や基本反応の解析から制御システムの研究へと進展し、ポストゲノム時代における遺伝子発現の要とされるようになってきました。それは、癌、発生、分化などの高次細胞機能においても mRNA の動態や翻訳制御プログラムが重要な働きをすることが明らかとなってきたからにはかありません

私が参加した Translation Control は 2 年に 1 回開催され、今回は 2002 年 9 月 10 日から 15 日にかけて開催されました。205 名の参加者を集め、ホールの椅子に座りきれなかったり、青空ポスター状態の演者もいるほどの盛況ぶりでした。学会の形式は当然ながら朝 9 時から夜 11 時過ぎまで続くいわゆる Cold Spring Harbor 方式です。4 題のレクチャー、94 題の口頭発表が 6 日間に渡って行われました。2 日目のポスターセッション後には J. Watson の家の庭で Wine party があつたり、最終日前日の夜には、CSHL に寄付をされている大富豪を招いて若手ピアニストの演奏会も開催されました。

宿泊施設、食事等について触れておきます。学会参加費は宿泊費、食事代が含まれていますが他の国際学会と比較すると割高です。以前よりずいぶん改善されたそうですが、食事はとても満足なものではありません。まず日本人の口には合いません。まずいです。郷にいれば郷に従えですが、近くにコンビニなど有るはずもなく、日本食至上主義の方には日本食の持ち込みをお勧めします。宿泊施設は研究所内にあります。中村先生はそこに泊まれたのですが、私および同行のポスドクは車で約 30 分も離れた所にあるホテルに廻されてしまいました。我々だけではなく、多数の参加者が周辺にあるいくつかのホテルに宿泊していました。基本的に所内も所外の宿泊施設も部屋は相部屋となります。さて、今回私が Translation Control にどうしても参加した

かった理由は幾つか有るのですが、その中の 1 つは私が最初に携わった研究テーマがどこまで行き着いたかを見るということでした。私が翻訳研究に足を踏み入れたのは今から 7 年前、学部の学生として名古屋市立大学薬学部・水谷隆治先生のもと、哺乳類のセレノシステイン取り込み機構の研究に携わった時です。セレノシステインは通常、オパールコドンと呼ばれる UGA 終止コドンにより直接コードされる 21 番目のアミノ酸として同定されました。21 番目のアミノ酸？終止コドンが翻訳される？当時(今もかも)何の知識もなく、体育会一筋の私の筋肉

頭でも大変魅力的なテーマであることが感じられました。そのころ、大腸菌におけるセレノシステイン取り込み機構はドイツの A. Böck らにより遺伝学および生化学的に解析されればば解明されようとしているところでした。彼らの文献を読み、目に飛び込んできたのはあまりにも巧みなセレノシステイン取り込みの戦略でした。セレノシステインに関することが記述されるのは希なので、せっかくの機会を利用していただき、その翻訳メカニズムを簡単に書きたいと思います(図 1)。セレノシステイン専用の tRNA^{Sec} は、セリンのアイソアセプターで、まずセリン tRNA 合成酵素によってセリンが付加されます。その後、2 種類の酵素の働きでこのセリンが tRNA^{Sec} に結合したままセレノシステインに変換されます。そしてできあがったセレノシ

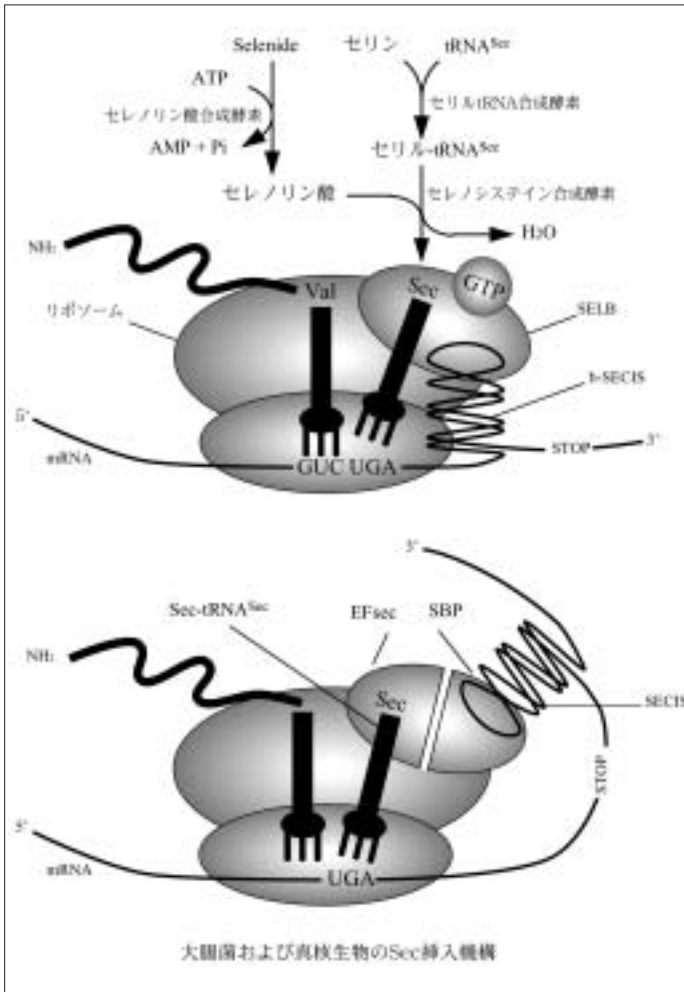


図 1

ステイン tRNA^{Sec} (以下 Sec-tRNA^{Sec}) は通常の翻訳伸長因子 EF-Tu には認識されず専用の伸長因子 SELB によって認識されます。SELB は他のアミノアシル tRNA に結合しないだけでなく、アミノ酸部分を識別し、Sec-tRNA^{Sec} に変換されていないセリン tRNA^{Sec} は認識しません。従って、UGA にセリンが挿入されることはありません。さらに、SELB は b-SECIS と呼ばれる UGA コドン直後に存在するループ部分に結合し Sec-tRNA^{Sec}-SELB-GTP-b-SECIS 複合体を形成し、UGA をほぼ 100% の効率でセレノシステインへと読み替えます。高等動物の場合、セレノ蛋白 mRNA には UGA 直下のステムループ構造は存在せず、3' 非翻訳領域にあるステムループ構造が SECIS としてセレノシステインへの読み替えを指定します。水谷先生らにより、SELB に相当する因子以外は見出されていましたが、SELB だけは未発見でした。その巧妙なメカニズムに胸をときめかせ、「よっしゃ〜、哺乳類の SELB 見つけたる！」と意気込み、牛の肝臓をすりつぶし、蛋白を抽出しカラムとの格闘が始まりました。そして、Sec-tRNA^{Sec} を認識する因子と SECIS を認識する因子は違うのではないかという仮説を立て、これを証明し、論文を書いて投稿しましたが相手にされず、苦勞したのも今はいい思い出です。その後、私の仮説通り高等動物

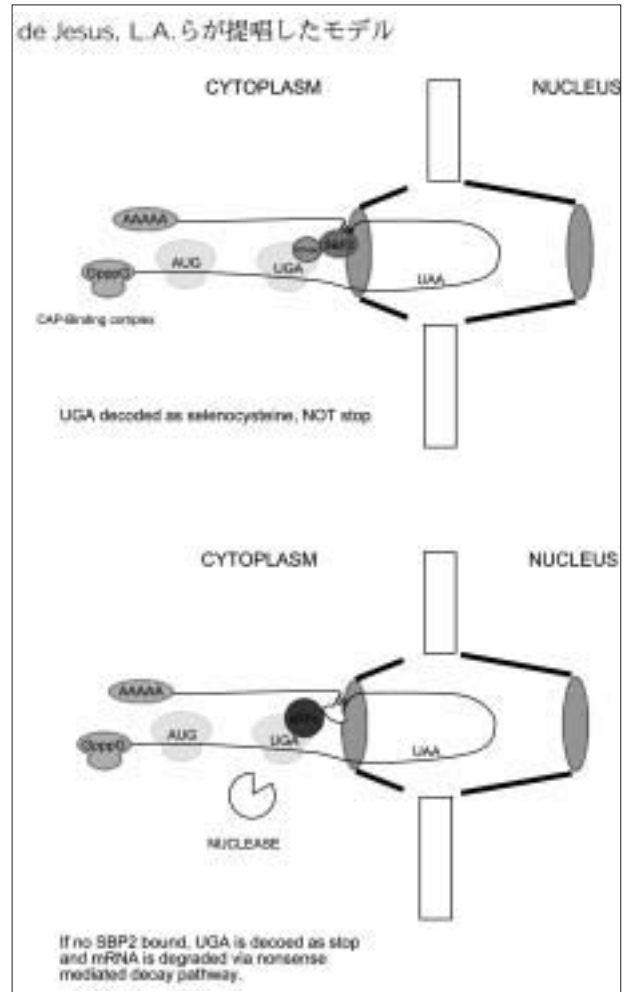


図 2

の場合、SELB (EFsec) ≠ SECIS 結合蛋白質 (SBP2) であることが完全に証明され今日に至っています。次のステップは UGA コドンをもつセレノ蛋白 mRNA がどのようにして NMD (nonsense mediated decay) を逃れているかと言うことでしょう。実際今回 M. Berry のグループ (de Jesus の発表) により、SBP2 は核内で mRNA と結合し、NMD を回避させていることを示唆する結果が報告されました (図2)。当時思いついてもどうすれば実験で証明できるかわからなかった事が次々と明らかになっており感慨深い思いでした。

さて、今回、翻訳に関わる研究者がこれほどまでいるのかと驚いたのですが、1990年代は翻訳機構を主題とする研究者は少数となっていました。私が学会デビューした1995年度の分子生物学会年会の抄録 (大事にとってある) を見ても極僅かなのが確認できます。それが何故今翻訳研究が一躍花形研究の1つとして脚光を浴びているのか? かいつまんで翻訳研究の歴史を振り返ってみたいと思います。S. Ochoa (1959年ノーベル生理学・医学賞受賞) が単一ポリマー RNA や、混合ポリマー RNA を合成するのに成功したのが今から47年前、M. W. Nirenberg (1968年ノーベル生理学・医学賞受賞) が poly(U) を合成し、UUU がフェニル

アラニンをコードすることを発見したのが41年前のこと。その後、H. G. Khorana (1968年ノーベル生理学・医学賞受賞)が塩基配列の決まっているRNAの人工合成に成功し、蛋白質のアミノ酸配列決定により、遺伝暗号表のコードが各アミノ酸に正確に対応していることを証明しました。1961年にNirenbergが試験管内での蛋白質合成に成功した手法などは今でも有用なテクニックとして応用され、活用されています。そして、1968年の終わり頃ようやく64通りの暗号解読が完了し、それから40年余りが経過した現在、翻訳研究は、基本因子や基本反応の解析から制御システムの研究へと進展し、ポストゲノム時代における遺伝子発現の要とされるようになってきました。それは、癌、発生、分化などの高次細胞機能においてもmRNAの動態や翻訳制御プログラムが重要な働きをすることが明らかとなってきたからにはほかありません。また、にわかには翻訳研究が注目されるようになった理由にはリボソームの立体構造が解明されたことが挙げられるでしょう。リボソームの機能・構造に関する研究は、初期には生化学的な手法が中心となり進められました。やがて遺伝子工学が実用化され、RNAやタンパク質の構造解析法にも画期的な進歩をもたらし、生体高分子の立体構造を基にしてその機能解析を目指す構造生物学という領域が確立されました。そして、複雑な高次構造を持ち、長らく翻訳研究最大の障壁であり続けたリボソームの立体構造が視覚的に明らかとなり、これまでに

積み重ねられてきた遺伝学・生化学のデータが一目のうちに検証できるようになりました。これから先の翻訳研究の指針を決める上でもその恩恵は計り知れません。このように翻訳研究は分子遺伝学的、構造物理学的に展開され、翻訳機構の生物種による多様性など、研究の厚みが増しました。

今日、様々な生物のゲノムプロジェクトが進み、国をあげたビッグサイエンスとして遺伝子機能の解明を行う時代に突入しています。それを反映してか、今回の Translation Control には疾患と絡んだ内容の発表が目立ち、「メカニズムを解明した」という内容のものは殆ど有りませんでした。かつて、国際リボソームミーティングや tRNA Workshop など「うわ〜、マニアックやなあ」と感嘆させてくれた演題が何題もあったのとは対照的でした。

翻訳の基本因子や基本反応にはまだまだ未解明な部分が多数残されており、解明されたと思われていたものも存在します。中途半端なところで置き去りにされているものもあります。私が携わったセレノシステイン取り込み機構も Ribosome Recycling Factor もそうでした。そのような分野にも今後スポットライトが当たることを期待したいと思います。



カンファレンスディナーにて
左より、中村（東大医科研）、筆者、小黒（東大医科研）、稲田（名古屋大）

プロフィール

1998年名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程修了
2002年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了、博士（医学）
東京大学医科学研究所博士研究員

藤原俊伸

（東京大学医科学研究所）

◆ ミーティング報告④ ◆

2nd International Yeast Prion Symposium

Mayacamas Ranch, California, USA

August 25th-28th, 2002

Colin Crist

(Department of Basic Medical Sciences,
Institute of Medical Science
University of Tokyo)

The word 'prion' was first used to describe a new infectious agent hypothesized to cause mammalian transmissible encephalopathies (TSEs) by a protein only mechanism. There are several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, which, similar to mammalian prions, are able to undergo an autocatalytic conformational arrangement. Mammalian prions and these 'yeast prions' share many important characteristics (for a review, see Table 1) including an N-terminally located 'prion' domain enabling a structural rearrangement of the protein into insoluble oligomers. These insoluble oligomers are thought to induce the autocatalysis of soluble monomers into the insoluble state, resulting in a growing amyloid fiber that is rich in β -sheet content and resistant to proteolysis. Yeast prions also exhibit 'prion strains' and a 'species barrier', which are phenomena previously described for mammalian prions. Of the yeast prions, the most studied is the Sup35 protein of *S. cerevisiae*, which is a subunit (eRF3) of the eukaryotic polypeptide release

How $[PSI^+]$ arises spontaneously and then propagated faithfully is an interesting enigma of prion biology

factor and essential for accurate translation termination. The Sup35p N-terminal 'prion domain' is similar to that of the mammalian prion as both are unstructured domains containing at least five oligopeptide repeats that are necessary for the efficient propagation of the prion state. The N-terminal of Sup35p has the additional characteristic of being extremely rich in the polar residues glutamine and asparagine, which is reminiscent of polyglutamine repeat disease proteins (ie/ huntingtin, α -synuclein) seen in mammals. Unlike mammalian prions, the 'prion' state of Sup35p (termed $[PSI^+]$) does not generally kill cells. Rather, it reduces the fidelity of translation termination at the ribosome and thereby suppresses nonsense codons (Figure 1).

From August 25th to the 28th, yeast and mammalian prion researchers from around the world gathered amidst the beautiful setting of the Mayacamas Ranch in California's Napa Valley for the 2nd International Yeast Prion Symposium. Many new and important insights in yeast prion biology have been discovered in recent years. New data now demonstrate how yeast prions arise spontaneously at low frequency and, once established, how they are stably maintained from cell generation to generation through the action of an unlikely partner, heat shock protein 104 (Hsp104p), a "protein disaggregase" (Figure 2). Other major issues under investigation include the 'prion curing' action of millimolar concentrations of guanidium hydrochloride (GuHCl), molecular dissection of the remarkable sequence characteristics of yeast prions, the existence of a 'species barrier' amongst yeast prions,

Table 1. Similar and divergent features between mammalian PrP and yeast $[PSI^+]$.

| Trait | PrP | Sup35p |
|--|-----------|-------------------------|
| Function of protein | unknown | translation termination |
| Localization | membranes | cytosol |
| Prion domain rich in polar residues | no | yes |
| Prion domain has oligopeptide repeats | yes | yes |
| Multidomain protein | yes | yes |
| Poorly structured N-terminal domain | yes | yes |
| <i>in vitro</i> fiber formation | yes | yes |
| Amyloid fibrils resistant to proteolysis | yes | yes |
| "Infectious" protein aggregates | yes | yes |
| "Prion strains" | yes | yes |
| "Species barrier" | yes | yes |

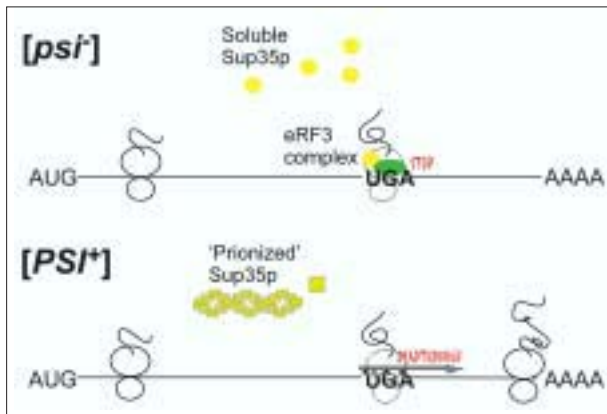


Figure 1. In the $[psi^-]$ state, Sup35p of *S. cerevisiae* is soluble and binds to Sup45p to form the translation termination complex eRF3, essential for accurate translation termination when the ribosome reaches a stop codon. In the $[PSI^+]$ state, soluble Sup35p has been converted to an insoluble aggregate causing ribosomes to fail to stop at the stop codon. It has been suggested that phenotypic diversity may be mediated by the $[PSI^+]$ suppression of nonsense mutations.

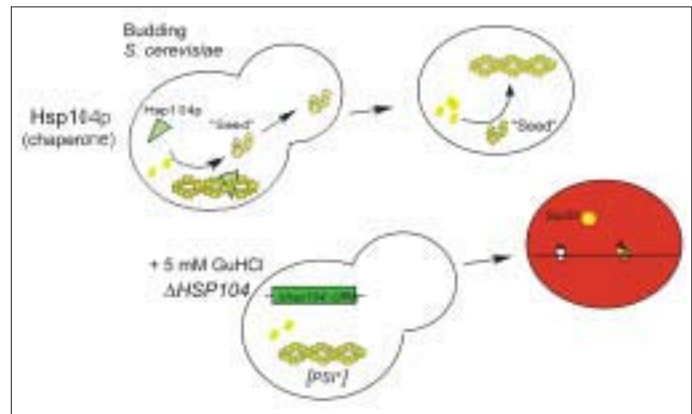


Figure 2. Hsp104p is essential to propagate $[PSI^+]$. Active Hsp104p acts as a 'crowbar' on the growing $[PSI^+]$ aggregate to create $[PSI^+]$ 'seeds' for rapidly dividing yeast cells. When Hsp104p is inactivated by mutation or by the addition of millimolar concentrations of guanidine hydrochloride, no seeding activity occurs and the growing aggregate is simply diluted out of the culture.

and the biological role of 'prionization' - an epigenetic means to provide phenotypic change. Since many of this year's presentations described new data about these interesting topics of yeast prion biology, the symposium proved to be a timely event to gather and discuss current research as well as future perspectives. This year's symposium was organized by Jonathan Weissmann (Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco). Due to the relatively small number of participants in this meeting, the format for the symposium allowed for most of the participants to provide a 20-minute presentation, as well as providing time for informal discussion and activities.

$[PSI^+]$ arises spontaneously in *S. cerevisiae* at a frequency of about 10^{-6} . How $[PSI^+]$ arises spontaneously and then propagated faithfully is an interesting enigma of prion biology. Susan Liebman (Department of Molecular Genetics and Cell Biology, University of Chicago, Illinois) discussed ongoing research in her laboratory on the mechanism of *de novo* generation of $[PSI^+]$. Work in Dr. Liebman's laboratory has been instrumental to discover that the *de novo* generation of $[PSI^+]$ requires another pre-existing prion called $[PIN^+]$ for ' $[PSI^+]$ inducer' and that $[PIN^+]$ is the 'prionized' version of Rnq1p protein (function unknown). $[PIN^+]$ shares many characteristics with other yeast prions, most notably is the existence of an N-terminally located 'prion domain' rich in Gln and Asn residues. Currently, there are two models for $[PIN^+]$ interaction. First, in a 'seeding model', $[PIN^+]$ aggregates may 'seed' the conversion of Sup35p to $[PSI^+]$ through a direct interaction. This model was further supported by work in Susan Uptain's laboratory (Department of Molecular Genetics and

Cell Biology, University of Chicago, Illinois) showing that, *in vitro*, Rnq1p fiber preparations could 'seed' the formation of fibers from purified Sup35p prion domains. The second 'titration model' suggests that preexisting $[PIN^+]$ aggregates may 'titrate' available chaperones, allowing Sup35p to adopt the alternate conformer and establish $[PSI^+]$. By sharing current data and discussing these possibilities, it was generally accepted that available evidence points to the first model, although the second model has not been ruled out.

Once $[PSI^+]$ and other yeast prions are established, how they are faithfully propagated is also a key question in prion biology. This topic was introduced in detail by Brian Cox (Department of Biosciences, University of Kent, England), who discovered $[PSI^+]$ as an aberrant genetic element inherited in a non-Mendelian manner, over 30 years ago. Dr. Cox discussed the biological importance of 'seeding' in yeast prion propagation. Once the $[PSI^+]$ phenotype is established in a cell, the growing aggregate may act to induce soluble Sup35p to adopt the $[PSI^+]$ conformer and join the growing aggregate. The process is rapid, with little soluble Sup35p detectable in $[PSI^+]$ cells. Thus, large growing aggregates need to be 'disaggregated' to produce 'seeds' for rapidly dividing yeast cells. Ongoing work in Dr. Cox's lab has established the necessity for 'seeding' prions for future cell divisions, that 'seeding' activity is likely caused by the activity of Hsp104p and that GuHCl is a potent inactivator of Hsp104p activity (Figure 2). By determining the number of generations it takes to remove all $[PSI^+]$ cells from a culture after the addition of GuHCl (ie/ inactivation of Hsp104p), Dr. Cox's group has established that there are, on average, 64 functional seeds per cell. These revelations were supported by

additional presentations. Frederique Ness of Mick Tuite's lab (Department of Biosciences, University of Kent, England) presented data showing that the addition of GuHCl prevented the generation of a prion 'seed' but not prion protein aggregation. These findings suggest a two-cycle model for 'prionization': 1) a GuHCl-sensitive replication of prion seeds followed by 2) a GuHCl-insensitive process to convert seeds to larger aggregates. In addition, Vitaly Kushnirov (Institute of Cardiology Research, Moscow, Russia) presented creative differential centrifugation-native PAGE experiments characterizing the components of Sup35p aggregates and providing further evidence that Sup35p prion aggregates are composed of smaller Sup35p oligomers fragmented by Hsp104p. Although it has been known that Hsp104p activity is important for the stability of yeast prions for many years, the true action of Hsp104p remained a mystery until recently. Thus, it is timely to find that many different experimental evidence suggests that Hsp104p provides a crucial 'seeding' role for $[PSI^+]$ propagation.

The prion forming domain of yeast prions have several interesting characteristics including it's extremely high content in the polar residues glutamine and asparagine, and the existence of tandem oligopeptide repeats, analogous to mammalian polyglutamine diseases and prion (PrP) protein, respectively. Much work has been emphasized on the molecular dissection of this domain. Yoshikazu Nakamura (Department of Basic Medical Science, Institute of Medical Science, University

of Tokyo) discussed leading research in his laboratory on defining the sequence that provides a species barrier in yeast prion biology. Work in Dr. Nakamura's laboratory has been instrumental to show that although Sup35p prion function is conserved among distantly related yeasts, a 'species barrier' inhibits prion induction between Sup35ps from different yeast species, which is a further property shared by mammalian prions. However, two species of yeast show susceptibility or cross-transmissibility beyond the species barrier and thus serve as useful tools for investigation of the species barrier. To

identify Sup35p's molecular determinant of the 'species barrier', work in Dr. Nakamura's laboratory has used extensive chimeric studies between the prion domains of *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* showing that the species barrier lies in a short segment of Gln/Asn rich residues at the N-terminus, defined by residues 1 to 41. Molecular dissection of the prion domain has been further emphasized by ongoing studies in Mick Tuite's lab that have shown

the importance of the oligopeptide repeat domains in the stability of $[PSI^+]$. To identify critical residues for the maintenance of $[PSI^+]$, Dr. Tuite's laboratory has recently investigated polymorphisms in the Sup35p prion domain of 21 different laboratory and industrial strains. These polymorphisms were further characterized by site directed mutagenesis successfully showing that, for example, while residues in the internal oligopeptide repeats (ie/ 3rd repeat) can be changed, the same changes are not tolerated in external oligopeptide repeats (ie/ 5th repeat). This could be a reflection of which oligopeptide

What is the, if any, biological role of 'prionization' in yeast? The $[PSI^+]$ form of Sup35p provides a metastable and epigenetic means to inactivate the role of the C-terminal domain in translation termination



The 2nd International Yeast Prion Symposium was held amidst the intimate setting of Napa Valley's wine country. Yeast prion researchers from around the world gathered at the Mayacamas Ranch, Napa Valley, California. (The author is kneeling on the grass, third person from the right).

repeats are essential for Sup35p-Sup35p protein interactions for $[PSI^+]$.

What is the, if any, biological role of 'prionization' in yeast? The $[PSI^+]$ form of Sup35p provides a metastable and epigenetic means to inactivate the role of the C-terminal domain in translation termination, and this may be of particular interest to RNA biologists. Many informative presentations addressed this issue. Of particular interest was the work presented by Heather True, a talented young scientist in Susan Lindquist's laboratory (Whitehead Institute, MIT, Massachusetts). Dr. Lindquist is a pioneer in yeast prion biology, much of her work has demonstrated phenotypic diversity mediated by the $[PSI^+]$ suppression of nonsense mutations. Heather's work has been instrumental to show that $[PSI^+]$ can convert previously neutral genes (ie/ inactivated by a nonsense mutation) to a non-neutral state and that this is a capacity for genetic variation. Heather's work showed that in the presence of acetate as the sole carbon source, some strains that exhibit the $[PSI^+]$ phenotype were able to grow better than their $[psi^-]$ (soluble Sup35p) counterparts. Colony morphologies also changed in $[PSI^+]$ cells of some strains growing on acetate and this morphology change was reported to be due to the expression of previously silent flocculin genes activated by $[PSI^+]$. This work is the first to describe $[PSI^+]$ as a facilitator of phenotypic diversity and perhaps evolutionary change. Reed Wickner, (Department of Biochemistry and Genetics, National Institute of Health, Maryland) was the first to use genetic criteria to identify the non-Mendelian genetic determinants of $[PSI^+]$ and $[URE3]$ as 'prions' in yeast. Ongoing research in his laboratory includes the microarray analysis of gene expression changes caused by

the prion form of Ure2p ($[URE3]$), a protein involved in the catabolism of nitrogen. It is thought that a similar approach may be used to identify genes that are positively or negatively regulated in the presence of the 'prionized' form of Sup35p and this may provide genomic insight into the biological role of $[PSI^+]$.

In addition to these and many other informative presentations, the beautiful setting of the Mayacamas ranch and the conference schedule provided ample opportunity for informal discussions and activities. Participants of the conference could enjoy swimming, fishing, hiking and canoeing at the ranch. However the highlight of the social activities may have been the winery tours when the rich, full-bodied flavours of Napa Valley's wines were enjoyed amidst the beautiful surroundings of the vineyards. Many of the participants purchased bottles of wine to enjoy at the event's final evening, a truly Californian BBQ followed by a midnight campfire at the Mayacamas ranch.

The final item on the agenda for this years meeting was a discussion about the next prion meeting. Over the last decade, the number of researchers entering this exciting field is growing vastly, and conversely, the number of identified yeast prions has grown while progress towards an ultimate proof of the prion hypothesis in yeast has accelerated rapidly. Due to these factors, and the enormous success of this years meeting, it was decided to increase the frequency of this meeting from the current quadrennial event to a biennial event. The next International Yeast Prion Symposium will be held at a European location in August, 2004.



Pioneers of yeast prion biology. (From left to right: Mick Tuite, University of Kent; Susan Liebman, University of Chicago; Jonathan Weissman, University of California San Francisco; Brian Cox, University of Kent; and Yoshikazu Nakamura, University of Tokyo)

プロフィール

Colin Crist graduated with a BSc in Microbiology from the University of British Columbia in Vancouver, Canada. He obtained his MSc degree in Biochemistry from the University of Tokyo, under the supervision of Professor Yoshikazu Nakamura and he is currently continuing his research in Nakamura laboratory as a PhD student, investigating the role of a unique oligopeptide repeat sequence in yeast prion biology.

Colin Crist

(Department of Basic Medical Sciences, Institute of Medical Science
University of Tokyo)

◆ ミーティング報告⑤ ◆

ダンディー 日誌

神津知子 (埼玉県立がんセンター)

2002年8月23日～27日に、スコットランドのダンディーでEMBOワークショップ「Ribozyme and RNA catalysis」が開催された。オーガナイザーは、ダンディー大学のDavid LilleyとMax Plank InstituteのFritz Ecksteinだ。Ribozymeの発見から今年でちょうど20年目に当たり、この期にこれまでの研究成果と問題点を整理して、新しい展開の糧にしようという趣旨で、Tom Cech, Olke Uhlenbeck, Harry Noller, David Bartel, Peter Mooreなど、RNA研究の中心的研究者が招聘された。

私とRNAとの出会いは、やはり20年前だった。当時DNA複製の研究をしていた。DNA合成をde novoで開始するDNA polymerase活性をマウス細胞で追い求めていたが、DNA polymerase α とprimaseが複合体となり、まずprimaseが10塩基鎖長のinitiator RNAを合成し、そのあとDNA合成をDNA polymerase α にバトンタッチすることを見出した。これが真核生物ではじめてのprimase発見となった。当時の興奮と歓喜は今でも忘れられない。その後Genomicsの研究に移ったが、Ribozymeを始めたきっかけは、1995年にギリシャのスペツァイで開かれたEMBOのサマースクールに参加したことである。白血病の融合mRNAの構造をポスター発表した折に、John Rocciにこれならribozymeで特異的に切断できるとsuggestされた。帰ってから、hammerhead ribozymeを始めたが、in vitroではうまくいくが、in vivoではあまり調子が良くない、私自信もribozymeを総括したいと考えていた。また、イギリスにはまだいったことがなく、スコットランドにはぜひ行ってみたいと思っていたこともあったので、このmeetingに参加することにした。イギリスとはどんなところか、期待に胸を膨らませて出発した。これは私のイギリス旅行記である。

8月22日 夕方ロンドン着。フィッシュアンドチップスをトライする。美味しいが量が多い。

8月23日 朝7:13のバスでヒースロー空港へ。エジンバラには9時着だったが、機内でイングリッシュブレックファストがでた。市内行きのバスに乗り、ヘイマーケット駅前で降りた。時間が早めだったせいか、RNA関係者と思しき人はあまり見当たらず、私の他にはポスターのケースを持った2人連れが同じバスに乗っていた。インド人と思われる男性と金髪の女性だ。切符を買った後、男性の方が話し掛けてきた。AmgenのSumedha JayasenaとAnastasia

Khvorovaで、ハンマーヘッドリボザイム新しい活性の強い構造を発見したので発表しにきたとのことだった。デンバーから2回乗りついできたそうだ。ホームで列車を待つ間、カフェラテを飲みながら話をした。Anastasiaの方は非常に眠そうであった。列車はけっこう込んでいたが、幸い私は推賞されていた右側の席に座れた。車窓からは、牧草を刈り取って大きく丸めたものがたくさん転がっていた。ヘイマーケットの名前の由来がわかった。田園地帯をいくと北海が見えてきた。あいにく曇っていたため海は寒々としていた。ダンディーはエジンバラから約70分で初めての都会だった。ダンディーについて列車からおりる時Anastasiaが必死で何かを探していた。ポスターだった。列車に乗る時にホームに置き忘れたらしい。会場のWest Park Centerに向かうタクシーの中でどうするか相談していた。幸いなことにディスクで持っているのでプリントアウトできればよいとのことだった。着くとすぐ大学でプリントアウトさせてもらうように手配していた。これが実に重要なデータとはその時はまだ知らなかった。6:00から夕食、ビュッフェ形式でかなりリッチだった。同席したSarah Woodsonと挨拶した。少し年をくっているが美人だ。7:30よりポタニカルガーデンでレセプションがあった。まだ明るく、きれいに整備された庭はかなり広がった。ビジターインフォメーションセンターにワインとスナックが用意されていた。110人程度の小さなミーティングだが、Tom CechやHarry Nollerなど有名人が多くいる。

8月24日 午前中はリボザイムの結晶構造解析、ランチ後、4時まではフリータイム、川沿いを歩いて小さい空港を過ぎ、街に戻った。4時からポスターセッション、6時からディナー。夕食後、Tom Cechの講演があった。リボザイム発見当時のエピソードを楽しそうに話していた。残念ながら時差と満腹で睡魔に襲われて、断片的にしか覚えていない。海外の学会に出るとこれが一番問題だ。続いて、Sarah Woodson(グループIイントロン)、このミーティングのオーガナイザーDavid Lilley(VSリボザイム)、Renee Schroeder(RNAシャペロン)の講演があった。

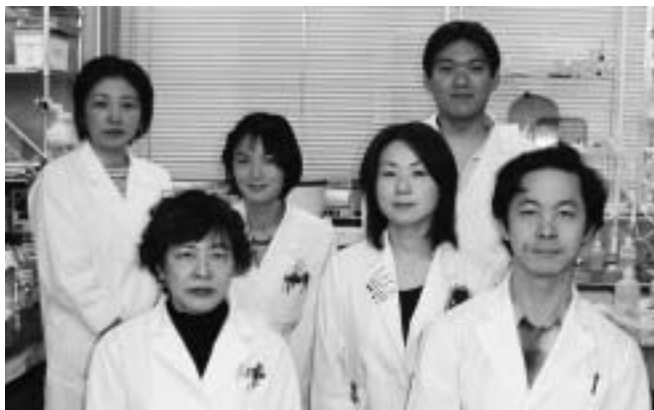
8月25日 午前中は、人工進化による新しいリボザイム活性、アロステリックリボザイム、RNAスイッチ、バイオセンサーなど、面白い話が続いた。D. Bartelは、RNA合成をするリボザイム、A. Jäschkeは、C-C bond形成を触媒するリボザイム、R. BreakerとM. Famulokは、アダマー



Dundee 学会風景 いろいろ

とリボザイムを連結したバイオセンサー、スイッチなど、リボザイムの多種多様な応用法を紹介した。John Rocci はリボザイムを細胞内で局在をコントロールする方法、このミーティングはリボザイムがテーマなので遠慮したとのことであるが、最後にレンチウイルス siRNA 発現ベクターが良く効くと話した。午後のフリータイムには、ダンディーのダウントウンまで散歩した。Old Steeple の前の芝生には観光客が多く集まっていた。キャプテンスコットが北極探検に使ったディスカバリー号が係留されていた(写真中央)。ディスカバリーポイントでお土産を買う。4:00 からのポスターセッションでは、例の Amgen の 2 人が発表していた。無事にプリントアウトできたようだ。Anastasia に説明してもらった。要約すると、ハンマーヘッドリボザイムの結晶構造を眺めていると上部が途中でできた不自然な構造をしていることに気がついた。もとの天然のウィルスのリボザイムをみると、そこにはループが二つあった。このループ部分を 3 種のウィルス由来の配列でスワッピングをしてみると、二つのループはホモである必要があった。しかもこれまでのモチーフの 100 倍の活性があり、Mg も 0.1mM で活性があった。したがって、二つのループの kissing interaction が活性に重要であり、はじめにトランス型にするためにこのループを切断したのが誤りであったことが判明したのであった。彼女はさらにこの強い活性を残したままトランス型にするために、片方のループを残し、片方を開環した。これだと標的配列のうちループ部分に当たる相手側はもう一つのループと interact するようにランダム配列から選択する必要があるが、どんな配列でも標的にできる。彼等は論文発表せずに特許をとったので既に使えるとのことだった。

夜のセッションでは、ハンマーヘッドの大家である Olke Uhlenbeck が講演した。1987 年に Gordon Conference で Bob Symons のリボザイムの話聞いてエキサイトしたこと、それ以来 16 年間のハンマーヘッド研究を披露した。しかし最後に天然のリボザイムとハンマーヘッドを並べたスライドを出してため息をついたのが印象的であった。Anastasia の発見でハンマーヘッドは新しい展開になるだろう。しかし、ハンマーヘッドがこれだけツールとして普及したのは彼の功績である。最後に“Nucleic Acid Award” が授与された。



神津研究室。最前列左側が筆者。

8月26日 R. Luhrmann の講演では pre-spliceosome と activated spliceosome とで dynamic に組成が変化すること、クライオ電顕で snRNP や spliceosome が中空のカゴ状の構造をしていることなどが新鮮だった。唯一の日本人演者である K.Taira は、hybrid ribozyme による gene discovery、さらに siRNA 発現ベクターを用いたライブラリーも紹介した。Harry Noller は、リボソームの構造と RRF の結合部位は 50S サブユニットで tRNA とは異なることを紹介した。バンケットでは、何故か、多比良先生を中心に東洋人テーブルになった。日本人、韓国人、中国人、エジプト人など総勢 11 人だ。周りからは異様に見えたに違いない。

8月27日 Peter Moore がリボソームのラージサブユニットの構造と機能について、Andrea Barta が、リボソームのペプチジルトランスフェラーゼが、Mg イオンに依存するリボザイムと考えられることを紹介した。Ada Yonath はリボソームを標的とする抗生物質の機能を synchrotron radiation による結晶構造解析より求めた。これはアートの世界だった。講演の前に何故か親しげに挨拶されて驚いた。これでミーティングは終わった。ランチを立ち食いして、事務を仕切っていた Hellen が用意してくれたバスに乗ってエジンバラまでいった。エジンバラの空港で別れ際に Anastasia に今回のミーティングの感想を訪ねたところ、ちょうど良い規模で一流の研究者と friendly に話ができてとてもエンジョイしたとのことだった。私も同感だと答えた。総じて、このミーティングは、リボザイムの発見から大きく花開いた RNA 研究の立て役者が集まり、ハイレベルで密度の高い内容だった。私もあれこれ新しいアイデアのヒントをいくつかもらった。最後に、手際よく細やかに事務をしきった Biochemistry Society の Hellen Reed に感謝。

8月28日 日本への出発は午後だったので、午前中に地下鉄に乗って、ロンドン中心部に行き、ビッグベン、ウエストミンスター、バッキンガム宮殿など駆け足でまわった。空港の免税店で、シングルモルトのスコッチを試飲して、日本には輸出していないというものを 3 本買った。ウイスキーを抱えて飛行機に乗り込んだ。これで私のイギリス旅行は終わった。

プロフィール

1974 年国際基督教大学卒業、薬学博士。1974 年より埼玉県立がんセンター研究所勤務。1988 年 - 89 年アレキサンダーフォンフンボルト財団ポスドクとしてドイツ留学。現在、主任研究員、核酸分子療法研究グループリーダー。趣味スキー。

神津知子

(埼玉県立がんセンター)

減数分裂の制御因子 Mei2-meiRNA 複合体

渡辺 嘉典

(東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻)

私が Mei2 と出会ったのは、今から実に 19 年も前のことで、大学院生として当時東大医科学研究所の山本正幸先生の研究室に入ったときのことで、そのころ、先輩の飯野雄一さんが pat1 という、温度を上げるだけで増殖を止め減数分裂を開始してしまう大変おもしろい変異株を見つけ、そのサプレッサー変異として減数分裂の開始に必須の mei2 遺伝子の変異を同定していました。当時山本研は、私を含めて学生 3 人、技官 1 人という弱小ラボで、このテーマを発展させるために私は mei2 遺伝子の解析を担当することになったわけです。まだ研究室の歴史が浅く、分子生物学的手法が十分立ち上がっていない状況でしたので、同級生のいる部屋とか研究所内のいろんなところに出向き、見よう見まねで分子生物学的手法を研究室に導入しながら

の研究のスタートでした。そういう状況ですから、遺伝子の配列を決めるのに一年以上かけるというような牧歌的なペースで研究は進みました。当時の酵母研究は分子遺伝学に 100% 依存していたわけですが、遺伝子の配列を決めても既知のタンパク質との相同性も見あたらず、また mei2 遺伝子変異株からはサプレッサー変異あるいはマルチコピー・サプレッサーといったものは全くとれてこないという八方ふさがりの状況で、発現制御に関する解析を除いて、Mei2 の機能解析は混迷を極めていました。こんな状況

下で無理矢理考えた結論は「Mei2 は減数分裂細胞の分化にあたり多くの重要な機能を担っている、今までに見たこともない新規のタンパク質である」という釈然としないものでした（このことはある意味では正しかったと今でも言えます）。また、そんな重要なものなら動物にもあるかも知れない（あってほしい）と、ネズミの精巣を潰して Mei2 抗体（抗体作りも全くの素人で失敗の連続でした）でウエスタン・ブロットを試したり、その結果出た怪しいバンドを頼りに精巣の cDNA ライブラリーを一年以上かけて抗体スクリーニングした末の挫折など、あまり方向性と確信のもてない実験の試行錯誤を繰り返す日々が続いていました。そんな海のものとも山のものともつかぬ mei2 の解析に一つの転換期が訪れたのは、すでに大学院の博士課程を修了

していました。mei2 の温度感受性変異株にゲノム DNA ライブラリー（もちろん mei2 破壊株から苦労して作ったもので、今でもうちの研究室でベストのライブラリーであると信じています）を入れてみたところ、制限温度下で mei2 欠損をサプレスし減数分裂を開始するようになる形質転換体を得ることができました。それまでに試みたサプレッサーのスクリーニングはことごとく失敗に終わっていたので、疑心暗鬼の中でクローニングと塩基配列決定の作業を進めていきました。ところが、これまた不可解なことに、クローンの機能領域に有意な ORF らしき配列が見つからないのです。それまで、サプレッサークローンはタンパク質をコードする遺伝子という固定概念ができていたので、この事実はにわかには受け入れられず、最終的にこれが

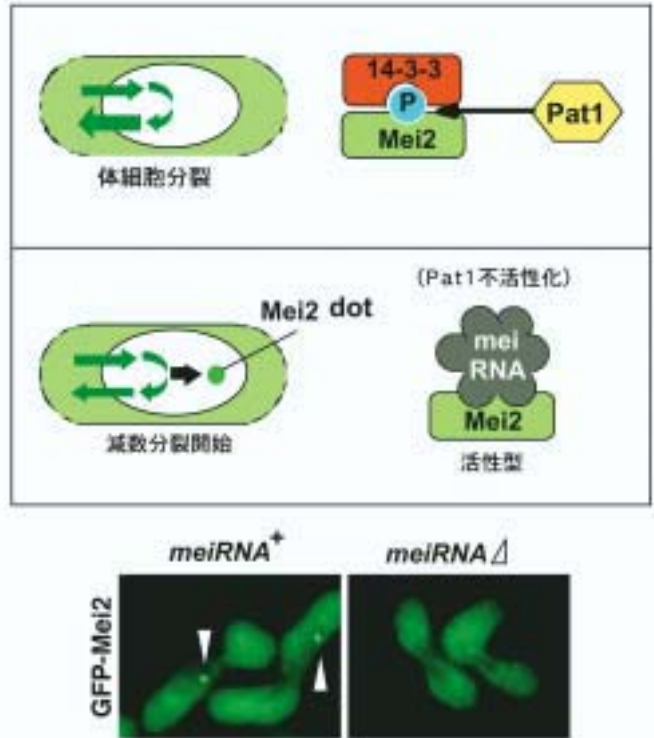
若い人には、研究の目的に主眼を置き、それを達成するためには新たな解析手段を開発あるいは導入する苦勞を積極的に経験することの大切さを強調したいと思います。それにより、その人は研究室に多大な貢献をするだけでなく、研究推進のための本当の実力を身につけることができます

RNA 遺伝子であることを受け入れざるを得ないと結論するまでに膨大な量の実験をしたのを覚えています。もう一つ私を興奮させたことは、この RNA 遺伝子を破壊した細胞が減数分裂をする能力を失ったという事実です。このことから、この減数分裂 (meiosis) に必要な新規の RNA を meiRNA と命名しました。しかし、これらの事実をもってしても、それだけでは Mei2 の正体を言い当てるものではありませんでした。その年の分子生物学会の要旨を、「機能未知なる Mei2 はこの新規 RNA と相互作用して機能している

かも知れない」という主旨の文章で結んだのを覚えています。ところがその当てずっぽの予言がにわかには現実味を帯びてきたのは、それからそれほど後のことではありませんでした。ちょうどそのころコンピューターによる相同検索のプログラムの精度が上がり、Mei2 の一部配列に RNA 結合タンパク質と弱い相同性があるという示唆を知人からもらったのです。私は大変興奮して、それまでコンピューターでは決してヒットすることがなかった RNA 結合モチーフ (RRM) を血眼になって Mei2 配列の中を探し、その可能性のある配列を見つけることができました。さらに、*in vitro* の RNA 結合実験（これも当時まだ普及していなかったので DNA のゲルシフト・アッセイをまねして組み立てました）を開始し、Mei2 が meiRNA と特異的に結合することを示す

にいたりました。さらに、減数分裂細胞の抽出液を用いた免疫沈降実験、RRMモチーフに網羅的に変異を導入した変異型 Mei2 の解析などから、Mei2 と meiRNA が細胞内で複合体として機能していることを証明しました。減数分裂の開始因子が RNA 結合タンパク質で、新規の RNA と複合体を形成しながら減数分裂の開始および進行に必須の働きを担っているという今までに聞いたことのないストーリーができあがったのです。現在でも、Mei2 と meiRNA の複合体のホモログは他の生物で見つかりませんが、RNA 結合タンパク質が減数分裂の進行に中心的な働きをしているという報告はいくつかあります。この論文をやっとの思いで Cell 誌に発表できたときには、Mei2 と出会って実に 10 年の歳月が流れていました。私の研究をよく知る知人は、「苦節 10 年とはまさにこのことです」と讃えてくれました。しかし、今から思うとその間にいろいろと苦労して、多くの実験系を暗中模索の中で自前で組み立てていった経験がその後の自分の研究人生に大変役立ったと思っています。若い人には、研究の目的に主眼を置き、それを達成するためには新たな解析手段を開発あるいは導入する苦勞を積極的に経験することの大切さを強調したいと思います。それにより、その人は研究室に多大な貢献をするだけでなく、研究推進のための本当の実力を身につけることができます。

その後の研究の発展としては、Mei2 が Pat1 キナーゼによってリン酸化されることによってその活性がブロックされていること、脱リン酸化型の RNA 結合タンパク質 Mei2 はそれだけで増殖細胞を減数分裂細胞へ分化たらしめてしまう能力をもつことが分かりました。また、Pat1 によりリン酸化された Mei2 に 14-3-3 タンパク質が特異的に結合することにより Mei2 の RNA 結合能が阻害されることが分かり、同時期に示されたリン酸化による Mei2 の分解促進機構と共に、リン酸化による Mei2 の不活性化のしくみが明確になりました。Mei2 は核と細胞質をシャトルする RNA 結合タンパク質で、減数分裂開始期には meiRNA と相互作用することにより核内に興味深いドット状の構造体を形成することも分かりました。さらにごく最近の知見としては、Mei2 と相互作用するタンパク質として翻訳開始因子のサブユニットが複数得られていること、減数分裂特異的な遺伝子の mRNA が Mei2 の活性化に依存して安定化されることなどが挙げられます。現時点での一つの推測として、Mei2 は hnRNP のように減数分裂に必要な遺伝子の mRNA を標的として核内での mRNA の安定化および細胞質での翻訳制御に関わっている可能性が考えられます。その場合、meiRNA は Mei2 が正しい



減数分裂開始因子 Mei2 の細胞内局在と活性制御機構

体細胞分裂により増殖する細胞では、Mei2 は pat1 によりリン酸化されさらに 14-3-3 タンパク質との相互作用により、RNA 結合能が阻害される。減数分裂開始条件下では、脱リン酸化された Mei2 が meiRNA と相互作用することにより核内にドット状の構造体を形成する。

複合体を形成するのをアシストしているのかも知れません。Mei2 の研究は、最近では山本研究室の何人かのメンバーたちの共同作業として進められていますが、まだその分子機能を特定するには至っていません。この特定研究の期間にその日が訪れるよう頑張りたいと思います。



プロフィール

1989 年東京大学大学院博士課程修了、理学博士。東京大学理学系研究科の助手、英国王立がん研究基金研究所客員研究員をへて、1998 年より同助教授。

渡辺 嘉典

〔東京大学大学院理学系
研究科生物化学専攻〕

non-coding RNA ～偶然か必然か～

影山 裕二

(奈良先端科学技術大学院)

ゲノムプロジェクトが国家プロジェクトとして取り組まれるようになり、プロテオーム解析が叫ばれるようになって久しいが、プロテオーム解析ではその名前が現すとおり non-coding RNA 分子は無視されている。RNA 分子の可能性に興味を持つものとしてはやり切れぬところであるが、皮肉なことにプロテオーム解析の盛況と相前後するように新規の non-coding RNA 分子が最近次々と発見されている。個人的には大変喜ばしいことだと思っているのであるが、残念ながらこれらの non-coding RNA のうちの多くが“偶然に”発見されたものであるというのも事実である。これら non-coding RNA については未だ不明な点も多く、RNA 分子種の包括的な理解のためにも研究の進展が待たれるところである。

以下の雑文は決して建設的な議論となっていないが、non-coding RNA の研究にかかわるものの素直な感想として読んでいただくとありがたい。

一口に non-coding RNA といってもその機能・構造は多岐にわたる。splicing に関わる snRNA や、他の RNA 分子の修飾にかかわる snoRNA、最近目覚ましい研究の進展がみられる miRNA や siRNA、そして RNase P やテロメラーゼ RNA に代表されるリボザイムまで、まさに多種多様である。このような non-coding RNA はどのようにして発見されてきたのであろうか。実際に原報を当たってみると、あるものは生物学的な機能が遺伝学的に同定され、あるものは特異的な発現パターンにより発見されるといった具合でまさに千差万別である。しかしながら今までのところ、目的分子が non-coding RNA である可能性をある程度推測した上でその同定が行われたものはまだまだ少数派であり、むしろ多くの場合 non-coding RNA の同定は予期せぬ結果、偶然の産物であるというのが現状であろう。この傾向はいわゆる mRNA 型の高分子量 non-coding RNA で顕著である。

同定した本人たちでさえその“幸運”を認めている例として、転写にかかわる核内 non-coding RNA である SRA

(steroid receptor RNA activator) が挙げられる。SRA は、ステロイドホルモンレセプターの転写活性化ドメインに相互作用し、転写制御因子として働く non-coding RNA であるが、驚いたことに転写活性化ドメインを bait とした yeast two-hybrid system によるスクリーニングにより単離されたのである。当初は SRA にコードされる短いペプチドが何らかの機能を持っているのではないかと考えられたが、ナンセンス変異やスタートコドンの変異を含む種々の変異を導入してもその活性を失わないこと、SRA RNA がステロイドホルモンレセプターと相互作用する他の転写制御因子と複合体を形成することから、RNA 分子そのものが機能していることが明らかとなった。タンパク質の相互作用を利用したスクリーニングから得られたものが実は non-coding RNA

であったと知ったとき、当の本人たちの戸惑いはいかほどであったろうか。彼らにしても、培養細胞を使った転写のアッセイで SRA が非常に顕著な転写活性化能を示すという事実がなければ、単なる false-positive の一つとして研究対象から外したのではないだろうか。

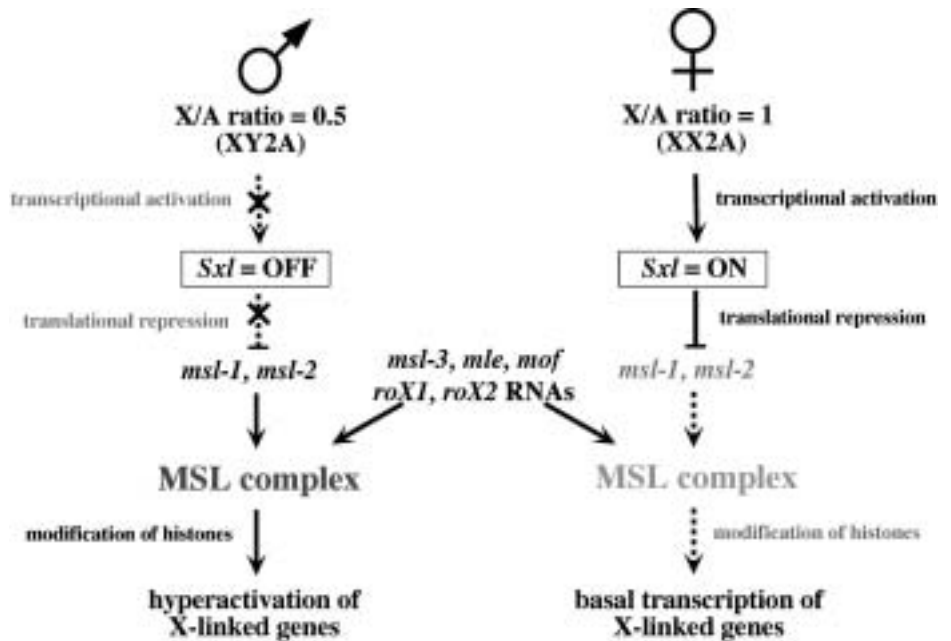
もう一つの例としてわたし自身の研究材料でもある roX1 および roX2 RNA を紹介したい。ショウジョウバエの遺伝子量補正では雌雄どちらかの X 染色体の転写活性が制御されており、結果的に雌雄間の X 染色体遺伝子量の違いが補正される。哺乳類では non-coding RNA である Xist を介し、2 本ある雌 X 染色体のうち 1 本が不活性化（ヘテロクロマチン化）されるのに対して、ショウジョウバエでは roX1 および roX2 を含む RNP 複合体 (MSL complex) が、1 本しかない雄 X 染色体の転写を約 2 倍に活性化している (図)。roX1 および roX2 RNA は雄の神経系に特異的に発現する遺伝子として単離された。その後これら roX RNA は弱いながらもほとんど全ての組織で発現するのが確認されたのだが、神経系では組織中の細胞密度が高いため、特に強く発現するように見えたということらしい。胚発生における発現パターンを実際に観察した経験から言うと、これはむしろ artifact に近い。その後遺伝子量補正に必須な MSL タンパク質と複合体を形成し、X

non-coding RNA 遺伝子の突然変異の例は………多くない。non-coding RNA がナンセンス変異やフレームシフトに強いことも一因であろうが、突然変異の原因遺伝子を探すときに、多くの研究者が無意識のうちにゲノム上の ORF を探し求めることの方が主因であるような気もする

染色体に局在する non-coding RNA であることが示されたのであるが、これにも発見した神経発生の Ron Davis のグループが、遺伝子量補正を研究していた Mitzi Kuroda と同じ大学にいたことが大いに幸いしている。ここでもいくつかの偶然が作用したと言わざるを得ない。

それでは偶然に頼らず non-coding RNA を積極的に単離するにはどうしたらよいのであろうか？さまざまな生物種で全ゲノム配列が明らかにされているのであるから、そこからシミュレーションや各種アルゴリズムを用いたコンピュータ検索により検索できないであろうか。最近の研究で、miRNA や snoRNA の配列上の特徴（相同性と呼べるほど似ているわけではない）を利用して多数の新規 non-coding RNA を同定した例が報告されており、特定の non-coding RNA のグループに関しては効果的な方法であることが証明された。だが、残念ながらこの方法は全ての non-coding RNA 分子種に使える方法ではない。比較ジェノミクスはどうであろうか。近縁種同士でゲノム配列を比較して、保存されている non-coding 領域を検索した例がバクテリアや線虫で報告されており、将来ゲノム解析がさらに多様な生物種で進めば非常に強力な方法になると期待される。ゲノム配列中のタンパク質をコードしていない領域から転写が起こっているかどうかを、高密度 DNA アレイ等を用いて検討するのも有用であろうと思われるし、実際にそのような方法で大腸菌や酵母など比較的ゲノムサイズの小さい生物ですでに成果が得られている。ただし、この方法はゲノムサイズが大きくなるにしたがって手間と時間（と研究費）を要求するものとなる。また、多細胞生物では長さが数 kb にわたる UTR がしばしばみられるため、これと non-coding RNA を見分けるのは容易ではない。またこの方法でもいえるのは、全ての遺伝子が検索に引っかかるわけではなく、false-positive もかなりの割合で混入していると考えられるため、最終的には遺伝学解析等でその機能が解明する必要があるということである。つまり *in silico* の解析以外にながしかの *wet* な解析の苦労が伴うということである。ゲノム配列が解明されている生物においてさえ non-coding RNA の全容解明は決して容易ではない。

配列情報だけでは non-coding RNA かどうかの同定が難しいということは、裏返せば non-coding RNA の配列情報が



遺伝子量補正の制御機構

遺伝子量補正の制御機構の本質は MSL complex 形成の制御機構である。雄細胞でのみ形成された MSL complex は X 染色体を特異的に認識し、クロマチン構造の変換を介してその転写量を調節している。roX1/roX2 RNA は転写制御に関わることが知られている数少ない non-coding RNA であるが、その生化学的機能は未だ謎に包まれている。

らは分子機能が推測できないということである。snoRNA や一部の miRNA のように標的遺伝子と部分的に相補鎖を形成したりする場合などはその機能についてある程度見当が付くが、特に高分子量の non-coding RNA は何をしているのか全くわからないものも多い。結合するタンパク質を同定するにしても RNA 結合性タンパク質は DNA 結合性タンパク質と比べてもはるかに親和性・特異性が低く、同定するのは容易ではない。目的の non-coding RNA 分子に関する程度の知見が得られてからでないと、生化学的な解析だけでは研究を進めるのは難しいようである。わたしがショウジョウバエを材料としていることもあって、遺伝学的な解析が進むことを期待しているのであるが、non-coding RNA 遺伝子の突然変異の例は Cartilage-hair hypoplasia (CHH) や telomerase RNA などいくつかの病原遺伝子がヒトで知られているだけで（他の例があればぜひご教授下さい）決してその例は多くない。non-coding RNA がナンセンス変異やフレームシフトに強いことも一因であろうが、突然変異の原因遺伝子を探すときに、多くの研究者が無意識のうちにゲノム上の ORF を探し求めることの方が主因であるような気がする。

わたし自身、遺伝子量補正において non-coding RNA の研究を行う上で、その難しさをひしひしと感じている。わたしは roX1/roX2 の論文が出たその年の4月に前述の Mitzi I. Kuroda の研究室にポスドクとして参加し、在籍中の4年間にわたし自身のものを含め roX1 に関するさまざまな研究が行われるのを見た。しかしながら、他の MSL complex の

サブユニットの役割が次々と明らかにされ、タンパク質サブユニット間の相互作用が明らかになったのとは対照的に、roX RNAs がどのタンパク質サブユニットと相互作用するのか、なぜ MSL complex 中にあるのかは謎のままであった（つまり泣いたポストドクや学生がたくさんいた）。これは roX1 と roX2 が機能的に redundant で、それぞれ単独の変異体では表現型が見られないため、正統な遺伝学が使えないという事情のせいでもあったが、今までに相当の蓄積がある遺伝子量補正の系においても、non-coding RNA の機能解

析は困難を極めたのである。最近になり roX1 と roX2 の二重変異体が作成され、やっと遺伝学を使った解析ができるようになった。従来の系ではわからなかった、あっと驚くような事実の発見があるのではないかと期待している。

否定的なことばかりを書いてきたようであるが、言い換えればそれだけおもしろい問題が積み残されている分野でもあるわけで、これから多くの方たちが参入してきて一緒に頭をひねっていただければ幸いである。



影山グループ（右端が著者）

プロフィール

1991年神戸大学理学部卒業。1996年総合研究大学院大学遺伝学専攻修了（理学博士）。学術振興会特別研究員（国立遺伝学研究所）、ベイラー医科大学（ヒューストン）博士研究員を経て2001年より奈良先端科学技術大学院大学助手。

影山裕二

（奈良先端科学技術大学院）

RNA Update

特集：non-coding RNA と遺伝子発現③

小さな RNA の大きな世界

牛田千里

〔弘前大学・農学生命科学部
応用生命工学科・生体情報工学講座〕

今から約10年前、名古屋大学博士課程後期に進学した私は武藤あきら助教授（現弘前大学教授）の指導で「マイコプラズマ低分子 RNA の機能と構造の解析」というテーマのもと研究を始めた。当時武藤教授は *Mycoplasma capricolum* から2種類の新規低分子 RNA を発見しており、「自己増殖可能な生物種の中で最も小さいゲノムをもつマイコプラズマでさえこのように tRNA や rRNA 以外の低分子非翻訳 RNA 種を持っているのだから、他の生物種にはもっとたくさんあるはずだ。マイコプラズマで見つけたものは他の真正細菌にも共通に存在するのではないか、それらの RNA は細胞の増殖にとって重要な役割を担っているのではない

か」と熱く語っていた。「ポストゲノム」という言葉はおろか、ゲノムシーケンシングプロジェクトでさえ完成した例はなく、やっと国際的なヒトゲノムプロジェクトが始まった頃のことである。

1991年の時点で原核生物の低分子非翻訳 RNA（tRNA、rRNA 以外）はわずか20種類前後でしかなかった。それらの発見は偶然によるところが大きく、発見されて何年も経つのに一向に機能がわからないということも往々にしてあった。しかし、この10年間に状況は大幅に変化した。例えば 10Sa RNA である。10年前には全く機能がわからな

かったのに、現在ではこの RNA が一分子で tRNA と mRNA の両方の機能を兼ね備え、中途半端な mRNA から翻訳されて出来た不良タンパク質の分解に働くことが明らかになっている。名前も新たに tmRNA と呼ばれるようになった。1991 年にはたった 3 種類の菌でしか単離されていなかったが、今では 100 種類を超える真正細菌で同定されており、中には遺伝子が真ん中で切断された形で存在する変わり種も報告されている。詳細については前回の RNA ネットワークニュースレターで武藤教授が紹介したのでそちらを参照されたい。

この結果は低分子非翻訳 RNA の中には特定の生物種にのみ存在するものが案外多く、それらがその生物種特有の生命現象に働くことを示唆しているのではないだろうか

関するいくつかの知見は得られていたものの、いずれも機能解明の手がかりとしては乏しく、決定打とはなり得なかった。ところが 2000 年 6 月、Wassarman と Storz は大腸菌 6S RNA が RNA ポリメラーゼの σ^{70} と β/β' サブユニットと結合すること、菌が増殖の静止期にはいるとこの RNA が細胞内に多く蓄積すること、静止期での σ^{70} 依存性プロモーターからの転写を抑えることを示し、Cell 誌に発表した (Cell 101:613 2000)。私の知る限り 1985 年以來 15 年ぶりの大腸菌 6S RNA に関する論文である。Wassarman らは 6S RNA の生理的機能として、1) 菌の静止期におけるプロモーターの使用を変化させる、2) 菌が飢餓状態にさらされた時にすぐ σ^{70} ホロ酵素が使えるように常に一定量の σ^{70} ホロ酵素を 6S RNA と結合した形で細胞内にストック

大腸菌 6S RNA も最も早く発見された低分子 RNA の一つである (Brownly, 1971)。その機能については 2000 年に至るまで約 30 年もの間不明であった。この間、6S RNA に

これまでに同定されている低分子非翻訳 RNA 種の例

| RNA | サイズ (nt) * | 機能, 関連現象, 他 |
|---------------------------------|-------------|--|
| <原核生物> | | |
| 4.5S | 114 | タンパク質の分泌 |
| 6S | 184 | σ^{70} RNA ポリメラーゼに認識されるプロモーターからの転写制御 |
| tmRNA | 363 | トランストランスレーション機構を介したタンパク質の分解 |
| RNase P | 377 | tRNA 前駆体のプロセッシング |
| Spot 42 | 109 | <i>galK</i> の翻訳抑制 |
| CsrB | 360 | CsrA に結合してその作用を拮抗する, グリコーゲン合成制御 |
| OxyS | 109 | 特定の遺伝子の翻訳阻害, 酸化ストレス |
| MicF | 93 | <i>ompF</i> の転写後調節 |
| DicF | 53 | 細胞分裂の制御 |
| DsrA | 87 | 特定の遺伝子の翻訳制御, 低温ストレス |
| RNA II | 555 | プラスミド DNA の複製プライマー (ColE1) |
| RNA I | 108 | プラスミド DNA の複製制御 (ColE1) |
| Small RNA | 75 | プラスミド DNA の複製制御 (R1162) |
| CopA | 90 | プラスミド DNA の複製制御 (RI) |
| Two small RNAs | 85, 150 | プラスミド DNA の複製制御 (T181) |
| finP | 105, 180 | <i>traJ</i> の翻訳制御によるプラスミド転位の抑制 |
| pOUT | 70 | トランスポゼース遺伝子の翻訳抑制による IS10 トランスポゾン転位の抑制 |
| C/D snoRNA-like RNA | 50 - 70 | 古細菌 rRNA, tRNA のリボースの 2'-O-メチル化 |
| <真核生物> | | |
| U1 snRNAs | 100 - 200 | シスプライシング (GU-AG イントロン) |
| U5 snRNAs | 100 - 200 | シスプライシング (GU-AG, AU-AC イントロン), トランスプライシング |
| U2, U4, U6 snRNAs | 100 - 200 | シス (GU-AG イントロン), トランスプライシング |
| U11, U12, U4atac, U6atac snRNAs | 100 - 200 | シスプライシング (AU-AC イントロン) |
| SL RNA | 100 - 150 | トランスプライシング |
| U7 snRNA | 60 | ヒストン mRNA の 3' 末端形成 |
| 7SK | 331 | 転写伸長因子 P-TEFb との複合体形成による RNA ポリメラーゼ II の活性制御 |
| telomerase RNA | 150 - 1,300 | テロメア DNA の合成 |
| RNase P RNA | 500 | tRNA 前駆体のプロセッシング |
| C/D snoRNA | 50 - 250 | rRNA や U snRNA のリボースの 2'-O-メチル化, rRNA のプロセッシング |
| H/ACA snoRNA | 50 - 250 | rRNA や U snRNA のウラシル塩基のシュドウリジル化 |
| MRP RNA | 250 - 400 | rRNA のプロセッシング |
| SRP RNA | 400 | タンパク質の分泌 |
| gRNA | 20 - 70 | RNA エディティング |
| siRNA | 20 - 30 | 標的 mRNA の分解 |
| miRNA | 20 - 30 | 標的 mRNA の翻訳阻害 |

*RNA サイズ：末端の塩基配列が決定されていないものや生物種により長さの異なるものについては目安のみ示した。

しておく、3) RNA ポリメラーゼのリサイクルに働く、という三つの可能性をあげ、低分子非翻訳 RNA の新たな役割を提唱した。

新規低分子非翻訳 RNA 種の発見も相次いでいる。OxyS RNA は大腸菌に酸化ストレスがかかった場合に発現し、RNA ポリメラーゼ σ^s サブユニットをコードする *rpoS* をはじめとしたいくつかの遺伝子の翻訳を阻害することが示されている。DsrA RNA は 菌が低温ストレスを受けたときに細胞内に蓄積し、*rpoS* の翻訳を活性化したり、逆に *hns* (H-NS という大腸菌ヒストン様タンパク質の遺伝子) の翻訳を阻害したりする。

我々は *M. capricolum* から 6 種類の低分子 RNA を単離した。そのうち 3 種類は大腸菌の 4.5S RNA, M1 RNA (RNase P RNA), 10Sa RNA に相同なものであり、残り 3 種類は他の生物種でも単離されていない新規の低分子 RNA であった。後者に属するもののうち MCS4 RNA と名付けた 125nt の RNA は細胞内での存在量が多く、配列が真核生物の U6 snRNA に類似しているという興味深い特徴をもつ。いくつかの実験から、この RNA がごく限られたマイコプラズマ種にしか存在しないことが強く示唆され、研究開始当初の予想を見事に裏切った。この結果は低分子非翻訳 RNA の中には特定の生物種にのみ存在するものが案外多くあり、それらがその生物種特有の生命現象に働くことを示唆しているのではないだろうか。

最近ではポストゲノム時代を反映するように、RNA 探索方法もコンピューターを駆使して行う例が頻繁に見られるようになってきた。Blyn らの予測によれば大腸菌にはこれまで報告されていない新規の低分子非翻訳 RNA が 144 種類もあるということである (Biosystems 65:157 2002)。それほど数には上らないにしても、Gottesman および Altuvia の 2 グループは計算科学的手段による非翻訳 RNA 遺伝子の探索と生化学的実験による検証を組み合わせ大腸菌には少なくとも 15 種類前後の新規低分子非翻訳 RNA があることを発表した (GD 15:1637 2001; Curr Biol 11:941 2001)。大腸菌などはこれまでの研究の歴史が長く、膨大なデータが積み重ねられているので、ともすればもう研究する余地はほとんど残されていないと考えられる向きもあるかもしれない。しかし、機能未知の ORF はたくさんあるし、新規低分子非翻訳 RNA 種は次から次へと候補があがってくる。これらの機能を知るにはゲノムの全塩基配列、他遺伝子の発現パターン、変異体の表現型等の情報が少しでも多くあった方が有利である。ポストゲノム時代を迎えて、いよいよ原核生物非翻訳 RNA の機能や構造の多様性を理解し、それらの応用を可能にする時代が到来したのではないか。

真核生物の低分子非翻訳 RNA に関する研究のここ 10 年

の話題として、1) C/D snoRNA と H/ACA snoRNA の発見と機能の解明、2) RNAi や PTGS という現象の発見とそれらの分子メカニズムの解明に伴う siRNA の発見および miRNA との関連、の 2 点をあげたい。

snoRNA も原核生物の低分子非翻訳 RNA と同様、1960 年代後半には発見されていたにも関わらず、なかなか機能解明には至らなかった。ところが 1996 年～1997 年にかけて、多くの核小体に存在する RNA がその塩基配列から 2 つのタイプに分けられること、それらが rRNA の一部、しかもリボースの 2'-O-メチル化やウラシル塩基のシュードウリジル化といった修飾をもつヌクレオチドを含む部分と相補的な配列を持つことが明らかにされ、急速な研究の展開を遂げた。メチル化に働く snoRNA は box C (5'-RUGAUGA-3') および box D (5'-CUGA-3') と呼ばれる保存配列をもち、C/D snoRNA と名付けられている。box C の 5' 側と box D の 3' 側は塩基対を形成してステム構造をつくる。シュードウリジル化に働く snoRNA は box H (5'-ANANNA-3') および box ACA (5'-ACA-3') という保存配列と、ステム/ループからなる特徴的な二次構造を呈し、H/ACA snoRNA と呼ばれている。現在同定されている snoRNA の中には rRNA だけでなく U snRNA の修飾をガイドするものや、未だ標的が明らかとなっていないものもある。近年、古細菌にも C/D snoRNA と同様の構造をとる低分子 RNA 種 (snoRNA-like RNA) が同定され、その起源は案外古いことが示唆されている。

siRNA あるいは miRNA は 20-25 nt のごく短い RNA である。これらは昨今の低分子非翻訳 RNA ブームの火付け役と言っても過言ではなからう。siRNA は RNAi や PTGS という現象に関わる因子として 1999 年に発見された。これを機に両現象の分子機構に関する研究が一気に進み、これまでの概念にはないシステムで細胞が遺伝子発現制御を行うことが示された。一方、miRNA は線虫の *lin-4* RNA や *let-7* RNA に代表される内在性の低分子 RNA を指す。siRNA も miRNA もそれらが標的とする遺伝子の発現を抑制することが知られているが、前者は細胞に導入した dsRNA が切断されてでき、標的 mRNA の分解に働くのに対し、後者はヘアピン構造をもつ前駆体が切断されてでき、標的 mRNA の翻訳阻害に働く。興味深いことにいずれの RNA の切断にも Dicer と呼ばれるタンパク質が働く。2001 年 Tuschl, Bartel, Ambros の 3 グループは独立に線虫やショウジョウバエ、HeLa 細胞から *lin-4*, *let-7* RNA を含む約 50 種類の miRNA を単離し、Science 誌に発表した。彼らはさらに多くの miRNA があることを予想している。

真核生物の細胞内にはどのような非翻訳 RNA 種がどのくらいの数存在しているのでしょうか？ 2 年ほど前から私は線虫を材料に非翻訳 RNA 種を体系的に網羅するという

研究を開始した。多細胞生物では細胞分化や発生、神経や脳の発達に伴う行動の多様性、病気の発症といったより高次の生命現象が観察され、それらの現象に非翻訳 RNA が一役も二役も買っているのではないかと思ったからである。今後も真核生物の新規低分子非翻訳 RNA 種の発見は続々と報告されるであろうし、それらの機能や構造の多様性、生命現象への関与も次々と解き明かされていくであろう。小さな RNA の大きな世界を目の前にワクワクしつつ、今後の非翻訳 RNA 研究に私も微力ながら貢献できればと願うのである。



プロフィール

1993年名古屋大学大学院理学研究科博士課程中退、1998年博士(理学)。弘前大学理学部教務職員、助手を経て1998年より現所属、助手。

牛田 千里

(弘前大学・農学生命科学部
応用生命工学科・生体情報工学講座)

RNA Update

特集：non-coding RNA と遺伝子発現④

小分子 RNA の役割・機能—高次生命現象に果たす役割

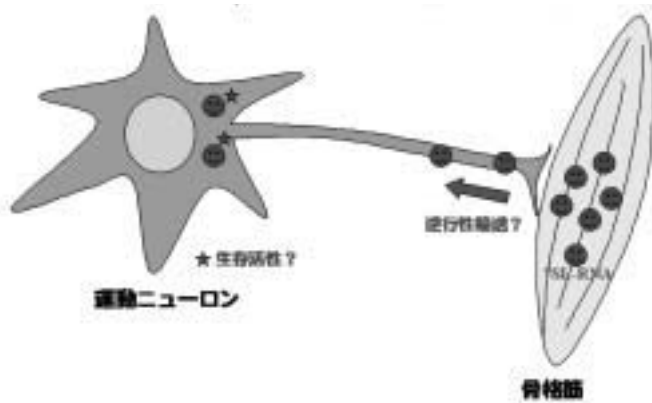
程 久美子

(東京大学大学院理学系研究科
三菱化学生命科学研究所)

神経細胞は発生の初期に過剰に産生され、分化の過程で約半数が死に至る。このような細胞死は自然細胞死と呼ばれるが、神経細胞の発生分化の過程でおこる自然細胞死は、標的組織由来の生存因子に依存すると考えられている。NGF, BDNFなどを始めとする既知のタンパク性の神経栄養因子のノックアウトマウスでは運動ニューロンの顕著な欠損は認められておらず、未同定の運動ニューロン生存因子が存在すると考えられていた。しかし、1960年代より運動ニューロン生存因子精製の試みは世界中で行われたが、タンパク精製の過程で活性は消失し同定に至らない、と報告されてきた。私達も、ニワトリの自然細胞死が起こる胚期の脊髄神経細胞初代培養系を生物検定系として、運動ニューロンに対し生存活性を持つ物質を、骨格筋より分離・精製することを試みた。何度かの精製を行ったが、最終精製物はタンパクと思いついていたために、なかなかどのようなタンパクであるのかを決定することができなかった。ところが、酵素失活実験などから、最終的に分離されたものが RNA であることがわかった。予想外の結果であった。しかし、確かに骨格筋より抽出した total RNA は、運動ニューロン生存活性を示し、この活性は DNA 分解酵素

しかし、確かに骨格筋より抽出した total RNA は、運動ニューロン生存活性を示し、この活性は DNA 分解酵素によっては失活しなかったが、RNA 分解酵素により失活した

によっては失活しなかったが、RNA 分解酵素により失活したため、total RNA 中に運動ニューロン生存活性を示す RNA が含まれていることが確認できた。そこで、この RNA を同定するために、筋の total RNA をカラムにより分画し、活性画分より cDNA ライブラリーを作製した。活性画分からのライブラリーには、かなりの rRNA が含まれており、それらを除いて各クローンの塩基配列を決めていくことが必要であったが、その中に一つの候補と考えられる RNA の cDNA 断片を得た。得られた cDNA 断片より全長をクローニングし、in vitro transcription により RNA を合成し、運動ニューロン生存活性を確認した。この RNA は 7SL-RNA のニワトリ相同分子であった。7SL-RNA は約 300 塩基の小分子 RNA であり、signal recognition particle の構成成分であるとされている。しかし、驚いたことに、in situ hybridization の結果、胚発生期のニワトリ胚腰部では、神経筋接合形成が起こる前には、7SL-RNA の強いシグナルは骨格筋にのみ検出されたのに対して、神経筋接合形成後では、骨格筋だけではなく、脊髄運動ニューロンさらに後根神経節で特異的に検出された。運動ニューロン生存因子は標的組織である骨格筋で産生され、神経筋接合がおこる



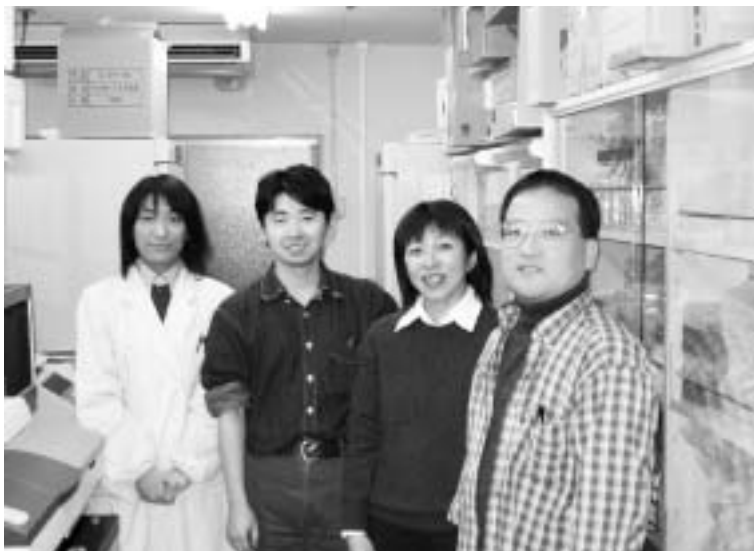
小分子 RNA, 7SL-RNA の予想される動き

と逆行性に運動ニューロンに輸送されるはずである。in situ hybridization の結果は、まさにこの仮説に一致したものであった。したがって、7SL-RNA が signal recognition particle の構成分子であるばかりではなく、運動ニューロンの生存に関わるという新しい機能を担う RNA である強い可能性を示していることになった。しかし、どのように骨格筋から分泌され、運動ニューロンへ輸送されるのか、また生体内で本当に運動ニューロンの生存活性があるのか、など未解決の問題は多い(図)。最近、7SL-RNA は、Mn superoxide dismutase (SOD)-1 の 3' UTR に内在性アンチセンス RNA として働き、MnSOD-1 の遺伝子発現を抑制することが報告された。運動ニューロンでも MnSOD-1 に直接作用しているのか否かはまだわからないが、ある特定の遺伝子発現制御に関与している可能性は非常に高いと考えられる。

RNA による遺伝子発現制御・抑制といえば、ここ数年の

研究で最も注目されているのが RNA interference (RNAi) である。化学的に合成された short interfering RNA (siRNA) による RNAi だけではなく、内在性の micro RNA (miRNA) も同定され、遺伝子の発現を制御することによって機能していることが明らかになりつつある。miRNA は翻訳されない RNA (non-coding RNA) であり、RNA として機能するものである。昨年から本年にかけて、どの生物にも、かなりの数の miRNA があることがわかってきている。私達が同定した 7SL-RNA は、複雑な高次構造を取り得ることがわかっており、その一部は運動ニューロン生存活性においても miRNA として機能しているのかもしれない。

コンピューターを用いて膨大なゲノム配列の情報処理を行うバイオインフォマティクス(生物情報科学)が、近年のポストゲノムシーケンス時代には必須になってきており、重要性が認識されてきている。現在は、多くの情報処理は、タンパクを作る、翻訳される RNA の転写領域に注目して行われている。しかし、これから数年の間には、小分子 RNA による新しい機能に関する研究報告が次々となされ、RNA による高次生命現象における多様な役割が解明されていくと期待できる。それに伴い、RNA の高次構造の予測、相同配列の検索などを、バイオインフォマティクスの手法によってゲノムワイドに行うことにより、網羅的に新しい小分子機能性 RNA を推定することが可能になり、既知の遺伝子数は、高等生物では、これらの RNA を含めると、数倍から数十倍に増加するだろう。このような RNA ワールドの新しい広がりとは、現在の生命科学における多くの未知の問題を解決することになるのかもしれない。



程グループ (右から2番目が筆者)

プロフィール

1987年、早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了、理学博士。三菱化学生命科学研究所特別研究員、日本医科大学助手、講師、助教授を経て、2002年より現所属、特任助教授(三菱化学生命科学研究所連携研究員・併任)。

程 久美子

(東京大学大学院理学系研究科)
三菱化学生命科学研究所

ちびっこ RNA, 何処へ行く

siRNA, miRNA は遺伝子解析の救世主,
遺伝子治療のスター選手, 遺伝子制御の主役になれるか?

善野修平

〔東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻西郷研究室〕

はじめに

最近, short interfering RNA (siRNA), micro RNA (miRNA) と呼ばれている 20 塩基ほどの non-coding RNA (ncRNA) がちょっとしたブームとなり, 注目を集めている。これらの ncRNA はたかが 20 塩基の配列情報を基に, 遺伝子転写産物の RNA に対して抑制的に作用し, 配列特異的な遺伝子機能破壊を誘導する。20 塩基という配列長は 1×10^{10} の配列情報を作り出せ, 塩基対合を通して生理機能の特異性を発揮するのに十分である。一見, ジャンクと思われる 20 塩基程度の RNA が, 一体, どのような発現制御され, どのような機構で機能するのかを明らかにすることは, 遺伝子機能を負に制御するシステムを理解する上での基盤的な情報を提供するであろう。私の所属する研究グループでも, RNAi (RNA interference) の研究を進めている。siRNA と miRNA の関連情報について, 我々の研究結果を混じえ, 雑駁に述べることにする。

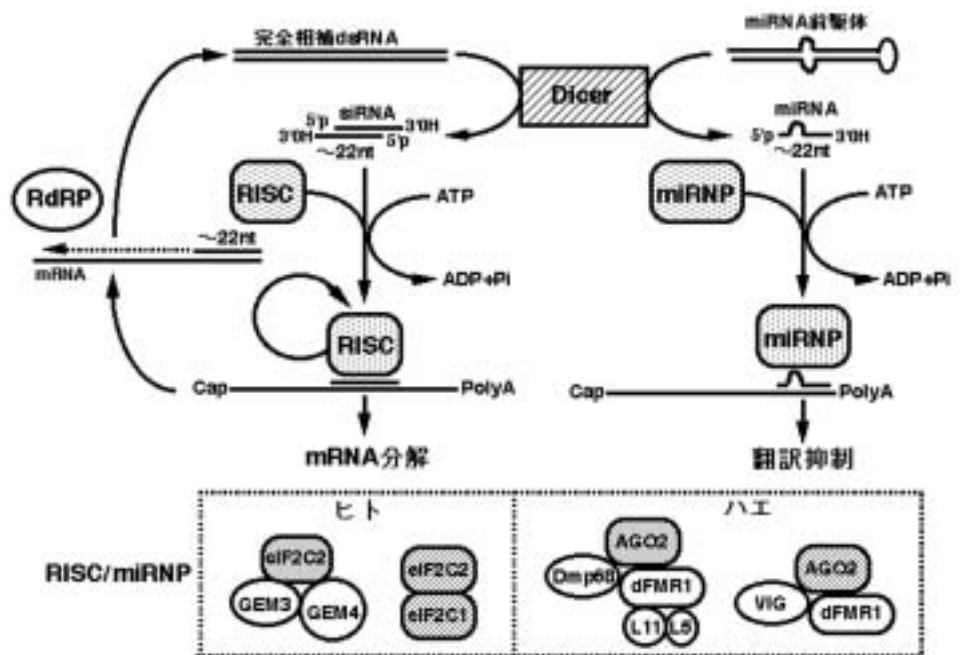
マーとして利用される。この現象は出芽酵母を除く多くの真核生物に存在する共通な遺伝子抑制機構と認識されている。siRNA はその 3' 末端が 2 塩基突出した構造をしており, 5' 末端がリン酸化, 3' 末端が水酸化されている。一方, miRNA は以前発生タイミングを調節する RNA として stRNA (small temporal RNA) と呼ばれていたもので, ~70nt の不完全相補なステム・ループ構造を持つ前駆体から, Dicer によるプロセッシングで, ~22nt の一本鎖 RNA として生じる (図 1)。miRNA をガイド RNA として取り込んだ miRNP (miRNA-protein complex) は mRNA の 3' UTR を 15 塩基程度の相補性で認識し, 翻訳を抑制する (図 1)。

siRNA はどのように RNAi を誘導するのか (我々の結果)

siRNA は細胞内のどのような蛋白質の助けを借りて RNAi を引き起こすのか。この問いに対して, 我々は RNAi

siRNA と miRNA

RNAi は dsRNA が細胞内に侵入した際に, その配列と相同な mRNA の分解が生じる現象である (図 1)。その反応は先ず, dsRNA が Dicer と呼ばれる RNase III 様酵素で ~22nt (nucleotides) に切断されることから開始される。この際に生じる ~22nt の二本鎖 RNA (dsRNA) が siRNA である。この siRNA をガイド RNA とする RISC (RNA-induced silencing complex) が配列特異的な mRNA の分解を引き起こす。この RISC 反応は繰り返され, 反応後の一本鎖 siRNA は再度 dsRNA 合成の為のプライ



siRNA と miRNA の作用機構モデル

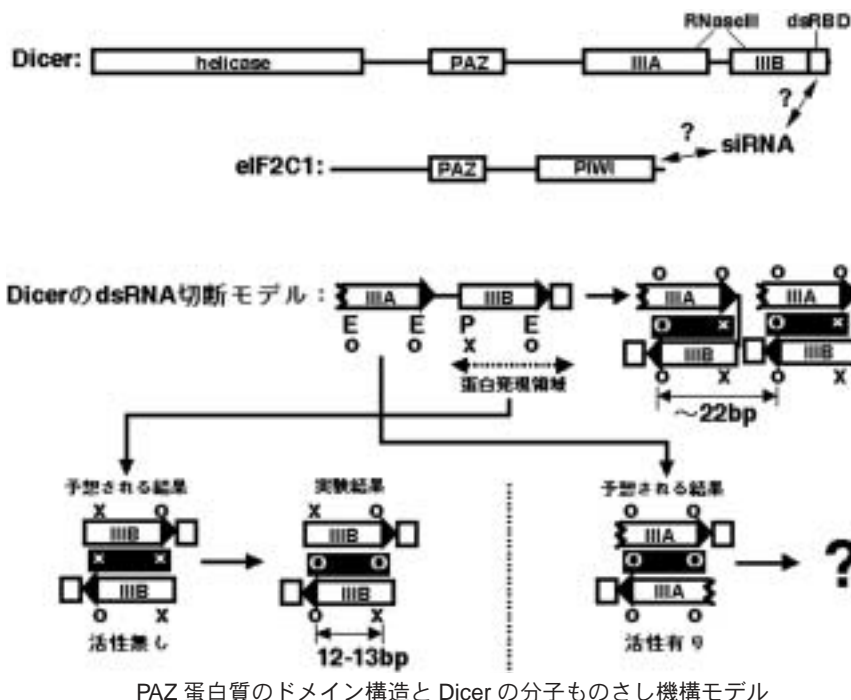
の役者として同定されていた線虫 RDE-1, ハエ AGO2 (ARGONAUTE2) に相同な eIF2C (PAZ ドメインと PIWI ドメインから成る, 図 2) に注目した。ヒトゲノム配列に対する相同性検索の結果, お互いに 80% 以上のアミノ酸相同性を有する 4 つの蛋白質を同定した。これらの遺伝子の 4 つの内の 3 つである eIF2C3 (FJL12765), eIF2C1, eIF2C4 (KIAA1567) は 1 番染色体の Ip34-p35 にクラスターを形成して存在し, 残りの 1 つである eIF2C2 は 8 番染色体に位置していた。これらが siRNA 誘導型の RNAi に関与するかどうかを調べたところ, 4 つ全ての eIF2C は多かれ少なかれその関与が見い出された。中でも, eIF2C1 が最も RNAi 活性と関係が強く, Dicer も eIF2C1 と同程度の強い関与が見い出された。おそらく, eIF2C1 と Dicer が RISC の形成に大きく貢献している成分で, eIF2C2, eIF2C3, eIF2C4 は eIF2C1 の代役として機能するのであろう。しかしながら, 他の研究グループは我々の結果と相反する結果を得ている。例えば, ヒト細胞抽出液アッセイ系を Dicer 抗体で処理しても RISC 活性に影響しないとか, ヒトやハエ由来の RISC 部分精製品に Dicer が見い出せないとかである。これらの相違は, おそらく in vivo でアッセイした我々の結果と in vitro でアッセイした他グループの結果の違いであろう。また, eIF2C1 と Dicer の相互作用を免疫沈降試験でも確認した。その相互作用部位は eIF2C1 の PIWI ドメインであった。Miwi の PIWI ドメインが RNA に結合でき, Dicer の dsRNA 結合ドメインが弱く siRNA と結合できることからすると, siRNA を介して

eIF2C1 と Dicer は相互作用しているのかもしれない (図 2)。

RISC と miRNP の実体

RISC はどのような構成成分から成っているのだろうか。この問いに答える最も直接的な方法は, RISC を精製することであろう。最近, ハエとヒトの培養細胞から RISC が精製された。ハエの RISC の精製に関しては, 2 つのグループが成功している。その 1 つは RISC 活性と AGO2 を指標に精製された ~500Kd の RISC で, AGO2, VIG (Vasa intronic gene) 及び dFMR1 (Drosophila homolog of fragile X mental retardation protein) から成る (図 1)。もう 1 つは dFMR1 の免疫沈降物として取り出した RISC で, dFMR1, AGO2, Dmp 68 (Drosophila homolog of p 68 RNA ヘリカーゼ), リボソーム蛋白質 L5, L11, 5S rRNA から成る (図 1)。お互いの RISC 成分で, dFMR1 と AGO2 はオーバーラップしており, これらの相互作用は RNAi 誘導後も存続し, それらは Dicer とも相互作用できることが確かめられている。VIG は AU-rich な配列に, dFMR1 は GGGG 配列に結合できる。これらは標的特異性や翻訳制御の厳密性に機能することが考えられる。Dmp 68 は RNAi に必要不可欠な成分で, siRNA 活性化の解離ステップに機能するのであろう。さらに面白いことに, これら 2 つの RISC は siRNA だけでなく, miRNA も含んでいた。RISC と miRNP はある程度同じ成分から構成されるらしい。一方, ヒトの RISC も 2 つのグループから見い出されている。その 1 つは ~550kD の RISC で, miRNP (40 種の miRNA を含む) でもあり, eIF2C2, Gem3 (Gemin3), Gem4 (Gemin4) の成分から構成されている (図 1)。Gem3 は RNA ヘリカーゼで, Gem4 は機能不明である。もう 1 つは siRNA との親和性を利用して精製された ~125kD の RISC で, その構成成分は eIF2C1 と eIF2C2, 及び一本鎖の siRNA である (図 1)。この結果は eIF2C と一本鎖 siRNA が RISC の本質成分であることを示している。以上のことを総合すると, RISC/miRNP の本質は eIF2C ファミリーに属する PAZ-PIWI 蛋白質 (図 2) とガイド RNA (一本鎖 siRNA か miRNA) であり, RISC か miRNP かの選択はその他の構成成分との相互作用の結果としてガイド RNA 側で決定される。また, Dicer を含めた RNA ヘリ

20 塩基という配列長は 1×10^{12} の配列情報を作り出せ, 塩基対合を通して生理機能の特異性を発揮するのに十分である。一見, ジャンクと思われる 20 塩基程度の RNA が, 一体, どのような発現制御され, どのような機構で機能するのかを明らかにすることは, 遺伝子機能を負に制御するシステムを理解する上で, 基盤的な情報を提供するのであろう



カーゼ成分は、siRNA（あるいは二本鎖 miRNA）の解離や標的 mRNA の 2 次構造の破壊を促進して反応を効率化し、その他の成分は標的的特異性に寄与すると考えられる。そして、RNAi や miRNA 機構の効率や miRNA の安定性を考慮に入れると、siRNA や miRNA を生じる際から、Dicer と RISC/miRNP は密接に相互作用していると考えた方が妥当であるように思える。

miRNA はどのように生成し、どのように機能するのか

miRNA 遺伝子は単独で存在したり、クラスターを形成していたりしている。クラスター型の miRNA 遺伝子は先ずポリシストロニックに 1 つに纏まって発現され、少なくとも 2 つの段階を通してプロセッシングされる。その 1 つは長い pri-miRNA 転写物からの ~70-nt の pre-miRNA 前駆体の生成で、核で起きる。もう 1 つは pre-miRNA からの成熟 miRNA のプロセッシングで、細胞質で起こる。そして、pre-miRNA は核排出系の基質となる。このように、miRNA の発現制御は 2 つのプロセッシング過程と核からの排出過程を含む多段階制御であるので、miRNA をタイミングよく機能発現できるわけである。また、miRNA は果たして本当に翻訳阻害以外の機能を有してないのか、という疑問が生じる。miRNA の塩基対合がどのように mRNA-RNP (ribonucleoprotein) の構造や組成に影響するかで、遺伝子発現を正に制御するか、負に制御するかを決めていると考えれば、miRNA は mRNA だけでなく、蛋白質に結合したりして、翻訳を阻害したり、促進したりもするであろうし、mRNA の安定性を変化させたり、mRNA をプロセッシングしたり、局在化したりするであろうと考えられる。このような miRNA がとる遺伝子発現制御戦略は、siRNA がとる直接的な転写物分解戦略よりも遺伝子発現を調節しやすいかもしれない。また、最近見い出された多くの miRNA の結果から、興味深い事実が見い出されている。一般に、miRNA は 15 塩基程度の mRNA に対する相補性を有するが、植物の miRNA39 は転写因子 SCL (Scarecrow-like) mRNA のコーディング領域に完全一致する形で結合し、mRNA の分解を引き起こす siRNA バージョンであった。また、プロモーター配列に類似した miRNA (植物の miRNA163 他) が見い出されており、これらは核内の CAF (植物 Dicer) で生成し、DNA レベルで遺伝子発現を制御すると考えられている。同様の報告は、植物と分裂酵母の siRNA でも見い出されている。DNA のメチル化が siRNA 配列に依存して生じ、配列特異的なサイレンシングを誘導するらしい。このように、miRNA と siRNA は PTGS (post-transcriptional gene silencing) のみならず、TGS (transcriptional gene silencing) にも一役を担っていることが明らかにされつつある。もっと広く考えると、その他の多くのまだ解決されていない配列特異的に生じる生理現象の殆どに、miRNA や siRNA などの ncRNA が関与すると考

えるのも、何ら不思議なことでないかもしれない。

Dicer はどのように ~22nt の RNA を生成するのか

Dicer は ATP 依存性ヘリカーゼ、PAZ、2 つの RNase III (III A、III B)、dsRNA 結合 (dsRBD) のドメインを持つ dsRNA 特異的ヌクレアーゼである (図 2)。好熱菌 *Aquifex aeolicus* の RNase III ドメインの構造から、Dicer の RNA 切断活性モデルが出されている。これによると、Dicer に 2 つ存在する RNase III ドメインの 1 つ (III B) は活性中心残基の Glu(E) が Pro(P) に置換して不活性化しており、Dicer がタンデムに並んだ場合、dsRNA が ~22nt に切断されるというものである (図 2)。しかしながら、我々が調製した III B-dsRBD の部分断片蛋白は 12-13nt 毎の切断活性を持っていた (図 2)。このように、RNase III ドメインの E から P への置換は不活性化を導かない。III A と III B の配列を比較すると、III A の N 末端側が少し欠けている。もしかすると、この欠失が III A を不活性化しているかもしれない。しかし、この解答には今後の実験結果を待たねばならない。最近発表された全長 Dicer の切断活性は、殆ど exo 型の dsRNA 切断パターンを示す。この結果は我々が考えている endo 型様式モデルと明らかに考え方を異にしている。

おわりに

ヒトゲノムの転写産物は、その 98% がイントロンと non-coding RNA であると見積もられている。もしかすると、mRNA スプライシングの副産物として、イントロン部分の miRNA は生成されるかもしれない。このように、一度、転写された RNA が miRNA システムを用いて配列特異的な存在価値を発揮できるとすると、それらの全ては何らかの形で遺伝子発現制御に貢献できるものと考えられる。多くの miRNA の存在が明らかになった今、以前ジャンクと目されていた小さな RNA が、遺伝子活性を制御し、かつ遺伝子間ネットワークを形成する主役として、市民権を得る日もそう遠くないことかもしれない。



筆者 (西郷研究室にて)

プロフィール

1985 年東京理科大学大学院修士課程修了。チッソ株式会社研究員、主任研究員を経て、1999 年より現所属、助手、博士 (農学)。

善野修平

(東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻西郷研究室)

tmRNA にみる機能性 RNA の多様な役割

稲田 利文

(名古屋大学理学研究科生命理学専攻)

機能性 RNA は、遺伝子発現の様々な段階で重要かつ多様な役割を果たしている。タンパク質をコードしない低分子 RNA (noncoding RNA) が、転写やサイレンシング、RNA の修飾や安定性、翻訳制御に関与する例が、様々な生物において次々に明らかになってきている。また最近、RNA 自身が温度センサーとして機能する例や、低分子代謝産物と直接結合して翻訳を制御する例が明らかになり、'riboswitch' と呼ばれている (図)。RNA による新たな制御機構の可能性が、さらに広がってきている。

1996 年に Sauer らにより提唱された tmRNA による trans-translation 機構は、RNA の持つ機能的なポテンシャルに対する多くの研究者の興味を喚起した。この tmRNA の機能解析において、武藤先生と井口先生の研究室による先駆的な研究が非常に大きな役割を果たしたことは、言うまでもないことである。noncoding RNA の潜在的機能に着目し、早い時期に研究を開始された先見性を学びたいと思う。

tmRNA に関する私の研究の経緯について触れたい。92 年に学位を取得した後、現在の所属である名古屋大学理学部分子生物学科の饗場研究室に助手として赴任した。94 年頃から大腸菌におけるグルコース効果の代表例であるラクトースオペロンの発現抑制について、4 年生であった木全博士 (現富山県衛生研究所) と共に解析を行った。一般的な教科書には、グルコースによる cAMP の低下がラクトースオペロンの発現抑制の主因であると明記されている。しかしながら解析の結果、ラクトースリプレッサーによる負の制御がグルコース効果に必須であることが明確になった。一方、95 年に Friedman らは、tmRNA がラクトースリプレッサーに結合して活性を抑制するモデルを提唱した。この noncoding RNA による転写因子の活性制御という先駆的なモデルは、非常に魅力的であった。

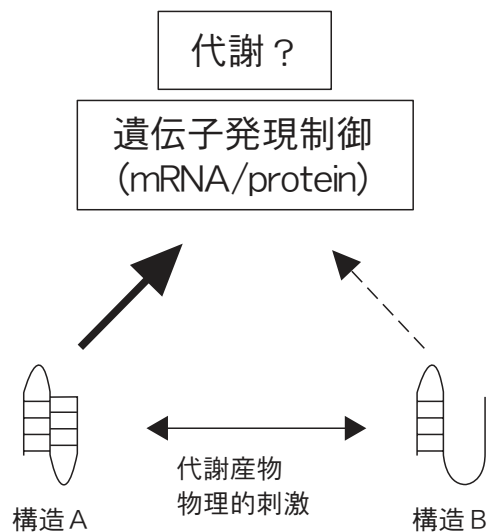
Sauer らにより trans-translation モデルが提唱された 96 年

当時、饗場研究室では田上博士 (海外休職中、ダナハーバー研究所中谷研所属) が中心となって、転写因子である *crp* の変異を数多く分離していた。終止コドン近傍のフレームシフト変異が発現量の異常な低下を引き起こすことから、この mRNA が tmRNA による trans-translation を受けることが予想された。井口先生より供与いただいた tmRNA をコードする *ssrA* 欠失変異株を解析した結果、この発現低下が

RNA 自身が温度センサーとして機能する例や、低分子代謝産物と直接結合して翻訳を制御する例が明らかになり、'riboswitch' と呼ばれている。RNA による新たな制御機構の可能性が、さらに広がってきている

tmRNA に起因することが判明した。この実験を契機として、饗場教授の指導により tmRNA の研究が開始した。私は、tmRNA の持つ非常にユニークな機能について驚くと共に、細胞内での遺伝子発現制御における役割について興味を抱き、tmRNA の遺伝子発現制御における役割について解析する機会を得た。

Friedman らは、tmRNA をコードする *ssrA* 欠失変異株においてラクトースオペロンの発現誘導が低下することを示し



Riboswitch モデル。代謝産物や物理的刺激に対応して RNA が 2 つの高次構造をとるスイッチの機能を持ち、発現制御を行う。シスの調節領域として機能する場合は明らかになったが、トランスに機能する機能性 RNA においても同様の機構が考えられる。

ていた。我々は、この現象は *ssrA* 欠失変異株におけるラクトースリプレッサーの発現の増加によっても説明できる、つまり *lacI*mRNA において trans-translation が起こる可能性を考えた。trans-translation の産物を同定する目的でプロテアーゼによって分解されない *ssrA* 変異 (*ssrADD*) を構築した。安倍博士 (現阪大医学系研究科) らにより *lacI* 遺伝子を保持するプラスミドを用いて、*lacI* mRNA において trans-translation が起こることが観察された。しかしながら、解析に用いたプラスミドはラクトースオペロンの全体を保持しておらず、細胞内での制御を反映しているか不明であった。

それまでのグルコース効果の解析から、ラクトースリプレッサーの結合部位であるオペレーターが *lacI* 遺伝子と一部重なる位置関係にあることを、我々は熟知していた。このことが、tmRNA が細胞内における遺伝子発現に関与する最初の例としての *lacI* の同定に繋がった。ラクトース非存在下では、リプレッサーがオペレーターに結合し自分自身の転写伸長を阻害する結果、終止コドンを含まない mRNA (ノンストップ mRNA と呼ばれる) がある頻度で形成される。この不完全な *lacI* mRNA が、tmRNA の標的となりカルボキシ末端の数残基を欠いたラクトースリプレッサーを排除する機構を想定するに至った。幸いにして、このアイデアを支持する基本的な結果が得られた。私の海外留学後、阿保博士 (岡山大理学部助教授) らによって継続して研究が行われ、論文が発表された。この *lacI* mRNA における trans-translation が、通常の遺伝子発現制御に tmRNA が関与する最初の例として認知されていることは、このストーリーに関わった研究者として大変嬉しく思っている。その後、転写の伸長阻害の結果生じたノンストップ mRNA における trans-translation の例が、複数発見されている。さらに饗場研究室では、1) サプレッサー tRNA による終止コドンの読み飛ばし (read through) の結果、通常の mRNA の 3' 端まで翻訳が進行した場合や、2) 翻訳終結効率を低下させるアミノ酸配列がカルボキシ末端に存在した場合に、終止コドンで起こると考えられる trans-translation など、新しい tmRNA の細胞内機能を明らかにしてきている。

tmRNA による trans-translation 機構は、不完全な mRNA を鋳型とした不完全な翻訳産物を排除する機構であるが、最近、真核生物におけるノンストップ mRNA 特異的な RNA 分解系が発見された。この分解系に 3' → 5' エキソヌクレアーゼを含むエキソソームが必須であることが示されているが、ノンストップ mRNA の認識を含めその詳細な分子機構は明らかではない。実際、ノンストップ mRNA を鋳型とする翻訳自体の解析が、真核生物においては殆ど行われておらず、現在解析中である。さらに我々は、tmRNA がノンストップ mRNA の分解に果たす役割についても新たな知見を得つつある。RNA の品質管理システムの生物種を越え

た普遍的な理解にも、tmRNA の研究が貢献できるのではないかと期待される。

私の留学中の研究の経緯について触れると、1998 年よりカリフォルニア大学バークレー校において酵母を材料とした翻訳研究を行い、核内キャップ結合因子 CBC と翻訳開始因子 eIF4G の相互作用を初めて明らかにする研究に携わった。この研究は、核内因子が翻訳開始に重要な役割を果たす可能性を明確に示唆していた。その後、石垣博士の Maquat 研における研究により、CBC に結合した mRNA が NMD (nonsense-mediated mRNA decay) を選択的に受けることが高等真核生物において示された。さらに前月号の特集で紹介されている様に、核内での mRNA の履歴 (nuclear history) が細胞質での運命 (cytoplasmic fate) を決めており、翻訳の制御を理解する為には、鋳型である mRNA 自体の形成過程の理解が非常に重要であることが明確になっている。酵母の細胞内における CBC と eIF4G の相互作用の役割は依然として不明であるが、特異的 mRNA の分解や翻訳の制御に関与する可能性を含め解析を進め、本特定研究に貢献したいと考えている。

温度変化や代謝産物の結合により、mRNA の調節領域の高次構造が変化して翻訳が調節される例が、最近原核生物において示された。この温度等の感知には、200 塩基鎖長の RNA により形成される、シュドノットを含む高次構造が重要である。RNA に転写されるゲノム情報の大部分は翻訳されない RNA であることを考えると、真核生物でも様々なサイズの機能性 noncoding RNA が、現在考えられているより遥かに多様な役割を果たしているかもしれない。また、現在主に知られている機能性 noncoding RNA による翻訳制御は、mRNA との相互作用による特異的な制御であるが、例えば翻訳因子やリボソームに直接作用する機能性 noncoding RNA による翻訳制御も考えられる。実際、核内低分子 RNA (snRNA) である 7SK が、転写伸長因子 P-TEFb に特異的に結合して活性を阻害していることが知られており、細胞内で翻訳因子やリボソームの活性を直接制御する機能性 noncoding RNA が存在する可能性は十分考えられると思う。また、代謝産物や温度等によって機能性 noncoding RNA の高次構造が変化し、翻訳や RNA の安定性が制御される例が今後明らかになるかもしれない。

遺伝子は DNA 上の一定領域の塩基配列により規定される遺伝的作用単位であるが、noncoding RNA の多彩な機能が次々と明らかになる最近の研究の進展を考えると、最終遺伝子産物としての RNA がタンパク質と同等の地位を得る日も近いのではないだろうか。ポストゲノム時代における "RNome" 解析の重要性は、ますます高まっている。



饗場研究室（最前列左端が筆者，最前列左から2番目が饗場弘二教授）

プロフィール

1992年東京大学理学系大学院生物化学専攻博士課程終了（指導教官，中村義一教授）。博士（理学）。1992年より名古屋大学理学部分子生物学科情報高分子学講座助手。98年4月より3年間カリフォルニア大学パークレー校に留学。帰国後現所属，助教授。

稲田利文

〔名古屋大学理学研究科
生命理学専攻〕

RNA Update

特集：生体防御機構とRNA ①

線虫 *C. elegans* そして RNAi

田原浩昭

〔国立遺伝学研究所
生物遺伝資源情報総合センター〕

この場では，筆者がモデル生物として用いている線虫 *C. elegans* に関して，そして *C. elegans* で最初に発見された RNAi 現象について徒然なる文章を記してみたい。

1) *C. elegans* について

Caenorhabditis elegans (シノラブディティス・エレガンス) は土壌に生息している非寄生性の線虫である。線虫がメジャーなモデル生物となったのは，S. Brenner が行動や発生を遺伝学的に解析するための材料として *C. elegans* を1965年ごろから使い始めたのがきっかけである。それ以前は，異なる線虫であるカイチュウが発生学における研究材料として使用されていた歴史があるが，あくまでマイナーな実験材料であったと思われる。線虫をモデル生物として用いている研究者は，*C. elegans* を「worm」，日本語では「虫」と呼ぶことが多い。

RNA ウイルスはその複製中に dsRNA 構造を持つことから，RNAi と類似した反応が RNA ウイルスに対する防御に働いていることは辻褃の合った話のように思える

ショウジョウバエ等とは異なり，線虫には目も無ければ羽も無く，手足も無いが，上皮組織，神経系，筋肉，消化管，生殖細胞という多細胞動物として基本的な体制が見受けられる。筆者は学部時代の終わりに，シンプルな生物を使っ

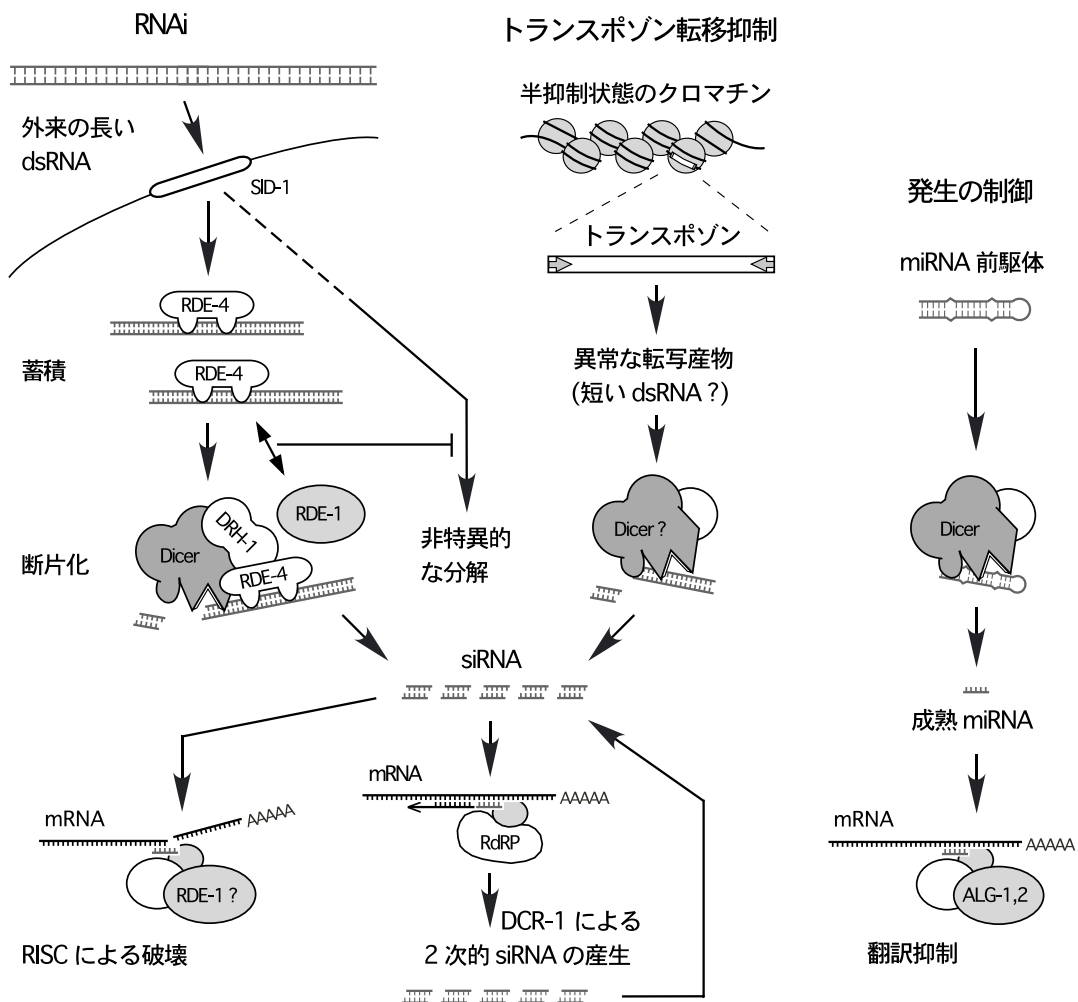
て研究をしたい，しかし真核の多細胞生物でなくてはと考えると，*C. elegans* を材料として用いている研究者を探してみた。そして，遺伝学研究所にできたばかりの小原研究室のドアを叩いたのが始まりと云うか運のつきで，いつの間にか10年以上にわたって *C. elegans* をモデル生物として研究を行って来てしまった。*C. elegans* のシンプルさから，なかなか離れられないわけである。

C. elegans の成虫は体長が約1mmであり，1世代は室温(20℃)で約3日半，餌が豊富な条件における寿命は2週間弱である。多くの線虫ではオスとメスが別個体である

のに対し、*C. elegans* においては集団中の個体の多くが雌雄同体である。雌雄同体は5対の常染色体 (I ~ V) そして1対の性染色体 (X) を持つ。雌雄同体に2本存在する性染色体がたまたま1本脱落すると、生まれた個体はオスになってしまう。ゲノム DNA のサイズは約 100Mb であり、大腸菌の 20 倍、ショウジョウバエの 1/2、ヒトの 1/30 であると考えられている。*C. elegans* はゲノムプロジェクトが最初に終了した多細胞生物であり、その結果として約 19,000 個の遺伝子が予測されている。ちなみにヒトの遺伝子数は *C. elegans* の約 2 倍と推測されているようで、扱っている実験生物よりはるかに高等であると思っていた筆者にとってはショッキングな事実である。

雌雄同体は自家受精によって約 300 個の卵を産む。*C. elegans* の卵および孵化後の個体は透明であり、得に胚発生が進んでいく様子は非常に美しい。ちなみに卵の大きさは

約 50 マイクロメートルであり、マウスの着床前の卵と同じぐらいの大きさと考えて欲しい。哺乳類であるマウスの卵は子宮中で大きく成長していくが、無脊椎動物である線虫の卵は孵化するまで 50 マイクロのまま卵殻の中で発生が進んでいく。*C. elegans* の卵は小さく孵化後の個体も比較的小さい、それゆえ細胞数も少ないという特徴がある。*C. elegans* の成虫における細胞数は、生殖細胞を除くと約 1,000 個である。細胞数が少ないということは、同じ種においてはどの個体を見てもほぼ同じ細胞系譜を示しつつ発生が進むことを意味する。*C. elegans* の発生における全細胞系譜は J. Sulston らによって記述されており、その論文における図を見ると、*C. elegans* における目的とする細胞の系譜を顕微鏡の下で簡単に同定できる気分になってしまう。しかしながら細胞の同定は容易な作業ではなく、*C. elegans* を用いた研究を始めてしばらくした頃の筆者は、細胞系譜がすぐわかると思って始めたけれども騙された（というか誤



線虫における RNAi および関連現象のモデル

RNAi (左), トランスポゾン転移抑制 (中央), miRNA を介した発生における翻訳制御 (右)。膜蛋白である SID-1 は、RNAi において dsRNA の効果が細胞間を移動する反応に必要である。RDE-4 は 2 コピーの dsRNA 結合ドメインを持つ蛋白であり、長い dsRNA の蓄積に関わっているようである。RDE-1 は PAZ および Piwi ドメインを持つ蛋白である。Dicer は RNase III 活性を持つマルチドメイン蛋白であり、長い dsRNA を短い siRNA に断片化する。RDE-4 は Dicer そして DRH-1 (dicer-related helicase) と強く、RDE-1 と弱く相互作用している。下流においては、siRNA を取り込んだ RISC (RNA-induced silencing complex) が標的 mRNA を認識して破壊すると考えられる。線虫においては、RdRP (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) が標的 mRNA を 2 本鎖化し、結果として 2 次的な siRNA を生じる反応があることも示唆されている。

解していた)と感じたものである。ちなみに最近では、顕微鏡の焦点を変えつつ時間を追って録画する4D解析が細胞系譜をたどるための実験技術として取り入れられてきている。ところで、全細胞系譜が記述されていることは、*C. elegans*が胚発生を研究するモデル生物として適していることを意味するのであろうか? 筆者は大学院時代に*C. elegans*の胚発生における母性 mRNA の役割を研究していたが、YesともNoとも言い難い。発生学の材料としては線虫の卵は小さすぎるようにも思える。しかしながら線虫においては、受精卵が不等分裂を繰り返し、どの割球が将来どの組織になるか24細胞期頃までにおおまかに運命決定されていくという特徴がある。このような胚発生初期のデジタルな現象を見ると、細胞運命がいかに決定されるかという発生学における命題を調べる良いモデルのようにも思える。

ところで、*C. elegans*の細胞系譜をたどると、発生の途中で消えて無くなる細胞を捕らえることができる。俗にいう、プログラム細胞死である。主にR. Horvitzのグループによって、プログラム細胞死が正常に生じなくなった線虫の変異体が同定されて解析されてきた。線虫で解明されてきたプログラム細胞死の機構の主要部分は脊椎動物においても保存されていることがわかり、筆者が大学院生の頃には非常にホットな話題だった。

*C. elegans*は行動遺伝学の材料としても盛んに用いられてきた。*C. elegans*の成虫は約300個の神経細胞を持ち、筋肉運動の制御や外界からのシグナルの受容に関わっている。神経はあるが脳と言えるほどの組織は無く、筆者から見ると線虫は何も考えていないように見える。ほとんど条件反射のためだけに神経系を持つように思えるのだが、幾つかの研究室の研究結果によると、記憶能力もほんの少しあるようである。

線虫における研究についてはその他にも幾つもの話題があるが、一つの区切りとも言える出来事がこの原稿を書く少し前にあった。線虫を用いた発生およびプログラム細胞死の研究に対して、S. Brenner, J. Sulston, R. Horvitzらにノーベル賞が与えられたことである。J. Sulstonと組んで*C. elegans*のゲノムプロジェクトを推進したR. Waterstonが入っていないのが意外であるが、彼には将来的にゲノムプロジェクトに関連してノーベル賞が与えられてもおかしくないと思われる。

2) RNAiについて

ここで、線虫において研究がスタートしたRNAi現象について書いてみたい。線虫の*par*突然変異体の原因遺伝子をクローニングするためにS. GuoとK. Kemphuesが行った

実験が、RNAi現象が認識されるきっかけとなったと言える。*par*突然変異が位置すると考えられる染色体領域中の複数の遺伝子クローンからRNAを*in vitro*合成して個体にマイクロインジェクションし、RNA導入による発現阻害が*par*表現型をコピーする遺伝子を探す実験を彼等は行った。不思議なことに、GuoらはアンチセンスRNAのみならず、センスRNAを注入しても標的遺伝子の発現阻害が起こることを見つけた。同様の実験手法を*mom*遺伝子群の解析に用いたC. MelloおよびJ. Priessのグループらは、古典的なアンチセンスRNAの作用モデルと区別する意味を含めて、線虫に外来RNAを注入した場合に生じる遺伝子発現の阻害をRNAi (RNA interference)と呼ぶことにした。さらにA. Fireらは、1本鎖であるアンチセンスRNAやセンスRNAよりも2本鎖RNA (dsRNA)を注入する方がRNAiを生じさせる上で効果的であることを発見した。線虫の研究をヒントにした結果、様々な真核生物においてdsRNAが遺伝子発現の阻害に有効であることが示されてきている。

RNAiは外来のdsRNAの導入に伴って生じる生理現象である。筆者はどのような分子機序によってRNAiは生じるのか疑問を持ち、RNAi現象を研究してきた。筆者らが最初に用いたアプローチは、RNAi活性が顕著に減少した線虫変異体*rde* (RNAi deficient)をスクリーニングすることであった。その遺伝学的解析から、動物においてRNAiに関与する因子として初めて*rde-1*遺伝子をクローニングすることができた。RDE-1は機能未知のPAZおよびPiwiドメインを持っており、RDE-1のホモログはその他の生物においてもRNAiおよび類似現象に必要とされているようである。引き続きクローニングした*rde-4*遺伝子は2本鎖RNA結合モチーフを持つ蛋白をコードしていた。生化学的解析の結果、RDE-4はRNAiに関与する蛋白因子の1つであるDicerおよび新規のRNAヘリカーゼ(DRH-1)と相互作用していることが判明した。

RDE-4等の果たす役割については、以下のように解釈している。RNAiの分子機序についてはショウジョウバエを用いた生化学的解析も行われており、その分子機序にはおおまかに2つのRNase活性が存在すると考えられてきている。導入された長い2本鎖RNAはRNase IIIモチーフを持ったDicerによってまず21~25塩基長の小さなRNA断片(siRNA)に分解され、下流においてsiRNAを取り込んだRISCと呼ばれるRNA-蛋白複合体が標的mRNAを認識して分解すると考えられている。線虫におけるRNAiの過程において、RDE-4はsiRNAより長い2本鎖RNAと相互作用しており、その長い2本鎖RNAの蓄積に*rde-4(+)*活性が必要であることを筆者は見つけている。それゆえ、RDE-4はRNAi機構の上流において細胞に侵入した直後の長い2本鎖RNAを検出して蓄積し、相互作用するRNase III様蛋白であるDicerに受け渡す役割を果たしていると考えて

いる。線虫における RNAi の分子機序について筆者が考えるモデルを図に示しておく。

RNAi 現象は遺伝子発現の阻害に有用であるが、RNAi を生じさせる分子機序の生理学的意義も興味深い。筆者らの線虫における研究によって、RNAi を生じさせる分子機序の一部はトランスポゾン転移抑制にも関与していることがわかった。トランスポゾンがコードする転移酵素の発現が、おそらく RNAi 類似反応によって抑制されているものと推測される。又、植物等における PTGS (post-transcriptional gene silencing) は RNAi と類似した現象であることがわかってきている。植物において PTGS を生じさせる分子機序の一部はウイルスに対する防御反応に関与しているようである。植物において同定されているウイルスの多くが RNA をゲノムとする RNA ウイルスであり、RNA ウイルスはその複製中に dsRNA 構造を持つことから、RNAi と類似した反応が RNA ウイルスに対する防御に働いていることは辻褃の合った話のように思える。又、小さなアンチセンス RNA (miRNA) が関与する発現における翻訳抑制現象においても RNAi と類似した反応が用いられていることがわかってきた。直接的か間接的にかは明らかでないが、分裂酵母におけるヘテロクロマチン形成やテトラヒメナにおけるゲノム

DNA の再編成にも RNAi 類似反応が関与していることが最近になって報告されている。

RNAi 現象の分子機序やその生理学的意義については新しい発見がなされ続けているが、新しい発見は新しい疑問を生み出しているようにも思える。さらなる新しい発見を求めて、しばらくは RNAi について研究を続けていこうかと考えている。



プロフィール

1996年 総合研究大学院大学遺伝学(遺伝学研究所)専攻修了, 理学博士。1997年よりマサチューセッツ大学においてポスドク研究員。2001年 徳島大学, 2002年より遺伝学研究所において学術振興会特別研究員(PD)。

田原浩昭

〔国立遺伝学研究所・生物
遺伝資源情報総合センター〕

RNA Update

特集：生体防御機構と RNA ②

RNA を介した細胞の抗ウイルス戦略に関する最近のトピック

櫻木 淳一

(大阪大学微生物研究所ウイルス感染制御分野)

はじめに

ある夏の日の昼下がり、先物取引の勧誘以外に滅多に電話など来ない貧乏研究者の私に突然かかってきた塩見さんからの電話で、このような原稿を書くことになってしまったわけだが、手に余るお仕事に正直苦しんでいる。

思い起こせば筆者はまだ修士課程の頃、京大ウイルス研をうろうろしているろくでなし学生であった(今でもろくでなしである)。そのとき既に活躍されていた塩見さんを時々お見かけして、まぶしく後ろ姿を拝見していたものがある(真っ白なテニスウェアでおられたせいだろうか)。それから幾星霜、今夏(2002年)の RNA 学会に初参加させていただいて、塩見さんに懐かしさで声をおかけしたところ、案の定「初めまして」と言われてしまった。ちょっと

めげたが実はこれこれで、まんざら初めてでもないのですなどと調子に乗って知り合い面をして悦に入っていたら原稿依頼が来てしまった次第で、人間、分にあった行動をしないとっぴ返しがあるものである。

筆者はそもそもウイルス屋であって、ウイルスの眼で生物を見つめるという大それた事を標榜して商売をしている身である(ウイルスに眼は無いが)。ウイルスは細胞に比べて構成要素が極端に少なく、筆者の研究対象であるレンチウイルスなど RNA ゲノムと 10 種足らずの蛋白によって形づくられているに過ぎないので、頭の構造が単純な筆者にはたいへんマッチした題材である。しかもウイルス屋の中でも今時珍しいくらいウイルスそのものに焦点を絞ってちまちま研究をしている変わり者なのに、塩見さんからいただいた主題は「生体防御機構と RNA」である。せ、生体防

御！どれほど複雑か想像もつかない。名も知らぬ数百の細胞内因子とそれを結ぶ数千の矢印が脳裏をむなしく駆けめぐるばかりである。頭を抱えてとりあえず web にすがろうと「RNA」「ウイルス」「生体防御」とキーワードを並べて Google 検索したら検索結果のトップはあろうことか自分の研究室のホームページであった。気付くと研究室の名称が「免疫・生体防御研究部門 ウイルス感染制御分野」なのだから当然と言えば当然なのだが自縄自縛、やんぬるかなである。腹をくくって自分の手の届く範囲で書いていくことにする。そのためでの悪い学生のレポートのごとくなったとしてもお許し願いたい。

インターフェロン (IFN), Toll Like Receptor (TLR) とウイルスの関係について

古くからウイルス感染に伴って感染細胞が抗ウイルス物質であるインターフェロン (IFN) を産生することは知られていた。

IFN を誘導する物質としてウイルス本体の他にリポポリサッカライド (LPS) や細菌類、そして二本鎖 RNA (dsRNA) などがある。dsRNA は IFN の作用した細胞内においても 2'-5' オリゴ A 合成酵素-RNaseL 発現系や dsRNA 依存プロテインキナーゼ (dsPKR) を活性化して mRNA 分解や翻訳抑制を誘導し、細胞の抗ウイルス状態を誘導する。dsPKR は dsRNA の二次構造を認識して二量体化し、自己リン酸化により活性化する。dsRNA は RNA ウイルス複製時にのみ細胞内で一時的に出現する (図) ので、これらの作用は主として IFN 発現後の細胞の抗ウイルス作用を説明するものであった。

しかし、ウイルス感染という現象下で dsRNA が細胞外やリソソームに存在する機会がそんなにあるだろうか

しかしながら dsPKR ノックアウトマウスでも poly(I:C) (dsRNA のモデルとしてよく合成 poly(I:C) が用いられる) に対する感受性が残存することから新規の dsRNA 受容体の存在が示唆されており、最近の報告でそれが Toll Like Receptor (TLR) の 3 型であることが指摘された (Nature 413:732, 2001)。TLR は動物の自然免疫系において病原体の特異的分子構造を認識する受容体として重要な役割を持つ膜貫通タンパクである。現在までに 10 種の型が報告されており、バクテリアの鞭毛蛋白・細胞壁や LPS 等を細胞外ドメインで認識して活性化し、細胞内領域で細胞内アダプター分子 MyD88 を介して最終的に転写因子 NF- κ B,

p38MAPKinase, JNK を活性化し、種々のサイトカインの発現を誘導する。報告では TLR3 発現細胞は poly(I:C) に反応して NF- κ B を多量に産生するが一本鎖 RNA や二本鎖 DNA には反応せず、poly(A:U) では弱く活性化する。また、TLR3 ノックアウトマウス由来のマクロファージは LPS には良く反応して IFN を産生するが

poly(I:C) 処理への反応は極めて弱い。このマウス由来の脾臓細胞は正常マウスと異なり、poly(I:C) やレオウイルス由来 dsRNA で処理しても活性化マーカーである CD69 の発現上昇が見られない等のことが示されている。

しかし筆者はどうも落ち着かない。TLR は細胞外に露出した領域で標的を認識するので、バクテリアの細胞壁成分や鞭毛成分が TLR の標的となっていることは非常に説得力がある。しかし、ウイルス感染という現象下で dsRNA が細胞外やリソソームに存在する機会がそんなにあるだろうか。動物ウイルスのゲノムはウイルス粒子の殻の中に入っ

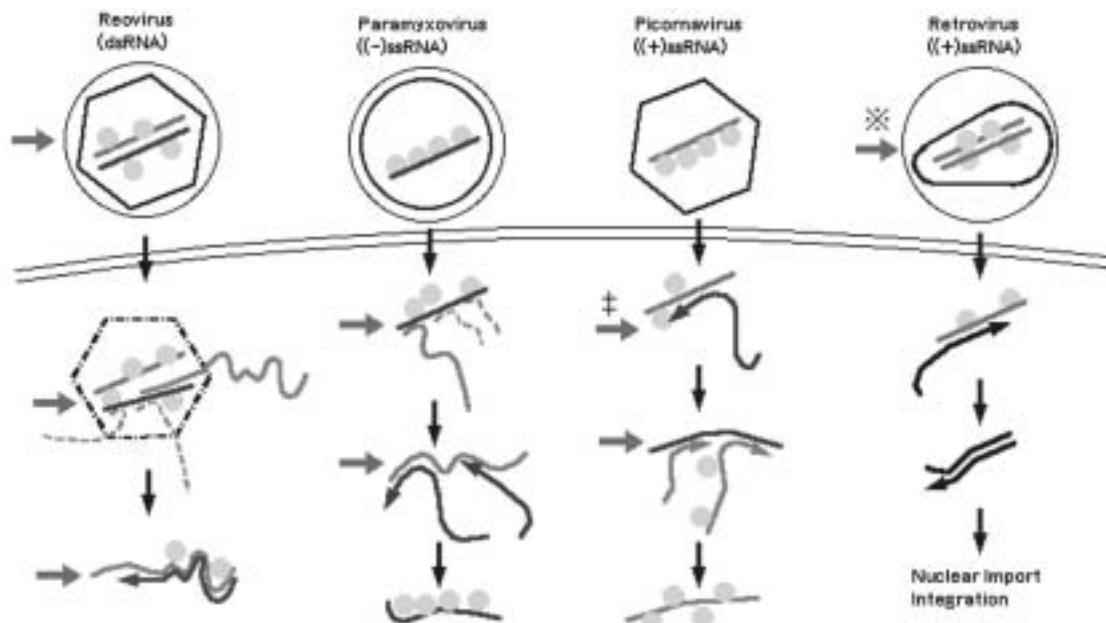


図: 様々なRNAウイルスのゲノム複製機構。dsRNA生成ポイントを → で示した。Reovirusのゲノム複製時を除き、実際に二本鎖になっている複製はRNA合成点近傍に限られると思われる。*レトロウイルスは相同な(+)鎖RNAが二量体化しているが、詳しい結合様式は明らかでない。*ピコルナウイルスのゲノムRNAはそのままmRNAとしても働く。
 — (+)鎖ゲノムRNA。—— (-)鎖ゲノムRNA。--- mRNA。—— dsDNA。● RNA結合ウイルス蛋白。

ていて、ウイルス由来核酸結合蛋白と複合体を作っているのだから、普通は細胞外に裸の RNA があるのは考えにくい。壊れたウイルスが大量に存在すれば裸の RNA も出てくるが、それはウイルス特異的の抗体反応やマクロファージ活性化によってウイルスが壊されている事を意味する。つまり獲得免疫反応が起こったあとで、TLR3 を介する自然免疫反応が起こっても遅いだろう。ウイルス粒子がリソソームに取り込まれ、壊されたときに dsRNA ゲノムが認識されるというモデルもありうる。しかしそもそも dsRNA ゲノムを持つウイルスはあまり重篤な病気を起こさないレオウイルスだけで、その感染はリソソームを介して起こるが粒子は壊されないのである。レオウイルス粒子はリソソーム中のタンパク質分解酵素の作用でいくつかのコンポーネントを失った subviral particles (SVP) となるが、その際 dsRNA は SVP 内にとどまったままで遊離しない。その後細胞質に入った SVP 内で転写が始まり、mRNA だけが SVP から抜け出ていく。一般にその他の RNA ウイルスが dsRNA を作り出すステップは細胞質で起こっている複製過程の一部に過ぎない(図)。RNA を鋳型として相補的 RNA を転写している時点で出現するのだから、いわば原盤でありさほど大量にあるわけではない。ウイルス感染により壊された細胞からこれらの複製過程の dsRNA が出て来るという可能性はあるが、細胞内外には RNase も多々あるはずで、それらに消化されずに認識される dsRNA がどれほどあるのだろう。消化されない RNA はおそらくウイルス蛋白等と複合体を形成しているから、裸の RNA とは構造の異なるそれらを TLR3 は認識できるのか。

TLR3 が細胞外の dsRNA を認識して最終的にサイトカインやインターフェロンを誘導するというストーリーは美しく、データに説得力もある。ただ、人工物で RNase 感受性や構造も天然の dsRNA とは異なる poly(I:C) や、通常存在し得ない裸のレオウイルス dsRNA を細胞外で認識させる(しかも 10-100 $\mu\text{g/ml}$ という濃度)という実験がそのままウイルス感染のモデルとして解釈されてしまうことに筆者は違和感を覚えるのである。ウイルス感染細胞や感染個体で、細胞外に裸の dsRNA が存在しているのか、あるならその濃度や安定性はどれほどかといった検討こそなされるべきではないかと筆者は感じている。

最近 Nod という新規の細胞質蛋白ファミリーが報告されている (Curr Opin Microbiol. 5:76, 2002) が、Nod は細胞質で LPS と反応して最終的には NF- κ B を活性化するという、細胞質内の TLR とでも言うべき機能を持っている。また、TLR4 は細胞表面だけでなくゴルジ体にも局在し、そこで取り込まれた細菌の LPS を認識しているという報告もある (J Exp Med. 195:559, 2002)。もしかすると dsRNA に対しても、このような細胞内でのレセプターが存在するのかも知れない。

HIV の Vif 蛋白と結合する因子について

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の Vif (Virion Infectivity Factor) 蛋白は HIV のアクセサリー蛋白であり、ウイルス粒子の感染性獲得に重要な因子だが、詳しい機能は未解明でいまだに議論がある(大事なことははっきりしている)ので Very Important Factor だという人もいるくらいである。vif 遺伝子は HIV ゲノムの中央付近に位置し、200 アミノ酸足らずの蛋白質をコードしている。Vif 蛋白は塩基性が強く、またプロリンに富んだ領域を介しての多量体形成能を持つ。こうした性質から大量発現・精製が難しいようで、いまだに Vif の構造を解いた論文は出ていない。

Vif の働きで特徴的なのは、許容細胞と非許容細胞があることである。Vif を欠いた HIV-1 プロウイルスからの子孫ウイルスは PBMC やマクロファージ、H9 や CEM のような一部の T 細胞系では増殖が出来ない(非許容細胞)一方、T 細胞系 C8166 や CD4 発現 Hela 細胞などでは野生株と同等の増殖能を持つ(許容細胞)。このことから Vif の働きには特異的な細胞性因子が関わっていると考えられていたが、ごく最近その因子が同定されたとの論文が提出された (Nature 418:646, 2002)。この報告によると、非許容細胞系 CEM のサブクローンを作成したところその中に許容細胞となった系を見だし、この二つの細胞系間で cDNA サブトラクションを行った結果、1 つの Vif 許容性の責任因子が同定され CEM15 と名付けられた。CEM15 は非許容細胞特異的に発現しており、Vif の有無にかかわらず HIV 粒子中に存在してウイルスの感染性を失わせるらしい。Vif は CEM15 との相互作用を通じて CEM15 の抗ウイルス作用を打ち消すのではないかと推測されている。CEM15 はマウスにオルソログがある以外、酵母・ハエ・線虫には類似の蛋白は見つからない。N 末側と C 末側がよく似た配列になっており蛋白全体が 2 つのタンデム構造になっているように見える。アポリポ蛋白 B-mRNA 編集酵素のサブユニットでシチジンデアミナーゼ活性を持つ apobec-1 や、機能不明の類似蛋白 phorbol-1 に対し相同性が認められ、また特に約 40 アミノ酸からなる亜鉛結合モチーフはこの種の活性を持つ酵素に特徴的で、ファージから人まで良く保存されている。この論文の著者らは CEM15 が細胞のウイルスへの自然抵抗性を担っているのではないかと考察している。

Vif と相互作用する細胞性因子があることは予想されていたが、それが RNA 編集 (RNA editing) 関連酵素であったことは何を意味するのだろうか。少し前に HIV-1 の mRNA は持続感染細胞中で RNA 編集を受けているという報告があった (Science 289:1564, 2000)。この中でシチジンデアミナーゼによると思われる C から U への編集も 1 カ所で見つかっており、こうした現象に CEM15 が関わっているのかも知れない。しかし目線を上げて、いままでの Vif に関する報告を眺めてみると話はそう単純ではない。Vif は論文の数だけ性質があるのかと思えるほど混沌としており、

少し挙げてみるとコアの安定性に関わる、プロテアーゼの活性に関わる、Gag と結合する、ウイルス RNA と結合する、逆転写の効率を上げるなど、なにやら百家争鳴の体である。一応コンセンサスとしてはウイルス産生細胞が許容細胞かどうかで感染性が決定する（プロデューサー依存）と言うことと、ウイルスが細胞に侵入した後の感染ステップに Vif の作用点があるということくらいだが、なにしろウイルス粒子中に Vif が取り込まれるのかどうかさえまだ決着していないのである。CEM15 の報告にしてもこの因子だけで完全に Vif への許容／非許容性をスイッチさせるには至らず、他の因子の存在も示唆されており、また CEM15 の酵素活性や Vif との物理的相互作用などについては何も示されていないのが現状であり、安易な考察は思わぬ隘路に入り込んでいく危険もある。

おわりに

何か持ち上げては貶しているような文章になってしまった。しかし筆者が言いたいのは、はっきりしていることは意外に少ないのだ、ということである。裏を返せば幾らでもやることは残っているのであり、ウイルス感染という事象はまだまだ魅力的であると筆者は思う（感染症はもう終わった学問だと授業で聞かされた方も多いとは思うが）。ウイルスと一口に言っても種によって実に様々な複製過程をとっており、それに対する細胞側の抗ウイルス戦略も

多岐にわたっていることが想像される。そのとき鍵の一つになるのはやはり RNA であろう。今後もこうした仕事は増えていくのは間違いなく、それに参加するにしても、読む側に居るにしても、misleading/misreading には注意深くありたい。言わずもがなだが様々な実験系で異なる結果が出ることは幾らでもある。どのような条件が実際の生理的環境を正しく反映するのかを見極めていくことも肝心と思う。



ラボにて。手はカップです（お皿の手は妻）。手のリボソームに対抗してみましたが、RNA とは関係ないことに気付き動揺しています。「カップ作りさえ一人では成り立たない、況わんや研究をや」という訓話にこじつけておきます。

プロフィール

1995 年阪大院医学研究科博士課程修了，医学博士。阪大微研助手，学振海外特別研究員 (McArdle Lab. of Cancer Res., University of Wisconsin-Madison)，医薬品機構ポスドク（東大医科研）を経て 2000 年より現所属，助手。

櫻木 淳一

大阪大学微生物研究所
ウイルス感染制御分野

RNA Update

特集：生体防御機構と RNA ③

大腸菌と T4 ファージの攻防

米崎 哲朗

(大阪大学大学院理学研究科)

助手として赴任した京都大学理学部植物学教室皆川研究室で初めて出会った T4 ファージは、大阪大学で過ごした学生・院生時代を通してあこがれの存在であった。数々の傑出した研究の舞台となり分子生物学の誕生へと導いた歴史的存在である。と同時に、ナノ世界の王者はたまた最高峰の芸術品として君臨するかのような T4 ファージの神秘的で精緻な姿は大なる魅力であった。その当時に始めた「T4 DNA 組換えタンパク質の同定」のため、野生型ファージと組換え遺伝子のナンセンス変異体について発現するタンパク質を比較した。野生型ファージがつくり出すタンパク質の内、組換え遺伝子変異体では消失またはサイズが短くなるタンパク質を同定できればその組換え遺伝子がコー

ドするタンパク質であると考えられる。20 年以上も前のことであるにも関わらず、T4 研究ではこのような実験は極めて簡単であった。T4 ファージ感染後の様々な時間帯に培養液へ放射性アミノ酸を与えて標識されるタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析するだけである。放射性のアミノ酸を与えると大腸菌内で合成途上にあるタンパク質を標識してくれる（つまり、その時点で発現している遺伝子が何かを教えてくれることになる）。また、当時から T4 の遺伝子は様々な時間帯に別れて発現することが知られていたので、興味ある遺伝子の発現時間帯が不明であるならば様々な時間帯について解析する必要があった。

実際に自らの実験で確認した T4 ファージの遺伝子発現は見事だった。T4 ファージのもつ 300 の遺伝子は感染前期、中期、後期のいずれかで発現するようにプログラムされており、これらの時期は約 5 分間隔で切り替わる。ファージ感染後 3-6 分、9-12 分、15-18 分のそれぞれ 3 分間に放射性アミノ酸を取り込ませる実験で、設定した 3 つの時間帯はそれぞれ前期、中期、後期に対応するため、たった 5 分違いの各時間帯で標識されるタンパク質の種類は大幅に異なっていた。即ち、T4 遺伝子発現パターンの鮮やかさが驚きだった。2 つ目の驚きは 3 分目からの標識でも宿主大腸菌の遺伝子発現が全く認められないことであった。これは T4 による宿主遺伝子発現の shut-off として古くから知られている現象であり、文献によると感染後 1-2 分で大腸菌の遺伝子は発現を停止するといわれている。何の特別な処理もほどこさずにただ感染菌の培養液に放射性アミノ酸を与えるだけで T4 の遺伝子発現を調べることができるのはこの shut-off のおかげである。

dmd 変異体の後期遺伝子 mRNA を切断するエンドリボヌクレアーゼには際立った特徴が認められる。RNA 上の何か特異的配列（または構造）を認識して切断する活性以外に翻訳に依存した切断活性をもつ。後者の活性は、RNA の或る領域が翻訳可能である場合にのみその領域内で切断が起きる

DNA 組換えの研究も 10 年を超した頃、T4 ファージのポストゲノム研究として未知遺伝子の一つに突然変異を導入したところ後期の遺伝子が発現せず増殖不能となってしまった。転写は正常であるものの分解活性が強いため翻訳に付される mRNA 量が著しく減少したのが原因であった。元々、この遺伝子 (*dmd*) は DNA 組換え研究の一環として始めたものだったのでまさに晴天の霹靂という展開となってしまった。しかし、あの見事な遺伝子発現パターンの背後には mRNA 分解活性が活躍するらしいことは十分に伝わってきた。かつて驚きをもって T4 の遺伝子発現パターンを眺めていた私にとって、この実験結果は押さえきれない興味を掻き立てることになった。

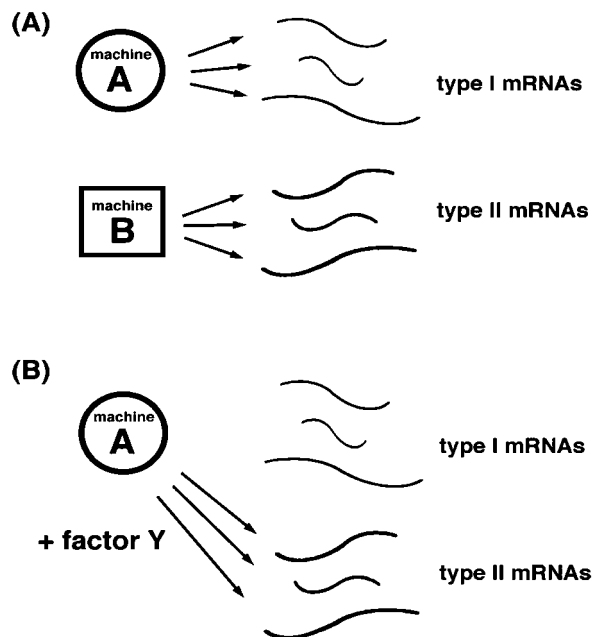
リボソーム結合エンドリボヌクレアーゼ

T4 の *dmd* 変異体では、安定なはずの後期遺伝子 mRNA が急速に分解されるため発現不能に陥る。しかも、一つや二つの遺伝子について生じる異常ではなく約 100 の後期遺伝子殆ど全てについて起こる。T4 の遺伝子発現レベルは高く、最も発現量の多いものでは感染菌抽出液の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動とクマジーブルー染色によって大腸菌由来タンパクの間に主要バンドの一つとして検出できるほどである。感染後期の大腸菌内で起きる転写活性は全て T4 の後期遺伝子に集中していることを考えると、ここに見られる mRNA 分解活性は大腸菌の転写活性を全てキャンセルしてしまうくらい強いものである。分解中間体を調べてみると、エンドリボヌクレアーゼによる mRNA 切断が原因であった。さらに、このエンドリボヌクレアーゼは大腸菌由来であることが判明した。大腸菌では mRNA 分

解に関与するといわれるエンドリボヌクレアーゼは 6 種類発見されており、それぞれの特性が詳しく調べられている。ところが、今回のエンドリボヌクレアーゼの特性を調べた結果と大腸菌変異体を用いた解析から、既知のどのエンドリボヌクレアーゼにも該当しないことが分かった。

dmd 変異体の後期遺伝子 mRNA を切断するエンドリボヌクレアーゼには際立った特徴が認められる。RNA 上の何か特異的配列（または構造）を認識して切断する活性以外に翻訳に依存した切断活性をもつ。後者の活性は、RNA の或る領域が翻訳可能である場合にのみその領域内で切断が起きる。また、翻訳終止コドンの下流で切断する活性も示す。翻訳に依存した活性を示すことと一致して、*in vitro* で一部を再現したこのエンドリボヌクレアーゼ活性はリボソームに結合していることが分かった。現在、エンドリボヌクレアーゼ活性を失った大腸菌の変異体を分離しマッピングを行っているが、変異は既知エンドリボヌクレアーゼ遺伝子のいずれとも異なる部位にあることが判明したので新規エンドリボヌクレアーゼであることは間違いないなさそうである。

このエンドリボヌクレアーゼが大腸菌に果たす生物学的意義については今後の解析をまたねばならないが、少なくとも T4 の mRNA を分解することで増殖を押しさえ込む抗 T4 効果をもっていることになる。一方、*dmd* 遺伝子はこの活性を抑制することにより大腸菌での T4 増殖を可能とする抗抗 T4 効果を示すという構図が描けるであろう。実際、*dmd* タンパク質は上述の *in vitro* 系において RNA 切断の阻害効果を示す。また、紙面の制約上割愛するが、長い間の



論争となっている「大腸菌 mRNA の分解を開始するエンドリボヌクレアーゼの正体」について、このエンドリボヌクレアーゼの発見は重要な手がかりを与える可能性がある。

大腸菌エンドリボヌクレアーゼと T4

抗 T4 効果をもつリボソーム結合エンドリボヌクレアーゼとその活性に対する抑制効果をもつ *dmd* タンパク質との明瞭な関係がみえてきたものの、事実は小説より奇なりである。T4 野生型の感染後期では、中期に発現した遺伝子の mRNA は素早く分解され発現停止に向かうのに対し、後期遺伝子の mRNA は安定に存在し発現を続ける。対照的に、*dmd* 変異体ではリボソーム結合エンドリボヌクレアーゼ活性により後期遺伝子 mRNA は急速に分解され発現不能となるのに対し、中期遺伝子 mRNA の分解速度は野生型の場合に比べ 1/3 に低下する。

中期遺伝子 mRNA を分解する活性を同定するために行った切断点の解析から、リボソーム結合エンドリボヌクレアーゼやその他既知のいずれのものとは明らかに異なる特徴をもったエンドリボヌクレアーゼの存在が示唆された。従って、さらに新しいエンドリボヌクレアーゼの姿が見えてきたのである。しかも、*dmd* 変異体ではこの活性が下がるという訳であるから、*dmd* タンパク質はリボソーム結合エンドリボヌクレアーゼとは反対にこのエンドリボヌクレアーゼに対しては促進効果をもつことになる。さらにややこしいのは、リボソーム結合エンドリボヌクレアーゼは専ら後期遺伝子の mRNA を標的とするのに対し、他方は専ら中期遺伝子の mRNA を標的とするような分業がありそのようなのである。

現時点では全くの想像に過ぎないが、図のような一般的関係が存在するのかも知れない。mRNA にはまだ解明されていないやり方でマークされる「タイプ」があり、mRNA 切断マシン A はタイプ I の mRNA を、マシン B はタイプ II の mRNA を標的として分解の開始を担う (図 A)。調節因子 X が作用するとマシンの活性は変化し、例えば A は抑制されたり或いは促進されるかも知れない。この考

えをさらに広げると次のようなことになるかも知れない。調節因子 Y が作用すると A は標的を変えタイプ II の mRNA (も?) をアタックするようになる (図 B)。逆に B がタイプ I を標的とするようになるかも知れない。勿論、細胞内には A、B 以外のマシンも存在するかも知れないし、mRNA のタイプももっと種類が多いかも知れない。

このような関係がリボソーム結合エンドリボヌクレアーゼや中期遺伝子 mRNA 切断エンドリボヌクレアーゼ以外についても実際に成立すると思われる例がある。前述のように T4 が感染した時、宿主遺伝子の発現は shut-off される。T4 感染後の大腸菌 mRNA の分解について調べたところ、感染前には $t_{1/2} \sim 30$ 分と安定であった *ompA* や *lpp* の mRNA が感染後には大腸菌デグラドソームと RNase G の作用により $t_{1/2} = 3$ 分の速度で分解された。一方、プラスミドを用いて導入した T4 の *soc* 遺伝子についての結果は逆になった。即ち、感染前にはデグラドソームと RNase G の作用により $t_{1/2} = 2.5$ 分と不安定であったにもかかわらず、感染後には $t_{1/2} = 30$ 分と安定化される。従って、T4 の感染によりデグラドソームと RNase G の基質選択性は大きく変化するのである。ちなみにこの場合の調節因子は T4 のゲノム上で *dmd* 遺伝子とは遠く離れた tk と呼ばれる領域内に存在する遺伝子がコードしていると思われる。

大腸菌との攻防

以上のように、宿主大腸菌がもつエンドリボヌクレアーゼをどのように防ぐ或いは制御するのが T4 の遺伝子発現において重要な意味をもつことが明らかとなってきた。しかし、この研究を振り返ると意外性の連続である。30 年にも渡る研究から、全て網羅されていたかのように思えた大腸菌の RNase に未発見のものがあるとは! しかも 1 つだけではなく、もしかしたら 2 つあるかも知れないのである。何故に長い間その存在を知られることもなく深い闇の中に潜んでいたのだろうか。今後の研究により、その謎を解きあかすことができた時こそモデル研究の真骨頂といえるだろう。思えば、我々は T4 ファージを武器として真実を解きあかすため大腸菌を相手に攻防しているのだ。



研究室の院生達と筆者 (中央左が筆者)

プロフィール

1978 年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了。同年より 1990 年まで京都大学理学部助手、現在は大阪大学大学院理学研究科助教授。

米崎 哲朗

(大阪大学大学院理学研究科)

ストレス応答としての RNA の切断・修飾-Ire1 の話

木 俣 行 雄

〔奈良先端科学技術大学院大学
遺伝子教育研究センター動物細胞工学〕

RNA とタンパク質の両方を用いて実験をしていますと、タンパク質というのはいかに凝集・沈殿しやすいものかということを感じさせられます。例えば、私たちの研究グループには、目的とするタンパク質が沈殿しやすく、半年以上も調製できずに困っている学生もいます。疎水性アミノ酸残基と親水性アミノ酸残基が入り交じって高次構造を形成しているタンパク質は、親水性の高いヌクレオチドの重合体である RNA に比べて、変性した場合に凝集して沈殿しやすいのは当然かもしれません。

タンパク質が凝集しやすいのは、実験室に限ったことではありません。熱ショックをはじめとするストレスが細胞に与えるダメージのひとつは、タンパク質の変性と凝集です。また、アルツハイマー病など神経難病にかんする最近の研究により、凝集したタンパク質は、単に機能を失うだけではなく、それ自身が細胞にとって「毒」であることが分かってきました。そして細胞には、変性タンパク質を元に戻し、もしくは分解するシステムが備わっており、その構成因子(分子シャペロンなど)はストレスに応じて発現誘導されます。

小胞体内在性分子シャペロンの発現誘導に、ユニークな RNA スプライシングメカニズムが関わっていることが示されたのは、1996年のことです。小胞体には多様な分子シャペロンが存在しており、新しく合成された分泌タンパク質の高次構造形成を担っています。膜貫通型エンドヌクレアーゼである Ire1 は、ストレスによる小胞体内部の異常に応じて活性化し、転写因子(出芽酵母の場合は Hac1)の前駆体型 mRNA のスプライシングを行います。それにより生成する成熟型 mRNA がコードする転写因子は、小胞体分子シャペロン遺伝子の転写を誘導します。これが、Unfolded Protein 応答です。

Unfolded Protein 応答という名前が示すように、この現象の引き金は、小胞体に蓄積した変性タンパク質であると考えられています。細胞質タンパク質に比べて、分泌タンパ

ク質はジスルフィド結合や糖鎖修飾を有していることが多い傾向にあります。よって、還元剤や糖鎖修飾阻害剤で細胞を処理すると、分泌タンパク質の高次構造形成が特異的に阻害され、効率よく Unfolded Protein 応答を引き起こすことができます。なお、小胞体に変性タンパク質を蓄積させ、Unfolded Protein 応答を引き起こすようなストレスを、小胞体ストレスと呼びます。

「小胞体内在性分子シャペロンのひとつである BiP が、Ire1 を負に制御する」という私たちの研究グループの知見は、変性タンパク質による Unfolded Protein 応答シグナル伝達経路の活性化を、うまく説明します。すなわち、小胞体ストレスが無い状態では、BiP が Ire1 に結合しており、Ire1

の活性を抑えています。一方、変性タンパク質が小胞体に蓄積すると、BiP はそれらに結合するため Ire1 から解離し、自由になった Ire1 は RNase としての活性を発揮します(詳細は図をご覧ください)。

Ire1 は真核生物全般(酵母、動物、植物)に存在しています。私たちの研究グループでは、哺乳動物と出芽酵母を材料に研究を進めていますが、そこで明らかになってきたことは、Ire1 の仕事は「転写因子の前駆体 mRNA のスプライシング」だけでは無いということです。

細胞に小胞体ストレスがかかった場合、Unfolded Protein 応答が起こるとともに、ほとんどのタンパク質の合成が抑制されます。これは、「タンパク質の正常な高次構造形成が出来ない状態の小胞体に、新たなタンパク質が流入するのを防ぐ」という意義があると思われます。私たちはほ乳類細胞において、その翻訳抑制のメカニズムとして、翻訳開始因子のリン酸化のほかに、Ire1 による 28S リボゾーム RNA 切断が起きていることを見いだしました。ほ乳類には Ire1 α 、Ire1 β と命名される 2 種類の Ire1 がありますが、この活性を持つのは Ire1 β だけです。さらに、Ire1 β にはアポトーシス誘起作用があります。この時の Ire1 β のターゲッ

Ire1 は、その活性が小胞体ストレス(外部からの刺激と内在性のものとの両方)や栄養状態により調節される RNase です。……私たちの Ire1 の研究が、「環境に応じた RNA の修飾による細胞機能の調節」という概念を、広げていければ幸いです

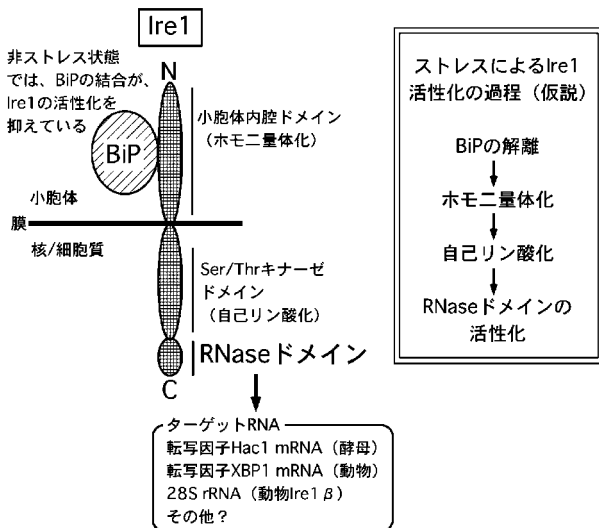


図 Ire1 の構造と機能

ト RNA は何か、目下のところ研究を進めております。

ここまでこの文章を読んでこられた皆さんの中には、「自然界ではどのような場面で Ire1 が機能するのか？」という疑問を持たれた方がいるかも知れません。もちろん、細胞が実験室以外で人工的な還元剤や糖鎖修飾阻害剤に曝される機会は、そう多くは無いはずですが。ヒトの疾患として異常タンパク質凝集体が形成されるものが多数知られており、Ire1 はそれらの形成防止や除去に寄与している可能性も考えられます。

一方、外部からのストレスが無くても、分泌が盛んな細胞は、小胞体へのタンパク質流入が過剰なためか、小胞体ストレス状態にあることが知られています。よって、小胞体ストレスへの対応がうまくいかないと、分泌が盛んな細胞は機能不全を起こし、死に至ることもあります。興味深いことに、Ire1β が多く発現しているのは、消化管の上皮細胞です。消化酵素を含むいろいろなタンパク質の分泌に、またその産生細胞の生存と死に、Ire1β がどのように機能しているか明らかにすることも、私たちの課題です。

出芽酵母でも、外部からのストレスが無い状態で、Ire1 の活性が見られます。それは、これまで述べてきたのとは異なり、培地の栄養状態のセンサーとしての活性です。培地中で増殖しすぎて栄養状態が悪くなると、細胞は増殖を停止し、その状態に適応するための遺伝子が発現します。

私たちは、栄養状態が良好な時にこれらの遺伝子の発現を抑えているのが、Ire1 であることを見いだしました。この場合、どのようにして Ire1 の活性が調節されているのか、また、Ire1 から下流にはどのようにシグナルが流れているのか、現在検討中です。

以上述べてきたように、膜タンパク質である Ire1 は、その活性が小胞体ストレス（外部からの刺激と内在性のものとの両方）や栄養状態により調節される RNase です。そして、Ire1 が行う RNA の切断は、スプライシングにより新しい RNA を生み出す過程である場合もありますし、単に切断するだけに見える場合もあります。私たちの Ire1 の研究が、「環境に応じた RNA の修飾による細胞機能の調節」という概念を、広げていければ幸いです。

また、本稿ではあまり触れることができませんでしたが、Ire1 のターゲットとなる RNA の挙動にも、興味深い点があります。例えば、Hac1 前駆体 mRNA のスプライシングは、ライゲーションを行うのは tRNA リガーゼであり、スプライスソーム非依存的なスプライシングと位置づけられています。また、Hac1 前駆体 mRNA そのもののユニークな挙動も、明らかになりつつあります。

Ire1 やそのターゲット RNA にかんするこれらのストーリーは、RNA 研究全体から見ると、「変わり種」かも知れません。しかし、まだ未解明な部分を含め、これらの分子が織りなす現象の意義は重要でかつ興味深いと信じており、これからも Ire1 やそのターゲット RNA が general interest を持って語られることを（そして、そこに私たちの研究グループが寄与できることを）強く願っています。



筆者と息子、実験を手伝わせています（うそです）

プロフィール

1993年、大阪大学大学院医学研究科博士課程修了、医学博士、1994年より、現所属。助手。

木俣 行雄

奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター 動物細胞工学

NMD っておもしろいの？

栗原 靖之

(横浜国立大学 大学院環境情報研究院)

1. 2002年 日本RNA学会 つくばにて

Y14, Magoh, Upf, . . . , 一見異なる様々な生物現象の中で NMD に関与する分子が発見され, NMD 研究は広がりを見せている。NMD(nonsense-mediated mRNA decay)は mRNA に変異が生じて本来のコーディング領域中に終始コドン (premature termination codon: PTC) が生じ, カルボキシル末端が欠失した有害なタンパク質を作らないように mRNA を分解する機構といわれている。NMD は進化的に極めて保存されているので生き物の生存に必須の分子機序であることは疑いない。しかし, 学会の熱気とは別に私は今ひとつ盛り上がる事が出来ない。なぜ? って, 「NMD っておもしろいの?」。この知的好奇心のためのモチベーションが高まらないからだ。

2. 「NMD っておもしろいの?」

主に外来遺伝子を導入した細胞株を使った人工的な実験系や遺伝子異常による疾患をモデルにして NMD は研究されている。これらは, NMD に関わる分子マシナリーとネットワークを生化学的に明らかにしてきた。しかし一連の研究は, 酵母でもヒトでも持つ NMD が “なぜ生じ, なぜ保存されてきたか?” という, 最も基本的な NMD の意義に関する疑問に答えることが出来ない。巷にあふれる総説書には「splicing 異常や免疫グロブリンの gene rearrangement によって生じた aberrant transcript の排除が NMD の生物学的標的であり, 意義である」と記載されている。しかし, この単純で不消化な記述は NMD の本質的な意義を見失わせている。免疫グロブリンの gene rearrangement の場合, 免疫システムを持つ生物の生理的標的としては一見適格に見える。だが, 進化的にみると免疫システムが発達している以前の生物にも見られることから免疫グロブリンの gene rearrangement による aberrant splicing の排除は NMD の二次的な機能として獲得したと考えられ, 「なぜ生じたのか?」の解ではない。さらによく考えてみると gene rearrangement で PTC が生じた場合, この転写物

種の前進的進化を促す遺伝子重複 (advantage) が必然的に生み出す偽遺伝子が, 生体の生存を脅かし, 種の繁栄を妨げる risk を軽減する機構として NMD を位置づける」ことを提案したい

が NMD で排除され, 抗体を産生することができなくなる。その B 細胞は生体内に留まるか細胞死を起こすのか, あるいは RNA editing でその PTC を別のコドンに置き換え機能的な抗体を産生する細胞に転換するのかと考えると, 話はさらに複雑になる。これを解くには, おそらくクローン選択などの免疫学の古典的概念を導入する必要があるだろう。一方, splicing 異常は, リボソームタンパク質の場合は高頻度で起こりうる事が示されているが, 一般的にどのくらいの頻度で生体内に起こっているかを示すデータは乏しい。このような不確定な予想に基づいて, いつ, どこに起こるとも知れない異常に対抗する機構として NMD の意義を疑いなく位置づけることができるだろうか? もちろん, これを否定するつもりはないが, 私には皆が信じる NMD の機能

が分子レベルの現象のみで語られたもので「生き物の視点」に立っていないように思えた。これらを吟味することなく NMD の生物学的重要性を本当に理解したことにはならないと思う。

生物学は比較の学問である。A と B を比べて, 違いを見だし, A と B は別の種であると規定する分類学から始まり, 様々な局面で比較という手法を使う。「違う (difference)」と言うこと

多様性 (diversity, heterogeneity) が重要な意味を持つ。また, 分子, 細胞, 個体のレベルに加えて種, 生態システム, それに進化的時間軸さえも研究対象になっている。このことは生き物の視点を持たない分子生物学の一部と大きな違いを持つ。こんな視点からもう一度考えてみよう, 「NMD っておもしろいの?」

3. 「NMD っておもしろいかも?」

種の進化はゲノムの進化と言い換えることが出来る。ゲノム進化の一つの大きな要因として 1970 年に故大野乾博博士によって提案された「遺伝子重複」が挙げられる (実験医学 2002 年 11 月号に故大野乾博博士のインタビューが掲載されている)。生物の進化は新しい環境に適応し生体を改変

していく作業だが、これには生命現象の根元、遺伝子を増やして機能を分担させることが必要である。そのため、生物は染色体の倍加や、ある染色体領域の重複等で遺伝子のコピー数を増やしていった。こうして重複した遺伝子の一方は本来の機能を維持するが、他方は進化的時間の中で新しい機能を獲得する自由度を与えられる。この自由度こそが、新たな創造の始まりである。事実、今日ファミリーを形成するタンパク質は、この過程で重複した遺伝子が新たな機能を獲得したり複雑な制御機構を可能にしたりするのに成功した例である。しかし、このように創造に成功したものはごく一部で、ほとんどの重複遺伝子は突然変異が蓄積し有害な産物を作り出す。また、転写発現調節領域に変異が導入されると組織特異的発現を示す遺伝子の発現パターンが乱れ生体システムの破綻を誘導するかもしれない。一般的にこのような遺伝子の転写活性は見られないと言われており、機能を喪失した遺伝子を「偽遺伝子」と呼んでおり、ヒトゲノム中には約2万個あると予想されている。この数は機能を持つ遺伝子数3-4万と比べると無視できない量である。「遺伝子重複」は種の進化に必要なメカニズム (advantage) である一方、常に生体を危機 (risk) に晒している。生物は、常に risk と advantage の和で、プラスになる選択をしている。それでも、生き物はあえて危険な道を進まなければ、種を繁栄させ新しい創造をすることが出来ない。その時 risk を軽減させることが出来れば、相対的に advantage を増大させ、さらに安全に新しい創造の場を生物種に与えることが出来る。このようなアイデアから私は、「種の前進的進化を促す遺伝子重複 (advantage) が必然的に生み出す偽遺伝子が、生体の生存を脅かし、種の繁栄を妨げる risk を軽減する機構として NMD を位置づける」ことを提案したい (図)。つまり、遺伝子重複によって生じた一方の遺伝子は有用な新規機能を持つばかりでなく、個体に悪影響を及ぼす可能性もある。将来的にこの悪影響を及ぼす遺伝子の転写活性を完全に抑え込み、安全に生存を保証することになるが、その過渡期には NMD を使って遺伝情報を遮断していると考えている。しかし、この遮断された遺伝情報も進化の一局面でしかなく、将来「災い転じて福となす」可能性を持つ。従って、その可能性を失わないようにその潜在的有用性を維持する手段として、一時的に遺伝情報を遮断するためにも NMD を利用しているのではないだろうか、と考えている。有害な欠失タンパク質の産生や発現特異性の乱れによる危険性は個体にとって一生晒され続ける risk である。NMD は個体、そして結局は種全体の存続と繁栄を脅かす risk を回避することにつながるだろう。

それでは、NMD の生体内の標的になる偽遺伝子は実際に存在するだろうか？ 私はこの問いに答えるための実験を始めたばかりである。この先、これが荒唐無稽なものか合理的なものかの判断が下るだろう。でも、このアイデアが、

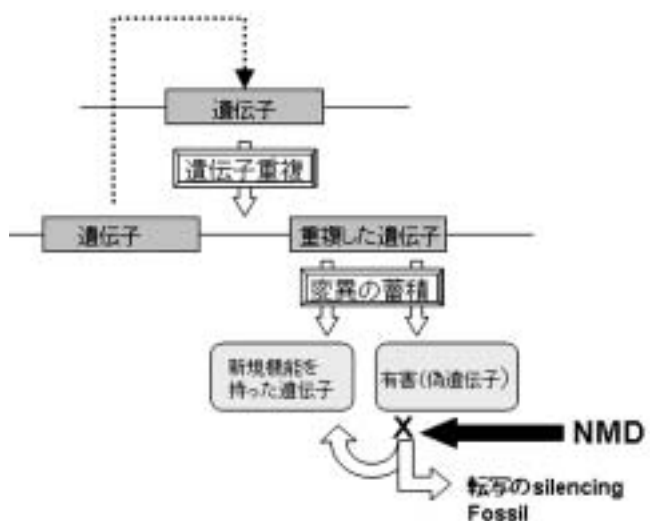
私にとって先に述べた知的好奇心のためのモチベーションを高めるのに十分なものであることだけは確かである。

私の部屋には一枚の写真が飾ってある (写真)。ネズミの口元にドイツの高名な遺伝学者 A.Gropp 教授が耳を当てて、ネズミが語ることを真摯に聞いているという構図だが、研究者は生き物が教えてくれることを注意深く聞こうということだと私は勝手に解釈している。人間が頭の中で考えられることに比べ、生き物が実際にやっていることは遙かに複雑で巧妙らしい。写真を眺めながら、今回のアイデアが正しいとしても、それは NMD のほんの入り口なのだと心を引き締めた。

と、ここまで書いたところで、2002年国際 RNA ミーティングで Wisconsin のグループが *C.elegans* の NMD の標的として偽遺伝子を同定していたことと、別のグループがほ乳類でも同様の結果を得ているらしいと言う話を横浜市立大学医学部の山下暁朗さんから聞いた。どんなに独創的なアイデアだと思っても「同じ事を考える人は世の中に3人はいると思いなさい」という私の恩師 (森脇和郎先生) の言葉を思いだした。

4. 「NMD をもっとおもしろくしよう！」

私は、学生時代、房総半島の山の中でニホンザルの社会構造を、そして大学院時代は国立遺伝学研究所の森脇和郎先生のもとで野生マウスの遺伝学を研究して過ごした。遺伝学では全ての生命活動を遺伝子転写のネットワークに帰結する傾向があるので、本来なら「遺伝子の転写制御こそが生命現象の根本だ」と言うべきところだが、どういう訳か道はずれて RNA の研究を始めた、いわば門外漢である。



NMD は遺伝子重複によって生じた偽遺伝子が有害なタンパク質を作らないように遺伝情報を遮断する。多くはゲノムに突然変異が蓄積し遺伝子の転写活性を喪失する。一部は新規機能を獲得する、又はさらに突然変異が蓄積して再び有用な新規活性をもった遺伝子に変わることがあるかも知れない。

しかし、この分野に新しい可能性を夢見ている。偽遺伝子がNMDの標的だという予想は、遺伝学を学んだものにとってそれほど意外なものではないと思う。しかし、分野が異なるとなかなか思いつかないことらしい。歴史が示すように、全くバックグラウンド異なる heterogeneity を持ったグループが共通のテーマー RNA 情報の時空間ネットワークを研究する意義は深い。クローズな community の行く末は、硬直した気風を生み学問を衰退させることは医学生物学のいくつかの学会を見れば明らかである。日本の RNA 研究が、常に医学、生物学、生化学、生物物理学などの heterogeneity を保ちつつ、柔軟に食欲に力を吸収して益々発展していくことを願っている。



本文中の A.Gropp 教授の写真と共に

プロフィール

1989年神戸大学大学院自然科学研究科修了、理学博士。日本学術振興会特別研究員、科学技術庁放射線医学総合研究所研究員を経て、1992年より横浜国大助手。途中ペンシルベニア大学医学部へ留学。

栗原靖之

〔横浜国立大学
大学院環境情報研究院〕

◆ 最近のトピックス① ◆

核内翻訳の復活

吉久 徹

(名古屋大学物質科学国際研究センター)

さて、みなさんが講義やセミナーのイントロで、真核生物を特徴づける核について述べる必要が生じたとき、核が存在する意義をどう説明するだろうか？「真核生物は核を持ったことによって、転写と翻訳の場を分けることができ、原核生物より複雑で高次の遺伝子発現制御が可能になった」と説明を切り出すのでは？どうも、何事も厳密に整理整頓されていた古き良き時代は、去りつつあるようだ。本当に、転写と翻訳の場は完全に区別されているのか？1999年のMangiarottiの細胞性粘菌を用いた解析の報告に続き、昨年 Science 誌に掲載されたIborra達の報文によって、上記の真核生物に関する「教義」は、変更を余儀なくされている。

核—細胞質隔絶の経緯

実は、意外なことに、核の中でタンパク質の合成が起こるのか、起こらないのかと言う論争は、決定的な決着を見ることなく、「なんとなく」先の教義が定着した、と言うのが真相のようである。核内翻訳に関わる近年の論文が必ず引用する論文に、1978年 Trends in Biochemical Science に掲載された J. A. Goidl と W. R. Allen の discussion forum がある。この時期、様々な生物・組織の細胞から調製した核画分の中に polysome があるとの報告がなされている。新規合成された RNA とタンパク質 (RNA-タンパク複合体 RNP) が密度勾配遠心上、polysome とおぼしき密度で遠心

されることから、こうした RNP は polysome であり、核に特異的なタンパク質を合成するのがその役割だとの主張がなされた。事実、核画分を用いた *in vitro* 翻訳反応は、細胞質由来の系と異なり翻訳開始・延長阻害剤 aurin tricarboxylic acid に耐性を示すこと、また、この polysome から *in vitro* 反応で産生される polypeptide のパターンも細胞質由来のものとは異なること等、が報告されている。これに対し、常に、細胞質、もしくは小胞体としても機能している核外膜からの polysome の混入がその原因であるという反論が成されており、Allen と Wilt (1975) は、ウニを用いた解析から、こうした核画分の翻訳活性は全翻訳活性の 0.2% にすぎないと主張した。また、先の discussion forum の中で Allen は、仮に全タンパク質の 1% が核内で翻訳されていたとしても、Hela 細胞では毎分 250 分子程度に過ぎず、生理的にはあまり意味がないだろうと述べていた。この議論は、「核内翻訳がない」と言うことを証明するのが論理的に難しい一方で、「核抽出液と呼ばれるものに、それ以外から混入した細胞質 ribosome がない」ということもまた難しいと言う、非常にフラストレーションの溜まる議論なのである。その後、タンパク質の核内輸送系の詳細が明らかになるなど、核内での翻訳の生理的意義自身に疑いが持たれるようになり、次第に核内で翻訳が起こることを重視する研究者は少なくなっていく。こうして、核と細胞質で、複製・転写と、翻訳とを分担するという教義ができあがったと思われる。

日の当たるところへ

この教義にほころびが見え始めたのは、全く別の分野での発見がきっかけである。すなわち、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) の発見である。NMD は、転写の誤りや splicing 異常によって誤った位置に終止コドンを持つ mRNA を分解し、異常タンパクの生成を未然に防ごうとする一種の品質管理機構である。このシステムは、成熟後の mRNA 上の最後の splicing site より上流にある終止コドンを検出できなくてはならない。特定の読み枠上の終止コドンを検出するシステムとは翻訳活性に他ならず、そのような活性を持つことが知られているのは、生体内では ribosome のみである。ほ乳類細胞では少なくとも一部の NMD は核内で起こっているという可能性が、複数の研究室から提示された。これによって、にわかに核内での翻訳活性が注目されるようになった。一方、Pederson と Politz はその総説の中で、生合成途上の 40S と 60S リボソームサブユニット、5S rRNP そして SRP のアセンブリーが、核小体で行われることから、これら翻訳に関わる RNP が正常に機能しうるかをチェックする品質管理が、核小体内で行われている可能性を示唆している。40S と 60S が会合し、さらに、SRP までもが相互作用しうる条件とは、やはり翻訳が起きている状態を想像せざるを得ない。

では、本当に核内翻訳は可能だろうか？ 前述の通り、ribosome のアセンブリーは、核小体で起こることが知られており、その構成成分は全てが核内に集積し、少なくとも 40S, 60S の核内前駆体は存在する。前駆体 ribosomal subunit が翻訳活性を持ちうることは、Mangiarotti と Chiaberge が 1997 年に報告している。また、翻訳開始因子、延長因子には、核-細胞質間をシャトルするものがあることが知られている。こうしたことからすると、核内には翻訳を行うために十分なタンパク質因子が揃っていると考えて良い。では、tRNA はどうであろうか。tRNA は核内でその成熟化が終了し、その aminoacylation が可能か否かをチェックした上で核外に輸送するというのが、世の中で一般に受け入れられている考え方である。とすれば、少なくとも核内には十分かどうかは別として、生合成途上ながら aminoacyl 化された tRNA が存在するわけである (後述)。むしろ、核内に翻訳を行うために足りないものは無さそうだ。

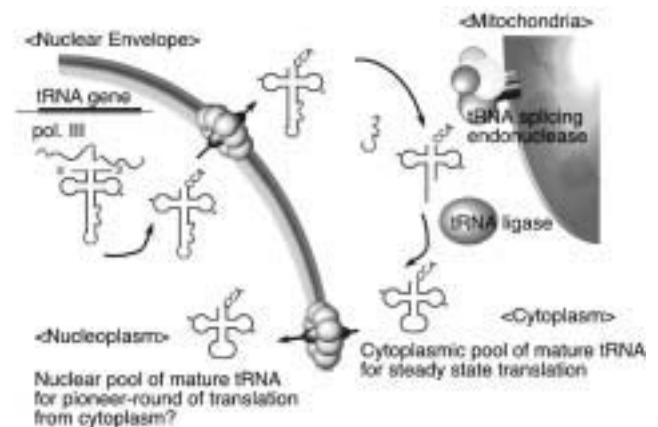
このような状況証拠を元に、Mangiarotti や Iborra らの論文が出てくると、いままで日陰に追いやられていた核内翻訳という考えが、俄然、息を吹き返すのも道理である。実際に、核内翻訳の生理的意義が核内タンパク質の供給では

実際に、核内翻訳の生理的意義が核内タンパク質の供給ではなく、核内での mRNA の品質管理にある、もしくは、ribosome 自身の品質管理にある、さらにはその翻訳開始に関わる因子の一部が異なるとすれば、細胞質と異なった性質を持つ mRNA-ribosome 複合体や翻訳活性も理解しやすい

なく、核内での mRNA の品質管理にある、もしくは、ribosome 自身の品質管理にある、さらにはその翻訳開始に関わる因子の一部が異なるとすれば、細胞質と異なった性質を持つ mRNA-ribosome 複合体や翻訳活性も理解しやすい。今後問題点は、核内翻訳がどれほど一般的なものか、また、その生理機能は本当に NMD に関わるものなのか、と言った方面へ広がってゆくであろう。

tRNA 成熟化の不思議

我々のグループも、この核内翻訳に興味を持ち、酵母を材料に研究を開始している。我々の興味は、むしろ核内翻訳に必要な tRNA の挙動にある。先ほど、tRNA の成熟化は核内で起こると考えられていると述べたが、我々のグループは、酵母の tRNA splicing endonuclease が核内ではなく、ミトコンドリア表面に局在していることを見出した。また、この splicing endonuclease の変異体の解析から、tRNA 前駆体が積極的に細胞質へ運ばれていることを示すデータも得ている。こうした事実は、核が、翻訳システム全ての製造・品質管理を一手に引き受けているという、前述のイメージに逆らうものである (どうも、こうした主張は、Journal の Editor の意向にも逆らうものらしいが…。)。しかし、P. Walter のグループは、tRNA と類似の機構で司られるユニークな *HAC1* mRNA の splicing が細胞質で起こると報告しており、両者に共通の因子である tRNA ligase が実際に細胞質で働いている可能性を明らかにした。tRNA の splicing に関わる酵素の局在に関するこ



核内翻訳に必要な tRNA はどのようにして供給されるのだろうか？ 核内翻訳に必要な tRNA は、現在のモデルからすると、合成途上で核外輸送前の tRNA が使われると考えられる。しかし、我々は、酵母の前駆体 tRNA のスプライシングの第一段階、即ち、exon-intron junction の切断を、ミトコンドリア外膜サイトゾル表面に存在する tRNA splicing endonuclease が司ることを見出している。もし、前駆体 tRNA が核外で成熟化するとすれば、細胞質から核質へという成熟体 tRNA の輸送経路が必要になってくるはずである。

うした結果は、tRNAの成熟化と細胞内での機能が、以前我々が考えていたよりずっとダイナミズムに富むことを示唆しているようだ。RNAの成熟化も、核質と細胞質の協力の上にことが運ばれ、かつ、その機能も両者にまたがる可能性は十分考えられる。少なくとも、酵母のような細胞では、アフリカツメガエルの卵母細胞などに比べて、異なった成熟化過程があるかも知れない。こうしたことを踏まえると、核内翻訳に供されるtRNAは、必ずしも全てが生合成途上の、それ自身が品質検査を受けるべきものではない可能性、即ち、細胞質から供給されている可能性も考慮しても良いと思われる。考えてみれば、もし、核内翻訳がmRNAの品質管理機構であるとすれば、そのチェックを行うための「機材」は、むしろ完成品であるべきだ。

このようなタンパク質世界の例では、どうも品質管理機構は、異常なタンパク質をそれがもともとあるはずだった場所から追い出すのに人手（因子）と労力（ATP）をかけているように思える。RNA WorldやRNP Worldではどうであろうか？

勿論、核内翻訳とNMDの関係に関して、まだまだ、征服すべき高い山が残っている。例えば、mRNAの品質管理であるとすれば、翻訳能をもったmonosomeでも十分であり、核内に存在すると思われるmRNA-ribosome複合体は本当にpolysomeなのか？翻訳の際にmRNA上に結合している様々なexport因子は、どのようにしてmRNAから外れずに結合しているのか？こうした核内翻訳に関わるribosome自身、生合成途上の前駆体なのに、そのような未成熟なものでも何故機能するのか？我々が提起しているtRNAの供給の問題に加え、こうした問題が解かれる中で、核内翻訳が市民権を得てゆくものと思われる。

近年の細胞生物学の進展に伴って、様々な細胞内部位でのタンパク質品質管理機構の存在が明らかとなっている。上述のように、RNA WorldやRNP Worldでも、NMDを始めとして、様々な局面での品質管理の重要性が指摘されるようになった。タンパク質世界の場合、品質管理機構の発見は、予想外の細胞内タンパク質輸送・膜透過現象の発見につながってきた。例えば、小胞体ではフォルディングや複合体形成に失敗したタンパク質は、

小胞体特異的品質管理機構により、それ以上先の分泌系オルガネラに進むことなく分解される。このERAD (ER-associated degradation)におけるタンパク質分解は小胞体内腔で起こるのではなく、細胞質のproteasomeで行われることが明らかとなっている。この場合、分解されるべきタン

パク質は、自らが入ってきた小胞体膜透過装置 (Sec61複合体) を逆方向に輸送されることによって、細胞質に達する。他方、複合体形成に失敗したミトコンドリア内膜の膜タンパク質の品質管理では、FtsHファミリーのAAA ATPaseが重要な働きをする。面白いことに、原核生物においても保存されているFtsHは、内在性膜タンパク質を端から膜から引きずり出して分解する活性を持っていることが最近分かった。さらには、この分解産物は、MDRタイプの輸送体によってミトコンドリアマトリックスから最終的にはサイ

トゾルまで運ばれることも明らかとなっている。このようなタンパク質世界の例では、どうも品質管理機構は、異常なタンパク質をそれがもともとあるはずだった場所から追い出すのに人手（因子）と労力（ATP）をかけているように思える。RNA WorldやRNP Worldではどうであろうか？mRNAの品質管理がその予兆となって、現在、世を再びにぎわしている核内翻訳も、それに付随して、核膜を介した未知のRNAの流れを明らかにしてくれるかもしれない。そのような発見の一端を担うことができればと思いつながら、ピペットマンを握る時間をやりくりする今日この頃である。



プロフィール

1984年東京大学卒業、
1989年同大学大学院博士課程修了（理学博士）。カリフォルニア大学バークレー校ポスドク、京大助手を経て、1996年より現所属、助教授。

吉 久 徹

〔名古屋大学物質科学
国際研究センター〕

◆ 最近のトピックス② ◆

RNA シャペロン

片 平 正 人

(横浜国立大学大学院・環境情報研究院)

1. 不幸(?)の電話

それは私への1本の電話から始まった。プルゥー、プルゥー、「はい、片平ですが」、「徳島大学の塩見です」。お、これはもしや塩見さんからの共同研究のお誘いの電話か、と私は瞬間思った。数週間前のRNAミーティングで、脆弱X症候群の原因遺伝子の産物であるFMR1タンパク質とその標的と目されるRNA4重鎖との相互作用に関して、共同研究を行う相談をさせていただいていたからである。しかしこの予想は塩見さんの次の一言ですぐに覆された。

「RNA シャペロンに関して、ニュースレターに何か書いてほしいのですが」。あ、これはいわゆる不幸の執筆依頼電話か。恐れていたものが来たか。これが私の正直な感想であった。「RNA シャペロンについて何か書けと言われても…」と尻込みする私であったが、塩見編集長の巧みな説得によって数分後には、「承知致しました。それでは何か書かせていただきます。」と答えていた。電話を置いてしばし呆然。この世界、仁義を欠いては生きてはゆけぬ。それにしてもどうまとめたものか。とにかく、まず文献調査をしてみよう。こうしてこの「RNA シャペロン」の稿が動き出す事となった。

2. いわゆる“シャペロン”とは

シャペロン(chaperone)とは、社交会にデビューする若い未婚女性の付添い人のことで、社交上の礼儀作法を指導・監督する役目を担っている。さて翻訳によって生合成されたタンパク質が機能を発揮する為には、正しい立体構造を形成(フォールディング)する事が必要である。しかし生体内では往往にして、誤った立体構造形成(ミスフォールディング)や凝集(アグリゲーション)が生じ、タンパク質が独力ではフォールディングできない事がある。このような時にタンパク質のフォールディングを助けるものの事を、生命科学の分野では“シャペロン”と呼ぶ。なおシャペロン自身も巨大なタンパク質である。特によく知られているシャペロンに、大腸菌のGroELとGroESがある。GroELの14量体とGroESの7量体はドーナツ状の構造体を形

成し、これがタンパク質と相互作用して、フォールディングを助ける。

立体構造の解析等の目的であるタンパク質(例えばRNA結合タンパク質)を大量に得たい時、大腸菌を用いた大量発現系がよく使われる。しかし発現したタンパク質が大腸菌内でミスフォールディング・アグリゲーションしてしまい、活性のあるタンパク質が得られないという事がよくある。このような際、大腸菌内にシャペロンも大量に発現させると、フォールディングが助けられ、活性のあるタンパク質を取得できるようになる事がある。このように、実際的な意味でシャペロンのお世話になっている研究者は少なくない。

“RNAには致命的な問題がある”。それは、RNAは誤った立体構造を形成し、そこにトラップされてしまい、正しい立体構造の形成に至らないという事があまりに容易に起こるという事である

3. “RNA シャペロン”とは

前項で述べたように、“シャペロン”というと通常は、タンパク質のフォールディングを助けるものの事を指す。一方“RNA シャペロン”とは、RNAのフォールディングを助けるものの事を指す。RNA シャペロンも、その実体はタンパク質である。生体内では様々な種類のRNAが、多様な生物学的機能を発揮している。タンパク質が機能を発揮する時と同様に、

RNAがある機能を発揮する為には、正しい立体構造を形成する事が必要となる。しかし“RNAには致命的な問題がある”。それは、RNAは誤った立体構造を形成し、そこにトラップされてしまい、正しい立体構造の形成に至らないという事があまりに容易に起こるという事である。これはRNAの立体構造の形成が、AはUと、そしてGはCと対合しさえすればよいという極端に単純なルールに、かなりの部分支配されている事による。RNA中のある短鎖断片が2重鎖を形成し得る相補的な短鎖断片は、同一RNA中に多数存在し、この為容易に誤った相手と2重鎖を形成してしまう。さらにA:U及びG:C塩基対以外の非標準型の塩基対が安定に形成される事もあり、正しい相手を見つける事は至難の業である。そしていったん誤った構造が形成されてしまうと、正しい構造へ移行する為に越えなければ

ならないエネルギー障壁が高く、現実問題として、生体内でこの移行を行う事が不可能となってしまう。しかしこれでは困る。そこで登場するのが RNA シャペロンである。

hnRNP A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) タンパク質は、相補的な RNA2 重鎖の形成及び解離を促進する作用がある事がわかった。また HIV-1 のヌクレオキャプシドタンパク質には、ハンマーヘッド型リボザイムとその基質 RNA との 2 重鎖の形成および解離を促進する作用がある事もわかった。さらに種々の RNA ヘリカーゼタンパク質は、ATP の加水分解によって得られたエネルギーを用いて、ミスフォールドした RNA をほどく事が想定されるようになった。これらのタンパク質は皆 RNA シャペロンであると考えられる。ただこれまで *in vivo* で生理的に意味のある作用を果たしている RNA シャペロンは見出されていなかった。しかし今年になって CYT-19 というタンパク質の機能の研究から、この壁がのり越えられた (例えば *Cell*, 109, 797-800, 2002 参照)。CYT-19 は *in vivo* において ATP の加水分解のエネルギーを用いて、ミスフォールドした RNA2 重鎖をアンワインド (巻き戻し) する事で正しいフォールディングの形成を助け、その結果スプライシングを促進する事が見出された。こうして RNA シャペロンという概念及びその重要性が認知されるようになった。DNA 上の遺伝情報は、RNA に姿を変える事で実際に躍動を始めるが、遺伝情報の伝達者や執行者として RNA が機能する為には、介添者 RNA シャペロンの力添えが時として必要になる。

4. 私と RNA シャペロンとの接点

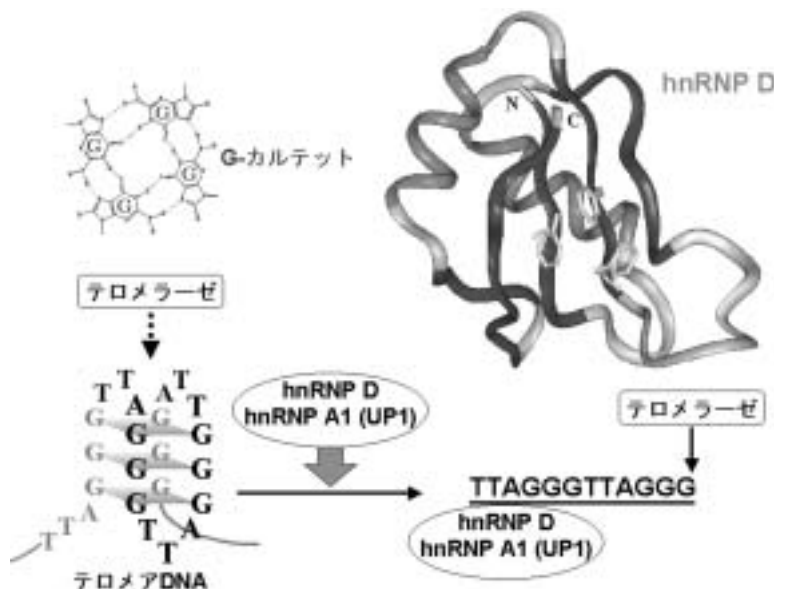
我々は hnRNP D (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) というタンパク質の立体構造の決定と、RNA 及び DNA との相互作用の解析を行ってきた。hnRNP D は m RNA のスプライシングやデグラデーションへの関与、さらにテロメア DNA の維持への関与等が実証もしくは示唆されているタンパク質である。hnRNP D の標的 RNA の 1 つに r(UUAGGG) がある。我々はこの RNA が生理的イオン条件下で 4 重鎖を形成する事、そして hnRNP D はこの 4 重鎖をほどいて 1 本鎖に構造遷移させる事を見出した (*J. Mol. Biol.*, 287, 221-237, 1999)。この RNA が生理的機能を発揮する為には、4 重鎖ではなく 1 本鎖構造をとる方が適当であると考えられている。従って hnRNP D は、あたかも RNA シャペロンとして働いているかのようである。

5. “DNA シャペロン”

我々は hnRNP D は、テロメア DNA が生理的イ

オン条件下で形成する 4 重鎖構造をほどいて 1 本鎖構造に遷移させる事も見出した (先述の論文及び *J. Mol. Bio I.*, 311, 973-988, 2001)。染色体末端のテロメア DNA は、複製のたびに短くなってしまう。テロメラーゼという酵素が、短くなった DNA を再び伸長してくれる。テロメア DNA を *in vitro* で生理的イオン条件下に置くと 4 重鎖構造を形成するが、4 重鎖が形成されてしまうと、テロメラーゼは伸長反応を行えなくなってしまう事がわかっている。hnRNP D は、4 重鎖 DNA を 1 本鎖状態に移行させる事で、テロメラーゼが働ける環境を保証していると考えられる。こうしてみると hnRNP D タンパク質は、DNA を正しいフォールディングへと導くあたかも “DNA シャペロン” として機能している (図参照)。

さらに我々は国立癌センターの福田博士、中釜博士等との共同研究で、hnRNP A1 タンパク質が、ミニサテライト DNA やテロメア DNA が形成する 4 重鎖構造をほどいて 1 本鎖状態にする事も見出した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12685-12690, 2002)。このミニサテライト DNA は *in vitro* において生理的条件下で 4 重鎖構造を形成し、それが障害となり DNA の複製がこの部位でストップしてしまう。しかし hnRNP D によってこの 4 重鎖をほどいてやると、DNA の複製はストップする事なく進行するようになる。つまり hnRNP A1 も、DNA シャペロンとしての機能を有していると考えられる。一方テロメア DNA との関連では、hnRNP A1 を欠失するとテロメア長が短くなる事、そして hnRNP A1 をもどすとテロメア長が再び長くなる事が報告されている。先の hnRNP D 同様に hnRNP A1 は、4 重鎖を



hnRNP D タンパク質及び hnRNP A1(UP1) タンパク質の “DNA シャペロン” 効果複製のたびに染色体の末端のテロメア DNA は短少化するが、テロメラーゼによる伸長反応により元の長さが維持される。しかしテロメア DNA が 4 重鎖を形成してしまうと、テロメラーゼは伸長反応を行う事ができない。hnRNP D 及び hnRNP A1 は、DNA の 4 重鎖構造をほどき 1 本鎖状態に移行させる事で、テロメラーゼが働ける環境を保証していると考えられる。

ほどく事で、テロメア DNA に対しても DNA シャペロンとして機能していると考えられる。

1 本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) や recA タンパク質が、2 重鎖 DNA を不安定化する事で 1 本鎖 DNA の再結合

を促進する事は以前より指摘されていた。言ってみればこれらは DNA シャペロンのほしりである。先に述べたような DNA シャペロンの新たな実例が今後さらに見出され、DNA シャペロンの重要性も認知されるようになるかもしれない。



研究室のメンバーと。後列右端が筆者。

プロフィール

1989 年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了、理学博士。日本学術振興会特別研究員、ヒューマンフロンティアサイエンス・ポスドク、横浜国立大学工学部講師、助教授を経て 2001 年より現所属。助教授。

片平 正人

(横浜国立大学大学院
環境情報研究院)

◆ 随筆：RNA and I ◆

10 ミクロンの小宇宙

谷 時雄 (熊本大学理学部生物科学科)

「わあー、きれい！」
子供のはずんだ声につられてふと空を見上げると、そこはすいこまれそうな満天の星空であった。

私の郷里は中国山地の寂れた山里にあるので、けばけばしいネオンサインもなく、天気の良い夜には、普段目にする事のない、手をのばせば届きそうな天の川を見ることができる。

空を見上げながら、ゆっくりと寝ころぶと、背中の方から屋間の太陽をたっぶりすいこんだ大地のぬくもりが伝わってくる。

澄んだ夜空のなかを横切るように、星光の一つがすーっと動いていくのが見える。飛行機にはジェット音が全く聞こえてこないの、人工衛星だろうか？

寝ころんだまま、美しくまたたく、数えることはできそ

うもないたくさん星々を見ながら、はるか何万光年のあなたに存在する星雲の運命に思いを寄せる。

本稿に添えた図 1 はハッブル宇宙望遠鏡が捉えた NGC6826 星雲と OH231.8 星雲の姿 (Nature, 417, 2002) であるが、実は、この図には、熱ショックストレスを与えた分裂酵母の核内 mRNA 分布を可視化した蛍光画像と、スプライシング因子 SC35 に対する抗体で蛍光染色した HeLa 細胞核の画像も含まれている。

読者の皆さんは、どの画像がどれに対応するかすぐにわかりましたか？はるか何万光年の彼方でひかり輝く星雲群に負けず劣らず、蛍光顕微鏡の下で観察するときの核内 mRNA や、スプライシング因子の蛍光画像は本当に美しく、幻想的である。

現在、我々は mRNA の核から細胞質への輸送機構と、その制御システムに興味を持ち、研究を進めている。真核細

胞における最大の特徴は、言うまでもなく、細胞内に核膜に包まれた核構造が存在することである。核膜の存在によって、遺伝子の保存と転写の場である核と、タンパク質への翻訳の場である細胞質が空間的に隔てられるので、DNAから遺伝情報を転写した mRNA を核から細胞質へと運ぶプロセスは、真核生物の遺伝子発現において必須な過程となっている。しかし、その詳細な分子機構や制御の仕組みには未だ謎が多い。

我々の mRNA 核外輸送機構に関する研究は、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の変異株を用いて、pre-mRNA スプライシングの分子機構を解析する研究の延長線上にある。我々はスプライシング反応に関与する新しい因子群を同定することを目的として、分裂酵母のスプライシング変異株を分離し、解析を進めていた。しかし、残念ながら、酵母スプライシング変異株の解析に関しては、海外の研究グループが既に出芽酵母を用いて大規模に行っていることを知っていたので、二番煎じ的研究になる可能性があった。

そこで、スプライシング機構の解析に続く、先を見込んだプロジェクトとして、当時ほとんど研究対象になっていなかった、スプライシング後の成熟 mRNA の核外輸送機構に着目し、バングラデッシュからの留学生 A.K. Azad 君と共に新しい実験に着手した。思えば、今から 12 年前にもさかのぼる 1990 年春のことであった。

我々はスプライシング変異株を分離するために、生育に関する分裂酵母の *ts* 変異株バンクを作成していた。そこで、その *ts* バンクの中から、mRNA の核外輸送に欠損を示す温度感受性変異株をスクリーニングすることを計画した。どうやって輸送変異株を同定するかが問題である。当初、酵母核を分離し、その核の中に mRNA が蓄積していることを

RT-PCR で解析して変異株を同定しようとした。しかし、この手法では多数の株をスクリーニングすることは到底無理で、早々に諦めた。次の手段として、oligo dT プローブを用いた *in situ* hybridization で、全 mRNA (poly A⁺ RNA) の分布を可視化して、制限温度下で核に mRNA を蓄積する株を分離することにした。当時は、細胞生物学的な知識も乏しく、分裂酵母で mRNA を検出する *in situ* hybridization 法などはもちろん報告されていなかった。柳田研で行われていた rDNA を検出する *in situ* hybridization 法を参考に、分裂酵母での mRNA 分布検出法を確立しようとしたが、なかなか再現性のある結果が得られず、失敗と苦勞の連続であった。

驚いたことに、蛍光 mRNA は核の中を比較的自由に動き回っており、クロマチンの存在もあまりじゃまになっていないらしい。……核の中は、思った以上に流動的で、ダイナミックな動きが可能らしい

そうこうしているうち、Cold Spring Harbor 研究所の細胞生物学者 David Spector 博士の研究室に客員研究員として 1 年間滞在する機会を得た。研究所に滞在中は、大学の雑務も会議もなく、毎日朝から晩まで実験だけに集中できるといふ、まさに天国のような日々であった。

それまで生化学と分子遺伝学的手法を中心に研究を進めていた私にとって、全てが新鮮な研究生活となり、正味 11 ヶ月程の滞在中に、oligo dT 蛍光プローブを用いた分裂酵母での *in situ* hybridization 法を早々に確立できた。初めて分裂酵母 mRNA の蛍光 *in situ* hybridization による検出がうまくいった時の、夜空の星のごとき蛍光シグナルの美しさは、今でもはっきりと覚えている。滞在中の実験で、熱ショックストレスによって分裂酵母の mRNA 核外輸送が阻害され核小体に mRNA が蓄積することなど、現在の研究にも繋がる興味深い知見を見いだすことができた (Tani et al., Mol. Biol. Cell, 6, 1995)。

Cold Spring Harbor 研究所から帰国後、確立した蛍光 *in situ* hybridization 法を用いて本格的に mRNA 核外輸送変異株のスクリーニングを開始した。*ts* 及び *cs* 変異株バンクを作成しながら、平行してスクリーニングを続けた。1500 株以上をスクリーニングして、最終的に 11 株の mRNA 核外輸送変異株 (*ptr1* ~ *11*: poly A⁺ RNA transport) を分離し、現在までに *ptr9* を除く各原因遺伝子をクローニングした。分離した *ptr* 変異株は、まさしく一緒に研究を進めてきた学生達の汗と涙の結晶である。また、十年かけて作成した *ts* 及び *cs* 変異株バンクは、我々の研究室の大切な宝箱であり、世界中の分裂酵母研究者にとっても、興味深い変異株が多数眠る有益な共有財産になると考えている。

最近、分裂酵母での分子細胞遺伝学的な解析に加えて、より直接的に mRNA の核内動態を明らかにするべく、動物

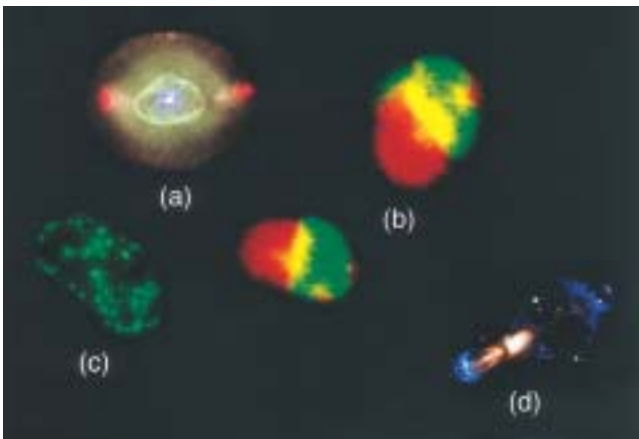


図1 星雲と核
(本稿の最後に答えがあります)

細胞を用いた解析も始めた。具体的には、蛍光で標識した mRNA を核にマイクロインジェクションして、細胞質への移行をリアルタイムで観察する系を確立した。未だ問題点は残されているものの、遺伝子の転写と mRNA 核外輸送との密接な関連性など、興味深い知見が得られつつある。更に、早稲田大学物理学科の船津高志博士のグループとの共同研究では、核内における mRNA 一分子の動きを蛍光を用いて可視化し、解析することを進めている。

動物細胞の核の大きさはおよそ直径 10 ミクロンであるが、その中には、長さが 2 メートルにも達するゲノム DNA がパッケージされている。直径がほんの 10 ミクロンであるから、核の中は DNA が密に詰め込まれていて、比較的ソリッドなイメージを、大部分の読者はもっているのではなからうか。筆者も、DNA (クロマチン) が密にあるために、RNA やタンパク質は核内でせいぜいクロマチン間隙を行き来する程度で、それほど自由には動けないのではないかと考えていた。

しかし、最新の 1 分子蛍光イメージング技術で得られた情報は、全く異なる核のイメージを与えてくれた。驚いたことに、蛍光 mRNA は核の中を比較的自由に動き回っており、クロマチンの存在もあまりじゃまになっていないらしい。船津研究室の多田隈博士が、世界で初めてイメージングに成功した生細胞中の mRNA 一分子の核内での動きを写したビデオは、いつ見ても飽きることがないが、一分子で見る mRNA は、時々何らかの核内構造体に結合したり、離れたりを繰り返しながら、比較的自由に拡散運動によって核内を動き回っていた。核の中は、思った以上に流動的で、ダイナミックな動きが可能らしい。

全く同じような結果が、核タンパク質の核内運動に関しても得られている。生きた細胞内で、GFP を融合した核タンパク質群の FRAP (Fluorescence recovery after photobleach-

ing) 解析を行い、転写因子、スプライシング因子、rRNA プロセッシング因子、DNA 修復酵素、及びクロマチン結合タンパク質などが、それぞれが機能を発揮する様々な核内ドメインに結合したり離れたり、流出入をかなりの代謝速度で繰り返していること、結合していないときには、核の中を自由に拡散運動で動き回っていることが示された。例えば、核小体因子の一つフィブリラリンは、定常状態で毎秒 10000 分子が核小体への解離と結合を繰り返している (Phair and Misteli, Nature, 404, 2000)。これらの観察結果は、核がソリッドなものであるという、従来のイメージからはほど遠いダイナミックな核構造の姿を浮き彫りにしている。

スプライシング反応も mRNA の核外輸送も、その制御の仕組みは核の機能構造と密接な関連があると考えられている。核内において、mRNA がクロマチンの転写・プロセッシング部位から遊離する仕組み、核膜孔を方向性を持って通過する仕組み、核外輸送効率を制御する仕組みなどは、今なおオバールに包まれたままである。また、核の中には、mRNA や snRNA の動態と密接に関連している、Cajal body, PML body, Gems, Cleavage body といった未だ充分には機能が明らかでない核内小構造体が存在する。古くから存在が知られており、既に機能が明確になっているはずの核小体でさえ、最近になって rRNA 合成以外の様々な新しい機能が見いだされている。我々の研究結果でも、一部 mRNA の核外輸送において、核小体が何らかの重要な機能を担っている可能性が示唆されている。

たかだか 10 ミクロンの直径しかない核であるが、私にとっては、遙か彼方まで無限に広がる宇宙に匹敵する、謎の多い魅力的な小宇宙である。苦楽を共にしてきた頼もしい学生達と、今年度から研究に加わってくれた安東助手を心強い味方に、mRNA 核内動態の解析を通して、未開拓の研究フロンティアを目指し、この未知なる小宇宙の更なる探索を続けていきたい。



小宇宙探索の仲間達 (後列右から 3 人目が筆者)

プロフィール

1982 年筑波大学大学院科学研究科修了、理学博士。三共㈱バイオサイエンス研究所、九州大学理学部助手、同助教授を経て 2001 年より現所属、教授。

谷 時 雄

(熊本大学理学部生物科学科)

(a) NGC6826 染色体 (b) 染色体 (c) mRNA 局在、赤 = mRNA、緑 = クロマチン (d) SC35 mRNA の核内輸送、(e) OH2138 染色体

◆ 随筆：RNA and I ◆

ミトコンドリア研究におけるロマンと社会的役割

太田成男 (日本医科大学老人病研究所)

ミトコンドリア研究

ミトコンドリア関連の研究に私が携わるようになって、かれこれ26年になる。ミトコンドリアの研究に固執するつもりは従来も現在も全くないのだが、ミトコンドリアには次々に新しい側面がでてきて、飽きることなく研究を続けてきた。ここでは、RNAにこだわらずにミトコンドリア研究のおもしろさについての感想を述べたいと思う。題に用いた「ロマン」という言葉は「夢や冒険への憧れを満たす事柄(広辞苑)」という意味で使った気恥ずかしい言葉である。

ミトコンドリアの多彩な機能

ミトコンドリアは、時代の流れに応じてそのイメージを変え、時代とともに注目されつづけてきた。ミトコンドリアが発見されたのは1890年、ミトコンドリアという名がつけられたのは1898年。発見当初から、多くの科学者は、ミトコンドリアを細胞内で増殖する構造体だと考えていた。ミトコンドリアが核とは違う独自のDNAを持っていることを根拠にミトコンドリアの起源が論じられてきた。現在ではミトコンドリアは太古に細胞内に入り込んで共生した生物の痕跡であることがほぼ確定している。生命の進化、人類の進化を考える上でミトコンドリアは不可欠である。

ミトコンドリアが進化の過程でいかに形成されてきたかを理解することで、ミトコンドリアは細胞の一部ではなく、細胞全体を制御する能力をもつはずだという思いが強くなってきた。さらに、個体全体に影響をおよぼすはずである

さらに、ここ数年間にもミトコンドリアに対するイメージがまた大きく変化してきた。単にエネルギー代謝をするだけの専門のオルガネラではなく、多彩な機能をもつことが判明したからである。また、「核 vs ミトコンドリア」という単純な図式では真核細胞を表現しきれないこともわかってきた。

ミトコンドリアは生命進化のエンジンであり、また私たちの生死を決定する鍵を握っている。生殖細胞の形成にはミトコンドリアのリボソームRNAが必要であるし、能動的細胞死であるアポトーシスの制御をミトコンドリアが主に担っている。アポトーシス開始のシグナル、制御のシグナル、実行因子はミトコンドリアに蓄積されており必要に応じて放出される。糖尿病などの生活習慣病や、アルツハイマー病などの老年病のなりやすさを規定していることもわかってきた。現在、ミトコンドリア研究は新たなステージに入ったといってもいいだろう。

ミトコンドリアは細胞に存在するオルガネラであり、体積にして細胞の10%、遺伝子の長さは、20万分の1である。その小さなオルガネラから細胞全体、個体全体を望み見ることによって、ミトコンドリアにはますますロマンを感じられるようになるはずである。

ミトコンドリア研究の知的貢献

ミトコンドリア関連の研究でノーベル賞を受賞した研究者は、8回10人にもものぼる。エネルギー代謝は生命を生命たらしめる必要条件であるから、生化学研究の王道として、ノーベル賞受賞者が輩出されたのは当然のように思える。一度ノーベル賞の受賞対象になった分野からは二度とノーベル賞はでないと言われてきた。しかし、ATP合成酵素がATPを合成するメカニズムについては、例外的に化学浸透圧説を提出したP. Mitchellと回転モデルを提出したP. Boyer, J. Wallerの2度にわたってノーベル賞が受賞されている。

自然科学の研究には大きくふたつの役割があると以前から考えている。私自身もそのふたつの役割の双方が不可欠であるという立場から研究に携わってきたつもりである。まずひとつは、自然科学は、私たちを最高の「ロマン」へと誘うことである。自然現象の仕組みを解き明かすことは、楽しく、面白く、驚きに満ちたことで、知的興奮を誘う。自然科学研究にロマンを感じるのには、私たち人間の特権である。自然科学は人間の知識欲を満足させる。魅力的な研究テーマは必ずこの「研究のロマン」を包含している。私たちの日々の研究生活は、忙しく、単純作業が多く、ときには苦痛さえ伴う。しかし、時には知的興奮がなければ研

研究者として長い期間、研究を続けることはできないだろう。

ミトコンドリアが一部の専門の役割しか果たしていない閉鎖系であると考えれば、あまり面白くない。しかし、ミトコンドリアが進化の過程でいかに形成されてきたかを理解することで、ミトコンドリアは細胞の一部ではなく、細胞全体を制御する能力をもつはずだという思いが強くなってきた。さらに、個体全体に影響をおよぼすはずである。細胞の一部であるミトコンドリアがどのように全体を制御するのかが現在の興味である。細胞の中に存在する小器官は、ミトコンドリア以外にもゴルジ装置や小胞体などいろいろある。だがミトコンドリアはそれらとはまったく違う独自の「個性」を持っているように思える。それは、やはり独自の遺伝子をもっているからであろう。

ミトコンドリアがいかに細胞全体を制御するかというイメージをつかむことによって、研究の位置付けと自分のオリジナリティーを発揮できる気持ちになってきた。生命のメカニズムを理解するためには、生命の歴史を理解することによって「生命の読み」が深まると思える。もちろん、進化の過程は再現することはできないので最終的には想像によってのみ理解することになる。この想像は自由であり、自分の生命観を形成するためにたいへん重要である。進化過程の産物であるミトコンドリアは、この点からは自由な想像をあたえる格好のテーマである。ミトコンドリアはロマンチックな面を備えている。時間と空間に思いを巡らす、これが研究にロマンを感じさせる秘けつかもしれない。

ミトコンドリア研究の実用的貢献

自然科学研究が担うもうひとつの役割は、歴史が証明するように人類の生産性をあげ、生活の質を向上させるということである。科学が芸術と異なる面は、生産性を向上させ、役にたつということである。これまで治療できなかった疾患に対して効果的な治療法を開発すれば、少なくとも患者さんや家族の人生は豊かになるだろう。他者の人生を豊かにすることに関わることは人間にとって喜びである。自然科学は、私たちの生活の向上に貢献する技術の基礎を築き、最近では直接貢献できるようになってきた。科学の持つロマンと、現実の私たちの生活への貢献。知と実用。自然科学が本質的にもつ両面である。また、現実の社会へ貢献できることはロマンのひとつであり、ふたつを別の事柄と考える必要はない。

ミトコンドリアがミトコンドリア病の研究の発展過程で、実にさまざまな疾患に関係していることがわかってきた。同時に、病気の原因を探ることで私たちの身体がいかに巧妙につくられているか、いかに奇妙で不思議なものであるかがわかってきた。生命の基礎原理を理解することで、病気の原因が理解できるようになる。同時に病気の原因をと

きほどこことによって、生命の巧さを理解できる。この両面を常に意識ながら研究を進めたいと思っている。

ミトコンドリア病は、ミトコンドリアが生命の進化に必要な役割を果たしてきた代償として、一定の頻度で生じる病気であると理解している。生命の進化に酸素を利用して効率よくエネルギーを生産する生物が高度に進化した。しかし、この酸素が多くの病気や老化の一因となっている。極端な例としての遺伝子病があり、生命の進化の駆動力の代償のために、現代に生きる個人やその家族にのみ負担がかかるのは生命の不合理だ。この遺伝子病という不合理さに立ち向かいたい、まだまだ自分の無力さを感じる。

私が大学院生だったころ、生体エネルギー関連の研究者たちと病気とエネルギー代謝との関係を議論したことを覚えている。その時の結論は、「エネルギー代謝は必須なものであるから、異常が生じることは致命的になることを意味するので、病気の原因にはならない」というものだった。All or noneではなく、微妙に変化したミトコンドリア機能により長い間蓄積した何かによって、病気の原因を内包するようになってくる。微妙な変化が長い期間に蓄積するプロセスを想像ではなく実証して、病気のなりやすさを明確にし、予防できるようになることが今後の課題である。ミトコンドリアの様々な機能を正常に保つことで、多くの疾患の予防につながる日を期待している。

エネルギーと活性酸素

ミトコンドリアの魅力は、分子膜間に生じる電気化学的エネルギーが様々な局面に顔をだすことである。私が、ミトコンドリア研究に打ち込むために、スイスのパーゼル大学のバイオセンター研究所で研究したいと思ったのは、ミトコンドリア蛋白前駆体がミトコンドリアに移入される際に、ミトコンドリアの膜間エネルギーが必要であるということに興味を駆り立てられたからである。ATPを合成するために貯えられた電気化学エネルギーが蛋白質の膜透過にもかかわっていることになんとも言えぬ興味をもったわけである。

アポトーシスに関しても、活性酸素にしても、カルシウムの蓄積にしても、ミトコンドリアのエネルギー状態が関わってくる。一連の物質間の相互作用だけでなく、エネルギー状態という物理量を介すると事柄は急にむずかしくなる。物理量としてのエネルギーが介することは、空間をも含めて想像力を掻き立てることであり、私にとってロマンを感じさせることである。

ミトコンドリアの呼吸鎖から放出される活性酸素 (super oxide anion) もそうである。寿命がきわめて短い物質のため、何か得体の知れないところが面白い。ミトコンドリア

の電子伝達の失敗による電子の漏れに起因するスーパーオキシドは、寿命は極めて短く、しかも反応性としてもそんなに強くない。細胞全体を東京ドームに例えると一つのスーパーオキシドが及ぶ範囲はボール一個分だそうである。しかし、スーパーオキシドを分解する酵素を欠損させると多大な影響があり、短命になることから、多大な影響があることは間違いない。スーパーオキシドは幽霊のようにも感じられる。このような得体の知れない物質とも呼べないような遷移状態をどうとらえるか。老化のような長期にわたる現象との関連をどう理解するか。老化も生命の進化と同じように、再現することはむずかしい。ある程度想像をたくましくする必要がある。この想像が楽しいところであり、想像にとどまらず実証して生命の基本原則をことごとく最も楽しいことである。そういう点では、ミトコンドリアにはおもしろい点、面が多く、今後楽しめる対象であると思っている。

最後に

ミトコンドリア研究のキーワードは、進化、エネルギー、遺伝子、生死、病気、老化。物理から社会学までを広くカ

バーする贅沢な領域である。そして、ミトコンドリアを介して時間と空間に思いをめぐらすことができることが、なにより研究対象として私は気に入っている。もちろん、「時間と空間」は、今回の特定領域のタイトルであることは、御存じのとおりである。



プロフィール

1974年東大理学部化学科卒、1979年東大大学院薬学系修了（自治医科大学香川教授のもとATP合成酵素の構造解析）、1979年群馬大学医学部助手、1981年スイス国バーゼル大学バイオセンター研究所ポスドクと研究員（Schatz教授のもとミトコンドリア生合成研究開始）、1985年自治医科大学講師、助教授（ミトコンドリア病の研究開始）、1994年から現職、教授。

太田成男

（日本医科大学老人病研究所）

New Techniques

‘Progress in science depends on new techniques, new discoveries, and new ideas, probably in that order.’ S. Brenner 1985

応用研究を哺乳類ミトコンドリアゲノムの基礎研究に応用する

林 純 一（筑波大学 生物科学系）

高齢化社会を迎えた現在、老化や生活習慣病は重大な社会問題となりつつある。近年になって、ミトコンドリア遺伝子疾患の原因となるミトコンドリアDNA（mtDNA）の病原性突然変異、とりわけtRNA遺伝子の欠失や点突然変異と全く同じ突然変異が、実際にはごく少量ではあるがほとんど全ての老化したヒトの組織で発見されたばかりでなく、かなり多くの糖尿病患者やアルツハイマー病患者の組織のmtDNAにも存在することが相次いで報告された。これによってmtDNAの突然変異とミトコンドリア遺伝子疾患、老化、神経変性疾患、生活習慣病との因果関係はにわかには大きな注目を集めるようになった。つまりmtDNAにあるtRNA遺伝子の突然変異はミトコンドリア遺伝子疾患という特殊な病気に限定されず、極めて身近なもので健常者

一人一人の体の中にも少量ながら加齢とともに蓄積し、われわれの健康に重大な影響を与えているという「老化ミトコンドリア原因説」が提出された。この仮説は現在でも多くの研究者の支持を得ている。

確かにミトコンドリアは生命エネルギーの工場として重要な役割を果たしており、その中にあるmtDNAのtRNA遺伝子に病原性突然変異が生じると、ミトコンドリアの翻訳機能に支障をきたす。そして確かに、老化にともない呼吸機能は低下するし、老化にともないmtDNAのtRNA遺伝子にさまざまな病原性突然変異が蓄積しているのも事実である。そうであれば、老化にともないmtDNAのtRNA遺伝子に蓄積した病原性突然変異が老化にともなう呼吸機

能低下の原因であることも確かであろう。このように、mtDNA の tRNA 遺伝子に蓄積した病原性突然変異は、老化を含めさまざまな疾患という形で我々の健康に重大な影響を与えるというのが「老化ミトコンドリア原因説」のシナリオである。

しかし、この考え方はすべて状況証拠にもとづいたものであり、老化にともなう呼吸機能低下の原因が核 DNA ではなく mtDNA の突然変異であることが直接証明されたわけではない。この仮説には二つの大きな問題点がある。第一に老化にともない mtDNA の tRNA 遺伝子に病原性突然変異が生じると本当に生命エネルギー生産が低下するののかという問題である。ミトコンドリア遺伝子疾患でこのことは立証されているが、老化では全く推察の域をでていない。第二はミトコンドリア遺伝子疾患の問題で、病原性突然変異蓄積による生命エネルギー生産能力の低下は確かにあるとして、ではこの生命エネルギー生産能力の低下が本当に臨床症状の発症につながる確かな証拠があるのかということ、それは全くないのである。

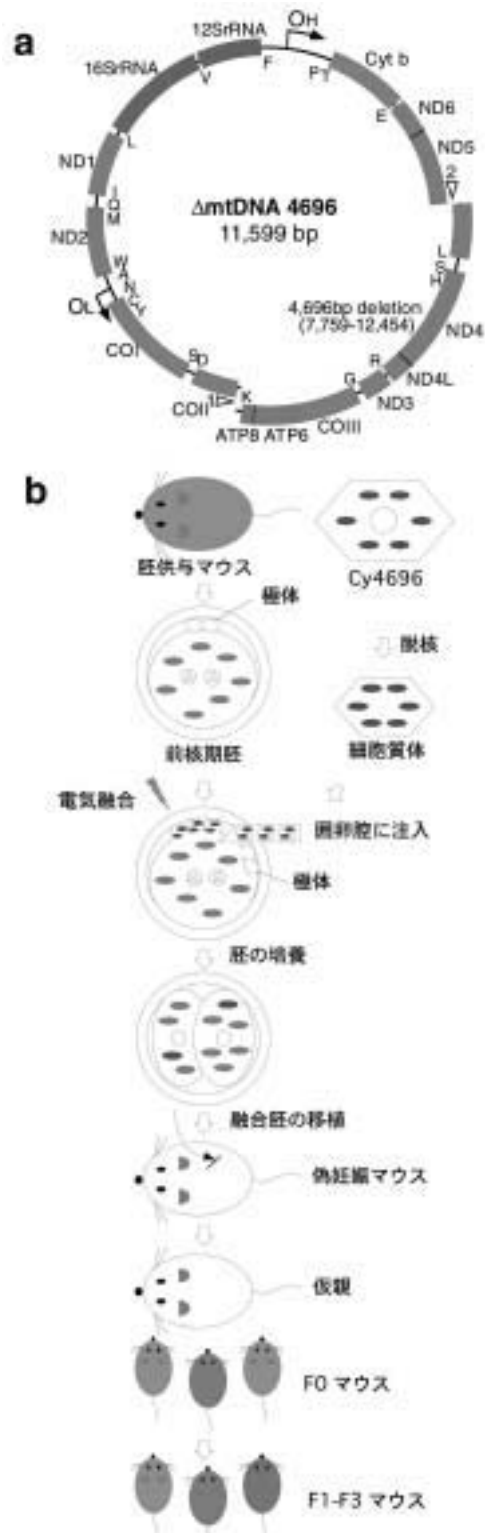
実はこれらのミッシングリンクを見事に解決してくれたのが病態モデルマウスである。最近、筆者たちは特定領域研究 (RNA 動的機能の分子基盤, 渡辺公綱 領域代表) の支援を受けて、世界ではじめてヒトと同じ mtDNA 突然変異を持つミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウス (写真 ミトマウス; 図1) の作製に成功した。さらにこの論文は、2000年のネイチャー・ジェネティクス誌 10月号に掲載され、マスコミの注目も集めた。この病態モデル動物を用いてミトコンドリア遺伝子疾患発症のメカニズムを詳細に調べたところこれまでの常識を覆す事実が次々に発見された。

その第一は、ミトコンドリア間には頻繁に tRNA の交換



ミトマウス

図1 大欠失型 (Δ) mtDNA 導入マウス (ミトマウス) の作製



a, Δ mtDNA の遺伝子地図。

mtDNA には 13 種の構造遺伝子 (複合体 I を構成する ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6; 複合体 III を構成する Cytb; 複合体 IV を構成する CO I, CO II, CO III; 複合体 V を構成する ATP6, ATP8), 2 種類の rRNA (12SrRNA, 16SrRNA) 遺伝子, 22 種類の tRNA 遺伝子が存在している。tRNA^{Lys} 遺伝子 (K) から ND5 遺伝子に至る外側の弧で示した領域の 4,696bp が欠失している。大欠失型 mtDNA のブレイクポイント近傍の配列決定や検出に用いられた PCR プライマー対は白抜きの矢印で示している。

b, Δ mtDNA 導入ミトマウス作製手順を示した模式図。

外部から導入された Δ mtDNA を持つマウスを作製するための実験工程。この工程において、野生型 mtDNA のみを持つマウスとミトコンドリアについてはピンク色で、 Δ mtDNA のみを持つマウスとミトコンドリアは青色で現した。 Δ mtDNA を少量だけ持つヘテロプラズミーマウスは赤紫で、大量に持つマウスは青紫色で現した。仮親は着色していない。

があるという点 (図2) で、これによってミトコンドリアは簡単に生命エネルギー生産に支障をきたさないようになってきているのである。筆者たちはこの事実に基づいて2001年、ネイチャー・メディシン誌に「ミトコンドリア連携説」という新しいパラダイムを提案した。これは従来多くの研究者のコンセンサスを得ている「老化ミトコンドリア原因説」を根底から覆すものである。第二は、呼吸機能が低下したこのマウスが発症する臨床症状が予想に反し極めて限定されているという点である。高乳酸血症、心電図異常、低身長、腎不全は認められたものの、ミトコンドリア遺伝子疾患で認められる他の臨床症状は発症していなかった。これも一般の常識を根底から覆すものであることから、この問題に関してはさらに注意深い解析を進めているところである。今後は、ミトコンドリア病態モデルマウスを病態発症の機構解明にとどめず、新たな遺伝子治療法の開発にも活用したいと思っている。

基本的なスタンスは、「応用研究を哺乳類ミトコンドリアゲノムの基礎研究に応用すること」にある

もちろん筆者たちの研究は本来このような応用研究が目的なのではない。基本的なスタンスは、「応用研究を哺乳類ミトコンドリアゲノムの基礎研究に応用すること」にある。このような新たな視点からの研究のおかげで筆者たちはこれまで、(1)哺乳類においては精子のmtDNAは一分子たりとも子孫に伝達されないこと、(2)mtDNA分子間で頻繁な組み換えは生じないこと、(3)ミトコンドリア間で頻繁なtRNA交換(ミトコンドリア間相互作用)がありこれが激しい酸化ストレスにさらされても呼吸欠損になるのを防御していることなど、哺乳類ミトコンドリアゲノムの基礎遺伝学に新たな情報を提供してきた。

ただし、基礎研究といえども応用面での価値を要求され

る傾向は、国立大学の独立法人化を間近に控え一層強くなってきた。つまり、大学の研究成果は産業と連携することで実用面での活用を念頭に置くことが重要な課題になってきている。そのため、本研究課題における「ミトコンドリア遺伝子疾患病態モデルマウス作製法」に関しては、筑波リエゾン研究所を通して特許出願を完了した。国立大学の教官が公費で得た知的財産を個人の私的利益に結びつけても支障がないというのは、一昔前には想像もつかなかった大きな変革である。

また国立大学の独立法人化は同時に「21世紀COE」や「教育COE」という形をとり、国立大学における研究成果や知的財産を積極的に社会に還元することで、納税者に対する説明責任を明確にする事を要求している。筆者たちはこの流れにあらがうことはせず、啓蒙書や衛星通信を利用した公開講座を通して積極的に今回の研究成果を社会に公表することにした。その一部は今年(2002年)の11月20日に講談社ブルーバックスから「ミトコンドリア・ミステリー」というタイトルで出版する運びとなったので是非ご一読いただきたい。

このように独立法人化がらみで国立大学での研究成果の実用面での対応を述べたが、少なくとも筆者が所属する理学系研究組織の最も大きな魅力はやはり基礎研究である。基礎研究は単に実用(応用)学問の基礎になるから重要であるということだけでは決してない。基礎研究は多くの人々の好奇心を満足させ、ロマンと感動を与えるいわば文化として重要な側面をもっている。しかし、基礎研究の最も重要なポイントはもっと別の所にあるのではないだろうか。

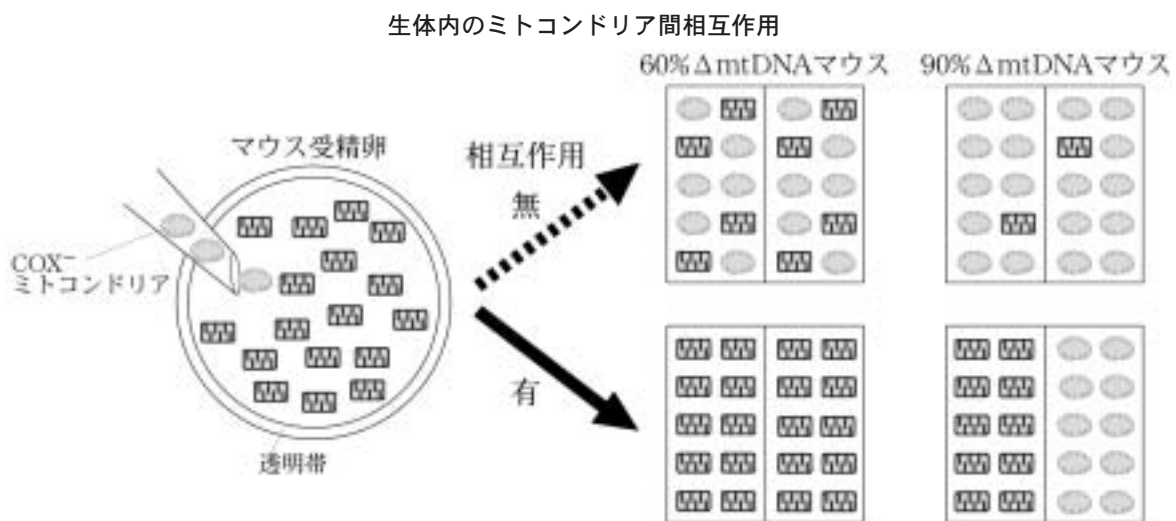


図2. ミトマウスで観察された生体内ミトコンドリア間相互作用

COX 電子顕微鏡の解析の結果、60% Δ mtDNA をもつミトマウスはどの組織のどの細胞のミトコンドリアもすべて COX 活性を示した。このことはミトコンドリア間に広範に物質(遺伝子産物)の交換が起こっていないと説明することができない。

実用研究がはじめから人間の利便性を人間の英知で追求し達成しようという戦略を取るのに対し、基礎研究は人間の英知を直接利益につなげない。しかし基礎研究の裾野が広ければ広いほど、そして遊びが多ければ多いほど、偶然思いもよらず実用面の輝きを持つ場面にしばしば遭遇する。「瓢箪から駒」、この遊びと偶然こそが基礎研究に人間の英知をはるかに越えた爆発的価値を時としてもたらすのである。大学での、そして大学でしかできないこのような基礎研究の魅力はまさにこの点に集約されているのではないだろうか。

もちろん何を研究してもいいという自由は、何もしなくてもいいという自由と区別がつきにくく、結果として何もしない研究者の温床になっている点は確かに問題である。しかし仮にそのような問題があったとしても、独立法人化を迎えた今こそ、このような基礎研究の本当の価値、つまり遊びと必然より偶然を大切にできる権利の重要性を強烈

に社会にアピールし、積極的に説明していかなければならないのではないだろうか。



プロフィール

1949年 函館市生まれ。
1977年 東京教育大学大学院・理学研究科・博士課程修了，理学博士。埼玉県立がんセンター研究所・生化学部主任研究員，テキサス大学健康科学センター・ダラス校客員研究員，筑波大学・生物科学系助教授を経て，1998年より筑波大学・生物科学系教授。2002年より筑波大学・生物学類長（兼任）。

林 純一

（筑波大学 生物科学系）

◆ 海外からの便り① ◆

ロンドンより

北尾 紗織

〔Cancer Research UK London Institute, Sara Nakielny's Lab.〕

いつか海外の研究室で研究生活を送りたいと思われている方はたくさんいらっしゃると思います。私もそういう一人でして、他の人の留学を見ていると、2～3年という時間はあっという間に過ぎて、いつの間にかもう帰国しているという印象がありましたし、いろいろな方から得るものは大きいという話を聞いていたので、海外へ行くことに興味がありました。ラボを決める上では、タンパク質のバイオケミストリーについて、勉強できる所がいいと思い、ちょうどその頃に、核/核外移行の美しいデータに惹かれていました。そして、あとは半分なりゆき型です。先のことを真剣に考えもせずに来たのを見透かしてか、父からは、ただ興味があるからというだけでは続けていけないと指摘されました。そして、何か理念を持つ必要があると渡英の際に諭されました。私のこれからの課題です。

研究者になりたい

高校生の時に、遺伝子工学（つまりは分子生物学）をやってみたい、と思って大学へ進学したものの、しばらく遊ん

でいたため、研究室に入ってから大きな衝撃を受けました。そして、私などの卒研究生は、「異次元」と言われていました。研究室は、東京大学医科学研究所細胞化学研究室で、吉田光昭教授の下でHTLV-1のウイルスタンパク質と細胞周期制御機構をテーマとしていました。この頃は、多い時は毎月1回くらいのペースで当番が回ってくるセミナーで、振りかけられる質問に答えられなくて大変でした。今から考えると、これがとてもよい勉強になっていて、実験的に証明することの難しさを学んだと思います。修士課程で卒業し、次に、厚生省医薬品機構の時限プロジェクトの一つ、エイジーン研究所にて、ウェルナー症候群をはじめとするヒトの早期老化症の原因遺伝子（RecQヘリカーゼ）の基礎的な研究に携わりました。ここでは、比較的自由に研究をすることができ、いろいろなことに興味を持つきっかけになりました。また、古市泰宏所長は、新しい手法や考えもどんどん取り入れる方で、ここでの研究レベルはなかなか良かったと思います。そして、今年1月から、Cancer Research UK London InstituteにあるNuclear Transport Lab.にてSara Nakielny博士のところのポスドクを始めました。当

初はリボソーム RNA の核外移行に関する研究をするはずだったのですが、現在は non-coding RNA をクローニングする仕事をしています。まだどの種類にあたるのかも、同定できるのかもわかりませんが、新しい世界で面白いと思います。

エイジーン研究所では、疾患遺伝子のポジショナルクローニングから始めましたが、ヒトの老化を司る遺伝子として、ウェルナー症候群の原因遺伝子が RecQ ヘリカーゼであることがわかってから、自然に興味の対象が DNA に移っていきました。ウェルナー遺伝子の欠損により、ゲノムの組換え頻度が上がるということは説明できましたが、それが老化につながるまでには証明できず、他の疾患遺伝子がそうであるように、遺伝子が同定されたからと言って完全に老化を理解することはできませんでした。結局、老化のような複合的な現象は、生物に依ってその決定要因が異なっていて、その最も弱い所に依存するのではないかと考えられます。その例として、ショウジョウバエに SOD 遺伝子を高発現させると、その寿命が非常に延長されます。ヒトの場合はというと、個体レベルは難しいのですが、やはりゲノムをしっかりとメンテナンスできなくなることが原因ではないかと思えます。遺伝情報のメンテナンスのために生物にどんな知恵があるのか、まだまだ興味が尽きません。

留 学 生 活

Cancer Research UK London 研究所は、昨年まで ICRF (Imperial Cancer Research Fund) 研究所と呼ばれていたところで、ロンドン市内にあり、姉妹研究所の Clare Hall はここから電車などで約1時間の郊外にあります。Lincoln's Inn Fields にある研究所の周りは、大英帝国時代の歴史的な建築が美しく、憩いの場となる緑の公園があり、歩いて行ける距離にロンドンの繁華街があります。生活するには非常に便利で、食生活と家賃の高さ以外は日本よりも快適に思うくらいです。この国が世界の中心、大英帝国であった証は、街並だけでなく、いくつかの立派な博物館の中にあります。非常に貴重なものと思われる文化遺産が、なぜか一ヶ所にコレクションされているのです。こんなことをしても許されるのだろうかと思いますが、確かに見応えあると思えます。

所属するロンドン研究所は、とても大きな組織で、多くの研究室、多くのスタッフが揃っています。私達のラボは、その中でも最も小規模なところで、グループリーダーのサラと、サイエンティフィックオフィサー1人、PhD の学生1人、ポスドク1人の合計4人のメンバーです。サイエン

ティフィックオフィサーは、いわゆる技官ですが、テクニシャンとは呼ばず、購入試薬やアイソトープの管理など研究所におけるラボの運営もしています。そして、大抵の場合、複数のラボに1人秘書がいます。私達のところだけでなく、個々のラボはそれほど広くないのですが、それで十分事足りる理由は、共用の施設や、共通の試薬、器具を有効に使っていることにあります。このメリットは大きく、研究所のスタッフによって試薬は常に供給され、暗室や冷室などの施設のメンテナンスはこまめに行われています。また、それぞれ専門のスタッフがいる培養細胞施設や動物施設、機器室もあります。更に、研究所内外のセミナーは、所内のポスドクから著名な研究者まで、いろいろな人によって頻繁に行われており、外部からの影響も多く受ける傾向にあります。このセミナーを企画する立場のグループリーダーの研究分野が広範囲に及ぶため、様々な分野のセミナーが行われています。そして、討論する時間も十分設けてあります。全てに参加しているわけではありませんが、これも大きなメリットだと思います。最近思うのは、サイエンスには人と話をすることが大切だということです。当

最近思うのは、サイエンスには人と話をすることが大切だということです。当たり前のことですが、それによって、新しいことを知るかもしれないし、何か思い付いたり、気付いたりするかもしれませんが

たり前のことですが、それによって、新しいことを知るかもしれないし、何か思い付いたり、気付いたりするかもしれませんが。今は絶好の環境にいると思うので、あとは実行あるのみです。

しかしながら、ろくに英語ができないのに来てしまったので、例にもれず苦勞しています。英語の問題や、ラボの様子は、人それぞれ異なると思いますので、客観的に言うのは難しいです。小規模なラボの良い点は、一対一で話すことが多いため、仕事に関して非常によく話ができることだと思います。サラは、自分はグループリーダーであり、良き話し相手のポスドクであり、必要ならば実験も補佐すると言ってくれます。その反面、欠点としては、それぞれのラボはラボ単位で行動することが多くて、自分の英語がまだおぼつかないの、気を付けないとサイエンスについて話をする機会が減ってしまいます。

最後に、こちらで生活するにあたり、研究室のサイエンティフィックオフィサーであるリンダには本当によく助けてもらっているの、心から感謝したいと思います。ここに日本語で記しても、きっと読んではもらえないのですが、とても素敵な女性です。そして、学生のタン君は、シンガポール出身で気の優しい子です。英語が公用語なので、言葉の問題は全くありません。ただ、シンガポールでは、現地語を話せない若者が増えてきて、自国の文化が受け継がれないのを残念に思っているようです。



左端が筆者，右から2番目が Sara.

プロフィール

1995年東京大学薬学部修士課程修了。エイジーン研究所研究員。2000年薬学博士。2002年1月より現所属。

北尾 紗織

Cancer Research UK
London Institute,
Sara Nakielny's Lab.

◆ 海外からの便り2 ◆

サンディエゴ，新研究，子育て

桑原(藁科)知子

(ソーク研究所 Fred. H. Gage 研究室)

藁科 雅岐

(スクリプス研究所 Peter G. Shultz 研究室)

ドクターを取得し(多比良研究室)，その後海外に行きたいなあ，と漠然と考えていたら多比良先生が「この人若いのおもしろい研究しているよ」とある日経バイオサイエンス紙を持ってきてくれた。見開きページで紹介されていたのがアメリカ，ソーク研究所の Fred H. Gage 教授である。「海外に行きたい」->「でも暖かい所がいいなあ(豪雪関ヶ原の隣町出身)」という心持ちだったところ Gage 教授(通称“Rusty”)はカリフォルニアのサンディエゴの研究所にラボを持っていたので CV を送ったところ OK がきたので決定した。夫のラボもサンディエゴに決定したのも大きい(スクリプス研究所 Peter G. Shultz 教授のラボ)。取り上げられていた Rusty の研究は「大人でも脳の神経幹細胞は新生する」というもので，特に記憶を司る海馬領域の神経幹細胞の研究が彼の専門の1つである。毎夜各酒を牛飲しつつ，過密スケジュールを綱渡りで切り抜ける多比良先生が興味を持ったのも頷ける気がする。

ソーク研究所に来てから2年間私が行ってきたのは，(神経)幹細胞から神経細胞やグリア細胞などへの分化経路の運命決定を担う Coding および Non-coding 双方をターゲットとした Gene Discovery 研究である。Embryo, Adult での違

い，*In vitro*，*In vivo*，環境の違い，経路の違いによっても無数の Screening が可能である。Rusty は笑いつつも賛成してくれたので片っ端から着手した。そのころ私は全く新しい分野に来て，何か1つのメカニズム探究に集中する頭を持っておらず，とにかく色んなことに着手して広い知識と技術，応用面を一刻も早く身につけたかった。精力的にそれらを行うのにアメリカはとても適していた。色々な面でのサポートが充実しているからである。

私にとって第一のサポートは時間節約である。というのも子育てをしながら研究するには時間がとても限られてくるからだ。前述したちょうど CV を Rusty に送った頃，私は妊娠に気づき，渡米を少しずらして日本で出産してから3ヶ月児の娘を連れてアメリカに来た。初めての子育て，新天地での新研究，新生活で本当に右も左も分からなかったが，デイケアにフルタイム(週5日，1日10時間，これ以上は無理)で子供を預ければなんとかやっていける。サンディエゴは研究所やベンチャー企業が非常に多く，子供を預けて働く親が多いので，デイケアのシステム(教育内容など)がしっかりしている。

さらに、研究所にテクニシャンや各 Facility が充実しており、実験に必要な多くの物資はいつでも使える状態で常時充填されており（自分でチップを詰めたり、アガロースプレートを作ったりしなくてもよい…）、FACS、シークエンスなどの実験を安心して任せられる。Rusty のラボでは動物実験、Confocal 顕微鏡解析・組織染色などの施設や機器、人材が充実しており、重要な実験は彼らが正確にサポートしてくれる。夫のスクリプス研究所では Facility が動物実験、組織染色等の実験演習や Excel 等を使ったコンピューター講座なども定期的に開いている。どの講座も人気は高いようで非常に優れたシステムである。私個人の実験では、1screening あたり 1000 を越えるクローニング解析をマイクロアレイ Facility とシークエンス Facility に受託できたこと、Celera 社の遺伝子解析を利用できたこと、ヒト、サルの新鮮な脳のサンプルを獲得することなどに Rusty が尽力してくれたことが大きい。「なぜそれが必要なのか」を説明すれば新しい機械だろうがシステムだろうが個人レベルでもセットアップしてくれるのはありがたく思っている。もっとも頻繁に TV や新聞取材が来る売れっ子の Rusty にはうなるほどの経済力があるのだろう。

そういった各サポートにより、重要な実験に持てる時間を有効に充てられるようになる。共同実験のスケールがあつという間に大きくなっていくのも魅力的な研究条件の 1 つだ。

ここまで書くとなんていい所、と思う向きもあるが、厳しい面も多々ある（多比良先生がこの点を強調して紹介してほしい、と言っていたので正直に書く）。競争が激しい分野、研究レベルが高い、ラボのスケールが大きい、という所は周りを見渡しても同じ様に思うが、人の入れ替わりが多い。ソークではポストドクは普通ベンチ 1 つ、デスク 1 つを割り当てられているが、実績のない人からそのうちのどちらかが削られる。Rusty は非常に紳士的に見られるが他の PI と同様その点は容赦ない。ポストドクの労働時間はあまり頓着しないが、人一倍頑張っていればそれが評価につながる、ということもない結果主義だ。そしてある日ベンチもデスクもなくなる人が出現する。私が渡米してすぐにまず子持ちの夫婦ポストドクが双方いなくなり、2 人の男子学生がデスクを削られ、MD 持ちの PhD 取得前の学生(女性)がベンチ & デスク双方を奪われ(つまりスペース消滅)、Grant が切れたポストドク 2 人が研究を強制的に変えさせられ、つい先日別のポストドクが一ヶ月間無給料状態となった。隣のラボではある日突然ボスが来て肩をたたかれた後、「新しいポストドクが来週からこのベンチを使うから」と言い渡され間借り状態で実験している女性ポストドクがいる。研究がやりやすいというメリットと、現実的な厳しさの両方が、ここサンディエゴで感じたアメリカの印象だ。

研究がしやすい、サポートが大きい、機械やサポート体制でできることはそれらにまかせる、
 ということは、研究の質をあげる、
 という意味につながるのだ
 と思う

研究がしやすい、サポートが大きい、機械やサポート体制でできることはそれらにまかせる、ということは、研究の質をあげる、という意味につながるのだと思う。前向きに考えれば限らない可能性が拓けているのだから、目的意識をしっかりとつかむよう心がけている。とは言っても、子供をデイケアに預けてラボに向かう最中、「えーっと、今日はこれとこれを午前中に仕掛けて、午後にあそこあそこに行き、何とかこれとこれだけは終わらせて帰ろう」、もしくは「今日は朝早く来れた分夕方娘を迎えに行く番だから、これとこの実験くらいしか片づけられないかもな」という超現実的な（目的意識というよりは）目先の目標を考え、こなすことに追われるのが関の山の日々だ。

娘を預ける朝-夕の時間はしっかり決まっているため、(A)朝、娘を預けにいったら遅くまで実験しても良い、(B)夕方迎えに行く人は朝早くラボに行ってしまうても良い、という日替わり当番が私達夫婦の平等なシステムだ。週末は(A)日中と(B)夕-夜の交代体制となる。主人は(B)にさらに夜中もう一回ラボに戻る、というオプションをつけて奮闘している。子供を産む前はエンドレスで精魂尽き果てるまで何も考えずに実験していたものだが、現在の私は体力的に彼の真似ができなくなった。、情けないことだが。

研究を続ける上で子供を産んだことは全く後悔していない。後 1, 2 人は産みたいと考えている。娘からは研究では味わえないたくさんの幸福を日々もらっている。夜泣き、離乳食作りや、つい数ヶ月前まではデイケアに持たせる毎日の弁当づくりに頭を悩ませたが、現在(2才4ヶ月)は大人と同じものを食べ、病気もなく元気に育ってくれている。何事も平等が夫婦の基本だが、子供の世話&家事はなぜか圧倒的に私の負担が多い気がする。その点ではよく不平をぶつけているが、娘の私に対する信頼が絶大に大きいので内心得心している。上述したように時間が限られ実験が思う存分できないといっても、夕方娘を迎えに行くときは「ああ、七海(娘の名)に会える」といううれしさに満たされる。反対に朝デイケアで別れる際に泣かれたり、最近では慣れてきたのかクラスの窓柵からちょこんと顔を出し、去っていく私の車を静かに見送っているときなどは申し訳ない気持ちになる。クラスで最後まで残っていた娘を暗くなって迎えに行くのもつらい。研究も大事だが子供孝行ももっとしなくてははいけない。

…家内がここまで一気に書き上げてくれたので、スペースがもうあまりないが、サンディエゴでの子育て(乳幼児)のシステムについて少し紹介したい。こちらでは幼稚園前

の子供を預かる施設として、デイケアと大まかに呼ばれる施設がある。産後数ヶ月の子供から預かってくれ、資格を持った保母さんが個人の家で開いている託児所と、多くの子供を預かるいわゆる保育園がある。費用はどちらもほぼ同じで、月～金曜日まで預けて月\$700くらいからあるが、約\$800が相場である（友人が利用していたデイケアは\$1100。1人あたり。税金の控除の対象になり、収入によっては年間\$5000まで戻ってくるシステムがある）。子供の年齢によって保母1人が面倒を見れる人数が法律で決められており小さい子供ほど少なく、また小さい子供ほど月謝は高い。乳児が預けられる時間は施設によって異なるが、個人の託児所の方が一般的に短いようである（1人では長時間面倒見切れない）。私達は初めは個人経営のデイケアを利用したが、そこは朝8時半から夕方5時半までであった。私達は娘の送り迎えを交代でまかっていた。片方が朝で、もう一方が夕方の迎えである。サンディエゴは夕方5時頃はひどい交通渋滞で、迎えの担当者はいつも5時前にラボを出なければならず、午後ほとんど実験ができないことがなんどもあった。

その後、スクリプス研究所と同系列の保育園に空きができたのでそちらに移った。そこは朝7時から夕方6時45分までのうち、10時間利用というものだ。現在もこの保育園を利用しているが、スクリプス研究所の向かいにあり非常に便利である。6時半まで時間が使えるとかなり違うのである。お昼は、2才児まではミルクや離乳食を弁当として持参させる所がほとんどである。弁当作りはほとんど家内がやってくれたが、毎朝の離乳食を考えるのに四苦八苦していた。2才以降は給食が用意されており、今年の9月から娘もクラスが進級したので、最近の我々は比較的ゆつたりとした心で朝を迎えられている。

日本でも児童虐待などで騒がれたように、信頼できる託児所を見つけるのは、非常に大きな懸案である。サンディ

エゴはその温暖な気候のせいか人口が爆発的に増加しており、今や全米第6位の人口を抱えている。住宅などの確保が難しくなっており、特にデイケアは絶対数が不足している。2才以下の乳幼児のクラスは1年待ちのところも多々ある。個人経営の託児所は比較的空きがあるが、個人であるだけに信頼できるかどうか不安だ。私達は日本にいる時に、サンディエゴの友人に紹介してもらいまずデイケアを決め、それにあわせて渡米、住居を決めた。個人経営の託児所ではあったが、信頼できるということで人気も高く、アメリカに着いてからも更に1ヶ月待たされた。乳児を抱えてこちらに来ることを考えている共働きの人は、まず子供のデイケアを見つけておいた方がいいと思う。

子育て自体は日本と比較して楽なようである。基本的には子供個々の成長にあわせてトレーニングをするので、のんびりと子育てをしている。日本の育児雑誌をたまに見ると、もうそんなことができるのかとあせったりもするが…。ただ男性にとっては楽ではないかもしれない。ここでは夫婦共働きが普通で、従って、子育ても夫婦平等が基本だ。家内からは「誰々の旦那はこんなこともしている」、「彼女の旦那はもっとやってくれている」と、文句ばかり言われる。あまりやっていないと思われる隣のベンチの(日本人)男性の例については触れないけれど。しかし、実際こちらの男親はよく子育てに協力している。保育園の行事にはほとんど夫婦そろって参加するし、家事も半分負担が当然だ。

サンディエゴは気候、景色がすばらしく、とても住みやすいところである。杉がほとんどないので、ひどい花粉症だった家内も解放されたようだ。娘も、あせもやひどい風邪で悩まされることもなく、これまでこれたのには助かっている。日本人の小児科の先生がこちらで開業されているのもいざというときの大きな安心感だ。本当に、サンディエゴは私達を暖かく迎えてくれている。

以上、私達研究者夫婦の「個人的な思いが詰まった形」の海外からの便りでした。塩見先生からの寄稿依頼の第1文が「七海さんの育児を楽しんでいますか？」でしたが、もちろん「Yes!」が返答です。



ガッツポーズの娘、七海2歳(中央)、桑原知子(左)、藁科雅岐(右)。ソーク研究所にて。

プロフィール

1999年筑波大学大学院博士課程修了、農学博士。2000年、出産後に渡米。ソーク研究所 Fred. H. Gage 研究室にて研究従事。

桑原知子

{ ソーク研究所
Fred. H. Gage 研究室 }

プロフィール

1999年筑波大学大学院博士課程修了、農学博士。2000年、結婚後に渡米。スクリプス研究所 Peter G. Shultz 研究室にて研究従事。

藁科雅岐

{ スクリプス研究所
Peter G. Shultz 研究室 }

生ごみ処理機の細菌を調べる

—複雑なシステムへの取り組み—

関口 達彦

(三洋電機株) エコ・エネシステム研究所

生ごみ処理機は、家庭や事業場から排出される食品残さを分解あるいは減量化することにより、処理場（焼却場）の負担を低減することを目的として開発された。大別して、乾燥により減量化する「乾燥型」と、細菌等により分解・減量化する「バイオ型」の2種類が商品化されている。当社では後者のタイプの生ごみ処理機を販売しており、当然の帰結として生ごみの分解にどのような細菌が関与しているのかが気になる。しかしながら、これまで生ごみ処理機の細菌についてはほとんど調べられていなかった。また、当社の装置では稼動開始にあたって積極的に細菌（いわゆる「種菌」）の投入を行わないので、細菌の時間変化も興味深い。以下では、生ごみ処理細菌の調査に関する私達の試みを紹介し、こうした複雑なシステムに対する私達の考えを述べさせていただく。

1. 生ごみ処理機とその菌叢の変化

生ごみ処理細菌を調べる第一歩としての取り組みは、従来の培養法によって個々の細菌を同定し、その時間変化を追跡するというものであった。ところがいくつかの障害に突き当たることになった。第一に同定の問題である。生ごみ処理機には、生ごみ自体やそれを投入する人間の手を通じて雑多な細菌が持ちこまれ増殖する。特に生ごみには天然に存在している種々の細菌が付着しており、自然界の細菌の多様性がそのまま処理機に持ちこまれるわけである。一般的な生化学的同定方法を試みたが、個々の細菌の特定が難しいことがわかった。後に一部の細菌について16S-rDNAの塩基配列での相同性解析を試みたが、菌の同定に至らないものが多かった。細菌の多様性の「深み」にはまってしまったわけであるが、これは個々の細菌に適当な記号を与えることで、区別できると考えた。

第二の、そして実質的に最大の問題点は時間である。一般的なバイオ型の処理機では培養基材として平均粒度が1～2ミリの木質チップが使用されている。生ごみ処理機か

ら木質チップを取り出し、水に懸濁して1次培養、コロニーを吊り上げて単離培養、生化学同定キットでの培養、というプロセスを行うと、10日から20日を要する。多様な細菌を捉えるためには種々の培養条件を用意する必要もあるので、1回の測定に要する時間と労力は大きく、菌叢の時間変化を追跡することは現実的には難しい。

そこで私達は方針を変えて、個々の細菌を同定することをひとまずおいておき、生ごみ処理機の菌叢変化とその時間変化を全体的に捉えるために、RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 法によって観察することにした。この方法は調べたいゲノムの塩基配列とは無関係に作成した短いDNAをプライマーとして使用するものである。ゲノムの中にたまたま相補的な配列があればプライマーが結合し、2つの結合部位にはさまれた部分が増幅される。ゲノムの塩基配列が異なればプライマーが結合する部位も異なり、増幅されるDNA断片の長さが異なる。このため個々の細菌の分類に利用されることが多いが、ここでは菌叢の状態の「指紋」として用いる。と言っても、生ごみ処理機の菌叢に通常のRAPD法を用いると、増幅されるDNA断片の種類が多すぎて解析が難しくなることが予想されるため、用いるプライマーを12塩基とし、PCR条件を通常のRAPD法と特異的プライマーによるPCR法との中間に設定した。この方法であれば、1日で菌叢を反映した電気泳動像を得ることができ、生ごみ処理機菌叢の日々の変化に追従していける。また、複数のプライマーを並行して使用することで、より多くの細菌を捉えることが出来、詳細な解析も可能となる。

結果として菌叢の時間変化について興味深い知見が得られた。先にも述べたように、稼動初期に積極的に種菌を投入しなくても生ごみや人間の手に付着した細菌が処理機内に持ちこまれ増殖する。このため電気泳動像では2～3日目からバンドが確認できた。しかしながら、このバンドは不安定であり、数日から1ヶ月の寿命で消えてしまった。

一般に多数の要素がネットワーク（相互作用）を構成して機能しているシステムでは、本質的に要素レベルとシステムレベルという階層性が生じる

新たなバンドの出現も見られるが、その寿命も同様である。2ヶ月を過ぎる頃から寿命の長い（数ヶ月以上）のバンドが現れはじめ、最終的には一定のバンドパターンへと安定化していった。このことは、稼動から2ヶ月程度までは主要な細菌の交代がおきて菌叢が安定しないが、3ヶ月以降は菌叢が安定していることを示している。処理状況を定量的に評価するのは難しいが、少なくともこの期間の生ごみ処理は非常に安定しているのも事実である（もちろんそのためには、温度や処理機内の水分率などの制御が必要）。

この結果は、種菌無しでも処理機内に安定な菌叢が形成されること、また種菌の投入は初期の生ごみ処理を助ける効果はあっても長期的な安定性を保証するものではないことを示している。長期的な安定性を望むのであれば、安定化した菌叢から取り出した種菌が必要であろう。

2. 複雑なシステムをどう調べるか

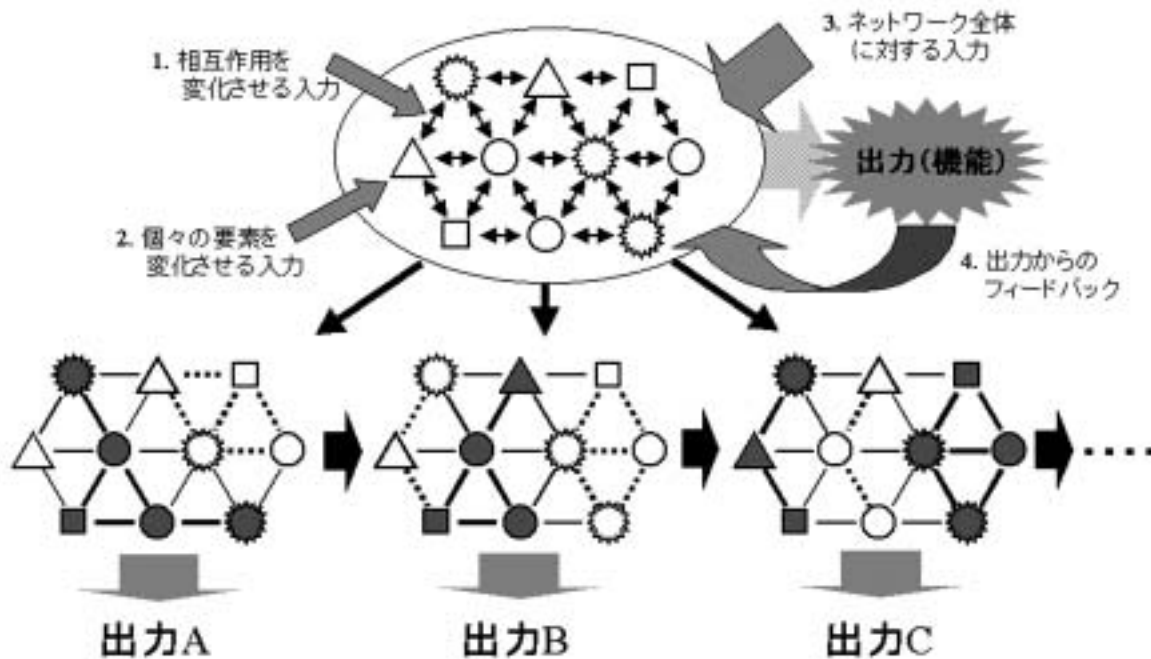
生ごみ処理機の菌叢のような複雑なシステム（要素が多様で数が多い、多様な相互作用がある、等）の全容を明らかにすることは難しい。構成要素や相互作用が一様であれば、要素の振る舞いを調べ、統計的手法によって要素と全体の挙動を解析することが出来る。少数の要素から構成されるシステムであれば、個々の要素の性質が異なっても、その挙動と相互作用を強引にでも書き下してしまえばコンピュータに持ちこむことができる。しかし生物は多数の要素から構成されている上、本質的に非線形性と非平衡性をもっている。こうなると個々の要素を調べるだけでなく、

システムとしての振舞いも同時に測定することが必要であり、さらにその時空間変化を調べることも必要となる（図）。

また、生物は階層的な存在である。分子—オルガネラー—細胞—組織という目に見える階層性は分かりやすい。一般に多数の要素がネットワーク（相互作用）を構成して機能しているシステムでは、本質的に要素レベルとシステムレベルという階層性が生じる。ここで言う「要素」は、個々の細胞でもよいし、個々の反応プロセスでもよい。1つのシステムがより大きなシステムの要素となる場合には、階層が多重になる。

1つの手法で要素レベルとシステムレベルの挙動を同時に調べることは理論的には可能であるが、現実問題としては難しい。上に述べた RAPD の変法でも、菌叢全体の挙動はある程度把握できるが、要素である個々の細菌の挙動が全て測定できていないわけではなく、機能として生じるマクロな挙動も測定できていない。同様に、脳の挙動解析に進展をもたらした光学計測法も、特定の領域における脳のマクロな活動を明らかにしたが、個々の神経細胞の挙動の全てを同時に測定することは困難である。要するに現段階でそういう測定法はあまり期待できないと考えて良い。

であれば、とりあえずのやり方として、要素の挙動とシステムの挙動を別的手段で調べておき、それらの結果を関係付けることから始めざるを得ない。生ごみ処理菌叢の例では、個々の細菌の同定（可能なら）とその環境に対する



ネットワークシステムのイメージ

多様な要素からなるネットワークシステムでは、上段に示した種々の入力によって自律的に要素や相互作用が変化し、いろいろな出力（機能）を実現する。さらにシステムの状態が自律的に変化していく場合もある（下段）。このため、個々の要素の振舞いを観察するだけでは出力が予想できない。
色付き：活動している要素、白抜き：休止している要素、要素間の線の違いは相互作用の違いを示す。

応答、他の細菌への影響などを調べると同時に、菌叢の変化や処理能力といったシステムとしてのパラメータを調べ、これらに関係付けることによってシステム全体を理解することになるのであろう。

RNA 情報発現系であれ、脳であれ、生ごみ処理菌叢であれ、多様で多数の要素からなるシステムの全貌を明らかにする試みが生み出すものは、個々の研究対象に関する知見だけではない。その研究手法自体が多くの生物システム、ひいては社会システムの解明にも役立つものと考えている。

◆ Business ② ◆

ゲノム創薬における RNAi の利用

鈴木 幹生

(大塚製薬株 大塚GEN研究所)

大塚GEN研究所では、大塚製薬におけるゲノム創薬のスタート地点となる研究所として、疾患原因遺伝子、創薬ターゲット遺伝子の同定を目標に研究を行っている。これまでにヒト cDNA のランダムシークエンス、Differential Display 法による組織特異的遺伝子の単離、糖尿病モデル動物の遺伝解析など、ゲノム解析により数多くの新規遺伝子の単離、解析を行ってきており、現在これらを含めた遺伝子の機能解析を通して、遺伝子と疾患との関連を探索している。本稿ではゲノム創薬における遺伝子機能破壊(抑制)技術の重要性、また最近、新しい遺伝子機能抑制システムとして注目を集めている RNAi について紹介したい。

遺伝子研究に基づく知見の蓄積により、これまで原因の十分に分からなかった糖尿病、高血圧症といった生活習慣病、さらに癌など多くの疾患の分子メカニズムが解明されつつあり、これらの疾患の多くが遺伝子の機能異常、発現異常により引き起こされることが明らかとなってきている。一方で、2000年に国際ヒトゲノムプロジェクトおよび Celera

Genomics 社によるヒト全ゲノム配列の概要が発表され、遺伝子とその異常が原因で生ずる疾患との距離は急速に縮まりつつある。基礎科学研究のこのような成果を受けて、近年、製薬業界においては“ゲノム創薬”という言葉が話題になっている。一口にゲノム創薬といっても各社様々なアプローチをとっており必ずしも画一的なものではないが、ゲノム創薬とは図に示すようなプロセスの中で、ゲノム解析によって得られた膨大な生物学的情報とバイオテクノロジーを最大限に利用し、いかに速く、オリジナリティの高

い新薬を創るかということであると思われる。このプロセスにおいて、創薬ターゲット遺伝子の同定・評価(バリデーション)は、他社に先がけて医薬品開発に着手する意味においても非常に重要なステップである。また近年のバイオ特許の観点から、ターゲット遺伝子およびそれを用いた低分子化合物等のスクリーニング法の特許化は、そのターゲット分子を用いて創られるその他の医薬品にも権利を主張できる可能性があることから競争が激化している。さらにヒトゲノム配列情報から、ヒトの全遺伝子数が4万個程度と予想されることに加え、現在の創薬技術をベースに考えた場合、新規の創薬ターゲット分子の数は、たかだか数百から2千までであろうという予測もこの競争に拍車をかけている。

さらにヒトゲノム配列情報から、ヒトの全遺伝子数が4万個程度と予想されることに加え、現在の創薬技術をベースに考えた場合、新規の創薬ターゲット分子の数は、たかだか数百から2千までであろうという予測もこの競争に拍車をかけている

しかしながら、そのような創薬ターゲット遺伝子を同定することは必ずしも容易ではない。ヒト全遺伝子配列の解析終了によって現在おそらくほとんどの遺伝子が認識されており、これにDNAマイクロアレイ技術やプロテオーム技術、

バイオインフォマティクスを組み合わせる事により、疾患によって発現が変動する遺伝子、受容体や酵素をコードする遺伝子を同定することはさほど困難なことではなくなっている。しかし、これらの技術を用いて同定された遺伝子とその表現型をリンクさせる、すなわち遺伝子の細胞レベル、個体レベルでの生理的機能を解析する技術は遺伝子産物の性質により大きく異なり、多岐に広がっているため、網羅的な解析は困難である。こうしたことから遺伝子とその機能を結びつける事が現在のゲノム創薬の大きな課題となってきており、

ノックアウトマ

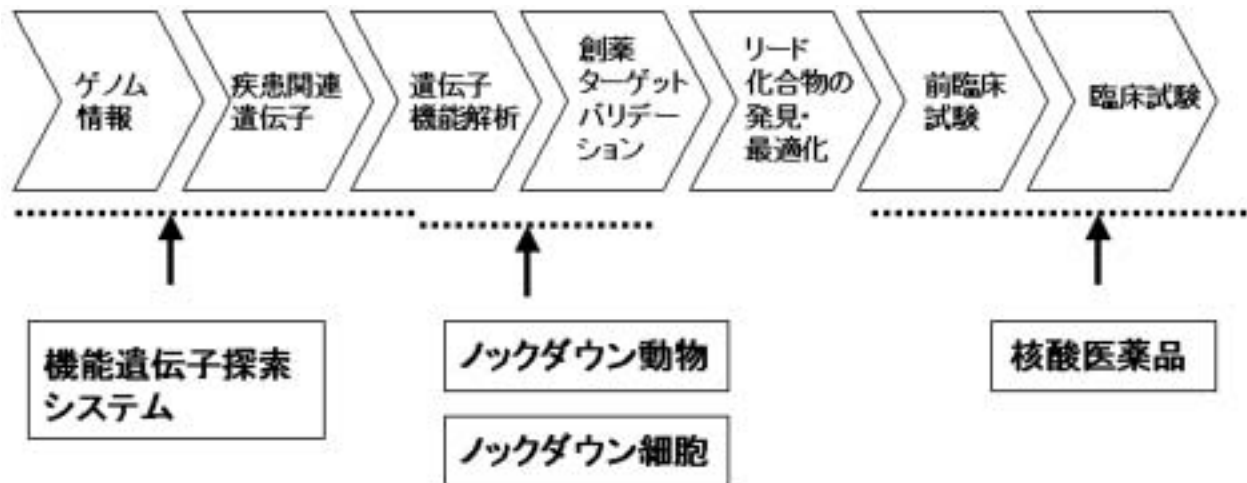
ウスやトランスジェニック動物を用いた機能解析が行なわれてきた。しかし、現在遺伝子機能破壊法として主に用いられている手法は相同組換えに基づくノックアウトマウスであり、その作製には2年近い作製期間と多くの労力、コストを必要とするため、膨大な数の遺伝子の中から創薬ターゲット遺伝子を見出す実験系としては必ずしも適当でない。このため培養細胞、動物個体レベルにおいて低コスト、短時間で評価可能な遺伝子発現抑制システムの開発は、創薬ターゲット遺伝子のバリデーションのスピードを飛躍的に高める事が可能であり、ゲノム創薬をさらに推進すると考えられる。最近これを可能にする技術の有力な候補として RNAi 技術が注目を集めている。

RNAi (RNA interference, RNA 干渉) は二本鎖 RNA を細胞に導入することにより、これに相同な配列をもつ mRNA が特異的に分解され、遺伝子の発現が抑制される現象で、1998年に線虫を用いた実験系において初めて報告された。その後、この現象が多くの生物で保存されていることが報告され、従来の遺伝子発現抑制法と比べ非常に簡便で、安定した抑制効果を示すことから、すでに線虫、ショウジョウバエなどいくつかの下等生物においては遺伝子発現抑制の標準的な技術として確立されている。一方、哺乳類細胞においては、下等生物と同様に RNAi システムは保存されているものの、長い二本鎖 RNA の導入が非特異的な遺伝子発現の抑制を著しく示すことから、当初その適用は初期胚、未分化細胞株などごく一部の細胞に限られていた。ところが2001年に、21ヌクレオチドの二本鎖合成 RNA 分子 (siRNA) が、哺乳類培養細胞において非特異的な抑制を引き起こすことなく RNAi 活性を誘導できることが示されたことから、RNAi 技術の哺乳類細胞への適用への道が開かれた。

遺伝子発現抑制系としての RNAi 技術の長所としては、従来のアンチセンス法などに比べ、配列特異性が高く、ま

た、非常に低い濃度で生体内において安定した抑制効果を示すことが挙げられる。このことはアンチセンス法で問題となる大量投与による細胞毒性を回避することが可能になる事を示している。合成 siRNA を用いた場合、哺乳類細胞ではその抑制効果は一時的であり、また細胞への siRNA の導入効率が 100%でないなどの問題があったが、2002年初頭のうちに数多くの研究室から発現ベクター系により RNAi を誘導するシステムが報告された。このことは特定の遺伝子を継続的に抑制した細胞株、動物個体を容易に作製できる事を意味しており、ノックアウトマウスに代わるノックダウンマウス作製への可能性が期待される。従来のノックアウトマウスを用いたシステムでは複数遺伝子の破壊は非常に長期間を要したが、RNAi 技術を利用したノックダウンマウスでは短時間で作製できる可能性がある。そうなれば、個体レベルでの複数遺伝子の機能的相互作用の解析も容易になるであろう。また、ES細胞が樹立されていないモデル動物においても、ノックダウン動物が作製できることが期待される。さらに RNAi の標的配列をランダム化させたシステムの構築や遺伝子発現チップを応用することにより、これまで述べてきたような遺伝子機能解析だけでなく、新規機能遺伝子の探索にも適用可能であろう。RNAi 技術の課題としては、siRNA の抑制効果が標的配列に依存しており、十分に抑制効果が得られないことがあるなどの問題が考えられるが、今後、RNAi の詳細なメカニズムの解析により抑制効果の高い配列の規則性も明らかになると考えられる。

siRNA の哺乳類細胞への有効性が発表されてから現在までまだ2年に満たないが、すでに *in vivo* においても siRNA、ベクター系ともに発現抑制効果が確認されており、次々に RNAi 技術の応用に向けた報告がなされている。これらのことから RNAi 技術の有用性と期待の高さがうかがえる。現時点ではまだ報告されていないものの、RNAi 技術を応用したノックダウンマウスについてもやがて報告されるであ



遺伝子発現抑制システムとしての RNAi 技術は、ゲノム創薬における様々なプロセスに応用可能である。

RNA 関連学会スケジュール 2003

国際シンポジウム RNA 2003 Kyoto

R N A 研究のフロンティア Frontier of RNA Science

日時：平成 15 年 11 月 24 日(月)～27 日(木) (4 日間)

場所：国立京都国際会館 (京都)

主催：日本 R N A 学会

代表：志村令郎 (日本 R N A 学会会長)

RNA 研究のフロンティアを明確にし, 21 世紀の新しい RNA 研究へと飛躍発展させることを目的として, 国際シンポジウムを開催する。本国際研究集会は, 第 5 回日本 RNA 学会年会と連係 (あるいは融合) して企画し, 外国からの招聘研究者 30 人程度を含む 300 ~ 400 人の規模で開催する予定です。井上丹・坂本博・井上邦夫・大野睦人ら関西地区のメンバーが中心になって準備を行う計画です。 (文責:大野睦人)

その他の RNA 関連国際学会

Cold Spring Harbor Meetings

Telomeres & Telomerase, April 30 - May 4, 2003

Retroviruses, May 20 - 25, 2003

Eukaryotic mRNA Processing, August 20 - 24, 2003

Neurobiology of Drosophila, October 1 - 5, 2003

RNA Society 2003 Annual Meeting

July 1-6, 2003 Vienna, Austria

編集後記

志村先生の随筆の中に、木原均の言葉として「これからの遺伝学は、遺伝子や遺伝子の働きをモノのレベルで研究するようになる」というのが出てきます。これを現在の状況を考えるとどのようになるのでしょうか。私個人的には「ゲノムの働きを個体のレベルで研究する」と書き換えることになるのではと思うのですが、いかがでしょうか。木原均の評伝を読むと、彼はコムギ染色体の研究から、一揃えの染色体のセットが遺伝子や個々の染色体よりも一段高次の遺伝的機能単位をなしているとの結論をひきだし、この新しい単位をウィンクラー (H. Winkler) の用語を用いゲノムと呼ぶよう提唱した、ということです。この巨人のあまたある業績の中で、私が好きなのは「種なしスイカの作出」と「フジの茎の右巻・左巻に関する観察」です。特に後者はとても興味深いモノです。フジの白花は茎が左巻で、フジ色の花をつける普通のフジは右巻なのだそうです（私はまだ確かめていませんが）。彼は右巻・左巻ということにとても興味があったようで（というより、おそらく、この世界の全ての現象に）、これ以外にも、たとえば、シメナワは儀式張る大社では右巻で、さもないと左巻であるとか、相撲の横綱の綱は右巻といった観察をしています。フジの話に戻りますと、花の色と茎の右巻・左巻が連鎖していることを示しており、今の科学を用いれば、右巻・左巻を決める遺伝子が取れそうな気がします。白石英秋さんの文章を読むと、そのような遺伝子の機能はRNAiやPTGSに関わっているのではないかと思えてくるのですが。

RNA Network Newsletter

第1巻第2号（2003年1月発行）

編集人 塩見春彦

発行人 中村義一

発行所 特定領域研究

「RNA情報発現系の時空間ネットワーク」広報担当

塩見春彦

徳島大学ゲノム機能研究センター

〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

Tel: 088-633-9450 Fax: 088-633-9451

e-mail: siomi@genome.tokushima-u.ac.jp



■ *Stemloop*