

# 遺伝子発現制御の歴史と応用

高橋 葉月<sup>1\*</sup>・ピエロ・カルニンチ<sup>1,2</sup>

## 遺伝子発現制御技術の歩み

一昔前ならば「遺伝子発現を制御することは神の領域に足を踏み入れること」などと思われており、現在でも遺伝子を操作するという言葉には抵抗を示す人も多いかもしれない。また、倫理的にもっとも議論の起こる分野でもある。

ここでは遺伝子組換え動物や作物に焦点をあてるのではなく、治療を目的としたいくつかの遺伝子制御の例をあげ、その有用性や問題点に焦点をあてたい。何らかの原因で遺伝子発現量のバランスが崩れることによって引き起こされる疾患に対して行う遺伝子制御は、その遺伝子治療薬への発展が非常に注目されている。また、新しい分野であるために可能性は未知数であり、大変期待が高い分野ではある。しかしながら、まずは遺伝子制御がどのように生体内で働いているか、または遺伝子制御によってどのような副作用が起こるかといった作用機序を解明することが先決である。

2000年ごろから現在にかけて研究されてきた遺伝子制御技術の歴史、およびその治療薬への応用を紹介する。

## RNAiとは

1990年代後半に、MelloとFireらが特定の二本鎖RNA (dsRNA) を線虫に導入したところ、配列特異的な遺伝子のサイレンシング、RNA干渉 (RNA interference; RNAi) が起こったことを発見した<sup>1)</sup>。2006年に発見者であるMelloとFireはその研究の功績を讃えられ、ノーベル生理学、医学賞を受賞している。

Fireらの報告の後、BernsteinらはdsRNAがどのようにRNAiを引き起こしているかをショウジョウバエの細胞を使用した実験系を用いて詳細に解析し、その結果RNase IIIファミリーであるDicerがdsRNAを23塩基の長さで切断し、短いdsRNA (small interference RNA: siRNA) がRNAiを引き起こしていることを報告した<sup>2)</sup>。

Dicerで切断されたdsRNAのうち、ガイド鎖一本鎖RNA (ssRNA) のみがRNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、

他方のパッセンジャー ssRNA はRISC外で分解される (図1)。

RISC-ssRNA 複合体のRNAi現象にはいくつかの作用機序があることが報告されている。RISCはArgonaute (Ago) タンパク質というRNaseが主体となっており、2008年にWangらは高度高熱性真核細菌のAgoタンパク質の結晶構造を解析し、PAZドメイン、PIWIドメイン、Nドメイン、Midドメインという4つのドメインがあることを報告した<sup>3)</sup> (図2)。PAZドメインはガイド鎖RNAの3'末端と結合する領域を持ち、また、Dicer切断の際にリン酸化されるガイド鎖RNAの5'末端はMidド

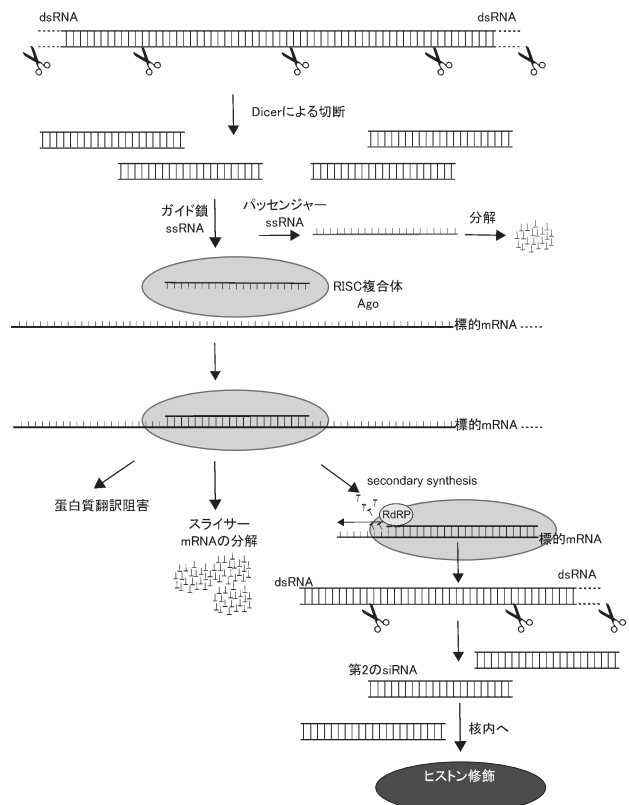


図1. siRNAのプロセッシング。dsRNAはDicerによって切断され、ガイド鎖ssRNAとパッセンジャーssRNAに分かれ、ガイド鎖がRISC複合体に取り込まれる。Agoに結合したsiRNAの機能については、タンパク質翻訳阻害、mRNAの分解、第2のsiRNAによるクロマチンのヒストン修飾などが報告されている。

\*著者紹介 <sup>1</sup> 国立研究開発法人 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター機能性ゲノム解析部門 (リサーチアソシエイト) E-mail: hazuki.takahashi@riken.jp  
<sup>2</sup> トランスサインテックノロジーズ株式会社



図2. 真核生物のAgo構造の概要. Dicerに切断されたガイド鎖RNAは5'末端がリン酸化され, MidドメインとPIWIドメインのリン酸基結合ポケットに結合する. 結晶構造の解析の詳細は文献3)を参照されたい.

メインとPIWIドメインの間にあるリン酸基結合領域に結合し, 末端から6塩基程度までが標的RNAを認識するのにとても重要だということが報告されている. その後2012年にヒトのAgo2結晶構造および*Kluyveromyces polysporus*のAgo結晶構造が3つの研究グループにより解析され, いずれの報告でもガイド鎖RNAの5'末端は高度高熱性真核細菌のAgoと類似の領域に結合することが報告されている<sup>4,6)</sup>.

siRNAにおけるRISCの主な役割は標的RNAの切断(スライサーと呼ばれる)であり, その活性中心部位はAgoタンパク質のPIWIドメインであることがわかっているが, RNAの結合によるPIWIドメインの構造変化や活性変化の詳細な機構についてはわかっていないことが多い.

その他の重要な役割は, siRNAの再合成である. 標的mRNAはRISC複合体にとりこまれたガイド鎖RNAと結合するが, その後RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)によって, dsRNAへと合成される. dsRNAは再度短く切断され, 第2のsiRNAが生成される過程へと進む. 第2のsiRNAについては線虫でもっともよく研究されており, 最初にRISCにとりこまれたガイド鎖RNAの領域ではなく, そこから数塩基下流や上流の別の領域がRNaseによって切断され, 第2のsiRNAが合成されていることが2つの研究グループによって報告されている<sup>7,8)</sup>. 両研究グループは第2のsiRNAがどの領域から生成, 複製されているかを広範囲に解析している. また, 第2のsiRNAはAgoとの複合体に結合後, 核内に取り込まれ, ヌクレオソーム付近のヒストン(H3K9)をメチル化することが報告されている. その結果, 第2のsiRNAの標的mRNAのRNAiが起こると考えられる(図1)<sup>9)</sup>.

このように, 一言でsiRNAといってもその作用機序はさまざまであることがわかる.

ここまではsiRNAの生体内での作用機序を紹介したが, 次の章ではsiRNAの特性を生かした医薬品の開発について紹介する.

### siRNA 医薬品

2000年以降にsiRNAが注目されて以来, 医薬品とし

ての開発が各研究所および製薬会社によって行われているが, 上市に至っているケースはまだない. これはsiRNA自体の効果に問題があるのではなく, 短いdsRNAが生体内で分解されやすく, 前述のとおりRNAiの作用機序も複雑であるため, 標的の組織に効果的にデリバリーされにくい点が問題である. したがってsiRNAの技術開発は, ともに発展してきたdrug delivery system (DDS)の開発と組み合わせて行わなければならないという課題が残っている.

リポソームという脂質二重膜の中に核酸を封入し, 標的部位に効果的にsiRNAをデリバリーすることで, siRNAの効果を高めているケースもいくつか報告されており, 臨床試験での応用も進められている. 現在米国の企業であるAlnylam PharmaceuticalがsiRNA医薬品関連の開発を主に行っており, siRNA特許関連の多くを所有している. トランスサイレチン型アミロイドシス(ATTR)は, トランスサイレチン遺伝子変異によってアミロイドタンパク質が不溶性になり, 全身に蓄積されることにより神経や臓器の機能不全を起こす疾患であるが, 2012年の報告によると日本には患者数が1800人程度の希少難治性神経疾患である. また, 家族性遺伝疾患としても報告されている. このATTRの家族性多発性神経炎(FAP)に対するsiRNA治療薬(ALN-TTR02)の開発をAlnylam Pharmaceuticalが行っており, 2013年のフェーズII試験では, 変異アミロイドタンパク質の産生を85%抑えたとの報告があった. 現在はさらにフェーズIII試験を実施している. ALN-TTR02はリポソーム製剤であり, siRNAのDDS問題をクリアしている成功例だと言えるだろう.

### アンチセンスオリゴヌクレオチド医薬品開発

siRNA医薬品と並行して, 1990年代後半から疾患関連因子のmRNAをアンチセンスオリゴヌクレオチド核酸医薬品(アンチセンス医薬品)によって制御する試みが行われており, 1998年には世界で初めてVitraveneというアンチセンス医薬品がAIDSに関連したサイトメガロウイルス網膜炎に対する治療薬としてアメリカ食品医薬品局FDAに認可された. 作用機序としては, サイトメガロウイルス遺伝子のmRNA発現領域に対するアンチセンスを作用させることにより, タンパク質への翻訳を阻害し, 最終的にウイルスの増殖を妨げるというものである. 近年米国FDAに認可を受けた例として, Isis/Genzymeが開発した家族性高コレステロール血症の発症に関連するアポタンパク質BのmRNAに対するアンチセンスMipomersenがあげられる. アンチセンス療法

はmRNAをターゲットにできるばかりでなく、スプライシングされる前のRNAもターゲットにできるため、エクソスキッピングが原因で起こるデュセヌ型筋ジストロフィー（DMD）などの治療にも応用されている。国内では、日本新薬と国立精神・神経医療研究センターがDMDのエクソン53スキップ薬の開発を進めており、2018年の上市を目指している。

ここまで紹介した、siRNA療法やアンチセンス療法は、特定の遺伝子またはタンパク質の生産を抑えることを目指して開発が行われているが、ここからは逆にmRNAの発現やタンパク質の発現を上げることを目指した遺伝子制御技術開発の例を紹介したい。

### 修飾 mRNA 医薬品開発

先にも述べたように、RNAを直接生体内で作用させることは、容易ではない。さらには長いmRNAをリボソーム内に封入して安定化させることや、直接導入でエンドヌクレアーゼによる切断を回避することは非常に難しい。また、RNAi療法は遺伝子発現を抑えることはできるが、上昇させることはできない。

これらの課題を克服するために、2008年ごろから現在にかけて、m7G CAP構造をanti-reverse cap analog (ARCA) に、uridineをpseudouridineに化学修飾した安定なmRNAを作製し、細胞およびモデル動物に導入する試みが行われており、それらの技術を用いた医薬品開発が米国のModerna Therapeuticsによって進められている<sup>10,11)</sup>。同社は2010年から現在までに9億5千ドルを資金調達しており、その調達金額は株式非公開企業としては最大だといわれている。もっとも期待の高い核酸医薬品と言えるだろう。

### SINEUP 医薬品開発

現在我々の研究室では、標的タンパク質の翻訳を促進するアンチセンスロングノンコーディングRNA (AS-lncRNA) の研究を行っており、その現象はRNAiとは反対の作用機序を示す。ゲノムの中にはレトロトランスポゾン (RE) という可動遺伝因子が存在し、進化の過程におけるその保存性は非常に高く、全身に可動している。さらにREはノンコーディングRNAであり、以前はジャンクRNAだと考えられていた。そのため、その機能や生体内での作用機序がほとんどわかっていなかったが、ここ最近少しずつ解明され始め、ウィルス感

染や外的ストレスに対して発現量が上昇する例や、特定の疾病によって転写量や可動量が上昇する例が報告されている<sup>12,13)</sup>。2012年にイタリアのGustincichらのグループがREの一つであるSINE (short interspersed nuclear element) がAS-lncRNAに存在すると、細胞ストレスに応答してセンス側のmRNAのタンパク質翻訳が促進されるという現象（これ以降SINEUPと記す）を、Natureに報告した<sup>14)</sup>。SINEUPは「AS-lncRNAがmRNAの発現を促進しているのではなく、タンパク質翻訳のみを促進する。」といった現象であり、今までの遺伝子発現制御の概念を超える発見となった<sup>15,16)</sup>。SINEUP関連の特許は理化学研究所（理研）が所有しており、理研ベンチャーのトランスサインテクノロジーズがそのライセンスを所有している。

### おわりに

ここで紹介した遺伝子制御については現在までにわかっているほんの一部の内容である。miRNAなどの機能については紹介していないが、総説などを参照されたい<sup>17)</sup>。

またsiRNAやmiRNA以外のノンコーディングRNAによる遺伝子制御の機能についてはまだそのほとんどがわかっていない。現在世界中の研究者がその機能についての解明を行っており、ホットトピックの一つでもある。今後もその研究動向に注目したい。

### 文 献

- 1) Fire, A. *et al.*: *Nature*, **391**, 806 (1998).
- 2) Bernstein, E. *et al.*: *Nature*, **409**, 363 (2001).
- 3) Wang, Y. L. *et al.*: *Nature*, **456**, 209 (2008).
- 4) Elkayam, E. *et al.*: *Cell*, **150**, 100 (2012).
- 5) Schirle, N. T. and MacRae, I. J.: *Science*, **336**, 1037 (2012).
- 6) Nakanishi, K. *et al.*: *Nature*, **486**, 368 (2012).
- 7) Sijen, T. *et al.*: *Science*, **315**, 244 (2007).
- 8) Pak, J. and Fire, A.: *Science*, **315**, 241 (2007).
- 9) Gu, S. G. *et al.*: *Nat. Genet.*, **44**, 157 (2012).
- 10) Zangi, L. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 898 (2013).
- 11) Warren, L. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **7**, 618 (2010).
- 12) Williams, W. P. *et al.*: *Virology*, **327**, 233 (2004).
- 13) Upton, K. R. *et al.*: *Cell*, **161**, 228 (2015).
- 14) Carrieri, C. *et al.*: *Nature*, **491**, 454 (2012).
- 15) Zucchelli, S. *et al.*: *Front. Cell. Neurosci.*, **9** (2015).
- 16) Patrucco, L. *et al.*: *Gene* (2015) (in press).
- 17) Ha, M. and Kim, V. N.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 509 (2014).