

- J.*, 21, 1176–1186.
- 13) Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, 76, 2879–2886.
- 14) Lo Conte, L., Chothia, C., & Janin, J. (1999) *J. Mol. Biol.*, 285, 2177–2198.
- 15) Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C.M., Pacold, M.E., Ellison, C.D., Anderson, K.E., Butler, P.J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P.T., Stephens, L., & Williams, R.L. (2001) *Mol. Cell*, 8, 829–839.

本坊 和也

(北海道大学大学院薬学研究院構造生物学研究室)

Crystal structure of p40^{phox} and regulation mechanism of superoxide generation

Kazuya Honbou (Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Frontier Research Center for Post-genome Science and Technology, Kita-21 Nishi11 Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan)

アンチセンス RNA ふたたび！

1. はじめに

哺乳類のゲノムにおけるタンパク質をコードする領域はほんのわずかであり、コードしない領域は98~99% (ヒト) にのぼる¹⁾。ところが転写産物について見てみると、タンパク質をコードするメッセンジャー RNA (mRNA) 以外に、タンパク質をコードしない転写産物がたくさん存在する。この non-coding RNA (ノンコーディング RNA, 非コード RNA; 以後 ncRNA と略す) はタンパク質をコード

しない、あるいはコードしたとしても短いタンパク質しかコードできない、多種多様な RNA 転写物の総称である。広義ではリボソーム RNA (rRNA) と転移 RNA (tRNA) を含むが、狭義では rRNA と tRNA を除く RNA 種を指すことが多い (表 1)。最近の網羅的な cDNA 解析により、予想外に多くの ncRNA がヒトにもマウスにも存在していることが見いだされた^{1~3)}。しかし機能が同定されているものはわずかであり、残りは transcript of unknown function (TUF)^{1,4)} とよばれるものである。このうちアンチセンス転写物は、タンパク質をコードするセンス鎖 (mRNA 側) の相補鎖、すなわちアンチセンス鎖と同じ配列を持っている。転写因子 HIF-1 α のアンチセンス転写物のように、今までにも偶然に見つかってはいたが、さほど注目されなかった。ところが網羅的な cDNA 解析により、かなり多くのアンチセンス転写物が転写されていることがわかってきた^{1,5)}。アンチセンス転写物を含めた ncRNA はガラクタ (junk) ではなく、生理的意義を持った「機能性 RNA」ではないかと予想されている。本稿ではアンチセンス転写物の機能に焦点を当て、最新の知見について紹介する。

2. アンチセンス転写物はどうのようにしてできるか？

アンチセンス転写物の合成のされ方には、いくつかのタイプがあることがわかった^{1,6)}。翻訳領域を含む mRNA 側の転写領域 (エクソン) と重なるかどうかという観点から転写領域は、1) mRNA の相補鎖側 (overlapping), 2) イントロン内 (intronic), 3) 遺伝子間 (intergenic) の場合に分けられる (図 1)。1) の場合には mRNA とアンチセンス転写物が重なり合う部分があるので、直接 RNA どうしが相互作用しうる (後述の iNOS)。また転写後のスプライシングを受けるか、受けないかによって 2 種類あるの

表 1 哺乳類の ncRNA の分類

RNA 種 (略号)	長さ (nt)*	機能
ribosomal RNA (rRNA)	120~4,700	翻訳
transfer RNA (tRNA)	70~90	翻訳
狭義の ncRNA :		
アンチセンス転写物 antisense transcript (AS transcript)	不定	mRNA の安定化, クロマチン制御など
small nuclear RNA (snRNA)	100~500	mRNA 前駆体のスプライシング
small nucleolar RNA (snoRNA)	60~330	RNA の修飾など
microRNA (miRNA)	20~23	翻訳効率, クロマチン制御など
Piwi-interacting RNA (piRNA)	25~31	Piwi タンパク質と相互作用
その他の機能がわかっている RNA (テロメラーゼ RNA, SRA など)	不定	テロメア合成 (テロメラーゼ RNA), 転写活性化 (SRA) など
機能不明の ncRNA = transcript of unknown function (TUF)	不定	不明

*nt = nucleotides.

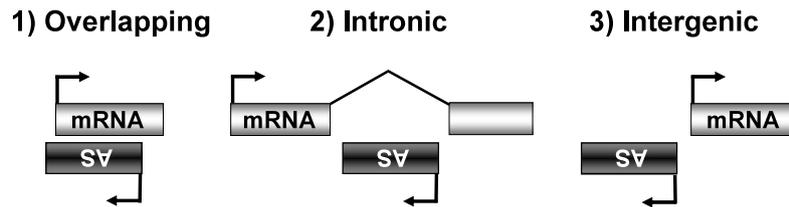


図1 mRNAとアンチセンス転写物の転写領域の位置関係

1) アンチセンス転写物 (AS) が mRNA の相補鎖側にあり、転写領域が重なり合っている (overlapping). 最も多いタイプで、iNOS 遺伝子の場合には mRNA-アンチセンス転写物間で相互作用を起こす。

2) イントロン内 (intronic) でアンチセンス転写物が転写される。

3) 遺伝子間 (intergenic) でアンチセンス転写物が転写される。

ボックスは転写領域、矢印は転写開始点、ボックスをつなぐ線はスプライシングを示す。

で、アンチセンス転写物にはいくつかのタイプが生ずる。転写開始点または終止点がはっきりせず、ノーザン解析においてはアンチセンス転写物のバンドがスメア状になることが多いが、非特異的なハイブリダイゼーションによるものではない⁷⁾。さらに、mRNAに見られる3'側のポリ(A)がないことも多い¹⁾。

アンチセンス転写物の発現はどのように変化するのだろうか? 多数の mRNA とアンチセンス転写物のペアについて調べた報告では、刺激により mRNA とアンチセンス転写物の発現量が一緒に増減するケースが多いが、反比例する場合もある⁵⁾。転写因子の結合部位 (シスエレメント) がセンス鎖側とアンチセンス鎖側では異なることがあるので、アンチセンス転写物の発現機構を解析するためにはアンチセンス鎖側のプロモーターの構造と機能の解析が不可欠である。

3. アンチセンス転写物の機能

このように哺乳類の細胞内には多種多様なアンチセンス転写物が存在している。マウスの脳において、多数の ncRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析したところ、200塩基を越えるような長い ncRNA が特定の組織や細胞に局在していることが報告された⁸⁾。それならば、アンチセンス転写物はいったい生物においてどのような役割を果たしているのだろうか? ncRNA が、どのように遺伝子発現に影響を与えるかについての調節モデルが提唱されている⁹⁾。実際、miRNA は腫瘍壊死因子 TNF- α mRNA の翻訳効率に密接に関係している¹⁰⁾。アンチセンス転写物の場合には翻訳効率か、あるいは mRNA の安定性に関与しているのではないかと予想はされていたが、実際に働いているという直接証拠は見つからず、mRNA とア

ンチセンス転写物の相互作用に関する実験的証拠もほとんどなかった。

最近、我々はアンチセンス転写物が mRNA を安定化させることを見だし、一方、別のグループがヒストンのアセチル化状態を変化させることを報告したので、以下に紹介する。

4. mRNA を安定化する場合: iNOS 遺伝子

一酸化窒素 nitric oxide (NO) は細菌やウイルスに感染した際、肝細胞やマクロファージで誘導型一酸化窒素合成酵素 inducible NO synthase (iNOS) により合成され、炎症の病態に深く関わっている。NO の誘導は iNOS 遺伝子の誘導によって起こるものであり、プロモーターにおける転写調節でほとんど説明できると考えられていた。しかし、サリチル酸などの薬剤の存在下では iNOS mRNA が不安定となり¹¹⁾、iNOS mRNA の 3'-非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結してレポーターアッセイをしてみると、mRNA の安定性が変化する¹²⁻¹⁴⁾。そこでセンスプライマーを用いた鎖特異的 RT-PCR 法で解析してみると、iNOS 遺伝子から mRNA の 3'-非翻訳領域と重なる形でアンチセンス転写物が生成されていることが確認できた¹⁵⁾ (図 2A)。ラット肝細胞におけるアンチセンス転写物の発現は iNOS mRNA の発現パターンと同じで、インターロイキン 1 β (IL-1 β) による誘導を受けた (図 2B)。さらに iNOS アンチセンス転写物は *in vivo* (ラット) でも存在した^{16,17)}。

一般に、細胞内で RNA は単なる線状構造ではなく、二次構造をとっていると考えられ、mfold などのプログラム¹⁸⁾で予測することができる。mRNA とアンチセンス転写物の転写領域が重なり合う場合 (図 1 の 1)、二次構造上のループ部分が接して RNA-RNA 相互作用が起こりうる。

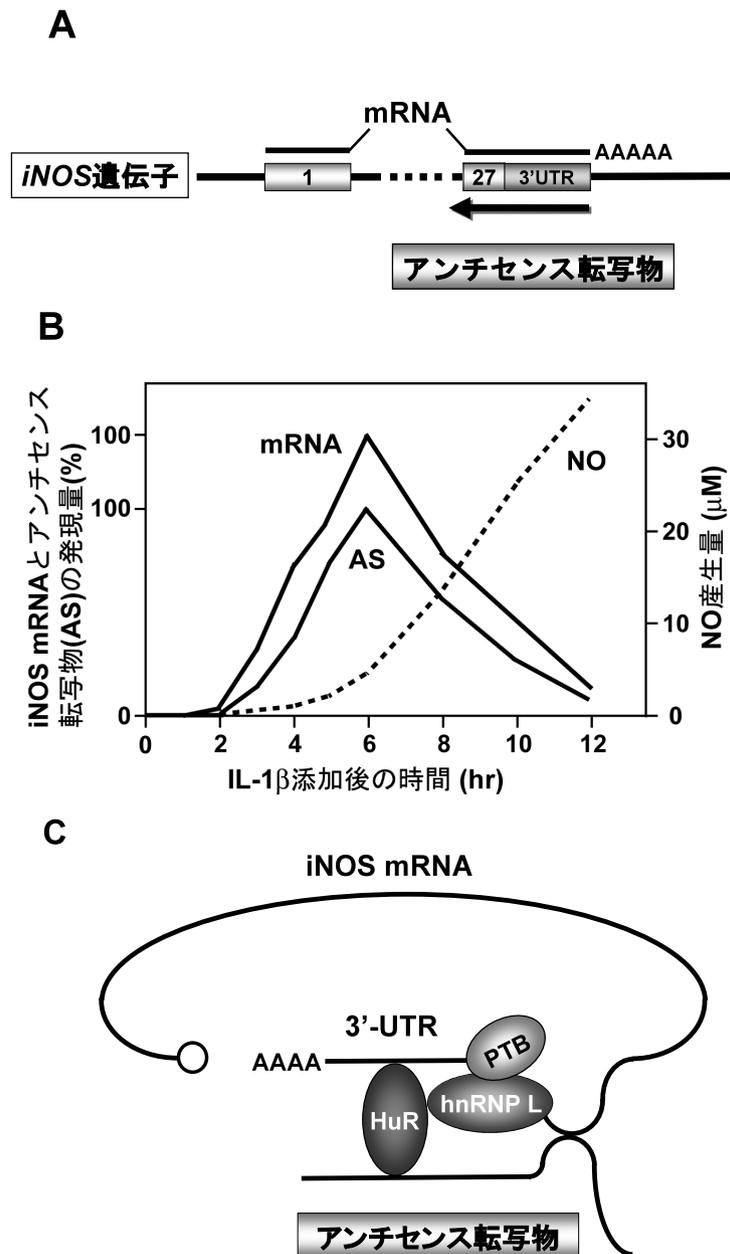


図2 iNOS mRNA とアンチセンス転写物の発現
 (A) アンチセンス転写物の合成. ラット *iNOS* 遺伝子は 27 個のエキソンから構成されているが, エキソン 27 には 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) が含まれる. アンチセンス転写物 (矢印) はエキソン 27 の相補鎖 (アンチセンス鎖) と同一の配列を持つ.
 (B) ラット肝細胞における *iNOS* 遺伝子の誘導. IL-1 β を培地に添加した際の *iNOS* mRNA および *iNOS* アンチセンス転写物 (AS) の発現量. リアルタイム PCR で測定して内部標準 (EF-1 α) で校正し, 6 時間後の mRNA 量を 100 としたときの相対値 (%) を示した. 産生された NO 量は破線で示した.
 (C) *iNOS* mRNA 上での複合体形成 (モデル). アンチセンス転写物は *iNOS* mRNA や RNA 結合タンパク質と結合し, 複合体を形成して mRNA をエキソヌクレアーゼから守り, mRNA を安定化する.

iNOS mRNA とアンチセンス転写物においても同様な RNA-RNA 相互作用があると予測して、いくつかの実験を行った¹⁵⁾。まず iNOS mRNA と同じ配列を持つオリゴヌクレオチド (センスオリゴ) を細胞に導入して、RNA-RNA 相互作用を阻害すると iNOS mRNA 量が減少した。つぎに iNOS mRNA の 3'-非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミドとともに、iNOS アンチセンス転写物を過剰発現させると、ルシフェラーゼ mRNA の安定性が増した。酵母 RNA ハイブリッド法の結果を併せると、iNOS アンチセンス転写物は iNOS mRNA と相互作用することによって mRNA を安定化させていることが明らかとなった。一方、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法によれば、iNOS mRNA とアンチセンス転写物は RNA 結合タンパク質 (HuR, hnRNP L, PTB) と結合した。mRNA-アンチセンス転写物間に相互作用が起こるのをきっかけとして RNA 結合タンパク質がリクルートされ、複合体ができて RNA の分解を防ぎ、iNOS mRNA が安定化されるモデルが考えられる (図 2C)。この複合体は細胞質に存在することが示唆されている。

アンチセンス転写物による mRNA の安定化機構はまったく新しいものであるが、iNOS 遺伝子以外のサイトカイン遺伝子でも、アンチセンス転写物による転写後調節が行われている可能性がある。

5. ヒストンの脱アセチル化を介する場合

ヒストン脱アセチル化を介してクロマチン制御する場合は 2 例報告されている。一つめは内皮型一酸化窒素合成酵素 *endothelial NO synthase (eNOS)* 遺伝子である。eNOS は iNOS と異なり、構成的に心血管系の内皮で発現している。eNOS 遺伝子でもアンチセンス転写物が産生されるが、スプライシングを受けてイントロンと遺伝子間にまたがる複数の転写物ができ、血管内皮以外でも広く発現している¹⁹⁾。特徴的なのは、eNOS アンチセンス転写物は長い翻訳領域を有しており、その産物が eNOS タンパク質と 87% の同一性を有していることである。eNOS アンチセンス転写物を過剰発現させると eNOS mRNA 量が減少し、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチン A を添加すると、eNOS アンチセンス転写物が増加して mRNA 量が減少する。これらの結果から eNOS アンチセンス転写物は、クロマチン制御により eNOS 遺伝子の発現を抑制すると考えられている。

2 番目の例は酵母の *PHO84* 遺伝子の場合である。酵母においてもアンチセンス転写物や遺伝子間の転写物が多く

発見されており、*PHO84* 遺伝子のアンチセンス転写物はヒストン脱アセチル化を介して *PHO84* mRNA の発現を抑えている²⁰⁾。

6. 今後の展望

これまで機能のわかったアンチセンス転写物の例はひじょうに少なく、アンチセンス転写物の機能解析はやっと始まったところである。ncRNA の中で最も研究されているのが miRNA であるが、miRNA は複数の mRNA の 3'-非翻訳領域を標的とする。miRNA の標的遺伝子は転写因子やクロマチン修飾因子などで、一般にサイトカインやその受容体の mRNA は標的となっていない²¹⁾。実際、iNOS mRNA の 3'-非翻訳領域には miRNA の結合し得る配列は存在しなかった¹⁵⁾。アンチセンス転写物と miRNA の調節機構がそれぞれ独立したものか、関連したものは今後の研究を待つ必要がある。

ncRNA は生理的意味を持たないのではないのかと疑う人はいまだにいる。われわれの細胞の中に多種多様な ncRNA が存在し、またできそこないの RNA を分解する機構 (RNA 品質コントロール) が存在するのも事実である。ここで紹介した調節機構以外にも、アンチセンス転写物の新しい機能が発見される可能性が高く、今後の展開から目が離せない。

- 1) Cheng, J., et al. (2005) *Science*, **308**, 1149-1154.
- 2) Carninci, P., et al. (2005) *Science*, **309**, 1559-1563.
- 3) Ota, T., et al. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 40-45.
- 4) Willingham, A.T. & Gingeras, T.R. (2006) *Cell*, **125**, 1215-1220.
- 5) Katayama, S., et al. (2005) *Science*, **309**, 1564-1566.
- 6) Kiyosawa, H., Yamanaka, I., Osato, N., Kondo, S., & Hayashizaki, Y. (2003) *Genome Res.*, **13**, 1324-1334.
- 7) Kiyosawa, H., Mise, N., Iwase, S., Hayashizaki, Y., & Abe, K. (2005) *Genome Res.*, **15**, 463-474.
- 8) Mercer, T.R., Dinger, M.E., Sunken, S.M., Mehler, M.F., & Mattick, J.S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 716-721.
- 9) Morey, C. & Avner, P. (2004) *FEBS Lett.*, **567**, 27-34.
- 10) Vasudevan, S. & Steitz, J.A. (2007) *Cell*, **128**, 1105-1118.
- 11) Sakitani, K., Kitade, H., Inoue, K., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Okumura, T., & Ito, S. (1997) *Hepatology*, **25**, 416-420.
- 12) Matsui, K., Kawaguchi, Y., Ozaki, T., Tokuhara, K., Tanaka, H., Kaibori, M., Matsui, Y., Kamiyama, Y., Wakame, K., Miura, T., Nishizawa, M., & Okumura, T. (2007) *JPEN J Parenter. Enteral. Nutr.*, **31**, 373-381.
- 13) Habara, K., Hamada, Y., Yamada, M., Tokuhara, K., Tanaka, H., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *Nitric Oxide-Biol. Chem.*, **18**, 19-27.
- 14) Yoshida, H., Kwon, A.-H., Kaibori, M., Tsuji, K., Habara, K.,

- Yamada, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *Nitric Oxide-Biol. Chem.*, 18, 105-112.
- 15) Matsui, K., Nishizawa, M., Ozaki, T., Kimura, T., Hashimoto, I., Yamada, M., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *Hepatology*, 47, 686-697.
- 16) Tanaka, H., Uchida, Y., Kaibori, M., Hijikawa, T., Ishizaki, M., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Tokuhara, K., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S., & Okumura, T. (2008) *J. Hepatol.*, 48, 289-299.
- 17) Hijikawa, T., Kaibori, M., Uchida, Y., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., & Okumura, T. (2008) *Shock*, 29, 740-747.
- 18) Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res.*, 31, 3406-3415.
- 19) Robb, G.B., Carson, A.R., Tai, S.C., Fish, J.E., Singh, S., Yamada, T., Scherer, S.W., Nakabayashi, K., & Marsden, P.A. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 37982-37996.
- 20) Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppo, G., & Stutz, F. (2007) *Cell*, 131, 706-717.
- 21) Asirvatham, A.J., Gregorie, C.J., Hu, Z., Magner, W.J., & Tomasi, T.B. (2008) *Mol. Immunol.*, 45, 1995-2006.

西澤 幹雄¹, 奥村 忠芳^{2,3}

¹立命館大学生命科学部生命医科学科,

²立命館大学総合理工学研究機構,

³関西医科大学医化学教室)

The revival of natural antisense transcripts

Mikio Nishizawa¹ and Tadayoshi Okumura^{2,3} (¹Department of Biomedical Sciences, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, Nojihigashi 1-1-1, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan; ²The Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University, Nojihigashi 1-1-1, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan; ³Department of Medical Chemistry, Kansai Medical University, Fumizono 10-15, Moriguchi, Osaka 570-8506, Japan)

トランスサイレチンの構造変化と細胞毒性

1. はじめに

タンパク質が凝集して線維状になった物質はアミロイド線維とよばれ、異常なアミロイド沈着が個々の臓器に障害を与える。アミロイド線維はβシート構造に富んだ構造を有し、幅が10~20nmで長さは数μmにも達する。また、コンゴレッド色素に染色され、偏光顕微鏡下で黄緑色の偏光を示す。アミロイド沈着が原因と考えられる疾患はアミロイドーシスと呼ばれ、原因となるタンパク質やペプチドは現在までに20種類以上知られている。ところが一

方で、アミロイドーシスとは直接関係のないタンパク質でも実験条件によっては凝集してアミロイド線維になることから、アミロイド線維はタンパク質がとりうる一般的な構造の一つであると考えられている。ここでは、代表的なアミロイドタンパク質であるトランスサイレチン (TTR) に関する近年の研究を紹介したい。

2. トランスサイレチンとアミロイドーシス

TTRは、127アミノ酸残基からなる分子量14kDaのタンパク質で、四量体として血中に存在しチロキシンとレチノール結合タンパク質の輸送を行う。TTRの血中濃度は0.2~0.3mg/mlであり、90%以上が肝臓で産生されるが、脳室脈絡叢、網膜、脾臓などにおいても産生される。TTR遺伝子に変異を受けやすい遺伝子で、これまでに100種類以上の変異体が発見されており、その大部分がアミロイドーシスを引き起こす¹⁾。TTRが原因のアミロイドーシスはTTRアミロイドーシスとよばれ、変異型TTRが蓄積するタイプと野生型TTRが蓄積するタイプがある。変異がない場合は高齢で発症するが、変異型TTRが蓄積する場合は20歳代~30歳代で発症するのが一般的である。

3. トランスサイレチンの立体構造

TTRのX線結晶構造解析の歴史は古く、1971年にはBlakeらによって結晶構造が報告されている²⁾。その構造は、βリッチなサブユニットがホモ四量体を形成しており、四量体の中央にチロキシンが結合するポケットが位置している(図1)。トランスサイレチンの単量体分子は、A~Hの8本のβストランドと1本の短いαヘリックスからなり、βストランドD, A, G, HとC, B, E, Fから成るβシートがギリシャキーバレル様のトポロジーを形成している。単量体同士の結合は水素結合によって安定化されており、Hストランドが別の単量体のH'ストランドと6本の水素結合で連結され、FストランドとF'ストランドが2本の水素結合で連結されている。水素結合は二量体と二量体をつなぎとめるためにも重要で、A19, G22, Y114, V122が8本の水素結合を形成し二量体同士を連結させている(図1)。

野生型TTRの立体構造に加えて、アミロイドーシスの原因となる変異型TTRの立体構造も多数報告されており、病原性アミノ酸変異はTTRの立体構造を変化させると提案されている。しかし、アミノ酸変異による立体構造変化はわずかであり、その変化は変異体によって異なっていた。Hornbergらは、23種類の変異型TTRの立体構造と野