

ク質分解活性を上昇させることが確認されている¹¹⁾。この時、プロテアソームとATPaseが結合した複合体は確認されず、両複合体の相互作用には安定な物理的相互作用は必要ないのかもしれない。従って、条件を整えば他のATPase複合体でもプロテアソームに基質を提供するパートナーとして機能するのかもしれない。

ロドコッカス属細菌や大腸菌を宿主とした組換えPupの精製が困難であることは、発現したPupの半減期が両宿主では非常に早いことを意味する。細胞内ATP依存性プロテアーゼは、高次構造を取らない状態に近いタンパク質についてはサイズや種類を問わずよく分解する。Pupはユビキチンとは異なり安定な構造を取っていないと考えられることから¹⁰⁾、他のATP依存性プロテアーゼにも認識され分解される可能性がある。

6. おわりに

これまで、微生物における選択的なタンパク質分解として、N末端アミノ酸の性質依存的にその半減期が決定されるN末端則¹²⁾や、終止コドンが欠失したmRNA上でタンパク質合成が滞ってしまったリボソームを解除するために分解シグナルと終止コドンを提供するtmRNA (transfer-messenger RNA) によるC末端への分解シグナル付加¹³⁾などが大腸菌を中心に研究されてきた。

今回紹介したPupタンパク質とその関連分子並びにプロテアソームは、放線菌のゲノムでは遺伝子クラスターとして一定の領域内にコードされていることが明らかになっているが(図1A)、近年の細菌のゲノム解析によって、放線菌以外のグラム陰性菌にも同様のクラスターが存在することが明らかになっており、Pupによる翻訳後修飾機構とPup化タンパク質の分解系が広く保存されていることが示唆されている¹⁴⁾。放線菌から端を発したPup依存性タンパク質分解系については、まだその系の一部が解明されたのみであり不明な点はまだまだ存在するが、今後の研究の進展に期待したい。

- 1) Pearce, M.J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S.P., & Darwin, K.H. (2008) *Science*, **322**, 1104–1107.
- 2) Lupas, A., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 533–534.
- 3) Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R., & Baumeister, W. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 766–774.
- 4) Wolf, S., Nagy, I., Lupas, A., Pfeifer, G., Cejka, Z., Muller, S. A., Engel, A., De Mot, R., & Baumeister, W. (1998) *J. Mol. Biol.*, **277**, 13–25.

- 5) Pearce, M.J., Arora, P., Festa, R.A., Butler-Wu, S.M., Gokhale, R.S., & Darwin, K.H. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5423–5432.
- 6) Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.-C., Weich, N., & Nathan, C.F. (2003) *Science*, **302**, 1963–1966.
- 7) Burns, K.E., Liu, W.-T., Boshoff, H.I.M., Dorresteijn, P.C., & Barry 3rd, C.E. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 3069–3075.
- 8) Striebel, F., Imkamp, F., Sutter, M., Steiner, M., Mamedov, A., & Weber-Ban, E. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 647–652.
- 9) Iyer, L.M., Burroughs, A.M., & Aravind, L. (2008) *Biol. Direct*, **3**: 45.
- 10) Liao, S., Shang, Q., Zhang, X., Zhang, J., Xu, C., & Tu, X. (2009) *Biochem. J.*, **422**, 207–215.
- 11) Takeuchi, J. & Tamura, T. (2004) *FEBS Lett.*, **565**, 39–42.
- 12) Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., & Varshavsky, A. (1991) *Science*, **254**, 1374–1377.
- 13) Keiler, K.C. (2008) *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 133–151.
- 14) De Mot, R. (2007) *Trends Microbiol.*, **15**, 335–338.

田村 範子¹, 尹 恵娟², 田村 具博^{1,2}

(¹産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門)

(²北海道大学大学院農学院基礎環境微生物学分野)

Ubiquitin-like protein involved in the proteasomal protein degradation in bacteria

Noriko Tamura¹, Hea-Yeon, Yun², and Tomohiro Tamura^{1,2}

(¹Research Institute of Genome-based Biofactory, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST); ²Laboratory of Molecular Environmental Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, 2-17-2-1 Tsukisamu-Higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062-8517, Japan)

線虫 *C. elegans* の神経系における感覚-運動変換機構

はじめに

動物の持つ神経系の重要な働きのひとつは、環境中からもたらされる様々な感覚情報を適切に行動に反映させることである。sensory-motor transformation (感覚-運動変換) とは、このような感覚入力から行動出力への変換の過程をいう。感覚-運動変換の研究は、行動出力、あるいは神経細胞の電氣的応答などと、感覚入力との因果関係が明瞭であることから、いろいろな感覚系を対象に分子レベル、神経細胞レベル、少数の神経細胞からなる局所回路レベルなど、さまざまな階層で行われてきているが、きわめて複雑な回路構造を持つ高等動物の脳・神経系においては、その全体像を理解することは容易ではない。

線虫 *Caenorhabditis elegans* は、わずか302個の神経細胞からなるきわめてシンプルな神経系を持つ。しかもその全回路構造は、連続切片の電子顕微鏡観察およびその再構成によって、個々の神経細胞間のシナプス結合やギャップ結合の数に至るまで解剖学的に詳細に記述されている¹⁾。つまり線虫は、感覚-運動変換に用いられる、神経系という情報処理ハードウェアの全構造が明らかになっているただひとつの生物であると言える。このことに加えて、体が透明な線虫では、細胞特異的なプロモーターの下流にGFP遺伝子をつないで特定の神経細胞を個体内でラベルし、その部分に局所的にレーザー照射を行うことで特定神経を外科的に除去すること、すなわち任意の箇所回路を分断することが可能である。さらに遺伝学を利用することもできる線虫は、神経回路構造をふまえた感覚-運動変換機構を研究する上で非常に有利な数多くの特徴を備えていると考えることができ、したがって、感覚-運動変換のさまざまな階層をまたぎ、統合的に全体像を理解することも線虫では実現可能な目標であり得る。

本稿では、線虫の様な感覚環境下での移動行動といくつかの感覚応答行動を例にとり、このシンプルなモデル生物におけるシンプルな感覚-運動変換にかかわる近年の研究を紹介する。

1. 線虫の行動の四つの要素

通常線虫は、エサとなる大腸菌を塗布した寒天培地上で飼育する。また行動実験の多くはこの寒天培地上、もしくはエサを含まない寒天培地上で行う。このとき線虫は、基本的には培地の表面をくねくねと二次元的にサインカーブを描きながら運動する（ときおり首を持ち上げたり、培地にもぐったりということもないではないが）。このため、実験環境下での線虫の運動のほとんどすべては、前進、後退、深い屈曲による方向転換、停止の四つの状態のいずれかに分類することが可能である（図1A）²⁾。線虫の示す走化性行動や温度走性行動およびその可塑的变化、交尾行動をはじめとするすべての行動は、上の四つの運動要素の組み合わせを適切に調節することによって行われている。したがって、線虫における感覚-運動変換の研究は必然的に、さまざまな状況下において、前進、後退、屈曲、停止を調節する機構の解析へとたどりつく。

2. 線虫の感覚器

線虫は高等動物の味覚、嗅覚、触覚、温度感覚などに相当する、さまざまな感覚機能を持っている。なかでも、揮

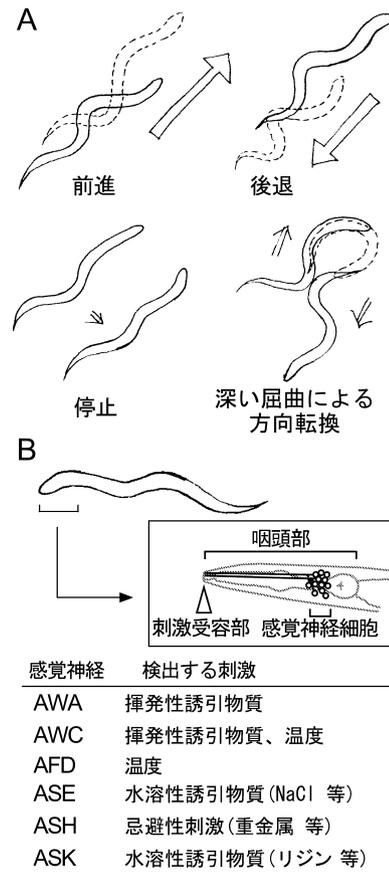


図1 線虫の運動と感覚神経（文献2~4）

A. 線虫の行動を構成する四つの基本運動要素. B. 線虫のアンフィド感覚神経細胞の位置（上）および、それらの感覚神経細胞が検出する感覚刺激の例（下）。

発性あるいは水溶性の化合物に対する化学感覚、および温度感覚は線虫の持つ最大の感覚器であるアンフィド (amphid) によって検出される（図1B）。アンフィドは、左右12対（12種類）、24個の感覚神経細胞からなる感覚器である。これらの感覚神経細胞は、線虫の体の前方に存在する咽頭部付近に細胞体を持ち、突起を頭部前端に向かって伸ばしている。この突起の先端には感覚繊毛が存在し、この部分で外部からの感覚刺激を受容している。1990年代前半のBargmannらの系統的なレーザー破壊実験^{3,4)}によって、個々の感覚神経の検出する刺激が明らかにされており、これらの感覚神経が以下に述べる感覚-運動変換経路における情報の入り口として機能する。

3. 線虫の移動運動における後退頻度の調節

2004年頃、われわれを含む複数のグループから、培地

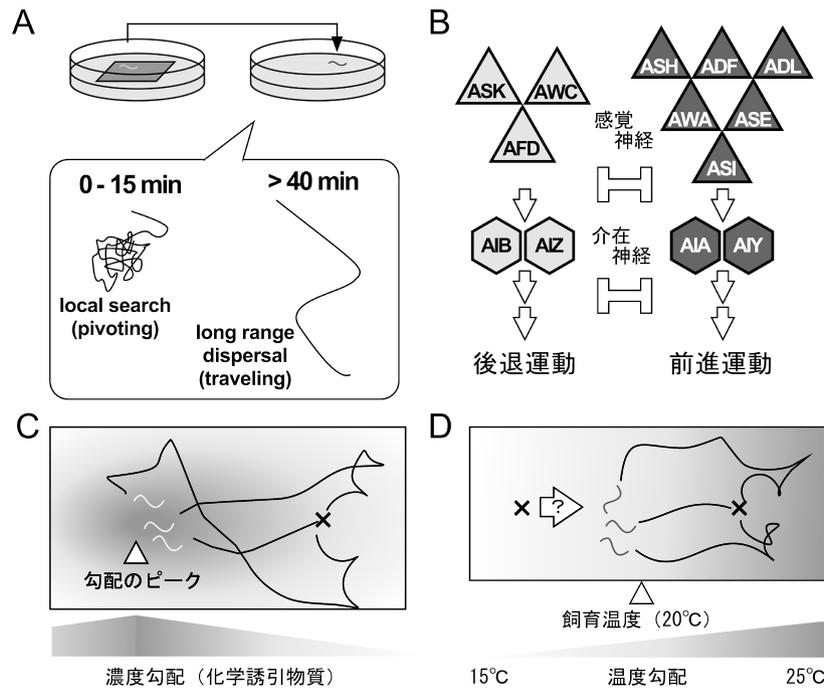


図2 線虫の行動 (文献 5, 6, 10, 11)

A. エサあり培地からエサなし培地に移した際の線虫の移動行動。図中の曲線は線虫の足跡を示す。培地を移しかえた直後は狭い範囲にジグザグの、時間経過後は広い範囲に比較的長い直線からなる足跡が見られる。B. 前進運動、後退運動の調節に関わる神経細胞。線虫には前進運動に対して促進的な働きを持つ感覚・介在神経細胞と、後退運動に対して促進的な働きを持つ神経細胞（および前進、後退に直接は関与しない神経細胞 [図では省略]）とが存在する。C. 走化性行動における線虫の動き。D. 温度走性行動における線虫の動き。図中の曲線は×印を実験開始位置としたときの足跡の模式図。いずれの場合も線虫は前進運動と、後退とそれに伴うランダムな方向転換とを適切に組み合わせて、濃度勾配のピーク、あるいは飼育温度へと到達する。

上での線虫の移動運動に関する次のような現象が相次いで報告された⁵⁻⁸⁾。十分にエサを与えて飼育した野生型の線虫を、エサのある寒天培地からエサのない寒天培地に移しかえると、移した直後の10-15分間は高頻度の後退運動と方向転換、これに伴う持続時間の短い前進運動が観察されるが、その後、時間経過に伴って後退運動の頻度は低下し、40分ほど経過したのちには、前進運動の持続時間は10倍程度まで増加する。この間、線虫に対しては新たな刺激を加えていないことから、培地移動直後の高頻度の後退運動は感覚環境の変化に対する応答行動、そして時間経過後の後退運動の頻度の低下は新しい環境への慣れの過程を反映していると考えられる。また同時に、このような移動行動の変化は、線虫を移しかえる前後の環境がエサの有無以外は全く同じであることから、直前までエサがあったことを知っている線虫が、再びエサを得るためにまずは近

傍の領域を探索し、エサがない状況が続くと徐々に探索範囲を拡大していくという、適応的な行動戦略としても解釈される。このような培地の移しかえ直後の高頻度の後退運動期は local search behavior⁵⁾（あるいは pivoting⁶⁾、もしくはミツバチ等の摂餌戦略との類似性から area-restricted search behavior⁷⁾、時間経過後の低頻度の後退運動期は long range dispersal⁸⁾（あるいは traveling⁶⁾）と呼ばれている (図 2A)。

われわれと Gray らはそれぞれ独立に、この培地の移しかえに伴う特徴的な移動行動の調節において、どの感覚神経を介して環境の変化を後退運動の頻度へと変換しているのかを調べるために、12種の感覚神経およびそれらのすぐ下流で情報を受け取る介在神経に対して1種類ずつ個別に、かつ系統的にレーザー破壊実験を行い、神経破壊個体の移動運動を観察した^{5,6)}。この結果、12種の感覚神経の

うちの3種 (AWC, ASK, AFD) を個別に破壊した場合に著しい後退頻度の低下が、また ASI 神経を破壊した場合に顕著な、AWA, ASE, ADF, ASH, ADL 神経を個別に破壊した場合にわずかな後退頻度の増加が認められた。さらに介在神経のうち AIB と AIZ のそれぞれの破壊により後退頻度の低下が、AIA と AIY の破壊により後退頻度の増加が観察された。レーザー破壊により後退頻度の減少をもたらす神経、増加をもたらす神経は、それぞれ本来は活性化されることによって後退運動を促進する、あるいは抑制する機能を持っていると考えられる (図 2B)。上の移動運動の調節では、培地の移しかえの直後には、後退運動促進性の感覚神経が高い活性を有し、数 10 分後には、活性が低下している、もしくはその逆であると推測される。またこの調節には、セロトニンやドーパミンなどを介した情報伝達も関与することが分かっている^{5,7,9)}。以上の結果は、線虫の感覚神経細胞の大半が四つの運動要素、とくに前進・後退の頻度の調節と密接に関与することを示しており、線虫においては、複雑な情報処理の結果として行動が出力されるというよりはむしろ、神経の種類によって生得的に決められた後退運動に対する促進性・抑制性のバランス、および相互の抑制が感覚-運動変換の本質であることを示唆している。

4. 走化性行動、温度走性行動における感覚-運動変換

エサのない実験用寒天培地の一点に線虫にとっての化学誘引物質をのせることで濃度勾配を作成し、それとは異なる一点に野生型の線虫をのせると、線虫は誘引物質に向かって移動する (走化性行動)。また線虫を、放射状、あるいは直線状の温度勾配を持つ実験用培地にのせると、直前の飼育温度に向かって移動する (温度走性行動)。このような誘引行動は古くから知られていたが、これらの行動が前進や後退運動の調節の観点から再検討されたのは、比較的最近のことである。

走化性行動において線虫は、化学誘引物質に向かって移動している際、すなわち移動に伴う誘引物質の濃度の経時変化が増加傾向にある場合には後退運動を抑制し、逆に誘引物質から遠ざかって、濃度の経時変化が減少傾向にある場合には、後退運動とそれに伴う方向転換 (方向転換後の進行方向はランダム) の頻度を増加させることが観察された (図 2C)¹⁰⁾。このとき線虫は前進運動の向きが偶然、誘引物質のある方向になるまで後退・方向転換を繰り返し、結果的に誘引物質のところへと到達する。このような行動戦略はバクテリアの示す走化性行動とも類似している。線

虫の感覚系は感覚刺激の有無を検出するだけでなく、刺激の増加や減少を検出して行動へと変換するシステムを持つことが推測される。

温度走性行動においても、よく似た後退頻度の調節が行われている。野生型の線虫を例えば 20°C で飼育し、寒天培地上の空間的温度勾配にのせるか、もしくは生理食塩水中に虫を入れて加温・冷却することで時間的温度勾配を与えると、直前の飼育温度よりも高い温度の範囲では、温度の上昇 (より暖かい方への移動) に応じて後退・方向転換頻度は増加し、温度の下降 (飼育温度へ移動) に応じて後退・方向転換頻度は低下する。結果的に線虫の移動行動の向きは、より冷たい方へと偏り (好冷性行動)、飼育温度に向かうことが可能となる (図 2D)¹¹⁾。現在のところ、飼育温度よりも低い温度範囲では明瞭な行動の特徴は見つかっておらず、より高い温度の方向への好温性行動による温度走性の行動上の戦略はよくわかっていない。

5. 線虫感覚神経のカルシウムイメージング

近年、線虫においては、カメレオンタンパク質や G-CaMP タンパク質などのカルシウムプローブ型タンパク質を用いた、神経細胞のカルシウムイメージングがよく行われている。体が透明で、少数の神経細胞に特異的に外来遺伝子を発現させるプロモーターの情報が発現している線虫では、生きたままで、場合によっては動いている状態で神経活動を観察できる、遺伝的プローブを用いた光学イメージングはきわめて有効である。またこのような解析は、神経細胞の応答が後退運動などの行動の調節とどのような関係にあるのかを知る上で不可欠でもある。

最近われわれは、感覚神経細胞のひとつ ASK に G-CaMP を発現させ、カルシウムイメージングを行った¹²⁾。上述のように ASK は、培地の移しかえに伴う高頻度の後退運動の際に、後退運動促進性の感覚神経として働く。またこのような後退運動の促進は、エサを除くことによって生じることから、われわれは ASK が感覚刺激の除去によって興奮するか、あるいは刺激の投与によって抑制される性質を持つのではないかと考えた。実際、ASK によって検出される感覚刺激であるリジンに G-CaMP を発現する線虫に投与したところ、細胞内カルシウム濃度の明瞭な低下が観察された (図 3)。このカルシウム濃度の低下は、刺激の投与の間持続した。また、持続的に刺激を与え続けたのちに刺激を除去した場合には、細胞内カルシウムは一過的に増加し、一旦、除去前レベルに低下するものの、継続的な刺激の除去下ではしばしば、オシレーションを伴っ

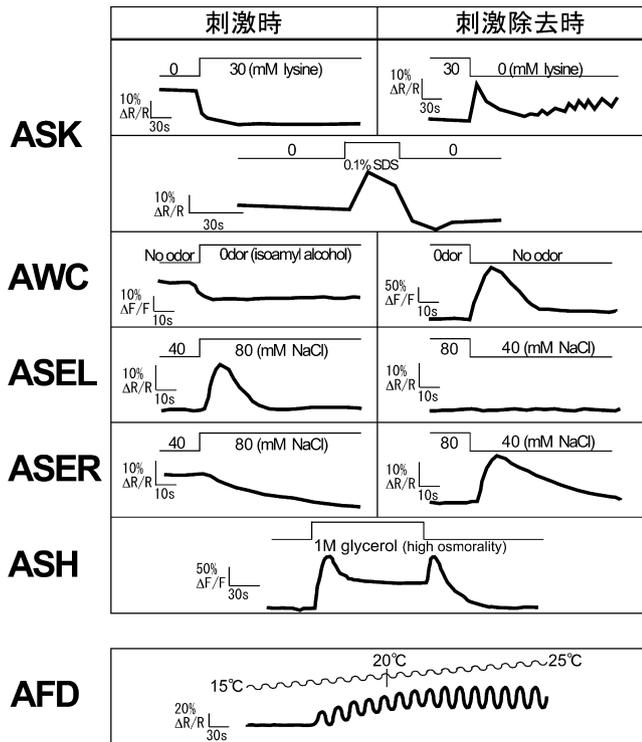


図3 線虫の感覚神経細胞におけるカルシウム動態 (文献12~16)

線虫の感覚神経細胞における刺激投与時および刺激除去時のカルシウム動態。図中、上段の細線は刺激の変化を、下段の太線はカルシウムプローブ型蛍光タンパク質を用いて観察された蛍光の変化を示す。

て増加する傾向が観察された。以上の結果は線虫の ASK 感覚神経が、ちょうど脊椎動物の視細胞がそうであるように、刺激の非存在下で相対的に高い活性を持ち、刺激の存在下で活性が低下する性質を持った神経であること、そして ASK が刺激の増加と減少の双方向の変化を検出する感覚神経であることを示している。さらにこのような性質は、培地を移しかえたときの行動とも矛盾しない。ASK 感覚神経はまた、線虫にとっての忌避物質である 0.1% SDS に対する忌避行動にも関与することが知られている。興味深いことに、線虫に 0.1% SDS を与えると ASK 感覚神経は若干の時間的な遅延を伴って、誘引物質の時とは全く逆の応答、すなわち、刺激の投与で興奮性の、除去で抑制性の応答を示した。上述のように感覚神経の固有の性質が、線虫の前進後退の調節を行っているとすれば、このような応答はきわめて合理的であるといえる。

最近の研究では、ASK 同様、培地を移しかえたときに後退運動を促進する感覚神経である AWC においては、感

覚刺激の投与時に弱い細胞内カルシウムの減少が見られ、刺激の除去時に強い増加が見られた¹³⁾。また、走化性において重要な ASE 神経は左右の神経が異なる機能を持つ(左側の ASEL がナトリウムイオンへの走化性に、右側の ASER が塩素イオンへの走化性に関与する)ことが知られるが、ASEL は刺激の投与に対して細胞内カルシウムの増加を示すが刺激の除去には応答せず、一方 ASER では刺激の投与に対して細胞内カルシウムのゆっくりとした減少が、刺激の除去に対して強い増加が観察された¹⁴⁾。ASH 神経は、さまざまな忌避性の刺激に対する負の走化性に関与する神経であるが、ASH では、刺激の投与時と除去時の両方で細胞内カルシウムの増加が認められた¹⁵⁾。さらに温度受容神経である AFD では、飼育温度よりもやや低い温度(飼育温度が 20°C であれば約 17°C)以上の範囲での温度上昇・下降に対して、それぞれ同程度の大きさの細胞内カルシウムの増加・減少が観察された¹⁶⁾。以上のように、これまでに観察されたすべての感覚神経細胞が、刺激に対してそれぞれに異なる応答性を示したことで、その多くが刺激の増加と減少の両方に対して応答したことは非常に興味深い。わずか 12 種類の感覚神経で、さまざまな環境変化を行動へと変換する線虫では、個々の感覚神経の応答性のレパートリーを増やすことによって、最初に述べた四つの運動要素の調節をより正確にしているのかもしれない。

おわりに

本稿ではスペースの都合から述べることはできなかったが、感覚神経細胞だけではなく、その下流の介在神経に対するカルシウムイメージングもすでに行われ始めている。今後は線虫の持つシンプルな感覚経路のより下流の神経細胞へと生理学的研究を進めることで、回路構造と神経細胞の活動パターンをふまえた感覚-運動変換機構が解明されていくと期待される。ここに紹介した内容に加えて、線虫のお家芸ともいえる遺伝学的な研究から得られた知見を総合していくことで、ひとつの生物における、分子-神経細胞-回路構造-行動という、感覚入力から行動出力に至る変換過程の全貌が明らかになる日はそう遠くないと思われる。このような研究は今後、より複雑な神経回路を持つ生物における情報処理機構を理解していく上で重要な示唆を与えてくれるに違いない。

- 1) White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., & Brenner, S. (1986) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 314, 1-340.
- 2) Croll, N.A. (1975) *J. Zool.*, 176, 159-176.

- 3) Bargmann, C.I. & Horvitz, H.R. (1991) *Neuron*, 7, 729-742.
- 4) Bargmann, C.I., Hartwig, E., & Horvitz, H.R. (1993) *Cell*, 74, 515-527.
- 5) Gray, J.M., Hill, J.J., & Bargmann, C.I. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 3184-3191.
- 6) Wakabayashi, T., Kitagawa, I., & Shingai, R. (2004) *Neurosci. Res.*, 50, 103-111.
- 7) Hills, T., Brockie, P.J., & Maricq, A.V. (2004) *J. Neurosci.*, 24, 1217-1225.
- 8) Tsalik, E.L. & Hobert, O. (2003) *J. Neurobiol.*, 56, 178-197.
- 9) Wakabayashi, T., Osada, T., & Shingai, R. (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 1767-1770.
- 10) Pierce-Shimomura, J.T., Morse, T.M., & Lockery, S.R. (1999) *J. Neurosci.*, 19, 9557-9569.
- 11) Ryu, W.S. & Samuel, A.D.T. (2002) *J. Neurosci.*, 22, 5727-5733.
- 12) Wakabayashi, T., Kimura, Y., Ohba, Y., Adachi, R., Satoh, Y., & Shingai, R. (2009) *Biochem. Biophys. Acta-General Subjects*, 1790, 765-769.
- 13) Chalasani, S.H., Chronis, N., Tsunozaki, M., Gray, J.M., Ramot, D., Goodman, M.B., & Bargmann, C.I. (2007) *Nature*, 450, 63-70.
- 14) Suzuki, H., Thiele, T.R., Faumont, S., Ezcurra, M., Lockery, S. R., & Schafer, W.R. (2008) *Nature*, 454, 114-117.
- 15) Chronis, N., Zimmer, M., & Bargmann, C.I. (2007) *Nat. Methods*, 4, 727-731.
- 16) Clark, D.A., Biron, D., Sengupta, P., & Samuel, A.D.T. (2006) *J. Neurosci.*, 26, 7444-7451.

若林 篤光

(岩手大学工学部応用化学・生命工学科)

Sensory-motor transformation pathway in *Caenorhabditis elegans*

Tokumitsu Wakabayashi (Department of Chemistry and Bioengineering, Faculty of Engineering, Iwate University, 4-3-5 Ueda, Morioka, Iwate 020-8551, Japan)

動物における Dicer 依存性小分子 RNA 機構

1. はじめに

microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) はそれぞれ miRNA 経路および RNA interference (RNAi) 経路で機能している小分子 RNA である。これらの小分子 RNA には、様々な共通点がある。例えば、両者はヘアピン状 RNA あるいは二本鎖 RNA から、細胞質に存在する RNase III である Dicer により切り出され、その後エフェクター分子である Argonaute タンパク質 (AGO) に取り込ま

れる (図 1)。一方で生成機構に相違点もある。通常、miRNA の前駆体は核内で転写された長い RNA 分子が Drosha と呼ばれるもう一つの RNase III によって切断されて生成される。siRNA と miRNA は長さも非常に似ているが、siRNA が 21 塩基長に強いピークを持つ分布を示すのに対して miRNA は 21-24 塩基長程度のやや幅の広いピークを持つ。この十年ほどの間の大量シーケンスやコンピューターを用いた遺伝子予測により、現在ではおよそ 1 万の miRNA 遺伝子が登録されている¹⁾。さらに重要なこととして、これらの試みから予想外の Dicer 依存性小分子 RNA 遺伝子群が見いだされてきた。本稿では、これらの発見のうち特に最近明らかになってきた miRNA 経路と siRNA 経路の新しい側面について解説したい。

2. 様々な種類の Dicer 依存性小分子 RNA

2.1 Drosha 非依存的に産生される miRNA

通常の miRNA はおよそ 30 塩基長の二本鎖領域を持ち、成熟 miRNA の配列を含む“upper stem”領域と、10 塩基程度の“lower stem”領域に分けられる²⁾ (図 2A)。lower stem 領域は Drosha の補因子である Pasha (哺乳類では DGCR8 と呼ばれる) により認識され、Drosha の切断部位が決められる。しかし、通常の miRNA より短いヘアピン構造から産生される小分子 RNA も見つかっている。このような小分子 RNA の多くはヘアピン構造をとる短いイントロンの 5' および 3' 末端に正確にマップされており、これらのヘアピン状イントロンは「mirtron」と名付けられた³⁾ (図 2B)。mirtron は、Drosha による切断を受けるのではなく、スプライシングおよび投げ縄状イントロンの脱ブランチ反応を経て miRNA 前駆体様の RNA へと変換され、通常の miRNA 同様に Dicer-1 により切断を受けたのち AGO1 に取り込まれる^{3,4)} (図 1a)。mirtron の Pasha/DGCR8 非依存的な生成は、その後ショウジョウバエやマウスの変異体の解析でも確認された^{5,6)}。また、マウスの DGCR8 あるいは Dicer ノックアウト細胞を用いた解析では、mirtron のみならず、Dicer 依存性、Drosha 非依存性小分子 RNA 遺伝子が多数発見された。例えば、この研究では内在性 short hairpin (sh) RNA が発見されている。ノックダウン実験に用いられている shRNA のように、RNA ポリメラーゼ III が miRNA 様の短い転写産物を生成しているのではないかと提唱されている⁵⁾。また一部の tRNA から Dicer 依存性に産生される小分子 RNA が見つかっている。これらの小分子 RNA はクローバー型の tRNA からではなく、ヘアピン構造をとった tRNA 分子から産生されると考えら