

# 序

約 22 塩基からなる内在性低分子制御性 RNA は真核生物の進化でも保存された分子として出現した。これらは標的配列と相補性の度合いに応じて標的遺伝子である RNA 転写産物に対して翻訳抑制または分解促進ができる。これらの RNA は microRNA (miRNA) と呼ばれている。miRNA は多数の遺伝子の制御と調整を介してタンパク質合成を調節し、結果として多くの生物学的性質を示す。エキソン型およびイントロン型を含めて、miRNA は発生段階や細胞恒常性において重要なノンコーディング (noncoding) 制御性 RNA なのだ。*lin-4* や *let-7* などのエキソン型 miRNA は、RNA ポリメラーゼ (Pol-) または RNA ポリメラーゼ (Pol-) によって長鎖オリゴヌクレオチド前駆体として転写される。さらに Drosha および Dicer RNA 分解酵素 (RNase) により変換されて成熟 miRNA が產生される。

エキソン型 miRNA の発現過程とは異なり、イントロン由来 miRNA (Id-miRNA) はメッセンジャー RNA (mRNA) のイントロン削除変換の際につくられる。哺乳類ではエキソン型およびイントロン型ともに miRNA は内在性の一本鎖分子であり、標的遺伝子との不完全な相補性を介して作用する。一方で、short interfering RNA (siRNA) は通常では外来性の二本鎖分子であり、標的遺伝子に対する完全な相補性により作用する。センスとアンチセンスの 2 本の完全相補的な miRNA により構成される合成分子であることから、siRNA は miRNA と同様の活性を示すと考えられる。

低分子量の一本鎖ヘアピン RNA である miRNA は、細胞内で部分的相補性のあるメッセンジャー RNA に対して干渉することが可能であり、癌の多型性やウイルス変異を標的とした新規治療方法の開発に役立つものである。この点が siRNA とは異なる性質である。なぜならば siRNA による遺伝子サイレンシングには標的と siRNA 配列が完全に相補的であることが必要であるからである。miRNA は、線虫 (*C. elegans*) の発生段階で遺伝的制御経路を広範囲に調節する内在性 RNA 断片として最初に発見された。イントロン由来 miRNA が *C. elegans*、マウスおよびヒトにおいて近年発見されたことにより、ポリメラーゼ (Pol-) RNA 転写/スプライシング機構により产生される miRNA を利用するという新規の治療戦略が導かれた。siRNA に比べて miRNA が有利な点は、長期間活性があること、*in vivo* で安定であること、RNA プロモーターを活用できること、複数の標的を制御できること、そして毒性がないことである。このタイプの遺伝子治療は、標的選択性がきわめて高く、変異や多型といった配列を含む標的遺伝子を正確に抑制する。配列特異的に遺伝子抑制に関する多くの低分子制御性 RNA を、最初に発見された miRNA と比較した結果、ほとんどのものが miRNA と同様の分子であることが明らかとなった。siRNA は、哺乳類やヒト細胞では内在性に発現していないが、下等動物での siRNA に相当する内在性因子は、Dicer および RISC [*Science* 297 : 2056–2060 (2002)] などの miRNA に類似した機序により合成される。miRNA は細胞がトランスジーンやウイルス遺伝子に対抗するための幅の広い自己防御手段に相当するものであり、遺伝子治療のためのユニークな媒体を提供するものである。

しかるべき標的細胞に毒性を示さずに充分量の miRNA を高効率かつ安定的に発現させるためには、正確な技術の開発が必要であり、そうすれば臨床試験が可能になる。人工的な miRNA が *in vivo* で安定的かつ効果的で無毒性であることを確認するためには、動物実験で miRNA 発現の薬物動態や細胞内安全性そして機能的安定性を確かめることが必要である。真核生物細胞では Pol- $\beta$  による転写は厳しく制御されており、種々の RNA プロモーターや転写因子により調節可能である。よって、Pol- $\beta$  を介した miRNA 産生システムにより遺伝子治療の効果的かつ安全な応用が可能となる。

1990 年代初頭までは、分子生物学のセントラルドグマ (Central Dogma) とは設計図としての DNA がメッセンジャー RNA に転写され、メッセンジャー RNA がポリペプチドやタンパク質に翻訳されて、遺伝情報を反映して特異的な機能が得られることとされていた。一方、ヒトゲノム計画によりヒトゲノム 30 億塩基対の中に存在するタンパク質コード遺伝子約 3 万個が同定され、その配列決定とマッピングが完了した。しかし、通常の遺伝子の占める割合はヒトゲノムの約 3 % にすぎなかった。低分子量ノンコーディング RNA は無用の残骸で処分されるものと長い間考えられていた。これらの分子は、おそらく RNA のスプライシングの過程で除外されるのであろうと思われていたが、近年の一連の研究成果から、遺伝子転写産物のノンコーディング断片 (イントロンなど) が細胞や生体を制御する主要伝達経路において重要な役割を担うことが示唆されてきている。多様な miRNA 遺伝子の発見により、体重や身長さらには各種薬剤への反応性などの個体差に反映される生理的多様性が説明できるようになった。miRNA の機能的役割により、突然単一の DNA が複数の遺伝子群を構成しうることが示唆される。これらの遺伝子群は複数の機能を担っており、あるものは翻訳制御に、また他のものはタンパク質合成の時期特異的なレベル調節といった機能を担う。ヒト miRNA 配列解析データの急速な蓄積により「新たな miRNA 遺伝子の発見」が加速的に進歩した。このことは生物医学の研究において、miRNA を利用して特異的メッセンジャー RNA 発現を操ることが可能になったことを意味している。

本書では、miRNA が遺伝子発現調節という観点から種によらず顕著に保存されていることを考慮した。すなわち、植物・線虫・ハエ・魚類・ニワトリ・マウスおよびヒトを含む多数の動物種の miRNA について、多様で斬新かつ有用な解説を提供することを本書の主目的とした。本書には、すでに miRNA 同定法について詳しい研究者にとっても役に立つ応用法の解説も含まれている。例えば、薬剤としての miRNA を設計・開発するための種々の応用法も解説している。

miRNA はわれわれが遺伝子発現を理解するための新しい道を切り開いた。miRNA は疾患発症を分子レベルで解明するための主要な役割を担うなど、生物医学研究において最も広く用いられる技術の 1 つになるであろう。新しい治療戦略の設計につながる情報提供するために、応用可能な miRNA の決定作業は分子レベルですでに始まっている。生物医学研究において miRNA が関与する分子学的側面における作用機序の理解を深めるためにも、本書が読者にとって刺激となり、多様な手段を模索するための助けとなれば幸いである。

Shao-Yao Ying

## 監訳者の序

また一つの大流行がきた。今回の波は桁外れに大きい。大津波ともいえるこの流行をどう生き抜くかでまた世の中も少しばかり変わってくるかもしれない。飲み込まれて溺れてしまうかもしれないし、全く何も変わらないかもしれない。やってみなければわかりっこない。とかくどんな時代でも流行を追いかけることにはそれなりの覚悟が必要だと思うが、今回ばかりはいつもとは違う。なぜならば、miRNA の到来は、セントラルドグマさえも修正させるほどの大発見であるからだ。動物・植物を問わず生きとし生けるものすべてが、さらにウイルスもが miRNA を操っている。生命現象を根底から見直さなくてはならない事態とまで誇示するのはいささか抵抗があるが、あえてはっきりいえば今までやってきたことは全部嘘だったということだってありえる。

この本は miRNA についてのプロトコール集というタイトルであるが、単なる無味乾燥なテクニック本ではない。miRNA の解明に貢献した先駆者たちが実体験をそのまま記したものである。よってその研究現場の熱気や苦悩がひしひしと伝わってくるドキュメンタリー小説ともいえる。実は miRNA の研究は決して難しいものではない。分子生物学を基本的に行える設備さえあれば多少なりとも可能である。しかも最近ではさまざまなキットやカスタムサービスが市販で提供されるようになり、全く経験のない初心者でも簡単にデータを出せてしまう。しかしこれまた世の常で恐縮であるが、誰もが研究可能になった今現在では miRNA の世界は最も熾烈な競争社会の 1 つとなってしまった。2003 年までの miRNA 関連論文の数は百数十件程度であったものが、現在ではあっという間に 2,000 報を超えており、2007 年だけを見てもその数は 1,000 報以上である。またある製薬会社は miRNA 関連の新薬開発に着手したなどの報道を耳にすることもしばしばある。

デッド・ヒートはスタートが肝心である。思い立ったら吉日。この本を手にされた多くの方々にとっての「真理の探求」のために少しでもお役に立てればこれほど嬉しいことはない。今一度、この大流行がどのような結末になっても、一步前に進まずにいたことを後悔することだけは避けたい。

2008 年 2 月

監訳者を代表して  
河府和義