

研究の糸 ～天然の遺伝子治療薬のようにはたらく 4.5S RNA_H

RNA 生物学研究室・教授 中川 真一

最近我々は、まるで天然の遺伝子治療薬のように毒性のエクソンをスキッピングさせているマウス垂目特異的な遺伝子の機能を明らかにしました。その遺伝子の名は 4.5S RNA_H。北大薬学部の大先輩、原田文夫先生(8 期)と加藤宣之先生(20 期)¹⁾が 1970 年代にがん研究所におられたときに同定された、北大にゆかりの深いノンコーディング RNA になります。4.5S RNA_H は最近の文献では 4.5SH と記載されることが多いのですが、本稿では原田先生がかつて論文で使われていた RNA_H という名称を使っていきたいと思います。

4.5S RNA_H はその名の如く、沈降係数 4.5S の RNA で、原田先生が見つけられた RNA ということで、いつしか業界では RNA_H と呼ばれるようになったそうです。原田先生が名付けたわけだけでなく、他の研究者が親しみを込めてそう呼び始めた、というところに、原田先生のお人柄を伺うことができるような気がします。原田先生は留学先のウィスコンシン大学でレトロウイルスが逆転写の際に使う tRNA についての研究をなさっていましたが、帰国して新しいプロジェクトを始めるに当たり、レトロウイルスに含まれる一連の低分子 RNA の研究を開始され、その過程で同定された RNA が本稿の主人公、RNA_H²⁾ です。当時はまたサンガー法による塩基配列は一般的な手法ではなく、この論文では、³²P ラベルされた RNA を精製して

RNaseT1 で処理し、cellulose acetate と DEAE-cellulose の二次元電気泳動で展開したスポットをさらにヌクレオチド解析するという、とてつもなく手間がかかり高度な手技も要する実験で RNA の塩基配列を決めておられています。瀬野悍二先生曰く「実験を絶対失敗しない」原田先生と、その下で修練を積まれた加藤先生のお二方が取り組まれたからこそ、世界に先駆けてこの RNA の配列を決めることができた、というのは間違いのないことかと思われます。

この RNA_H、当初はウイルスと相互作用している RNA ということで同定されたものの、ウイルスが感染していない細胞でも内在の poly-A をもつ mRNA と相互作用していることがわかり、さらに相補的な配列が様々な mRNA にも見られることから、加藤・原田論文では、mRNA 前駆体のプロセシング等に関わっているのではないかと、というアイデアが提唱されています。実際、四半世紀の時を経て明らかになったのはスプライシングの制御因子だったということになりますので、データベースもあまり整備されておらず、BLAST などの相同配列検索アルゴリズムもなかった当時にこのアイデアに行き着いた両先生のご慧眼と透察力には脱帽せざるを得ません。ただ、当時はそれ以上の生理機能解析ツールは揃っておらず、また、この遺伝子がマウスやラットなどの小型げっ歯類特異

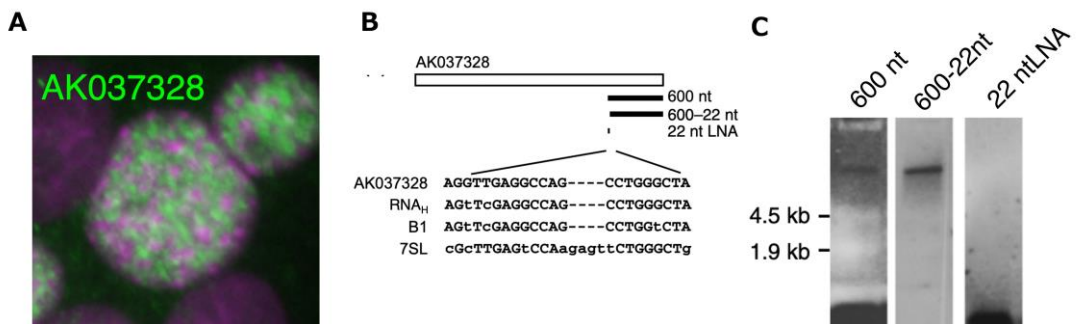


図1 プローブの交差反応によって同定された RNA_H

(A) AK037328 をプローブとして得られた RNA 局在のシグナル。核に強いシグナルが見られる。(B) AK037328 と RNA_H、レトロトランスポゾン SINE B1、および、SINE B1 レトロトランスポゾンが由来したと言われている 7SL の相同配列と(C)で用いたプローブの位置。(C) 脳の RNA を用いたノザンブロット。600nt プローブは AK037328 を検出するが 90 塩基の RNA_H と強く交差反応する。

的でヒトにはみられないということもおそらく手伝って、RNA_H は国際的な研究の表舞台からその後ほとんど姿を消してしまいます。

私が RNA_H と出会ったのは 2005 年、和光の理研で新しい研究室を立ち上げてほどない時期でした。私はもともと発生生物学畑の出身で、学位取得後しばらくは神経系の軸索ガイダンスや組織形成を制御する分子メカニズムの解明を目指していたのですが、ひょんなことから核内に蓄積するノンコーディング RNA に出会い、心奪われ、いつの間にか寝ても覚めても核内ノンコーディング RNA の事を考えてしまう、まるで初恋に心躍らせる中学生のような日々を当時送っていました。そこで思いついたプロジェクトが、神経系で高発現している機能未知のノンコーディング RNA 遺伝子のプローブを片っ端から作って *in situ* hybridization で細胞内局在を調べ、核内に蓄積する新規ノンコーディング RNA を同定しよう、というものです。なんとも brute force なアプローチで、今から考えればあまりの計画性のなさに我ながら呆れてしまうところもありますが、恋は盲目あばたもえくぼといいますが、当時はノンコーディング RNA に関する仕事をしていればそれで幸せ、みたいなところもありまして、テクニカルスタッフの石田くんと、えっちらおっちら毎週 20 クローンぐらいづつ、番号しかついていない遺伝子の転写産物の細胞内局在のスクリーニングしておりました。そこで抜群に発現量が高く、核がピカピカに染まる新規遺伝子 AK037328 が見つかりまして、その

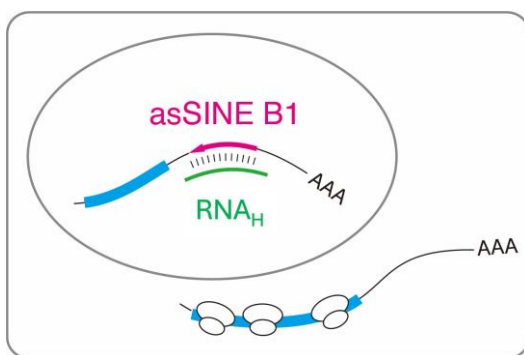


図2 RNA_Hによる mRNA 繫留モデル

通常 mRNA は核内で転写されたあと速やかに細胞質へと輸送される。3' の非翻訳領域にレトロトランスポゾン SINE B1 がアンチセンス方向に挿入された mRNA は、相同配列を持つ RNA_H と塩基対を形成し、核内に繫留されと考えられる。

核内のキラキラとしたシグナルに大興奮したのを今でもよく覚えております。

ところがこの AK037328、予測では数千 bp ぐらいの長さの転写産物を作っているはずなのですが、ノザンプロットをしたところ、あの核内の強いシグナルから考えるとありえないぐらい薄いバンドしか見えません。そのかわりに、90 塩基ぐらいのところに、サインペンで書いたようなぶっといシグナルが出てくるではありませんか(図1)。マウスの RNA にはしばしばリピート配列が含まれているので、そのような配列に対してプローブを作ってしまうと別のバンドを検出してしまうこともあるのですが、当然そういう配列は BLAST などの相同配列検索をあらかじめ行って、プローブには含めないようにしています。おかしいな、なんでだろう、と、首をひねっていたのですが、石田くんがある日、この遺伝子の一部、たった 17 塩基の配列が、RNA_H と同じ配列であるということに気づきました。これだけ短いと通常の相同配列検索アルゴリズムでは引っかからなくて、僕らもユニークな配列だと思ってプローブを作っていたわけですが、わずか 17 塩基の相同配列を介してこのプローブが 4.5SH に交差反応したシグナルを、我々は見ていた、ということになります。

新規遺伝子、だと思っていたら、既知の RNA_H だった、ということで大いに落胆したのですが、よくよく過去の論文を調べてみると、原田先生たちの塩基配列の決定やゲノム領域の同定以降、ほとんど解析の手がつけられていないということが分かってきました。2006 年の RNA 学会で石田くんがポスター発表したところ、もうその頃は原田先生は引退されておられたのですが、原田先生のお弟子さんで転写研究をされている富山大学の廣瀬豊先生さんから「面白いですね。私も少しやっていたんですが、いまは誰も研究してないから、ぜひ頑張ってください。」と背中を押していただき、機能解析を進めることにしました。ただ、RNA_H は単一遺伝子ではなく、ゲノム中には数百コピーもあるということが知られており、機能未知遺伝子の生理機能を調べるときの常套手段であるノックアウトマウスを作って解析するというアプローチは、非現実的に思われました。ですので、いわゆるアンチセンス核酸を用いたノックダウン実験を行い、RNA_H が相補的な配列を持つ mRNA の細胞内局在を制御しているのではないかと、というモデルを提唱しました(図2)³⁾。RNA_H の配列はレトロラン

スポゾン(ゲノム中を飛び回って自分自身のコピーを増やしていく利己的配列)の一種、SINE B1 と非常に高い相同性を示します。また、この SINE B1 はマウスの中で最も繁栄しているレトロトランススポゾンで、様々な mRNA の非翻訳領域に飛び込んでいます。この挿入は遺伝子によってはセンス方向、また別の遺伝子ではアンチセンス方向に入っていますが、アンチセンス方向に入った場合は RNA_H と塩基対を形成することになります。RNA_H は核内に局在していますから、この塩基対形成を介して、標的となる mRNA を核内に繫留しているのではないかと、というのが基本的なアイデアです。ただ、アンチセンス核酸によるノックダウンは一過的で長期的な影響を見ることができないこともあり、出てきた結果も、再現性がある、仮説と矛盾しない、というボトムラインはクリアしていたものの、誰が見ても一目で納得するほど crystal clear なものではありませんでした。一応論文にはまとめたものの、ちょうど私自身が理研から北大へ移動することもあり、このプロジェクトはここで一旦終了、のはずでした。

北大に赴任したのが 2016 年の春。さてこれから何を始めようか、と色々考えていたのですが、当初は、理研で行っていたようなマウスを用いた解析を手広く進めることは、正直なところ諦めていました。理研ではマウスのコアファシリティーが非常に充実していて、変異マウスの作製はもちろん、人工授精によるマウスの繁殖サービスを始めて至れり尽くせりのサービスがあり、ノックアウトマウス作製の経験が皆無だった私でも、ほぼ委託解析みたいな感じで、しれっとマウス屋のふりをして実験することが可能でした。ただ、そのような上げ膳据え膳至れりつくせりの環境は理研以外にはそうそうありませんし、無い物ねだりをして仕方がないので、マウスの仕事は続けつつ、学生やポストドクの頃に慣れ親しんでいたニワトリやアフリカツメガエルに回帰してなにか面白いこと見つけてやろう、と思っていたわけです。ところが、その年の 12 月に開催された分子生物学会でふと立ち寄ったゲノム編集関連のセッションで、マウスの卵管に CRISPR-Cas9 の溶液を入れてエレクトロポレーション(通称エレポ)するだけで簡単に変異マウスが作れる、という目からウロコの発表を聞きました。その驚きの手法の名は iGONAD。細かい管に溶液入れてエレポというのは発生屋にとっては垂涎ものの古典的テクニックで、私自身学

生時代より長年慣れ親しんでいた、大好きな仕事です。早速、発表者の東海大学の大塚正人先生に連絡を取り、大塚先生のラボにお邪魔して技術を教えてもらうことになりました。iGONAD の共同開発者である鹿児島大学の佐藤正宏先生と大塚先生の懇切丁寧なご指導のおかげもあり、ほどなく、単純な null 変異マウスであれば 1 週間に 1 ラインほどのペースでゲノム編集マウスを作れるような体制を北大で立ち上げることが出来ました。たった 1 ラインのノックアウトマウスを作るために院生 2、3 名が犠牲(?)になっていた 90 年代と比べるとまさに隔世の感があります。

遺伝子改変マウスをじゃんじゃん作れるようになったのは良いのですが、飼育スペースは限られていますので、どうしても凍結精子なり凍結卵で緊急性の低いラインは保存する必要があります。ただ、そういった生殖工学はほぼ全てコアファシリティーにお任せでやってきた「なんちゃってマウス屋」とってはハードルが高く、なかなか手を出そうという気にもなりません。そんな折、SNS 上でゲノム編集関連の情報交換をしていたトクロンティヌス氏といわゆるオフ会をすることになりました。富山の海の幸に舌鼓を打ちながら昨今のゲノム編集技術界隈の話題に花を咲かせていたところ、生殖工学なんて今はそんなに難しくないですよ、熊大の CARD で毎年講習会やっているので行ってみてはいかがですか？というアドバイスを頂きました。トクロンティヌス氏は極めて困難だと言われていたマウス精子の簡便な凍結法を開発した方です。プロが言うなら間違いはない。善は急げということで早速講習会に申し込み、いい年したおっさんが若い学生さんに混じって手を動かしていたのですが、講習会の指導は手取り足取り懇切丁寧で、4泊5日の集中コースで、生殖工学は全くの素人の私でも、採精から採卵、人工授精と凍結、卵管移植まで一通りできるようになりました。話が RNA_H からだいぶそれてきてしまったようですが、実はここで大きな出会いが。その CARD の講習会は熊本大学の熊本大学生命資源研究・支援センターで行われていたのですが、何日目だったか、エレベーターを待ちながらふとフロアーの案内を見ていたら、数年前に新学術領域で同じ班にいた荒木喜美先生のラボが上の階だということに気づき、休憩時間にふと立ち寄ってみたのです。突然の訪問にもかかわらず、あらおひさしぶり、といつもニコニコ顔で迎えてくださり、昨今

のゲノム編集技術の進展について歓談していたのですが、その中で、荒木先生のところでは最近非常に大きなゲノム領域をバッサバッサと欠損させる技術を開発しているという話を伺いました。RNA_Hはゲノム中に 200 コピー以上存在しますが、レトロトランスポゾンのようにゲノムのあちこちに散在しているわけではなく、そのほとんどは6番染色体の 1 MB ぐらいの領域に集中して存在していることが知られています。荒木先生のその技術を使えば、ひょっとしてRNA_Hのノックアウトもできるのではないかとふと思いつき、1 MB ぐらいの領域なんですけど飛ばすこと出来ますか？とお伺いしたところ、そんなすぐ出来ますよ、早速作ってみましょう、ということになりました。犬も歩けば棒に当たるといいますか、エレベーターでふとフロアマップが目に入らなければこの出会いはなかったわけで、研究が大きく飛躍するきっかけはどこに転がっているのかわからないものだ、つくづく思います。

荒木先生の超絶テクニックで半年もたたないうちにノックアウトマウスが完成し、掛け合わせをしたところ、ホモマウスが全く生まれてきません。つまり、RNA_Hはマウスの生存に必須の、非常に重要な遺伝子ということが分かりました。それまでノンコーディングRNAの変異マウスを色々作ってきましたが、胎生致死の表現型を示したのはこれが初めてで、ついに春が来た、と、飛び上がるほど嬉しかったのは言うまでもありません。その頃配属された薬学科の山本育子さん(61 期)に色々調べてもらったところ、胎生 6.5 日目、着床してすぐに致死になるという、非常に強い表現型を示すということが分かってきました。次に重要なのは、なぜRNA_Hの変異マウスが胎生致死になるか、その分子メカニズムを明らかにすることです。ところがこれが大変難航しました。山本さんが細胞質、核に分けた分画からRNAを抽出して先述した核内繫留モデルの検証を試みたのですが、いくつかの候補標的遺伝子では若干そういう傾向が見えるものの、そのような微妙な差で発生初期に致死になるような強い表現型が出るとは到底思われません。また、RNA シークエンシングという手法を用いて全遺伝子の発現を解析してみても、ありとあらゆる遺伝子が大きく発現変動していて、それらに共通した性質、たとえば共通のプロモーター配列であるとか、共通した非翻訳配列であるとか、あるいは特定の経路に関わっているだとか、そう

いう特徴は何一つ見つけることが出来ませんでした。一体何が起きているのだろう。全く手がかりが掴めないまま、時間だけが過ぎていってしまいます。

この状況を一転させてくれたのが、摂南大学農学部の芳本玲先生です。私が理研にいた頃、芳本先生は別の研究室でポスドクをされていたのですが、RNAに興味があるということで、私達の研究室の雑誌の輪読会や研究進捗報告会に顔を出してくれていました。RNA_Hの局在を見ますと、RNA スプライシングに関わる因子が濃縮する核スペckルと呼ばれる核内領域に特に強いシグナルが見えます。ですので私達もスプライシングと何らかの関わりがあることは念頭にはあったのですが、既知の選択的スプライシングアイソフォームの発現パターンの解析では大きな変化が見られなかったこともあり、あまり深くは追求していませんでした。ただ、私自身は胚操作や組織染色による解析が専門で、バイオインフォマティク的な解析はそれほど得意ではありません。餅は餅屋、専門家が見たらまた違ったものがみえるかもしれない、RNA スプライシングといえばそういえば芳本先生だ、ということで、データを見てもらうことにしたのです。芳本先生は京都大学の大野睦人先生のところでみっちりRNA スプライシングの生化学の基礎を学んでいたうえ、バイオインフォマティク的な解析も玄人はだし。果たして、データを渡した翌日に電話がかかってきて、これ、すごいこと起きてますよ、と、世紀の(?)大発見について熱く語ってくれました。

芳本先生の解析でわかったことは、RNA_Hのノックアウトマウスでは異常なエクソンが突如として数百個出現し、それらを取り込んでしまったmRNAにはストップコドンやフレームシフト変異が導入されてしまうので、非常に多くの遺伝子が機能できない状態になっている、ということでした(図3)。そしてその異常エクソンの配列を見ると、RNA_Hと非常に似た配列を持つレトロトランスポゾン、SINE B1 がアンチセンス方向に挿入された配列になっています。実はSINE B1は厄介なレトロトランスポゾンで、アンチセンス方向に挿入されると、ポリピリミジントラクトや5'スプライス部位、3'スプライス部位、といった、エクソンの定義に必要な配列を持ち込んでしまいます。ですので、そのような挿入がイントロンに起きると、細胞はその配列をエクソンと間違えて、スプライシングして

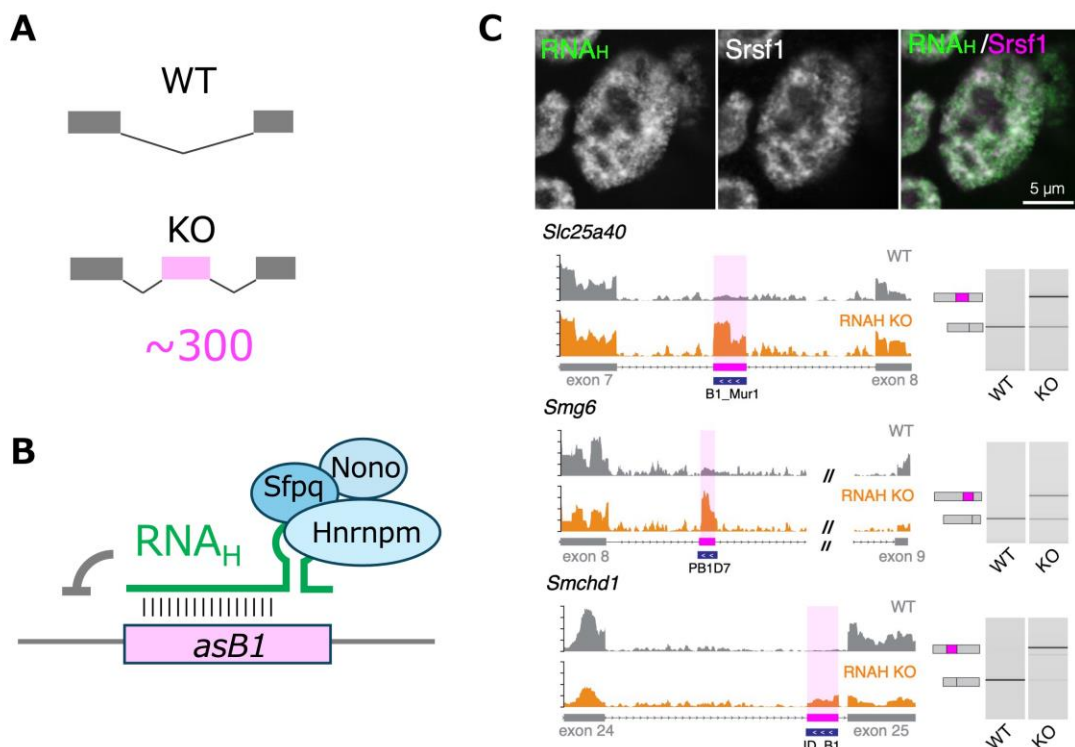


図3 RNA_Hはレトロトランスポゾン SINE B1 のアンチセンス配列由来の毒性エクソンをスキッピングさせている (A) RNA_Hのノックアウト (KO) マウスで見られるスプライシング異常の模式図。RNA_Hのノックアウトマウスでは野生型(WT)では決して見られない異常エクソンが約 300 個出現するため、宿主遺伝子から作られるタンパク質に変異が導入されてしまう。(B) RNA_Hの動作機構。RNA_Hの 5'のステムループ構造には Hnrnpm、Sfpq、Nono といったスプライシングを阻害する RNA 結合タンパク質が結合している。RNA_Hの 3'領域は標的の SINE B1 のアンチセンス配列由来の毒性エクソンと塩基対を形成し、スプライシングを阻害するタンパク質群をリクルートすることでスキッピングを誘導する。(C) RNA_Hの細胞内局在と異常エクソンの例。RNA_Hは Srsf1 などのスプライシング因子が濃縮する核スベックルに局在している。Slc25a40、Smg6、Smchd1 などの遺伝子のイントロンに挿入されたアンチセンス SINE B1 由来の配列が KO マウスではエクソンとして認識されている。

mRNA にとりこんでしまうことになります。そうするとその mRNA には高頻度でストップコドンやフレームシフト変異が導入され、機能が破壊されてしまいます。ところが、実際はそのような異常スプライシングは起きていません。なぜか。それは、これら SINE B1 由来の毒性エクソンのスプライシングを、相補的な配列を持つ RNA_Hが阻害しているから。このような美しいストーリーが、石垣山の一夜城よりしく、一夜にして完成していたのです。

その後の研究はトントン拍子に進み、RNA_Hが単純に塩基対形成でアンチセンス挿入 SINE B1 のエクソン化を防いでいるわけではないこと、5'側にあるステムループ構造にスプライシングを抑制するタンパク質が結合することが重要であること、

また、RNA_Hが標的のエクソンを認識する部分の配列は可変であり、別の配列に置き換えると、その配列と相補的な持つエクソンをスキッピングさせられることも分かり、新たに配属された薬科学科の中山雄太くん(65 期)の協力も得ながら、論文にまとめることが出来ました⁴⁾。これらの結果は創薬という点でも重要で、我々は任意のエクソンをスキッピングさせることのできる人工キメラ分子を手にしたことになります。現在、福山型筋ジストロフィーなど、異常なエクソンが原因となる遺伝的疾患の治療に RNA_Hの改変分子が利用できないか、薬学科の野村郁子さん(学生)が八面六臂の活躍で検討を進めてくれています。実際、マウスという種は、アンチセンス挿入 SINE B1 配列由来

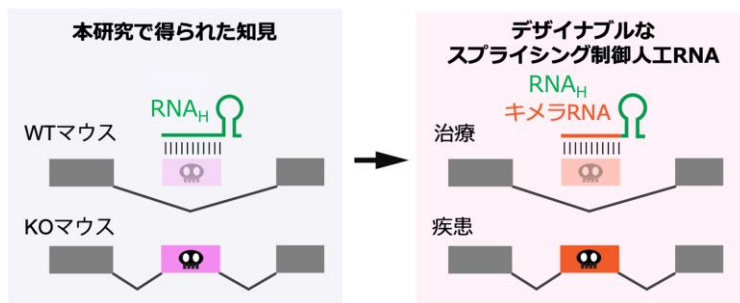


図4 RNA_Hのキメラ RNA は任意のエクソンをスキッピングさせる

内在の RNA_H は相補的な配列を持つ SINE B1 のアンチセンス配列由来の毒性エクソンをスキッピングさせている。RNA_H の標的認識配列を特定のエクソンのアンチセンス配列に入れ替えることで、任意のエクソンのスキッピングを誘導することができる。

の異常エクソンに起因する遺伝的疾患を大量に抱えている患者さんと言っても良く、進化の過程で獲得した天然の遺伝子治療である RNA_H によって、ピンピンしているわけです。RNA_H を利用したキメラ分子によるエクソンスキップ治療薬の開発はかなり見込みがあるのではないかと、大いに期待しているところです(図4)。

我々の発見は、進化的にも非常に興味深い洞察を与えてくれます。RNA_H を持っている種と、レトロトランスポゾン SINE B1 を大量に持っている種は完全に一致するのですが、この奇妙な一致をきれいに説明することが出来るのです。つまり、SINE B1 が遺伝子のイントロン方向にアンチセンス方向に挿入されると異常エクソンとして認識される可能性が高いので、SINE B1 の活動は、宿主ゲノムにとって非常に大きな脅威となります。従って、レトロトランスポゾン SINE B1 は他の種で出現したのかもしれませんが、それらが転移すると致死性な変異を生み出してしまうので、ゲノム中であまりコピー数を増やすことが出来なかったと考えられます。ところが、マウスやラットなどの小型げっ歯類の祖先は、進化の過程で RNA_H を獲得し、毒性エクソンの原因となる SINE B1 のアンチセンス挿入が無毒化されたはずで。そうすると他の種では猛毒であった SINE B1 のアンチセンス挿入が中立な変異となり、SINE B1 はゲノムの中を自由に飛び回ることが可能となったのでしょう。RNA_H は天然の遺伝子治療薬であるとともに、進化の解毒剤である、と言ってもよいのかもしれない。

原田先生とは個人的な面識はなく、私が RNA 研究業界に出入りするようになった頃にはすでに引退されていたこともあり、学会等でも全くお会いする機会がありませんでした。いつかご挨拶し

たいと常々思っていたのですが、2 年前にお亡くなりになられた RNA 研究分野の巨星、西村暹先生のお別れ会で、初めてお会いすることが出来ました。そこで原田先生が北大の薬学部のご出身だということをお伺いし、奇妙な縁に大変驚きました。振り返ってみれば、プローブの交差反応がきっかけで始まった RNA_H 研究は、北大への異動がきっかけとなって生まれた様々な先生方との出会いによって思いもなかった展開を見せ、最後に北大薬学部ご出身の原田先生との出会いを通してすべての伏線が回収された感があります。紡がれ続けた研究の糸の不思議に、見えない力の存在を感じるのは私だけでしょうか。私自身の研究人生はもう第四コーナーを回って最後の直線に入るところですが、この歳になってキャリアハイといっても良い面白い仕事に出会い、充実した時間を過ごしているのはまさに北大薬学部のおかげです。定年まであと 10 年余。様々な縁を大切にしながら、日々研究に励んでいきたいと思っています。



写真 右:原田先生 左:中川

参考文献

- 1) [加藤宣之, 芳香 *SCIENCE* 74-4\(2025\).](#)
- 2) F. Harada, and N. Kato, *Nucleic Acids Res* 8(6), 1273-1285(1980).
- 3) K. Ishida, et al. *Genes Cells* 20(11), 887-901(2015).
- 4) R. Yoshimoto, et al. *Mol Cell* 83(24): 4479-4493 e4476(2023).

同窓会 HP:2025 年 1 月 28 日公開