

3. ウイルス, ファージ, トランスポゾンと機能性低分子 RNA

金井 昭夫

慶應義塾大学 先端生命科学研究所

真核生物のマイクロ RNA (miRNA) にはウイルスゲノムを標的にするものがあり, ウイルスゲノムの中にも miRNA がコードされるような例が蓄積して来た. これら低分子の RNA はウイルスの感染や増殖に重要な役割を担っている. また, 生殖細胞では piRNA とよばれる低分子 RNA が内在的なトランスポゾンの発現を抑制している. さらに, 古細菌や真性細菌では CRISPR RNA とよばれる低分子 RNA がウイルスやファージのゲノムを標的にしていることが明らかになって来た. すなわち, 低分子 RNA には宿主の生体防御機構と大きく関わっているものがある. 低分子 RNA を使って, ウイルスやファージばかりでなく, 病原性細菌などの増殖をコントロール出来る可能性についても考察する.

はじめに

Non-coding RNA (ncRNA) はタンパク質に翻訳されることなく, RNA のままで様々な機能を遂行する分子の総称である. 古典的には, 転移 RNA (tRNA) やリボソーム RNA (rRNA) 等をさすが, 21 世紀に入ってから膨大な数の, 新しい機能性 ncRNA の存在が, 生物界の 3 つのドメインである真性細菌 (バクテリア), 古細菌 (アーキア) そして真核生物 (ユーカリア) の全てで報告されている. さらに近年では, ウイルスなどの比較的小さいゲノムの中にも数多くの ncRNA が見いだされている. この総説では, これら ncRNA のうち, 低分子の機能性 ncRNA (本稿では低分子 RNA と記載する) に焦点をあて, ncRNA とウイルスやファージ, あるいはトランスポゾンのような可動性遺伝因子 (Mobile genetic element) との制御関係を考察したい.

詳細な説明をする前に, 新しい ncRNA の代表例について, 大まかな位置づけを確認しておきたい. これらの

ncRNA の多くが, 21 世紀になってから, ゲノムプロジェクト以降のトランスクリプトーム解析 (cDNA プロジェクト) の結果として発見された¹⁻⁵⁾. ここで, 先に述べた生物のドメインと RNA 分子の大きさ (長さ) を目安にすると, 新しい ncRNA について考えやすい. まず, 真核生物には miRNA と呼ばれる 21 ~ 24 塩基程度の低分子 RNA があり, 基本的には標的となる mRNA に結合 (ハイブリダイズ) し, 標的 mRNA の翻訳抑制や分解を介して, その機能を遂行する⁶⁾. 低分子 RNA と標的 mRNA との塩基配列が完全に相補の関係にあるときには, その低分子 RNA を特に small inhibitory RNA (siRNA) と呼び, 標的となる mRNA 鎖の切断が起こる. いわゆる「RNA 干渉」の主体をなす分子である. また, 主に生殖細胞で発現している piRNA と呼ばれる 26 ~ 31 塩基程度の低分子 RNA があるが, こちらは標的となる RNA がコードされるようなゲノム領域の転写の不活性化や DNA のメチル化を介して, 遺伝子発現の抑制に関与している^{7,8)}. さらに, 真核生物には通常の mRNA のようにエクソンやイントロンを持ち, キャップ構造の付加や Poly (A) テイルをもつ, mRNA 様 ncRNA (または高分子 ncRNA や long ncRNA, lncRNA と呼ばれる) が存在する. この mRNA 様 ncRNA は, その機能が明確なものは数少ないが, 遺伝子の発現調節やエピジェネティックな制御に関与することが報告されている^{2,9,10)}. 一方で, 原核生物である真性細菌や古細菌では, 50-200 塩基程度の, その名の通り small RNA (sRNA) と呼ばれる分子種が報告されている¹¹⁾. 原核生物のゲノムではタンパク質をコードする遺伝子が密につまっているので, これ

連絡先

〒 997-0017

山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1

慶應義塾大学 先端生命科学研究所

TEL: 0235-29-0524

FAX: 0235-29-0525

E-mail: akio@sfc.keio.ac.jp

表1 ウイルス, ファージ, トランスポゾンと低分子 RNA

低分子RNA	長さ (nt)	主な生物ドメイン	標的	低分子 RNA の機能
miRNA (siRNA)	21~24	ウイルス、真核生物	ウイルスゲノム トランスポゾン	ウイルスの増殖抑制あるいは促進 トランスポゾンの発現抑制
piRNA	26~31	真核生物	トランスポゾン	トランスポゾンの発現抑制
tRNA	73~93	真核生物	レトロウイルスのゲノム	DNA 複製のプライマーとなる
CRISPR RNA	約30*	真性細菌、古細菌 (アーキア)	ウイルスやファージのゲノム、プラスミド 他の細菌ゲノム	ウイルスやファージの増殖抑制、プラスミドの分解 ゲノム水平伝搬の抑制
small RNA	50~200	真性細菌	細胞増殖に関わる mRNA 細菌ゲノムのプロファージ領域	細菌の増殖制御?

* CRISPR RNA の 1 ユニットに対応するスペーサーとリピートの典型的な長さ (詳細は本文を参照)

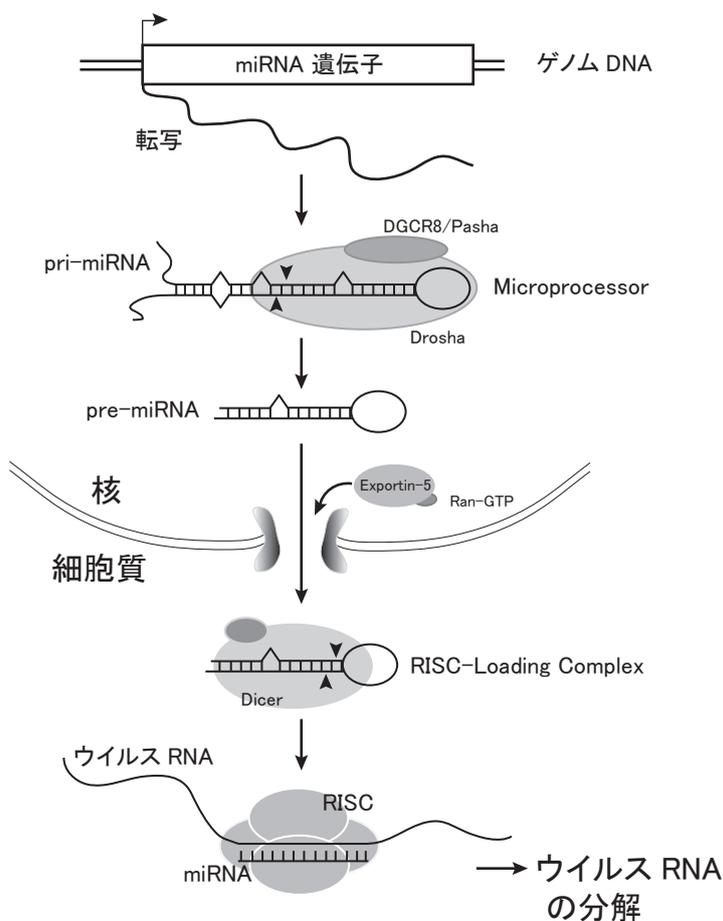


図1 miRNA の発現, プロセッシングと標的となるウイルス RNA 分解の模式図.

宿主細胞の miRNA がウイルス RNA を分解するまでの過程について説明する。核内で転写された pri-miRNA に対して、RNase III ドメインを持つ酵素 Drosha が第 1 段階目のプロセッシングを遂行する。その結果、pri-miRNA の特異的な箇所での切断され 70 ~ 100 塩基長の pre-miRNA (前駆体 miRNA) が生じることになる。この pre-miRNA は、核外への輸送にかかわる Exportin-5 を主体とした複合体により認識され、細胞質に運び出される。細胞質の pre-miRNA は、第 2 のプロセッシングを担う酵素であり、これも RNase III ドメインを持つ酵素である Dicer により切断されることで、miRNA となり、RISC と呼ばれるタンパク質複合体の中でウイルスの RNA を分解すると考えられる。

ら新しく発見された ncRNA は、今まで既知であった遺伝子と遺伝子の間（遺伝子間領域）や、タンパク質をコードする遺伝子のアンチセンス側で見つかることが多い。また、これに加えて、原核生物の多くには CRISPR と呼ばれるゲノム領域から産生される低分子 RNA が、宿主の生体防御において重要な働きをすることが明らかになりつつある（原核生物の RNA 干渉と云われている）¹²⁾。

繰り返すが、ncRNA の機能は多様であり、それは、遺伝子発現の調節から、細胞の増殖、分化、発生、癌化、生体防御までにおよぶ。一方で、全ての生物種において共通と考えられる事象は、自己と、自己以外の核酸を有した生物種との、低分子 RNA を介してのせめぎ合いである。この意味では、ウイルスがコードする miRNA や、宿主細胞がコードする miRNA でウイルスゲノムを標的にするもののリストやその詳細をまとめて行くのが、本来の筋でもあろうが、既に優れた総説が発表されていることもあり¹³⁻¹⁵⁾、本稿においては、より一般的な視点を追い求めることとした。すなわち、機能性の低分子 RNA と標的となるウイルスだけでなく、ファージも、あるいはトランスポゾンのような可動性遺伝因子（Mobile genetic element）との制御関係もあわせて比較することで、その共通性なり、異質性を考察した。本稿に登場する主たる低分子 RNA については表 1 にまとめている。

ウイルスゲノムを標的とする宿主由来の miRNA とウイルスゲノムがコードする miRNA

機能性低分子 RNA がウイルスに対する生体防御に関わるということは、ウイルスゲノムを標的にする宿主細胞の miRNA (あるいは siRNA) があるということに他ならない。ここで、宿主細胞が miRNA を作り出す過程を理解することが、ウイルスの miRNA 研究を理解するにも必要であるので、その概略を図 1 にまとめた（厳密には miRNA を生じる過程と siRNA を生じる過程は区別される）⁶⁾。まず、miRNA も短いとはいえ、ゲノム DNA にコードされており、特定の合成酵素によって生じるのではないことに留意いただきたい。直接の転写産物は pri-miRNA (primary miRNA) と呼ばれ、図に示すように特徴的な RNA の二次構造を有する。この pri-miRNA に対して、Drosha と呼ばれる酵素が第 1 段階目のプロセッシングを遂行し、70-100 塩基長の pre-miRNA (前駆体 miRNA) が生じることになる。Drosha は 2 つの RNase III ドメインと dsRNA 結合ドメインを持つ酵素であり、Pasha (Partner of Drosha; 哺乳類では DGCR8 と呼ばれる) との複合体を形成している。次に、pre-miRNA は、核外への輸送にかかわる Exportin-5 を主体とした複合体により認識され、細胞質に運び出される。その結果、pre-miRNA は、第 2 のプロセッシングを担う、これもまた、RNase III ファミリーに属する酵素である Dicer により切断されて、miRNA が生じる。細胞質にお

いて、Dicer は単独で働くのではなく、RISC-loading complex (RLC) と呼ばれる複合体を形成していることがわかっている。これは miRNA (siRNA) が最終的に機能を発揮し、ウイルス RNA を攻撃する場である RISC (RNA induced silencing complex) の前段階ともいべき複合体である。

具体的な例を使って説明したい。2005 年にフランス CNRS のグループが、レトロウイルスである PFV-1 (Primate foamy virus type-1) は、ヒトゲノムがコードする miR-32 の標的になっていると報告した¹⁶⁾。このウイルスゲノムは Gag, Pol, Env, EnvBet, Tas, Bet などのタンパク質をコードするための mRNA をオールタナティブスプライシングにより生成するが、これらの RNA に共通する領域に miR-32 の結合領域が存在する。すなわち miR-32 はこのウイルスの増殖を押さえることが出来る。興味深いことに、同ウイルス由来の Tas タンパク質は哺乳類の細胞における miRNA 依存性のサイレンシングを抑制する。つまり、ヒトの miRNA とウイルスのタンパク質が RNA 干渉に関わる分子を使ってせめぎあっていることになる。C 型肝炎ウイルス (HCV) でも面白い研究がある。米国カルフォルニア大学のグループは、インターフェロン β でヒト肝癌細胞株の Huh7 を処理すると 8 種の miRNA が誘導されてくるばかりか、HCV のゲノムがその標的になりうることを報告した¹⁷⁾。論文中で明確にウイルス RNA の複製が阻害されているのは miR-448 (ウイルス粒子のコアタンパク質に対応する RNA 領域を標的とする) と miR-196 (非構造的タンパク質である NS5A に対応する RNA 領域を標的とする) である。インターフェロンに抗ウイルス作用があるのは良く知られたことであるが、インターフェロンで誘導される miRNA にも抗ウイルス作用を持つものがあるということになる。一方で、HCV の増殖には肝臓特異的な miR-122 が必要とされている¹⁸⁾。この miRNA が如何にウイルスの増殖に関わっているのかは今後の研究を待たねばならないが、miRNA は使い様で毒にも薬にもなるということが分かる。さらに、もう一つの例として、miRNA のプロセッシングに関わる Dicer が、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の複製にも関わっているということを述べておきたい。HIV の両端に LTR という複製に必要な領域があるが、ウイルス由来の転写活性化タンパク質である Tat は LTR の初期転写産物上にある TAR 配列に結合してその転写を促進することが明らかになっている。この TAR 配列から miRNA が産生されるという報告があり、TAR miRNA を産生するのが Dicer である^{19,20)}。TAR miRNA の機能はいまだ明らかとなっていないが、ウイルス複製の阻害が示唆されている。さらに、TAR miRNA と同じ図式が、HIV の Nef にもあてはまる。Nef は宿主の細胞膜に局在し、エイズの発症に重要な役割を演じていると考えられているが、Nef 領域に対応するヘアピン構造をとった 2 本鎖 RNA からも

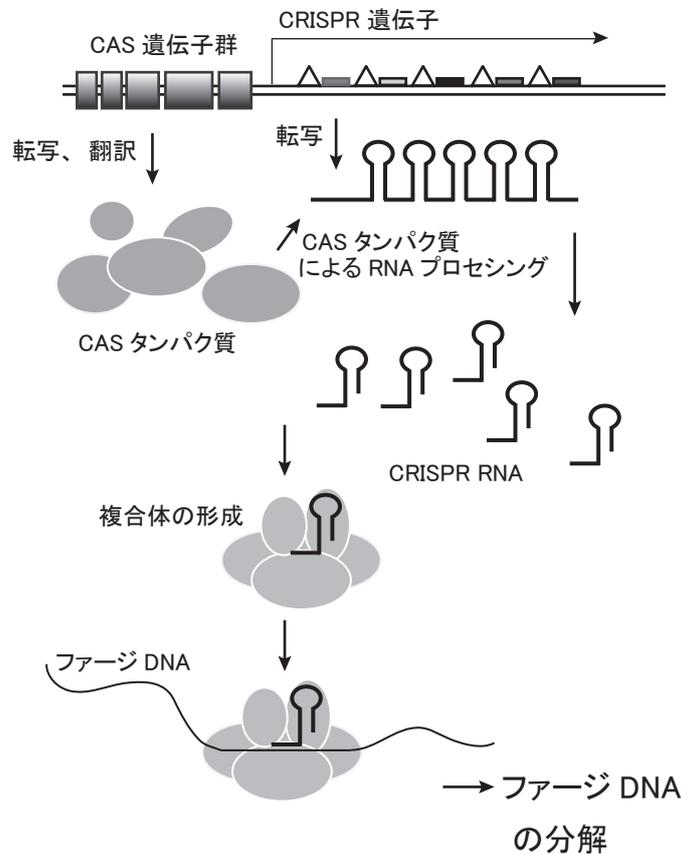


図2 CRISPR 遺伝子の発現、プロセッシングと標的となるファージ DNA 分解の模式図。

宿主となる細菌の CRISPR RNA がファージ DNA を分解するまでの過程について説明する。CRISPR 遺伝子は短いリピート配列（図中の三角形）の間に外来のファージに相補的な配列であるスペーサーを持っている（図中の長方形）。一方、CAS 遺伝子群は CRISPR の一次転写産物のプロセッシングや標的 DNA に対するサイレンシングに必要なタンパク質群である。プロセッシングを受けた低分子の CRISPR RNA が CAS タンパク質とともに複合体を形成し、標的となるファージ DNA の分解を誘導すると考えられる。

miRNA が産生される²¹⁾。この miRNA も自身のゲノムに作用して、Nef の発現を押さえ、その結果ウイルスの感染性を押さえることになる。さて、2007 年に我々の研究グループは、ヒトに感染するウイルスとしないウイルスのゲノムについて、ヒトの miRNA を用いた標的配列のコンピュータ解析を行い、ヒトに感染するウイルスは、そうでないものに比べて、よりヒトの miRNA の標的になりやすい傾向を持つことを報告した²²⁾。標的となる可能性のあるウイルスのリストを作成したところ、1 本鎖の RNA ウイルスが多いことが統計的に示唆された。この研究は標的となるウイルスの配列と miRNA のリストをより厳密に検討している段階である。

一方、ウイルスゲノムの方も miRNA をコードしているものがある。ウイルス miRNA で最初に詳細な報告がなされたのは、2004 年の Science 誌において Epstein-Barr virus (EBV) を用いた例であろう。著者らは、EBV を感染させた細胞から

低分子 RNA のクローニングを行ない、クローンの中に EBV ゲノム由来の miRNA を 5 種見つけるに至った²³⁾。その後、今日に至るまで、miRNA を持つウイルスは 20 種以上に及び、その数は未だに増え続けている。例えばヒトと関連するウイルスで代表的なところでは、Herpes Simplex Virus-1 及び -2、Human cytomegalovirus、Human immunodeficiency virus-1、JC Polyomavirus、Kaposi sarcoma-associated herpesvirus といったところである。ここで、ヒト以外に感染するものも含めても、miRNA をコードするウイルスの大半は DNA ウイルスのようである。それは miRNA の産生が核内と細胞質の RNA プロセッシングを経ていることと無縁でないように思われる。少なくとも、細胞質に持続感染する RNA ウイルスでは、核における miRNA のプロセッシングシステムは利用できない。実際、EBV の miRNA をはじめ、ほとんどのウイルス miRNA がゲノム中で miRNA 前駆体に特徴的なステムとループよりなる RNA

二次構造を有した形でコードされている。すなわちウイルスの miRNA 産生は、宿主細胞の miRNA プロセッシングシステムを利用していると考えられる。また、これらの miRNA は自身の RNA や宿主細胞の特異的な mRNA を標的として、ウイルスの感染や増殖を制御している²⁴⁻²⁶⁾。

トランスポゾンの発現を抑制する低分子 RNA

2006 年くらいから複数の研究グループにより生殖細胞系列に特異的な発現を示す新しいタイプの低分子 RNA の存在が報告された^{7,8)}。それは miRNA より少し長い 26 ~ 31 塩基程度の大きさをもっていた。前述のように miRNA や siRNA は RISC という複合体を介して、その機能を遂行するが、RISC を構成するタンパク質因子の中で、最も重要と考えられているのが、Argonaute (AGO) タンパク質である。ここで、miRNA などが AGO ファミリーのなかの AGO サブファミリーと複合体を形成するのに対して、先の新しい低分子 RNA は、AGO ファミリーのなかの PIWI サブファミリーと複合体を形成することから、piRNA (Piwi-interacting RNA) と呼ばれている。piRNA と特異的に結合する PIWI サブファミリータンパク質について、まず、マウスの例をとりながら説明したい。マウスでは同サブファミリーに属する 3 種のタンパク質、MIWI, MILI, MIWI2 (MISTI) が報告されている⁷⁾。これらのすべてが生殖細胞で、かつ時期特異的に発現しており、特に精巣の発生過程についての解析が進んでいる。遺伝子のノックアウトマウスを作製すると、すべてのケースにおいて、そのホモ変異体は不妊となり、生殖細胞でレトロトランスポゾン (ゲノム上に数多く存在するリピート様配列) の発現が上昇してくる。ここで、レトロトランスポゾン発現の上昇はゲノム DNA 上の脱メチル化と強くカップルしている。すなわち、レトロトランスポゾン領域の発現を、メチル化を介して押さえ込むことが、精子形成過程や成体の精巣におけるマウス PIWI サブファミリーの役割とみることができる。同様な事象は、ショウジョウバエの精巣や卵巣においても詳細な研究が報告されているが、こちらでは、DNA のメチル化というより、遺伝子発現を何らかの形で抑えているようである^{8,27)}。ここで、ショウジョウバエの piRNA は、ほとんどがリピート配列由来のため repeat associated small interfering RNA (rasiRNA) と呼ばれており、その大半が前駆体であるレトロトランスポゾンの転写産物から生じている。すなわち、哺乳類でも昆虫においても、生殖細胞の形成過程において、遺伝子に異常をきたすようなトランスポゾンの転移を piRNA が防いでいると考えられる。これに加えて、植物 (シロイヌナズナなど) では非常に多くのトランスポゾンが知られているが、これらの発現を押さえ込むのは siRNA である。この時には DNA のメチル化に加え、ヒストンのメチル化がその遺伝子の不活性化に関与している^{28,29)}。最近の研究では、

植物体がストレスを受けたときにレトロトランスポゾンの活性化が観察されるが、この活性化過程を押さえるのにも siRNA の経路が重要な役割を担うことが報告されている³⁰⁾。

少し付け加えておかなければならないのは tRNA についてである。レトロウイルスの DNA 合成に tRNA がプライマーとして働くことは周知のことである³¹⁾。また、ショウジョウバエにおけるコピアなどのトランスポゾンでも部分的に切断された tRNA をプライマーに用いている³²⁾。とすれば tRNA は翻訳といった仕事以外にもウイルスの増殖を制御する機能性低分子 RNA ということになる。最近、私たちのグループは主に古細菌の tRNA を詳細に解析し、様々な形で分断された tRNA 分子を見つけるに至った³³⁻³⁵⁾。tRNA はウイルスが宿主のゲノムに入り込む時のターゲットサイトになるという報告があるが、面白いことに、分断された tRNA はウイルスのゲノムへの攻撃を防御することが示唆されている^{36,37)}。

原核生物の RNA 干渉を担う CRISPR システムと新しい低分子 RNA

RNA 干渉という真核生物特有のシステムと思われる方も多いようだが、2005 年くらいから明らかになって来た CRISPR が、原核生物の RNA 干渉システムに相当すると考えられるようになった³⁸⁻⁴⁰⁾。原核生物のうち、真性細菌では約 40% が、また古細菌では約 90% のゲノムがこのシステムを有している。ここで、CRISPR とは clustered regularly interspaced short palindromic repeat の略称であるが、これはゲノム上に存在する一群の短い低分子 RNA をコードする領域に相応する。図 2 を参照していただきたい。CRISPR はリピート (同一のクラスターでは同じ配列) とスペーサーと呼ばれる領域 (ファーージやプラスミドの配列が入り込んでいる) が繰り返した構造をとっている。多くの場合、その上流には CRISPR-associated genes (CAS 遺伝子群) が存在するが、CAS 遺伝子産物は CRISPR RNA のプロセッシングやその機能発現を担うと考えられている。すなわち、CRISPR システムは独自の機構を持ちながらも、真核細胞の RNA 干渉システム (図 1) と類似するところがある。CRISPR 遺伝子が真核生物でいうところの siRNA に、また CAS 遺伝子群が siRNA のプロセッシングや機能遂行にかかわる Dicer や AGO などに相当することになる (真核生物の siRNA 制御に関わるタンパク質のホモログではない)。

CRISPR の機能について、さらに詳しく見ていこう。原核生物がファーージ等の攻撃にさらされると、そのファーージの配列を含んだ CRISPR 遺伝子の発現が誘導されると考えられる。まず、短い RNA ユニットが連なった形の転写が行なわれ、ここから CAS タンパク質がリピートとスペーサーを 1 組ずつ含むような形でプロセッシングを行ない、CRISPR RNA を産生する。プロセッシングの目印になるの

はリピート配列に由来する RNA の二次構造であると考えられる。次に、各 CRISPR RNA は CAS タンパク質と複合体を形成し、この複合体中でスペーサーによって探し求められたファージゲノム中の同一配列を切断することで、ファージからの攻撃を回避することになる。興味深いことに、CRISPR システムは、標的となるファージやウイルスを撃退するだけでなく、他の細菌に由来するようなゲノムの水平伝搬を抑制しているとの報告もある⁴¹⁾。また、非常に重要な機能の一つとして、CRISPR は感染したファージの配列の一部をスペーサーとして取り込み、次の感染に備えることが出来る⁴⁰⁾。一方、最近、CAS タンパク質がない種では CRISPR RNA のプロセッシングを RNase III が行なっているとの報告があった⁴²⁾。真核生物でも原核生物でも、この RNase III という酵素の仲間が低分子 RNA を産生するのに中核的な位置を占めているようである。

さて、近年に著しい発展が見られるタイリングアレイや RNA-Seq (次世代シーケンサを用いた RNA 解析) といった手法は、細菌の低分子 RNA についても非常に多くの知見をもたらした。私たちのグループでも、大腸菌の幾つかの生理条件下で低分子 RNA の網羅的な解析を試みたが、その結果、大腸菌など非常に良く研究されている生物種においても、まだまだ新しい低分子の RNA が 100 種以上存在し、またその中にはゲノムに内在しているプロファージ領域から発現しているものが、約 10 種類はあることが分かって来た (新原ら、投稿中)。ここで、プロファージ領域からでる低分子 RNA といったものが、いままで述べて来た自己と (低分子 RNA を作る側)、非自己 (低分子 RNA の標的になる側) を考える上で面白い観点を提供することに気がついた。いったいこれらの低分子 RNA は、ファージとして持っていたのだろうか?あるいは大腸菌のゲノムに取り込まれることにより生まれたのだろうか?ということだ。残念ながらプロファージ領域には塩基の変異が蓄積しており、オリジナルのファージを同定することが困難なため、そのファージが低分子 RNA を発現するか否かということも現状では分からない。また、このような低分子 RNA は極めて限定された種間でしか保存されていないために、進化的な解析アプローチも限定的であり、なかなか機能に結びつかない。そんな現状下でもう 15 年も以前から面白い機能が示されているのが、プロファージ領域から発現する大腸菌低分子 RNA の 1 つ DicF である。

DicF はまずオペロンとして発現し、その後 60 塩基程度の低分子 RNA にプロセッシングされる。この切断に必要な酵素は RNase III と RNase E である^{43,44)}。また、プロセッシングを受けた Dic F RNA の標的となるのは、大腸菌の細胞分裂に関与する FtsZ であり、その結果、FtsZ mRNA の翻訳を阻害することになる⁴⁵⁾。実際、DicF を過剰発現させた大腸菌では、細胞分裂が阻害されるために、長く伸びた菌の表現型が観察される。それでは、ファージ

は大腸菌を分裂させないために、この低分子 RNA を生み出したのだろうか?それならば何故、プロファージとなった現在の領域からも、通常の培養条件下にて、DicF はある一定のレベルで発現を続けているのだろうか? DicF RNA の生理機能を知るためにはもう少し時間がかかりそうである。また、最近に枯草菌低分子 RNA の RNA-seq が行なわれ、本細菌においても、プロファージ領域から低分子 RNA の発現があることが述べられている⁴⁶⁾。

低分子 RNA によるウイルスや細菌の増殖を阻害する試み

これまで、低分子 RNA によりウイルスやファージ、またはトランスポゾンの増殖を変動させるような具体例について述べて来た。これらは生体内で実際に備わっているシステムの例である。それでは、低分子 RNA を使って人工的にウイルスなどに抵抗性のある個体を作り出せるのだろうか?さらには、人工的な低分子 RNA を用いることで、宿主側である細菌や細胞の増殖もコントロールすることが可能なのではないだろうか?

最初の命題に直接答えるわけではないが、2006 年に米ハーバード大から Herpes simplex virus -2 (HSV-2) を用いた面白い系の構築が報告されている⁴⁷⁾。ここで、HSV-2 は HIV 感染伝搬の補助因子であるので、性交渉を介した HSV-2 の伝搬を防ぐことは、HIV の感染拡大を防ぐためにも貢献することになる。著者らは、siRNA を脂質と混合することで、マウスの膣や子宮頸部で効率よく、その上皮の細胞に取り込まれること、また、少なくとも 9 日間は導入した siRNA が効果的に標的とする遺伝子の発現 (翻訳) を抑制することを見いだした。そこで、HSV-2 の UL27 遺伝子 (エンベロープタンパク質をコード) や UL29 (DNA 結合タンパク質をコード) を標的にする siRNA を用いたところ、そのマウスは致死量の HSV-2 感染からも防護されたのである。これは、適当な siRNA をうまく適所に発現させてやることで、個体レベルで、ウイルスの攻撃から逃れられる可能性を示している。その一方で、HSV-2 の感染が内臓ではなく、上皮細胞という点で siRNA の効果が届きやすい場所であったことは否めないだろう。これはアンチセンス RNA やリボザイムを用いた時も同じ考察がなされることが多い。通常は、細胞レベルでは効果があっても、個体となるとなかなか難しい。いわゆる、「ドラックデリバリー」の問題がある。

それでは、バクテリアのような単細胞生物を用いれば、それも細胞内で人工の低分子の RNA を発現するようになった場合はどうだろうか?この問いに答えるために、我々の研究グループでは大腸菌の増殖を抑制するような人工低分子 RNA を同定するようなシステムの構築に挑んだ⁴⁸⁾。図 3A は構築した系の概略を示している。我々は、まず、ランダムな 60 塩基の塩基配列含んだインサート領域を発現

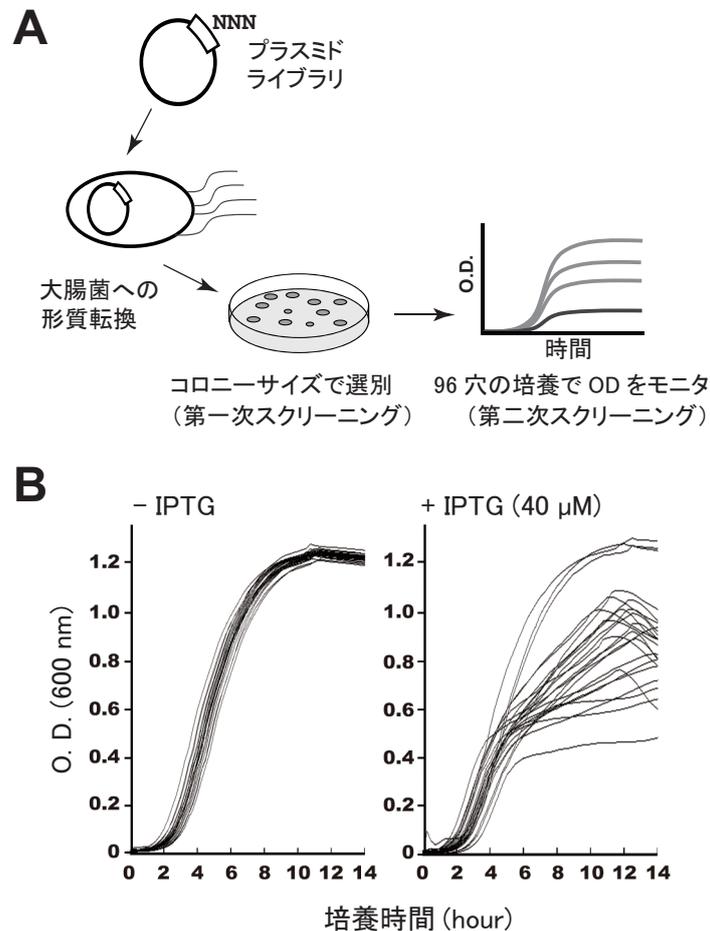


図3 大腸菌の増殖を抑制する人工低分子 RNA スクリーニング系の開発 (文献⁴⁸⁾ を改変)。

(A) 大腸菌の増殖を抑制するような人工低分子 RNA のスクリーニング系。

まず、人工低分子 RNA からタンパク質への翻訳がないようにするために、読み枠をずらした複数の停止コドンの後に、ランダムな 60 塩基長の配列を含んだ (NNN で表示) インサートを持つプラスミドライブラリの構築を行なう。このインサート領域は誘導剤である IPTG で発現可能となっている。IPTG の有無において次なる連続した 2 段階のスクリーニングを行なう。

(i) IPTG を含んだプレート上での大腸菌コロニーの大きさによる選別を行なう。

(ii) 96 穴のプレートを用いた吸光度 (600 nm) を比較し、IPTG 依存 (低分子 RNA の発現依存) に大腸菌の増殖を抑制するプラスミドクローンを同定する。

(B) 人工低分子 RNA の発現誘導が無し (-IPTG) と有り (+IPTG) の条件下における大腸菌の増殖曲線 24 例。

様々な段階で増殖の抑制を起こすクローンが得られていることが分かる。

するようなプラスミドライブラリを作成した。この時に、ランダム配列の上流からは、翻訳への目印となるリボソームの結合領域を除去し、そこに、読み枠をずらした複数の停止コドンを導入した。このことにより、人工低分子 RNA からタンパク質への翻訳が起こらないようにしたのである。ここで、インサート領域は誘導剤である IPTG で発現可能となっているが、どんな低分子 RNA でも非常に高発現の場合は増殖に影響が出てくるので、なるべく薄い IPTG の濃度で、かつ効果的な濃度を求めた (40 μ M)。次に、この低分子 RNA 発現ライブラリを使用して、大腸菌

の増殖に影響をもたらすクローンのスクリーニングを行なった。IPTG の有無で増殖に差があるものが目的のものである。スクリーニングを効率的にするために、IPTG の有無において次なる連続した 2 段階のスクリーニングを行なった。すなわち、(i) IPTG を含んだ寒天培地上での大腸菌コロニーの大きさによる選別を行なう。(ii) 96 穴のプレートを用い液体培地の吸光度 (600 nm) を比較し、IPTG 依存 (低分子 RNA の発現依存) に大腸菌の増殖を抑制するプラスミドクローンを同定することである。その結果、様々な増殖パターンをインサート配列依存に呈する

大腸菌を区別することが可能になった (図 3B)。これまでのところ、大腸菌の増殖を抑制するような 80 種以上の低分子 RNA の配列が得られている。しかしながら、その配列からメカニズムに至る共通性はまだ見えてこない。将来的にさらに数多くの配列と増殖のパターンを比較して、もし、ここにルールを導き出すことが出来るならば、そのルールは、例えば、病原性細菌の増殖阻害などに応用可能と思われる。

おわりに

本稿で述べてきたように、低分子の機能性 RNA は生体防御という観点から、生物界の 3 大ドメイン (真核生物、真性細菌そして古細菌) の全てで重要な役割を演じている。そして、その制御機構の中心にあるものが RNA 干渉のメカニズムであることは疑いがないだろう。一方で、RNA 干渉のメカニズムといっても全てが明らかとなっているわけではない。その上で、例えば細菌に内在するような低分子 RNA について考えてみても、百以上の新たな遺伝子の存在が示唆されており、しかも、ほとんどの機能は未知のままである。まして、先の節で紹介した人工低分子 RNA の細菌増殖抑制のメカニズムに至っては、まだまだ始まったところである。とどまるところ、RNA は奥が深い。だからこそ、その先には、極めて重要な基礎的な知見が横たわり、それに立脚する応用技術 (ここではウイルスゲノムの分解、病原性細菌の増殖阻害など) に展開できると期待するのである。

また、本稿を読んでいただけた諸兄には自明だろうが、制御機構を考える上では、機能性 RNA 側ばかり見ているは駄目なことを再認識させられる。図 1 も図 2 も低分子 RNA がタンパク質との複合体を形成することで、その機能を最終的に遂行している。そして、今回の総説のように、並列的に生物種や機能性低分子 RNA を書き連ねたからこそ、関連するシステムの比較がある程度可能になったと思われる。間違いなく、機能性 RNA の解析にはそれと相互作用するようなタンパク質側からも現象を見つめなければならない。例えば、RNase III という酵素は、節が変わって、取り扱う低分子 RNA の種類が変わっても繰り返し現れて来る。とすれば、この酵素が今後も RNA 干渉のメカニズムやシステムの進化を考える上での鍵になるだろう。

謝 辞

本稿の作成について、慶應義塾大学先端生命科学研究所 RNA 研究グループの皆様にお世話になりました。また本稿を批判的に通読していただいた同グループの藤島皓介博士、高根香織氏に感謝いたします。

参考文献

1) Okazaki, Y. *et al.* Analysis of the mouse transcriptome

- based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563-573, 2002.
- 2) Numata, K. *et al.* Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection. *Genome Res* 13, 1301-1306, 2003.
 - 3) Vogel, J. *et al.* RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res* 31, 6435-6443, 2003.
 - 4) Shabalina, S. A. & Spiridonov, N. A. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome Biol* 5, 105, 2004.
 - 5) Deng, W. *et al.* Organization of the *Caenorhabditis elegans* small non-coding transcriptome: genomic features, biogenesis, and expression. *Genome Res* 16, 20-29, 2006.
 - 6) Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610, 2010.
 - 7) Aravin, A. A. *et al.* A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31, 785-799, 2008.
 - 8) Siomi, M. C., Miyoshi, T. & Siomi, H. piRNA-mediated silencing in *Drosophila* germlines. *Semin Cell Dev Biol* 21, 754-759, 2010.
 - 9) Orom, U. A. *et al.* Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* 143, 46-58, 2010.
 - 10) Tsai, M. C. *et al.* Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329, 689-693, 2010.
 - 11) Waters, L. S. & Storz, G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615-628, 2009.
 - 12) Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6, 181-186, 2008.
 - 13) Umbach, J. L. & Cullen, B. R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev* 23, 1151-1164, 2009.
 - 14) Ouellet, D. L. & Provost, P. Current knowledge of MicroRNAs and noncoding RNAs in virus-infected cells. *Methods Mol Biol* 623, 35-65, 2010.
 - 15) Tsunetsugu-Yokota, Y. & Yamamoto, T. Mammalian microRNAs: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1, 1-9, 2010.
 - 16) Lecellier, C. H. *et al.* A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308, 557-560, 2005.
 - 17) Pedersen, I. M. *et al.* Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449, 919-922, 2007.
 - 18) Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581, 2005.
 - 19) Klase, Z. *et al.* HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in

- chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC Mol Biol* 8, 63, 2007.
- 20) Ouellet, D. L. *et al.* Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res* 36, 2353-2365, 2008.
 - 21) Omoto, S. *et al.* HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology* 1, 44, 2004.
 - 22) Watanabe, Y., Kishi, A., Yachie, N., Kanai, A. & Tomita, M. Computational analysis of microRNA-mediated antiviral defense in humans. *FEBS Lett* 581, 4603-4610, 2007.
 - 23) Pfeffer, S. *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736, 2004.
 - 24) Triboulet, R. *et al.* Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 315, 1579-1582, 2007.
 - 25) Stern-Ginossar, N. *et al.* Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317, 376-381, 2007.
 - 26) Umbach, J. L. *et al.* MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454, 780-783, 2008.
 - 27) Aravin, A. A., Hannon, G. J. & Brennecke, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318, 761-764, 2007.
 - 28) Tran, R. K. *et al.* Chromatin and siRNA pathways cooperate to maintain DNA methylation of small transposable elements in Arabidopsis. *Genome Biol* 6, R90, 2005.
 - 29) Hollister, J. D. *et al.* Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between Arabidopsis thaliana and Arabidopsis lyrata. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2322-2327, 2011.
 - 30) Ito, H. *et al.* An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472, 115-119, 2011.
 - 31) Mak, J. & Kleiman, L. Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* 71, 8087-8095, 1997.
 - 32) Kikuchi, Y., Ando, Y. & Shiba, T. Unusual priming mechanism of RNA-directed DNA synthesis in copia retrovirus-like particles of Drosophila. *Nature* 323, 824-826, 1986.
 - 33) Soma, A. *et al.* Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in Cyanidioschyzon merolae. *Science* 318, 450-453, 2007.
 - 34) Sugahara, J. *et al.* Comprehensive analysis of archaeal tRNA genes reveals rapid increase of tRNA introns in the order thermoproteales. *Mol Biol Evol* 25, 2709-2716, 2008.
 - 35) Fujishima, K. *et al.* Tri-split tRNA is a transfer RNA made from 3 transcripts that provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2683-2687, 2009.
 - 36) Randau, L. & Soll, D. Transfer RNA genes in pieces. *EMBO Rep* 9, 623-628, 2008.
 - 37) Sugahara, J., Fujishima, K., Morita, K., Tomita, M. & Kanai, A. Disrupted tRNA gene diversity and possible evolutionary scenarios. *J Mol Evol* 69, 497-504, 2009.
 - 38) Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712, 2007.
 - 39) Brouns, S. J. *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960-964, 2008.
 - 40) Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167-170, 2010.
 - 41) Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322, 1843-1845, 2008.
 - 42) Deltcheva, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607, 2011.
 - 43) Faubladiet, M., Cam, K. & Bouche, J. P. Escherichia coli cell division inhibitor DicF-RNA of the dicB operon. Evidence for its generation in vivo by transcription termination and by RNase III and RNase E-dependent processing. *J Mol Biol* 212, 461-471, 1990.
 - 44) Faubladiet, M. & Bouche, J. P. Division inhibition gene dicF of Escherichia coli reveals a widespread group of prophage sequences in bacterial genomes. *J Bacteriol* 176, 1150-1156, 1994.
 - 45) Tetart, F. & Bouche, J. P. Regulation of the expression of the cell-cycle gene ftsZ by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules. *Mol Microbiol* 6, 615-620, 1992.
 - 46) Irnov, I., Sharma, C. M., Vogel, J. & Winkler, W. C. Identification of regulatory RNAs in Bacillus subtilis. *Nucleic Acids Res* 38, 6637-6651, 2010.
 - 47) Palliser, D. *et al.* An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439, 89-94, 2006.
 - 48) Komasa, M. *et al.* A screening system for artificial small RNAs that inhibit the growth of Escherichia coli. *J. Biochemistry* 150, 289-294, 2011.

Virus, phage, transposon and their regulatory small non-coding RNAs

Akio KANAI

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Tsuruoka, Yamagata 997-0017 Japan

E-mail: akio@sfc.keio.ac.jp

Many reports have been accumulated describing not a few microRNAs (miRNAs) in eukaryotes target viral genomes, whereas a number of viruses also encode miRNA genes. These small RNAs play important roles on viral infection and their replication. In germ cells, another small RNA, piRNA is reported to repress endogenous transposons. Furthermore, CRISPR RNA target virus/phage genomes in both archaea and bacteria. Therefore, small RNA is deeply involved in a broad range of biological defense systems. This system may be applied not only to control replication of viruses or phages but also provide implication on regulating the growth of microorganisms including pathogenic bacteria.