

領域略称名：非コード RNA 領域番号：3104
-----------------------------

平成26年度科学研究費補助金「新学術領域研究  
(研究領域提案型)」に係る事後評価報告書

「非コード RNA 作用マシナリー」

(領域設定期間)

平成21年度～平成25年度

平成26年 6月

領域代表者 (東京大学分子細胞生物学研究所・教授・泊 幸秀)

# 目 次

1. 研究領域の目的及び概要	2
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	4
3. 研究領域の設定目的の達成度	7
4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況	11
5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況	12
6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	14
7. 総括班評価者による評価	15
8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	17
9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開發表等）	21
10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度	27

## 1. 研究領域の目的及び概要（2ページ程度）

研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を発展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

### 【研究領域の目的】

近年の研究により、ヒトを含む高等真核生物には膨大な数の非コード RNA が存在しており、発生や老化、さらには行動や記憶など、生物の高次機能に深く関与していることが指摘されている。これらの非コード RNA は、ゲノムのエピジェネティックな修飾や、転写・翻訳、RNA の安定性など、遺伝子発現の様々な段階で重要な役割を果たしていることが明らかにされている。このような状況にもかかわらず、「非コード RNA がどのような分子メカニズムで働くのか」という動作原理に対する我々の理解は、驚くほど進んでいない。その大きな理由として、非コード RNA はそれ単独では機能せず、タンパク質をはじめとした複数の相互作用因子と「エフェクター複合体」を形成して初めて機能を発揮するにもかかわらず、これまでの研究が網羅的な非コード RNA の同定と細胞レベルでの機能解析を中心に展開されてきたことにある。

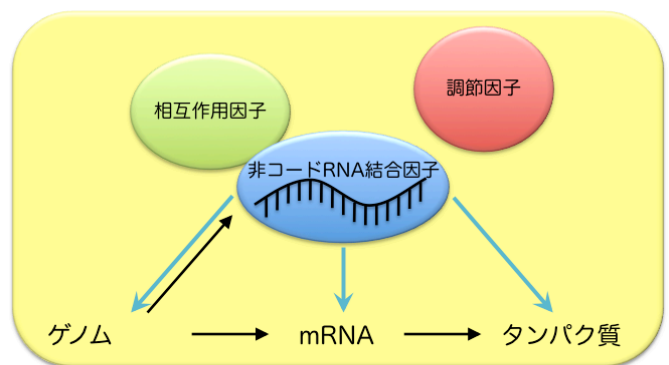
非コード RNA の役割を理解するためには、エフェクター複合体の構成因子やその関連因子を中心とした研究を、非コード RNA が関与する様々な局面・段階において展開することが必要不可欠である。本領域では、エフェクター複合体や関連因子の作用機序を総称して「非コード RNA 作用マシナリー」と名付け、その分子基盤および調節機構、さらには高次生命現象で果たす生理的役割の詳細な理解を通じて非コード RNA の動作原理を明らかにすることを目的とする。同時に、動作原理の確たる理解に立脚した医薬応用研究を有機連携的に推進する。

### 【研究領域の概要】

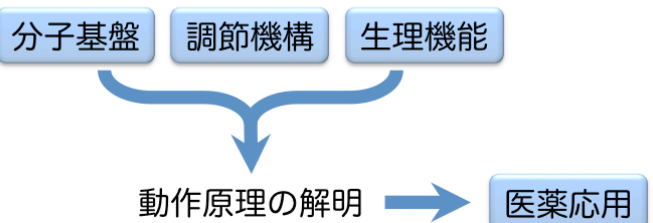
まず、領域発足当時の当該研究分野の学術的背景について、小分子 RNA、高分子非コード RNA の2つの側面から概説する。

長さ 20~30 塩基ほどの小分子 RNA については、多くの部分が共通の作用マシナリーを介して働くことが示唆されていた。例えば、RNA サイレンシング複合体 RISC 中に存在する Argonaute や、二本鎖 RNA 切断因子 Dicer などが、小分子非コード RNA 作用マシナリーの中核を担うタンパク群として同定され、それらの分子機能がよく知られるようになっていた。しかしながら、複合体が成熟するまでの素過程や複合体形成に必要な因子、標的遺伝子発現抑制の分子メカニズムなどの詳細は多くの段階で不明であった。例えば、Argonaute への小分子 RNA の取り込みは単純な分子同士の会合ではなく、ATP を必要とする能動的なプロセスであることが分かっていたものの、その分子的な実体は全く明らかとなっていなかった。また、小分子 RNA が標的遺伝子の発現を mRNA の分解や翻訳の抑制を通して制御する事は知られていたものの、作用マ

## 非コードRNA作用マシナリーの 統合的理解



### 非コードRNA作用マシナリー (非コードRNA結合因子や関連因子およびそれらの作用機序)



シナリーが具体的にどのような制御を受けているのか、また、小分子 RNA による遺伝子発現抑制がどのような生理的意義を持っているのかについては不明な点が多く残されていた。このように、作用マシナリーの動作原理の理解が遅れていたために、RNA 医薬開発等への応用に必須な基盤的な情報が大きく不足している状況にあった。

高分子非コード RNA は、長さが 200 塩基から数十万塩基にわたる転写産物の総称であり、領域発足当時、ヒトやマウス等の高等真核生物のゲノムからは、数千とも数万ともいわれる膨大な数の高分子非コード RNA が転写されている事がすでに明らかになっていた。しかしながら、これらゲノム解析により同定された高分子非コード RNA のほとんどは、生理的な機能的が不明な新規分子であり、以前より知られていた Xist や Kcnq1ot1 などエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる高分子非コード RNA についても、その長さや塩基配列には共通の特徴が見られず、個々の作用マシナリーも多様であると予想された。したがって、高分子非コード RNA 作用マシナリーの理解を進めるには、生理機能が分かっているものについて具体的な作用マシナリーの構成因子の同定とその動作原理の解明をすすめると同時に、個々の高分子非コード RNA の生理機能を詳細に解析し、その分子機能を予測することが必要不可欠であると考えられた。

本領域で推進する非コード RNA 研究は、近年急激に重要度の増した研究分野の一つである。これまでの生命現象の概念を覆すような新規性と、医薬応用への高い可能性と期待感から、世界的に最も競争の激しい分野であると言って過言ではない。一方で、医薬応用への基盤となるべき動作原理の解明は驚くほど進んでいない。その背景として、非コード RNA はそのエフェクター複合体こそが生体における機能単位であるにもかかわらず、従来は非コード RNA 分子の同定やその細胞レベルでの機能発現を中心とした研究に焦点がおかれ、個別の作用マシナリーの詳細な解析が行われてこなかったことが挙げられる。従って、作用マシナリーの分子基盤、その調節機構、高次生命現象における生理機能の解明、そして医薬応用という一連の研究は、同時並行的かつ有機連携的に進められることが極めて重要であり、それによって初めて、個々の研究にとどまらない相乗効果が期待される。そこで、本領域では、あえて複数の研究項目を設定せず、計画研究や公募研究を有機的に連携させることによって、非コード RNA の基盤研究から医薬応用に向けての理想的な「学術連鎖」を着実に推進することを戦略目標とした。なお、研究実施にあたっては、小分子 RNA・高分子非コード RNA の枠にとらわれず、手法やアイデアの共有を積極的に推進することで、非コード RNA 作用マシナリーの動作原理の本質的理解や医薬応用への貢献を目指した。

非コード RNA は高次生命現象において極めて重要な働きを果たしているにもかかわらず、その基盤となる動作原理の理解が遅れていたために、本領域発足当時の状況は、いわばブラックボックスの状態でも臨床等への応用を半ば強引に進めようとしている状態にあったと捉えることができる。本領域はそのブラックボックス的な状況を打開し、研究分野の方向性を積極的に牽引することで、我が国のみならず世界的な学術水準の向上を目指したものである。非コード RNA の作用マシナリーを明らかにし、その高次生命現象における役割を解明することは、これまでの生命現象の観念を根本的に変革するような生体システムの統合的理解に大きく貢献するものであり、また、非コード RNA 作用マシナリーの確たる理解に基づいた医薬への応用は、RNA 創薬の臨床段階で生じるであろう諸問題の突破口となると期待された。このように当時の研究状況に鑑みたとき、本領域研究が、我が国の学術水準の向上・強化につながる、新学術領域研究として推進するにふさわしい課題であったことは明白である。

## 2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、どのように研究組織間の連携や計画研究と公募研究の調和を図ってきたか、組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

本領域では、「新学術領域研究」という我が国独自の研究支援制度を最大限に活用し、非コード RNA の基盤研究から医薬応用に向けての理想的な「学術連鎖」を着実に推進することを戦略目標とした。したがって、あえて研究項目を設けず、小分子 RNA あるいは高分子非コード RNA 作用マシナリーの分子基盤、その調節機構、高次生命現象における非コード RNA の生理機能の解明、そして医薬応用という一連の計画研究を、同時並行的かつ有機連携的に進めてきた。領域運営にあたっては、計画研究で網羅できない研究課題を公募研究として幅広い学問分野から採択し、小分子 RNA・高分子非コード RNA の枠にとらわれず、領域会議やシンポジウムなど、あらゆる機会を通して、手法やアイデアの共有や研究の連携を強力に推進した。さらに、中間評価を受け、共著論文の出版費用を総括班で支出するなど、領域内の共同研究をさらに活発化するための積極的な支援活動を行った。その結果、以下の通り非常に多くの共同研究や研究連携が遂行され、現時点までに合計 15 報（領域外の研究者が責任著者の論文も含めると合計 20 報）の共著論文が発表された。



### 【共同研究・研究連携など】

泊幸秀(計)×和田猛(計): 光学活性ホスホロチオエートを含んだ小分子 RNA の作用機序に関する共同研究  
 泊幸秀(計)×勝間進(公): カイコを用いた piRNA 生合成経路についての共同研究  
 泊幸秀(計)×三嶋雄一郎(公): microRNA による翻訳抑制メカニズムに関する研究連携  
 泊幸秀(計)×三嶋雄一郎(公): 非コード RNA 作用マシナリーに関する英文総説の共同執筆  
 泊幸秀(計)×藤原俊伸(公): microRNA による翻訳抑制メカニズムに関する研究連携  
 泊幸秀(計)×多田隈尚史(公): RISC 形成過程・切断課程の 1 分子イメージングに関する共同研究  
 塩見美喜子(計)×中川真一(計): piRNA 前駆体の細胞内局在解析についての共同研究  
 塩見美喜子(計)×西増弘志(公): piRNA 生合成に関わる Zucchini スクレアーゼについての共同研究  
 塩見美喜子(計)×宮川さとみ(計): 生殖細胞における RNA サイレンシングに関する英文総説の共同執筆  
 鈴木健夫(計)×和田猛(計): 新規 RNA 修飾構造決定に関する共同研究  
 鈴木健夫(計)×荒木喜美(公): 遺伝子トラップマウスの作製・供給・解析ならびに共同研究  
 程久美子(計)×山下暁朗(計): アンチセンスオリゴ設計とそれを用いた mRNP 精製についての共同研究  
 程久美子(計)×秋光信佳(公): 非コード RNA 分解に関与する RNA 結合タンパク質探索についての共同研究  
 程久美子(計)×堀家慎一(公): ヒト転写因子群をターゲットにした siRNA ベクターの分与と共同研究  
 佐渡敬(計)×荒木喜美(公): SmcHD1 相互作用候補因子の機能欠損マウスの解析の共同研究  
 佐渡敬(計)×小林慎(公): Xist KO MEF 細胞及び Xist KO マウスを用いた共同研究  
 影山裕二(計)×中川真一(計): 長鎖非コード RNA に関する英文総説の共同執筆  
 中川真一(計)×鈴木健夫(計): Xist RNA の化学修飾に関する共同研究  
 中川真一(計)×佐渡敬(計): 核マトリクスタンパク質 hnRNP U の生理機能に関する共同研究  
 和田猛(計)×竹下文隆(計): ホスホロチオエートを含んだ小分子 RNA の in vivo 評価についての共同研究  
 三嶋雄一郎(公)×藤原俊伸(公): microRNA による翻訳抑制機構の解析についての共同研究  
 秋光信佳(公)×神武洋二郎(公): ANRIL の分解に関する研究連携  
 中山潤一(公)×Goto Derek(公): RNA とエピジェネティクスに関する英文総説の共同執筆  
 竹田秀(公)×松本高広(公): microRNA のマウス個体レベルでの解析に関する研究連携  
 多田隈尚史(公)×三嶋雄一郎(公): ゼブラフィッシュ初期胚における RNA 発現制御に関する研究連携  
 栗原由紀子(公)×秋光信佳(公): ノンコーディング RNA の RNA 免疫沈降に関する共同研究

## 【技術・試料・情報の提供や助言など】

泊幸秀(計)→三嶋雄一郎(公): miRNA による翻訳抑制機構についての情報提供・助言  
泊幸秀(計)→西増弘志(公): Cas9 と Argonaute の構造機能についての助言  
泊幸秀(計)→秋光信佳(公): NEAT1 の機能解析に関する助言  
泊幸秀(計)→浅原弘嗣(公): RNA 結合タンパクによる遺伝子発現制御に関する助言  
泊幸秀(計)→佐々木幸生(公): Pre-miRNA プロセッシングの試験管内アッセイ方法に関する助言  
塩見美喜子(計)→泊幸秀(計): 小分子 RNA 関連因子に対する特異抗体の提供  
塩見美喜子(計)→中澤敬信(計): miRNA の Northern 解析の技術提供  
塩見美喜子(計)→影山裕二(計): ショウジョウバエ培養細胞における遺伝子導入法の技術提供  
鈴木健夫(計)→小田健昭(計): LC/MS 解析を用いた RNA のヌクレオチド組成検証のための技術強力  
程久美子(計)→泊幸秀(計): ほ乳細胞における高効率な siRNA 設計に関する助言  
山下暁朗(計)→泊幸秀(計): 動物細胞超高発現ベクターとその発現技術提供  
山下暁朗(公)→泊幸秀(計画): RNA-タンパク質複合体精製に関する技術提供  
山下暁朗(計)→中川真一(計): 動物細胞超高発現ベクターとその発現技術提供  
山下暁朗(計)→藤原俊伸(公): 動物細胞超高発現ベクターとその発現技術提供  
山下暁朗(計)→程久美子(計): 動物細胞超高発現ベクターとその発現技術提供  
山下暁朗(計)→程久美子(計): 新規 FRT 発現ベクターと HeLa TetOn-FRT 安定発現系の技術提供  
山下暁朗(計)→程久美子(計): RNA 結合タンパク質ノックアウトマウス由来 MEF の single FRT 細胞樹立  
山下暁朗(計)→程久美子(計): TRBP 機能解析のためのノックアウト Flp-In 細胞作成技術の提供  
山下暁朗(計)→鈴木健夫(計): タンパク質の大量発現系技術の助言ならびに材料提供  
山下暁朗(計)→秋光信佳(公): UPF1 発現システムの提供  
山下暁朗(計)→浅原弘嗣(公): RNA 制御を解析するレポーターライブラリの有用性に関する助言  
佐渡敬(計)→浅原弘嗣(公): non-coding RNA の濃縮手法の開発に関する助言  
宮川さとみ(計)→塩見美喜子(計): piRNA 合成経路に関する助言  
宮川さとみ(計)→山下暁朗(計): ほ乳細胞における高効率なプラスミド設計組み換えに関する助言  
影山裕二(計)→鈴木健夫(計): LC/MS 分析に供する RNA の大量供与  
影山裕二(計)→三嶋雄一郎(公): 共焦点顕微鏡による解析技術提供  
中川真一(計)→佐渡敬(計): hnRNP U の機能解析および Xist RNA の輸送制御に関する助言と培養細胞の提供  
中川真一(計)→中澤敬信(計): miRNA の in situ hybridization の技術提供  
中川真一(計)→栗原由紀子(公): in situ hybridization 実験系の技術提供  
中川真一(計)→秋光信佳(公): RNA-FISH 法の技術提供および ncRNA 発現計や Neat1 研究材料の提供  
中川真一(計)→荒木喜美(公): lincRNA 研究進展状況の情報提供  
中川真一(計)→影山裕二(計): 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法に関する助言  
竹下文隆(計)→小田健昭(計): ヒトがん細胞の培養法に関する助言  
藤原俊伸(公)→泊幸秀(計): ショ糖密度勾配遠心によるポリソーム解析技術提供  
藤原俊伸(公)→小田健昭(計): poly(A)配列を含むプラスミド DNA の提供  
藤原俊伸(公)→浅原弘嗣(公): 5'UTR を介した制御機構についての助言  
勝間進(公)→塩見美喜子(計): カイコ卵巣由来細胞の提供  
秋光信佳(公)→竹下文隆(計): 核内長鎖非コード RNA の検出方法に関する助言  
秋光信佳(公)→本田知之(公): RNA ウイルス由来 ncRNA の安定性および局在情報の提供  
秋光信佳(公)→堀家慎一(公): インプリンティング関連 ncRNA の機能制御に関する助言  
秋光信佳(公)→栗原由紀子(公): マイクロアレイ解析についての技術提供  
浅原弘嗣(公)→竹下文隆(計): CRIPR/Cas9 法による長鎖非コード RNA の抑制に関する助言  
三嶋雄一郎(公)→Goto Derek(公): miRNA による抑制活性の可視化に関する助言  
堀家慎一(公)→秋光信佳(公): インプリンティングを受けるノンコーディング RNA に関する助言  
堀家慎一(公)→清澤秀孔(公): ゲノム刷り込み遺伝子座における染色体の核内配置に関する助言



### 3. 研究領域の設定目的の達成度（3ページ程度）

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとし、どの程度達成できたか、また、応募時に研究領域として設定した研究の対象に照らしての達成度合いについて、具体的に記載してください。必要に応じ、公募研究を含めた研究項目毎の状況も記述してください。

本領域では、非コードRNAとその相互作用因子からなる複合体（エフェクター複合体）や関連因子により構成される、非コードRNAとその作用機序を総称して「非コードRNA作用マシナリー」と名付け、その分子基盤および調節機構、さらには高次生命現象で果たす生理的役割の詳細な理解を通じて非コードRNAの動作原理を明らかにすることを目的とした。さらには、非コードRNA作用マシナリーの確たる理解に立脚した医薬応用に資するため、非コードRNAの新たな合成方法の開発と、モデル生物を用いた前臨床的研究の推進を目指した。

本研究領域では研究項目をあえて設けず、個別研究の有機的な連携を目指したが、非コードRNAの作用原理を理解するための基盤としては、「非コードRNA作用マシナリーの分子基盤」「非コードRNA作用マシナリーの調節機構」「非コードRNAの生理機能」「非コードRNAの医薬応用」の4つの要素が挙げられる。以下にそれぞれの研究目的の詳細と達成度を記す。

#### 【非コードRNA作用マシナリーの分子基盤】

##### 目的

すべての小分子RNA作用マシナリーの核心を成すArgonauteタンパク質について、AGOサブファミリーの果たす多機能的な役割に必要な機能ドメインを同定し、その作用機構を明らかにするとともに、理解の遅れているPIWIサブファミリーについて、piRNAの生合成過程における機能を解析することにより、小分子RNA作用マシナリーに共通する動作原理を解明する。また、Xistなどの高分子非コードRNA作用マシナリーの構成因子の同定や構造情報の解析を進めることにより、高分子非コードRNA作用マシナリーの分子実体を明らかにする。

##### 達成度

領域代表である泊らにより、Argonauteタンパク質のサブファミリーであるAGOタンパク質において、小分子RNA二重鎖の一本鎖化に関与するNドメインが同定され（*Nat Struct Mol Biol.* 2012）、Nドメインによる小分子RNAの一本鎖化の反応においてATPは必要でないこと、ATPを必要とする反応過程は二重鎖小分子RNAとAGOサブファミリーの会合反応であることが明らかにされた（*Nat Struct Mol Biol.* 2009, 2010）。泊らは、これらの研究成果をもとに、二重鎖小分子RNAの解離に関して“ラバーバンドモデル”を提唱し、小分子RNA作用マシナリーにおけるエフェクター複合体の成熟過程をよく説明するものとして受け入れられている（図1）。さらには、小分子RNAの構造的特徴が、これらの反応過程においてどのような影響をあたえるかについて詳細に解析することにより、これまで一見ランダムに見えていた天然miRNAの構造的特徴を包括的に説明することが可能となった（*Nat Struct Mol Biol.* 2009, 2010; *EMBO Rep.* 2011; *EMBO Rep.* 2013）。また、塩見らは、ショウジョウバエの変異系統やカイコの生殖系列培養細胞を用いた生化学的解析により、RNA結合タンパク質であるYbがpiRNAの生合成の場を形成する際に重要であること（*Gene. Dev.* 2010; *Cell Reports*, 印刷中）、PIWIサブファミリーによるpiRNAの生合成過程においてVasaタンパク質が決定的な役割を果たしていること（投稿準備中）を示した。鈴木らは、核内非コードRNAであるXistの構造解析を行い、Xistの5'末端が、mRNAに見られる通常のキャップ構造（m<sup>7</sup>G-ppp-Nm-Nm-N...）とは異なる、特殊な修飾

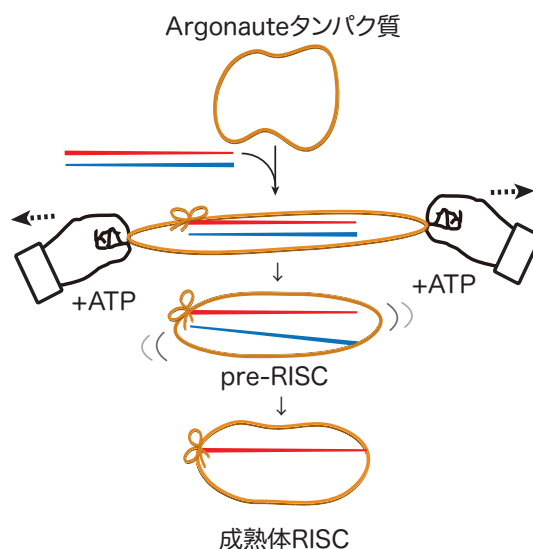


図1. 小分子RNAの一本鎖化における“ラバーバンド”モデル



を受けていることを明らかにし高分子非コードRNAとmRNAとの化学的性質の違いを示唆する重要な知見を得た(投稿準備中)。公募研究では、勝間と泊による共同研究により、カイコのpiRNA合成に関する研究 (*Mol. Cell* 2011) が展開され、その後の勝間らによるカイコ性決定におけるpiRNAの役割の解明 (*Nature* 2014) に結びついた。また、公募研究では、西増らは塩見らと共同で、piRNAの生合成に必要とされるZucchiniタンパク質の結晶構造解析を行い、Zucchiniタンパク質が一本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼであることを見出した。また、生化学的・細胞生物学的な解析により、Zucchiniタンパク質が実際にpiRNAの産生に直接関与していることを明らかにした (*Nature* 2012)。

これらの研究は、小分子作用マシナリーの核となるRISC複合体について、その会合反応の素過程や動作原理をつまびらかにすることを可能にし、一方で高分子非コードRNAの構造についてその方法論を提供し、非コードRNA作用マシナリーの理解に必要不可欠なRNAの構造についての貴重な知見をもたらすものであり、当初の目的を上回る成果を挙げることが出来た。

### 【非コードRNA作用マシナリーの調節機構】

#### 目的

種々の小分子RNAが標的分子に作用する際には、相互作用する複合体や標的配列近傍のコンテキストの違いにより、その活性に大きな影響を受けると考えられる。本研究領域では、RNA結合タンパク質によるmRNAの認識と小分子RNAによる発現制御との相関を詳細に解析し、RNA結合タンパク質による小分子RNA作用マシナリーの調節機構を明らかにする。また、代表的な高分子非コードRNAであるXistと相互作用するタンパク質複合体を同定し、Xist RNA作用マシナリーに含まれるタンパク質が、Xistの機能に及ぼす影響を、ノックアウトマウスの作製を含む遺伝学的な手法を用いて評価することにより、Xist RNA作用マシナリーの調節機構を明らかにする。

#### 達成度

程らは、2本鎖RNA結合タンパク質であるTar RNA binding protein (TRBP)がsiRNAと強く相互作用しており (*PLoS ONE*, 2013)、siRNAのRISCへの取り込みに関与していることを示した (*Nucleic Acid Res.* 2014)。また、RISCに含まれるTNRC6Aには核移行シグナルと核外移行シグナルの両方が存在しており、これらの複合体は核と細胞質をシャトルして核内でも機能を発揮している可能性を明らかにした(Nishi et al., *RNA* 2013)。小田らは、RNA結合タンパク質D8が、DNA損傷時に誘導されるアポトーシス促進因子であること、アポトーシス誘導因子Bim mRNAの3' UTRに結合して2次構造の変化を惹起し、miRNAのmRNAに対する結合を阻害していることを明らかにした(論文未発表)(図2)。また、D8を欠損したマウスの解析から、IL-33 mRNAについても同様のmiRNAを介した制御に関与していることが示唆されている(論文未発表)。佐渡らは、Xistの機能欠損系統であるXist<sup>Δ5</sup>を作成し、この変異がX染色体のヘテロクロマチン状態の維持のみに影響する特異な例であり、巨大栄養細胞の著しい減少を示すことを示した (*Development*, 2011)。また、クロマチン結合タンパク質であるHmcHD1の欠損マウスが、Xist<sup>Δ5</sup>と同様に、ヘテロクロマチン状態の維持および巨大栄養細胞の減少に特異的な表現型を示すことを明らかにした(未発表)。公募研究では、中山らにより、分裂酵母のテロメアのヘテロクロマチン化に関与するクロモドメインタンパク質Chp1がRNAと結合し、このRNA結合活性がChp1のヘテロクロマチン化における機能に必須であることを明らかにした。また、Chp1のRNA結合活性は、メチル化H3ヒストンへの結合により増強されることを示した (*Mol Cell* 2012)。

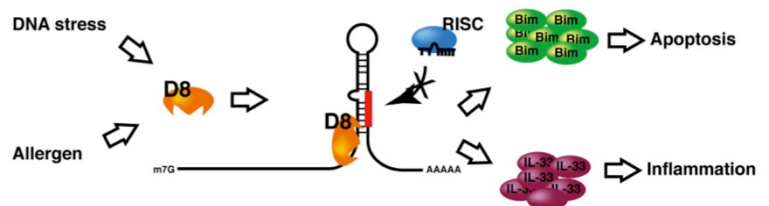


図2. RNA結合タンパク質D8によるmiRNA作用マシナリーの調節

これらの研究成果は、非コード作用マシナリーにおけるRNA結合タンパク質やクロマチン結合タンパク質の機能を明らかにし、タンパク質因子による個々の非コードRNA作用マシナリーの調節機構の解明という当初の設定目的を達成するに十分なものである。

## 【非コード RNA の生理機能】

### 目的

非コード RNA 作用マシナリーの高次生命現象における役割を理解するためには、個々の生命現象における非コード RNA の機能を、モデル系を用いることによって詳細に解析し、あらかじめ作用マシナリーの分子機能を予測することが不可欠である。本領域研究では、発生・分化あるいは行動・記憶といった高次生命現象に着目し、それら過程に参与する非コード RNA の同定と機能解析を行うことで、個々の非コード RNA の生理機能を明らかにする。さらには、それぞれの非コード RNA と相互作用する因子を同定し、生化学的解析を推し進めることにより、非コード作用マシナリーを構成する各要素の全容を解明する。

### 達成度

影山らは、ショウジョウバエの高分子非コード RNA である Lobe-less RNA が、行動記憶中枢であるキノコ体において、軸索走行制御遺伝子の発現制御を介して神経回路形成を支配していることを示した（未発表）。また、従来非コード RNA と考えられていた高分子非コード RNA の中には小さなペプチドをコードしているものが存在し、実際にそれらのペプチドが遺伝子発現制御を介して上皮細胞の形態形成に決定的な役割を果たしていることを示した（*Science*, 2010）。中川は、Xist RNA の不活性 X 染色体への局在化には hnRNP U が必須であり、その局在化には hnRNP U にある RNA 結合ドメインとクロマチン結合ドメインの両方が必要であることを示した（*Dev. Cell*, 2010）（図 3）。一方、宮川らは、ノックマウスの解析から、piRNA の生合成とレトロトランスポソンの抑制には、DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼである MVH が必須であることを明らかにした（*Genes Dev.* 2010）。また、中澤らは、初代分散培養神経細胞の形態変化に連動した発現変動を示す miRNA や、薬物依存の中枢である線条体に発現し、コカイン感受性に必須の miRNA を複数個同定している（投稿中）。公募研究では、蓮輪らにより、マウス miR-200b および miR-429 が、転写抑制因子である ZEB1 の脳下垂体における発現抑制を介して、黄体形成ホルモンの発現を活性化していることが明らかにされ（*Science*, 2013）、生殖内分泌系における miRNA の生物学的意義が初めて明示された（図 4）。

非コード RNA の生理的機能については、非コード RNA の生物学的意義に対する高い期待に裏打ちされた精力的な研究が多数展開され、当初の目的以上に高い成果を得ることができた。

## 【非コード RNA の医薬応用】

### 目的

非コード RNA 作用マシナリーの確たる理解に立脚し、非コード RNA の医薬応用を目指した基礎的研究を、有機連携的に推進する。非コード RNA の実用的な医薬応用に必要とされる、ヌクレアーゼ耐性で非コード RNA 作用マシナリー関連分子と選択的に相互作用する核酸誘導体の候補として、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つを硫黄原子に置換し、ヌクレアーゼ耐性を高めたホスホロチオエート RNA がある。本研究領域では、光学異性体を含めたホスホロチオエート RNA の不斉化学合成法の確立と、ホスホロチオエート化が非コード RNA の生理活性に及ぼす効果の詳細を明らかにする。また、癌転移モデル動物および siRNA/miRNA のデリバリーシステム、in vivo イメージング技術等を駆使した前臨床的解析により、ホスホロ

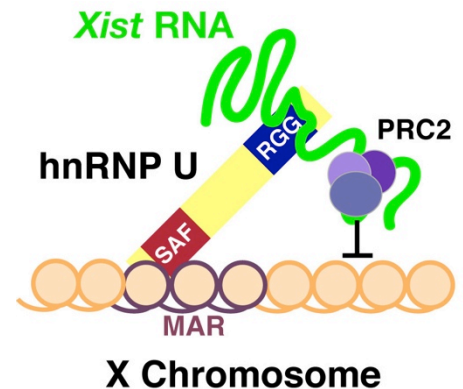


図 3. Xist 作用マシナリーにおける hnRNP U の役割

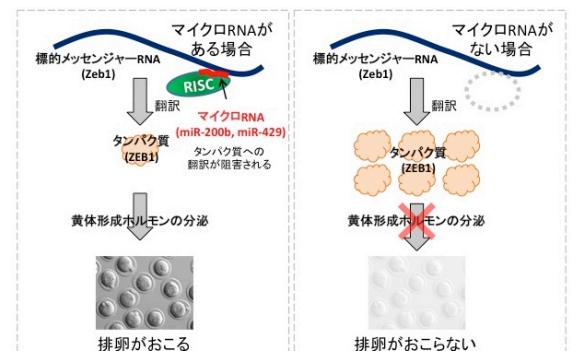


図 4. 生殖内分泌系における miR-200b および miR-429 の機能

チオエート RNA 等の核酸誘導体を含む RNA 医薬の有効性、安全性を検討する。

## 達成度

和田らは、リン原子の立体が厳密に制御されたホスホロチオエート RNA を高収率かつ立体選択的に合成することに世界に先駆けて成功し、光学活性ホスホロチオエート RNA と相補的な塩基配列を有する RNA との二本鎖形成能を解析することにより、リン原子の絶対立体配置が RNA 二本鎖の熱力学的安定性に及ぼす効果を明らかにした (*Chem. Soc. Rev.* 2011, *J. Org. Chem.* 2012、特許出願：WO/2011/108682)。また、エトキシメチル基により 2'-水酸基を修飾した RNA は、天然型の RNA と比較して、顕著に二本鎖の熱力学的安定性が向上することを明らかにした (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011、特許出願：WO2012/073857)。さらには、二本鎖 RNA に特異的に結合し、生体内での安定性を向上させ、RNA 医薬のデリバリーに有用な新規人工オリゴ糖の合成に成功した (*J. Org. Chem.* 2012、特許登録：US/8288527)。竹下らは、がんモデルマウスや生体イメージングを用い、前立腺がんの骨転移 (Takeshita *et al.*, *Methods in Mol. Biol.* 2009, Takeshita *et al.*, *Mol. Ther.* 2010)、乳がんのリンパ節転移 (Takeshita *et al.*, *Methods in Mol. Biol.* 2012)、肺転移性膀胱がん (Uchino *et al.*, *Mol. Ther.* 2013) において、がんの増殖・転移抑制効果を指標とした siRNA/miRNA の前臨床試験の評価系を構築した。また、上記評価系にホスホロチオエート siRNA を投与し、生体内における siRNA の動態・安定性を検討することにより、原発巣における抑制効果の向上や血中滞留時間の延長など、医薬応用に有用な特徴を持つことを示した (Fujita *et al.*, *Sci. Rep.* 2013)。

これらの研究成果は、DNA で確立された手法を改良することにより、ホスホロチオエート RNA の不斉合成を工業化する上で欠かせない知見であり、核酸医療のより現実的な回答の一つを示すものである。また、合成された核酸医薬の具体的な評価法の開発は、小分子 RNA のみならず高分子 RNA の核酸医薬への道筋をつけるものであり、設定目的である医薬応用を目指した基礎的研究の推進について、計画通りの成果が得られた。

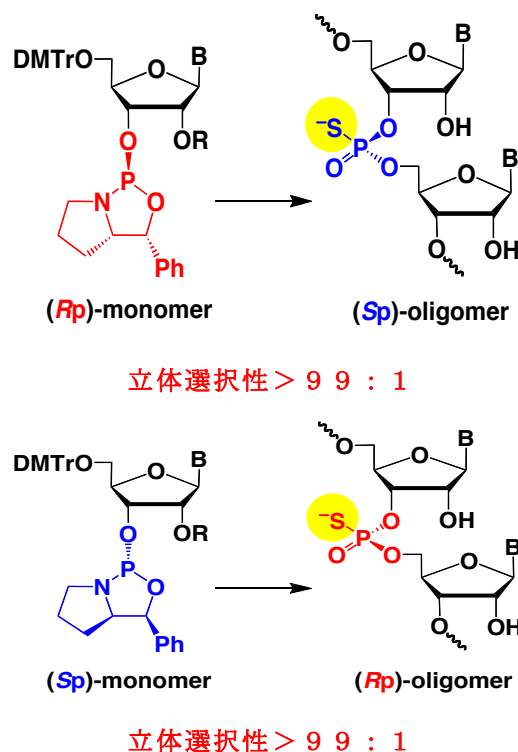


図5. オキサザホスホリジン誘導体を用いた、ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

#### 4. 研究領域の研究推進時の問題点と当時の対応状況（1ページ程度）

研究推進時に問題が生じた場合には、その問題点とそれを解決するために講じた対応策等について具体的に記述してください。また、組織変更を行った場合は、変更による効果についても記述してください。

##### 【計画班】

**問題点:** 程らによる研究課題「小分子 RNA 作用マシナリーの調節機構」は、領域発足時の研究分担者（東大・西村）が平成 22 年度限りで退職したことから、研究組織の早急な立て直しが必要であった。

**対応策:** 直ちに研究分担者の選定を行い、平成 23 年度より、西村が行っていた RNA 結合タンパク質である D8 による miRNA の標的抑制作用の調節機構に関する当該研究を継続して行う小田と、小分子 RNA 作用マシナリーの調節機構の解析に重要な RNP 複合体解析に実績のある山下の 2 人の研究分担者が加わった。

**効果:** 小田の参加によって D8 に関する研究が切れ間無くスムーズに継続されたと同時に、山下の参加によって、RNP 複合体解析手法や動物細胞におけるタンパク質高発現システム、さらには ncRNA 研究を効率化させる細胞株の樹立法など、多くの優れた技術が領域にもたらされ、班員の間で広く共有された（「2. 研究組織と各研究項目の連携状況」の項を参照）。したがって、結果的には、当初の計画以上に非コード作用 RNA マシナリーの調節機構に関する研究が推進された。

##### 【公募班】

**問題点:** 当初、前半期(平成 22～23 年度)の公募研究課題として採択され、22 年度は領域研究に参画したにもかかわらず、やむを得ない事情により 23 年度の実施を辞退したものが 3 件ある。竹田は、日本学術振興会の最先端・次世代研究開発支援プログラムへの参加に伴い、23 年度より本領域への参加を辞退した。また、西増は、所属の変更に伴う科研費応募資格の変更により、所属部局内の内規に従って 23 年度より本領域への参加を辞退せざるを得なくなった。さらに、中山は、計画研究代表者を務める新学術領域研究「非コード DNA」が 23 年度に発足したことに伴う科研費の重複制限により、23 年度の本領域への参加を辞退した。

**対応策:** 公募研究辞退後も「班友」という形で領域会議や関連シンポジウムなどに参加してもらうこととした。

**効果:** 本領域の構成員との積極的な連携を維持することにより、共著論文も含めた成果発表につながった。

**問題点:** 中間評価の際に、「領域内での共同研究は活発に行われていることは評価できるものの、計画班員、公募班員とも、その多くが動物（特にほ乳類）の非コード RNA の生化学、分子遺伝学研究で主な業績をあげてきた研究者であり、異分野連携の要素は小さい」との指摘があった。

**対応策:** 後半期(平成 24～25 年度)の公募研究では、一分子イメージングや核酸化学合成などの幅広い研究分野、さらにはウイルス、分裂酵母、ゼブラフィッシュなど広範囲な生物種をカバーするような研究提案を積極的に採択し、公募班員の編成を大きく変更した。また、植物、線虫、鱗翅目昆虫などを専門とする前半期公募班員との交流も継続した。

**効果:** 計画班員、公募班員の中で分野を超えた広範囲の情報交換や連携が生まれ、重厚な領域研究につながった。

##### 【総括班】

**問題点:** 発足当初から領域内での共同研究や有機的連携を進めていたものの、その成果は、領域の前半には、論文などの目に見える形としては必ずしも顕在化していなかった。その結果、中間評価では、個別には着実な研究の進展が見られる一方で、領域内でのバックグラウンドの異なる研究者間の連携や共同研究、さらにはそれによって生み出される研究成果や新しい展開は、これまでのところ限定的なものにとどまっているという指摘があった。

**対応策:** 中間評価での指摘を踏まえ、研究者間の交流を積極的に継続すると同時に、共著論文の出版費用を総括班から支出するなど、領域内の連携をさらに活発化するための積極的な支援活動を行った。

**効果:** 「2. 研究組織と各研究項目の連携状況」の項にあるとおり、非常に多くの共同研究や研究連携が遂行され、現時点までに合計 15 報（領域外の研究者が責任著者の論文も含めると合計 20 報）の共著論文が発表されるなど、連携支援の効果が目に見える形で現れている。

## 5. 研究計画に参画した若手研究者の成長の状況（1ページ程度）

研究領域内での若手研究者育成の取組及び参画した若手研究者の研究終了後の動向等を記述してください。

非コード RNA 研究の次世代を担う研究者を育成すべく、若手主催の勉強会「RNA フロンティアミーティング」を毎年後援した。さらに、Keystone Symposia や Cold Spring Harbor Laboratory Meeting など、重要な国際学会で口頭・ポスター発表を行う学生やポスドクの旅費支援も積極的に行った。特に、後述するカナダでの国際ミーティング RiboClub 2013 の共催にあたっては、学生・ポスドク 15 名を総括班予算から派遣して口頭・ポスター発表を行い、出席者から高い評価を得た。旅費支援を受けた若手研究者には、公式ブログ「ncRNA+blog」にミーティングレポートを寄稿してもらい、情報の共有と発信を行った。また、領域会議においては、遠方からの学生の旅費をサポートするとともに、学生やポスドクによるポスターセッションの時間を設け、最新のデータに基づく闊達な議論を行った。

また公募研究の採択に際しては、公募要項にも「若手研究者による積極的な提案を歓迎する」との旨を明記し、幅広い分野の若手研究者を積極的に採用した。結果として、計画研究のみならず、公募研究も含めた様々な研究連携を通して、優れた研究成果が多数生み出された。

さらに、以下の通り、班員のみならず領域研究に参画した学生等が多くの賞を受賞し、研究期間内にプロモーションされた班員も 17 名に上った。

### 【班員の受賞】

泊 幸秀 (計)	2012 年 2 月	日本学士院学術奨励賞
	2012 年 2 月	日本学術振興会賞
	2011 年 4 月	和歌山県文化奨励賞
	2010 年 4 月	科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
中澤 敬信 (計)	2014 年 5 月	大阪大学総長奨励賞
西増 弘志 (公)	2014 年 4 月	科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
	2012 年 6 月	日本蛋白質科学会 若手奨励賞
竹田 秀 (公)	2012 年 7 月	日本骨代謝学会学術賞
	2011 年 2 月	日本学術振興会賞
浅原 弘嗣 (公)	2012 年 4 月	ノバルティス・リウマチ医学賞
萩原 伸也 (公)	2012 年 10 月	ITbM Research Award

### 【領域研究に参画した学生等の受賞】(主なものを抜粋)

深谷 雄志 (泊)	2014 年 2 月	日本学術振興会 育志賞
	2014 年 3 月	東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 Excellent Research Award
	2013 年 8 月	日本 RNA 学会 青葉賞
長谷川 優子 (中川)	2012 年 1 月	日本学術振興会 育志賞
Pieter Bas Kwak (泊)	2012 年 3 月	東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 Excellent Research Award
岩崎 信太郎 (泊)	2013 年 12 月	井上研究奨励賞
石津 大嗣 (塩見)	2012 年 7 月	日本 RNA 学会 青葉賞
中村 奈月 (影山)	2013 年 9 月	RNA フロンティアミーティング ベストプレゼンテーション賞
成瀬 健 (泊)	2013 年 3 月	東京大学大学院新領域創成科学研究科 研究科長賞
依田 真由子 (泊)	2010 年 8 月	ロレアル・ユネスコ女性科学者賞 日本奨励賞

酒田 祐佳 (佐渡)	2011年9月	日本遺伝学会 Best Paper 賞
今町 直登 (秋光)	2014年5月 2014年5月	東京大学 生命科学シンポジウム 優秀ポスター賞 船越龍・鶴代賞
水谷 玲菜 (秋光)	2014年5月 2011年7月	船越龍・鶴代賞 日本アイソトープ協会セミナー ベストプレゼンテーション賞
秋月 源 (秋光)	2013年7月	日本アイソトープ協会セミナー ベストプレゼンテーション賞
越智 晴香 (秋光)	2012年9月	RNA フロンティアミーティング ベストプレゼンテーション賞
河岡 慎平 (勝間)	2012年3月	東京大学大学院農学生命科学研究科 研究科長賞
庄司 佳祐 (勝間)	2014年3月	東京大学大学院農学生命科学研究科 研究科長賞

### 【班員の昇進】

泊 幸秀 (計)	東京大学分子細胞生物学研究所・講師 → 同・教授
塩見 美喜子 (計)	慶應義塾大学医学部・准教授 → 東京大学大学院理学系研究科・教授
中澤 敬信 (計)	東京大学医科学研究所・助教 → 大阪大学大学院薬学研究科・特任准教授
宮川 さとみ (計)	JST さきがけ研究員 → 大阪大学大学院医学系研究科・特任講師
鈴木 健夫 (計)	東京大学大学院工学系研究科・助教 → 同・講師
佐渡 敬 (計)	九州大学生体防御医学研究所・准教授 → 近畿大学農学部バイオサイエンス学科・教授
影山 裕二 (計)	岡崎総合バイオサイエンスセンター・特任助教 → 神戸大学遺伝子実験センター・准教授
和田 猛 (計)	東京大学新領域創成科学研究科・准教授 → 東京理科大学薬学部生命創薬科学科・教授
秋光 信佳 (公)	東京大学アイソトープ総合センター・准教授 → 同・教授
堀家 慎一 (公)	金沢大学フロンティアサイエンス機構・特任助教 → 同学際科学実験センター・准教授
神武 洋二郎 (公)	浜松医科大学医学部・助教 → 近畿大学産業理工学部生物環境化学科・准教授
三嶋 雄一郎 (公)	神戸大学理学研究科・学術研究員 → 東京大学分子細胞生物学研究所・助教
藤原 俊伸 (公)	神戸大学自然科学系・特命准教授 → 名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授
竹田 秀 (公)	慶應義塾大学医学部・准教授 → 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授
中山 潤一 (公)	理化学研究所神戸研究所・発生再生総合科学センター・チームリーダー → 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科・准教授
萩原 伸也 (公)	東北大学多元物質科学研究所・助教 → 名古屋大学 WPI-ITbM・特任准教授
荒木 喜美 (公)	熊本大学生命資源研究支援センター・准教授 → 同・教授

## 6. 研究経費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

### 【共有設備】

本領域では、総括班として管理を行う共有機器等は設置しなかったが、鈴木の高感度質量分析装置や、程の siRNA ライブラリ、山下の動物細胞タンパク質高発現ベクターや RNA-タンパク質複合体精製技術など、各班員が所有する実験設備やリソースが領域内で広く活用され、多くの成果につながった。

### 【情報発信】

総括班では、「実験医学」や「細胞工学」などの比較的専門性の高い和文雑誌の特集を企画するだけでなく、一般向けの科学雑誌「ニュートン」の特集「生命の影の司令塔 RNA」や、ニュートン別冊「人体は「なに」で作られているのか」の監修、さらには中高生向けの講演会の開催など、非コード RNA に関する情報を、国民に広く分かりやすく発信することを心がけた。

また、領域のニュースレターについては、印刷物を発行して国内機関に送付する代わりに、インターネット上で公式ブログ「ncRNA+blog」(<http://blog.ncrna.jp/>) を開設して頻繁に更新を行うことにより、日本語での情報発信に係る経費をほぼ 0 円に抑えた。日々の雑感から、論文紹介やミーティングレポート、留学のすすめやバイオインフォマティクスの技術指針に至るまで、5 年間で合計 267 個の記事を発信し、そのページビュー(閲覧数)は合計 174,407 に上った(2014 年 5 月時点)。また、日本国内に留まらず、アメリカ(20,864 ページビュー)、ドイツ(2,742 ページビュー)、イギリス(1,024 ページビュー)、以下、スイス、オーストラリア、フランスなどからも多く閲覧された。これらの中には、留学中のポストドクなどを含め、海外で研究活動を行う日本人も多く含まれていたと推測され、次世代を担う若手研究者に対する情報発信が効果的に行われたと考えられる。



このように、本領域では、ニュースレターのブログ化による経費の効率化を行う一方で、英語での情報発信にも力を注いだ。班員によって、非コード RNA に関連する数多くの英文総説やプロトコルブックが出版され、本領域の研究成果や当該学問領域の将来展望などについて、世界に向かって情報発信が行われた。例えば、領域代表の泊らが 2010 年 7 月に *Trends Biochem Sci.* 誌に発表した“Making RISC”は、当該分野における新概念を提唱した重要な総説として、これまでに 100 報以上の論文に引用されている。また、班員の共著による総説の出版費用は総括班から支出された。

### 【国際シンポジウムの開催】

総括班では、世界的に著名な研究者に加え、*Molecular Cell* や *EMBO Journal* 等学術雑誌のエディターを交えた国際シンポジウムやワークショップを多数主催・共催し、未発表のデータを元に闊達な議論を行った。海外から招聘した研究者からは「Cold Spring Harbor Laboratory Meeting よりもエキサイティングだ」との感想をいただくなど、大きな成功を収めた。また、国際シンポジウム開催に際しては、理研 CDB のオーディトリウムや東京大学の弥生講堂など、班員の所属機関の会議設備を最大限活用することにより、会場費を効果的に抑制した。

また、カナダの RNA 研究者が中心となり、毎年ケベック州で開催されている国際学会“RiboClub”については、本新学術領域研究とぜひともパートナーシップを結びたいという主催者側からの申し出があり、2013 年のミーティング(RiboClub 2013)を共催する運びとなった。RiboClub 2013 には、本領域の班員のみならず、班員の研究室に所属する学生やポストドクも多数参加し、口頭およびポスター発表を行った。RiboClub 2013 には世界中から参加者が集まったが、日本の非コード RNA 研究のレベルの高さと、本領域から参加した学生・ポストドクの研究発表の質の高さを賞賛する声が多数寄せられた。

以上の様に、本領域では、限られた総括班予算を効果的に活用するための様々な工夫を行うことにより、大きな成果につながった。

## 7. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

以下の総括班評価者からは、機会のあるごとに領域の運営に関する貴重な助言や、個々の研究についての批判的かつ建設的な意見をいただいた。

永田 恭介	筑波大学 学長
松藤 千弥	東京慈恵会医科大学 学長
岡野 栄之	慶應義塾大学医学部 教授
仲野 徹	大阪大学大学院医学系研究科 教授
阿形 清和	京都大学大学院理学研究科 教授

本領域終了後の平成26年6月上旬に、本領域の研究成果等の資料を上記評価者に送付し、事後評価をお願いした結果を以下にまとめる。

### 【総合所見】

A+：研究領域の設定目的に照らして、期待以上の成果があった 4名（永田・松藤・岡野・阿形）

A：研究領域の設定目的に照らして、期待どおりの成果があった 1名（仲野）

A-：研究領域の設定目的に照らして、概ね期待どおりの成果があったが、一部に遅れが認められた 0名

B：研究領域の設定目的に照らして、十分ではなかったが一応の成果があった 0名

C：十分な成果があったとは言い難い 0名

### 【研究領域の設定目的の達成度】

- 小分子RNAと高分子非コードRNAに分けて論じる。小分子RNAに関して本領域で設定した目的は、本領域の実施期間中、世界的に見てかなり達成された。その中で本領域が果たした役割は非常に大きく、かつ解明すべき各課題で重要な貢献がなされたと言える。高分子非コードRNAに関しては、網羅的というより個別の事例に関する研究が行われ、包括的な作動原理の解明には至らなかったものの、生理機能や病態との関連において重要な発見がなされた。生命科学全体へのインパクトは小分子RNAにおける成果が大きいため、総合的には期待以上の達成度があったと判断する。（松藤）
- 領域内では、領域全体の目標設定にしたがって、RNAマシナリーの「分子基盤」、「調節機構」、「生理機能」、「医薬応用」に関する研究を個々に先鋭的にすすめながら、領域内の有機的な連携も活用して計画を推進し、計画全体の研究は高いレベルの成果を上げながら順調に進められた。中間評価時点で若干の遅れも見受けられた医薬応用に関連する研究でも、創薬に直接繋がらないまでも、一定の基盤研究は遂行された。（永田）
- 急速に脚光を浴びつつあった非コードRNAを領域とする、時宜にかなった設定目標であった。領域が運営された5年の間に、当該領域は爆発的に進展したが、その世界の流れに遅れることなく、若手研究者を中心に非常に活発な研究が展開された。全体として、当初の目的は十分に達成された。（仲野）
- 本新学術領域「非コードRNA作用マシナリー」では、非コードRNAの研究者の精鋭が一堂に会して、非コードRNAの作用原理の究明という基礎的な所から医薬応用に向けての学術連鎖を実現した。（岡野）
- 日本のRNA研究は、ハイレベルかつ信頼度の高い生化学的な技術をベースとして世界的な評価を得ているが、本班はそれらのメンバーをコアとして形成され、non-coding RNA(ncRNA)そのものを研究のターゲットとしたものではなく、その複合体について生化学的手法を用いて正攻法で攻めている。（阿形）

### 【研究成果】

- 質・量とも極めて高いレベルである。原著論文だけでなく、波及効果の大きい総説、プロトコールも多数含まれている。また特許などの産業財産権もバランス良く得られている。（松藤）
- 領域代表の泊、計画研究者の塩見、宮川、影山、中川ら、公募研究の勝間、中山、蓮輪ら、が、非コードRNAの産生機構や作用機序において重要な発見をおこない、一流誌にその研究内容を報告するなど、極めて順調に進んだ。非コードRNAの医薬応用の研究がやや遅れ気味ではないか、また研究進捗状況に班員間で大きな違いがあり一部の班員には十分な進捗が認められなかったのではないかと、という印象はあるものの、全体としては、十分な業績であった。（仲野）
- 「分子基盤」研究項目では、極めて順調に研究が進展し、RISC複合体の機能原理を明らかにした。論文発表も申し分ない。「調節機構」研究項目は、RNA結合タンパク質やクロマチン結合タンパク質によるRNAマシナリーの調節機構の解明に貢献した。「生理機能」および「医薬応用」研究項目でも設定目的



をほぼ達成できる成果をあげている。(永田)

- 小分子 RNA の複合体の研究については本班によって世界のトップレベルの研究が展開されたことは大きな成果として高く評価している。高分子非コード RNA の複合体についても、小分子 RNA レベルの研究まで底上げできればもっと良かったと思われるが、5年の期間内で完了できるほど簡単な課題ではないので、引き続き今後の課題として扱うことでさらなる飛躍を期待したい。また、創薬への展開についても、5年の期間内でまとめるという課題というよりも継続的に取り組む課題と認識している。(阿形)
- 313 報もの非常に数多くのインパクトの高い論文が発表し、多くの領域内の共同研究や連携が生まれ、これまでに合計 15 報(責任著者が領域外のものも含めると 20 報)の共著論文が出版されている。領域ホームページ・ブログによる情報発信、国際・国内シンポジウムセミナーや市民公開講座の開催なども活発に行っており、領域としての活動成果は高く評価できる。(岡野)

#### 【研究組織】

- あえて複数の研究項目を立てず、同時並行的・有機的な連携を進める試みが実を結び、研究期間の後半から加速度的に研究者間の連携による成果が生み出された。また、ブレークスルーというレベルには至らなかったものの、本領域をきっかけとして、生物学者と化学者の共同研究や連携が進んだことは評価される。(松藤)
- 若い領域代表者であったが、班員間の交流と国際進出を促進するよう、良く班をまとめて活発な活動を行ったことは高く評価できる。(阿形)
- 総括班の努力などにより、組織的な連携共同研究については、量的にも質的にも顕著な成果をあげたといえる。(永田)
- 領域内での共同研究が十分になされており、非コード RNA という新しい分野の中核的グループを形成することができたことは特筆に値する。(仲野)
- 他の多くの新学術領域研究と異なり、あえて複数の研究項目を設定せず、領域代表者・泊 幸秀教授の強力なリーダーシップのもとに、計画研究や公募研究を有機的に連携させ、大変魅力的な研究グループを構築し、目的に向かって邁進してきた。(岡野)

#### 【研究費の使用】

- 総括班の経費に関しては、抑えられる出費を抑えたうえで、国際シンポジウム、若手研究者補助、共同研究推進などに重点的に支出するメリハリのきいた運営がなされ、有効だったと言える。(松藤)
- 問題なく設定された目標に向けて支出されたと考えられる。(永田)
- 比較的小規模な予算による領域であったが、きわめて有効に利用され、十分な業績をあげた。(仲野)

#### 【当該学問分野、関連学問分野への貢献度】

- 非コード RNA は、広範で重要な遺伝子発現調節に関わる新しい基本的原理であり、生命科学、特にがん、幹細胞、発生、分化などの領域で重要性を増し、論文数も急激に増加している。この分野に本領域が果たした原理的・方法論的な貢献は多大である。本領域は、1 年先行して実施された新学術領域研究「RNA 制御学」と緊密な連携を取りながら運営され、RNA 研究全般に対する貢献も大きかった。(松藤)
- この領域における当面する課題は、この領域が設定された時点では、国際的にも共通に認識されていた。本領域研究は、そのような課題に果敢に挑戦し、国際的にも評価されるべき高い成果をあげた。従って、世界的な RNA 研究の進展に大きく貢献した。(永田)
- 非コード RNA は、世界的に見て最もホットな研究分野のひとつであるが、本領域はその王道をいくものであり、当該学問分野や関連学問分野に与えた貢献度は十分であった。(仲野)

#### 【若手研究者育成への貢献度】

- 領域会議やシンポジウムでは、若手研究者によるレベルの高い発表や討論が行われ、若手育成を促進するという領域の考え方が各研究者に浸透していることを実感した。本領域の若い領域代表が、リーダーシップを存分に発揮してこれだけの成果をあげたことも特記されるべきだと考える。(松藤)
- 本領域研究に参画していた研究者自身が若手と認識される研究者群であり、彼ら自身のキャリアアップが順調になされている点は特筆すべきであろう。領域研究に参加した大学院生についても、受賞実績だけから見ても、この領域の育成に果たした役割は大きなものであったと考えられる。(永田)
- 領域会議でのポスター発表やその評価、海外での学会発表に対する積極的な援助など、若手研究者育成にも十分な貢献があった。本領域で育った若手研究者が、領域代表の意を汲み、今後大きく羽ばたいてくれるものと期待している。(仲野)

## 8. 主な研究成果（発明及び特許を含む）【研究項目毎または計画研究毎に整理する】

（3 ページ程度）

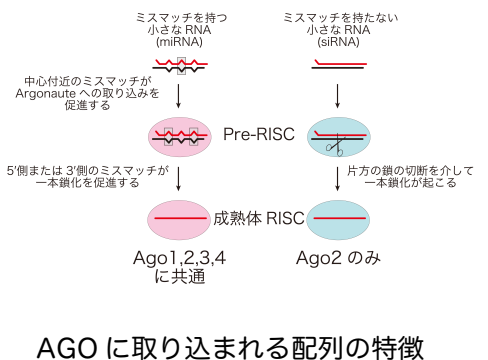
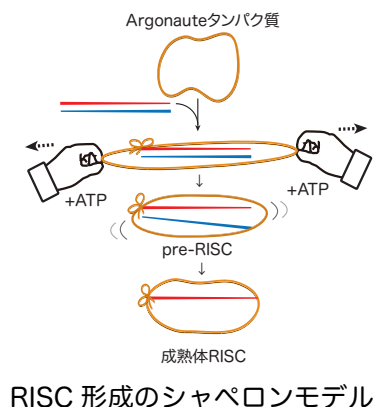
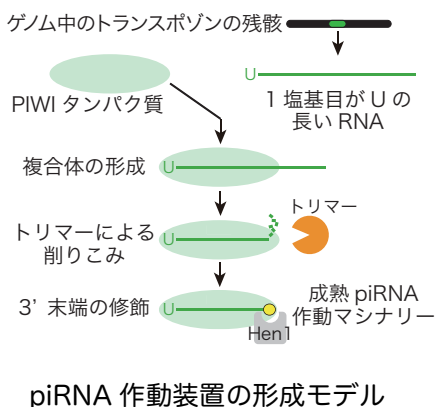
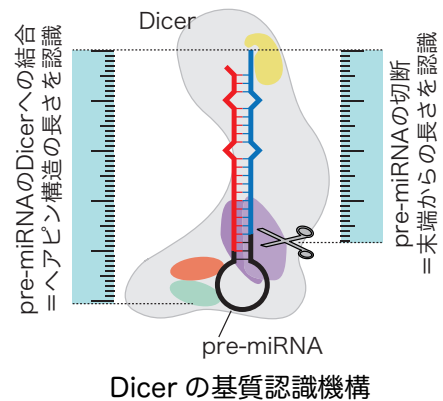
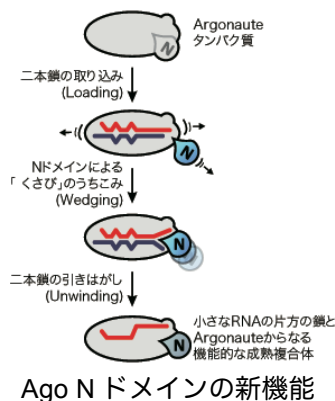
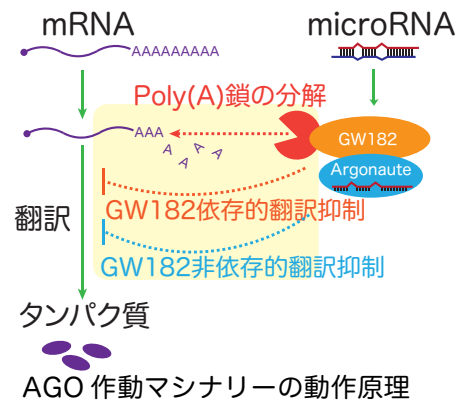
新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、現在から順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

### 【計画研究 1】小分子 RNA 作用マシナリーの中核因子 Argonaute の解析

研究代表者：泊 幸秀（東京大学）

研究分担者：塩見 美喜子（東京大学）

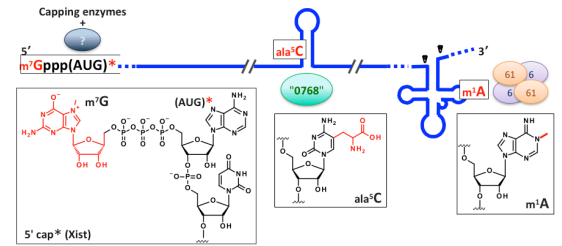
- ・ショウジョウバエおよび植物において miRNA を取り込んだ RISC が標的 mRNA の脱アデニル化や翻訳抑制を引き起こすメカニズムを明らかにした(Iwakawa and Tomari, *Mol Cell* 2013; Fukaya and Tomari, *Mol Cell* 2012)。
- ・ヒト AGO サブファミリータンパク質の機能未知ドメイン（N ドメイン）に系統的変異を導入したライブラリーを作成し、RISC 形成における影響を調べた結果、これまで機能未知であった N ドメインが小分子 RNA 二本鎖の一本鎖化に極めて重要な役割を果たしていることを見いだした(*Nat Struct Mol Biol.* 2012)。
- ・ショウジョウバエにおいて miRNA 前駆体から miRNA 二本鎖を切り出す Dicer-1 は、基質の pri-miRNA と結合する際にはヘアピン構造の両末端を認識し、その長さが正しいものと結合すること、その後、末端からの長さを正確に認識して pre-miRNA を切り出している事を明らかにした (Tsutumi et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2011)。
- ・piRNA 合成を再現する生化学的な実験系を確立し、長い piRNA 前駆体が PIWI サブファミリータンパク質に取り込まれた後に 3'末端が削られさらに 2'-O-メチル化を受けるというモデルを提唱した(Kawaoka et al., *Mol Cell* 2011)。この研究は公募班の勝間との共同研究によって行われた。
- ・ショウジョウバエおよびヒトにおいて、AGO サブファミリータンパク質が小分子 RNA 二本鎖を取り込む際には、Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリーによる AGO タンパク質のダイナミックな構造変化が必要であることを明らかにし、なぜ RISC 形成過程の前期に ATP が必要であるかという議論に終止符を打った (Iwasaki et al., *Mol Cell* 2010)。
- ・小分子 RNA 二本鎖が AGO タンパク質に効率良く取り込まれ、さらに効率良く一本鎖化するために、どのような構造的および配列的特徴が必要かを明らかにした(Yoda et al., *Nat Struct Mol Biol.* 2010)。これにより人工的な miRNA の論理的デザインが可能になり、その設計法について国内特許・国際 PCT 特許出願を行った。



## 【計画研究 2】高分子非コード RNA 作用マシナリー構成要素の探索と解析

研究代表者：鈴木 健夫（東京大学）

X 染色体の不活性化を制御する非コード RNA、Xist の 5'末端断片の LC/MS 解析を行い、通常の mRNA に見られる cap2 型 ( $m^7G$ -ppp-Nm-Nm-N...)とは異なる特殊な修飾を受けていることを明らかにした(投稿準備中)。また、核内構造体に蓄積する高分子非コード RNA である Malat1 の 3'プロセシングの過程で tRNA 様の構造を持つ mascRNA が作られるが、そのうちの 1ヶ所のアデノシンが TRMT61A/TRMT6 複合体によりメチル化され  $m^1A$  となることを明らかにした(投稿準備中)。これらの成果は、高分子非コード RNA を直接精製し、その化学修飾を解明した世界の初めての例であり、それらの修飾を介した高分子非コード RNA の新たな機能制御機構の存在が示唆された。



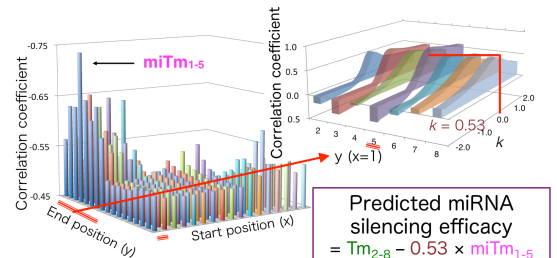
非コード RNA に見られる化学修飾と作用因子

## 【計画研究 3】小分子 RNA 作用マシナリーの調節機構

研究代表者：程 久美子（東京大学）

研究分担者：山下 暁朗（横浜市立大学）小田 健昭（東京大学）

従来、miRNA は細胞質に存在する成熟型の mRNA を標的としていと考えられてきたが、AGO が形成する複合体に含まれる TNRC6A には核移行シグナルと核外移行シグナルの両方が存在しており、これらの複合体は核と細胞質をシャトルして核内でも機能を発揮している可能性を明らかにした(Nishi *et al.*, *RNA* 2013)。また、miRNA の配列とターゲットの配列が形成する塩基対合の熱力学的性質を数値化し、それらの値によってサイレンシング効率を予測する事に成功した(Hibio *et al.*, *Sci. Rep.* 2012)。



small RNA サイレncing 効果の定量化

また、非コード RNA 作用マシナリーの動作原理の *in vitro* 解析にむけての研究基盤を整備するために哺乳類動物細胞のタンパク質大量発現系・精製系の構築を行い、ミリグラムオーダーでタンパク質を取得することが可能となった。この実験系は、領域内で広く共有された。

## 【計画研究 4】Xist RNA 作用マシナリーの調節機構

研究代表者：佐渡 敬（近畿大学）

高分子非コード RNA の作動マシナリーの動作原理を解明するため、最も生理機能が良くわかっている X 染色体の不活性化を制御している非コード RNA、Xist の機能ドメイン解析を行った。その結果、Xist の 5'側に 19 塩基の配列が挿入された Xist<sup>IVS</sup> は、X 染色体に局在することができるものの完全な不活性化を誘導することが出来ず、ホモ接合体では妊娠中期に致死となること、そのような個体では栄養膜巨大細胞において X 染色体の再活性化が特に顕著に見られることなどが明らかとなった(Hoki *et al.*, *Development* 2011)。

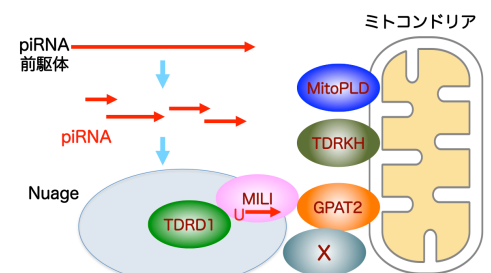
## 【計画研究 5】高次生命現象における時空間的な小分子 RNA の生理機能解析

研究代表者：中澤 敬信（大阪大学）

研究分担者：宮川（倉持）さとみ（大阪大学）

線条体に高発現しているマイクロ RNA 群を同定し、特に高発現しているものについて欠損マウスを作製しその機能解析を行ったところ、モノアミンの代謝異常によるコカイン感受性の上昇が見られる事を見いだした(論文投稿中)。また、神経細胞の形態の変化によって発現が変動する miRNA も複数個同定した(論文投稿中)。

GS(germ stem)細胞を用いた piRNA 研究の哺乳類培養細胞モデルを開発し、piRNA の作動マシナリーの中核因子 MILI に結合するタンパクとして、ミトコンドリア外膜の脂質代謝酵素である GPAT2(Glycerol-3-



哺乳類細胞での piRNA 産生モデル

phosphate acyltransferase 2)を同定した(Shiromoto, *et al. RNA*, 2013)。

DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼである MVH(mouse VASA homologue)欠損マウスにおいては、piRNA の発現低下、レトロトランスポソンの制御領域における DNA メチル化の低下が起きるのに加え、piRNA 合成の場とされている生殖顆粒 inter-mitochondrial cement(IMC)自体が形成されなくなる事も分かった(Kuramochi-Miyagawa *et al. Genes Dev.* 2010)。

**【計画研究6】 遺伝学的アプローチによる高分子非コード RNA マシナリーの生理機能解析次生命現象における時空間的な小分子 RNA の生理機能解析**

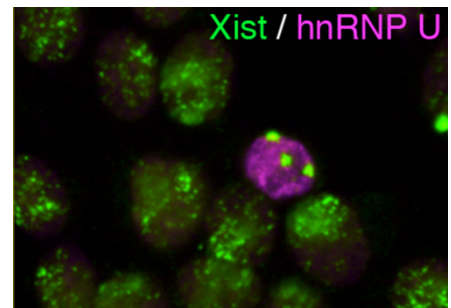
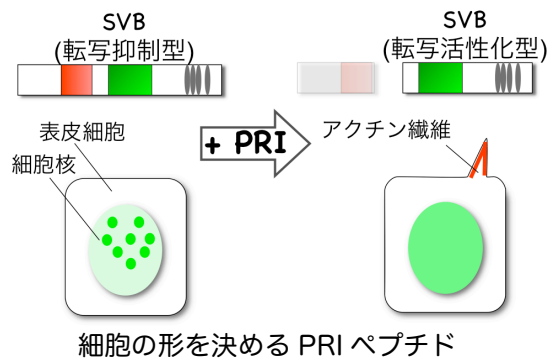
研究代表者：影山 裕二（神戸大学）

研究分担者：中川 真一（理化学研究所）

核内の特定の構造体に局在する高分子非コード RNA である Gomafu、Neat1、Malat1 のノックアウトマウスを作製してその表現型を解析したところ、いずれも通常の飼育環境下では見かけ上異常を示さないこと(Nakagawa *et al., J Cell Biol.* 2012; Nakagawa *et al., RNA* 2011)を明らかにした。

ショウジョウバエの胚発生過程で特徴的な発現パターンを示す高分子非コード RNA についてその変異体の遺伝学的な解析を行い、*polished rice (pri)* と名付けた遺伝子が、実は高分子非コード RNA ではなく短鎖ペプチドをコードする遺伝子として機能し、標的となる転写因子の細胞内局在を制御していることを明らかにした(Kondo *et al., Science* 2010)。

X 染色体の不活性化を制御する Xist の染色体局在を制御する因子をスクリーニングし、核マトリクスタンパク質である hnRNP U が Xist と染色体の両方を結びつける「のり」のような役割を果たしている事を明らかにした(Hasegawa *et al., Dev. Cell* 2010)。



**【計画研究7】 非コード RNA 作用マシナリーの医薬応用**

研究代表者：和田 猛（東京理科大学）

研究分担者：竹下 文隆（国立がん研究センター）

ホスホロチオエート化 siRNA を動物モデルに投与した際、原発巣における抑制効果の向上と共に非がん組織へ移行する量の増加もみられ、医薬応用のためには、がん細胞特異的デリバリー方法との併用が必要であることが示唆された(Fujita *et al., Sci. Rep.* 2013)。

二本鎖 RNA に特異的に結合し、生体内での安定性を向上させ、RNA 医薬のデリバリーに有用な新規人工オリゴ糖の合成に成功した (Iwata *et al., J. Org. Chem.* 2012、特許登録：US/8288527)

光学活性ホスホロチオエート RNA の新しい合成法を確立し、相補的な塩基配列を有する RNA との二本鎖形成能を調べ、リン原子の絶対立体配置が RNA 二本鎖の熱力学的安定性に及ぼす効果を初めて明らかにした(Nukaga *et al. J. Org. Chem.* 2012、特許出願：WO/2011/108682)。この現象を、泊らによる高効率な RISC 形成のための小分子 RNA の論理的デザインと組み合わせることにより、医薬応用につなげる道筋を付けた。

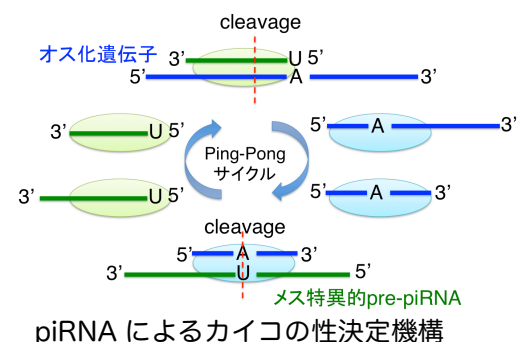
非コード RNA の医薬応用を目指し、リン原子の立体が厳密に制御された光学活性ホスホロチオエート RNA の実用的合成法の開発を行い、4 種類の核酸塩基を有するリン原子の立体が厳密に制御されたホスホロチオエート RNA を高収率かつ高立体選択的に合成することに世界で初めて成功した(Oka *et al Chem. Soc. Rev.* 2011)。

**【公募研究】 piRNA の機能解析に基づくカイコの性決定機構の解明**

研究代表者：勝間 進（東京大学）

長年謎だったカイコの性決定機構について、W 染色体から産生される 1 種類のメス特異的 piRNA が性決定因子であり、性決定のスイッチである BmDSX タンパク質の選択的スプライシングを引き起こすことを明らかにした(Kiuchi *et al., Nature* 2014)。

カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN4 細胞を用いた実験系を確立し、この系におけるシャペロンの役割を解明した(Izumi *et al., RNA* 2013)。



【公募研究】真核細胞における RNA サイレンシングの構造基盤の解明

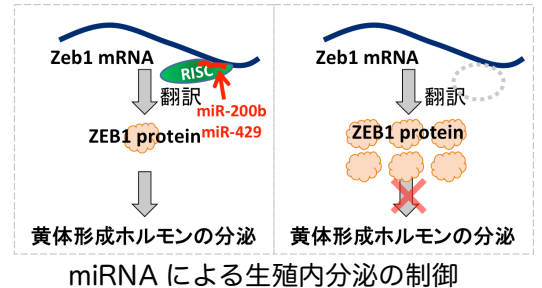
研究代表者：西増 弘志（東京大学）

計画班の塩見と共同で、piRNA 生合成に関わる Zucchiniヌクレアーゼの X 線結晶構造解析を行い、Zuc は 2 本鎖 RNA を切断する Nuc とは異なり、一本鎖 RNA が結合するのに適した狭い溝状の酵素活性部位をもつこと、Zuc のヌクレアーゼ活性は piRNA 産生とトランスポゾン抑制に必須であることを明らかにした (Nishimasu *et al.*, *Nature* 2012)。

【公募研究】高次生命現象を指標とした miRNA-標的遺伝子作用マシナリーの解明

研究代表者：蓮輪 英毅（慶応大学）

マウスの下葉体前葉に強く発現する miRNA である miR-200b と miR-429 について、ノックアウトマウスを作成・解析することにより、これらの miRNA が黄体形成ホルモンの発現を抑制する転写因子 ZEB1 の mRNA 3'UTR に直接結合し、その発現を抑制していることを明らかにした。また、ZEB1 が排卵の引き金となる LH の一過性の放出を抑制する因子であることを示し、上記二つの miRNA が LH の活性化因子であることを明らかにした。本研究は非コード RNA が生殖内分泌系の制御に寄与していることを示す初めての例となった (Hasuwa *et al.* *Science* 2013)。



【公募研究】RNA 分解を介した核局在型高分子非コード RNA 作用マシナリーの制御機構の解明

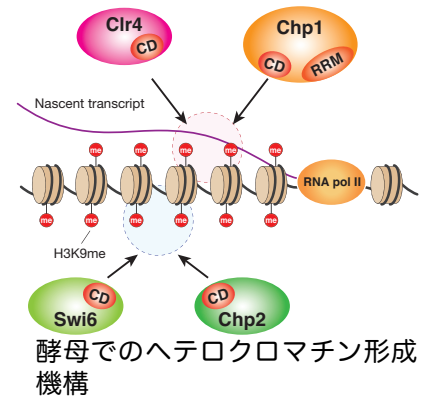
研究代表者：秋光 信佳（東京大学）

代表的な核内高分子非コード RNA である NEAT1 が、ウイルス感染依存的に発現が誘導されることを示し、さらには NEAT1 が転写抑制因子である SFPQ と相互作用して標的遺伝子のプロモーターから解離することにより、各種サイトカインの発現を誘導していることを明らかにした (Imamura *et al.*, *Mol. Cell* 2014)。この研究は、自然免疫応答の分子スイッチとして高分子非コード RNA が機能していることを初めて示した報告である。また、非コード RNA の安定性をゲノムワイドに解析する新しい手法、BRIC-seq (BrU immunoprecipitation chase assay through sequencing)を開発し、分解速度の特に早い一群の非コード RNA、SLiT(Short-Lived noncoding Transcripts)を同定した (Tani *et al.*, *Genome Res.* 2012)。

【公募研究】高次クロマチン構造形成を制御する非コード RNA 作用マシナリーの解析

研究代表者：中山 潤一（名古屋市立大学）

RNAi とクロマチンを結ぶ非コード RNA マシナリーである、RITS の作用機序の解明を目的として、その構成要素の一つである Chp1 に着目して研究を進めた。その結果、Chp1 のクロモドメインが H3K9me3 と結合することで、その結合部位とは別のクロモドメインが持つ RNA 結合能が増強されることを明らかにした。また、Chp1 の変異分子を用いた詳細な機能解析を行い、非コード RNA 作用マシナリーの機能制御にクロモドメインの多面的な機能が関わることを明らかにした (Ishida *et al.* *Mol. Cell* 2012)。



## 9. 研究成果の取りまとめ及び公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5ページ程度）

新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、現在から順に発表年次をさかのぼり、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に\*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

計画研究研究（7件、13名）および公募研究（延べ28件、24名）の研究成果として、計313報の学術論文発表（査読のあるもののみ）、30件の特許出願・登録がなされ、そのうち12報の論文について、計26件の新聞等による報道があった。また、研究の連携促進の結果として、20報の共著論文が発表された。研究班員は、これらの研究成果について、4件の和文雑誌の特集企画、2件の英文雑誌・刊行本の特集企画、15件のシンポジウム・ワークショップを企画し、積極的に研究成果の発表に努めた。また、領域のホームページと公式ブログを開設し、広く情報発信に努めるとともに、一般社会に対するアウトリーチを目的として計48件の活動を行った。以下に主なものを抜粋して記す。

【原著論文】（全て査読あり） 計 313 報 （新聞等での報道 計 26 件）

### 計画班 (計 179 報)

Diversity of the piRNA pathway for non-self silencing: worm-specific piRNA biogenesis factors.

Izumi N, \*Tomari Y.

*Genes Dev.* 2014 Apr 1;28(7):665-71.

Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants.

Iwakawa HO, \*Tomari Y.

*Mol Cell.* 2013 Nov 21;52(4):591-601.

日刊工業新聞 (2013/11/22)

Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs.

Yoda M, Cifuentes D, Izumi N, Sakaguchi Y, Suzuki T, \*Giraldez AJ, \*Tomari Y.

*Cell Rep.* 2013 Nov 14;5(3):715-26.

*Arabidopsis* ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly.

Endo Y, \*Iwakawa HO, \*Tomari Y.

*EMBO Rep.* 2013 Jul;14(7):652-8.

miRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in *Drosophila*.

Fukaya T and \*Tomari Y.

*Mol Cell.* 2012. Dec 28;48(6):825-36.

マイナビニュース (2012/11/5)

The true core of RNA silencing revealed.

Sasaki HM, \*Tomari Y.

*Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jul 5;19(7):657-60.

The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly.

Kwak PB, \*Tomari Y.

*Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jan 10;19(2):145-51.

Nature Japan (2012/3/8)、マイナビニュース (2012/1/13)

PABP is not essential for microRNA-mediated translational repression and deadenylation in vitro.

Fukaya T and \*Tomari Y.

*EMBO J.* 2011 Nov 25;30(24):4998-5009.

Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1.

- Tsutsumi A, Kawamata T, Izumi N, Seitz H, \*Tomari Y.  
*Nat Struct Mol Biol.* 2011 Sep 18;18(10):1153-8.
- 3'-end formation of PIWI-interacting RNAs in vitro.  
 Kawaoka S, Izumi N, \*Katsuma S. \*Tomari Y.  
*Mol Cell.* 2011 Sep 16;43(6):1015-22.
- Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes.  
 Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S. Suzuki T, \*Tomari Y.  
*Mol Cell.* 2010 Jul 30;39(2):292-299.  
 日刊工業新聞 (2010/6/4)、日経産業新聞 (2010/6/4)
- ATP-dependent human RISC assembly pathways.  
 Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, \*Tomari Y.  
*Nat Struct Mol Biol.* 2010 Jan;17(1):17-23.  
 日刊工業新聞 (2009/12/7)
- Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding.  
 Kawamata T, Seitz H, \*Tomari Y.  
*Nat Struct Mol Biol.* 2009 Sep;16(9):953-60.  
 日刊工業新聞 (2009/8/20)、科学新聞(2009/8/28)
- Yb integrates piRNA intermediates and processing factors into perinuclear bodies to enhance piRISC assembly.  
 Murota Y, Ishizu H, Nakagawa S. Iwasaki YW, Shibata S, Kamatani, MK, Saito K, Okano H, Siomi H and Siomi MC\*.  
*Cell Rep.* 2014 in press
- Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in Drosophila.  
 Nishida KM, Miyoshi K, Ogino A, Miyoshi T, Siomi H, \*Siomi MC.  
*Mol Cell.* 2013 Feb 21;49(4):680-91.
- Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in Drosophila.  
 Saito K, Ishizu H, Komai M, Kotani H, Kawamura Y, Nishida KM, \*Siomi H. \*Siomi MC.  
*Genes Dev.* 2010 Nov 24(22):2493-8.
- A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in Drosophila.  
 Miyoshi T, Takeuchi A, Siomi H, \*Siomi MC.  
*Nat Struct Mol Biol.* 2010 Aug;17(8):1024-6.
- Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in Drosophila germlines.  
 Nishida KM, Okada TN, Kawamura T, Mituyama T, Kawamura Y, Inagaki S, Huang H, Chen D, Kodama T, Siomi H,  
\*Siomi MC.  
*EMBO J.* 2009 Dec 16;28(24):3820-31.
- A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila.  
 Saito K, Inagaki S, Mituyama T, Kawamura Y, Ono Y, Sakota E, Kotani H, Asai K, \*Siomi H. \*Siomi MC.  
*Nature.* 2009 Oct 29;461(7268):1296-9.
- A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs.  
Suzuki T and \*Suzuki T.  
*Nucleic Acids Res.* 2014 May 15. pii: gku390.
- Taurine-containing uridine modifications in tRNA anticodons are required to decipher non-universal genetic codes in ascidian mitochondria.  
Suzuki T. Miyauchi K, \*Suzuki T. Yokobori S, Shigi N, Kondow A, Takeuchi N, Yamagishi A, \*Watanabe K.  
*J Biol Chem.* 2011 Oct 14;286(41):35494-8.
- Interactions between the non-seed region of siRNA and RNA-binding RLC/RISC proteins, Ago and TRBP, in mammalian cells.

- Takahashi T, Zenno S, Ishibashi O, Takizawa T, Saigo K, \*Ui-Tei K.  
*Nucleic Acids Res.* 2014 Apr 1;42(8):5256-69.
- Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus.  
 Nishi K, Nishi A, Nagasawa T, \*Ui-Tei K.  
*RNA.* 2013 Jan;19(1):17-35.  
 日刊工業新聞 (2012/11/19)、マイナビニュース (2012/11/16)、Nature Japan (2013/1/24)
- Incomplete X-inactivation initiated by a hypomorphic Xist allele in the mouse.  
 Hoki Y, Ikeda R, Mise N, Sakata Y, Ohhata T, Sasaki H, Abe K, \*Sado T.  
*Development.* 2011 Jul;138(13):2649-59. Epub 2011 May 25.
- MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons  
 \*Kuramochi-Miyagawa S., Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, \*Nakano T.  
*Genes Dev.* 2010 May; 23: 887-892.
- Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis.  
 Kondo T, Plaza S, Zanet J, Benrabah E, Valenti P, Hashimoto Y, Kobayashi S, Payre F, \*Kageyama Y.  
*Science.* 2010 Jul 16;329(5989):336-9.
- Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice.  
 \*Nakagawa S., Naganuma T, Shioi G, Hirose T.  
*J Cell Biol.* 2011 Apr 4;193(1):31-9.
- The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA.  
 Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Tsutui K, \*Nakagawa S.  
*Dev Cell.* 2010 Sep 14;19(3):469-76.
- 公募班 (計 144 報)**
- A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm.  
 Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H, Arai Y, Ishihara G, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Suzuki MG, \*Katsuma S.  
*Nature.* 2014 May 14. doi: 10.1038/nature13315. [Epub ahead of print]  
 時事通信 (2014/5/15)、財経新聞 (2014/5/18)
- Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation between nuclear body paraspeckle and promoter mediates IL8 expression in response to immune stimuli.  
 Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K. and \*Akimitsu N.  
*Mol Cell.* 2014, 53, 393-406.  
 毎日新聞 (2014/2/27)、日経産業新聞 (2014/2/10)、日経新聞 (2014/2/7)、時事通信 (2014/2/7)
- Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived non-coding transcripts in mammals,  
 Tani H, Mizutani R, Salam KA, Tano K, Ijiri K, Wakamatsu A, Isogai T, Suzuki Y and \*Akimitsu N.  
*Genome Res.* 2012, 22, 947-956.  
 日経産業新聞 (2012/4/18)
- The X-linked Imprinted Gene Family *Fthl17* Shows Predominantly Female Expression Following the 2-cell Stage in Mouse Embryos  
 \*Kobayashi S., Fujihara Y, Mise N, Kaseda K, Abe K, Ishino F, Okabe M.  
*Nucleic Acids Res.* 2010, 38(11), 3672-81.
- 15q11-13 chromatin organization reveals epigenetic regulation of CHRNA7 and deficiencies in Rett and autism brain.  
 Yasui DH, Scoles HA, Horike S. Meguro-Horike, M., Dunaway, K.W., Schroeder, D.I., LaSalle, J.M.



- Human Molecular Genetics*. 2011, 20, 4311-4323.
- Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome.
- Meguro-Horike M, Yasui DH, Powell W, Schroeder DI, Oshimura M, LaSalle JM, \*Horike S.  
*Human Molecular Genetics*. 2011, 20, 3798-3810.
- miR-1 and miR-206 regulate angiogenesis by modulating VegfA expression in zebrafish.
- Stahlhut C, Suárez Y, Lu J, \*Mishima Y, \*Giraldez AJ.  
*Development*. 2012 Dec 1;139(23):4356-64.
- Functional and direct interaction between the RNA binding protein HuD and active Akt1
- \*Fujiwara T, Fukao A, Sasano Y, Matsuzaki H, Kikkawa U, Imataka H, Inoue K, Endo S, Sonenberg N, Thoma C, \*Sakamoto H.  
*Nucleic Acids Research*. 2012, 40, 1944-1953.
- Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing.
- Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, \*Nishimura Y, \*Nakayama J.  
*Mol Cell*. 2012 Jul 27;47(2):228-41.
- Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly.
- Hayashi A, Ishida M, Kawaguchi R, Urano T, Murakami Y, \*Nakayama J.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 109(16):6159-64.
- Roles of fission yeast Gre3 protein in ribosomal RNA processing and heterochromatic gene silencing.
- Kitano E, Hayashi A, Kanai D, Shinmyozu K, \*Nakayama J.  
*J Biol Chem*. 2011 Apr 29;286(17):15391-402.
- N-terminal phosphorylation of HP1 {alpha} promotes its chromatin binding.
- Hiragami-Hamada K, Shinmyozu K, Hamada D, Tatsu Y, Uegaki K, Fujiwara S, \*Nakayama J.  
*Mol Cell Biol*. 2011 Mar;31(6):1186-200.
- Methylation of ribosomal protein L42 regulates ribosomal function and stress-adapted cell growth.
- Shirai A, Sadaie M, Shinmyozu K, \*Nakayama J.  
*J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22448-60.
- Highly parallel SNP genotyping reveals high-resolution landscape of mono-allelic Ube3a expression associated with locus-wide antisense transcription.
- Numata K, Kohama C, Abe K, and \*Kiyosawa H  
*Nucleic Acids Res*. 2011,39, 2649-2657.
- L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity.
- Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, Akiyama H, Scherer G, Takada S, \*Asahara H.  
*J Biol Chem*. 2012 Jun 22;287(26):22206-15.
- miR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility.
- Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, \*Okabe M.  
*Science*. 2013 Jul 5;341(6141):71-3.
- 朝日新聞 (2013/6/14)、読売新聞 (2013/6/14)、時事通信 (2013/6/14)、共同通信 (2013/6/14) など
- Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA.
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, \*Zhang F, \*Nureki O.  
*Cell* 2014 Feb 27;156(5):935-949
- Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis.
- Nishimasu H, Ishizu H, Saito K, Fukuhara S, Kamatani MK, Bonnefond L, Matsumoto N, Nishizawa T, Nakanaga K, Aoki J, Ishitani R, Siomi H, \*Siomi MC, \*Nureki O.  
*Nature* 2012 Nov 8;491(7423):284-287

**【特許】 計 30 件**

非コード RNA の医薬応用などの研究成果にもとづいて出願・登録された特許のうち、主なものを以下に記す。

泊 幸秀 他

small RNA 二本鎖およびヘアピン型 RNA の設計方法 (特願 2009-153798, 特開 2011-4708)  
Method for designing small RNA duplex and hairpin RNA (WO/2011/001965, PCT/JP2010/061036)

和田 猛 他

リボヌクレオシドホスホロチオエートの製造方法 (特願 2012-503271)  
Ribonucleoside phosphorothioate manufacturing method (WO/2011/108682A1)

和田 猛 他

2'-O-修飾 RNA (US61/418,384)  
2'-O-MODIFIED RNA (WO/2012/073857, PCT/JP2011/077313)

和田 猛 他

オリゴジアミノ糖化合物 (US12/659,425)  
Oligo-aminosaccharide compound (WO/2010/104192A1, PCT/JP2010/054282)

**【シンポジウム・ワークショップの開催】 計 15 件**

2013/9/23～25 14<sup>th</sup> Annual Meeting “RiboClub 2013” (日加合同国際研究集会)  
Québec (カナダ) 泊 幸秀 企画

2011/6/13 Tokyo RNA Club the 5th Meeting (国際研究集会)  
東京大学 弥生講堂一条ホール (東京) 泊 幸秀 企画

その他、日本分子生物学会 (2010, 2011, 2012, 2013)、日本 RNA 学会 (2013)、日本蛋白質学会 (2012)、日本骨代謝学会 (2010)、CDB Meeting (国際研究集会) (2010, 2012)、RIKEN Symposium (国際研究集会) (2013) など、各種学会・研究集会においてシンポジウム・ワークショップを企画した。

**【和文雑誌の特集企画】 計 4 件**

実験医学 2013 年 5 月 泊 幸秀 編集  
実験医学 2011 年 7 月 中川 真一・影山 裕二 編集  
細胞工学 2011 年 7 月 佐渡 敬 編集  
実験医学 2010 年 6 月 塩見 美喜子 編集

**【英文雑誌・刊行本の特集企画】 計 2 件**

Methods in Molecular Biology 2013 年 11 月 塩見 美喜子 編集  
Frontiers in Non-coding RNA 2012 年 6 月 程 久美子 編集

**【アウトリーチ活動】 計 48 件**

13人の班員により、本領域で得られた最新の研究成果について、その内容を解りやすく一般社会に対して説明するとともに、その科学的意義について啓蒙活動を行った。以下に主な活動内容を記す。

#### 泊 幸秀

- 2013年5月号 科学雑誌ニュートン「LEADING EDGE 科学の最前線から」インタビュー  
2013年3月 ニュートン別冊「人体は‘なに’で作られているのか」監修  
2012年12月 和歌山県親と子どものためのきらめき“夢”トーク「分子の世界から見た生き物のしくみ」  
2012年10月号 科学雑誌ニュートン「生命の影の司令塔 RNA」監修  
2010年12月 中高生対象講演会「小さな RNA の大きな働き」

#### 中川 真一

- 2012年6月 朝日新聞地域ミニコミ誌「朝日サントウン」 インタビュー記事掲載

#### Goto Derek

- 2014年1月 Agriculture Camp（富良野市）（小学生対象）  
2013年5月 Open Public Seminar. 豊橋市自然史博物館  
2010年6月 一般公開講義「人類の食料の略奪者：寄生センチュウ」  
2010年9月  
～2011年7月 「未来の科学者養成講座」における研究指導（高校生対象）

#### 秋光 信佳

- 2013年8月 福島県檜葉町 ならはっこイベント講演会「放射線について学ぼう」（一般対象）

#### 堀家 慎一

- 2013年7月 ひらめきときめきサイエンス（日本学術振興会）（小学生および保護者対象）  
2010年12月 まちなかサイエンスセミナー（アートシアターいしかわ）（高校生対象）

#### 神武 洋二郎

- 2012年10月 市民公開講座「人はなぜ老いるのか？」（一般対象）

#### 浅原 弘嗣

- 2014年2月 千里ライフサイエンスセミナー  
「生命科学・医薬研究を拓くマイクロ RNA の研究最前線」（一般対象）

#### **【領域ホームページ】**

- 領域ホームページ (167,767 ページビュー)  
領域ブログ “ncRNA+Blog” (174,407 ページビュー)  
(2014年5月26日現在)

## 10. 当該学問分野及び関連学問分野への貢献度（1ページ程度）

研究領域の研究成果が、当該学問分野や関連分野に与えたインパクトや波及効果などについて記述してください。

近年のゲノム研究のもたらした最も重要な成果の一つは、ヒトを含む高等真核生物における膨大な数の非コード RNA の存在を明らかにしたことである。これまでに調べられたモデル生物の全てにおいて、タンパク質の構造情報を持たないゲノム領域から盛んに転写が行われ、真核細胞がその転写産物で満たされていることはすでに周知の事実と言ってよい。本領域の発足時には、これら非コード RNA について組織・細胞・疾患特異的な発現様式が次々と報告され、また、生物学的に重要とされる各種タンパク質と非コード RNA との物理的な相互作用についても次第に明らかになりつつあり、今後のこの研究分野の大きな飛躍を予感させる状況にあった。本領域は、このような研究的背景において、「非コード RNA がどのようなメカニズムで働くのか」という根本的な命題について、非コード RNA が複数の相互作用因子を含むエフェクター複合体として初めて機能を発揮するという見解に基づき、そのメカニズム全体を「非コード RNA 作用マシナリー」と捉えて包括的な研究を推進することにより、その答を得るべく努力を重ねてきた。

非コード RNA 作用マシナリーの分子基盤の研究については、目覚ましい進展があった。泊らは、小分子 RNA のエフェクター複合体である RISC の形成過程において、1) 二重鎖 RNA の AGO タンパク質への取り込みが、ATP の加水分解依存的な熱ショックタンパク質の作用による AGO タンパク質のダイナミックな構造変化を介して行われること、2) その後の一本鎖 RNA の解離が、機能未知であった AGO タンパク質の「N ドメイン」によって、くさびが打ち込まれるようにして、化学エネルギーの消費なしに行われることを示した。この一連の研究は、生化学的にエレガントなその手法とともに、世界的にも競争の激しい当該研究分野において高い評価を受けた (*Nat Struct Mol Biol.* 2009, 2010, 2012; *Mol Cell.* 2011)。これらの成果に基づき、泊らが提唱した「ラバーバンドモデル」は、単に RISC の形成過程という特異的な反応にとどまらず、RNA とタンパク質の相互作用という、古典的な生化学の命題について一つの回答を示したものといえ、そのインパクトや波及効果は当該研究分野にとどまらず、極めて高いものといえる。また、長らく大きな謎であった piRNA の生合成過程についても、西増と塩見らによる結晶構造解析と生化学的解析により、Zucchini が piRNA 前駆体を切断するエンドヌクレアーゼであることが明らかとなり (*Nature* 2012)、当該研究分野を大きく進展させた。

他方、非コード RNA の生理機能についてもいくつかの特筆すべき進展があった。影山らは、すでに同定していたショウジョウバエ高分子非コード RNA を丹念に精査することで、*polished rice* と呼ばれる遺伝子座から転写された転写産物が、11 アミノ酸あるいは 32 アミノ酸の極めて小さなペプチドをコードしていることを明らかにしたが、これらの小さなペプチドが、転写因子である Shavenbaby タンパク質の部分分解による転写抑制ドメインの除去を促進することにより、転写抑制因子から転写活性化因子へのスイッチングを誘導するという、まさに驚くべきメカニズムを発見した (*Science* 2010)。この研究を契機として、このような小さなペプチド遺伝子がヒトやマウスにも多数存在するという報告が次々となされたことに鑑みても、遺伝子と ORF の概念を変える大きなインパクトのある研究成果であったと言えよう。また、勝間らにより、80 年来の謎であった鱗翅目昆虫の性決定が、たった 1 種類の piRNA による遺伝子発現制御に帰着するということが見事に証明された (*Nature* 2014)。さらには蓮輪らによって、miRNA が生殖内分泌系を介して排卵を制御していることが初めて明らかにされる (*Science* 2013) など、非コード RNA の生理機能に関する世界的な発見が領域内から相次いで報告され、他分野に対しても大きな波及効果を及ぼした。

医薬への応用を目指した非コード RNA 作用マシナリーの研究例として、和田らが行ったホスホロチオエート RNA の不斉合成法の確立が挙げられる。ホスホロチオエート RNA は、これまで汎用されてきたリボースの

2'位の修飾とは異なり、タンパク質との相互作用の起きやすいホスホジエステル結合に修飾を施すことから、生体内において安定で、かつ副作用を抑えるための高い選択性を持つ RNA 分子として注目されている。和田らは独自に開発したオキサザホスホリジン立体選択的合成法を応用し、リン原子の立体を厳密に制御した RNA の合成法を、世界で初めて確立した(*Chem Soc Rev* 2011, *J Org Chem* 2012, 特許出願 : WO/2011/108682)。この方法は既に企業と共同で工業的生産段階の検討に入っており、今後の RNA 創薬の可能性を大きく広げること成功したと言える。

これらの研究成果は、我が国のみならず世界的な RNA 研究の学術水準の向上につながるものであり、RNA が関わる生命現象についてのこれまでの観念を根本的に変革するものであると同時に、RNA 創薬が抱える諸問題の突破口になることが期待される。