

## 概論

# microRNAが制御する多彩な生命現象と癌研究の接点

落谷孝広

内在性の低分子RNAであるmiRNA（microRNA）は、いわゆる「ファインチューナー」として、遺伝子発現をさまざまなかたちで精巧に調節することがわかってきた。さらに、miRNAによる制御システムに生じた異常は、癌を中心とするヒトの疾患の発生や進展とも大きくかかわることが次々と明らかになっている。本特集では、miRNAによる多彩な生命現象の制御機構解明が癌研究にいかに貢献するのかを中心に、最新の知見を紹介する。

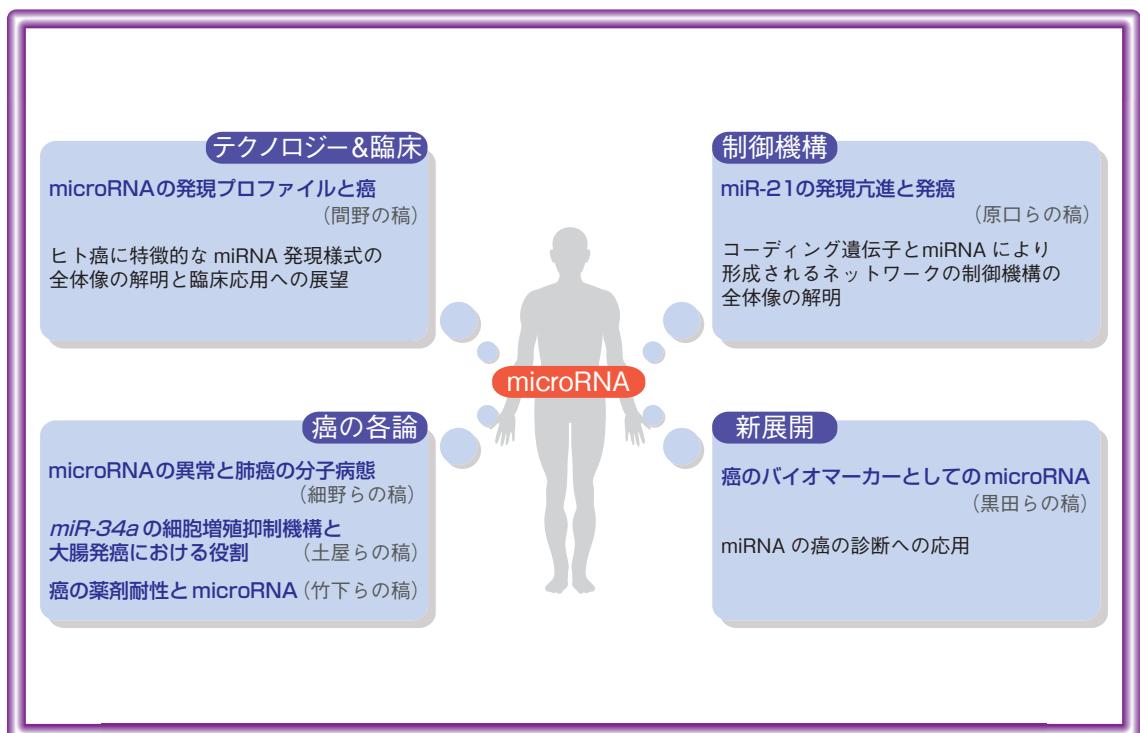
## はじめに

多くのRNA分子、例えばメッセンジャーRNA（mRNA）などはゲノムから転写され、翻訳のプロセスによりタンパク質が産生される。つまりRNAは長きにわたってゲノムとタンパク質を仲介するメッセンジャーとして研究されてきた。しかし近年、全く新しいカテゴリーのRNAが見つかった。それがmiRNAである。ヒトやハエ、線虫などの左右相称動物ではこのmiRNAは進化の過程を通じて比較的よく保存されているが、こうした左右相称動物の出現以前に分岐したイソギンチャクや海綿動物といった比較的単純な構造の動物でも同様な低分子RNAが存在する。miRNAもゲノムから転写されるが、mRNAのようにタンパク質に翻訳されることなく、18～25ヌクレオチドの小さなRNA配列であるmiRNAは、主に翻訳阻害とmRNAの切断（分解）という2つのプロセスで標的となる複数の遺伝子を制御していることが明らかになってきた。ヒトでは700を超えるmiRNAが同定され（おそらくは今後1,000を超えると予測）、すべてのヒト遺伝子のうち1/3もが、これらのmiRNAによって制御を受けるとされている。したがって、もしこのmiRNAに何らかの異変が起きれば、それがわれわれの疾患と深く関係することは容易に想像できる。

## 1 miRNAと癌研究の最新知見

本特集では、miRNAの異常が引き起こす疾患のなかで、特に研究が進んでいる癌研究の分野での最新の情報について、国内の専門家の先生方にご寄稿いただいた（概念図）。まず自治

MicroRNA expression and its implications for the strategies of cancer management  
Takahiro Ochiya : Section for Studies on Metastasis, National Cancer Center Research Institute (国立がんセンター研究所がん転移研究室)



概念図 特集「microRNAの制御異常と癌」のコンテンツ

医科大学の間野博行博士には「microRNAの発現プロファイルと癌」と題して、貴重な臨床検体のナノグラムオーダーのRNAから数十万クローンのmiRNA分子を簡便にクローニングする新たなmRAP (miRNA amplification profiling) 法を用いた、ヒト癌に特徴的なmiRNA発現様式の全体像の解明と臨床応用への展望などを概説いただく（間野の稿参照）。

また、miRNAの癌細胞での発現様式の特徴の一端はエピジェネティックな転写制御であることが明らかにされつつあり、東京大学医科学研究所の伊庭英夫博士と原口 健博士には「miR-21の発現亢進と発癌」と題して、癌化のプロセスにおけるmiRNA遺伝子自身の発現調節を解析するプロモーター予測や、特定のmiRNAを強力に抑制するTough Decoy RNAの開発を通じて、コーディング遺伝子とmiRNAのようなノンコーディング遺伝子により形成されるネットワークの制御機構の全体像の解明に迫っていただく（原口らの稿参照）。

名古屋大学の高橋 隆博士はわが国のmiRNA研究の先駆者として、癌とmiRNAの研究を世界的にリードされてこられた。本特集では、「microRNAの異常と肺癌の分子病態」と題して、肺癌の発症、進展におけるmiRNAの果たす役割について、特に肺癌で研究の進んでいるlet-7とmiR-17-92クラスターを中心に細野祥之博士、鈴木 元博士との共著で最近の知見を含めて概説いただいた（細野らの稿参照）。次にmiRNAとして最も注目を集めているmiR-34の関係する大腸癌に関して、「miR-34aの細胞増殖抑制機構と大腸発癌における役割」と題して国立がんセンター研究所の土屋直人博士、中釜 齊博士にmiR-34aがE2F転写因子やそのターゲット遺伝子の発現を抑制することで、細胞の増殖を止め、癌細胞を老化様に変化させるプ

ロセスの詳細について概説いただいた（土屋らの稿参照）。さらに、長期の抗癌剤治療や癌の悪性化に伴って現れる薬剤への耐性は癌治療のうえで大きな問題であるが、この薬剤耐性に関与するmiRNAの実態も次々に明らかになってきている。この分野の最新の情報を「癌の薬剤耐性とmicroRNA」と題して、国立がんセンター研究所の竹下文隆博士が概説する（竹下らの稿参照）。

最後に、東京医科大学の黒田雅彦博士に「癌のバイオマーカーとしてのmicroRNA」と題してご紹介いただくのが、miRNAの臨床診断への応用である（黒田らの稿参照）。癌の臨床検体のmiRNAプロファイリングから浮かび上がってくるのは、癌の進展や悪性度と密接に関連するmiRNAの特徴的な変動であり、これらのmiRNAをバイオマーカーとして追うことでの、病態の把握や予後予測に役立てようという動きがすでにはじまっている。

## 2 miRNAと癌幹細胞

2007年、ChenらはES細胞や胚様体、マウス11日胚などの未分化な細胞集団は、成熟した体細胞に比較してやや単純なmiRNAの発現プロファイルを示すことを報告した<sup>1)</sup>。またp63などの幹細胞の維持に必須な有名な分子を制御するmiRNAの存在も次々と報告されつつある。これらの事実から予測されるのは、細胞、組織の分化の程度は特定のmiRNAのシグネットチャによって明瞭に区分できるという点である。さらに未分化な幹細胞の示すmiRNA発現プロファイルは、癌細胞のそれとよく似ている。そして、癌で発現が上昇している、いわゆるoncogenic miRNAs (Oncomir) の類は、正常の発生の初期段階の未分化な細胞で発現が多く、いったん分化した細胞、組織では逆に発現が低くなっていることが多く観察される。もちろん、癌で発現が低下している suppressive miRNAs ではその逆の現象が起きているわけである。各種癌でのmiRNAの変動を表にまとめておいたので参考されたい。

そのようななか、関心は「癌幹細胞」の性状の理解や治療標的としてmiRNA研究がどれだけ有効であるかという点に集まっている<sup>2)</sup>。癌幹細胞も正常幹細胞も、どちらも自己複製能を有しながら、多能性を保ち、CD44、CD133などの細胞表面のマーカーもある程度同じものを共通にもつなど、きわめてその性質は似通っている。したがって、正常のES細胞や組織の幹細胞の自己複製能と分化能の制御に働くmiRNAのネットワークを理解することは、癌幹細胞の新たな制御メカニズムの解明に貢献するはずである。図にはES細胞の自己複製と分化制御にかかわるとされるmiRNAについてまとめた。

癌幹細胞とmiRNAの関係にはじめてメスを入れたのは'07年のLieberman博士らの論文であり<sup>3)</sup>、乳癌の癌幹細胞と思われる細胞集団は、より分化度の進んだ癌細胞に比べて、いくつかのmiRNAの発現が減少していることを見出した。その1つが細野らの稿でも詳述される抑制型のmiRNAであるlet-7であり、通常は癌遺伝子であるRas、HMGA2を抑制しているはずが、癌幹細胞ではその働きがなくなることで、少なくともこの2つの遺伝子が抑制から外れたため、自己複製の亢進や分化の抑制へつながったと予想される。このlet-7のようなmiRNAが癌幹細胞を特異的に攻撃するための治療戦略となりうるかどうかについてはまだ多くの検証が必要である。また、個々の癌で指標となるmiRNAが、どんな遺伝子(群)を標的にしているかを知ることは、新たな癌治療の創薬を生む可能性がある。その意味では最近のBartel博士らのSILAC法を改良したプロテオーム解析による標的分子の同定法に大きな注目

表 各種癌で明らかとなっているmiRNAの発現

癌の種類	miRNAs	
	発現上昇	発現低下
脳腫瘍, GBM	miR-21, 221	miR-128, 181
乳癌	miR-9-1, 10b, 17-5p21, 21, 29b-2, 34, 146, 155, 181b-1, 213	let-7, miR-15a, 16, 125a, 125b, 127, 145, 204
肺癌	miR-17-5p, 17-92, 21, 24-2, 106a, 128b, 146, 150, 155, 191, 192, 197, 199a-1, 203, 205, 210, 212, 214	let-7, miR-9, 26a-1-p, 27b, 29b-2, 32, 33, 30a-5p, 95, 101-1, 124, 124a-3, 125a, 125a-p, 126, 140, 143, 145, 181c-p, 198, 192-p, 199b-p, 216-p, 218-2, 219-1, 220, 224
食道癌	miR-21, 93	miR-203, 205
胃癌	miR-21, 24-1, 24-2, 25, 92-2, 107, 191, 214, 221, 223	let-7
結腸直腸癌	miR-17-5p, 20a, 21, 24-1, 24-2, 29b-2, 30c, 31, 32, 96, 106a, 107, 128b, 135b, 155, 183, 191, 221, 223	let-7, miR-34, 127, 133b, 143, 145
肝細胞癌	miR-15b, 18a, 21, 106b, 221, 222, 224	let-7, miR-101, 122a, 125a, 195, 199a, 200a
膵臓癌	miR-17-5p, 20a, 21, 24-1, 24-2, 25, 29b-2, 30c, 32, 92-2, 100, 106a, 107, 125b, 128b, 146, 155, 181a, 181b-1, 191, 196a, 196b, 199a-1, 212, 214, 221, 223, 301, 376a	miR-139, 142-p, 345, 375
前立腺癌	miR-17-5p, 20a, 21, 25, 30c, 32, 92-2, 106a, 146, 181b-1, 191, 199a-1, 214, 223	miR-15a, 16, 143, 145, 218-2
子宮頸癌	miR-21, 199a	miR-143, 145
B-CLL	miR-17-92, 155	miR-15a, 16, 143, 145, 192, 213, 220

GBM : glioblastoma multiforme (多形膠芽腫), B-CLL : B cell chronic lymphocytic leukemia (B細胞慢性リンパ球性白血病) (文献9より引用)

が集まっており<sup>4)</sup>, miRNAの標的分子の解明にどのようなアプローチをかけていくかは見逃せない。

### 3 miRNAと癌の浸潤転移

スローンケタリング記念がんセンターの Massagué 博士らのグループは、ヒト乳癌細胞を移植したマウスの転移巣から再樹立した高転移細胞株において、その発現が顕著に抑制されている miR-335, miR-126, miR-206 の 3 つの miRNA に注目した。これらの miRNAs の発現を親株と同等のレベルまで回復させた場合、高転移細胞株の骨や肺へ転移する能力がみごとに抑制されたのである<sup>5)</sup>。この 3 種の miRNA は、実際に乳癌患者の転移した癌組織でもその発現が低下していることも明らかとなった。さらに同グループは、20 例の臨床検体を検討した結果、これらの miRNAs の発現低下と転移とに相関が認められたことを報告している。特に miR-335 は、6 種類の細胞の浸潤転移に関与する遺伝子群を制御しており、そのうち SOX4 と TNC という細胞の運動能に関与する成分が miR-335 の発現低下により亢進することにより、遠隔転移をもたらす結果となると説明している。これとは別に、Huang 博士らは miR-373 と miR-520c が CD44 の発現抑制を介して *in vitro*, *in vivo* の両方で乳癌細胞の浸潤

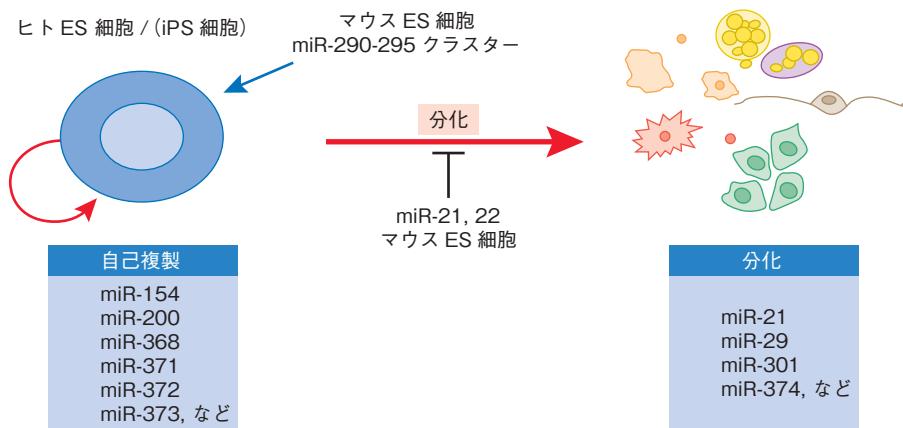


図 miRNAによる幹細胞の制御

ヒトES細胞（おそらくヒトiPS細胞も同じ）は、さまざまなmiRNAの制御を受けてその自己複製能を維持している。しかし、分化のプロセスに入るとダイナミックなmiRNAの発現変動が引き起こされるようだ。マウスのES細胞では、ヒトのそれとは別の種類のmiRNAsが変化しているようだ。よく知られているのは、ES細胞の未分化能維持に必須とされる*Nanog*, *Sox2*, *Oct4*などの遺伝子の動きを抑制しているmiR-21の存在や、自己複製能を促進する働きのあるmiR-290-295クラスターなどである。

転移にかかわることを同時期に報告した<sup>6)</sup>。こうした結果に勇気づけられ、世界中の多くの研究者が癌の転移を押さえ込むことが可能なmiRNAsの発見に精力を傾けている。

### おわりに—miRNAの疾患治療・診断への応用

本特集ではすべてを概説することは不可能なほど、miRNAを癌の診断・治療に応用しようとする動きは世界中で活発化している。まず治療で言えば、C型肝炎ウイルスの増殖に必須であると報じられたmiR-122に関して、デンマークと米国の2つの企業が、miR-122を抑制する働きのある核酸医薬の開発を早速手がけ、臨床研究の段階にあるようだ。癌で主に発現の低下しているmiRNAを対象とした臨床試験が報じられるのもそう遠くはない予想されている。また、癌組織で変動するmiRNAsをもとに、癌の診断を進めようとする企業も多く存在する。その一例はMDアンダーソン研究所と共同で米国企業が進めるmiRNA（複数のセット）による肺癌の再発予測や、他の米国企業による膵臓癌のバイオマーカーの開発研究である。さらに特筆すべきは、最近話題になっている血液中を巡るmiRNAの存在である<sup>7) 8)</sup>。こうした血液や体液中のcirculating miRNAsの生物学的意義は完全には理解されておらず、その診断への応用は慎重な基礎研究が必要だが、血液わずか1滴中のmiRNAを解析することで複数の疾患の診断や、癌の早期診断が可能になる日が来るかもしれない。

最後に、本特集がこれから世界レベルで展開されるであろうmiRNAによる癌の生物学的特性の理解や、診断、治療、病態把握、予後予測といった臨床応用の現状と問題点の把握に、少しでも役立つことを祈念する。

## 文献

- 1) Chen, C. et al. : Mammalian Genome, 18 : 316-327, 2007
- 2) Papagiannakopoulos, T. & Kosik, K. S. : BMC Med., 6 : 15, 2008
- 3) Yu, F. et al. : Cell, 131 : 1109-1123, 2007
- 4) Bartel, D. P. : Cell, 136 : 215-233, 2009
- 5) Tavazoie, S. F. et al. : Nature, 451 : 147-154, 2008
- 6) Huang, Q. et al. : Nature Cell Biol, 10 : 202-210, 2008
- 7) Lawrie, C. H. : Br. J. Haematol., 141 : 672-675, 2008
- 8) Mitchell, P. S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 : 10513-10518, 2008
- 9) Osaki, M. et al. : Biomarkers, 13 : 658-670, 2008

## 参考図書

『RNAの機能解明と医療応用』(林崎良英, 安田 純／編), 実験医学増刊, Vol.26 No.10, 羊土社, 2008  
 『躍進するRNA研究』(中村義一, 塩見春彦／編), 実験医学増刊, Vol.22 No.17, 羊土社, 2004

## Profile

## 著者プロフィール

**落谷孝広**：国立がんセンター研究所がん転移研究室室長（兼任：早稲田大学生命理工学部客員教授, 東京工業大学大学院生命理工学研究科客員教授）。さまざまなシステム細胞の機能解析や再生医療への応用、癌の分子腫瘍学、microRNA のもつ多様な生命現象の調節の解明と癌治療・診断研究への応用を目指す。

**基本～先端まで丸ごとわかる！定番テキスト、待望の改訂!!**

改訂第3版

新刊

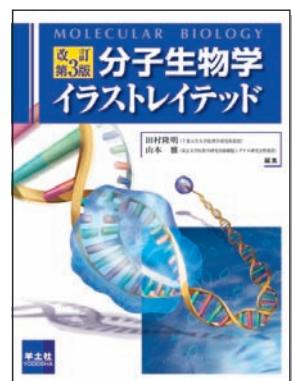
# 分子生物学 イラストレイティッド

編／田村隆明, 山本 雅

見て理解できる豊富なイラストで、  
必須知識のすべてが身につく！

- 全項目で最新知見を補充
- RNAバイオロジーや幹細胞生物学など、注目の先端領域を追加！
- 内容の充実度はそのまま、よりコンパクトなボリュームになりました

■ 定価(本体4,900円+税) ■ B5変型判 ■ 349頁 ■ ISBN978-4-7581-2002-9



# 大きな躍進を続けるmiRNA研究 —世界の最新動向と日本の研究者への期待

インタビュー協力：慶應義塾大学医学部 座間 猛先生

近年では、さまざまな生物種でゲノム解析が進み、高等生物になるに従いnon-coding RNAの数が爆発的に増えることがわかつてきました。それに伴い、miRNA研究は飛躍的に進み、発生や分化などの多彩な生命現象に関与すること、その異常が癌などのさまざまな疾患に関与することなどが次々と明らかになっています。また、miRNAを用いた、あるいは指標とした診断・治療の研究成果も多数報告されています。そこで本インタビューでは、重要性が増大しているmiRNAについて、臨床応用を目指して研究を進めている慶應義塾大学の座間 猛先生に、国内外の研究の動向と展望、これからmiRNAを研究するうえで重要なことなどをお聞かせいただきました。

## miRNAを取り巻く欧米と日本の温度差

——まずはmiRNA研究を取り巻く欧米と日本の状況をお教えてください。

まず強調したいのは、miRNA研究に関して、日本全体としてはかなり出遅れていることです。欧米の方が研究が進んでおり、miRNAに対する関心もかなり高いです。例えば私自身について言えば、5年ほど前に、米国で研究を続けられている恩師や海外の知人から「miRNAをツールとして、今後どのような研究を進めるのか」と尋ねられたことが何度かあります。miRNAがかなり盛り上がっていたので、当然のように私も関心をもっているだろうと思われていたのです。しかし、当時、基礎医学研究でmiRNAが進んでいることを知っていましたが、恥ずかしながら、自分の研究としてmiRNAを扱うことは考えてもいませんでした。このような状況は、日本の他の研究者にもあてはまっていたようです。現在でも、5年ほど前と変わらずこの温度差がずっと続いているのではないかでしょうか。

——当時、世界と日本の温度差の要因となったものは主に何だったのでしょうか？

大きな要因として、日本では臨床検体を扱った研究が進まなかったこと、欧米は大規模な研究をするための資金の使い方が上手だったということがあると思います。

例えば、米国ではあらゆる臨床検体の大規模なmiRNA発現プロファイリングが進んでいます。それには、臨床



慶應義塾大学医学部  
座間 猛

1995年3月、慶應義塾大学医学部医学科を卒業。同年4月、同学大学院博士課程医学研究科入学、血管性病変の発症にかかる遺伝子解析に従事。その後、同学医学部薬理学教室、途中ペンシルベニア大学を経て、'99年、東京医科歯科大学難治疾患研究所機能調節疾患部門（現在はゲノム応用医学研究部門）にて、未来開拓学術研究推進事業の日本学術振興会研究員として従事。2002年からは、慶應義塾大学医学部内科血液研究室に戻り、ヒューマンサイエンス振興財団のリサーチフェローとして研究に従事し、現在は特別研究員講師として活躍している。

表 miRNAに関する重要なトピックス

年	トピックス	参考文献
1993年	miRNAとして最初に発見されたlin-4の報告	Lee, R. C. et al. : Cell, 75 : 843-854 Wightman, B. et al. : Cell, 75 : 855-862
1998年	RNA interferenceの報告	Fire, A. et al. : Nature, 391 : 806-811
2000年	miRNAが種を超えて保存されていることを示唆	Pasquinelli, A. E. et al. : Nature, 408 : 86-89
2003年	miRNAの命名・分類についての指針	Victor, A. et al. : RNA, 9 : 277-279
2004年	miRNAと癌化との関係を強く示唆	Calin, G. A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 2999-3004 Ruby, J. G. et al. : Nature, 448 : 83-86
2007年	mirtonの発見	Okamura, K. et al. : Cell, 130 : 89-100 Berezikov, E. et al. : Mol. Cell, 28 : 328-336
2008年	脊椎動物の複雑性とmiRNA	Heimberg, A. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 : 2946-2950

の現場からRNAが分解されないように、状態のよいまま臨床検体をサンプリングすることと、低分子のmiRNAを高い効率で抽出するための方法が重要です。日本では培養細胞を用いたmiRNAの研究はよく進んでいますが、臨床検体の研究に関してはあまり整備されていません。また、個人の研究室で何百という大規模な検体を処理することは難しいため、巨額の資金と人員を一挙に動員して研究することも非常に重要です。この点に関しては、miRNAの理解が進んでいなかったため、日本はなかなか足を踏み出せなかつたのだと思います。

## 発見から産業化・実用化への動きと展望

——世界的なmiRNAの産業化への動き、具体的には創薬・診断などの臨床応用への可能性などを教えてください。

miRNAは、線虫のヘテロクロニー遺伝子としてlin-4が1993年に発見されたのがはじまりです。当時lin-4は、線虫に特異的なsmall temporal RNAと考えられていました。ところが、RNAiの発見をきっかけに、この分野の研究が進み、実は同じような小さなRNAが多数存在することがわかりました。現在では、例外はある、生物種を超えて保存されていること、高等生物になるに従いmiRNAの数が大きく増加することが明らかとなっています。そして、2002年くらいから、ヒトの疾患にも関連することが言われはじめ、実際に慢性リンパ性白血病に関するという研究成果が報告されました。

創薬に関しては、現在、siRNA医薬のBevasiranibのように、Phase III試験まで進んだmiRNA医薬はないのですが、かなり積極的に多くの企業が動いています。例えば、Regulus Therapeutics社は英国の大手製薬企業の

GlaxoSmithKline社とライセンス契約を結んでいますし、今年になってからもMiragen Therapeutics社が慢性心不全の治療薬としてmiRNA医薬を開発することを発表しました。ただ、やはり国内では、siRNA医薬の方が盛んで、miRNA医薬に関してはほとんど聞かれません。日本でもmiRNA医薬の研究と開発が進んでいくと思いますが、siRNA医薬のように、特許を海外に押さえられ、研究開発に支障がでてくるのは間違いないと思います。

診断への応用に関しては、かなり具体的に進んでいます。癌遺伝子として機能するoncomiRと呼ばれるmiRNAを含め、ある癌においては特徴的なmiRNAプロファイリングが報告されています。それらをバイオマーカーとして癌の診断や治療選択が可能となります。このような診断薬が昨年末にRosetta Genomics社からはじめて出ました。また、miRNAはエクソソームを使って血中に出ているという報告も多数あり、血液1滴から、癌の診断ができるようになるのではと思います。実はわれわれの研究からもそれを支持するデータが得られています。もっといえば、血液1滴から、癌の診断、治療経過、薬の効果、予後などすべてわかるようになる時代がくると思います。

## プロファイリングを通してわかったこと

——ここまで、世界と日本の温度差、産業化への応用などを紹介いただきましたが、そのような状況のなかで、座間先生はどのように研究を進めているのか、具体的にお聞かせください。

私は臨床に還元することを最終目的として、内科・耳鼻咽喉科・婦人科のグループからなるクラスターを形成し、科を横断した研究を進めています。扱う検体は喉頭癌などの頭頸部腫瘍、子宮体癌、卵巣癌などの婦人科腫

癌です。3年ほど前から、miRNAのプロファイリングをするために、手術で採取した臨床検体をすぐにAmbion® RNAlater®で処理し、凍結させ、Ambion® mirVana™ PARIS™ Kitで抽出し、total RNAを保存しています。現在は、1,000以上の検体を状態よく保存できています。また、保存した検体の一部はすでにプロファイリングが済んでいて、具体的な成果も出はじめています。

以前、喉頭癌を解析したときには、網羅的なスクリーニングとして、アジレントテクノロジー社のマイクロアレイを用いました。そして、癌で変化のあったmiRNAをTaqMan®プローブを用いたリアルタイムPCRで解析する、という手法をとっていました。これによって、700近いmiRNAのなかからスクリーニングを行い、従来よりもはるかに多くのさまざまな病期の検体数について、定量的に解析をすることができました。マイクロアレイの結果もリアルタイムPCRの結果も発現の傾向において非常に一致しています。

#### —今はどのような手法で研究を進めているのでしょうか？

そうですね。子宮体癌の検体には、網羅的かつ定量的にmiRNAを解析できるTaqMan®アレイシステム（図）を、2008年8月のリリース後すぐに取り入れてみました。マイクロアレイは原理上、ゲノムのコンタミや定量性に問題があり、いくつかのmiRNAにおいてその点が気になっていたためです。最終的に、定量的なプロファイリング結果を出すまでのスピード面で助かりました。また、結果はマイクロアレイとも一致していて、非常に信頼性の高いものでした。

#### —それでは、マイクロアレイをやめて、TaqMan®アレイシステムを利用した方が効率的だということでしょうか？

それは、研究者によると思います。現実的には、時間・検体数・初期設備費用・ランニングコストなどを考慮しなければなりませんし、扱う検体が株化細胞か臨床検体かにもよります。例えば、数ミリ程度の喉頭癌組織の場合、臨床検体は非常に貴重で失敗ができないので、定量性が確実に保証されることは大きなポイントとなります。

#### —プロファイリングから得られた、先生の研究成果をお教えてください。

それでは喉頭癌での成果を簡単にご紹介します。まず、喉頭癌を研究対象の1つとした理由ですが、喉頭癌の罹患者はほぼ100%喫煙者であり、癌化に至る特徴的なメ

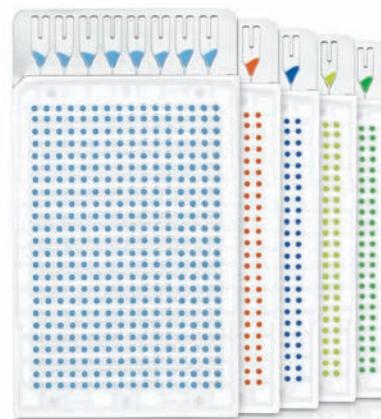


図 miRNA解析の理想的ツールTaqMan®アレイシステム

TaqMan®アレイはヒトのmiRNAに特異的な667のアッセイ、齧歯類の518のアッセイを2枚のカードに搭載しております。8カ所あるポートから反応液を注入し、遠心によって各ウェルに分配するために、煩雑なピベッティングは必要ありません。また、Megaplex™ RT Primersは上記のアレイの搭載遺伝子にあわせて設計された逆転写試薬で、たった1反応でアレイに搭載されている381のmiRNA遺伝子をすべて逆転写します。TaqMan®アレイとMegaplex™ RT Primersの組合合わせは、時間、コスト、データ精度に対する厳しい需要に応えることができる、画期的、かつ理想的な手法です

カニズムの一部を明らかにできると思ったからです。すると、喉頭癌では、これまで他の癌で報告されているoncomiRは1つも変化しておらず、これまで報告のなかったmiRNAに大きな変化がみられました。また、子宮体癌に関しても同様の解析を行い、特徴的な発現プロファイルを得ました。われわれは、これらがそれぞれの癌に特異的なmiRNAであり、バイオマーカーとして非常に有力だと考えています。

## miRNAを研究するうえで重要なこと

—これまでmiRNA研究を実践してきた視点から、実験を進めるうえで、一番注意した方がよいことなどを教えてください。

これは当然ですが、miRNAのクオリティーです。OD比を調べている方も多いと思いますが、total RNAの品質を客観的に評価するためにアジレントテクノロジー社が開発したRIN（RNA Integrity Number）値も測定すべ



### miRNA研究の関係各社との打ち合わせを終えて

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科喉頭研究班（齋藤康一郎 他）と、アプライドバイオシステムズジャパン社（杉本光）、エスアールエル社（石井裕治、佐竹恵美子）、G&Gサイエンス社（越坂卓也、阿部由紀子）など、関係者での打ち合わせ後（敬称略）

きです。分解の程度を表すRIN値は最高の品質を10とするものですが、われわれの経験ではRIN値が7.2のRNAサンプルすでに信頼のおける再現性を得ることができませんでした。指標としては、7.8以上を使用した方がよいと思います。マイクロアレイやTaqMan<sup>®</sup>アレイシステムなどの実験を行う研究者は、特にクオリティーに注意を払う必要があり、ここに多くのプロファイリング結果が一致しない原因があると考えています。

**—その他、研究を進めるうえで念頭に置いた方がよいことなどもお教えてください。**

念頭に置くべき点は、動物では、mRNAの量だけをみて生命現象を判断できなくなったことです。動物ではmiRNAはmRNAを切断しないで翻訳を抑制するため、mRNAの量は変化せずに、タンパク質の量だけが減ることがあるからです。例えば、これまで非常に多くのmRNAのプロファイリングが行われてきましたが、この点には注意が払われておらず、タンパク質レベルの変化を見逃してきたことはかなり多いのではないでしょうか。

また、タンパク質レベルの変化ばかりに注意を払うことも避けるべきと思っています。特に、癌の微小欠失であると思われる部位にタンパク質をコードする遺伝子がなかった場合でも、miRNAの存在を確認する意義は大きいと思います。

例えば、冒頭で述べた慢性リンパ性白血病がよい具体例です。この慢性リンパ性白血病には、ヒト13番染色体の長腕領域が、半分以上の罹患者に欠失することが知られていました。そして、よく調べてみると、そこには2つのmiRNAの遺伝子が見つかりました。まだ仮説ですが、そのmiRNAがないと慢性リンパ性白血病になるのではと言われています。そのような疾患は、知られていないだけで他にもあると考えています。

**—これまで原因不明だったところに、miRNAが関与していることがあるということですね。**

稀ではないと思いますし、そういうものを洗い出す必要があります。それは宝物を探し当てるようなものだと思います。

### 今後の抱負

**—それでは最後に、本インタビューを読んでいる研究者の方に、先生ご自身の今後の抱負をお話しいただけますでしょうか。**

miRNA研究は本当に宝の山で、癌をはじめ、再生・神経などのいろいろな分野の方々がすでにmiRNAを念頭に置かれて研究を進められていると思います。その際、どのような結果であってもmiRNAに関する情報を共有することが非常に大事だと思っています。情報を共有することで、miRNA研究のすそ野が広がり、新しい発想につながります。実際、われわれも日々驚くことばかりで、今後もmiRNAがもつ生命への意義を楽しみながら解き明かしていきたいと思っています。

**—本日は大変貴重なお話を聞かせいただきどうもありがとうございました。**

**AB Applied Biosystems**

アプライドバイオシステムズ ジャパン株式会社

〒104-0032 東京都中央区八丁堀4-5-4

TEL : 03-5566-6100 (代表)

URL : <http://www.appliedbiosystems.co.jp>

# miRIDIAN microRNA Mimic および Inhibitorを用いた 内在性miRNAターゲット遺伝子の転写調節

サーモフィッシューサイエンティフィック株式会社

microRNA (miRNA) は短鎖のノンコーディングRNAで、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解により、遺伝子の発現調節に関与しています。miRNAの機能を増加あるいは阻害し、その変化の解析を可能にするmiRNA機能ミック(模倣)およびインヒビター(阻害剤)は、miRNAの機能研究において有用なツールとなります。本稿では、miRNA機能解析研究に有用な Thermo Scientific Dharmacron 製品と、その実験例をご紹介します。

## ● miRIDIAN microRNA Mimic

miRNA ミックを細胞に導入することで、内在性 miRNA の機能を増加する機能獲得(gain-of-function)アッセイができます。miRIDIAN microRNA Mimic は、Sanger miRBASE (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) に登録されている miRNA に対する配列と、アンチセンス鎖を RISC に取り込まれやすくする化学修飾をもつ合成二本鎖 RNA です。天然型 miRNA と同様に RISC に取り込まれ、ターゲット遺伝子転写物(mRNA)を認識・調節します。

## ● miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor

miRNA インヒビターを細胞に導入することで、内在性 miRNA の機能を阻害する機能抑制(loss-of-function)アッセイができます。インヒビターは、miRNA に対する相補配列をもつ一本鎖の RNA で、miRNA に不可逆的に結合することにより、その機能を阻害します。最新のインヒビター、miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor は、化学修飾と末端ステムループ構造を導入し、インヒビターとしての機能抑制効果を高めています。

## ● miRNA発現プロファイル解析サービス

miRNA に対するマイクロアレイを用いて、miRNA 発現量の変化を網羅的に調べる発現プロファイル解析サービスです。独自のアレイとともに、全ての miRNA に対する miRIDIAN 合成 microRNA を内部標準に用いるなど様々なコントロールを用いることで、実験誤差が抑えられ、正確性、感度、再現性が向上しています。

## ● miRIDIAN microRNA Mimic および Hairpin Inhibitorを用いた肝臓がん細胞(Huh-7)における miR-122 の機能獲得および抑制とターゲット遺伝子の転写調節

miRIDIAN microRNA Mimic および Hairpin Inhibitor の有用性を示すため、既知の miRNA とターゲット遺伝子の組合せである miR-122 と Aldolase-A (AldoA) の系を用いて検証実験を行いました。AldoA の mRNA は、その 3' UTR で miR-122 のターゲット配列を保存しており(図1)，



図1：miRNAターゲット遺伝子予測プログラム(3種類)によって、miR-122のターゲットとして AldoA mRNA 3' UTR の同じサイトが予測されています (<http://pictar.mdc-berlin.de/>, <http://www.targetscan.org/>, <http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/>)。(A) このサイトは複数の生物種の3' UTRにおいて保存された領域にあります。(B) miR-122(青)の AldoA 3' UTRへの結合は 8-mer seed(赤)の一一致による予測されています。

肝細胞では通常発現が抑制されています。これまでの研究により、miR-122は AldoA のような非肝臓遺伝子の発現を抑制し、成人肝臓の表現型の維持に関与していると考えられています。ここでは肝臓組織における miR-122 の役割をさらに検証した実例を示します。

### 方法

#### ・細胞培養

Huh-7 細胞はトランスフェクション 24 時間前にプレーティングしました(96 ウェルプレート, 10000 cells/well)。

#### ・miRNAミックおよびインヒビター

miR-122に対する miRIDIAN microRNA Mimic と miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor、各ネガティブコントロールを用いました。インヒビターは 3 種類：(1) miRNA の逆相補配列のインヒビター(reverse complement, RC)，(2) 以前のデザイン(第一世代)の miRIDIAN Inhibitor，(3) ヘアピン構造をもつ現在の miRIDIAN Hairpin Inhibitor。

#### ・デュアルルシフェラーゼアッセイ

ホタルルシフェラーゼ(Fluc)とウミシイタケルシフェラーゼ(Rluc)の遺伝子を含む、デュアルルシフェラーゼプラスミド psiCHECK-2(Promega)を用いました。miR-122 miRNAに対する相補サイトを、hRluc 遺伝子 3' UTR に導入しました。レポータープラスマド(100ng/well)と

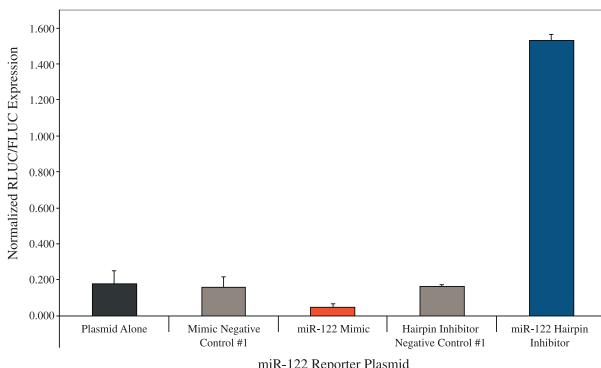


図2: Huh-7細胞のデュアルルシフェラーゼアッセイの結果。Huh-7細胞に対して、レポータープラスミドのみ、またはレポータープラスミドとmiRIDIAN製品の両方を、DharmaFECT Duoを用いてトランスフェクションしました。ルシフェラーゼの発現量はトランスフェクション48時間後に測定しました。

miRIDIAN microRNA MimicまたはHairpin Inhibitor(1-40 nM)を、DharmaFECT Duo( $0.3 \mu\text{L}/\text{well}$ )を用いて細胞にトランスフェクションしました。ルシフェラーゼ活性はDual-Glo Luciferase Assay System(Promega)を用いて測定しました。

#### • AldoA mRNAのノックダウンアッセイ

miR-122 miRIDIAN microRNA MimicおよびHairpin Inhibitor(1-40 nM)を細胞にトランスフェクションし、1-7日後に細胞を回収、mRNAの発現量を測定しました。

#### 結果

- miR-122ミックおよびインヒビターを用いたデュアルルシフェラーゼアッセイ

miR-122は肝臓で発現しております、AldoA mRNAをターゲットにすると報告されています。肝臓組織と同様のmiR-122発現が、肝臓がん細胞株Huh-7細胞においても確認できため(マイクロアレイ解析)、Huh-7細胞をin vitro実験系として選択しました。miR-122の発現を検出するデュアルルシフェラーゼレポータープラスミド(または空のレポータープラスミド)を、各miRIDIAN microRNAと共に細胞にトランスフェクションしました。miR-122レポーターを導入した細胞では、空のレポーターを導入した細胞と比べて、内在性miR-122によるルシフェラーゼ発現量の低下が見られました。miRIDIAN miR-122 MimicをmiR-122レポーターと共にトランスフェクションした場合は、ルシフェラーゼ発現量はさらに低下(3倍以上)しました(図2)。一方、miR-122 Hairpin Inhibitorをトランスフェクションした場合は、ルシフェラーゼ発現量の増加(8倍以上)が観察されました。

#### • AldoA mRNAアッセイ

レポーターアッセイに加えて、miRNAのターゲット遺伝子(mRNA)の発現量を観察することは重要な知見となります。各miRIDIAN microRNAを種々の濃度でHuh-7細胞に導入し、ターゲット遺伝子AldoAのmRNA発現量

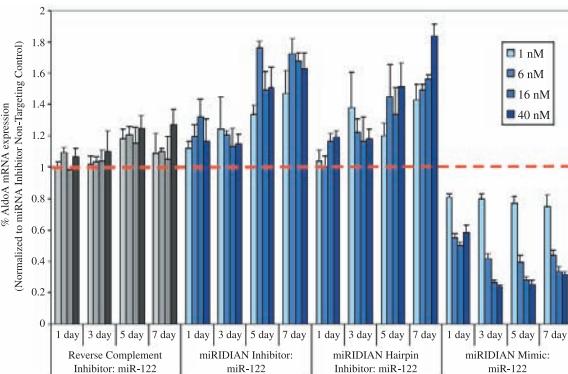


図3: Huh-7細胞におけるAldoA mRNA の発現量。赤の点線は内在性miR-122により調節されているAldoA発現量を示しています。縦軸は、1より大きい値はmiR-122の機能抑制によるAldoAの増加を、1より小さい値はmiR-122の機能増加によるAldoAの減少を示しています。miRIDIAN Hairpin Inhibitorと第一世代のmiRIDIAN Inhibitorでは、miR-122の機能が効果的に抑制されています。

の時間変化を調べました。miRIDIAN microRNA Mimicをトランスフェクションすると、予想通り AldoA mRNA レベルが低く抑えられました(図3)。一方、miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitorを細胞に導入すると、AldoA mRNA レベルが増加しました。逆相補配列(RC)と第一世代のmiRNAインヒビターは、ともに AldoA mRNA レベルを増加しましたが、その内在性miRNA抑制効果は Hairpin Inhibitorと比較して弱い結果でした。

#### まとめ

miRNAの機能獲得および機能抑制の実験を、miR-122 miRNAと AldoAの系を対象として行いました。miR-122 Mimicの導入によるAldoA mRNAレベルの減少と、Inhibitorの導入によるAldoA mRNAレベルの増加が確認されました。miRIDIAN microRNA MimicおよびHairpin Inhibitorは、miRNAとターゲット遺伝子の機能研究において有用なツールとなります。

#### ● Thermo Scientific Dharmacon 製品情報

- miRIDIAN microRNA Mimic

内在性miRNAの機能を増大するミック

- miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor

内在性miRNAの機能を阻害するインヒビター

- microRNA Expression Profiling Service

マイクロアレイによるmiRNA発現解析サービス

**Thermo** Dharmacon RNAi Technologies  
SCIENTIFIC

サーモフィッシューサイエンティフィック株式会社  
バイオサイエンス事業本部

■ 本社 Tech サポート TEL : 045-453-9085

■ 東京オフィス 販売関連問合せ TEL : 03-3811-3621

e-mail sales.bid.jp@thermofisher.com

<http://www.thermoscientific.jp/>

# Agilent miRNAマイクロアレイ - miRNA Profilingの最強ツール

total RNA中のmatureなmiRNAを直接ラベル化、高感度検出  
5 logのダイナミックレンジを達成、定量PCRと高い相関

アジレント・テクノロジー株式会社  
ライフサイエンス・化学分析本部

microRNA(以下miRNA)は、様々な生体内プロセスで非常に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつあり、その網羅的発現解析の重要性はますます高まっている。しかし、22mer前後という配列の短さと、高いホモロジーのため、従来マイクロアレイによる正確な網羅的検出が難しいと言われてきた。アジレントのmiRNAマイクロアレイは、matureなmiRNAを選択的に検出する独自のプローブデザインと、極めてシンプルなラベル化プロトコールにより、高い再現性、5桁におよぶ類のないダイナミックレンジ、定量PCRやノーザンプロッティングとの高い相関を実現した。

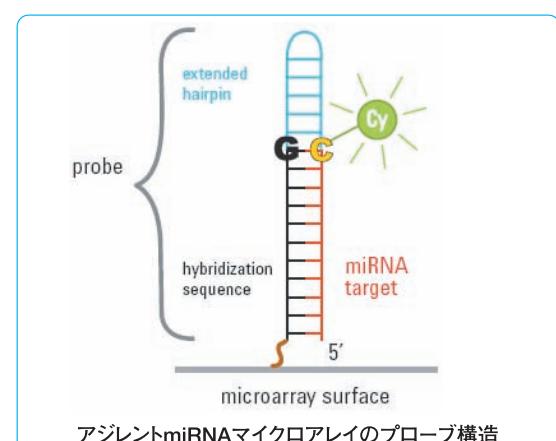
以下にその特徴を概説する。

## わずか100ngのtotalRNA中のmiRNAを直接ラベル化

低濃度のmiRNAを高精度に分析するためには、実験過程で生じるバイアスをできるだけ抑えた、シンプルなプロトコールを用いることが重要である。アジレントのmiRNAマイクロアレイのラベル化では、100ngのtotal RNA中のmiRNAを直接エンドラベル化し、そのままダイレクトにハイブリダイゼーション前の過程での吸着や増幅などによるバイアスを極力低減させた。ラベル化にはtotal RNAを用い、small RNAの濃縮作業は不要である。miRNAのプロファイリングに用いるためのtotal RNAの抽出方法について、市販3種類のキットについて検討を行い、結果を報告している。<sup>1)</sup>さらに新製品として、アジレント社製total RNA抽出キットの評価も行っている。

## Mature miRNAのみを選択的に検出

miRNAはその合成過程で、より長い前駆体として転写され、細胞内でプロセシングを受けた後に、22mer前後のmature miRNAとして機能する。より表現型に近い発現解析を行うためには、matureなmiRNAのみを、前駆体と区別して選択的に検出することが重要である。アジレントのmiRNAアレイは、matureなmiRNAより長い前駆体のハイブリダイゼーションを効率的に防ぐため、立体障壁となる独自のヘアピン構造をプローブに導入することにより、matureなmiRNAの高精度な分析を可能にした。<sup>2)</sup>



アジレントmiRNAマイクロアレイのプローブ構造

## miRBaseのUpdateに迅速対応

新規miRNAが続々と報告され、Sanger InstituteのmiRBaseは頻繁にUpdateされている。アジレントはガラス基板にインクジェットで直接DNAオリゴマーをin situ合成してアレイを製造するため、極めてフレキシブルにデザインを変更できる特長をもち、miRBaseのUpdateに迅速に対応している。

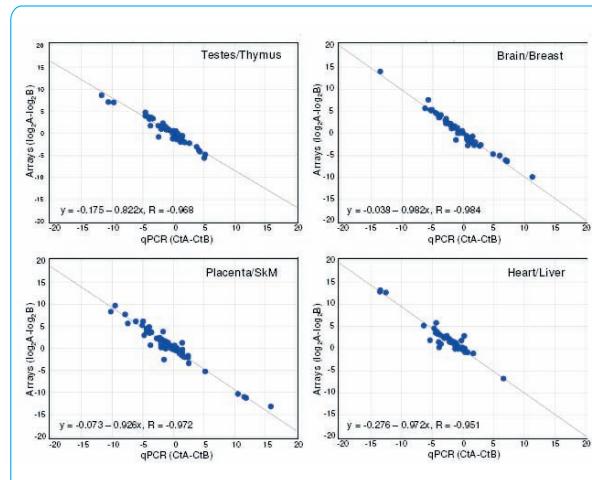
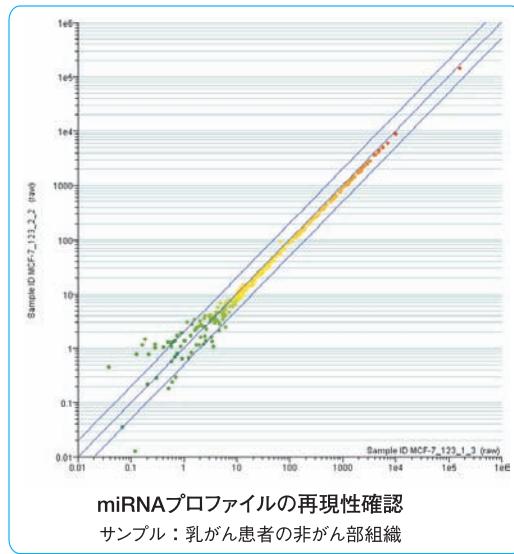
### Sanger miRBase 12.0対応

Human miRNA Microarray (851 Human miRNAs)

Mouse miRNA Microarray (611 Mouse miRNAs)

Rat miRNA Microarray (350 Rat miRNAs)

その他87の生物種に対してデザインされたmiRNAプローブデータベースをカスタムアレイ作成のために公開 (Agilent eArray)



## 再現性、ダイナミックレンジ、感度すべての点において高い信頼性

miRNAは、細胞の発生段階や、組織間、癌細胞などで発現が大きく変化することが知られており、網羅的プロファイリングでは、ダイナミックレンジが重要なポイントとなる。アジレントのmiRNAマイクロアレイでは、ノイズレベルを除いたうえで、5 log の有効ダイナミックレンジを持ち、多種多様な検体において、高品質な発現プロファイルを得ることができる。繰り返し実験の再現性が極めて高く、多数の繰り返しスポットを配置することにより、さらにデータの信頼性を高めている。

## miRNA発現プロファイルと遺伝子発現プロファイルの統合解析ツール

1つのmiRNAが1,000近くのターゲット遺伝子を制御している可能性が報告されており、miRNAと遺伝子発現の関係において、網羅的プロファイルの統合解析ツールが強く必要とされている。アジレントのmiRNAマイクロアレイの結果は、遺伝子発現解析の標準ソフトウェアとして、世界で最も汎用的に使われているGeneSpring GXにインポートすることにより、miRNAの発現解析だけではなく、複数のmiRNAがターゲットとしている遺伝子群のGene Ontology解析やPathway解析を可能としている。

## 定量PCRとの高い相関

上図は9つの異なるヒト組織について、広いレンジで発現している、幅広いGC含量をもつなど、いくつかの観点で選択された60のmiRNAの発現をアジレントのmiRNAマイクロアレイと、TaqMan® stem-loop qRT-PCRで測定、

比較したデータのうち、8組織4ペアの例を示したものである。横軸のqRT-PCRの値は、2組織間でのCt値の差であり、縦軸のアレイはそれぞれの組織でのmiRNAのシグナル強度のLog2の差である。両者の間において、極めて良好な相関係数と、1に近いSlope値が得られている。その他の組織の組み合わせについては、参考文献<sup>1)</sup>のAdditional Materialを参照されたい。

また、アジレントのマイクロアレイを用いた論文については、下記のサイトから検索することができる。

<http://www.opengenomics.com/>

## 終わりに

アジレントmiRNAマイクロアレイは、感度、再現性、測定精度、さらに使いやすさの点において優れた特長を持ち、matureなmiRNAの網羅的プロファイリングを強力にサポートするツールである。今後、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルなどへの応用開発を進めていく予定である。

## 文献

- 1) Robert A Ach et.al : BMC Biotechnology, 8: 69, 2008
- 2) Wang Hui et al. : RNA, 13: 151-9, 2007



Agilent Technologies

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

カスタマーコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

URL : <http://Agilentgenomics.jp>

e-mail : [email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

# ウイルス由来のRNAを感知するRIG-I、その構造と機能に迫る

京都大学ウイルス研究所 遺伝子動態調節研究部門 分子遺伝学研究分野 藤田尚志 教授



ヒトの細胞には、いったん転写されながらも、タンパク質の合成には関与しないRNA (non-coding RNA) が多く存在することがわかっている。立体構造をもつことで遺伝子発現の調節機能を果たすマイクロRNAは、その一例だ。一方、ウイルスにとってのRNAは「遺伝子の本体」としてきわめて重要な意味をもつ。京都大学ウイルス研究所の藤田尚志教授は、インターフェロンの抗ウイルス作用について研究を続け、細胞がウイルスに特徴的なRNA構造を認識することでインターフェロンを活性化させていることを突き止めた。

—なぜ、インターフェロンとウイルスとの関わりについて研究しようと思われたのでしょうか？

大学3年のとき、ウイルスが、普段はオフ状態にあるインターフェロン遺伝子のスイッチをオンにすることを知り、おもしろそうだと思ったのが始まりです。微生物学の講義で国立予防衛生研究所（現 国立感染症研究所）の河野晴也先生の話を聞き、その内容がインターフェロンやウイルスに関するものだったのです。当時は、遺伝子の数すらわからないような時代でしたが、私が研究を始めると、世界中で遺伝子工学が発展し、さまざまな生物種のゲノムが解読されるようになり、研究環境が飛躍的に整っていきました。

その後、1993年に東京都臨床研究所で独立した研究室をもち、2006年に京都大学のウイルス研究所に移ってきました。ウイルス研はインターフェロン研究では古くから知られていましたが、新たに分子遺伝学研究分野の研究室を立ち上げ、現在に至ります。

—インターフェロンとはどういう物質なのでしょうか？

インターフェロンはタンパク質で、I型、II型、III型と、大きく3種に分けられます。いずれもウイルスを抑制する作用をもちますが、I型とIII型は生体内のさまざまな細胞内で作られ、細胞質内にあるウイルスを感知するセンサーがはたらくことで活性化されます。残るII型は免疫細胞が活性化された時に作られます。

インターフェロンは、自らの細胞の性質を変化させることによってウイルスの増殖を阻害していることがわかっています。また、細胞によっては増殖を抑制する機能も発揮します。

—藤田先生ご自身は、どのような研究成果を挙げられて

きたのでしょうか？

最大の成果は、2004年に、「ウイルスの侵入を感じするセンサーが、生体のさまざまな細胞に存在するRIG-Iというタンパク質である」ということを突き止めたことです。RIG-Iの遺伝子は、まったく知らない新規のものでした。その後、RIG-Iは「RNAを認識する部位」と、「I型およびIII型インターフェロンの活性化スイッチをオンにする部位」からなることや、ウイルスのRNAの認識が下流の遺伝子や転写因子のスイッチを次々にオンにし、最終的にインターフェロンの活性化を促すこと、インターフェロンによってさらにスイッチがオンになる遺伝子があること、なども明らかにしてきました。

—RIG-Iは、どのようなRNAを認識するのでしょうか？

細菌やカビは自らのしくみで増殖し、私たちの細胞とはかなり異なった物質を作り出すので、免疫系が感知するのが比較的容易です。一方、ウイルスは私たちの細胞を乗っ取って増えるので、ウイルスだけがもつ微妙な特徴を認識するシステムが必要とされます。RIG-Iは、ウイルスが自己複製の際に作り出す「25塩基対以上の二重鎖RNAの構造」を認識します。ここで重要なのは、「RNAの塩基配列そのもの」ではなく、「二重鎖」という構造」を認識する点です。その理由の一つは、ウイルスの遺伝子は短時間に変異を繰り返すため、特定の配列を認識するのでは対応不可能だからだと考えられます。

二つめの理由に、私たちの細胞は自らのRNAとして二重鎖のものを作り出しがないことがあげられます。私たちのDNAは二重鎖ですが、DNAは核やミトコンドリアの中に厳密に収納されており、細胞質に漏れ出てく

ることはできません。つまり、細胞質内にある二重鎖RNAは例外なくウイルスのもので、存在が感知された場合には直ちに排除システムが稼働するようになっているわけです。

—全てのウイルスが、RIG-Iによって認識されているのでしょうか？

そうではありません。RIG-Iが認識するのは、増殖過程で二重鎖RNAを作り出すRNAウイルスと一部のDNAウイルスです。代表的なRNAウイルスには、インフルエンザウイルスやC型肝炎ウイルスなどがあります。データベースを調べると、RIG-Iとアミノ酸配列がよく似た別のタンパク質が2種類ありました。これらもインターフェロンの活性化に関与していたのですが、そのうちの一つであるMDA5はコクサッキーウイルスなどのピコルナウイルスを認識するセンサーとして機能することがわかっています。

—あらゆる生物が、こうしたウイルス抑制のメカニズムをもっているのでしょうか？

脊椎動物以上の生物に限られます。ただし、RIG-I遺伝子については、その痕跡が線虫や植物などにもみられます。いずれも抗ウイルス作用に関与していますが、線虫などではウイルスの配列を認識して排除するRNA干渉に関与しているようです。生物の進化過程において、ウイルスに対抗する手段に異なるシステムを利用するようになった点は興味深いと思います。

インフルエンザウイルスのように病原性の強いものもありますが、こうしたウイルスは、インターフェロンの合成と機能を阻害するタンパク質を作り出すように進化している場合がほとんどです。ウイルスと生物は、常に「いたちごっこ」の生存競争をしているといえそうです。

—RIG-IやMDA5の研究成果は、医療や創薬への応用も可能でしょうか？

はい、そう期待しています。たとえば、人工の二重鎖RNAを投与することでRIG-IやMDA5を活性化させることができます。また、インターフェロンの活性を高める物質のスクリーニングにも、RIG-IやMDA5が使えるでしょう。インターフェロンは、すでにC型肝炎や一部のがんの治療に使われていますが、生産コストが高いために非常に高価です。もしインターフェロンの活性を高められる薬剤が開発できれば、RNAウイルスによる他の感染症にも広く使えるようになると思います。

一方で、MDA5遺伝子に特定の変異があると、自己免疫疾患の一つであるI型糖尿病にかかりにくくなることがわかっています。逆に免疫が正常なときには、ウイルス感染が引き金となってI型糖尿病が発症すること

があるようです。MDA5やRIG-Iの遺伝的な多型は、免疫反応の個人差に大きく関与していると思われます。私も、最近になって、ヒトのRIG-Iの多型を調べはじめています。

—ウイルスの抑制に宿主細胞のマイクロRNAが関与しているということはないのでしょうか？

あると思います。というのは、アレイを用いてウイルス感染細胞のマイクロRNAのプロファイルを調べると、発現レベルが上がってくるものがあるからです。おそらく、ある種のマイクロRNAが細胞の遺伝子発現を変化させることで、ウイルス増殖を抑制しているのでしょうか。現在までにマイクロRNAとして70種ほどが知られており、実際にはもっと多くあると思いますが、そのうちの少なくとも5種くらいがウイルス抑制に関与しているようです。マイクロRNAは配列特異的に機能を発揮するので、RIG-Iが認識する二重鎖RNAとは少し異なりますが、両者はどこかでつながっているような気がしています。

—今後の課題や目標は何でしょうか？

RIG-Iのセンサー部分の分子が、どのようにウイルスを認識するかをさらに詳しく解明したいと思います。ウイルスを使わずにRIG-Iを活性化させる技術を開発したので、血球、上皮、肝臓などの細胞でRIG-Iを活性化し、その下流で、いつ、どのような遺伝子の発現に動きがみられるのかを調べたいと考えています。

一方、マウスでRIG-I遺伝子をノックアウトしてみたところ、発生途中で死んでしまうことがわかつきました。どうやらRIG-Iは抗ウイルス作用にとどまらず、発生や分化にも関与しているようです。多様なRIG-Iの機能と作用メカニズムを検討し、医療にも結びつけられるとよいと思っています。

—たいへんありがとうございました。

聞き手:西村尚子/サイエンスライター

### 藤田尚志 *Takashi Fujita*

京都大学ウイルス研究所 教授

京都大学大学院生命科学研究科協力講座 教授

平成元年 日本生化学会奨励賞受賞

平成18年8月 The Seymour and Vivian Milstein Award (2006): The International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR)

microRNA(miRNA)の網羅的な解析を可能に

**3D-Gene® microRNA 研究用DNAチップ  
(ヒト/マウス/ラット)**

**'TORAY'**

Innovation by Chemistry

## 超高感度DNAチップ **3D-Gene®**

### 非増幅mRNA検出 (cDNA法)

mRNAを増幅せず、cDNAに転写したままの状態で測定するプロトコールは増幅バイアスがなく、mRNA量をより精確に反映した結果が得られます。超高感度な**3D-Gene®**が、この方法を可能にしました。

近日受託開始

### miRNA検出

totalRNAの約0.01%しか存在しない微量のmicroRNAを高感度DNAチップ**3D-Gene®**により解析することができます。また、再現性、定量性の高いデータが得られます。

### ホルマリン固定標本抽出 mRNA検出

超高感度DNAチップ**3D-Gene®**を使用することによって、ホルマリン固定標本(FFPE)から抽出したRNAサンプルでも遺伝子発現解析が可能となりました。

近日受託開始

### **3D-Gene®**ラインナップ

- ヒト全遺伝子型 DNAチップ  
Human Oligo chip 25k
- ヒト免疫・メタボリックシンドローム DNAチップ  
Human Immunity & Metabolic Syndrome 9k
- ヒト消化器がん DNAチップ  
Human Digestive Cancer 9k
- マウス全遺伝子型 DNAチップ  
Mouse Oligo chip 24k
- ラットサブセット型 DNAチップ  
Rat Oligo chip 12k
- 酵母全遺伝子型 DNAチップ  
Yeast Oligo chip 6k
- microRNA研究用 DNAチップ(ヒト/マウス/ラット)  
miRNA Oligo chip (Human, Mouse, Rat)



## 次世代シーケンサーと超高密度マイクロアレイが実現する イルミナの癌ゲノム解析ソリューション



- 網羅的かつ高精度な新規マイクロRNA探索
- 最新データベースに基づく1,100種類以上のマイクロRNAプロファイリング



- 1塩基レベルでの転座、逆位、挿入、欠失の検出
- 1.5kbのスペースで検出できるコピー数変化



- 高解像度で正確なDNAメチル化マッピング
- 27,000 CpGアイランドを低成本でプロファイリング

● 次世代シーケンサー Genome Analyzer ● 超高密度マイクロアレイ BeadChip

イルミナの癌ゲノム解析ソリューション : <http://www.illuminakk.co.jp/cancer/>

イルミナ株式会社

〒103-0025

東京都中央区日本橋茅場町2-13-13 共同ビル5F

Tel (03)4578-2800 Fax (03)4578-2810

[www.illuminakk.co.jp](http://www.illuminakk.co.jp)



**RNAiによる遺伝子発現制御機構の研究に最適です。**

## 抗Argonaute(Ago), モノクローナル抗体

和光純薬工業(株)では、細胞質におけるRNAiのキーフォームである「RNA-induced silencing complex (RISC)」の主要コンポーネントであるArgonaute (Ago)タンパク質に対するモノクローナル抗体を製造販売しております。

### 内在性 Ago1 タンパク質の免疫沈降

#### 免疫沈降

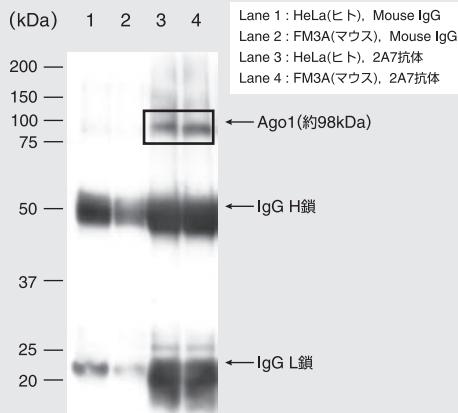


図1.

HeLa(ヒト子宮頸部がん由来)、FM3A(マウス乳がん由来)の細胞溶解液に、2A7抗体(015-22411)5μgを固相化した10% Protein G slurryを20μL添加し免疫沈降を行った。得られた免疫沈降画分をSDS-PAGEに供し、ウェスタンプロットを行った。その結果、ともに98kDa付近に内在性Ago1のバンドが確認された。使用細胞数は1×10<sup>7</sup>。

### 内在性 Ago2 タンパク質の免疫沈降

#### 免疫沈降

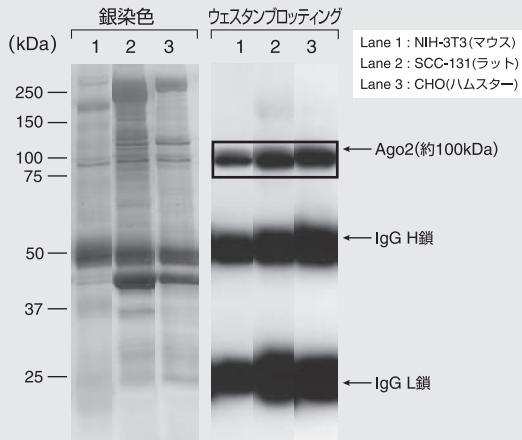


図2.

NIH-3T3(マウス)、SCC-131(ラット)、CHO(ハムスター)の細胞溶解液に、2D4抗体(018-22021)5μgを固相化した10% Protein G slurryを20μL添加し免疫沈降を行った。得られた免疫沈降画分をSDS-PAGEに供し、銀染色及び2D4抗体(018-22021)を一次抗体として用いたウェスタンプロットを行った。その結果、マウスだけでなく、ラットとハムスターにおいても100kDa付近に内在性Ago2のバンドが確認された。使用細胞数は5×10<sup>6</sup>。ウェスタンプロットの一次抗体希釈倍率は1/1,000。

追加情報 細胞由来Agoタンパク質の免疫沈降にも使用できることを確認しております。

コードNo.	品名	容量
015-22411	Anti Ago1, Monoclonal Antibody (2A7)	50μL
014-22023	Anti Mouse Ago2, Monoclonal Antibody(2D4)	50μL
018-22021		100μL
011-22033	Anti Human Ago2, Monoclonal Antibody(4G8)	50μL
015-22031		100μL

コードNo.	品名	容量
292-66701	microRNA Isolation Kit, Human Ago2	10回用
292-67301	microRNA Isolation Kit, Mouse Ago2	10回用
290-66501	microRNA Cloning Kit Wako	8回用
298-65103	Single Strand DNA Ligase, thermostable, recombinant, Solution	200units
292-65101		500units

## 和光純薬工業株式会社

本 社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
東京支店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
営 業 所：北海道・東北・筑波・横浜・東海・中国・九州

問い合わせ先

フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806  
URL : <http://www.wako-chem.co.jp>  
E-mail : [labchem-tec@wako-chem.co.jp](mailto:labchem-tec@wako-chem.co.jp)