

「機能性 RNA プロジェクト」
事後評価報告書

平成 22 年 11 月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

平成22年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 村田 成二 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

目次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-15
2. 1 機能性RNA解析のための支援技術 ・ツールの開発	
2. 2 機能性RNAの探索・解析のための バイオインフォマテックス技術の開発	
2. 3 機能性RNAの機能解析	
3. 評点結果	1-37
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1
参考資料2 評価に係る被評価者意見	参考資料 2-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「機能性 RNA プロジェクト」の事後評価報告書であり、第 25 回研究評価委員会において設置された「機能性 RNA プロジェクト技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第 26 回研究評価委員会（平成 22 年 11 月 11 日）に諮り、確定されたものである。

平成 22 年 11 月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 研究評価委員会

「機能性 RNA プロジェクト」(事後評価)

分科会委員名簿

(平成22年6月現在)

	氏名	所属、役職
分科 会長	あいば ひろじ 饗場 弘二	鈴鹿医療科学大学 薬学部 教授、名古屋大学 名誉教授
分科 会長 代理	おおの むつひと 大野 睦人*	京都大学ウイルス研究所 遺伝子動態調節研究部門 情報高 分子化学研究分野 形質発現学学科 教授
委員	ごとう すすむ 五斗 進*	京都大学 化学研究所 バイオインフォマティクスセンター 准教授
	とまり ゆきひで 泊 幸秀*	東京大学 分子細胞生物学研究所 准教授
	なかい けんた 中井 謙太*	東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター 教授
	なんかい ひろかず 南海 浩一	(株)ジーンデザイン プロセス開発部 部長
	ひらお いちろう 平尾 一郎	(独)理化学研究所 生命分子システム基盤研究領域 核酸 合成生物学研究チーム チームリーダー

敬称略、五十音順

注* : 実施者の一部と同一組織であるが、「NEDO 技術委員・技術評価委員規程 (平成22年7月1日改正)」第34条(評価における利害関係者の排除)により、利害関係はないとする。

審議経過

- 第1回 分科会（平成22年6月3日）
 - 公開セッション
 - 1. 開会、分科会の設置、資料の確認
 - 2. 分科会の公開について
 - 3. 評価の実施方法について
 - 4. 評価報告書の構成について
 - 5. プロジェクトの概要説明
 - 非公開セッション
 - 6. プロジェクトの詳細説明
 - 7. 全体を通しての質疑
 - 公開セッション
 - 8. まとめ・講評
 - 9. 今後の予定、その他、閉会

- 第26回研究評価委員会（平成22年11月11日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

健康安心プログラムの目標達成のための本プロジェクトは、RNA を利用した新しい形の医療技術、創薬、診断技術など新規産業の創成につながる普遍的な基盤を形成するものであり、NEDO の事業として妥当である。また、加速予算の投入やテーマの整理および計画の見直しなど適切なマネジメントが行われた。そして、3つの研究開発項目に沿って世界的水準の研究が進められ、世界的に見ても非常に優れた基礎研究と独創的な基盤ツールが数多く生み出されたことは高く評価でき、真に世界をリードするような技術を育成することができた。さらに、それらに立脚した実用化に向けて、大きな一歩を踏み出した。

しかしながら、3つの研究開発項目は基本的にそれぞれ独自に展開され、研究グループ間の連携は十分とはいえず、各々の有機的な繋がりによる新たなコンセプトや基盤技術の創出は十分ではなかった。また、得られた成果の他の競合技術と比較した場合の優位性については具体的に検証することが必要である。さらに、今後の教訓として、基盤技術としてのプロジェクト全体の知財戦略を組み立てる組織・システムや、一般向けの情報発信が必要である。

2) 今後に対する提言

機能性 RNA の研究は、各グループのリーダーを中心にオリジナリティーの高い研究が展開された。しかしながら、この分野は世界的に医薬への応用も含めてさらに進展しているので、本プロジェクトの様な、極めて重要でありながらも、医薬応用の基盤となるべき基礎的知見が絶対的に不足している分野においては、5年という年限は明らかに短い。また我が国の世界的競争力を持続させるという意味においても、継続的な研究促進が強く望まれ、長期的な視野に基づいた次期プロジェクトを早期に立ち上げる必要がある。NEDO がこのような基盤研究をひきつづきサポートすることは大変意義がある。

今後もこの3グループを中心に連携し、機能性 RNA を用いる創薬で世界をリードしていくことを期待する。その際、サブプロジェクト間の協力関係をもう少し強調できればよりよい。例えば、バイオインフォマティクス技術の開発では、機能解析や実験技術と絡めた応用を強調できればより良い成果が期待される。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

健康安心プログラムの目標達成のための本プロジェクトは、RNA を利用した新しい形の医療技術、創薬、診断技術など新規産業の創成につながる普遍的な基盤を形成するものであり、NEDO の事業として妥当である。さらには、世界的な RNA 研究の現状から大規模プロジェクトとして実施したことが重要であり、民間企業あるいは大学であっても通常の予算規模では到底実現できないものである。将来的には実用化も考えられることから、本プロジェクトの意義は大きい。

一方、プロジェクト終了後も踏まえた長期的な戦略の中での位置付けや、海外の動向や市場予測などの説明があれば、さらに本事業の妥当性が明確になった。さらに、本プロジェクトのような応用基盤発掘型のものが NEDO のプロジェクトとして実施されたことは大きな意味がある。今後、得られた技術をどう事業化するかなどという観点で新しいプロジェクトを立ち上げることを期待する。

2) 研究開発マネジメントについて

本プロジェクトの目標については、予測手法・解析手法の開発、データベースの構築、数十の RNA の機能解析と明確である。また、3 グループ共に目標をクリアするための妥当なスケジュールと予算が立案されている。従って、当初の見通しの確かさならびに、研究開発目標と研究開発計画の妥当性が裏付けられたといえる。

さらに、中間評価後に、業績が上がっているところへの加速予算の投入や2 テーマを整理するなどの進捗状況を把握する努力が行われ、計画の見直しなどにも適切なマネジメントが行われた。また、チームリーダーに若い独創性の高い人材を起用するなど研究開発実施者の事業体制も妥当であった。

しかしながら、本プロジェクト期間中は、3 つのテーマでそれぞれの知見を蓄積することが最優先事項になり、3 つのテーマ間がお互いに十分フィードバックし合うレベルにまでは至らず、グループ間協力の相乗効果という点でも、3 つの研究開発項目間の連携についてのマネジメントに問題を残した。また、今後の教訓として、基盤技術としてのプロジェクト全体の知財戦略を組み立てる組織・システムがあるとなお良かった。

3) 研究開発成果について

機能性 RNA 研究は今まさに急速に進展している分野の一つであるが、本プロジェクトの3つの研究開発項目ともに、各テーマ毎においておおむね目標は達成している。機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発、機能性 RNA データベースの構築、機能性 RNA マススペクトロメトリーの開発、微量 RNA 精製技術の開発、長鎖 RNA 合成法の確立、核内 RNA ノックダウン法の確立と核内 ncRNA の新機能の解明、piRNA の末端形成機構と生合成経路のモデルを提唱、ゲノム安定性に関する多数の esiRNA の発見、などは世界初あるいは世界最高水準の独創的な成果であり、かつ汎用性が高い。世界的に見てもユニークで独創性の高い業績が多くでたことは高く評価出来るし、真に世界をリードするような技術を育成することが出来た。さらに、多くの研究成果は、適切に論文として発表されており、また特許出願もなされている。しかし、得られた成果の他の競合技術と比較した場合の優位性については具体的に検証することが必要である。また、今後の教訓として、一般向けの情報発信がもっとあるとなお良かった。

4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトは基盤的な性質が強いが、その中において、実用化のイメージを踏まえた研究が推進され、既に応用のめどが立っているものの他に、応用につながりそうなシードも多く見いだされ、全体としてみれば十分評価出来る。特に、RNA マススペクトロメトリー、RNA 自動精製装置、長鎖 RNA 合成法、などの技術が実用化された場合にはその波及効果は大きい。また、RNA 配列の比較、整列を高精度・超高速で行うソフトウェア、核内 RNA ノックダウン法、などは関連分野への波及効果が期待される。

新たな知見が得られつつある RNA 研究の中で、国際レベルでの RNA 研究の進捗に本プロジェクトが大きく寄与して、まだ揺籃期にある我が国の RNA 産業育成のためになにがしかの貢献が出来た。

しかしながら、実用化に際しては、開発された技術を他の競合技術と比較して、本当に世界をリードして実用化の勝算があるのかなど、優位性と問題点を明確にすることが必要である。また、プロジェクト全体としての総合的な出口イメージの明確化が求められる。

研究評価委員会におけるコメント

第26回研究評価委員会（平成22年11月11日開催）に諮り、了承された。研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所 属、役 職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 (科学技術ジャーナリスト養成プログラム) 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	オリンパスビジネスクリエイツ株式会社 事業企画本部 戦略探索部 探索2グループ シニアマネージャー
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	大西 優	株式会社カネカ 顧問
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 相談役
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	小柳 光正	東北大学未来科学技術共同研究センター 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授	

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

健康安心プログラムの目標達成のための本プロジェクトは、RNA を利用した新しい形の医療技術、創薬、診断技術など新規産業の創成につながる普遍的な基盤を形成するものであり、NEDO の事業として妥当である。また、加速予算の投入やテーマの整理および計画の見直しなど適切なマネジメントが行われた。そして、3つの研究開発項目に沿って世界的水準の研究が進められ、世界的に見ても非常に優れた基礎研究と独創的な基盤ツールが数多く生み出されたことは高く評価でき、真に世界をリードするような技術を育成することができた。さらに、それらに立脚した実用化に向けて、大きな一步を踏み出した。

しかしながら、3つの研究開発項目は基本的にそれぞれ独自に展開され、研究グループ間の連携は十分とはいえず、各々の有機的な繋がりによる新たなコンセプトや基盤技術の創出は十分ではなかった。また、得られた成果の他の競合技術と比較した場合の優位性については具体的に検証することが必要である。さらに、今後の教訓として、基盤技術としてのプロジェクト全体の知財戦略を組み立てる組織・システムや、一般向けの情報発信が必要である。

〈肯定的意見〉

- 機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発、機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発、および機能性 RNA の機能の解明、という3つの研究開発項目に沿って研究開発が進められ、全体として大きな研究の進展がみられ、当初の研究目標は達成された。3つの研究開発項目の推進にふさわしいサブグループリーダーと関連グループを組織されたプロジェクトリーダーの洞察力と見識に敬意を表する。
- 基礎科学的な観点から世界的に見てもユニークで独創性の高い業績が多くできたことは高く評価できる。応用面については、3つのテーマで進行度にかなり差があったが、既に応用のめどが立っているものの他に、応用につながりそうなシードも多く見いだされ、全体としてみれば十分評価できると思う。このプロジェクトの目的は、プロジェクト期間内（5年間）に応用に直結した成果を出すというものではなく、応用基盤技術の整備であることに留意する必要がある。
- 総じてオリジナリティーの高い研究を進めており、世界レベルの成果も多数出ている。
- 本プロジェクトからは、非常に優れた基礎研究と独創的な基盤ツールが数

多く生み出され、それらにしっかりと立脚した実用化に向けて、大きな一歩を踏み出したと言える。

- 3つの研究グループそれぞれが目標を上回るすばらしい成果を出していた。事業の目的である核酸医薬の創製という分野では、これまで欧米に比べ日本はかなり遅れていると思っていたが、今回の成果を見ると、日本も追い越せるという印象を持った。
- 世界的に競争の激しい分野において、タイムリーな研究プロジェクトをほぼ計画に沿った形で実施でき、独自技術を含め、世界的水準の研究を行った。
- 世界的に進捗の早い機能性 RNA の研究分野において、本プロジェクトから先端をゆく新たな知見が得られ、またオリジナリティーの高い手法も創出されている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 3つの研究開発項目は基本的にそれぞれ独自に展開されたが、研究グループ間の有機的な連携は十分とはいえない。特に、機能性 RNA の予測は困難な課題であり、本プロジェクトにおいても予測に基づいた機能性 RNA の実証的研究という点では問題を残した。
- 本プロジェクトの3つのテーマは良く考えられていて、テーマ間の連携によってお互いにフィードバックしあうような構成になっている。ただ、機能性 RNA 自体が新しい分野であるため、基礎的な情報が十分蓄積しているとはいえない状況にあった。そのため、本プロジェクト期間中は、3つのテーマでそれぞれの知見を蓄積することが最優先事項になったと思う。このような理由で、3つのテーマ間の連携は色々と模索されたのではあるが、それがお互いに十分フィードバックし合うレベルにまでは達してはいなかった。後数年でそのようなレベルに達すると思われる時点でプロジェクトが終了することは仕方のないところではあるが残念である。
- サブプロジェクト間の協力関係も制約のある中でよくやっているが、一方で、もう少し具体的な協力関係を構築することもできたのではないかと思う。
- 分野としての歴史が浅く、基礎的知見がまだまだ絶対的に不足している本分野においては、5年という期間は短すぎたように感じられる。
- 全く連携していないということはなかったが、欲を言えば3者の成果をまとめ上げるような具体的な目標設定（実用化を目指したもの）とその成果が欲しかった。
- 本プロジェクトは比較的基礎研究的色彩が強いので、有望な技術がいくつ

も得られているが、現段階では産業応用面で今後与えるであろうインパクトの大きさを評価することは難しい。

- 各々のプロジェクトの有機的な繋がりによる新たなコンセプトや基盤技術の創出があればなお良かった。

〈その他の意見〉

なし

2) 今後に対する提言

機能性 RNA の研究は、各グループのリーダーを中心にオリジナリティーの高い研究が展開された。しかしながら、この分野は世界的に医薬への応用も含めてさらに進展しているので、本プロジェクトの様な、極めて重要でありながらも、医薬応用の基盤となるべき基礎的知見が絶対的に不足している分野においては、5年という年限は明らかに短い。また我が国の世界的競争力を持続させるという意味においても、継続的な研究促進が強く望まれ、長期的な視野に基づいた次期プロジェクトを早期に立ち上げる必要がある。NEDO がこのような基盤研究をひきつづきサポートすることは大変意義がある。

今後この3グループを中心に連携し、機能性 RNA を用いる創薬で世界をリードしていくことを期待する。その際、サブプロジェクト間の協力関係をもう少し強調できればよりよい。例えば、バイオインフォマティクス技術の開発では、機能解析や実験技術と絡めた応用を強調できればより良い成果が期待される。

〈今後に対する提言〉

- ・ 各グループのリーダーを中心にオリジナリティーの高い研究が展開された。NEDO がこのような基盤研究をひきつづきサポートすることは大変意義がある。今後も何らかの形で本プロジェクトが継続されることを期待する。
- ・ 3つのテーマがようやくこれから連携できるレベルになりつつあるところでプロジェクト終了となった。機能性 RNA のような新しい分野の成果が、5年で即応用に直結するというのは難しいが、シードはかなり発掘されたと思う。今後、応用化に向けたこの分野のフォローアップを NEDO をお願いしたい。また、本評価では、各テーマごとに実用化の評価をしているが、それに少し違和感を覚える。各テーマはお互いに協調的に共同研究するように設定されている。実用化しやすいテーマとそうでないテーマがあるし、実用化において裏方的な役割をするテーマもあるであろう。この意味で、実用化の評価はプロジェクト全体とするべきではないかという気がする。
- ・ 多くの新しい技術が開発されており、今後の発展と市場化には期待ができるが、サブプロジェクト間の協力関係をもう少し強調できればよりよいと思われる。例えば、バイオインフォマティクス技術の開発では、機能解析や実験技術と絡めた応用を強調できれば、よりアピールできると思う。
- ・ 本プロジェクトの様な、極めて重要でありながらも、医薬応用の基盤となるべき基礎的知見が絶対的に不足している分野においては、5年という年

限は明らかに短く、また我が国の世界的競争力を持続させるという意味においても、継続的な研究促進が強く望まれる。

- ・ 今回の成果を基に、これからが本当にこの3グループが連携していくべきだと思う。今後もこの3グループを中心に連携し、機能性RNAを用いる創薬で世界をリードしていただきたい。
- ・ 次世代シーケンサーの急速な発展など、計画立案当初には予想できなかった大きな技術革新がある中で、ここで得た新技術の種をどのようにして産業にいかしていくか、粘り強く努力されることを希望します。
- ・ 機能性RNAの研究は、世界的に医薬への応用も含めてさらに進展している。従って、本分野のプロジェクトは短期的に終了するものではなく、長期的な視野に基づいた次期プロジェクトを早期に立ち上げる必要があると感じる。

〈その他の意見〉

- ・ 無駄をなくすという観点から科学行政を考えるのはナンセンスである。基礎科学は巨大な先行投資である。5年で見れば全く役に立たなかった技術も10年後には役に立つ可能性もある。また、現在非常に役に立っている応用技術も、その多くは基礎科学の中から偶然発見されたものである。応用技術のシードを恣意的に計画的に発見するのは極めて難しく、セレンディピティーが必要なのである。iPSのように応用に直結する分かりやすい例はむしろ珍しい。このような理由で、応用研究を重視するNEDOのプロジェクトとして、本プロジェクトのような応用基盤発掘型のものが実施されたことは大きな意味があると思うし、この方向は今後も是非続けて欲しいと思う。
- ・ このような成果を出すのは官のサポートの下に産学連携でないと難しいと思う。今回の成果を無駄にしないためにも、この分野への更なる官のサポートの継続を望む。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

健康安心プログラムの目標達成のための本プロジェクトは、RNA を利用した新しい形の医療技術、創薬、診断技術など新規産業の創成につながる普遍的な基盤を形成するものであり、NEDO の事業として妥当である。さらには、世界的な RNA 研究の現状から大規模プロジェクトとして実施したことが重要であり、民間企業あるいは大学であっても通常の予算規模では到底実現できないものである。将来的には実用化も考えられることから、本プロジェクトの意義は大きい。

一方、プロジェクト終了後も踏まえた長期的な戦略の中での位置付けや、海外の動向や市場予測などの説明があれば、さらに本事業の妥当性が明確になった。さらに、本プロジェクトのような応用基盤発掘型のものが NEDO のプロジェクトとして実施されたことは大きな意味がある。今後、得られた技術をどう事業化するかなどという観点で新しいプロジェクトを立ち上げることを期待する。

〈肯定的意見〉

- 機能性 RNA の解析とその機能の制御による生体応答を理解する研究は、RNA を利用した新しい形の医療技術、創薬、診断技術など新規産業の創成につながる重要な基礎的、基盤的研究である。この意味で本プロジェクトは健康安心プログラムの目標達成のために寄与しているといえる。また、本プロジェクトは基礎的、基盤的であるが故に、公共性が高く、NEDO の事業としてふさわしい。
- 既に書いたが、応用研究を重視する NEDO のプロジェクトとして、本プロジェクトのような応用基盤発掘型のものが実施されたことは大きな意味があると思うし、この方向は今後とも是非続けて欲しいと思う。
- まだ基礎的な段階であるが、核酸医薬、再生医療といった応用が考えられることは、NEDO の事業として妥当であると考ええる。また、核酸医薬はまだ開発リスクが大きい段階だと思われるので、NEDO の関与は必要であると考ええる。さらに、個別の研究テーマの成果を見ても、医療への応用へはまだ時間がかかると思われるものの、それぞれの成果は投じた予算との比較において十分であると考ええる。
- 本プロジェクトは、基礎科学的にも極めて重要であると同時に、医薬応用への高い可能性を持つ機能性 RNA 研究において、普遍的な基盤を形成するものであり、健康安心イノベーションプログラムの目標達成に寄与している。特に、質量分析を利用した機能性 RNA の直接解析ツールの開発な

どは、民間企業であっても大学であっても、通常の予算規模では到底実現できないものであり、NEDO としての関与は妥当であった。

- 1 民間企業のみ、あるいは 1 大学の研究室のみで本プロジェクトのような成果を出すのは困難であり、本プロジェクトの成果は将来的には実用化も考えられることから、NEDO の事業として十分妥当である。また、機能性 RNA 研究は核酸医薬品開発にももちろん繋がるので、健康安心イノベーションプログラムの目標達成にも寄与していると考えられる。
- RNA 創薬など、プロジェクト終了時点でもいまだ模索状態の新技术であり、しかも軌道に乗った場合のインパクトが大きい内容であり、NEDO の関与は適切であったと思われる。
- 医療などへの実用化に向けてブレイクスルーとなる新技术を生み出すためには、生物の理解を含めた堅実な基盤研究が必須である。このような研究は公共機関でしか成しえないこと、また世界的な RNA 研究の現状から大規模プロジェクトとして実施することが重要であり、本プロジェクトの意義は大きい。

〈問題点・改善すべき点〉

- 内外の類似の研究プロジェクトおよび NEDO の他の関連プロジェクトとの関係での本事業の位置づけがやや不十分であった。
- 本研究プロジェクトの位置づけは、あくまでも基盤技術の開発であるため、本当に NEDO の事業として妥当性を出すためには、プロジェクトの発展的な継続が必要であると考えます。そういう意味で、本プロジェクトが終了してしまったのは惜しいと思う。
- 海外の動向や市場予測などを提示していただいて、本事業の成果の優位性などを説明していただければ、さらに事業の妥当性が明確になったと思われる。
- NEDO プロジェクトとしてみると、基礎研究的色彩が強過ぎたきらいは否定できないかもしれない（応用面は個々の企業に拡散しがち？）。むしろたとえば今回得られた質量分析技術をどう事業化するかなどという観点で新しいプロジェクトを立ち上げた方が NEDO らしいと言えるかもしれない。
- 幾つかのテーマは、時代に呼応した実用化に向けて、橋渡しの次期プロジェクトとして継続できればなお良かった。

〈その他の意見〉

なし

2) 研究開発マネジメントについて

本プロジェクトの目標については、予測手法・解析手法の開発、データベースの構築、数十の RNA の機能解析と明確である。また、3 グループ共に目標をクリアするための妥当なスケジュールと予算が立案されている。従って、当初の見通しの確かさならびに、研究開発目標と研究開発計画の妥当性が裏付けられたといえる。

さらに、中間評価後に、業績が上がっているところへの加速予算の投入や2 テーマを整理するなどの進捗状況を把握する努力が行われ、計画の見直しなどにも適切なマネジメントが行われた。また、チームリーダーに若い独創性の高い人材を起用するなど研究開発実施者の事業体制も妥当であった。

しかしながら、本プロジェクト期間中は、3 つのテーマでそれぞれの知見を蓄積することが最優先事項になり、3 つのテーマ間がお互いに十分フィードバックし合うレベルにまでは至らず、グループ間協力の相乗効果という点でも、3 つの研究開発項目間の連携についてのマネジメントに問題を残した。

また、今後の教訓として、基盤技術としてのプロジェクト全体の知財戦略を組み立てる組織・システムがあるとなお良かった。

〈肯定的意見〉

- 全体として目標についてはほぼ達成されており、研究開発目標と研究開発計画の妥当性が裏付けられたといえる。研究開発実施者の事業体制も妥当であり、進捗状況を把握する努力は適切に行われ、計画の見直しも適切になされた。
- チーム編成については、チームリーダーに若い独創性の高い人材を起用したことがプロジェクトの成功につながったと考える。また中間評価後に、業績があがっているところに加速予算を投入するなど、メリハリのきいた実施体制は大変良かったと思う。
- 研究開発目標については、予測手法・解析手法の開発、データベースの構築、数十の RNA の機能解析と明確であり、そのための現状把握と解決に至る計画も非常にはっきりしていると感じた。
- 事業体制では全体を統括する渡辺プロジェクトリーダーの元、サブプロジェクトリーダー間で密にミーティングを行ったことにより、連携がうまく行っている。それにより、計画の加速、見直しについても適切に実施されている。また、定期的な研究会の開催はサブプロジェクト間の連携には非常に有効であったと思われる。
- チーム構成は適正である。特に我が国を代表する研究者 3 名が各グループのリーダーとして独創的な研究を推進したことは高く評価できる。また中

間評価で指摘された問題点には、適切に対応している。

- それぞれのグループの目標を達成するためによく組織された体制で、各グループリーダーの下で研究開発を行い、実際に素晴らしい成果を上げている。また、途中で2テーマを整理するなど、適切なマネジメントが行われていたと思われる。
- 上述の通り、計画立案はタイムリーで、実際5年間大きな変更もなく実施できたことは、当初の見通しの確かさを示している。各研究グループも各々存分に活動できたように見える。
- 例えばマスペクトロメトリーは実用化レベルに達し、さらには幅広い応用も可能になり、中間評価における計画見直しと重点化が功を奏している。また、本プロジェクトにより新たな機能性 RNA も見つかり、全体として、3グループ共に目標をクリアするための妥当なスケジュールと予算であったといえる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 3つの研究開発項目間の連携についてのマネジメントに問題を残した。
- 既にかいたが、機能性 RNA 自体が新しい分野であるため、基礎的な情報が十分蓄積しているとはいえない状況にあったため、本プロジェクト期間中は、3つのテーマでそれぞれの知見を蓄積することが最優先事項になった。つまり、3つのテーマ間がお互いに十分フィードバックし合うレベルにまでは達してはいなかったという点で計画に少し無理があったのかも知れない。特に、機能性 RNA を予測するバイオインフォマティクスは苦しかったと思う。ほとんど情報がない状態で予測する必要があった。この意味で、もしこのプロジェクトの第二弾があったら、連携がよりうまく機能する可能性がある。
- 個々の研究プロジェクトでの成果の実用化に向けたマネジメントは非常にうまく進められているという印象を受けたが、プロジェクト全体としてのマネジメントについては、はっきりした方針が見えにくかった。「研究開発項目ごとの個別目標を達成し全体目標に至る」とあるので、このままでもいいかと思うが、核酸医薬や再生医療といった応用まで考えるのであれば、プロジェクト全体として各研究項目を統合する戦略があってもいいのではないかと思った。
- 各グループのリーダーの能力に全く問題はないが、それぞれのグループを構成する民間企業および大学研究者の構成が、真に最適であったかどうかは評価が難しい。情勢変化に対応し、実施者の新規追加や交代など、より柔軟な対応があっても良かったのかもしれない。また、研究開発項目の「総

合調査研究」については、その必要性和成果が見えてこなかった。

- 民間企業も多いので難しいかもしれないが、特許申請などに関しても3グループで協調して、少しでも早く海外よりも優位に立てるようにしていただきたい。
- 今回のようなプロジェクトではむしろその方がよかったのかもしれないが、プロジェクトリーダーがあまり前に出ず、各々の若いグループリーダーに任せていたように見えた。その点が、研究成果は十分にでたが、事業化といった方面でやや弱いという結果につながった可能性はある。
- プロジェクト期間を考慮した目標設定になっているが、プロジェクト終了後も踏まえた長期的な戦略の中での本プロジェクトの位置づけも明確にしてもらいたい。

〈その他の意見〉

- ・ 前回の中間評価に引き続いて審査させていただいたが、グループ間の交流など、改善はみられるものの、やはり遠慮がちという印象がある。そのような点でも、プロジェクトリーダーがもう少し指導力を発揮されても良かったかもしれないと感じた。
- ・ 中間評価の見直しが功を奏してさらにプロジェクトが進展しているが、途中で終了したプロジェクトについても興味深いものがあった。萌芽的な研究の場を与えることも重要であろう。

3) 研究開発成果について

機能性 RNA 研究は今まさに急速に進展している分野の一つであるが、本プロジェクトの3つの研究開発項目ともに、各テーマ毎においておおむね目標は達成している。機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発、機能性 RNA データベースの構築、機能性 RNA マススペクトロメトリーの開発、微量 RNA 精製技術の開発、長鎖 RNA 合成法の確立、核内 RNA ノックダウン法の確立と核内 ncRNA の新機能の解明、piRNA の末端形成機構と生合成経路のモデルを提唱、ゲノム安定性に関係する多数の esiRNA の発見、などは世界初あるいは世界最高水準の独創的な成果であり、かつ汎用性が高い。世界的に見てもユニークで独創性の高い業績が多くでたことは高く評価出来るし、真に世界をリードするような技術を育成することが出来た。さらに、多くの研究成果は、適切に論文として発表されており、また特許出願もなされている。

しかし、得られた成果の他の競合技術と比較した場合の優位性については具体的に検証することが必要である。また、今後の教訓として、一般向けの情報発信がもっとあるとなお良かった。

〈肯定的意見〉

- 3つの研究開発項目ともに、おおむね目標は達成している。
- 機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発、機能性 RNA データベースの構築、機能性 RNA マススペクトロメトリーの開発、微量 RNA 精製技術の開発、長鎖 RNA 合成法の確立、核内 RNA ノックダウン法の確立と核内 ncRNA の新機能の解明、piRNA の末端形成機構と生合成経路のモデルを提唱、ゲノム安定性に関係する多数の esiRNA の発見、などは世界初あるいは世界最高水準の独創的な成果であり、かつ汎用性が高い。多くの研究成果は、適切に論文として発表されており、また特許出願もなされている。特に、研究開発項目2「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」および研究開発項目3「機能性 RNA の機能の解明」については目標達成度が高い。
- 世界的に見てもユニークで独創性の高い業績が多くでたことは高く評価できるし、真に世界をリードするような技術を育成することができた。また一部、機能性 RNA の機能について、新しいコンセプトを提唱できるような業績を上げることができた。
- 成果については個別のプロジェクトとしての目標達成は、自己評価のとおりで興味深い結果も創出している。全体的に論文発表、特許取得についても十分にされている。

- 目標は十分に達成されており、数多くの世界初・世界最高水準の成果が得られている。
- 3グループとも目標に照らして十分な成果を挙げており、レベルの高い論文誌への投稿や特許出願もされている。これらの成果は機能性 RNA を用いる創薬に用いられ新たな市場の創造にも繋がると期待している。
- 基礎研究としては、明らかに世界水準の多彩な成果が得られ、論文発表なども積極的に行われている。今後の事業化につながりそうな技術も得られている。全体に当初の目標はクリアできている。
- 機能性 RNA 研究は今まさに急速に進展している分野の一つであり、プロジェクト開始時とはその目標も流動的に変わる可能性があるが、幾つかのテーマでは、世界的な研究の進捗に呼応して初期目標よりも高いレベルでクリアしている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 得られた成果の他の競合技術と比較した場合の優位性については具体的に検証することが必要である。研究開発項目1「機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」の中の機能性 RNA の予測については最終目標を達成できたとはいいがたい。
- テーマ間の連携によってお互いにフィードバックしあうような状態にまでは、期間中に達しなかった。
- 一般に向けての情報提供がどの程度発信されたのかがわからない。このプロジェクトだけに限らないが、一般向けの情報発信がもっと必要ではないか。もちろんそのためには NEDO のサポートが必要である。
- 繰り返しになるが、新しい市場創造への努力という面では、やや小粒になってしまった気がする。またグループ間協力の相乗効果という点でもやや期待ほどではなかった印象がある。
- 今後に向けて、基盤技術としてのプロジェクト全体の知財戦略を組み立てる組織・システムがあるとなお良かった。

〈その他の意見〉

- ・ バイオインフォマティクスの項には少しあったが、全体の成果としてサブプロジェクト間での共著論文数などがあっても良かったかもしれない。

4) 実用化の見通しについて

本プロジェクトは基盤的な性質が強いが、その中において、実用化のイメージを踏まえた研究が推進され、既に応用のめどが立っているものの他に、応用につながりそうなシードも多く見いだされ、全体としてみれば十分評価出来る。特に、RNA マススペクトロメトリー、RNA 自動精製装置、長鎖 RNA 合成法、などの技術が実用化された場合にはその波及効果は大きい。また、RNA 配列の比較、整列を高精度・超高速で行うソフトウェア、核内 RNA ノックダウン法、などは関連分野への波及効果が期待される。

新たな知見が得られつつある RNA 研究の中で、国際レベルでの RNA 研究の進捗に本プロジェクトが大きく寄与して、まだ揺籃期にある我が国の RNA 産業育成のためになにがしかの貢献が出来た。

しかしながら、実用化に際しては、開発された技術を他の競合技術と比較して、本当に世界をリードして実用化の勝算があるのかなど、優位性と問題点を明確にすることが必要である。また、プロジェクト全体としての総合的な出口イメージの明確化が求められる。

〈肯定的意見〉

- 研究開発項目 2 「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」については、RNA マススペクトロメトリー、RNA 自動精製装置、長鎖 RNA 合成法、など、実用化が期待できる成果が生まれており、これらの技術が実用化された場合にはその波及効果は大きい。研究開発項目 1 「機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」および研究開発項目 3 「機能性 RNA の機能の解明」においても、いくつかの成果は、例えば、RNA 配列の比較、整列を高精度・超高速で行うソフトウェア、核内 RNA ノックダウン法、などは関連分野への波及効果が期待される。
- 3 つのテーマで進行度にかなり差があったが、既に応用のめどが立っているものの他に、応用につながりそうなシードも多く見いだされ、全体としてみれば十分評価できる。繰り返すが、このプロジェクトの目的は、応用基盤技術の整備であることに留意する必要がある。
- ヒト疾患に関連する機能性 RNA の同定、機能性 RNA の解析基盤技術の獲得という 2 点からは成果の実用化が見えている。また、関連分野への技術的な波及効果も期待できる。人材育成についても、プロジェクト終了後もプロジェクト雇用の研究者がそれぞれ別の職を見つけているようなので、成功しているといえる。

- 本プロジェクトは基盤的な性質が強いが、その中において、実用化のイメージを踏まえた研究が推進されたことは評価できる。
- それぞれのグループで実用化が見込まれる成果を出しており、中には実用化されたものもあることから、波及効果が十分期待できる。
- 本プロジェクトによって、まだ揺籃期にある我が国の RNA 産業育成のためになにがしかの貢献ができたことは間違いないと思われる。
- 新たな知見が得られつつある RNA 研究の中で、出口をイメージすることは難しい場合もあるが、国際レベルでの RNA 研究の進捗に本プロジェクトが大きく寄与していることは確かである。

〈問題点・改善すべき点〉

- 実用化に際しては、開発された技術を他の競合技術と比較して、優位性と問題点を明確にすることが必要である。
- 企業の関与する miRNA の医薬利用プロジェクトにおいて、本当に世界をリードして実用化の勝算があるのかについての確信は得られなかった。
- 機能性 RNA の特定と基盤技術の開発にはある程度目処が立っている。一方で、難しいのだと思うが、プロジェクト全体としての核酸医薬への実用化イメージがあるともっと良かったと思う。
- 実用化が見込まれるものについては、早期に民間企業を中心に事業化を目指していただきたい。
- プロジェクトの性質上、出口イメージを明確化するという要求にはやや無理があると思うし、5年の期間では評価は難しいが、現段階で得られたいくつかの有望な技術が今後どこまで成長するかは予断を許さないと言える。
- プロジェクト全体としての総合的な出口イメージが明確になっているとなお良かった。

〈その他の意見〉

- ・ 本分野においては、最も実用に近いと考えられる siRNA・miRNA の基本特許は外国に押さえられてしまっている一方で、真の実用化に必要な基礎的知見は、世界的に見てもまだまだ絶対的に不足している。よって、拙速な実用化を目指しそれに振る舞わされることは得策ではなく、むしろ独創的なアプローチから基礎研究を推進することこそが、我が国の競争力を高めることになる。その意味では本プロジェクトの意義は非常に大きかった。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

1) 成果に関する評価

サブフェムトモルの RNA を検出・定量するためのマスマススペクトロメトリー、RNA 試料の調製技術、解析技術、RNA ならびにその誘導体の化学合成技術の開発において当初の目標を大きく上回る成果を達成し、「機能性 RNA を高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい手法の確立と機能性 RNA をゲノムワイドに解析するためのツールを確立する」という最終目標を達成した。特に、RNA のマスマススペクトル技術は世界一であり、独創性が高く日本にしかない RNA を直接解析する技術開発である。また、世界初の成果も数多く発表され、特許出願も適切に行われたことから、これらの手法の実用化が進めば機能性 RNA の研究開発の進展が見込まれ、今後の進展次第では、事業化の面でも大きな成功を収める可能性がある。

今後、マスマススペクトロメトリーをマイクロアレイなど従来の技術と対比した場合の問題点をコスト面も含めて明確にし、開発した方法の特性をいかして、RNA 解析のための支援技術・ツールとして実用化、汎用化の方策を明確にしていきたい。また、化学合成のチームと分析チームの間の共同開発を通して新技術を創出できるとなおい良かった。

〈肯定的意見〉

- RNA マスマススペクトロメトリーを開発し、RNA 分子をサブフェムトモルレベルで解析することに成功したことは、生体から抽出した微量機能性 RNA を高感度で直接測定できる道を拓いた画期的な成果である。同時に、RNA マスマススペクトロメトリーを用いて、piRNA の末端修飾構造の決定や miRNA の直接測定に成功したことは特筆すべき成果である。また、RNA マスフィンガープリント法を開発し、質量情報にのみ基づいて RNA の特定に成功したことも大きな成果である。さらに RNA 自動精製装置の開発、長鎖 RNA 合成法の確立など、このグループの研究開発の成果は目覚ましい。「機能性 RNA を高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい手法の確立と機能性 RNA をゲノムワイドに解析するためのツールを確立する」という最終目標を達成したといえる。
- 独創性が高く日本にしかない RNA を直接解析する技術開発を行っていて、高く評価できる。特に、RNA の mass 技術は世界一であり、今後の発展も大いに期待できる。基礎研究業績も十分出ている。
- 機能性 RNA、特に微量な RNA を解析、計測、精製する技術に関してすべて目標値をクリアしている。特に、MS を用いた絶対定量技術に関して

は実験技術とともに **CID checker** の開発による解析の効率化が図られており、新たな技術領域を開拓している。さらに、**RNA** プロファイリング・絶対定量を核酸医薬の薬物動態計測などに応用しており、今後さらなる汎用性が期待される。

- 当初の目標を大きく上回る成果を達成しており、世界初の成果も数多く発表されている。高く評価できる。
- ユニークな分野で世界をリードする成果をあげている。従来法では得られないような情報が得られるなど、今後の進展次第では、事業化の面でも大きな成功を収める可能性がある。
- **MS** を用いた高感度の **miRNA** 解析など世界的にもレベルの高い結果を出しており、これらの手法の実用化が進めば機能性 **RNA** の研究開発の進展が見込まれる。
- サブフェムトモルの **RNA** を検出・定量するためのマスペクトロメトリー、**RNA** 試料の調製技術、解析技術のそれぞれの開発目標を達成し、世界最高水準にある。また **RNA** ならびにその誘導体の化学合成技術の開発においても、高い水準を達成している。知財権の取得も適切に行われている。

〈問題点・改善すべき点〉

- **RNA** マスペクトロメトリーはオリジナリティーの高い技術であり、**RNA** 試料を直接測定するという大きなメリットがあることは理解できるが、マイクロアレイなど従来技術と対比した場合の問題点も明確にした上で、機能性 **RNA** を真に高感度、定量的かつ網羅的に解析するという目的のために、**RNA** マスペクトロメトリーをどのように活用するかを明らかにしてほしい。**RNA** 自動精製装置、長鎖 **RNA** 合成法、超高感度マイクロアレイ技術を **RNA** 解析のための支援技術・ツールとして実用化、汎用化の方策を検討してほしい。
- 他の競合するような技術に対してコスト面も含めて比較して頂きたかった。
- 逆に言うと、可能性はいろいろ認められるが、開発した方法の特性をいかして、うまく事業化していく道筋はまだ明確でないように見える。
- 化学合成のチームと分析チームの間の共同開発を通して新技術を創出できると良かった。化学合成に関しては、時代が要求するレベル、さらには将来に要求されるであろうレベルの目標を明確にして開発を進めてもらいたい。

〈その他の意見〉

- ・ 核酸合成技術と解析・計測・精製技術との連携が見えにくかったで、これから期待したい。

2) 実用化の見通しに関する評価

RNA マススペクトロメトリー、RNA 自動精製装置、長鎖 RNA 合成法など、実用化が期待できる成果が生まれている。特に、RNA マススペクトロメトリーによるマイクロ RNA 血液診断はガン細胞などの有力な診断技術としても注目に値する。さらに、miRNA の直接絶対的定量は、臨床サンプルへの適用で、その簡便さ・コスト等の検討をすすめられる段階にある。また、本マススペクトロメトリーを用いた解析が実用化されれば、機能性 RNA の解析に寄与することは間違いなく、この分野への技術的な波及効果は大きい。

一方、実用化に際しては、開発された技術を他の競合技術と冷静に比較して、優位性と問題点を明確にすることが必要である。また、汎用化についても検討して欲しい。また、RNA 合成技術では、既知法と比較して、その性能およびコストの面で競争力の見通しが明確化されていない。世の中の RNA 研究や RNA 医薬品のニーズを考慮した、修飾 RNA の化学合成の出口イメージの再考等も必要である。

〈肯定的意見〉

- RNA マススペクトロメトリー、RNA 自動精製装置、長鎖 RNA 合成法、など、実用化が期待できる成果が生まれており、これらの技術が実用化された場合にはその波及効果は大きい。例えば RNA マススペクトロメトリーによるマイクロ RNA 血液診断はガン細胞などの有力な診断技術としても注目に値する。
- 比較的実用化しやすいテーマであり、実際に実用化に向かっている技術をたくさん持っている。また他にシードも多くあり、全く問題なし。
- 微量 RNA の解析・計測・精製技術はオリジナリティーがあり、世界でも最先端を行っている。実用化についてもほぼ問題なく達成できそうなので、このまま最先端を進んで欲しい。
- RNA の質量分析による直接定量、往復循環クロマトグラフィー、長鎖 RNA 合成など、実用的な、あるいは実用化に近い成果が生まれている。
- MS を用いた解析が実用化されれば、機能性 RNA の解析に寄与することは間違いなく、この分野への技術的な波及効果は大きいと思われる。
- 独自技術ということもあり、将来の実用化のもつポテンシャルとしては、本サブグループの成果が一番大きく、今後の進展が期待される。
- 微量 RNA の解析・計測・精製、ならびに、RNA の化学合成のそれぞれにおいて、実用化・製品化に向けた検討を行えるレベルにある。

〈問題点・改善すべき点〉

- 実用化に際しては、開発された技術を他の競合技術と冷静に比較して、優位性と問題点を明確にすることが必要である。また、汎用化についても検討してほしい。
- 長鎖 RNA 合成技術は優れたものだと思われるが、既に製品化・市販されているいくつかの RNA 合成方法と比較し、性能およびコストの面で競争力が期待できるかどうかの見通しが明確でないように感じられた。
- CEM アミダイトに関しては、アミダイトそのものを広く販売しないと世界標準にはならないし、コストもさがらないのではないか。
- 私見であるが、次世代シーケンサーの大きな進展により、本研究の位置づけも大きく変わらざるを得なかったのではないか。機器の導入コストなども考慮しつつ、いかにして実用化・事業化しているかを考える重要な時期にある気がする。
- 世の中の RNA 研究や RNA 医薬品のニーズを考慮して、天然型の RNA やチオフォスフェートなどの修飾 RNA の化学合成の出口イメージを再考する必要があるかもしれない。

〈その他の意見〉

なし

3) 今後に対する提言

当初計画をはるかに超える成果が得られているので、今後は、開発された一連の技術の優位性を具体的に示し、実用化に迫ってほしい。しかしながら、拙速な実用化に惑わされることなく、基盤的技術の着実な進展と確立も望まれる。また、これらの技術を国内外の多くの研究者が積極的に活用して機能性 RNA の機能の解明の研究の一層の進展に寄与するための手段の検討も必要である。

一方、次世代シーケンサーの大きな進展により、本研究の位置づけも大きく変わる可能性も考えられるので、次世代シーケンサーなどと組み合わせるとか、相補的な情報が得られるようにするなど常に新たな手法の開発にも引き続きチャレンジすることを期待する。また、応用技術を普及させるためには、企業と組んで技術コストを下げる努力も必要である。

〈今後に対する提言〉

- ・ 本研究開発項目については当初計画をはるかに超える成果が得られている。開発された一連の技術の優位性を具体的に示し、実用化に迫ってほしい。また、これらの技術を積極的に活用して機能性 RNA の機能の解明の研究の一層の進展に寄与してもらいたい。
- ・ このまま行けば良いと思う。ただ、応用技術を拡散させるためにはコストが問題になる。企業と組んで技術コストを下げる努力もすべきだろう。
- ・ 機能性 RNA の解析技術の詳細はあまり理解できていないが、構造解析は順調に進んでいるので、より具体的な機能解析にも踏み込んではどうだろうか。
- ・ miRNA の直接絶対的定量については、臨床サンプルへの適用について、その簡便さ・コスト等の検討をすすめられる段階にあると思われる。同時に、拙速な実用化に惑わされることなく、基盤的技術の着実な進展と確立が望まれる。
- ・ 実用化できるものはできるだけ早く広く世の中に出していただきたいが、一方、技術の進歩により今回の成果もいずれ時代遅れになる可能性ももちろん考えられるので、常に新たな手法の開発にも引き続きチャレンジして頂きたい。
- ・ 上述のように、大きな可能性をもつ技術なので、上手な使い方を工夫することが重要であろう。次世代シーケンサーなどと組み合わせるとか、相補的な情報が得られるようにするなど、釈迦に説法かもしれないが、頑張ってもらいたい。
- ・ 国内外の多くの研究者に本プロジェクトで得られた基盤技術を提供するために、その手段も考えていただきたい。

〈その他の意見〉

なし

2. 2 機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

1) 成果に関する評価

RNA 2次構造を考慮した配列の比較、整列を高精度・超高速で行うソフトウェアおよび2次構造モチーフを抽出するアルゴリズム開発等は既に世界最高水準に達しており、目標値を十分にクリアしている。成果の普及に関しても機能性RNAデータベースの構築を始めとして、多くの成果が www.ncrna.org にて公開されているようなので、適切に行われている。また、データベースではプロジェクト内での機密データの扱いにも配慮している。また、これだけの規模のバイオインフォマティクス研究者集団が一つのテーマに取り組んだ例は、海外でもあまり例がない。

しかし、機能性RNAと言っても多種多様で、ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的予測という最終目標は、やや概括的すぎた。さらに、開発した予測技術が機能性RNA研究に実際にどの程度貢献できるかどうかについては不安が残る。またRNAの高次構造に関しての理解が現状では不足しており従来からのRNAの二次構造予測の限界を本法で超えられるかは疑問で、本質的な手法を創出するためには、さらに斬新なアイデアが必要であろう。

〈肯定的意見〉

- RNA 2次構造を考慮した配列の比較、整列を高精度・超高速で行うソフトウェアおよび2次構造モチーフを抽出するアルゴリズムを開発したことや機能性RNAデータベースを構築したことは高く評価できる。また、実際に開発したソフトウェアとアルゴリズムを用いて、ヒトゲノムから1万個の機能性RNA候補を抽出したことやmiRNA予測に関しても新手法を開発し数百個のmiRNA候補を発見したことも評価できる。
- 機能性RNAの情報がほとんどない時点で、バイオインフォマティクスでそれを予測するのは非常に困難であったと思う。このような困難な状態にも関わらず、構造の保存性の要素を入れた予測などを可能にしたのは評価できる。
- RNAの2次構造を考慮した配列解析技術は、既に世界最高水準に達しており、目標値を十分にクリアしている。成果の普及に関しても機能性RNAデータベースの構築を始めとして、多くの成果が www.ncrna.org にて公開されているようなので、適切に行われている。また、データベースではプロジェクト内での機密データの扱いにも配慮している。
- 世界最高レベルの二次構造予測やそれに基づくアラインメントなど、優れた成果が生み出されており、全体としての目標は達成されている。

- 成果の中にはすでに公開している 2 次構造予測ソフトや機能性 RNA のデータベースなどがあり、これらは機能性 RNA の研究開発に必要な不可欠なものになり得る事から、十分に目的を達成している。
- 大規模データベース構築等の例を除くと、これだけの規模のバイオインフォマティクス研究者集団が一つのテーマに取り組んだ例は、我が国はもちろん、海外でもあまり例がないと思われるが、チームワークを発揮して、予測法開発などを大きく進展させ、また共同研究でも存在感を発揮したと思う。
- 従来法に比べると新機能 RNA 発見のためのアルゴリズムの精度は向上しており、ウェット研究者にも利用可能なものになってきている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 開発した予測技術が機能性 RNA 研究に実際にどの程度貢献できるかどうかについては不安が残る。
- プロジェクト期間内に、予測プログラムを改良するための、他の 2 テーマからのフィードバックがあれば良かった。
- ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測に関しても十分に目標値をクリアしているが、機能解析チームの新規 miRNA 候補との比較がないのが勿体無いと思った。特許の関係など問題はあるのだろうが、予測の精度向上に使えるのではないかと思う。
- 一口に機能性 RNA と言っても、miRNA などの様に二次構造が極めて重要なものから、転写されることそれ自体が重要であって転写された RNA そのものには機能がないと考えられるものまで、多種多様である。このため、ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測という最終目標は、やや概括的すぎたように思われる。
- 上述の長所とはうらはらになるが、情報解析チームを独立させなければ、さらに他の実験チームとの連携が進んだのではないかとも思われる。情報集団のあげた成果が独自に事業化への道を拓いたとはいえ、その意味ではもう少し裏方的な構成もあり得たかもしれない。
- RNA の高次構造に関する理解が現状ではまだまだ不足しているので、従来からの RNA の二次構造予測の限界を本法で超えられるかは疑問である。本質的な手法を創出するためには、さらに斬新なアイデアが必要かもしれない。

〈その他の意見〉

- ・ 機能性 RNA データベースからは配列解析へのリンクが少ないように感じ

た。詳細には見ていないが配列をクエリにした検索も **BLAST** しか提供していないように見える。折角 2 次構造を考慮した配列解析ツールがあるのだから、2 次構造を考慮したデータベース検索ができてもいいのではないかと思った。

- 質問で出ていた **RNA** の相互作用予測については、分科会時には述べられていなかったが、既に京都大学のグループと共同で進めているものもあり、今後の発展は期待できると思う。

2) 実用化の見通しに関する評価

既に多くの成果が解析プログラムやデータベースとしてウェブ上で公開されており、実用化されている。その他の成果についてもウェブで公開するという観点からは実用化のイメージはしやすい。また、二次構造を考慮した RNA の優れた解析技術や、機能性 RNA の解析に有用なデータベースなども、すでに実用化に近い状態である。さらに、人材育成という意味では、チームワークを発揮して人間を育てるという点でとてもうまく機能した。ここで育った人材は RNA 研究だけにとどまらず、広くバイオインフォマティクス全体での活躍が期待されるという意味での波及効果も期待できる。

しかしながら、機能性 RNA 候補をゲノムから推測するバイオインフォマティクス技術への期待は大きいですが、実用化の見通しについては依然としてあいまいである。今後、実用化レベルの予測ツールとしての信頼性を評価するために、第三者によるさらに多くのウエットでの検証実験とそのフィードバックが必要である。

〈肯定的意見〉

- 本プロジェクトで開発し web 公開された予測プログラムが外部の人々に非常に良く使われていることからみても評価できる。
- 既に多くの成果が解析プログラムやデータベースとしてウェブ上で公開されており、実用化されている。その他の成果についてもウェブで公開するという観点からは実用化のイメージはしやすい。
- 二次構造を考慮した RNA の優れた解析技術や、機能性 RNA の解析に有用なデータベースの開発などは、すでに実用化に近い状態である。
- 多くの成果を挙げられており、今後はこの成果を大学や企業など第3者がどのように使うかということになると思う。
- 情報チームだけの成果について、実用化イメージを求めるのはやや無理がある。一方、人材育成という意味では、チームワークを発揮して人間を育てるという点でとてもうまく機能したと感じる。ここで育った人材は RNA 研究だけにとどまらず、広くバイオインフォマティクス全体での活躍が期待されるという意味での波及効果も期待できる。
- 現在の RNA 研究に役立つ機能性 RNA の予測ツールとして利用が可能である。

〈問題点・改善すべき点〉

- ウエットでの検証実験をさらに行って、データの信頼性がさらに高めてもらいたい。そうすれば機能性 RNA の研究に対する貢献は間違いなく大き

いものになると思われる。データベースにアクセスする際のセキュリティの強化を行っていただきたい。

- 繰り返しになるが、そもそもこのチーム独自の実用化イメージを求めること自体に無理があるので、そういう意味では別のチーム構成もあり得たのではないか。情報チームを独立させると、成果の切り分けの問題の発生を危惧してしまい、本当に他のチームにとって必要な仕事はつい自前でやっけてしまいがちになるのではないか。
- 実用化レベルの予測ツールとしての信頼性を評価するために、第三者によるさらに多くの検証実験とそのフィードバックが必要である。

〈その他の意見〉

- ・ 機能性 RNA 候補をゲノムから推測するバイオインフォマティクス技術への期待は大きいですが、実用化の見通しについては依然としてあいまいである。機能性 RNA データベースの構築は実用化の立場からもより要求度の高い課題といえる。
- ・ データベースの普及についてはかなり使われるようになってきていると思うが、これまで以上に世界中からアクセスされるように拡張されることを期待している。

3) 今後に対する提言

バイオインフォマティクス技術の開発は、機能性 RNA の探索・解析のための有効な起爆剤となりうる重要な課題である。本研究において RNA 二次構造予測研究が大きく進歩したが、現状のような問題設定で、正確な予測がどこまで可能なのかを考察するなどの視点は、もっと生物学者との議論から生まれてくるのではないか。また、支援技術チームの解析結果では核酸の修飾も重要な要素となっている印象を受けたが、そのような情報を取り込むこともできるのではないだろうか。従って、他の研究グループとのより緊密な連携を計り、開発したソフトウェアとアルゴリズムおよびデータベースの有用性が具体的に示されることを期待する。

一方、miRNA のターゲット予測などは、もう少し実験的な検証が必要である。これらの検証を経て、真に有効なバイオインフォマティクス技術の開発の実現を期待する。

さらには、開発した優れた技術・ツールやデータベースに蓄えたデータを、世界中の多くの研究者に使ってもらえるような広報・宣伝活動を行うことも重要である。

〈今後に対する提言〉

- バイオインフォマティクス技術の開発は、機能性 RNA の探索・解析のための有効な起爆剤となりうる重要な課題である。他の研究グループとのより緊密な連携を計り、開発したソフトウェアとアルゴリズムおよびデータベースの有用性が具体的に示されることを期待したい。また、これらの検証を経て、真に有効なバイオインフォマティクス技術の開発を実現していただきたい。
- mRNA 型の non-coding RNA の予測ができれば有用であると思う。また、近縁種間で保存されているというパラメーターを予測に利用していたが、ヒトとチンパンジー間で保存されていない機能性 RNA がヒトであるために重要であるという可能性も指摘されているので、むしろ保存されていないようなものを発見することも重要なのではないか。
- データベースは機能アノテーションが重要になってくると思うが、機能解析チームや支援技術・ツールチームの解析結果を公開するというのは知財の関係上難しいのだろうか？
- また、支援技術チームの解析結果では核酸の修飾も重要な要素となっている印象を受けたが、そのような情報を取り込むこともできるのではないだろうか。
- 開発した優れた技術・ツールを、世界中の多くの研究者に使ってもらえる

ような広報・宣伝活動を行うことも重要であろう。

- 今回の研究でたとえば、**RNA** 二次構造予測研究が大きく進歩したことは評価するが、現状のような問題設定で、そもそも正確な予測がどこまで可能なのかを考察するなどの視点は、もっと生物学者との議論から生まれてくるのではないか。**miRNA** のターゲット予測も、他チームでもやや重複した試みがなされていたようで、もう少し実験的な検証や、新しい成功物語につなげる努力が望まれる。
- 予測アルゴリズム開発の将来の展開には、**RNA** の機能と構造の両研究分野の進捗が不可欠と思える。従って、ドライとウエットの両分野の研究者の緊密な連携研究が重要であろう。

〈その他の意見〉

- データベースに蓄えた秘匿データは、公開後何年かした時点で公開されるべきではないか。これは情報チームには責任がないが、プロジェクト全体として議論するべきではないだろうか。

2. 3 機能性RNAの機能解析

1) 成果に関する評価

疾患や発生・分化など細胞機能に関連する機能性 RNA 候補の機能解析ならびに医薬品開発や再生医療などに有用な基盤知見の取得および基盤技術の構築を目標に精力的な研究が進められ、研究目標を上回る成果が得られた。特に、長鎖核内機能性 RNA 研究方法を世界で初めて確立、piRNA や endo-siRNA など新規小分子 RNA 種の世界に先駆けた発見、幹細胞の分化制御因子としての miRNA の役割の解明、アレルギー疾患や癌と miRNA の関係を研究する上での貴重な実験系提供、センス-アンチセンス RNA ペアの発見などは、高く評価できる。これらの研究業績は、世界的な一流誌に多くに論文として発表されている。知財に関しては、他のグループとも連携して十分な議論を行い、早急に特許申請を行うことにより、この分野で将来日本が優位に立てるようにして欲しい。

しかしながら、「バイオインフォマティクス技術の開発」との連携が十分ではなく、バイオインフォマティクスで予言された新規 non-coding RNA の機能解析をするという当初の計画にはプロジェクト期間内に達しなかったことは、残念である。

また、miRNA の機能解析について興味深い知見が得られているが、同様の研究が世界中で行われており、真に医薬応用に資するだけの成果であるかどうかの評価は現時点では難しい。

〈肯定的意見〉

- 疾患や発生・分化など細胞機能に関連する機能性 RNA 候補の機能解析ならびに医薬品開発や再生医療などに有用な基盤知見の取得および基盤技術の構築を目標にいくつかの研究グループにより精力的な研究が進められた。研究目標を上回る成果が得られた。特に以下の点は高く評価できる。
 - 1) ヒト間葉系幹細胞で骨芽細胞への分化誘導抑制活性を示す miRNA と標的遺伝子候補を明らかにしたことは、幹細胞の分化制御因子としての miRNA の役割を示す大きな成果である。
 - 2) ヒトマスト細胞株から 1300 種以上の新規 miRNA 候補を実験的および配列情報解析により取得、さらにヒト癌細胞株に対して増殖抑制活性、アポトーシス誘導活性を示す miRNA を多数同定した。これらの成果はアレルギー疾患や癌と miRNA の関係を研究する上での貴重な実験系を提供した。
 - 3) ヒト繊維芽細胞からの iPS 細胞の樹立の効率を上昇させる miRNA の

同定に成功したことは **iPS** 細胞研究への大きな貢献である。

- 4) ヒト **cDNA** データベースから選別した長鎖 **RNA** の多くが組織特異的発現パターンを示すことおよび核内に局在するという重要な発見が行った。また、核内 **RNA** の優れたノックダウン系を世界で最初に開発した。これらは極めてオリジナリティーの高い研究であり、長鎖 **ncRNA** の機能解明の研究の突破口を開いたものとして高く評価できる。
 - 5) 実際に、細胞の形態形成に関与する **ncRNA** の発見、長鎖 **ncRNA** と共局在する疾患関連タンパク質群の同定なの先駆的発見がなされた。
 - 6) ヒトおよびマウスからセンス-アンチセンス **RNA** ペアを抽出し、正常組織と腫瘍組織で発現が変動するペアを多数発見した。これらの成果は、**ncRNA** の新たな機能解明研究の基盤となることが期待される。
 - 7) 生殖細胞のゲノム安定性に関係する多数の **piRNA** を同定し、**piRNA** の末端形成機構と生合成経路のモデルを提唱した。また、体細胞のゲノム安定性に関係する多数の内在性の新規 **siRNA** を発見し **esiRNA** と提唱した。さらに **esiRNA** 生合成経路のモデルを提唱した。これらは、世界トップレベルの研究として高く評価できる。
- 研究業績については、**miRNA**、**piRNA** などの低分子 **non-coding RNA** の分野で、世界的な一流誌に多くの論文が出版されたことは、高く評価できる。また、**mRNA** 型の **non-coding RNA** の機能のひとつは、細胞内の特定の部位に特定のタンパク質因子群を集合させる拠点構造を作ることである、というコンセプトにつながったことは評価できる。
 - モデル細胞から多くの **miRNA** を同定し、機能解析している。また、長鎖 **ncRNA** などその他の機能性 **RNA** の同定と機能解析も順調に進んでおり、十分に目標は達成している。
 - 数多くの重要な基礎的知見が得られており、目的は順調に達成されている。特に手の付け所さえ分からなかった長鎖核内機能性 **RNA** の研究方法を世界で始めて確立したことは、高く評価できる。また、**piRNA** や **endo-siRNA** など、新規小分子 **RNA** 種を世界に先駆けて明らかにしたことも重要な成果である。
 - 新規な機能性 **RNA** や創薬に繋がる機能性 **RNA** を発見し、レベルの高い論文誌への投稿もあり、十分に成果を出している。
 - 非常に多くの技術の種が得られている。いくつかは確かに有望そうに見えるので、今後の発展が楽しみである。また、参加者の多いプロジェクトをそつなくまとめた手腕も評価されるべきと思われる。
 - 初期の目標を十分に上回る成果を挙げている。新たな機能性 **RNA** 候補や

その機能が同定されつつある RNA 種が蓄積され、今後の医薬への応用が期待される。

〈問題点・改善すべき点〉

- 全体として大量に得られた新規 miRNA 候補が、真に miRNA として働いているかどうかの検証およびそれらの標的の同定は、現段階では部分的な成功にとどまっている。また、同定、取得した多数の新規の長鎖 ncRNA の機能解析をどのように行うかは、より困難な課題と思われる。さらにノックダウンによる表現型が観察された場合でも、そこからいかにして作用機構の解明に迫るかが問われている。これらの点についてのブレークスルーを期待したい。ヒト間葉系幹細胞における miRNA や標的遺伝子候補の探索など、本研究開発項目で使用された予測システムと本プロジェクトの研究開発項目「機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」で開発されたシステムとの連携、比較がないことに不満が残る。
- 既にかいたが、バイオインフォマティクスで予言された新規 non-coding RNA の機能解析をするという当初の計画に沿う状態にはプロジェクト期間内にほとんど達しなかったことは、この分野の新しさを考えると仕方のないこととはいえ残念である。
- バイオインフォマティクスの項で書いたことだが、新規 miRNA の取得に関してはインフォとの協力がもう少しあってもよかったのではないか。手法の開発は別々でもいいと思うが、結果の比較があるとお互いの手法の参考になると思う。
- miRNA の機能解析については、興味深い知見が得られているが、同様の研究が世界中で行われており、真に医薬応用に資するだけの成果であるかどうか、また単に配列情報だけの特許出願にどの程度の優位性があるかどうかは、現時点での評価が難しい。
- 知財に関しては早急に、できれば他のグループとも連携して、特許申請など行っていただきたい。そうすることによりこの分野で将来日本が優位に立てるようにしてほしい。
- 成果が多方面にわたったためか、やや個々の技術的成果が小粒という印象を受ける。世界的な位置づけなども現段階では評価が難しい（慶応大の基礎研究などは別として）。
- 個々の研究室レベルのテーマでプロジェクトが進められたため各論的な成果に留まり、基礎と応用研究が混在した焦点の絞りきれていないプロジ

ェクトのようにも見える。網羅的に配列を特許出願する知財戦略に関しては、十分な議論が必要であろう。

〈その他の意見〉

- ややもすると、個別の研究グループによる独立した研究が集まったような印象があるが、機能性 RNA という広範囲に及ぶテーマの中においては、致し方ないように思われる。

2) 実用化の見通しに関する評価

本研究開発項目の多くの課題は、基礎的、基盤的な研究であるため、実用化と直接結びつけて評価することは賢明でない。むしろ、真の実用化を達成するにおいて、その基盤となるべき多くの重要な基礎的知見が得られたことこそ重要である。その中で、miRNAの研究を中心に、医薬への応用が期待される成果が挙がっており、癌臨床検体における miRNA の発現プロファイルの解析などは、展開によっては、診断マーカーとして実用化出来る可能性がある。このように病気と関連するようなシードは数多くあるので、今すぐの実用化ではなく、時間をかけて着実に開発を進めていただきたい。

一方、医薬への応用を目指すのであれば、疾患ターゲットを絞ったうえで、RNA 医薬の機能・安定化・DDS を総合的に調べていくための連携研究が必要であった。

〈肯定的意見〉

- このテーマでは、プロジェクト期間内に実用化に直結したものはほとんどないが、病気と関連するようなシードは数多くあるので、今後の展開に期待したい。
- 各疾患モデルがはっきりしており、出口イメージは明確である。
- 真の実用化には欠かすことの出来ない基礎的知見が大きく不足している本分野において、重要な発見が数多くなされたことは評価できる。
- 3つのグループの中ではこのチームの研究内容が最も直接創薬に繋がると思うが、実用化までには最も時間がかかる内容なので、今すぐ実用化ではなく、着実に開発を進めていただきたい。
- さまざまな技術に対して、それぞれの大きな目標は十分明確である。また、得られた成果の数が多いので、確率的にいても、それらのいくつかは相応の成功を収めることが期待できる。
- miRNAの研究を中心に、医薬への応用が期待される成果が挙がっている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 企業の関与する miRNA の医薬利用プロジェクトにおいては、どれくらい独創性があるのか、本当に世界に対して実用化の勝算があるのかについての確信は得られなかった。実際、one of them なのではないかという疑いは晴れなかった。今後の健闘で、是非この疑いを晴らしていただきたいと思う。
- 技術が実用化されるまでには、さまざまな外部条件に左右されるが、そう

いう意味で、それぞれの技術が真に実用化されるまでにどのような問題がありそうかというところまでは伝わらなかった。また、現実には難しいのだろうが、個々の研究が独立し過ぎている印象はあった。サブグループ内でも、サブグループ間でも。

- 医薬への応用を目指すのであれば、疾患ターゲットを絞ったうえで、RNA 医薬の機能・安定化・DDS を総合的に調べていくための連携研究があっても良かった。

〈その他の意見〉

- ・ 本研究開発項目の多くの課題は、基礎的、基盤的な研究であるため、必ずしも実用化と直接結びつけて評価できない。癌臨床検体における miRNA の発現プロファイルの解析などは、展開によっては、診断マーカーとして実用化できる可能性はある。
- ・ 出口に対して機能解析という観点からは十分明確なイメージがあるが、医療への応用はまだ始まったばかりだと思うので、今後に期待したい。
- ・ 本グループの研究内容は、基礎的な色彩が強いため、実用化と直接結びつけて評価することは賢明でない。むしろ、真の実用化を達成するにおいて、その基盤となるべき多くの重要な基礎的知見が得られたことこそ重要であると思われる。

3) 今後に対する提言

本研究開発項目については得られた成果は、再生医療、疾患の診断、創薬、さらには医療分野以外のバイオ産業に波及効果をもたらすことが期待できるが、当面は、それぞれの研究で得られた基盤的知見や手法を共有し、今後は今まで以上に RNA 研究者間の横の繋がりを密にして、性急な実用化にとらわれずそれぞれの研究を着実に進めることを期待する。具体的には、ゲノム中にどの程度の頻度で重要な機能を持つ mRNA 型の non-coding RNA が存在するのかが見極め、ならびに miRNA の機能解析については、真に医薬応用に資するだけの成果であるかどうかの検証を期待する。

また、大学など研究機関の成果に関しては、民間企業と組むなどして上手く活用し、論文などで公開された成果をもとに海外の企業が創薬研究などを行う前に、日本発の核酸医薬を研究・開発して欲しい。

〈今後に対する提言〉

- ・ 本研究開発項目については得られた成果は、再生医療、疾患の診断、創薬、さらには医療分野以外のバイオ産業に波及効果をもたらすことが期待できるが、当面は、性急な実用化にとらわれずそれぞれの研究を着実に進めていただきたい。
- ・ 低分子 non-coding RNA の分野は比較的研究しやすく概念的にも分かりやすいので、今後もどんどん進むと思うが、mRNA 型の non-coding RNA の研究がどのように展開するかは予測しにくい。実際ゲノム中にどの程度の頻度で重要な機能を持つ mRNA 型の non-coding RNA が存在するのかが今のところ不明であり、本プロジェクトにおいてもそれは明らかにならなかった。mRNA 型の non-coding RNA が重要であろうことは論を待たないが、低分子 non-coding RNA の分野のように広範囲に展開するかどうかは今後のひとつの焦点となろう。
- ・ それぞれの研究で得られた基盤的知見や手法を共有し、連携を密に行うことにより、さらなる発展が期待される。
- ・ 大学など研究機関の成果に関しては、民間企業と組むなどして上手く活用していただきたい。論文などで公開された成果をもとに海外の企業が創薬研究などを行う前に、日本発の核酸医薬を研究・開発していただきたい。
- ・ 長鎖 ncRNA の研究など、今後の進展次第によっては、大きく化ける可能性のある内容が得られているので、息長く個々の研究の種を育てていかれることを期待します。
- ・ 急速に情報が蓄積されている RNA 研究は、一方で、不均一な精度の膨大なデータの蓄積によってデータベース化が難しい状況にあるとも言える。

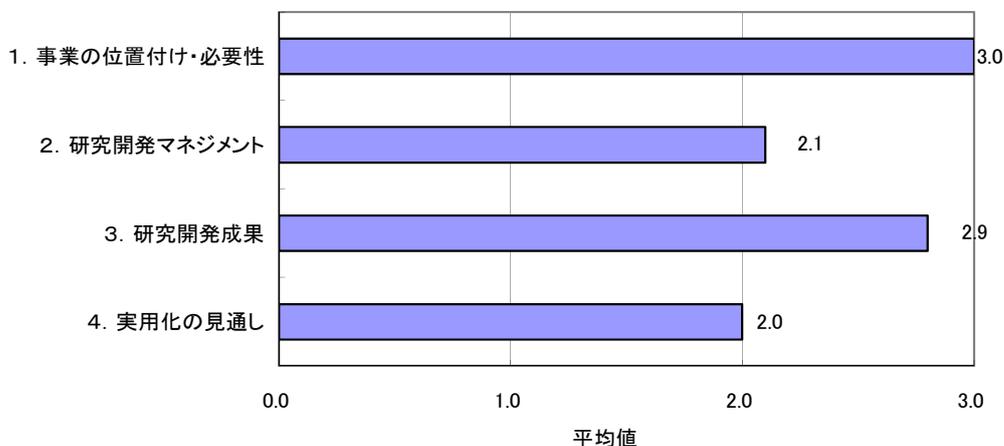
従って、今後は今まで以上に RNA 研究者間の横の繋がりを密にしてデータの議論をしていただきたい。

〈その他の意見〉

なし

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	A	A	A	A	A	B	B
1. 事業の位置付け・必要性について	3.0	A	A	A	A	A	A	A	A
2. 研究開発マネジメントについて	2.1	A	A	B	B	B	B	C	B
3. 研究開発成果について	2.9	A	A	A	A	A	A	B	A
4. 実用化の見通しについて	2.0	B	B	B	B	B	B	B	B

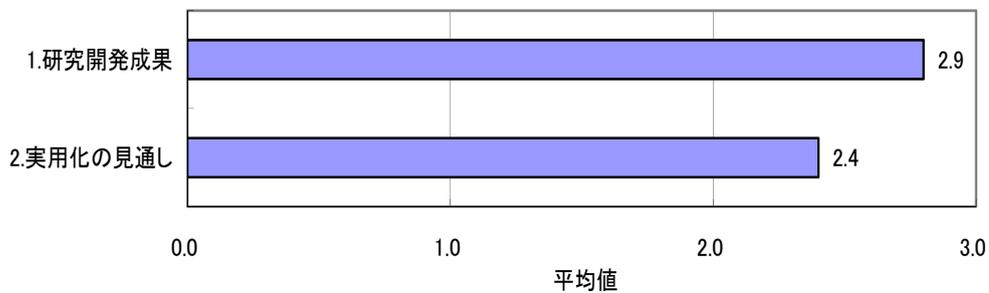
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

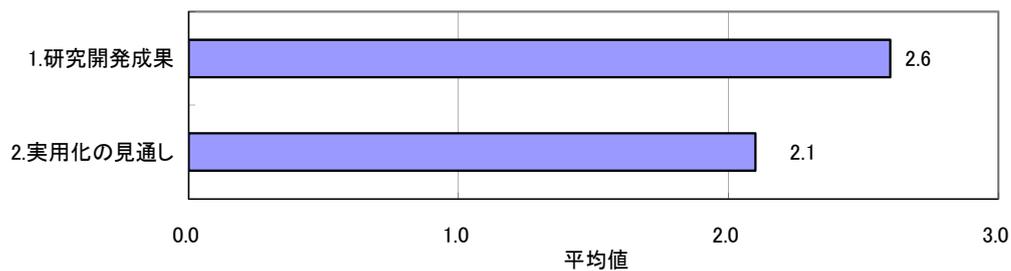
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

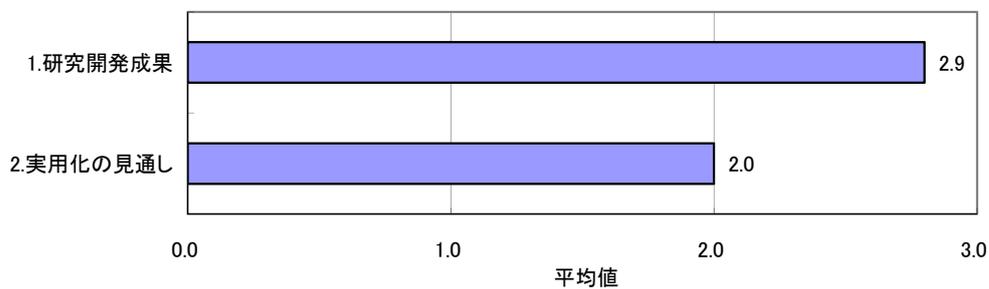
3. 2. 1 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発



3. 2. 2 機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマテックス技術の開発



3. 2. 3 機能性RNAの機能解析



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点（注）							
3. 2. 1 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発									
1. 研究開発成果について	2.9	A	A	A	A	A	B	A	
2. 実用化の見通しについて	2.4	B	A	A	B	B	B	A	
3. 2. 2 機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマテックス技術の開発									
1. 研究開発成果について	2.6	B	A	A	A	A	B	B	
2. 実用化の見通しについて	2.1	B	B	A	B	A	C	B	
3. 2. 3 機能性RNAの機能解析									
1. 研究開発成果について	2.9	A	A	A	A	A	B	A	
2. 実用化の見通しについて	2.0	B	B	A	C	B	B	B	

（注）A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確
- B ・妥当
- C ・概ね妥当であるが、課題あり
- D ・見通しが不明

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「機能性RNAプロジェクト」

事後評価分科会資料

資料 5-1

健康安心イノベーションプログラム

「機能性RNAプロジェクト」

事業原簿

【公開版】

作成者

新エネルギー・産業技術総合開発機構
バイオテクノロジー・医療技術開発部

— 目次 —

概要	i ~ v
プロジェクト用語集	viii ~ x
I. 事業の位置付け・必要性について	1
1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	1
1.1 NEDO が関与することの意義	1
1.2 費用対効果	2
2. 事業の背景・目的・位置づけ	2
II. 研究開発マネジメントについて	3
1. 事業の研究開発目標	3
1.1 研究開発目標	3
1.2 目標設定の理由	3
2. 事業の研究開発計画	3
2.1 研究開発項目①		
「機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」	3
2.2 研究開発項目②		
「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」	4
2.3 研究開発項目③		
「機能性 RNA の機能解析」	4
3. 研究開発実施の事業体制	5
3.1 事業体制	5
3.2 研究開発の運営管理	6
4. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメント	10
4.1 知財戦略	10
4.2 成果実用化を推進するマネジメントの取り組み	10
5. 情勢変化への対応	11
5.1 研究テーマおよび研究体制の見直しと強化・発展	11
5.2 中間評価の受審と対応	11
5.2-1 中間評価	11
5.2-2 中間評価結果	12
5.2-3 対応を要する指摘事項への対応	13
III. 研究開発成果について	1.1
1. 事業全体の成果	1.1
①機能性 RNA の探索解析のためのバイオインフォマティクス 技術の開発	1.2
②機能性 RNA 解析のための支援技術・ツール開発	1.4
③機能性 RNA の機能解析	1.6

2. 研究開発項目毎の成果	
2. 1 機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発 2.1.1
2. 1. 1 機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発 2.1. 5
2. 1. 2 ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測 2.1.41
2. 1. 3 機能性 RNA データベースの構築 2.1.53
2. 2 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発 2.2. 1
2. 2. 1 RNA マススペクトロメトリー法の開発 2.2. 3
2. 2. 2 機能性 RNA の高感度検出システムの開発 2.2.14
2. 2. 3 RNAの新規合成基盤技術開発と化学分子設計 2.2.41
2. 3 機能性RNAの機能解析 2.3.1
2. 3. 1ヒト疾患に関連する機能性 RNA の迅速で高効率な同定 2.3.5
2. 3. 1. 1 ヒト疾患に関連する機能性RNAの同定とその機能解析 2.3.5
2. 3. 1. 2 機能性RNA解析に基づくゲノム医学研究 2.3.40
2. 3. 2 機能性 RNA に関する基盤的知見の獲得と それを基にした機能性RNA同定 2.3.70
2. 3. 2. 1 機能性 RNA 候補の多面的選別法の確立と機能解明 2.3.70
2. 3. 2. 2 マイクロRNAの作用機構の解明 2.3.94
2. 3. 2. 3 アンチセンスRNAの機能解析 2.3.104
IV. 実用化の見通しについて 15

(添付資料)

1. イノベーションプログラム基本計画
2. プロジェクト基本計画
3. 技術戦略マップ(分野別ロードマップ)
4. 事前評価関連資料
5. 成果発表・論文・特許出願リスト

概要

作成日 平成22年5月11日

プログラム名	健康安心イノベーションプログラム						
プロジェクト名	機能性 RNA プロジェクト	PJコード	P06011				
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術開発部/主査 伊豆本 義隆						
0. 事業の概要	本プロジェクトでは、バイオインフォマティクス(BI)の活用による機能性 RNA を推定する技術の開発、機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発、及び機能性 RNA の機能を解析することにより、本研究分野における我が国の優位性の確立を目指す。また、本プロジェクトにおける成果を素早く特許化することにより、将来的な医療・診断分野における新産業の創出に貢献する。						
I. 事業の位置付け・必要性について	生体における機能性RNAの機能を解析し、その機能の抑制や促進による生体応答を総合的に把握する基盤研究をさらに強力に進めることは、再生医療や疾患治療等の実現に資する重要な課題であり、「健康安心プログラム」の一環として本プロジェクトを実施する。このように基礎的・基盤的研究であるので、NEDOの関与が必要である。						
II. 研究開発マネジメントについて							
事業の目標	機能性RNA候補をゲノム上から推測するバイオインフォマティクス技術を確立する。また、機能性RNAを高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい方法、手法の確立と、機能性RNAをゲノムワイドに解析するためのツールを確立する。これらのツールを活用して、機能性RNAの機能解明に取り組む。また、ヒト疾患に関連する機能性RNA及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性RNA候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。						
事業の計画内容	主な実施事項	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	
	BI活用による機能性RNAの推定	←				→	
	支援技術・ツール開発	←				→	
	機能性RNAの機能解析	←				→	
	調査研究	←				→	
成果とりまとめ			↔				
開発予算 (単位:百万円)	会計・勘定	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	総額
	一般会計	605	899	798	778	759	3,839
	特別会計	-	0	0	0	0	0
	加速予算	-	0	51	0	0	51
	総予算額	605	899	849	778	759	3,890
開発体制	経産省担当原課	経済産業省 産業技術環境局 研究開発課 経済産業省 製造産業局 生物化学産業課					
	プロジェクトリーダー	プロジェクトリーダー (独)産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター 研究技術統括 渡辺公綱 サブリーダー 東京大学大学院新領域創成科学研究科(産総研情報生命科学センタ ー長 兼務) 教授 浅井潔 東京大学大学院工学系研究科 教授 鈴木勉 (独)産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター チーム長 廣瀬 哲郎					
	委託先 (参加企業)	(社)バイオ産業情報化コンソーシアム (株)三菱総合研究所 みずほ情報総研(株) 株式会社インテック システム研究所 (株)DNAチップ研究所 (株)ノバスジーン (株) 島津製作所 オリパス(株) ヤマサ醤油(株) 日本新薬(株) ジ ェノダイブファーマ(株) 東レ(株) 協和発酵キリン(株) 大塚 製薬(株) 日立ソフトウェアエンジニアリング(株)					
	共同研究実施先	北海道大学 弘前大学 山形大学 東京大学 慶應義塾大学 東京工業大学 千葉大学 東海大学 北陸先端科学技術大学院大学 京都大学 大阪大学 武庫川女子大学 岡山大学 徳島大学 (独)産業技術総合研究所 (独)理化学研究所					
情勢変化への対応	研究テーマおよび研究体制の見直しと強化・発展 ○「研究進捗状況ヒアリング」【H19(2007)年1月】における見直し						

	<p>研究開始から約1年半が経過した、平成19年1月23日と24日の2日間にわたり、全分室・共同実施先に対して「研究進捗状況ヒアリング」を行い、実施体制の見直しを行った。テーマ「尋常性乾癬に関わる RNA の機能解析」については、当初予定していた臨床検体の入手ができておらず、今後の入手の目処も立たないため、平成18年度をもって本テーマは中止することとした。この結果、ジェノダイブファーマ株式会社（分室10）と東海大学（共同実施先）を研究実施体制から外した。また、テーマ「機能性 RNA を in vivo で計測するシステムの開発」については、標識した RNA を細胞内に取り込ませる技術の確立に手間取り、研究が大幅に遅れてしまった。当面は、本テーマは中断することとし、計画通り進捗しているテーマ「機能性 RNA の高感度検出システムの開発」の方に研究資源を集中することとした。その他のテーマについても、評価結果を平成19年度の予算配分に反映させた。</p> <p>○加速予算の投入【H19(2007)年4月】</p> <p>一方、テーマ②-1「RNA のマスペクトロメトリー（質量分析技術）の開発」は、本プロジェクトを支える重要なツール開発であり、世界的に見ても日本発のオリジナルな技術である。実施計画をはるかに上回るペースで開発が進んでいることから、NEDO の「加速財源制度」を活用し、平成19年4月にフーリエ変換型質量分析装置を導入した。本装置は、2005年にサーモエレクトロン社が発売したもので、質量分解能が飛躍的に高い。本プロジェクトが築き上げた優位性を確保するために、いち早く本装置を導入することとした。</p> <p>○中間評価以後の見直し【H21(2009)年4月】</p> <p>テーマ①-2「ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測」における「比較ゲノムによるゲノム相同領域の抽出」(三菱総研担当)については一定成果が得られ、抽出した領域の解析に研究開発の重点が移ったため、プロジェクト途中で終了した。</p>
<p>中間評価結果への対応</p>	<p>【結果抜粋】</p> <p>順調に研究を進めている。興味深い結果も創出しており、後半は更なる成果が期待される。</p> <p>【主な改善点と対応】</p> <p>①バイオインフォマティクス技術については、開発した予測技術の有効性を明確にすべき。</p> <p>(対応)機能解析グループとも連携しつつ、検証実験を計画。</p> <p>②支援技術・ツールの開発においては、従来技術と対比した上での活用法、残された解析課題などを明確に。</p> <p>(対応)開発技術の必要性の明確化を行い、テーマを絞込み、予算を集中化。</p> <p>③機能性RNAの機能解明については、良い芽を出している研究を選択し、実用化を目指した研究を行うべき。</p> <p>(対応)産業競争力に寄与しうる先進的な基盤技術になる テーマ、競合優位性を獲得しうるテーマに絞り込んで予算を集中化。</p>
<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<p>本プロジェクトでは、以下の3つの研究開発項目について推進し、それぞれ目覚ましい成果を導いた。概要は以下の通りである。</p> <p>研究開発項目①「機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」</p> <p>○新規機能性 RNA 発見に必要な、二次構造を考慮した RNA 配列の比較・整列について数々の新規手法を開発し、精度、速度で世界最高性能を達成した。</p> <p>○機能性 RNA の機能予測に必要な、配列群の共通二次構造予測を高精度に行う手法と、二次構造モチーフを配列群から抽出するグラフ理論を用いた新規アルゴリズムを開発した。</p> <p>○ゲノム配列中からマイクロ RNA を従来法よりも精度良く抽出する手法を開発し、330個の新規マイクロ RNA 候補を発見した。</p> <p>○ヒトゲノム中のシンテニー領域、ヒトゲノム同士の比較から得られる相同領域等から、二次構造を考慮した配列解析技術の適用によって 20 万箇所以上の機能性 RNA 候補を抽出し、有望な 1 万領域以上についてマイクロアレイ発現解析を開始した。</p> <p>○新規機能性 RNA 発見のプラットフォームとして、独自の情報解析結果も含めた機能性 RNA データベースを開発した。</p> <p>研究開発項目②「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」</p> <p>○RNA マスペクトロメトリーの開発に成功し、サブフェムトモルの RNA 分子を直接解</p>

	<p>析することに成功した。プロジェクト最終目標値を大幅に上回る成果である。この手法を用いて、piRNA の末端修飾構造や miRNA の選択的安定化機構を明らかとした。また、miRNA の直接プロファイリングに成功し、診断技術としての実用化に大きく前進した。また、核酸医薬の薬物動態が可能になり、今後は世界標準を志向した基盤技術としての確立を目指す。</p> <p>○RNA マスフィンガープリント法の開発に成功し、RNA マススペクトロメリーで得られた RNA 断片の質量情報のみを用いて、ヒトおよびマウスゲノムの表裏(6 ギガ塩基)から RNA の遺伝子領域を迅速に特定することに成功した。</p> <p>○RNA の微量解析を支援するツールとして、RNA 自動精製装置(往復循環クロマトグラフィー)の開発に成功した。</p> <p>○RNA 医薬品の開発を目的とした新規化学合成技術(特許出願済)の開発に成功した。この手法により、長鎖 RNA(110 塩基)の合成に成功し、生物活性を示すことができた。高品質かつ安価な RNA を供給するシステムが整いつつある。</p> <p>○微量なマイクロ RNA の発現解析を高感度で行うため、Photo-DEAN 法および、MPEX 法の開発を行い、数アトモルのマイクロ RNA を定量的に解析することに成功した。</p> <p>研究開発項目③「機能性 RNA の機能解析」</p> <p>○ ヒト間葉系幹細胞、マスト細胞から 1500 種以上の新規 miRNA を同定し特許出願した。幹細胞分化やマスト細胞の脱顆粒、癌細胞増殖抑制に関わる生理活性を有する miRNA とその標的 mRNA を 10 個以上発見した。miRNA のノックアウトマウスを作製し、miRNA が脳下垂体機能である排卵に関与することを初めて示した。</p> <p>○ iPS 細胞の作成効率を著しく上昇させる miRNA を同定した。</p> <p>○H-InvDB から約 100 種の組織特異的または核内局在 ncRNA を同定した。その中から免疫抗原提示やボディーパターンニング、肝細胞癌抑制能、間葉系幹細胞分化に関係する機能性 RNA 候補を同定した。核内 ncRNA 解析のための新手法を開発し、細胞構造構築や細胞周期制御を行う ncRNA 機能を発見した。10 種類の疾患タンパク質と ncRNA の相互作用を明らかにした。</p> <p>○ショウジョウバエの生殖細胞特異的な piRNA、体細胞の esiRNA という新しい RNA 群を発見した。また piRNA の生合成経路のモデルを提唱し、piRNA 合成と共役した Traffic jam 遺伝子の新規制御機構を明らかにした。ヒトの miRNA と Ago タンパク質の相互作用情報を収集し、新しい miRNA 多様化機構を見出した。</p> <p>○ヒトとマウスから 3000 を超えるセンス-アンチセンス RNA ペアの新規マイクロアレイを開発した。これを用いて正常組織と腫瘍部でセンス-アンチセンスペアの比率が著しく変動するペアを 60 個以上発見した。アンチセンス RNA 領域から産生される 60nt 程度の低分子 RNA 群を同定した。</p> <table border="1" data-bbox="464 1332 1407 1400"> <tr> <td>投稿論文</td> <td>「論文」 160件、「総説・解説記事等」 101件</td> </tr> <tr> <td>特許</td> <td>「出願済」 56件(うち国際出願 26件)</td> </tr> </table>	投稿論文	「論文」 160件、「総説・解説記事等」 101件	特許	「出願済」 56件(うち国際出願 26件)
投稿論文	「論文」 160件、「総説・解説記事等」 101件				
特許	「出願済」 56件(うち国際出願 26件)				
<p>IV. 実用化の見通しについて</p>	<p>細胞分化誘導因子、遺伝子発現抑制因子、タンパク質翻訳調節因子等の機能を持った機能性 RNA を同定し、成果をすばやく特許化することにより、再生医療や RNA 医療、疾患診断、疾患治療等への応用を目指す。同時に、機能性 RNA を解析する手法及びツールの開発により、本分野における我が国の優位性の確立を目指す。</p> <p>さらに、本プロジェクトの成果は、医療分野以外のバイオ産業(農林水産産業、発酵工業、環境分野、食品分野、など)においても、大きな波及効果をもたらすと期待される。</p> <p>研究開発項目①「機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」</p> <p>機能性 RNA データベース、次世代シーケンサー配列自動解析システムは、今後のエピゲノム解析などゲノム情報の医療・創薬への応用の情報基盤としての活用が予定されている。</p> <p>研究開発項目②「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」 (東京大学のグループ)</p> <p>・RNA マススペクトロメリー(RNA-MS)の開発に成功し、miRNA を診断分子として用いた血液診断や、核酸医薬の薬物動態技術に実用化のめどがたっている。さらに RNA-MS を支える情報解析技術に関しては著作物登録や国際出願を行っており、知財戦略の観点からも優位に立っている。</p>				

	<p>・RNAの全自動精製を実現した往復循環クロマトグラフィーは精製装置の開発に成功し、実用化に向けて検討を開始した。</p> <p>・これらの技術は国内の企業を中心に技術移転を行う予定である。とくに開発された世界最高レベルのRNA配列情報解析技術は、機能性RNA標的予測など核酸医薬の開発に必須の技術として活用を始めており、今後幅広く利用されることが期待される。</p> <p>(DNAチップ研究所)</p> <p>・高い検出感度を誇るmiRNAのマイクロアレイ技術の開発に成功しており、製品化のためのプロトタイプを生産している。</p> <p>(日本新薬のグループ)</p> <p>・高品質のRNAを安価に化学合成する方法を確立し、今年度中に「研究用試薬」としての製造販売を開始する計画である。将来的には、RNA医薬のGMP製造における「グローバルスタンダード」を目指している。</p> <p>研究開発項目③「機能性RNAの機能解析」</p> <p>(協和キリングループ)</p> <p>・マスト細胞の脱顆粒効率を制御するmiRNAや癌細胞増殖を制御するmiRNAを用いたアレルギー疾患や癌の治療技術の実用化に向けた研究が既に開始されている。</p> <p>(京大グループ)</p> <p>・iPS細胞作出効率を上昇させるmiRNAや間葉系幹細胞の分化を制御するmiRNAは、再生医療における高品質な有用細胞の作出技術への実用化が大いに期待される。</p> <p>(産総研グループ)</p> <p>・長鎖ncRNAやアンチセンスRNAでは、癌などの疾患の新規診断マーカーとして有望なものが得られている。</p>	
V. 評価に関する事項	事前評価	平成16年度実施。 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部
	中間評価	H19年度 中間評価実施
	事後評価	H22年度 事後評価実施
VI. 基本計画に関する事項	作成時期	平成18年3月作成
	変更履歴	平成20年6月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1)研究開発の目的」の記載を改訂。また、人事異動に伴いプロジェクトリーダーの所属・役職を改訂。

用語	用語の解説
二次構造	RNA 配列上離れた位置にある2塩基が相補的な塩基対を形成することによって生じる RNA の構造。
動的計画法	直接的な計算では膨大な計算量を必要とする問題を部分問題に分割し、再帰式による計算によって効率的に解く方法の一般的名称。DNA 配列やアミノ酸配列の最適アラインメントを求める手法としても使われる。文字列の類似度だけを考慮したアラインメントは、配列長の2乗に比例したメモリと計算時間で求めることができるが、RNA 配列の二次構造を考慮した厳密なアラインメントでは、配列長の 6 乗の計算時間が必要とされ、解析の障害となってきた。
カーネル法	カーネル関数を用いた数理的手法の一般的名称。データを高次元に射影し、非線形データ構造を線形構造に置き換えることができる。サポート・ベクタ・マシンはカーネル法を用いた機械学習の手法である。
確率文脈自由文法	RNA の二次構造を解析するのに有用な確率的なモデルの一種。
構文解析	文章や文字列の構成要素間の文法的な関係を説明すること(<i>parse</i>)。構文解析は字句解析 (<i>Lexical Analysis</i>) とともに、プログラミング言語などの形式言語の解析に使用される。確率文法を用いた構文解析は DNA 配列からの遺伝子領域予測、RNA の二次構造予測に用いられている。
MEA 原理	アルゴリズムが予測するラベル系列が、正解のラベル系列にできるだけ一致するような予測を行う手法。
二次構造モチーフ	RNA の二次構造の特徴的な局所パターンのこと。
サポート・ベクタ・マシン	機械学習の手法の一種。近年最も強力な手法として急速に広まっている。
確率文脈自由文法	確率木文法と同様に、RNA の二次構造を解析するのに有用な確率的なモデルの一種。
シンテニー領域	異なる種の染色体間で、遺伝子が同じ順番で配置されている領域。
隠れマルコフモデル	線形の配列パターンをモデル化するための確率モデルの一種。主に、タンパクコーディング遺伝子発見に使われている。
多重配列アライメント (マルチプルアラインメント)	複数の配列(3 本以上)を相同性に基づいて整列させたもの。遺伝子の機能や進化の解析等に用いられる。マルチプルアラインメントを作成するための代表的なツールとして ClustalW がある。
Blastz プログラム	2本のゲノム配列の局所類似配列を検索するプログラム。
ペアワイズアラインメント	2本の配列を整列すること。
In silico	コンピューターを用いての意味。分子生物学などの実験は通常は、ウェット(wet)と呼ばれるように細胞や各種の生体分子を扱ったものであるが、それらの実験に関連するシミュレーションなどの計算などを指して in silico と呼ぶ。
マスペクトロメトリー法	質量分析法のこと。
RNA マスフィンガープリント法	RNA断片の質量数を、non-coding RNAデータベースに対して検索をかけることにより、RNAの配列を読むことなくRNA分子全体の配列を迅速に同定する方法。
サブフェムトモル(fmol)	モルの 10 のマイナス 16 乗のこと。分子数として約6億分子に相当する。
キャピラリーLC/ナノスプレーイオン化法	内径0.1-0.2mmほどの細いキャピラリー管に樹脂を充填し、クロマトグラフィーを行うことで RNA 試料の微量分離が可能となる。溶離液を直接、高電圧を印加したスプレーヤーの先端部から噴霧することで RNA 分子をイオン化する方法。エレクトロスプレーイオン化法の一つである。
ランダムプライミング	ランダムな配列を持つオリゴDNAをプライマーとして、配列未知なRNAを

	鋳型にcDNAを作成する手法。
リンカーライゲーション	配列未知な RNA の配列を決定するために、末端に既知のオリゴ DNA や RNA を連結させること。
CID (collision-induced dissociation) 解析	イオン化した分子(ここでは RNA)を質量分析装置で稀ガスと衝突させることによって分解し、内部配列に由来する情報を取得する方法。RNA の de novo シーケンスに用いる。
蛍光相関分光法 (FCS)	レンズにより絞られたレーザー光の焦点領域の蛍光強度のゆらぎから蛍光分子の大きさと数を直接測定する方法。
核酸プローブ	検出したい RNA と特異的に結合する配列を持った核酸分子のこと。
アンチセンス遺伝子	蛋白を合成する mRNA の塩基配列(センス配列)に対して相補的な塩基配列をもつ遺伝子こと。
光ライゲーション反応	紫外光により隣接する核酸配列を連結する方法
MPEX反応	基板上での DNA 伸長反応による高感度に検出できる反応
ハイブリダイゼーション	相補的な塩基配列をもつ DNA(RNA)同士、もしくは DNA-RNA 間で 2 量体を形成すること。マイクロアレイ解析においては基盤上に配置されたプローブに、サンプル由来の標識された cDNA もしくは cRNA を作用させること。
マイクロ RNA	遺伝子の発現を抑制する働きがある機能性 RNA の一種
プライマー	DNA を酵素的に合成する際に使われる 20~30 塩基対の短い DNA 断片。
マイクロアレイ	様々な配列をもつ微量の DNA をスライドガラスやシリコン、ナイロン膜などの基板上に整列してのせ、固定化したものの総称。 サンプルの細胞と対象の組織細胞から別々に mRNA を抽出して、この RNA を別々の蛍光色素で標識し、cDNA (mRNA と相補的な塩基配列を持つ DNA) を合成する。これらの標識化された cDNA を混合してスライドガラス上にスポットして、固定化された遺伝子と結合させる操作(ハイブリダイゼーション)を用いて、遺伝子の発現量の比を検出する。DNA や RNA の遺伝子配列や発現量を解析することができ、生物が持つ遺伝子の僅かな違いを調べることができる。
DNA コンピューティング	DNA の分子生物学的性質を利用して計算する方法。
2' 位保護基	RNA は糖の隣接する 2' 位と 3' 位に水酸基を持ち、伸長反応中に 2' 位が反応しないように保護しておく必要がある。一般的には、TBDMS (t-butyl dimethylsilyl) 基が用いられているが、その嵩だかさが立体障害となり固相合成の収率を低下させる。一方、DNA は 2 位に水酸基がないため 2 位保護基が不要であり、RNA に比べて合成が容易であり、かつ 2 位の立体障害が軽減されているため固相合成の収率が高い。
モノマー	核酸の固相合成法(アミダイト法)における、P-N 結合(リン原子と窒素原子間の結合)を持つ A、T(U)、C、G 4 種類のホスホロアミダイト誘導体の重合体(ポリマー)の合成ユニットのこと。
レポーターアッセイ	ルシフェラーゼ(発光酵素)遺伝子をレポーターとし、1 種類の試薬で同時発光させることで転写活性を測定すること。
間葉系幹細胞	間葉系幹細胞とは、骨髄液や脂肪組織などの中に少量存在する未分化の細胞で、筋肉、骨、脂肪など種類の異なる複数の細胞に分化できる能力を持ち、かつ自己複製の能力も持つ細胞のことを言う。
マスト細胞	喘息、アトピー性皮膚炎などの即時型アレルギー反応を誘起する細胞のこと。肥満細胞とも言う。膜表面に IgE の受容体を有し、ヒスタミンなどを含有する顆粒を含むことが特徴。IgE の刺激などで起こる脱顆粒によ

	り、顆粒内のヒスタミンや化学伝達物質が放出されることで、肺の気管支収縮や粘膜浮腫などのアレルギー症状が起こる。
癌細胞株	ヒトやマウス、ラットの腫瘍組織から単離され、株化された細胞のこと。不死化しており無限増殖能を有する、足場非依存性の増殖を示す等の特徴を示す。
MPSS 法	Massively Parallel Signature Sequencing の略で、メッセンジャーRNAに由来する配列の一部を数十万個、一度に取り出して各遺伝子の発現量を測定する方法。
アポトーシス	多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる、管理・調節された細胞の自殺(プログラムされた細胞死)のこと。
カリオタイプ	染色体の核型
ヒト臨床腫瘍サンプル	癌患者由来の組織及びそこから単離された DNA、RNA、タンパク質等のこと。固形癌の場合は手術時に切除した腫瘍組織とそれに付随した隣接正常組織が利用される。血液系癌の場合には採血により取得される。
ノックアウトマウス	機能抑制系の有力な方法として、マウス個体において機能を調べたい遺伝子を完全に欠失させる手段がある。そのようにして作成された遺伝子改変マウスのこと。遺伝子の機能解析において極めて強力な手法であるが、手間・技術・時間が必要とされる。
ノックダウン	RNA を導入(発現)することにより、遺伝子発現を抑制すること。
脆弱 X 症候群(fragile X syndrome: FRA X)	精神遅滞・巨大睪丸・染色体検査による脆弱 X 所見を主徴とする奇形症候群。原因は、X 染色体上の FMR1 遺伝子の機能不全とされる。
RNAi	RNA 干渉ともいう。細胞に二本鎖 RNA を導入した場合、それと同じ配列をもつ遺伝子の発現(タンパク質の合成)を抑制する現象のこと。真核生物において、標的遺伝子(mRNA)を破壊(分解)することにより遺伝子発現を制御し、ウイルスに対する防御反応と類似した現象であり、遺伝子解析の有効な方法として、基礎研究から将来の医療分野への応用として期待されている。
モノクローナル抗体	認識部位が単一の特異性の高い抗体のこと。
RISC	RNA 誘導サイレンシング複合体(RNA-induced silencing complex)。RNA 干渉における遺伝子の不活性化やマイクロ RNA の機能発現において重要な役割を果たす。
センス-アンチセンス	通常アンチセンス遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子が転写された鎖(センス鎖)と相補的な配列を有する(反対鎖から転写される RNA をコードするような)遺伝子を指すが、センス-アンチセンスの関係は相対的であるため、これらを一括してセンス-アンチセンスと呼ぶ。

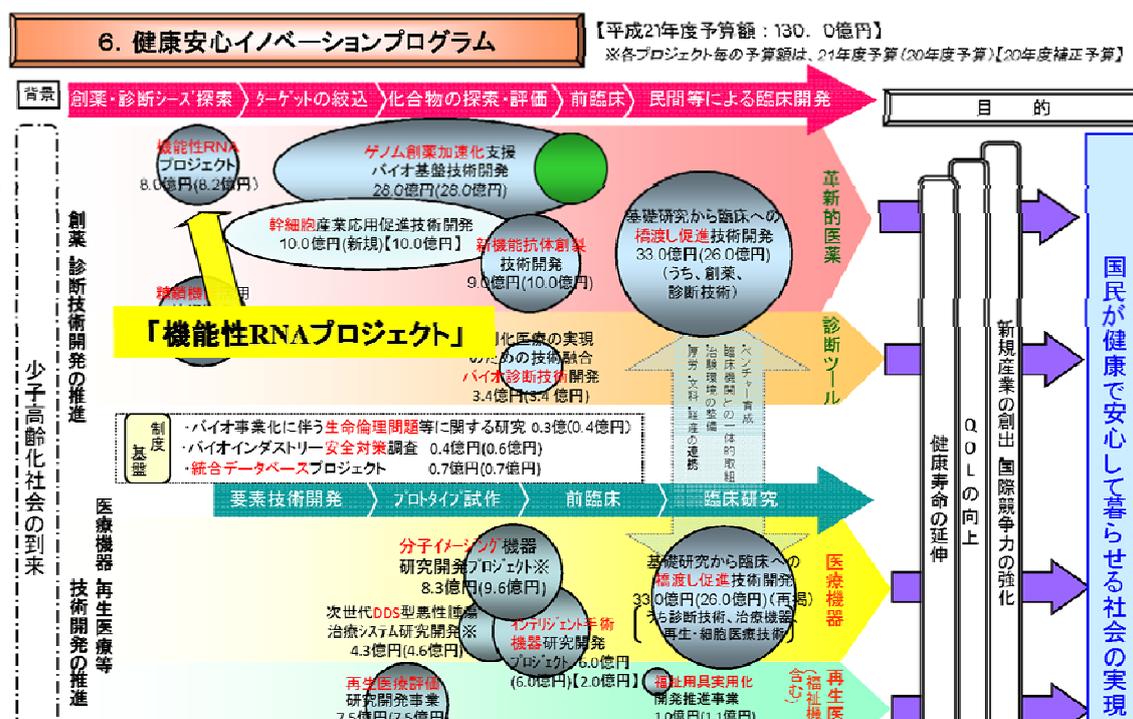
I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDOが関与することの意義

Non-coding RNA(ncRNA:非コードRNA)は、タンパク質をコードする mRNA 以外の RNA の総称である。細胞内に存在する全転写産物には相当量の ncRNA が存在することが推測されており、細胞機能を理解する上でそれらの機能解析は欠くことのできない重要課題である。昨今、このように機能を有すると推定される ncRNA、即ち、機能性 RNA による遺伝子発現調節機構が生命の発生や細胞の分化に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。

NEDO技術開発機構では、すでに研究開発が着手されている遺伝子、タンパク質、糖鎖等の生体分子の機能・構造・ネットワーク解析に加え、新たなポストゲノム研究の展開として機能性 RNA の解析を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療等の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として本プロジェクトを遂行することとした(「添付書類1. 健康安心プログラムイノベーションプログラム基本計画」を参照)。



生体における機能性RNAの機能を解析し、その機能の抑制や促進による生体応答

を総合的に把握する基礎的・基盤的研究を強力に進めることは、再生医療や疾患治療等の実現に資する重要な課題である。本プロジェクトは基礎的・基盤的研究であるが、開発する技術や研究開発過程で取得される各種のデータは、画期的な新薬の開発をはじめとした幅広い分野に直結している。この分野における国際的社会的背景と、開発すべき技術の多様性・先端性・緊急性を鑑みれば、個別企業の経営資源と開発力とではとても賄える規模の研究開発では無く、また開発技術・成果は国内バイオ・IT産業の基盤を担うものである。このような研究開発を達成するには、NEDOの関与が必要であり、我が国の企業の研究開発事業等をサポートすることへ大きな意義がある。

1. 2 費用対効果

本プロジェクトにおいては、バイオインフォマティクスの活用による機能性 RNA を推定する技術の開発、機能性 RNA 解析のための新たな支援技術・ツールの開発、及び機能性 RNA の機能解析を実施する。これらを通して、その遺伝子発現調節機構を明らかにすることにより、細胞分化誘導因子、遺伝子発現抑制因子、タンパク質翻訳調節因子等の機能を持った機能性 RNA を同定し、バイオ分野における新たな基盤形成を目指す。これにより、再生医療や RNA 医療、遺伝子治療、疾患治療等、産業応用の促進、新産業の創出が期待される。また同時に、機能性 RNA を解析する手法及びツールの開発により、機能性 RNA 解析研究を飛躍的に進めることで、本分野における我が国の優位性の確立を目指す。さらに本プロジェクトにおける成果を素早く特許化することにより、将来的な医療・診断分野における新産業の創出に貢献するなど、その実施効果は大いに期待できる。

2. 事業の背景・目的・位置づけ

近年の研究により、我々哺乳類を含む高等生物の細胞中には、従来のタンパク質をコードする RNA とは異なり、タンパク質をコードしていないにもかかわらず転写される non-coding RNA(ncRNA:非コード RNA)が多数存在することが明らかになった。これらは、機能性 RNA として、発生や細胞分化の過程において重要な役割を果たしており、癌や糖尿病などの疾患の発生にも深く関わっているものと考えられている。

本プロジェクトでは、バイオインフォマティクスの活用による機能性 RNA を推定する技術の開発、機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発、及び機能性 RNA の機能解析を行うことにより、本研究分野における我が国の優位性の確立を目指す。また、本プロジェクトにおける成果を素早く特許化することにより、将来的な医療・診断分野における新産業の創出に貢献する。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の研究開発目標

1.1 研究開発目標

最終目標(平成21年度末)

機能性 RNA 候補をゲノム上から推測するバイオインフォマティクス技術を確立する。また、機能性 RNA を高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい方法、手法の確立と、機能性 RNA をゲノムワイドに解析するためのツールを確立する。これらのツールを活用して、機能性 RNA の機能解明に取り組む。また、ヒト疾患に関連する機能性 RNA 及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性 RNA 候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。(「添付書類 2. プロジェクト基本計画」を参照)

1.2 目標設定の理由

三つの研究開発項目である、①機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発、②機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発、③機能性RNAの機能の解明、に沿った目標設定であり、実用化進展を踏まえて幅広く捉えた目標内容でもある。世界的にも競争の激しい分野であり、確実な基盤知見の取得、基盤技術の構築を目指し、産業化への出口イメージをも踏まえた目標となっている。

2. 事業の研究開発計画

2.1 研究開発項目①「機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」

【達成目標】(平成21年度末)

バイオインフォマティクス技術を活用して新規の機能性RNA候補を網羅的に予測し、機能性RNAデータベースを構築する。(「添付書類 2. プロジェクト基本計画」を参照)

【研究の必要性】

膨大な塩基配列データから、機能を持つ RNA 配列部分をすべて実験によって発見することは困難であるため、ゲノム配列・cDNA 配列などから機能性 RNA を網羅的に発見する情報技術が必要である。また、配列類似性と同時に二次構造が重要な機能性 RNA の情報解析には、既存の配列相同性解析だけでは不十分であり、機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクスの研究開発が必要である。さらに、本プロジェクト等で得られた情報を広く一般に効果的に活用するために、そのデータベースを構築することが必要である。

【研究開発の具体的内容】

機能性RNA配列を予測するバイオインフォマティクス手法の開発を実施する。また、このような技術等を活用し、ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的な予測を行い、さらに

機能性RNAのデータベースを構築する。

①-1. 機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術の開発

二次構造の類似性を考慮できるRNA配列に特化した、配列比較・検索手法を開発する。また、RNA配列の整列、配列群からの二次構造予測、機能推定を行う情報技術を開発する。また、機能性RNAをターゲットとするマイクロアレイ情報の解析技術を開発する。

①-2. ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的予測

機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術を活用し、ゲノム配列全体から機能性RNAを網羅的に予測する。

①-3. 機能性RNAデータベースの構築

機能性 RNA データを広く一般に効果的に活用するため、機能性RNAデータベースを構築する。

2.2 研究開発項目②「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」

【達成目標】(平成21年度末)

機能性 RNA をハイスループット、高感度、網羅的に解析できるバイオツールを開発する。また、超微量な機能性RNAを高感度(サブフェムトモルオーダー)で直接測定することが可能な方法・手法等の開発。

【研究の必要性】

機能性RNAを単離、精製してin vitro実験で解析する手法・ツールは、開発されつつあるが、感度面と安定性において課題が残っている。特に機能性RNAは発現が極微量でありながら、発生や分化などの生命現象で重要な機能を持つことが知られており、機能性RNAの発現量や発現変動を捉えるためには高感度なバイオツール開発が不可欠である。さらに、機能性RNA解析を加速するため、in vitro実験においてハイスループットに解析する手法・ツール開発が必要である。

【研究開発の具体的内容】

機能性RNAをハイスループットに、網羅的に、かつ定量的に再現性をもって解析できるバイオツールの開発を行う。また、発生・分化・疾患等により変動する機能性RNAの発現変動を網羅的に解析する技術の開発を行う。さらに、RNAはタンパク質と比較して更に微量であるため、測定を極限まで高感度化をはかることで、細胞から抽出した超微量な機能性RNAを高感度で直接測定する技術・手法を開発する。

②-1. RNA のマススペクトロメトリー法の開発

②-2. 機能性 RNA の高感度検出システムの開発

②-3. RNA の新規合成基盤技術開発と化学分子設計

2.3 研究開発項目③「機能性 RNA の機能解析」

【達成目標】(平成21年度末)

ヒト疾患に関連する機能性 RNA 及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性 RNA 候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

【研究の必要性】

種々の機能性RNAが、どの遺伝子を標的として、どういった機構で作用することによって発現制御を行っているか、また、機能性RNA自身の発現・機能調節はどの様に行われているか、等に関する知見は極めて少ないのが現状であり、これらの機能性RNAに関する発現・機能制御機構の解明が非常に重要となっている。さらに、疾患に関連した機能性RNAを同定、解析し、診断マーカーとしての展開、及び疾患治療や再生医療等を目指した医薬品の開発基盤を確立することも必要である。

【研究開発の具体的内容】

ヒト疾患に関連する機能性RNAの同定とその機能解析、機能性RNAの作用機序の解明、また発生・分化など重要な働きを示す機能性RNAの同定とその機能解析を行う。

③-1. ヒト疾患に関連する機能性RNAの迅速で高効率な同定

ヒト疾患に関連する機能性RNA候補を選抜し、疾患細胞株、疾患モデル動物等での評価を実施し、疾患で変異あるいは発現変動が見られる機能性RNAを同定する。これらの各種疾患関連機能性RNAに対して、*in vitro*、及び*in vivo*系で各種解析手法を駆使して機能解析を行う。特定された機能性RNAについては、核酸関連低分子化合物等を用いて機能性RNAの発現・機能を制御するための研究開発を行う。

(1) ヒト疾患に関連する機能性 RNA の同定と機能解析

(2) 機能性 RNA 解析に基づくゲノム医学研究

③-2. 機能性RNAに関する基盤的知見の獲得とそれを基にした機能性RNA同定

発生・分化等におけるダイナミックな機能性RNAの発現変動解析、同定を行い、新規な機能を有する機能性RNAの発見を目指す。さらに機能性RNAの生体細胞内での生合成経路、局在、結合パートナーの同定を通して、機能性RNAの機能を解明し、その機能を人為的に制御するシステムを構築する。

(1) 機能性 ncRNA の多面的選別法の確立と機能解明

(2) マイクロ RNA の作用機構の解明

(3) アンチセンス RNA の機能解析

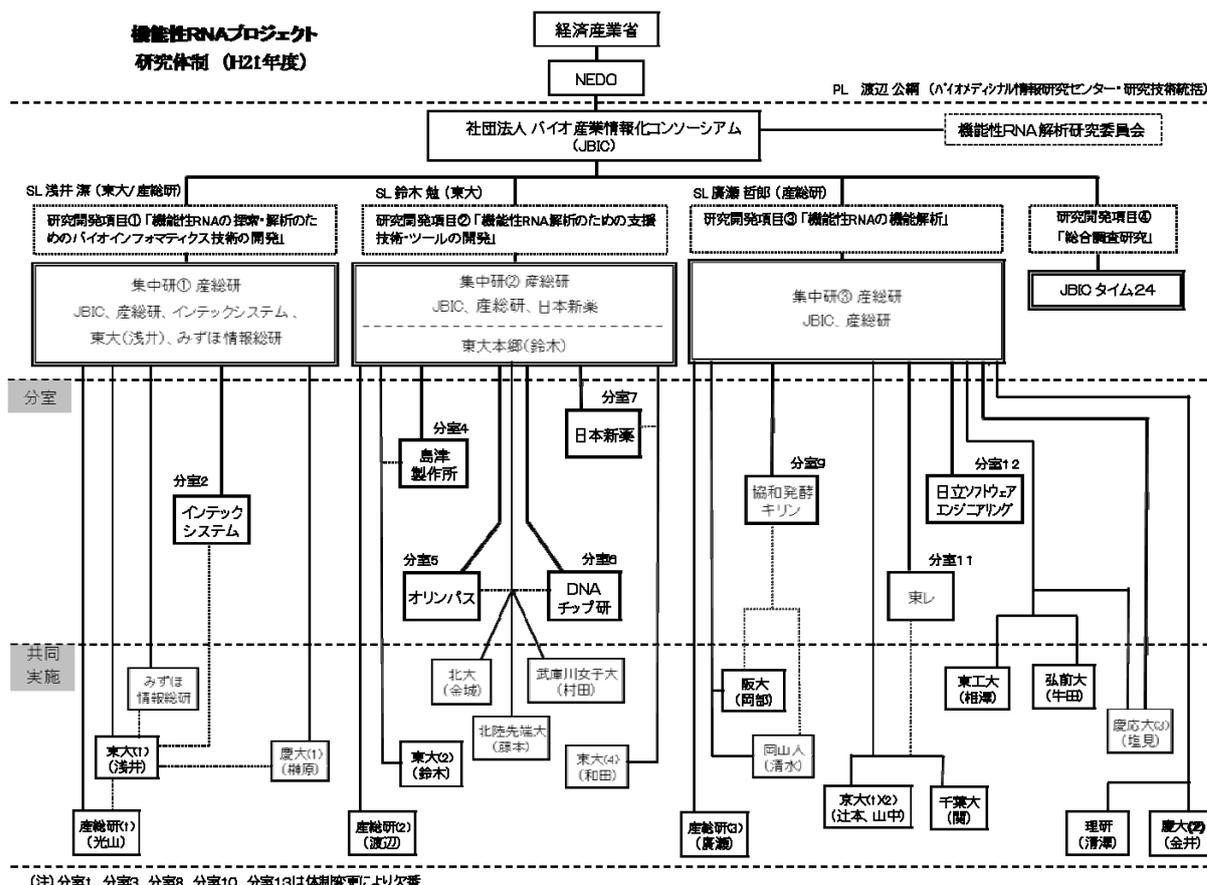
3. 研究開発実施の事業体制

3.1 事業体制

本研究開発は、平成17年度に経済産業省産業技術環境局研究開発課及び製造産業局生物化学産業課において基本計画を策定し本事業を実施した。平成18年度～平成21年度は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(以下「NEDO技術開発機構」という)において本事業を実施した。この際に「委託契約事務の取扱いに関する機構達

(平成15年機構達第8号)第14条「公募によらない場合の適用基準」に基づき、NEDO技術開発機構において公募による研究開発実施者の選定は行わなかった。

また、独立行政法人産業技術総合研究所生物情報解析研究センター 渡辺公綱 研究技術統括を研究開発責任者(以下「プロジェクトリーダー」という)とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施した。[研究体制図を参照]



3.2 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省、プロジェクトリーダー(PL)である渡辺公綱、及び委託先である社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム(JBIC)と密接な関係を維持しつつ、「健康安心イノベーションプログラム」の目的及び目標、並びに本事業の目的及び目標に照らして運営管理を実施した。

具体的には、渡辺公綱PLを委員長とした「機能性RNA解析研究推進委員会」を組織し、原則月1回「サブリーダー会議」を開催した。各分室・共同実施先からは毎月「月報」を提出してもらい、サブリーダー会議においてレビューを行った。本委員会は「お台場機能性RNAコロキウム」(研究進捗討議会)を年間に8回程度開催し、各研究開発項目間における情報交換の場とした。「研究進捗報告会」(全体会議)を原則年1回開催し、外部委員を招集し、プロジェクト方針についての助言を得た。さらに、平成19年1月には「研究進捗状況

ヒアリング」を2日間に渡って開催し、その結果を次年度の研究実施計画に反映させた。それぞれの開催実績は以下の通りである。

○月報の提出:

各グループ(分室、共同実施先)の業務管理者または主要研究員が、翌月の5日までに、A4版1ページに進捗状況を記載し、SPLにメールで提出した。(秘密情報を含む場合はパスワード保護をかけるか、または郵送とした) 下記サブリーダー会議において、各SPLがお互い担当テーマの状況を紹介した。多岐にわたるプロジェクト各テーマの進捗概要を把握するのに非常に有効であった。

○サブリーダー会議の開催:

プロジェクトリーダー(PL)、3名のサブリーダー(SPL)およびJBICのプロジェクト担当者が原則毎月会合し、プロジェクトの運営について協議・決定した。

開催日時:

H17(2005)年度(6回)

9/9, 11/18, 12/12, 1/18, 2/1, 3/23

H18(2006)年度(11回)

4/26, 5/24, 6/28, 7/24, 9/19, 10/25, 11/27, 12/19, 1/24, 1/29, 3/28

H19(2007)年度(4回)

4/11, 4/18, 5/17, 6/12, 8/24, 9/18, 10/26, 11/28, 12/25

H20(2008)年度(8回)

5/7, 6/18, 7/18, 9/10, 11/14, 12/18, 1/22, 2/20,

H21(2009)年度(6回)

5/21, 6.26, 8/19, 10/13, 11/18, 12/25

会議メンバー:

氏名		所属・役職
渡辺 公綱	PL	産総研 生物情報解析研究センター・研究技術統括
浅井 潔	SPL①	東京大学 大学院新領域創成科学研究科・教授 産総研 生命情報工学研究センター・センター長
鈴木 勉	SPL②	東京大学大学院工学系研究科・教授
廣瀬 哲郎	SPL③	産総研 生物情報解析研究センター・チーム長
中川 智	委託先	JBIC 研究開発本部・担当部長

○お台場機能性RNAコロキウム(研究進捗討議会)の開催:

原則月1回の頻度で、集中研(お台場)において開催した。3名の研究員が研究進捗状況を報告し、ディスカッションを行った。時により、学会参加報告会とした。毎回40名程度の参加があり、活発な情報交換の場となった。

○研究進捗報告会(全体会議)の開催:

2005年10月3日 13:00~18:00 キックオフ・ミーティング

各グループの研究計画紹介。参加者101名。

2006年2月22日 13:00~18:00 平成17年度研究進捗報告会

各グループの研究報告。外部評価委員2名。参加者87名。

2007年2月23日 10:00~18:00 平成18年度研究進捗報告会

各グループの研究報告。外部評価委員4名。参加者97名。

2008年2月13日 10:00~18:00 平成19年度研究進捗報告会

各グループの研究報告。外部評価委員3名。参加者89名。

2009年2月13日 10:00~18:00 平成20年度研究進捗報告会

各グループの研究報告。外部評価委員4名。参加者81名。

2010年1月22日 10:00~18:00 平成21年度研究進捗報告会

各グループの研究報告。外部評価委員3名。参加者81名。

●研究進捗状況ヒアリングの実施:(自主点検)

H19(2007)年1月23日および24日(両日とも10:00~18:00)において「機能性RNA解析研究推進委員会」が各グループ(集中研、分室、共同実施先)の研究進捗状況を個別にヒアリングし、評価を行なった。この評価結果に基づき、平成19年度の研究実施計画(体制、予算配分)を決定した。

お台場機能性RNAコロキウム開催一覧

第1回 2006年11月29日(火)16:30~19:00 参加者40名

金 大真(産総研)「RNAのバイオインフォマティクス研究の課題と展望」

堀 邦夫(ハスジーン)「蛍光相関分光法による核酸分子の挙動測定」

廣瀬 哲郎(産総研)「mRNA型ncRNAの研究法についての考察」

第2回 2006年12月12日(月)15:00~17:00 参加者42名

北川 英俊(日本新薬)「新しい保護基CEMを用いたRNAの化学合成法の開発」

相澤 康則(東工大)「ヒト間葉系幹細胞を用いた機能性RNA研究の展望」

牛田 千里(弘前大)「線虫を材料として用いた機能性RNA研究の利点」

第3回 2006年1月18日(水)13:00~15:00 参加者44名

浅井 潔(東大)「革新的なRNA配列情報解析技術の開発」

村田 成範(DNAチップ研)「MPEX法を用いたRNAの微量検出法の構築」

森川 實(ジェノタイプファーマ)「尋常性乾癬に関与する機能性RNA」

第4回 2006年3月23日(木)13:30~15:30 参加者41名

齋藤 輪太郎(慶応大)「センス・アンチセンスRNAのバイオインフォマティクス」

清澤 秀孔(理研)「センス・アンチセンスRNAの網羅的発現解析」

塩見 美喜子(徳島大)「マイクロRNAの機能発現に関与するタンパク質因子の解析」

第5回 2006年4月20日(木)13:30~16:00 参加者48名

榊原 康文(慶応大)「確率文法とカーネル法によるRNA配列情報解析技術の開発」

鈴木 勉(東大)「RNAのマススペクトロメトリー法の開発」

関 直彦(千葉大)「ヒト腫瘍組織を用いた機能性RNAの発現解析」

第6回 2006年5月29日(木)13:30~15:30 参加者47名

浜田 道昭(みずほ情報総研)「RNAの二次構造に着目した革新的な配列解析アルゴリズムの開発」

斎藤 博英(京大)「機能性モチーフとその結合蛋白質を用いたリボスイッチの構築」

- 吉田 哲郎 (協和発酵) 「ユニークな培養細胞系からの新規マイクロ RNA のクローニングと機能解析」
 第7回 2006年6月28日(水)13:00~15:00 参加者41名
 金 大真 (産総研 CBRC) 「データベース関連の最近の状況について」
 長尾 一生 (JBIC 研究員) 「機能性 RNA を in vivo で計測するシステム及び高感度検出システムの開発」
 井手上 賢 (JBIC 研究員) 「H-inv 登録 Non-coding RNA 候補の細胞内局在と RNA 制御因子の作用について」
 第8回 2006年7月19日(木)13:00~15:30 参加者41名
 * 学会参加報告
 加藤 敬行 RNA2006 Annual Meeting of RNA Society (Seattle, 米国)
 渋谷 利治 RNA2006 Annual Meeting of RNA Society (Seattle, 米国)
 廣瀬 哲郎 RNA2006 Annual Meeting of RNA Society (Seattle, 米国) + 日本 RNA 学会年会
 井手上 賢 IUBMB International Congress (京都) + 日本 RNA 学会年会
 長尾 一生 IUBMB International Congress (京都)
 相澤 康則 Cold Spring Harbor Laboratories Symposium "Regulatory RNA" (New York, 米国) + 日本 RNA 学会年会
 牛田 千里 Cold Spring Harbor Laboratories Symposium "Regulatory RNA" (New York, 米国) + 日本 RNA 学会年会
 * 番外
 金 大真 (産総研) 「バイオインフォマティクス・ツールの解説」
 第9回 2006年9月19日(火)15:30~17:30 参加者38名
 佐藤 健吾 (JBIC 研究員) 「Benasque 会議(機能性 RNA ワークショップ、スペイン)の報告」
 植竹 弘一 (日本新薬) 「RNA の新規合成基盤技術開発と化学分子設計」
 相澤 康則 (東工大) 「ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の分化に関わる ncRNA の探索」
 第10回 2006年10月23日(月)15:30~17:30 参加者26名
 村田 成範 (DNA チップ研究所) 「マイクロアレイ上での酵素反応系を用いた短鎖 RNA の微量検出法の構築」
 田中 正史 (ジェノタイプファーム) 「尋常性乾癬感受性領域に発現する ncRNAs」
 牛田 千里(弘前大) 「Movement of *C. elegans* small ncRNAs in oogenesis, fertilization and early embryonic cell division」
 第11回 2006年11月27日(月)15:00~17:00 参加者45名
 塩見 美喜子 (徳島大) 「ショウジョウバエ *Aubergine* と rasiRNA を介して起こる RNA silencing」
 吉田 哲郎 (協和発酵) 「ヒトマスト細胞からの miRNA の単離と発現解析」
 加藤 敬行 (東大) 「RNAi 活性に影響を及ぼす因子の同定と高効率 siRNA 設計法の開発」
 第12回 2006年12月19日(火)15:30~17:30 参加者36名
 井上 丹 (京大) 「ncRNA の機能制御システムの開発」
 寺澤 和哉 (京大) 「分化に関わる miRNA の同定とその機能解析」
 清澤 秀孔 (理研) 「ヒト組織、及び腫瘍組織におけるセンス-アンチセンス RNA の発現解析」
 第13回 2007年4月18日(水)15:00~17:00 参加者43名
 * 最近の国際学会レポート
 佐藤 健吾 (CBRC): BIRD 2007
 加藤 敬行 (東大): キーストーンシンポジウム
 櫻井 雅之 (東大): ゴードン会議
 長尾 一生 (JBIRC): 生物物理学会
 青木 一真 (JBIRC): RNA2006Izu
 井手 上賢 (JBIRC): RNA2006Izu
 第14回 2007年5月17日(木)15:30~17:30 参加者39名
 木立 尚孝 (CBRC) 「RNA 配列多重アラインメントツール Murlet」
 上田 宏生 (東大) 「RNA マスフィンガープリント法の開発」
 佐々木 保典 (BIRC) 「ヒト機能性 RNA の基盤的特性の発見」
 第15回 2007年7月23日(月)15:30~17:30
 菊池 (東工大) 「分化誘導系によるノンコーディング遺伝子の抽出と発現解析」
 牛田 (弘前大) 「組織特異的発現を示す新規 ncRNA について」
 陶山 (東大) 「アトモル以下の多種類の RNA の同時定量を逆転写をせずに行うフォト DEAN 法」
 第16回 2007年9月18日(火)15:30~17:30
 浅井潔 (東大、産総研) 「RNA 配列情報解析ツールの現状と今後の課題」
 北川英俊 (日本新薬) 「CEM 法を用いる長鎖 RNA 合成と修飾核酸合成への取り組み」
 沼田興治 (理研) 「人工逆鎖プローブをもちいた新規内在性アンチセンス RNA の予測に向けた試み」
 第17回 2007年10月26日(金)13:00~15:00
 村田 成範 (DNA チップ研究所) 「miRNA 検出用マイクロアレイツールの開発経過報告と今後の展開」
 塩見 美喜子 (徳島大学) 「内在性ヒト Argonaute に結合する small RNA の解析と機能相違」

- 中野 春男 (協和発酵)「癌細胞の増殖・細胞死に関するマイクロ RNA の同定と機能解析」
 第18回2007年11月28日(水)13:00～15:00
 金大真(産総研)「機能性RNAデータベースの構築とカスタムマイクロレイトを用いた新規RNA遺伝子候補領域の発現解析」
 宮内健常(東大)「往復循環クロマトグラフィーによる機能性RNAの単離精製」
 小柳三千代(京大)「マウス体細胞の初期化に関わる microRNA の探索とその機能解析」
 第19回2007年12月25日(水)15:30～17:30
 寺井 悟朗(インテックW&G/JBIC)「パラログ解析に基づく機能性RNA発見」
 藤本 健造(北陸先端大)「RNA 解析に向けた光ライゲーション技術の開発」
 青木 一真(JBIRC)「ヒト機能性ncRNAの機能解析に向けた組織特異性を指標としたアプローチ」
 第20回2008年4月18日(金)15:15～17:15
 坂口 裕理子(東大)「RNA マススペクトロメリーの開発」
 井手上 賢 (BIRC)「核内機能性 RNA の機能解析」
 相澤 康則 (東工大)「ヒト幹細胞関連ノンコーディングRNA遺伝子の機能分類」
 第21回 2008年11月17日(月)15:30～17:30
 佐藤 健吾(産総研 CBRC/JBIC)「カーネル法による機能性 RNA 遺伝子の探索」
 櫻井 雅之(東大工/JBIC)「ヒト転写産物におけるイノシン化部位の網羅的探索と機能解析」
 清澤 秀孔(理研)「アンチセンス転写とエピジェネティックな遺伝子発現制御」

4 研究開発成果の実用化に向けたマネジメント

4.1 知財戦略

【方針】

1. 本プロジェクト成果において、実用化の核となる基盤技術をコア技術として、その知財を重点的に確保する。
2. 個別のテーマ(機能性RNAの探索・発見など)については参画企業の戦略(医薬開発戦略等)を尊重。

【成果】

区分 年度	特 許 出 願		主なコア技術特許
	国内	国外	
H17	1件	0件	①RNA の二次構造予測技術(アルゴリズム)
H18	8件	2件	
H19	7件	6件	②RNAの質量分析技術
H20	9件	11件	
H21	5件	7件	③RNAの生物学的ノックダウン分析技術
小計	30	26	
計	56		③iPS細胞作成技術

4.2 成果実用化を推進するマネジメントの取り組み

【方針】

本プロジェクト成果を他のNEDOプロジェクトに紹介し組合せ、実用化に向けたシナジー効果を模索する。

【成果】

研究開発項目②における「RNAの質量分析技術」を核酸医薬による遺伝子治療に関する他のNEDOプロジェクトに紹介し、モデル動物の血中での核酸医薬候補の分析を実

施し成功。該遺伝子治療の有用性の一端が証明され、治療推進の根拠となった。

5. 情勢変化への対応

5.1 研究テーマおよび研究体制の見直しと強化・発展

○「研究進捗状況ヒアリング」(H19年1月)における見直し(自主点検の実施)

- ・テーマ③-1-(2)「尋常性乾癬に関わる RNA の機能解析」については、当初予定していた臨床検体の入手ができておらず、研究が大幅に遅れてしまい、今後の改善の目処も立たないため、平成18年度をもって本テーマは中止した。この結果、ジェノダイブファーマ株式会社(分室10)と東海大学(共同実施先)を研究実施体制から外した。
- ・テーマ②-2「機能性 RNA を in vivo で計測するシステムの開発」については、標識した RNA を細胞内に取り込ませる技術の確立に手間取り、研究が大幅に遅れてしまった。そこで、当面は、本テーマは中断することとし、計画通り進捗しているテーマ②-3「機能性 RNA の高感度検出システムの開発」の方に研究資源を集中することとした。その他のテーマについても、評価結果を平成19年度の予算配分に反映させた。

◎加速予算を投入(H19年4月)し研究を推進

- ・テーマ②-1「RNA のマスペクトロメトリー(質量分析技術)の開発」は、本プロジェクトを支える重要なツール開発であり、世界的に見ても日本発のオリジナルな技術である。実施計画をはるかに上回るペースで開発が進んでいることから、NEDO技術開発機構が独立行政法人に移行する際に新設された、著しい成果を挙げているプロジェクトに対して追加的な資金を投入する「加速財源制度」を活用し、平成19(2007)年4月にフーリエ変換型質量分析装置を導入した。本装置は、2005年にサーモエレクトロン社が発売したもので、質量分解能が飛躍的に高く、創薬分野や精密化学分野では必要不可欠な装置としての定評を得ている。RNA 研究に応用されるのも時間の問題と思われる、本プロジェクトが築き上げた優位性を確保するために、いち早く本装置を導入した。

○中間評価(H19年4月)における見直し

「5.2 中間評価の受審と対応」を参照)

○最終年度にむけた見直し【H21年4月】

テーマ①-2「ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測」における「比較ゲノムによるゲノム相同領域の抽出」(三菱総研担当)については一定成果が得られ、抽出した領域の解析に研究開発の重点が移ったため、プロジェクト途中で終了した。

5.2 中間評価の受審と対応

5.2-1 中間評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成19年度に以下のとおり実施し、その結果を踏まえ、プロジェクトの見

直しを実施した。

【中間評価】

①中間評価分科会

日時:平成19年7月4日(水) 13:00～17:30

場所:日本科学未来館 7階 会議室2

②評価手法: 外部評価

③中間評価委員:

分科会長	大石 道夫	かずさDNA研究所	理事長兼 所長
分科会長 代理	饗場 弘二	名古屋大学 大学院 理学研究科 生命理学専攻	教授
委員	中井 謙太	東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析 センター 機能解析イン・シリコ分野	教授
委員	名取 幸和	東京工業大学 大学院 理工学研究科 コアリッションセンター機能体	特任教授
委員	西島 和三	持田製薬株式会社 医薬開発本部 開発企画推進部	主事
委員	横山 勇生	日経BP社 日経メディカル別冊	編集委員

5.2-2 中間評価結果

肯定的な評価ポイント

機能性RNAのバイオインフォマティクスによる予測技術、検出・解析技術、および生体機能と作用機構の解明の目標を掲げ、順調に研究を進めている。興味深い結果も創出しており、後半は更なる成果が期待される。機能性RNA研究は世界的な競争の状態にあり、将来のバイオ産業の新たな柱を生み出す可能性のある技術である。基盤研究の構築・確立は我が国の民間企業のみでは到底達成できない分野であり、本プロジェクトを実施する意義は高い。

対応を要する評価ポイント:

一方、欧米においてその限界が明確となったり、逆に最終目標のハードルが高い分野もあるので、世界の趨勢をよく見極め、テーマの絞り込み、予算の集中化、など柔軟に軌道修正を行うとともに、積極的に3グループ間で協力関係を築いてほしい。

具体的には以下のとおりである。

- ① バイオインフォマティクス技術については理論的な成果は積み上げられているが、検証実験については不十分であり、プロジェクト全体に対する貢献度を上げるためにも、開発した予測技術の有効性を明確にすべきである。
- ② 支援技術・ツールの開発においては各テーマの有機的な連絡、研究の必然性が不明である。従来技術と対比した上での活用法、残された解析課題などを明確にして欲しい。
- ③ 機能性RNAの機能解明については互いに独立な多数の研究グループの集まりのような印象がある。プロジェクト後半は、良い芽を出している研究をいくつか選択して、実用化・事業化を目指した研究を行うために、テーマの推進・連携方法について工夫すべきである。

5. 2-3 対応を要する指摘事項への対応

指摘事項

① バイオインフォマティクス技術については理論的な成果は積み上げられているが、検証実験については不十分であり、プロジェクト全体に対する貢献度を上げるためにも、開発した予測技術の有効性を明確にすべきである。

【対応】

バイオインフォマティクス技術については、機能解析グループとも連携しつつ、検証実験を計画し、機能解析候補の絞り込みを通じてインフォマティクス技術の有効性を示す取り組みを進めた。

指摘事項

② 支援技術・ツールの開発においては各テーマの有機的な連絡、研究の必然性が不明である。従来技術と対比した上での活用法、残された解析課題などを明確にして欲しい。

【対応】

支援技術・ツールの開発においては従来技術と比較した優位性及び問題点の明確化、開発技術の活用法の検討による必要性の明確化を行い、テーマの絞り込みと予算の集中化を行った。

指摘事項

③機能性RNAの機能解明については互いに独立な多数の研究グループの集まりのような印象がある。プロジェクト後半は、良い芽を出している研究をいくつか選択して、実用化・事業化を目指した研究を行うために、テーマの推進・連携方法について工夫すべきである。

【対応】

機能性RNAの機能解明については各グループの有するリソースや情報の共有などを通じて連携を進めるとともに、産業競争力に寄与しうる先進的な基盤技術になるテーマ、競合優位性を獲得しうるテーマの選択、強化を行い、研究の促進を図った。

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

1.1 成果概観

2005年7月から2010年2月まで、約5年弱の期間を費やして、「機能性 RNA プロジェクト」が産官学連携の下で実施された。ちょうど今世紀に入る頃に発見された種々の形態をもつノンコーディング機能性 RNA を検出・単離するツールを開発し、その機能を解明するという本プロジェクトは、時代の流れに即したものであった。それは単に生命現象における機能性 RNA の機能を探求するにとどまらず、多くは未知の機能の解明を通じてガンやもろもろの疾病に対する医薬品の開発や再生医療に資する基盤技術を確立するという極めて発展性が高く、応用範囲の広いテーマである。

世界的な激しい競争下において独自性と優位性を確保するために設定された、①機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発、②機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発、③機能性 RNA の機能解析という3研究開発項目が、それぞれの目標の実現に向けて努力するとともに、3者が相互に緊密な連携を取りながら研究を推進することにより、数々の重要で顕著な成果を挙げる事ができた。

○機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発では、機能性 RNA の網羅的予測を可能にし、世界最高レベルの2次構造を考慮した RNA 配列情報技術を数多く開発することに成功し、今後 RNA 創薬のための有用な解析ツールとなる予測機能性 RNA のカスタムマイクロアレイ（連携研究による）や、機能性 RNA だけでなくゲノム中のさまざまな因子を網羅的に解析するための情報基盤として有益な機能性 RNA データベースを開発するなど、多くの実用化に近い成果を挙げた。

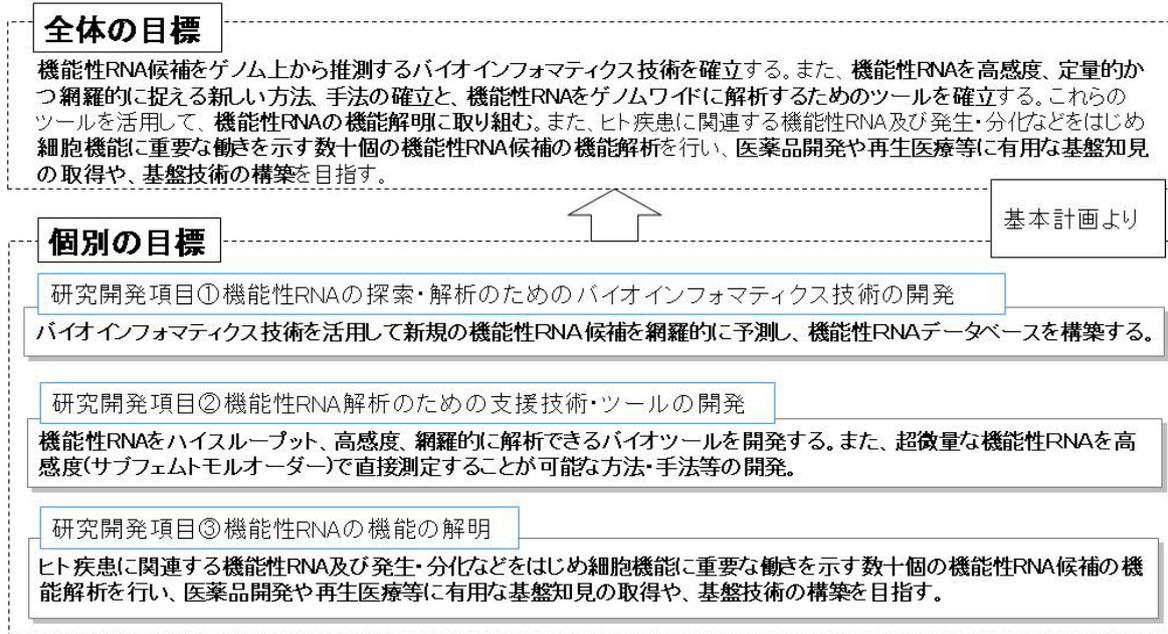
○機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発では、世界標準を目指した核酸医薬の薬物動態の解析に役立つ RNA-MS と情報解析技術、RNA の全自動合成精製技術など実用化に近い成果や、製品化に向け検討中の miRNA 用高感度マイクロアレイやすでに研究用試薬として販売を開始した高品質で安価な RNA 化学合成法など、もっとも出口に近い成果を挙げている。

○機能性 RNA の機能解析では miRNA 機能を利用した再生医療技術、アレルギー疾患治療技術、ガン治療技術、あるいは iPS 細胞の効率良い作出技術などの他、診断マーカーとしての長鎖 ncRNA やアンチセンス RNA の利用技術の基盤を確立した。

これらの成果は機能性 RNA 研究を飛躍的に発展させ、本分野における我が国の優位性を確立することに大きく貢献した。さらに、特に機能解析では再生医療、難疾患治療等医療・診断分野における新産業の創出などに貢献し得る成果を挙げた。miRNA の機能解析では世界的な激しい競争下で評価すべき上記の成果を挙げたが、長鎖 ncRNA の機能解析は、miRNA の研究と比較すれば世界的に見てもやっと研究の端緒に辿り着いたばかりの分野であり、まだ解決すべき問題は山積しており、今後の飛躍的な発展が期待される。

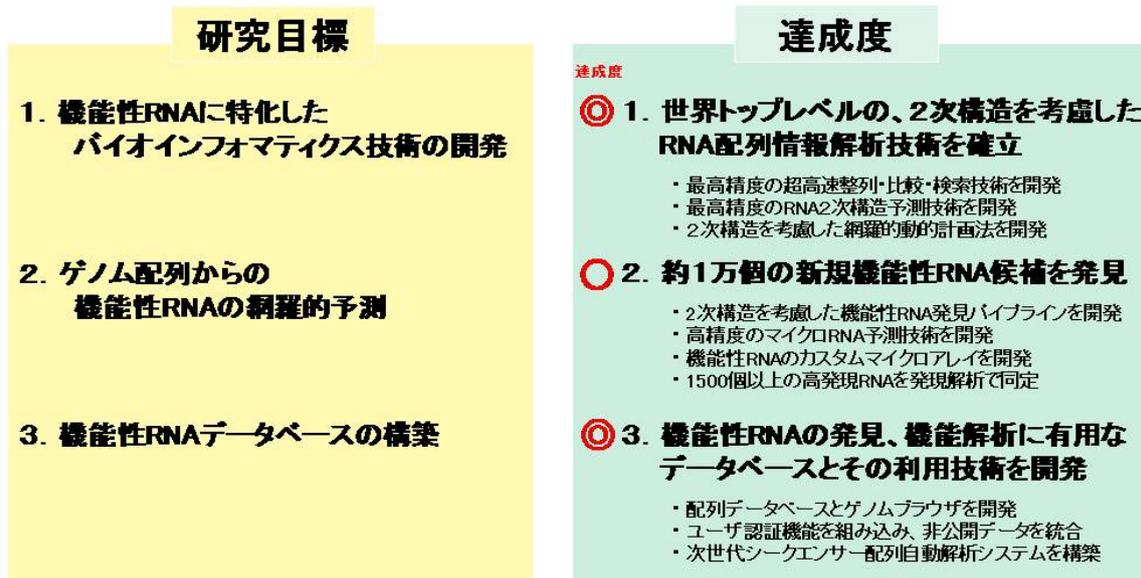
1.2 最終目標と達成度

研究開発項目ごとの個別目標を達成し全体目標に至る。



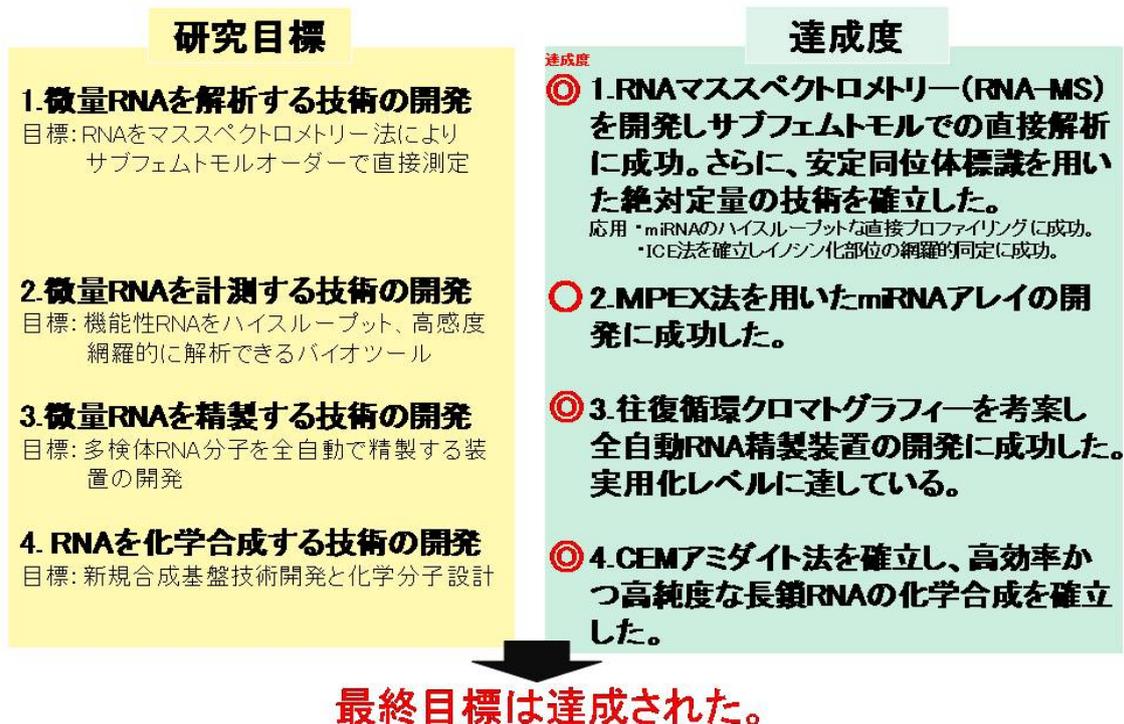
26/53

研究開発項目① 目標達成まとめ

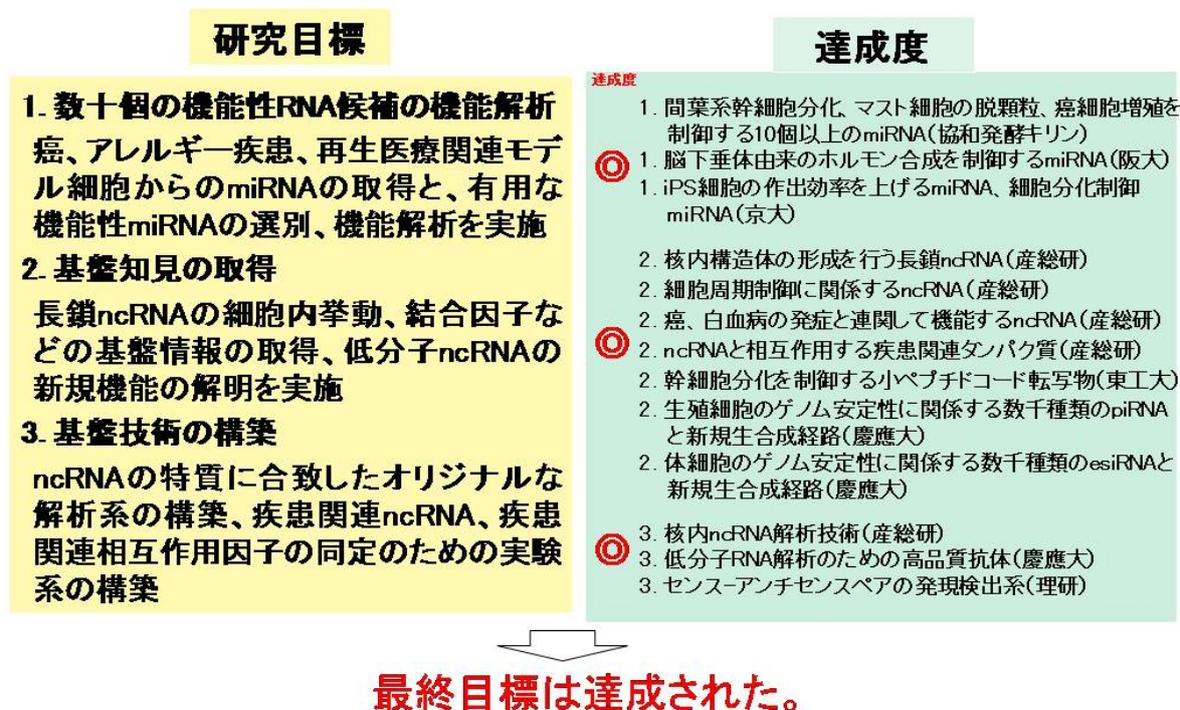


最終目標は達成された。

研究開発項目② 目標達成まとめ



研究開発項目③ 目標達成まとめ



1.3 達成度各論

1.3.1 ① 機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

【最終目標】

バイオインフォマティクス技術を活用して新規の機能性 RNA 候補を網羅的に予測し、機能性 RNA データベースを構築する。

【目標に対する達成度】

① RNA の発見、機能解析に重要な、2 次構造を考慮した配列情報解析技術に関して、画期的な技術を開発に成功し、数々の有用なソフトウェアを開発した。理論面においても、期待精度最大化原理を発展させた新理論を展開し、2 次構造予測、構造アラインメントの精度や速度では世界最高レベルを達成した。また、高度な動的計画法を駆使し、RNA の相互作用、塩基置換によるエネルギー変化などの解析に必須なソフトウェアを開発した。また、RNA 配列の比較・検索に有効なカーネルを設計し、snoRNA の発見に有効であることを実証した。さらに、開発したソフトウェアは①-2 機能性 RNA 発見に提供し、Nature、PNAS 等の一流誌（4 報）にて掲載された共同研究成果に結びついた。

このように RNA 配列情報解析技術（バイオインフォマティクス技術）については、世界最高レベルの技術を数多く開発することに成功し、目標を大きく上回る成果である。

② 機能性 RNA を効率よく発見するための基盤技術の開発に成功し、ヒトゲノムから 10,000 個以上の機能性 RNA をバイオインフォマティクスにより予測し、カスタムアレイによる解析によって、1,500 個以上の高発現機能性 RNA を発見した。また、進化的に保存したマイクロ RNA に対する最高精度の予測技術の開発に成功すると共に、mRNA の構造制約を評価して標的 mRNA を予測する技術を開発した。また、偽遺伝子の特徴を利用した機能性 RNA 予測手法を開発し、癌マーカー遺伝子や新規 snoRNA を発見した。

このように新規の機能性 RNA 候補の網羅的予測については、目標を達成している。

③ 50 万配列以上を網羅した機能性 RNA データベースを構築し、公開した。配列データベースである fRNAdb と、機能性 RNA に特化したゲノムブラウザである UCSC Genome Browser for functional RNAs を連携させて開発し、既知の機能性 RNA 情報、予測機能性 RNA 情報、miRNA 標的など数多くの有用な情報を DB 上で提供している。また、ユーザ認証機能を組み込み、共同研究に活用するなど、プロジェクト内の情報基盤を提供した。さらに、次世代シーケンサー配列自動アノテーションシステムを開発した。これらのデータベース、システムは、エピゲノム解析など今後様々なプロジェクトに活用できる情報基盤である。

このように機能性 RNA データベースの構築については、実用的で網羅的なデータベースの開発に施工したことに加え、ユーザ認証機能の付加とその活用におけるプロジェクト内共同研究の成功は、目標を上回る成果であった。

以上を総合し、本研究開発項目は目標を大きく上回る成果を上げたと考えられる。

1.3.2 ②機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発

【最終目標】

機能性 RNA を高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい方法、手法の確立と、機能性 RNA をゲノムワイドに解析するためのツールを確立する。これらのツールを活用して、機能性 RNA の機能解明に取り組む。

【目標に対する達成度】

①RNA を高感度で直接解析するための手法として、RNA マススペクトロメトリー (RNA-MS) を開発し、中間年度ですでにプロジェクトの最終目標値であるサブフェムトモルオーダーでの RNA の微量解析に成功した。本手法を駆使することで、piRNA の末端修飾構造の同定、miRNA の選択的安定化機構の解明、miRNA 直接プロファイリング、新規 RNA 修飾の発見など、これまでの手法では不可能であった様々な解析に成功した。また、膨大な質量情報を情報処理するアルゴリズムやソフトウェアの開発にも成功し、知財戦略的にも優位に立った。さらに RNA-MS を支援するツールとして、往復循環クロマトグラフィー法を考案し、微量 RNA の全自動精製装置の開発にも成功した。RNA-MS は、cDNA 解析に頼らない全く新しい RNA の解析技術であり、機能性 RNA 研究のみならず、RNA 創薬や核酸医薬の開発を強力にサポートする基盤技術に成長した。本開発テーマは、最終目標値をクリアすることにより、加速財源の投入を得ることが出来、多くの研究業績を残すことができた。

②RNA の網羅的解析技術としては、ヒトの RNA に大量に含まれるイノシン化修飾を特定する手法の開発を行った。ヒト脳由来 RNA には大量のイノシン化修飾が存在することが知られ、高次なレベルでの脳機能に関わると考えられている。イノシン化部位を網羅的に同定するために、独自に開発した ICE 法と、次世代シーケンサーを組み合わせた手法 (ICE-Seq 法) を開発し、ヒト脳のトランスクリプトームから、現在までに 3 万箇所を超えるイノシン化部位を同定した。このうちの約 80% の部位は計算科学では予測不能な新規部位であった。これらの多くは miRNA による翻訳抑制を調節する役割があることが示唆された。今後は脳神経疾患と RNA エディティングの変動解析を行っていく予定である。

③RNA のハイスループット、高感度検出に関しては、多重伸長反応 (MPEX) 法や光化学反応法を利用した新規の手法を開発した。MPEX 法に関しては miRNA をプロファイリングするためのマイクロアレイを開発し商品化へのめどをつけた。

④RNA の化学合成技術も実用化に成功し高品質かつ安価な核酸医薬の供給が可能になり、実用化と事業化に成功している。本手法により、長鎖 RNA の化学合成に成功し、生物活性を確認することができた。高品質かつ安価な合成 RNA を供給するシステムが整い、今後は

これらの技術を診断分野や核酸医薬の開発に積極的に活用する予定である。

以上より最終目標に対する達成度は100%と言える。

1.3.3 ③ 機能性 RNA の機能解析

【最終目標】

ヒト疾患に関連する機能性 RNA 及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性 RNA 候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

【目標に対する達成度】

①疾患や再生医療のための重要な新技術となりうる有用な機能性 miRNA が数多く同定された。協和発酵キリンググループが同定したマスト細胞からの脱顆粒効率を制御する miRNA は、今後のアレルギー疾患の治療技術につながる重要なものである。同グループによる癌細胞の増殖を制御する miRNA についても、同様の活性を有する既知の miRNA よりも高効率で機能するものも取得されており有望である。上記の2つの現象については、ポジティブな効果を果たす miRNA とネガティブな効果を果たす miRNA がそれぞれ取得されていることも特筆に値する。つまりポジティブ因子として miRNA に対しては、その機能を抑制するための核酸誘導体を投与する戦略を立てることができ、一方でネガティブ因子として miRNA に対しては、miRNA そのものを核酸医薬品として用いて細胞に投与する戦略を立てることが可能になる。同グループは、miRNA を投与した培養細胞をマウスに移植しゼノグラフト化したものを長期に追跡し、miRNA 効果が長期に渡り持続していることまで確認している。こうした創薬開発のための基盤的検定を積み重ねることによって、miRNA を用いた新しい医薬品の開発に結びつく事が期待される。

②京都大学グループでは、iPS 細胞の作出効率を著しく増大させる miRNA を新しく同定することに成功した。iPS 細胞の作出は、効率だけでなく、高品質な iPS 細胞を作り出すことなど、今後益々技術向上が求められることが推測されるが、miRNA はそうした過程で重要な因子としてクローズアップされることが期待される。本プロジェクトの成果は、その先駆けとなるもと位置づける事ができ、今後の iPS 細胞作出技術向上への貢献と、作出メカニズム解明の糸口として利用されることを期待したい。

③ゲノムの暗黒物質とも呼ばれ機能がほとんど未知であった長鎖 ncRNA についての様々な新しい特徴が明らかになった。産総研グループは、長鎖 ncRNA の特徴として細胞核内で機能すること、特定の組織で特異的に機能するものが多数を占めることを明らかにした。細胞核内の RNA を機能解析するための新しい解析ツールとして、アンチセンス核酸を用いた核内 RNA ノックダウン法を開発し、この方法を駆使した核内 ncRNA の新しい機能を解明した。特に細胞内構造体の構築を司る ncRNA 機能や、細胞周期特異的な DNA 複製時の制御を

行う ncRNA 機能、クロマチン上での発現制御機能などの発見は、特筆すべき成果といえる。一方で、ncRNA が相互作用タンパク質と共に機能体を形成することに注目し、微量の ncRNA と相互作用する因子の新しい同定法を考案し、新しいタンパク質と ncRNA の相互作用を明らかにした。こうした研究の進め方は、今後の長鎖 ncRNA の機能解析のための先駆けとなる研究手法となることが期待される。また相互作用因子の解析や詳細な発現解析から長鎖 ncRNA や理化学研究所グループの解析によって得られた多くのアンチセンス RNA が癌、神経変性疾患などの難治性疾患と関わる可能性が次々と明らかになってきた。今後の詳細な機能解析を継続することによって ncRNA と疾患の接点が明らかになると期待できる。

④慶應大学グループによって、miRNA に続く新しい低分子 ncRNA の機能と相互作用因子が発見された。低分子 ncRNA が共通して結合している argonaute ファミリータンパク質を特異的な抗体を用いて解析したことによって、生殖細胞特異的な piRNA 群や体細胞由来の esiRNA 群といった新たなカテゴリーに属する低分子 ncRNA が発見された。これらの RNA は、miRNA 機能とは異なり、ゲノムを乱す様々な可動性因子の働きを抑える役割を果たしていることが推測されている。こうして数ある Argonaute タンパク質と低分子 ncRNA との的確な組み合わせによって機能分化がなされて、様々な様式で細胞内の重要な働きを行っていることを世界に先駆けて発見した点は特筆に値するといえる。

①で得られた成果は、医薬開発に向けた次のステップの研究に進行中である。次なるステップには、これらの核酸をデリバリーするための技術革新が求められている。一方、③で得られた ncRNA に関する基盤知見は、これまで配列情報だけで類推されてた ncRNA 機能に、新しい機能概念を加えたこと、さらには、ncRNA のための機能解析系が整備されたことが大きな成果であると言える。長鎖 ncRNA に関しては、プロジェクト期間中に世界的にも大きな進展が見られなかったことから、本プロジェクトで整備した研究体制を継続することによって、今後重要な発見に至る事が期待される。また既にこのプロジェクト中にも既に一端が見出されたように、基盤的な知見には必ず疾患との接点が見出され、こうした接点を今後詳細に解析することによって全く新しい医薬品開発のコンセプトが生まれることが期待される。そのような ncRNA ならではの独自機能の利用こそが真の意味でのオリジナルな RNA 医薬品となるものと考えている。

以上のように、プロジェクト開始時に想定した成果を大きく上回るオリジナリティの高い成果が数多く得られ、最終目標に対する達成度は100%と言える。

2. 研究開発項目毎の成果

本プロジェクトは、以下に示す3つの研究開発項目から構成されているため、3つの研究開発項目毎に、成果を纏め、既に設定されてある最終目標に対する達成度との観点からの記述と各研究室での研究成果の要約に分けて纏めた。以下にそれらを記載する。

- ① 機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発
- ② 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発
- ③ 機能性RNAの機能解析

上記の研究を達成するために、産官学の共同研究体制を産業技術総合研究所内に組み、さらにこれを強化するために外部の研究機関の連携のもと研究開発を行った。

2. 1 機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

【成果要約】

本研究開発項目では、ゲノム配列・cDNA 配列などからの情報技術を用いて機能性 RNA を網羅的に発見し、機能性 RNA データベースを構築し、その機能を予測して実験による計測や機能解析にも貢献する。情報技術による機能性 RNA の発見技術は未成熟なため、機能性 RNA に特化した配列情報解析技術の開発と、新旧技術の組み合わせによる機能性 RNA の網羅的发现を平行して実施し、既知の機能性 RNA、網羅的な機能性 RNA 発見の結果およびその他の情報解析結果を統合した機能性 RNA データベースを構築する。中間目標（平成 19 年度）は、1）ゲノム配列から機能性 RNA を網羅的に検出するバイオインフォマティクス技術を確立する、2）機能性 RNA の機能を予測するための情報技術を開発する、の 2 点であり、最終目標（平成 21 年度）は、バイオインフォマティクス技術を活用して新規の機能性 RNA 候補を網羅的に予測し、機能性 RNA データベースを構築することである。

機能性 RNA の発見のためには、配列の類似性だけでなく、その二次構造に基づいた解析を行わなければならない。①-1 「機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発」では、膨大な計算時間と記憶容量が必要であった従来手法の限界を克服するため、さまざまなアルゴリズム・ソフトウェアの開発を行った。その結果、二次構造を考慮した RNA 配列の構造アラインメントを高精度、超高速に行うソフトウェア、1 本の RNA 配列の 2 次構造および RNA 配列群の共通 2 次構造の予測で最高精度のソフトウェア、2 次構造と配列の両方の類似性をカーネル法によって取り込んで既知ファミリーの機能性 RNA の検索を高精度に行うソフトウェア等の開発に成功した。また、共通二次構造・二次構造モチーフを抽出するソフトウェア、RNA のアクセサビリティなど局所的なエネルギー構造を計算するソフトウェア、塩基置換に伴うエネルギー、構造等の変化を配列のすべての位置について網羅的に計算することのできる動的計画法に基づくソフトウェアなど、ゲノムレベルの網羅的な機能性 RNA の発見と機能予測や、miRNA、siRNA の標的予測、核酸医薬への応用に不可欠な技術を数多く開発した。

①-2 「ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測」では、開発したアルゴリズム・ソフトウェアを積極的に活用し、ゲノムのシンテニー領域、ヒトゲノム内の相同領域等を中心に解析、約 20 万箇所の候補領域を抽出し、その中から 1 万箇所以上の有望な機能性 RNA 候補を抽出した。また、進化的に保存された miRNA の予測を高精度に行う手法を開発し、330 個の新規 miRNA 候補を発見した。これらの新規機能性 RNA 候補についてカスタムマイクロアレイを設計して発現解析を行い、1500 個以上の高発現の機能性 RNA を発見した。RNA の分解に関与する Exosome のノックダウン実験による発現解析を機能解析グループと共同で行い、発現量が必ずしも高くない機能性 RNA を効率よく発見出来る手法を構築した。我々が行った機能性 RNA 候補の抽出、すなわちインフォマティクス技術とマイクロアレイを組み合わせたパイプラインは、発現している機能性 RNA を効率よく発見するために有効な基

盤技術であると考えられる。

①-3「機能性 RNA データベースの構築」では、既知の機能性 RNA に関する配列、文献、マッピング情報と、網羅的に予測された機能性 RNA 候補の情報を統合することにより、機能性 RNA の発見・機能予測を支援する情報基盤を提供することを目的に、UCSC ゲノムブラウザに独自の解析結果・情報を統合した UCSC GenomeBrowser for Functional RNA と、機能性 RNA の配列情報ブラウザ fRNAdb を開発した。さらに、各ユーザに固有の非公開データと公開データを同時に表示して解析を行ことのできるユーザ認証を組み込み、プロジェクト内の共同研究を促進する情報基盤を提供した。機能性 RNA データベースを活用した機能解析グループとの共同研究により重要な新規機能性 RNA を発見し、トップジャーナルに論文発表した。また、次世代シーケンサーによる発現解析から得られる大量の配列データを自動的に解析し、その帰属の決定とゲノムへのマッピングを行うシステム GIGANT を開発した。

【研究開発の方針】

本研究開発項目の目的は、機能性 RNA 配列を予測し、その機能を解明するためのバイオインフォマティクス技術を開発することである。機能性 RNA を情報技術によって予測し、予測した機能性 RNA 候補の機能解析を実験グループと連携して行い、その成果を蓄積すると共に解析結果を新たな発見に結び付けるため、本研究開発項目では、基本計画に示された3つの課題、①-1「機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発」、①-2「ゲノム配列からの機能性の網羅的予測」、①-3「機能性 RNA データベースの構築」を行った。

mRNA においては、そのコードするタンパク質の種類にかかわらず、3文字ずつアミノ酸に翻訳されるための明確な情報構造を持っているが、個々の機能性 RNA ファミリーはそれぞれ全く異なった配列・構造上の特色を持っているから、機能性 RNA を情報技術によって発見する一般的な手法を構築することには無理がある。しかしながら、既知の機能性 RNA ファミリーに関する知見から、同一の機能を持つと考えられる機能性 RNA ファミリー内の RNA 同士は、類似の2次構造をもつことが期待されるから、2次構造を考慮した配列の類似性、保存性に着目した解析によって新規機能性 RNA を発見しようとするのは自然な考えである。

既に発見手法が確立している tRNA、rRNA に加え、miRNA、snoRNA のような既知の機能性 RNA ファミリーの新規 RNA 遺伝子を発見する場合には、それぞれの RNA ファミリーに特有な2次構造・配列の特徴をもとにゲノム上を検索することが有効であることは、tRNA-scan、Infernal 等のツールの有効性から明らかであった。ところが、代表的な既知機能性 RNA ファミリーである miRNA、snoRNA の発見でさえ、十分な精度で行うことのできるツールは存在しなかった。また、miRNA、snoRNA の標的遺伝子(RNA)の予測に関しても、配列相補性のみに着目した既存手法では信頼できる結果が得られない状況であった。

タンパク質コード遺伝子(mRNA)の予測においてゲノム間比較での保存領域に着目すると同様に、新規機能性 RNA ファミリーに属する機能性 RNA 予測においても、ゲノム間・ゲノム内で保存された領域に着目して予測を行うことは有効であると考えられる。実際、QRNA、RNAz などのツールが本プロジェクト開始時において既に開発されていた。しかしながら、2次構造の保存性の厳密な検出は計算複雑度が高く(2本の RNA 配列に対する計算時間で配列長の6乗、記憶容量で配列長の4乗に比例)、ゲノムワイドな大規模解析が不可能だったこともあり、保存領域の抽出やその解析技術では2次構造を無視した解析の精度が低く、予測結果の信頼性にも問題があった。さらに、さらに、ヒトゲノムの大部分が実際には何らかの形で RNA に転写されていることが次第に明らかになるに及んで、新規機能性 RNA 候補を情報技術によって予測し、その候補配列が RNA として発現していることを実証するだけでは、有用な発見を行ったとはみなすことができない状況となってきた。このため本研究開発項目では、単に2次構造が保存されて転写されていることを実証するだけでなく、組織特異的に発現する候補野絞り込みなど、機能解析と連携した予測・解析を行

うこととした。

以上から明らかなように、2次構造を考慮してRNA配列を比較、整列、モデル化、検索する情報技術は、機能性RNAの発見とその機能解析を行う上でカギとなる技術であるにもかかわらず、タンパク質アミノ酸配列やゲノムDNA解析における標準ツール（BLASTなど）は存在せず、新たな配列情報解析技術の開発抜きには、新規機能性RNAの発見は難しい情勢であった。そのため本研究開発項目では、RNA配列の高速高精度な構造アラインメント（2次構造を考慮した配列アラインメント）手法、2次構造と配列の両方を考慮したRNA配列の比較・検索、RNAの2次構造予測、2次構造を考慮したRNA相互作用の予測等のRNA配列情報解析技術の開発と、それらの技術を組み合わせた新規機能性RNA予測を連携しながら同時に進めることとした。また、予測した約1万個の機能性RNA候補についてカスタマイクローアレイを設計し、様々な組織での発現を解析して有用な機能性RNA候補を絞り込み、機能解析グループと連携した研究開発を行った。2次構造を考慮したRNA配列情報解析技術の未発達と並んで、機能性RNAの発見、解析の進展を阻んでいたのがデータベースの欠如である。ほとんどのゲノム解析プロジェクトやゲノムデータベースが、タンパク質コード遺伝子を中心に構築されてきたために、機能性RNAに特化し、かつ網羅的なデータベースは不十分であった。たとえば、本プロジェクト開始時点では、機能性RNAに特化した網羅的データベースであるRfamには、ゲノム配列への転写情報はなく、逆にUCSCゲノムブラウザにはRfam配列のアノテーションはなかったのである。本研究開発項目では、単に既知の機能性RNA配列のデータを蓄積するだけでなく、予測した機能性RNA配列、予測の元となった様々な情報解析結果、次世代シーケンサーによって読まれた機能性RNA断片のデータなどを集積し、新規機能性RNAの発見と絞り込み、機能解析に活用できるデータベースの開発を行うことを目標に、研究開発を進めることにした。同時に、実験グループから提供されるRNA配列データを解析し、開発したデータベースを活用して新規機能性RNAの発見する研究にも取り組んだ。

【各研究室における成果】

2. 1. 1. 機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発

JBIC 集中研①

共同実施先： 産総研①、東京大学（1；浅井）、慶応義塾大学（1；榊原）
みずほ情報総研

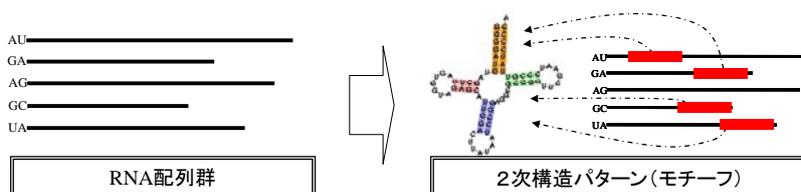
2. 1. 1. 1. 機能性RNAのための総合的な配列解析技術の開発

機能性 RNA をバイオインフォマティクスにより解析するためには、従来の配列解析技術だけでは不十分である。本研究開発項目においては、RNA の 2 次構造予測、モチーフ探索、アラインメントなど、ほとんどの情報解析の基盤となるバイオインフォマティクス技術の開発を行った。

2. 1. 1. 1. 1. RNAmine (RNA 配列群からの頻出する 2 次構造パターン抽出ソフトウェア)

(1) 背景

機能性 RNA の多くは、機能と密接に関連した特長的な 2 次構造を有することが知られている。従って、RNA 配列群に頻出する 2 次構造パターンを同定することは、機能性 RNA の機能と関連する可能性が高い 2 次構造を同定することにつながる。この際、配列からの 2 次構造予測の精度には限界があるため、決められた 2 次構造を利用するのではなく、配列の潜在的な 2 次構造情報を利用した 2 次構造パターンの同定が望まれる (図 1)。



- **入力:** RNA 配列群
 - アラインメントされている **必要なし**
 - 2次構造がわかっている **必要なし**
- **出力:** 入力配列群中に「高頻度で」出現する **2次構造パターン(モチーフ)**
 - 複数存在する場合は **すべて** 導出する

図 1. RNAmine の概要

(2) 手法

以下の 2 つの手順により、与えられた RNA 配列群に頻出する 2 次構造パターンを同定する。

(i) RNA 配列のグラフによる表現 (ステムパターン) とラベルタクソノミ

RNA 配列をステムグラフと呼ばれるラベル付き有向グラフにより表現する。ステムグラフの各頂点は RNA 配列のステム候補、ラベルはステム集合をその類似性を用いてクラスタリングすることにより付与する。また、有向辺およびそのラベルは 2 つのステム間の関係に応じて与える。このようにして得られるステムグラフは RNA の潜在的な部分 2 次構造を可能な限り考慮した表現となる。さらに、本研究では、ノードのラベルを一つに固定するのではなく、ラベルタクソノミと呼ばれる階層的なデンドログラムとして表現した。これにより、非常に柔軟なラベルのマッチが可能となった。

(ii) コストがある閾値以下の頻出クリークパターンの抽出

上述の表現方法により、配列群から頻出する 2 次構造パターンを抽出するという問題は、ステムグラフ集合からコストがある閾値以下のクリークパターンを抽出する問題として定式化される。これは、データマイニングの業界で近年活発に研究がなされているグラフマイニング問題と考えることができる。我々は、独自に、グラフマイニン

グアルゴリズムを考案した。

(3) 結果

RNAmine を利用して、各 RNA 配列の 2 次構造を利用した際の 2 次構造予測結果を表 1 に示す。

表 1. RNAmine の性能評価

Family	RFAM_ID	#seqs	length	%id	RNAmine			CMfinder	comRNA	RNAalifold	RNAfold	RNAsubopt	str/seq
					1	5	10	MCC	MCC	MCC	MCC	MCC	
Cobalamin	RF00174	50	203.2	43	0.41	0.52	0.53	0.54	0.00	0.47	0.34	0.44	119.6
Lysine	RF00168	50	181.6	46	0.80	0.85	0.86	0.79	0.21	0.35	0.64	0.74	112.3
Purine	RF00167	37	99.6	53	0.83	0.90	0.91	0.89	0.00	0.52	0.73	0.81	8.3
RFN	RF00050	48	137.2	64	0.62	0.71	0.74	0.41	0.00	0.57	0.44	0.52	29.4
S_box	RF00162	50	110.4	61	0.77	0.82	0.84	0.78	0.29	0.48	0.64	0.76	35.1
Tymo_tRNA-like	RF00233	27	82.6	66	0.76	0.88	0.88	0.93	0.55	0.51	0.60	0.72	10.3
glmS	RF00234	14	177.6	55	0.80	0.86	0.90	0.88	0.47	0.35	0.58	0.66	30.7
tRNA	RF00005	50	73.4	40	0.75	0.84	0.84	0.78	0.00	0.37	0.60	0.73	8.5
				average	0.72	0.80	0.81	0.75	0.19	0.45	0.57	0.67	44.3

RFAM_ID: ID number in Rfam database (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/>). #seq: the number of sequences in each family. length: average length of sequence in each family. %id: average sequence identity calculated by alostat program. MCC: average MCC among sequences. Best MCC among top 1, 5 and 10 structures are shown in result of RNAmine. For comRNA and RNAsubopt, the best MCC among predicted common secondary structures is shown (if comRNA produced no motif, MCC is 0 in this table). str/seq (for RNAsubopt): the average number of predicted suboptimal secondary structures per sequence. The definition of MCC is found in the supplementary paper.

(4) 成果の活用と公開

プロジェクトでは、RNAmine を用いて実際に機能性 RNA 候補の同定を行った。その方法および結果については後述する。

RNAmine は Hamada et al., *Bioinformatics* 22(20), pp. 2480–2487, 2006 で論文発表し、そのアルゴリズムは特許出願した。

<http://software.ncrna.org/cgi-bin/index.cgi?page=Input&program=rnamine> から、WEB サーバが利用可能である (図 2)。

<http://www.ncrna.org/>

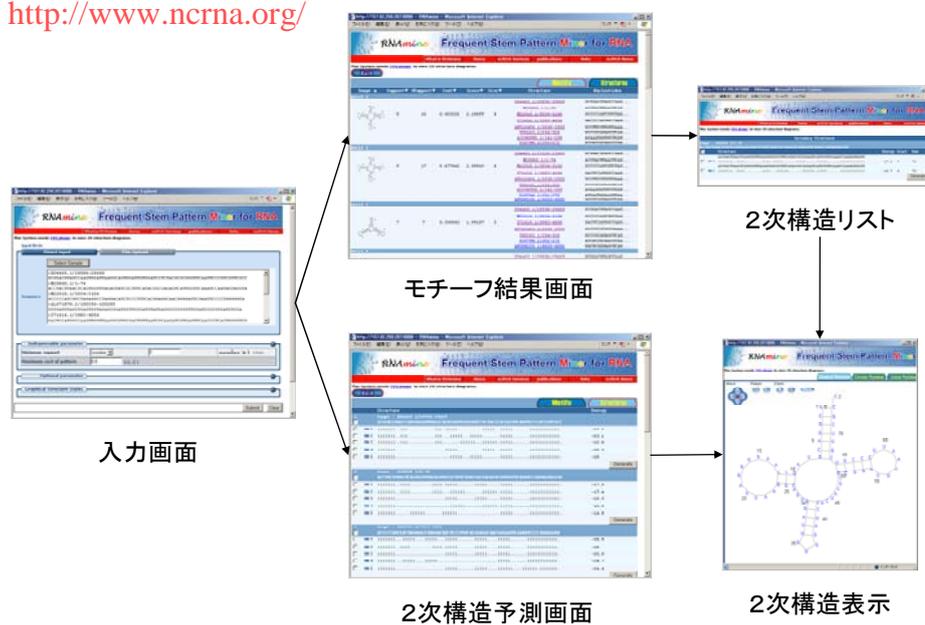


図 2. RNAmine の Web インターフェース

2. 1. 1. 1. 2. RNAclique (RNA 配列群から類似した局所 2 次構造クラスタ探索ソフトウェア)

(1) 背景

前述の RNAmine はグラフマイニング手法を用いるため、多くの計算量を必要とする。そのため、実際の解析においては前処理を行い、候補配列群を絞る必要があった。しかしながら、実験や計算機によって予測された多数の機能性 RNA 候補に加え、ゲノム中には HAR や TFR など多数の機能未知の興味深い領域が存在する。これらの領域を解析の対象とするためには、大規模な配列群から 2 次構造の類似した 2 次構造のクラスタを抽出する手法が必要である。

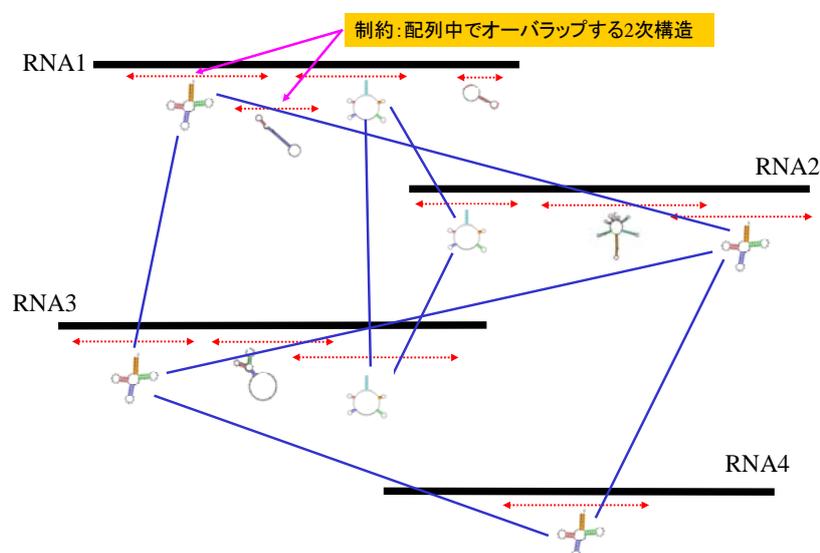


図 3. RNAclique の概要

(2) 手法

RNAmine とは異なるアプローチを用いて、大規模な配列群から類似した局所 2 次構造を抽出する手法 RNAclique の開発を行った。RNAclique は以下の手順に従い 2 次構造の類似したクラスタを抽出する (図 3)。入力の RNA 配列群 $\{S(i) : i=1, 2, \dots, N\}$ に対して、以下のステップで処理を行う。

(i) 局所安定 2 次構造の候補集合の計算

各 RNA 配列に対して、局所安定 2 次構造の候補集合を計算する。今回は RNALfold と呼ばれる局所安定 2 次構造予測ソフトウェアを用いた。

(ii) 配列ベースのフィルタリング

得られた局所安定 2 次構造を有する部分配列群に対して、比較的ゆるいパラメータを用いて all-to-all で wu-blast 検索を行い、次のステップで 2 次構造の類似度を計算するペア候補をフィルタリングする。

(iii) 2 次構造の類似性計算

上述のフィルタリングを通過した局所2次構造のペアに対して、2次構造の類似性を計算する。今回はソフトウェア RNAforester (with RIBOSUM80-85 行列) を用いて2次構造の類似性を計算した。

(iv) 制約付きグラフの構築

局所2次構造をノード、類似性がある閾値以上の局所2次構造間に辺を結ぶことによりグラフを構築する。また、同じRNA配列に含まれるオーバーラップしている局所2次構造は、同じクラスタに含まれては困るので、同じクラスタに入ることの出来ないノードのペアを制約として与える。このため、ここで構築されるグラフを制約付きグラフと呼ぶ。

(v) 制約付き偽クリーク探索

上記で構築した制約付きグラフから、制約を満たす偽クリーク部分グラフを抽出する。一般にこの問題はNP困難な問題であるため、本研究ではGRASPと呼ばれるヒューリスティックアルゴリズムを適用した。

(vi) 得られたクラスタ集合の事後処理

得られたクラスタ集合に対して、ランキング付けを行う。

(3) 計算機実験

計算機実験の結果、提案手法は他の手法に比べてクラスタを抽出する精度が優れていることがわかった。

Modified method 1: 局所2次構造をオーバーラップしないように(エネルギーが低い順)に選択する

Modified method 2: 類似度として2次構造を考慮しない(配列のみの)類似度を使用する(実験ではclustalwのスコアを使用)

Modified method 3: 「擬クリーク」ではなく「クリーク」を抽出する

	Proposed		Method 1		Method 2		Method 3	
	Relevance	Recovery	Relevance	Recovery	Relevance	Recovery	Relevance	Recovery
Dataset 1	0.711	0.846	0.201	0.301	0.711	0.687	0.331	0.5
Dataset 2	0.716	0.837	0.307	0.362	0.722	0.822	0.35	0.525

- オーバーラップする2次構造を全て使用したほうが**断然性能がよい**
- 類似度として2次構造を考慮したほうが**若干性能が良い**
- クリークを抽出するよりも擬クリークを抽出したほうが**断然性能が良い**

(4) 成果の活用と公開

手法から予想されるとおり、RNAmine は並列化を行うことが難しかったが、今回提案する手法は並列化が容易な手法となっている。RNAclique を用いた解析例については後述する。本開発は、IP SJ Transactions on Bioinformatics Vol.2, pp.36-46, 2009 で論文発表した。

2. 1. 1. 1. 3. CentroidFold (RNA 配列からの 2 次構造予測ソフトウェア)

(1) 背景

単一の RNA 配列からその 2 次構造を正確に予測することは、バイオインフォマティクスにおける古典的な問題の一つである。その重要性は、近年の機能性 RNA の発見により増してきている。

(2) 手法

2 次構造の確率分布（本研究においては与えられているものとする）に対して、 γ セントロイド推定量と呼ばれる推定寮を用いて 2 次構造予測（デコーディング）を行う手法を開発した(図 4)。 γ セントロイド推定量は、 γ TP+TN の期待値を最大にするような推定量（期待精度最大化推定量）である。RNA の 2 次構造中の塩基対を正確に予測することは、生物学的に重要であるため、2 次構造予測の評価には、塩基対に関する SEN、PPV、MCC が通常利用されているが、 γ セントロイド推定量は、ML 推定量 (Mfold や RNAfold で使用) および MEA 推定量 (CONTRAFold で使用) に比べ、これらの評価指標に適した推定量であることを理論的に示すことが可能である。CentroidFold は一つのパラメタ γ を有するが、この γ を調整することにより、予測 2 次構造の SEN と PPV を調節することが可能である。

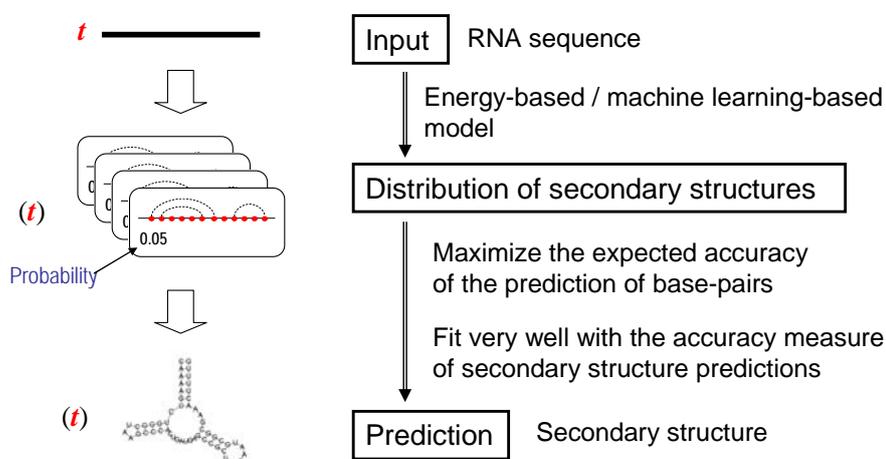


図 4. CentroidFold アルゴリズムの概要

(3) 計算機実験

標準的なベンチマークデータセットである S151-Rfam データセットを用いて、評価実験を行った。CentroidFold は既存の 2 次構造予測ツールの中で最も精度が良いことが確かめられた(図 5)。

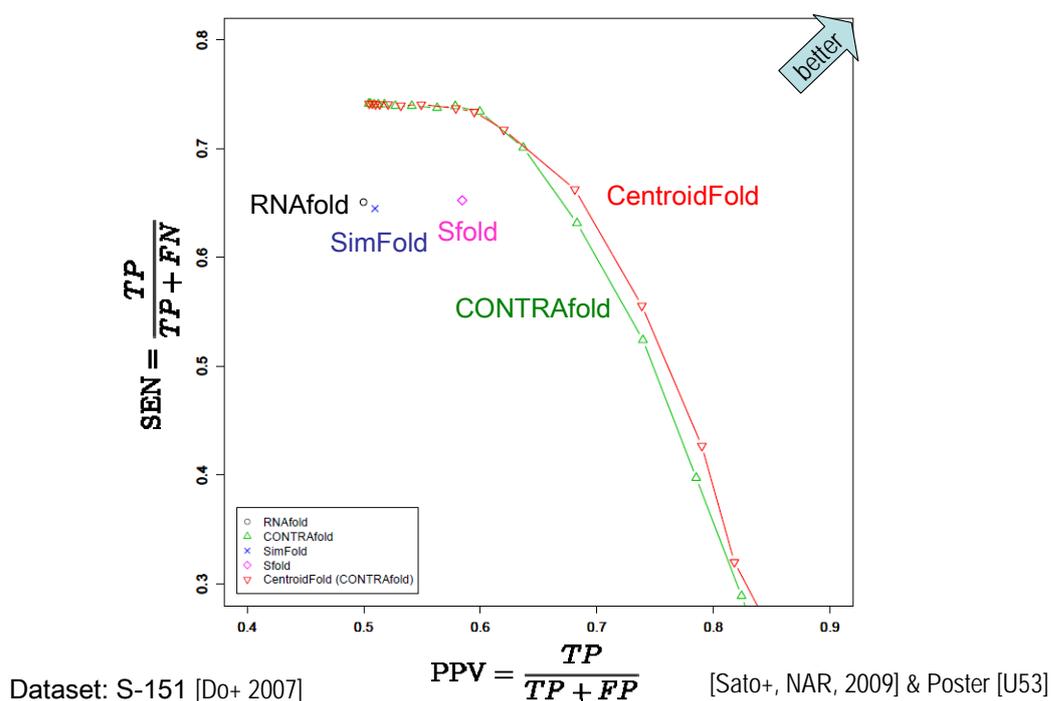


図5. 2次構造予測の性能

(4) ディスカッション

MCCを最大化する推定量は、効率的に計算することが不可能である。それどころか、与えられた2次構造に対して、MCCの期待値を計算することも一般には難しい(全ての2次構造候補を数え上げる必要がある)。我々は、偽期待MCCと呼ばれる、効率よく計算可能な量を提案し、偽期待MCCが期待MCCの非常に良い近似となっていることを発見した。

この、偽期待MCCと γ セントロイド推定量を組み合わせることにより、小さな計算のオーバーヘッドにより、SENとPPVのバランスの取れた2次構造を予測可能な手法を提案している。

(5) 成果の活用と公開

CentroidFoldは現在最高精度の2次構造予測ツールである。WEBサーバ(図6)およびソフトウェアは無償で利用可能である。ソフトウェアについてはHamada et al., *Bioinformatics* 25(4), pp.465-473, 2009で、ウェブサーバーについてはSato et al., *Nucleic Acids Res.* 37(Web Server), pp.W277-W280, 2009でそれぞれ論文発表した。

<http://www.ncrna.org/centroidfold>

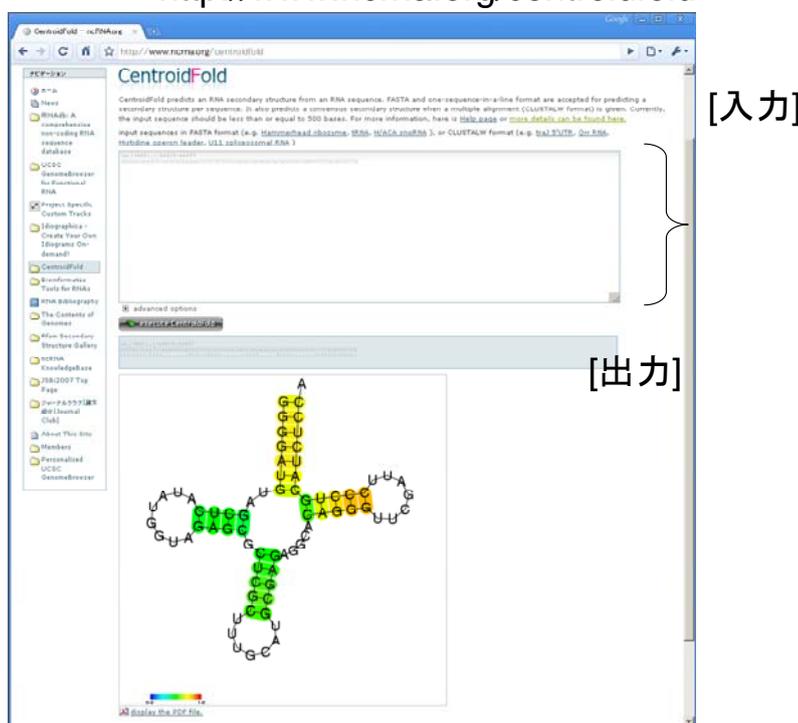


図6. CentroidFoldのWEBインターフェース

2. 1. 1. 1. 4. CentroidHomfold (相同配列群の情報を利用した RNA 配列からの 2 次構造予測ソフトウェア)

(1) 背景

CentroidFold を開発したことにより、我々は現在最高精度の 2 次構造予測ツールを得ることができた。2 次構造予測の精度をさらに向上させるためにはどのようにすればよいだろうか？一般に、2 次構造予測を行いたいターゲット RNA 配列と同時に、その配列に相同な配列群が同時に利用可能な場合が多い。本研究では、ターゲット配列の 2 次構造予測の精度をさらに向上させるために、相同配列群の情報を効果的に利用した 2 次構造予測手法を開発した(図 7)。

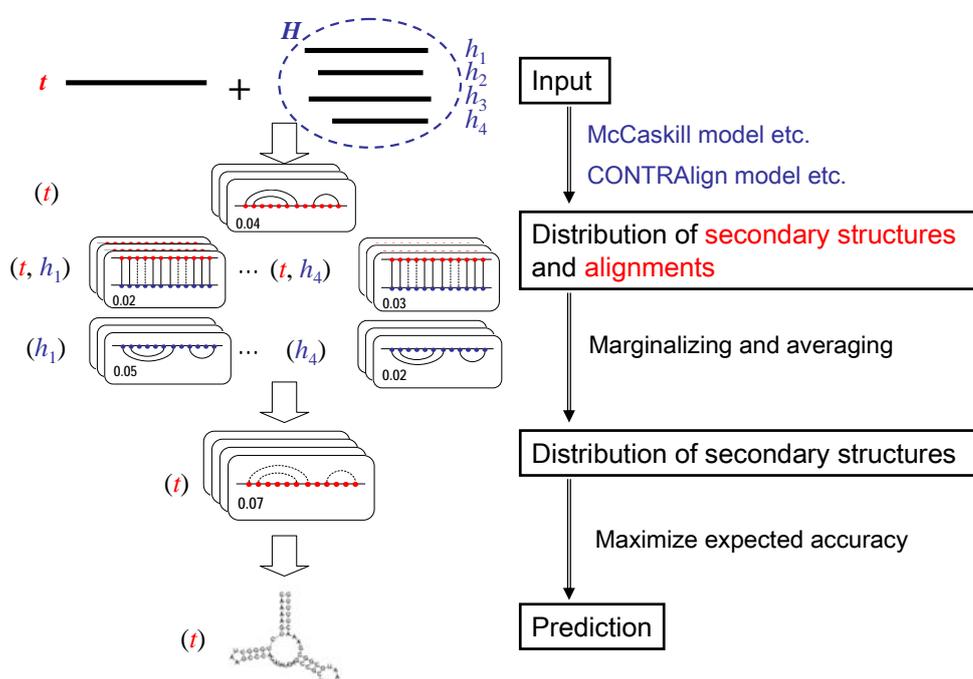


図 7. CentroidHomfold のアルゴリズムの概要

(2) 手法

ターゲット配列と相同配列の間の可能な構造アラインメントの分布をターゲット配列の 2 次構造に周辺化した分布を考える。ターゲット配列と相同配列が何らかの共通 2 次構造を有すると仮定すると、この分布は、通常のターゲット配列の 2 次構造分布に比べて、優れた分布を与えると考えられる。したがって、この分布に対して γ セントロイド推定量を用いて予測される 2 次構造は、CentroidFold の予測する 2 次構造よりも、正確に 2 次構造を予測可能であることが期待される。しかしながら、この予測方法は多大な計算量を必要とする。従って本研究では、ある種の近似を用いて、高速に 2 次構造を予測する手法を提案し、ソフトウェア CentroidHomfold として実装を行った。CentroidHomfold は、ターゲット配列および各々の相同配列群の可能な 2 次構造全体の分布、および、ターゲット配列と各相同配列との間の可能なアラインメント全体の分布を考慮した手法となっている。

(3) 結果

CentroidHomfold は相同配列群の情報を効果的に利用することにより、従来の2次構造予測の精度を大幅に向上させることがわかった(図8)。

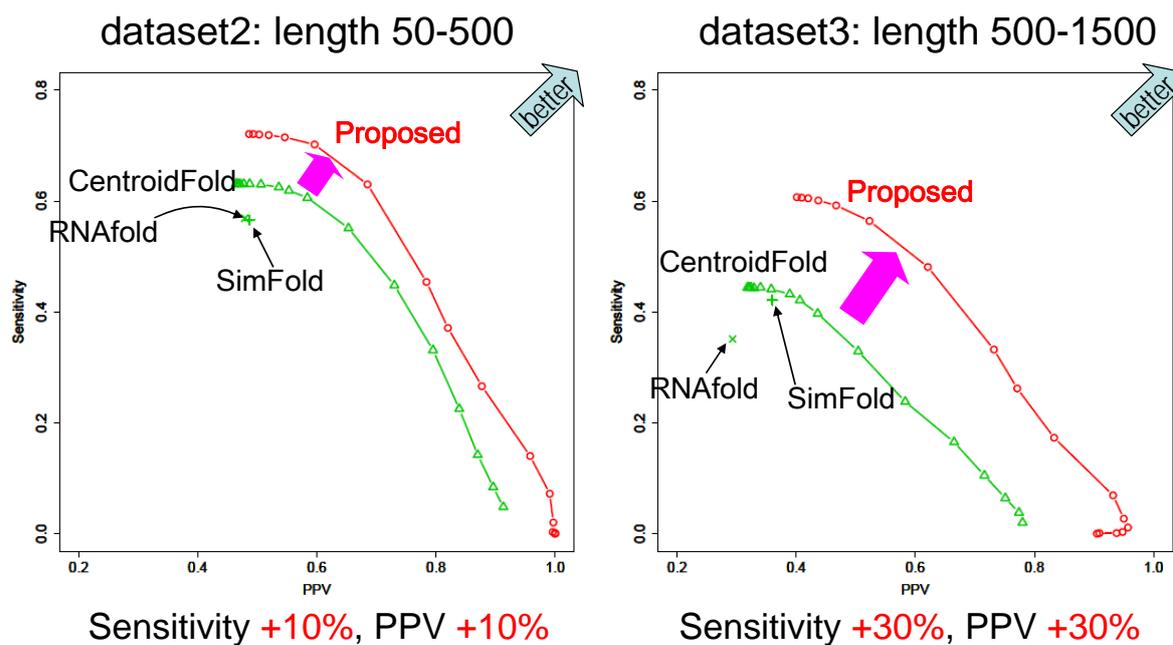


図8. 相同な配列群の情報を利用することによる2次構造予測の精度の大幅な向上

(4) 成果の活用と公開

CentroidHomfold については、ISMB2009 で口頭発表し、Hamada et al., Bioinformatics 25(12), i330-i338, 2009 に論文が採録された。

2. 1. 1. 1. 5. CentroidAlifold (RNA マルチプルアラインメントからの共通 2 次構造予測ソフトウェア)

(1) 背景

与えられた RNA のマルチプルアラインメントから、そのアラインメントに共通する 2 次構造を予測することは、比較ゲノムによる機能性 RNA の探索や RNA の系統解析において広く用いられる基本的な手法である。

(2) 手法

アラインメントに含まれる各 RNA 配列の 2 次構造を出来る限り正確に予測する推定量を設計し、CentroidAlifold として実装を行った。CentroidAlifold で利用されている推定量は RNAalifold で利用されている推定量や McCaskill-MEA, PETfold で利用されている推定量に比べ理論的に優れていることを示すことが可能である。

(3) 計算機実験

他の手法に比べて、共通 2 次構造予測の精度が優れていることが示された (図 9)。

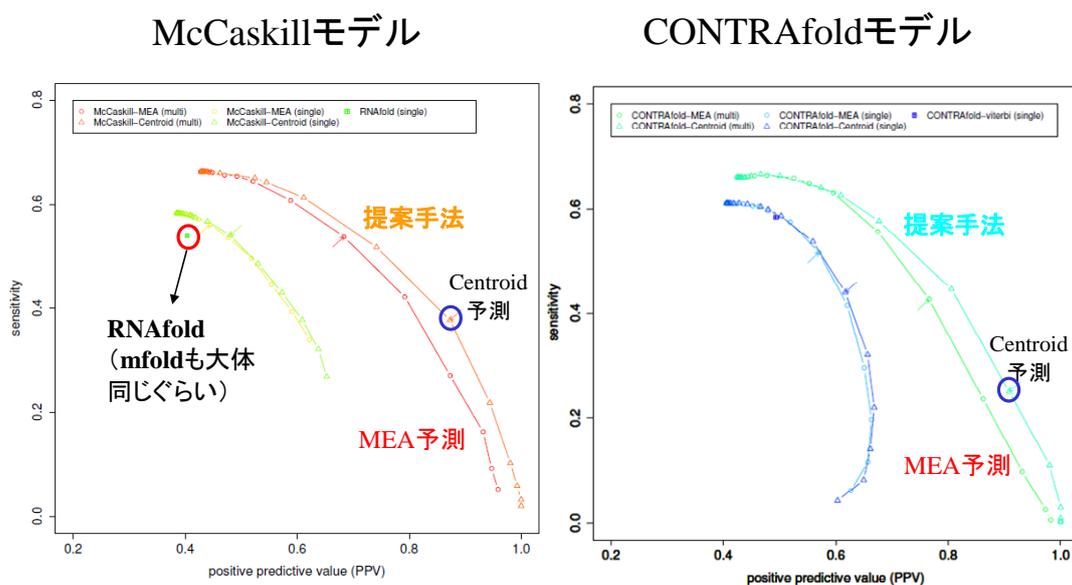


図 9. CentroidAlifold の性能評価

2. 1. 1. 1. 6. CentroidAlign (2次構造を考慮した RNA マルチプルアラインメントソフトウェア)

(1) 背景

2次構造がその機能に密接に関連している機能性 RNA の配列群をマルチプルアラインメントする場合、通常のアラインメントツールのように、配列情報のみを考慮するだけでは不十分であり、各 RNA 配列の2次構造も同時に考慮したアラインメントを行う必要がある。しかしながら、2次構造を考慮したアラインメントは、一般に、膨大な計算量を必要とし、現実的な手法ではない。

(2) 手法

期待精度最大化原理に基づき、2次構造情報を考慮して、アラインメントのカラムを正確に予測可能な推定量を提案した(図 10)。この推定量は、構造アラインメント上の分布を通常のアラインメント空間に周辺化した分布に対する γ セントロイド推定量に基づいている。実際にこの推定量を計算するためには多大な計算量を必要とするため、実際には、近似を行い高速でアラインメントを計算できるように工夫を行っている。

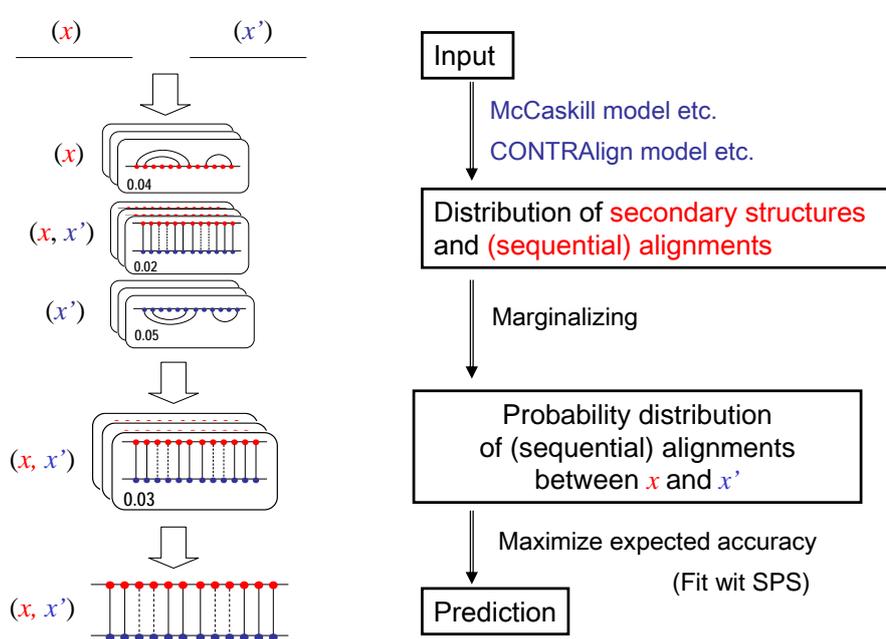


図 10. CentroidAlign アルゴリズムの概要

(3) 計算機実験

5つのベンチマークデータセットを用いた実験では、CentroidAlignfoldは他のツールに比べて高速かつ正確にアラインメントを予測することが可能であることがわかった(表2)

表2. CentroidAlignfoldの性能評価

Table 3. MXSCARNA dataset

aligner	n	SPS	SCI	SEN	PPV	MCC	TIME
contralign	1693	0.79	0.58	0.64	0.67	0.63	707
probcons	1693	0.78	0.54	0.63	0.66	0.63	487
centroid_align	1693	0.80	0.67	0.70	0.69	0.68	2000
lara	1693	0.77	0.71	0.70	0.68	0.68	61694
mafft-xinsi	1693	0.80	0.71	0.72	0.69	0.69	4316
mlocarna	1693	0.77	0.80	0.75	0.68	0.70	468792
murlet	1693	0.79	0.63	0.71	0.69	0.69	500469
mxscarna	1693	0.78	0.69	0.73	0.70	0.70	2540
raf	1693	0.79	0.72	0.75	0.70	0.71	41078
rcoffee	1693	0.78	0.61	0.67	0.68	0.66	4822
stral	1693	0.74	0.57	0.61	0.63	0.60	2021

See the caption in Table 1

Table 4. MASTR dataset

aligner	n	SPS	SCI	SEN	PPV	MCC	TIME
contralign	52	0.87	0.72	0.64	0.77	0.69	31
probcons	52	0.87	0.72	0.64	0.78	0.69	18
centroid_align	52	0.88	0.75	0.65	0.77	0.70	47
lara	52	0.86	0.77	0.69	0.80	0.73	3620
mafft-xinsi	52	0.88	0.78	0.68	0.78	0.71	133
mlocarna	52	0.85	0.80	0.68	0.75	0.71	2117
murlet	52	0.87	0.74	0.67	0.78	0.71	4149
mxscarna	52	0.86	0.73	0.66	0.77	0.70	50
raf	52	0.86	0.74	0.70	0.77	0.73	272
rcoffee	52	0.87	0.74	0.66	0.78	0.70	223
stemloc-ama	51	0.86	0.72	0.63	0.77	0.68	353453
stral	52	0.81	0.70	0.61	0.75	0.65	32

See the caption in Table 1

CentroidAlign

- one of the fastest tools (that consider secondary structures)
- better SPS (sum-of-pairs score) than other tools
- better SCI,SEN,PPV,MCC than CONTRAlign and probcons

(4) 成果の公開と活用

CentroidAlignについては、Hamada et al., Bioinformatics 25(24), pp. 3236-3243, 2009に論文発表した。

2. 1. 1. 1. 7. RNAmine を用いた機能性 RNA 候補領域の発見

RNA 配列群からの共通 2 次構造パターン抽出プログラム RNAmine を用いて、ヒトゲノムの intergenic 領域とイントロンから、配列保存度が高い 100 塩基以上の配列を抽出し解析を行った。Intergenic 領域に対しては、平成 18 年度の解析で EST のサポートを課していた処理を省いた 32,474 配列のデータセットを解析対象とした。イントロンに対しては、平成 18 年度の解析で得られた 10,609 配列のデータセットを解析対象とした。これらの大規模データを直接 RNAmine の入力データとすることは現状では困難なため、クラスタリングによる前処理を行うことでクラスター単位での解析を行った。まず、BLASTClust で作成した全てのクラスターに対して RNAmine でモチーフ抽出を行った。RNAmine の出力結果を RNAforester でアライメントし、RNAz に入力したときの計算結果の内、特にスコアが高かったものを RNA ファミリー候補とした (図 11)。解析の結果、構成メンバーがユニークな配列からなる 25 モチーフを抽出することに成功し、

133 箇所の新規機能性 RNA 候補を得た。これらの機能性 RNA 候補に対してマイクロアレイによる実験を進めた。

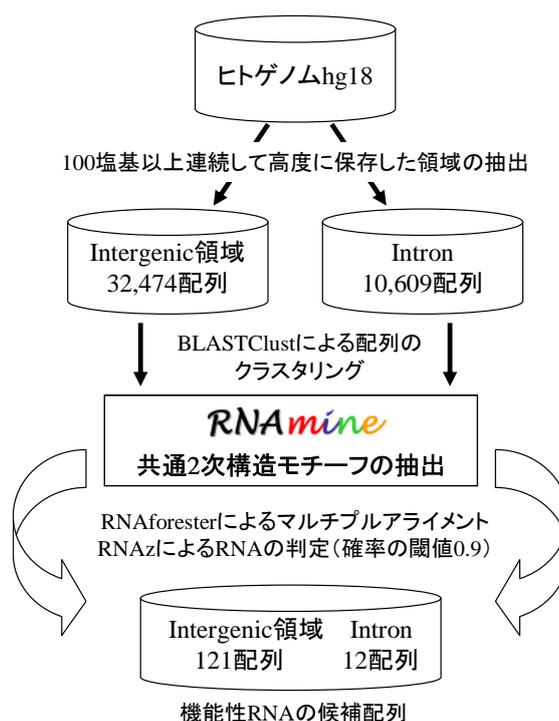


図 1 1 . RNAmine を利用した機能性 RNA 候補配列の探索

RNAmine で抽出した配列から設計したプローブのマイクロアレイ実験結果に対して、Hela、Brain、Testis、Thymus のいずれかの組織で 50 以上の信号強度が記録され、組織特異的な発現が見られたプローブについて解析した。解析の結果、RNAmine で作成した同一クラスターから設計されたプローブの内、Brain の信号強度比が他の 3 組織の 2 倍以上であったプロ

ープを2プローブ得ることが出来た（表3）。

表3. RNAmineの同一クラスターから設計されたプローブ
（プローブ番号6476と6479がbrainで信号強度比2倍以上）

プローブ 番号	信号強度比				測定値			
	Hela	Brain	Testis	Thymus	Hela	Brain	Testis	Thymus
6475	1	1.34	2.02	2.02	29.743	25.8569	69.19543	37.40676
6476	1	12.61	0.89	1.08	17.51814	142.8838	17.96623	11.78372
6479	1	2.31	0.6	0.42	109.0125	162.6364	75.73906	28.57087
6482	1	0.47	1.19	0.6	71.18672	21.75913	97.28877	26.64562

2. 1. 1. 1. 8. RNAclique を用いた機能性 RNA 候補の発見

実データを用いた大規模な解析を2例行った。まず、第1の解析では、Human ゲノム中で43個の既知 miRNA を含む遺伝子間領域 (95,757 塩基) に対して手法を適用した。その結果、スコアが1位のクラスタ (66 配列を含む) に既知の43個の miRNA と1個の Berzikov による予測 miRNA が含まれていた。クラスタに含まれる残りの配列は新規 miRNA の可能性もある。第2の解析では、Washietl らにより予測された機能性 RNA 候補領域 (71,970 領域) に対して手法を適用した。その結果、492 のクラスタが抽出された。入力データ中で5本以上存在する既知の機能性 RNA ファミリー SECIS, SNORA70, let-7, mir-10, mir-17, tRNA の各々に対して、カバレッジが最も高かったクラスタのカバレッジの値は、SECIS (0.17)、SNORA70 (0.92)、let-7 (1)、mir-10 (0.80)、mir-17 (0.80)、tRNA (0.53) であった。Washietl らのデータセットを用いた場合の計算時間は22CPUで64,708秒であった。このように新しく提案した手法は大規模な配列群に対して適用することが可能な手法である。

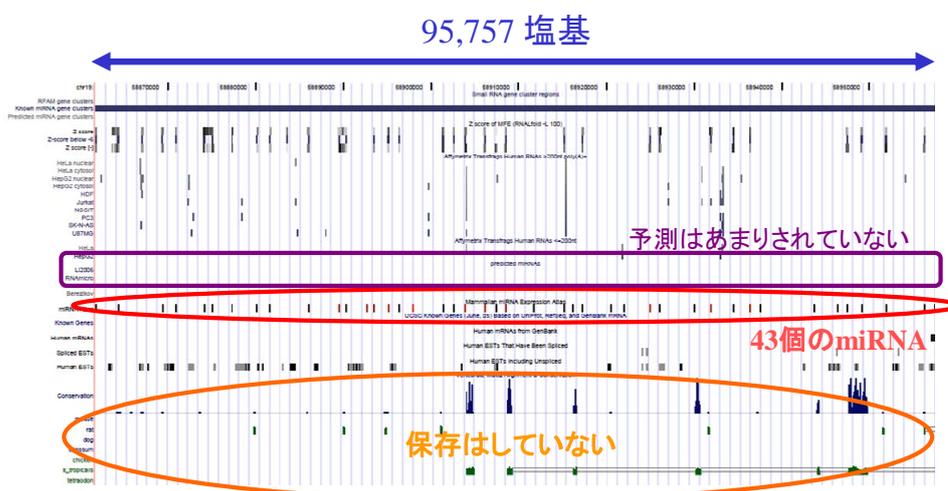


図12. 43個の miRNA が存在する Human ゲノム中の領域

一方、上記の解析例でも明らかになった通り、2次構造の類似性のみを指標としてクラスタ抽出をおこなった場合、多数のクラスタが発見されることがわかった。そのため、さらに確度の高いクラスタを抽出するため、(a) タイリングアレイ発現データ [Kapranov+2007]とのオーバーラップ、(b) ESTとのオーバーラップ、(c) Transposon Free Region [Simons+2005]とのオーバーラップ、(d) Most Conserved Region [Siepel+2005]とのオーバーラップ、(e) Indel Conserved Region [Lunter+2006]とのオーバーラップ、(f) Low Z-score Region とのオーバーラップ、RNAzにより予測された機能性 RNA 候補[Washietl+2006]とのオーバーラップ、(g) Evofoldにより予測された機能性 RNA 候補[Pedersen+2006]とのオーバーラップの9個の特徴を同時に満たすクラスタの効率的かつ完全な探索を行う手法の実装も行った。(a)を満たし、(b)-(g)の中の3つ以上を共通に満たす、2次構造が類似した

クラスタを探索した結果、(a), (b), (c), (d)の特徴を共通に有するクラスタ (10 配列)が発見された (図 1 3)。このクラスタは2次構造が類似しているだけでなく、その他の特徴も共有しているためより確度の高いクラスタであると考えられる。

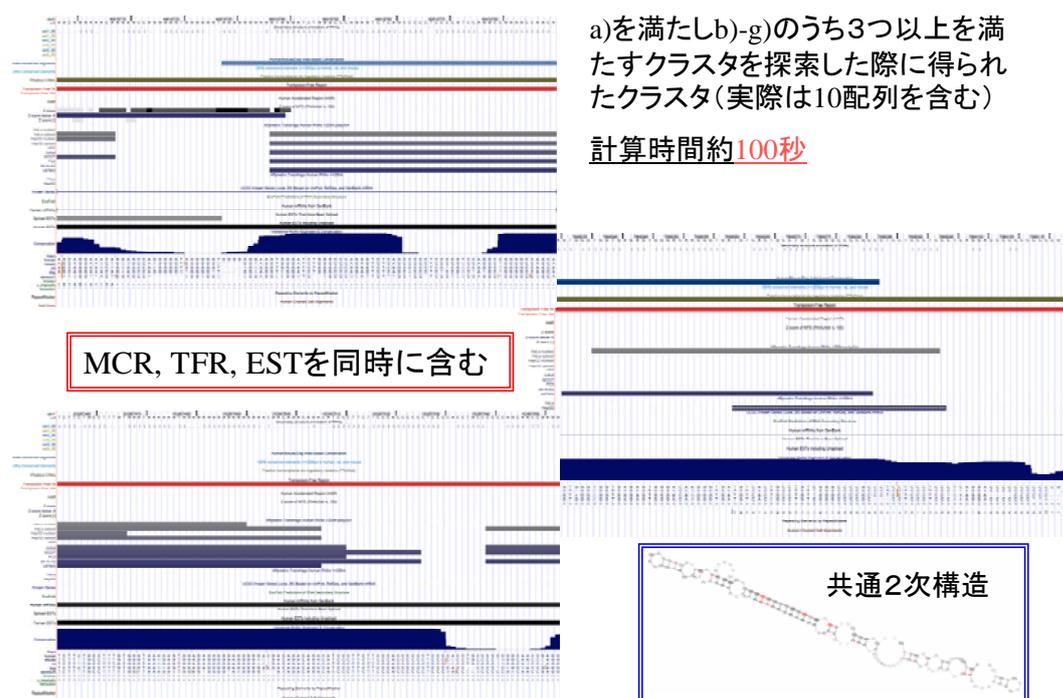


図 1 3. RNAcliqueにより得られたクラスタ

2. 1. 1. 1. 9. まとめ

本研究開発項目においては、機能性 RNA のための総合的なバイオインフォマティクス技術の開発を行った。その結果、RNA の2次構造予測ツール CentroidFold や2次構造を考慮した高速なマルチプルアラインメントツール CentrodAlign に代表される多数の基本的なソフトウェアを開発することができた。特に、CentroidFold は、現時点において、最高精度の2次構造予測精度を有している。これらの基本的なツール群は、今後、機能性 RNA を解析する際のツールとして広く利用されることが期待される。

2. 1. 1. 2. 高速な RNA 配列の比較検索技術の開発

(1) RNA配列の高速な構造アラインメントと共通2次構造予測

機能性 RNA においては配列の類似性だけでなく、その二次構造をみなければ分類や機能推定が難しいが、RNA 配列からの二次構造予測の制度には限界があり、二次構造を考慮した配列の比較・整列技術も実用的な既存技術も従来は存在しなかった。

RNA 配列の潜在的な共通二次構造と配列類似性を同時に考慮しながら厳密に整列させるためには、長さ L の配列 N 本に対して、 $O(L^{3N})$ の計算時間と $O(L^{2N})$ の記憶容量が必要である (Sankoff アルゴリズム) ことが知られている。これでは、2 本の配列の整列であっても、10 倍長い配列に対しては 100 万倍の計算時間がかかり、数百塩基程度の配列の整列に必要なメモリが通常の計算機のメモリ量をはるかに超えてしまうため、ゲノムレベルの解析に利用することは全く不可能である。そのため、現実的な計算時間と記憶容量で配列の比較・整列を行うため、主に次の 3 種類のアプローチが有望である。

- (a) Sankoff アルゴリズムの動的計画法において、整列させる範囲の限定、構造の分岐の粒度の制限、塩基対間の距離の制限を組み合わせることで高速化する方法。
- (b) 二次構造を形成するステム領域の 5' 側と 3' 側の整列を独立に行い、ステムの整合性は後処理することによって大幅に計算時間と記憶容量を節約する方法。
- (c) 各配列から抽出された二次構造を考慮した特徴量の比較を、カーネル法を用いて効率的に計算することにより、配列を直接整列させることを回避する方法。

本研究課題では、主に (a)、(b) のアプローチを用いた。(c) のアプローチは、次の研究課題 2-3 確率文法とカーネル法による RNA 配列情報解析技術の開発で用いられた。

(a) のアプローチによって、200 塩基程度の配列群に対する Sankoff アルゴリズムが通常の計算機で実行できるソフトウェア Murlet (<http://murlet.ncrna.org>) を開発し、整列の精度で世界最高性能を達成した (Kiryu et al., Bioinformatics 23(13), pp. 1588-1598, 2007)。動的計画法の領域制限を領域の幅によって行うと、その幅を配列長の差以上に取らなければならないため、配列群の配列長が均一でないと著しく効率が低下する。そこで、MEA 原理に基づくアラインメントを基準として動的計画法の領域を設定して効率化した。同時に二次構造モジュールの分岐箇所の粒度を制限することによっても大幅に高速化した。

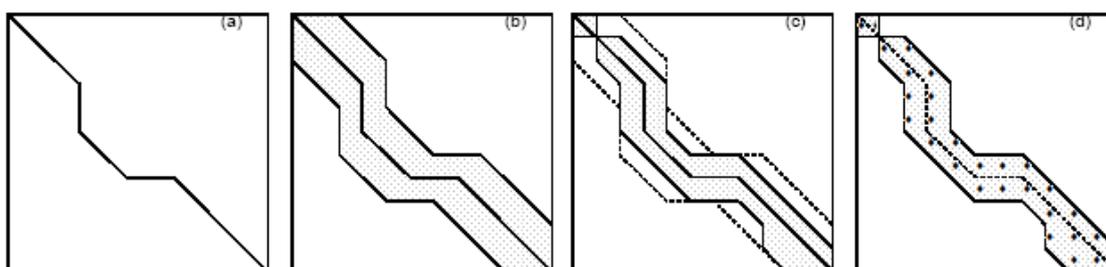


図1. (DP 領域の制限。(a) MEA 原理に基づく初期アラインメント (b) 初期アラインメント近傍に制限された DP 領域 (c) 一致確率の低い部分を削った DP 領域 (d) 制限された分岐可能場所を点で示した

(b)のアプローチによって、数千塩基の RNA 配列を二次構造を考慮して整列させる高精度なソフトウェア SCARNA を開発した。2本の配列の比較・整列では現実的な計算時間で実行できない Sankoff アルゴリズムを除けば世界最高性能を達成した (Tabei et al., *Bioinformatics* 22(14), pp.1723-1729, 2006)。さらにアルゴリズムを配列群の多重整列に拡張した MXSCARNA (<http://mxscarna.ncrna.org>) を開発し、世界最高速と最高性能を同時に達成した (Tabei et al., *BMC Bioinformatics* 9:33, 2008)。さらに、RNA 配列群から二次構造と配列が局所的に類似した配列を抽出してアラインメントを行う Scarna-lm を開発した (Tabei et al., *Bioinformatics* 25(12), pp.1498-1505, 2009)。これらの手法では、MaCaskill アルゴリズムによって得られた各 RNA 配列の塩基対確率行列からステム領域の候補を抽出し、その固定長の構成要素の 5' 側と 3' 側を技巧的な動的計画法によって整列させる。多重整列においては配列群の塩基対確率行列を平均化することによってロバストな共通ステム候補を抽出できることが明らかとなった。

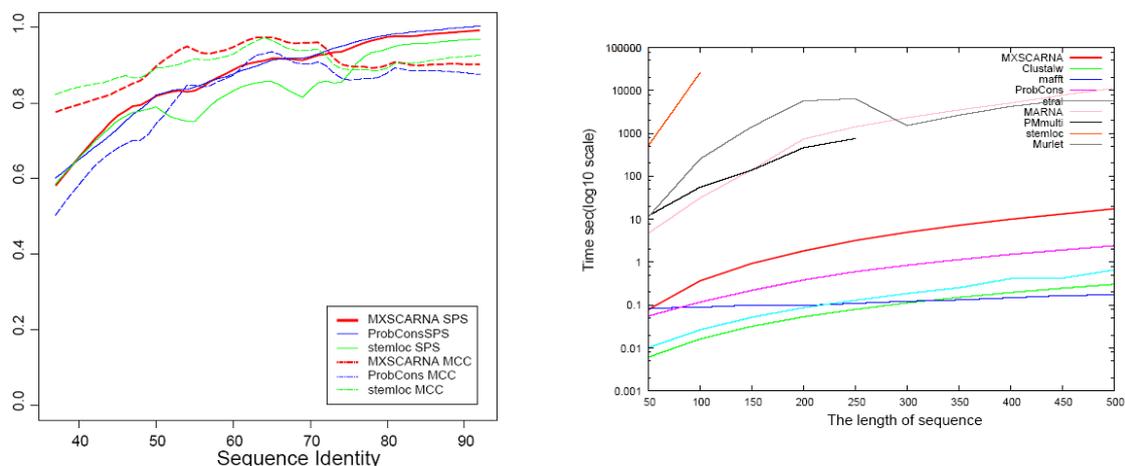


図 2. MXSCARNA による多重構造アラインメントの精度と計算速度。(左図) SPS (Sum of Pairs Score) および MCC (Mathew' s Correlation Coefficient) による多重アラインメントの精度と配列相同性の関係。MXSCARNA が両方の指標で安定した精度を示している。(右図) 配列長と計算時間の関係。二次構造を考慮したアラインメント手法では MXSCARNA が唯一、大規模解析に適用可能であることがわかる。

ゲノム中からの機能性 RNA 発見のためには、ゲノムブラウザ等から得られる RNA のマルチプルアラインメントから共通 2 次構造を求める手法が必要である。本開発では、バイオインフォマティクスにおいて重要性を増している期待精度最大化 (MEA: Maximum Expected Accuracy) 原理に基づく手法 (McCaskill-MEA) を開発し、従来よりも正確な共通 2 次構造予測を実現した (Kiryu et al., Bioinformatics 23(4), pp.434-441, 2007)。

(2) 高度な動的計画法による 2 次構造解析手法の開発

RNA 分子は、配列上離れた位置の塩基同士が 2 次構造上で塩基対を形成する可能性があるため、RNA 分子の始点と終点を定めなければ正確な 2 次構造予測を行うことができない。しかし、RNA 分子として転写された場合の潜在的な 2 次構造を考慮した網羅的な解析をゲノム配列に対して行う場合には、あらかじめ RNA 分子の範囲を決めることは困難である。ゲノム上に点在する潜在的な機能性 RNA 候補や、miRNA のターゲットとなる mRNA など様々な配列に対して、2 次構造を考慮した網羅的な解析を行うためには、始点と終点を特定せずに局所的な 2 次構造を解析する手法が必要である。

一方、RNA の 2 次構造予測に用いられてきたアルゴリズムは配列長の 3 乗に比例した計算時間と 2 乗に比例した記憶容量を必要とするから、長いゲノム配列に対して直接このアルゴリズムを適用することは明らかに不可能である。従来は、決められた固定長の窓を少しずつずらしながら計算された塩基対確率を平均化することによって近似的な塩基対確率が

計算されていた。

本開発では、塩基対を形成する最大の塩基間距離 W (固定) と、配列長 L (一般に長い) に対して、高度な動的計画法を駆使することによって LW^2 に比例した計算時間と $L+W^2$ に比例した記憶容量で正確な塩基対確率が計算できることを示し、Rfold というソフトウェアとして実装、公開した。また、Rfold で計算された塩基対確率に基づく局所 2 次構造予測は、従来の手法よりも正確であることを示した (Kiryu et al., *Bioinformatics* 24(3), pp. 367-373, 2008)。

さらに、Rfold で用いたアルゴリズムを発展させて、ゲノム内に潜在的に存在する RNA の二次構造的な特徴を網羅的に計算するアルゴリズムを Raccess プログラムとして実装し、これを用いてヒトゲノムの統計解析を行った。

siRNA や miRNA などの機能性 RNA は、mRNA と相補的に結合することで、その機能を発揮する (図 3 上)。このとき、もしターゲットとなる領域が強い二次構造をとるならば、それが障害となり機能を発揮できない (図 3 下) ため、miRNA や siRNA による抑制効果が重要な遺伝子においては、ターゲット領域が強い二次構造をとらないように、進化的な圧力が働いている。最近になって、ターゲット領域が二次構造を組みにくいアクセシブルな領域であるという性質を考慮することが miRNA の予測や、siRNA の設計に有効であることが知られるようになってきた。

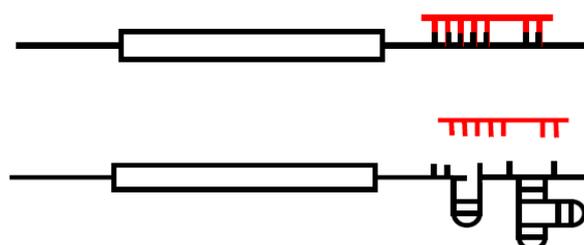


図 3. mRNA(黒)、miRNA(赤)

これまでの二次構造研究は、塩基対を形成する部分に注目するものが多く、塩基対を組まない領域の性質についての研究は非常に少なかった。しかし、siRNA や miRNA の例から類推すると、転写物の中でアクセシビリティが特に強く保存された領域は、なんらかの機能性 RNA のターゲットになっている可能性があると考えられる。そこで我々は、ゲノムスケールでアクセシブルな領域を計算することのできるアルゴリズムを開発し、Raccess というソフトウェアとして実装した。

このプログラムをヒトゲノム全体に対して適用し、潜在的に二次構造を組まない進化圧力が働いている領域を網羅的に探索 (図 4) し、その統計解析を行った。その結果、ゲノム上の転写領域には全般的に二次構造に対する拘束が非常に強く働いていることが明らかになった。しかも、転写物の機能の異なる各部位において、進化的拘束のパターンも様々

であることが分かった。

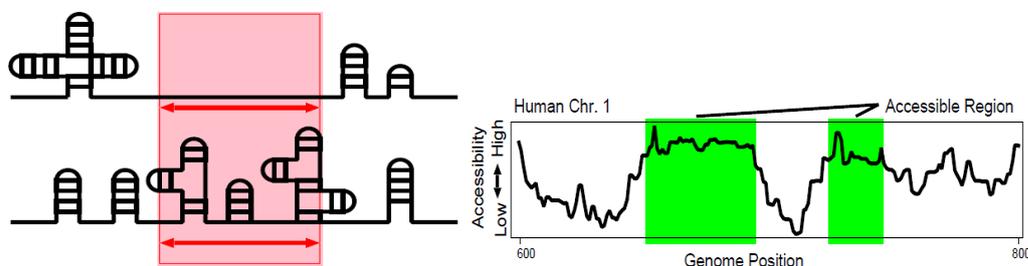


図4. ゲノム上の位置とアクセサビリティ

(左) Raccess はRNAの各範囲について、そこがアクセサブルである確率を計算する。

(右) ゲノムの各位置について計算されたアクセサビリティ。

緑の領域は他のゲノム領域に比べて特にアクセサブルであることを示す。

例えば、タンパク質のコード領域は、全領域についてアクセシビリティを保つ拘束が働いているが、これは、mRNAの翻訳がスムーズに進むためであると予想される。5' UTR領域には、二次構造を作ろうとする進化的圧力が働いているが、これはこの領域が翻訳制御に関わる二次構造をとることが多いこととコンシステントである。3' UTR領域は、全般的にはアクセシビリティが低いですが、ストップコドンの下流150塩基位までは、アクセシビリティが高い。これは、翻訳がスムーズに進むためであるとも考えられるが、miRNAのターゲットサイトが、ストップコドンの近くにあるほど抑制効果が高いこととも関連があると考えられる。このほかに、mRNA以外の転写領域として、LINEやSINEなどのリピート配列についても統計解析も行った。すると、トランスポゼースをコードしているL1などはmRNAと似たアクセシビリティの特徴を持つことが分かった。一方ヒトゲノム最大のリピートファミリーであるAlu配列は、強固な二次構造を保存するような圧力が働いており、細胞の中で、構造RNAとして生理機能をもつものが相当数あることが予測された。

この一連の統計解析で、一番大きな発見は、イントロン領域には二次構造を保存する強い進化的圧力が働いていることを初めて検出したことである(図5)。これまでのゲノム解析では、イントロン部と遺伝子間領域を区別するような配列特徴は知られていなかったが、我々の解析では、pre-mRNAのイントロン部の全領域に渡って、強固な二次構造をとるような非常に強い進化的圧力が存在することが分かった。この特徴は、一義的には長いイントロンが効果的にスプライシングされるために生じたと考えられるが、イントロンが、進化の過程で機能性構造RNAを供給するreservoirとして働いている可能性も考えられる。

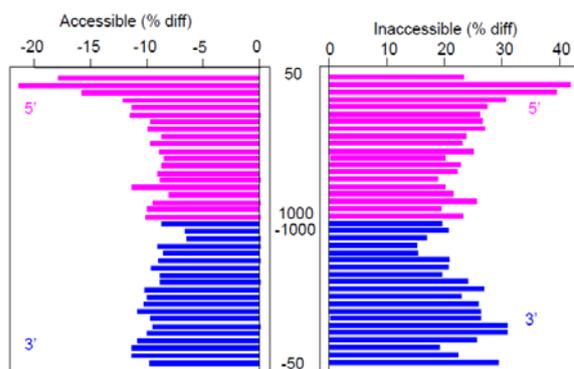


図5. イントロン領域のアクセサビリティ。左図、右図は、イントロン領域において、それぞれアクセサブルな領域、アクセサブルではない領域の割合のバックグラウンドからのずれを示す。

縦軸は5'、3' 端からの塩基数（1000塩基まで）を示す。イントロン領域では、アクセサブルでない領域が多いことを示している。

（3）RNA 二次構造の揺らぎを考慮した配列解析ツール群

1990年代までのRNAの配列解析は、RNAの遺伝子の二次構造を正確に求める方法論が主だったが、高等動物に多数存在する非コードRNAの研究に伴い、RNA配列解析の目的も多様性を増している。プロジェクトの中で、共通二次構造(McCaskill-MEA)、構造RNAのマルチプルアライメント(Murlet)、局所塩基対確率(Rfold)、アクセシビリティ(Raccess)などを計算するアルゴリズムの開発及び、実装を行ってきたが、さらにTurnerのエネルギーモデルから様々な二次構造的特徴を計算するアルゴリズムの開発及び実装を行った

(Rprofile、Renergy、Rpair、Rchange)。まずRprofileは、ゲノムの各領域で、二次構造の各コンポーネント（内部ループ、バルジ、マルチループ）などが出現する確率を計算するプログラムである。Renergyは、ゲノムの各スライディングウィンドウで、その幅のRNAの二次構造エネルギーの期待値を効率的に求めるプログラムである。Rpairは、ゲノムの塩基ペアが、対を組むときと組まないときで平均エネルギーの差を求めるプログラムである。これにより、各塩基のペアが二次構造安定化にどの程度寄与しているかを計算することができる。Rchangeは、RNA配列に塩基置換が入ると平均エネルギーがどの程度変化するかを計算することができる。これらのプログラムに共通するのは、RNAの二次構造の揺らぎを考慮しているという点で、確固とした構造を取らない転写物の解析に役に立つことが期待される。

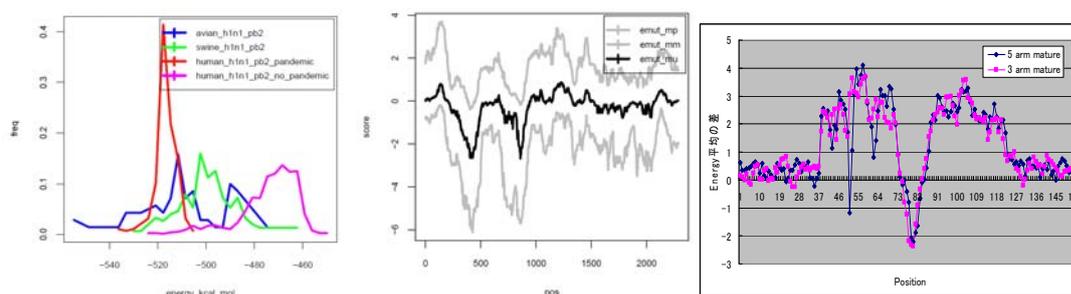


図6. (左)Renergyにより計算した、インフルエンザウィルスのPB2ポリメラーゼ mRNA の二次構造エネルギー分布。2009年のヒトにおけるパンデミック由来のものを除けば、鳥、豚、人と体温が下がるにつれて、mRNAの二次構造エネルギーが弱くなっていくのがわかる。(中) Rchangeによる、PB2ポリメラーゼ mRNA 配列の各位置で塩基置換前後の二次構造エネルギーの変化。400塩基目と800塩基位置のあたりに置換が起こるとFoldエネルギーが弱くなる場所がある。(右) Rpairを用いた pre-miRNA 遺伝子周りのエネルギー変化のプロファイル。5'アームに mature miRNA を持つ pre-miRNA (青) では、mature miRNA の 5' 末端部分が塩基対を組まない傾向がある。

(4) まとめ

本研究開発では、高速で正確な構造アラインメントツールである Murlet、MXSCARNA をプロジェクトの前半で開発することに成功し、①-2「ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測」に活用することが出来た。また、局所的な塩基対確率と2次構造を求める Rfold、アクセサビリティを計算する Raccessをはじめ、Rprofile、Renergy、Rpair、Rchange など RNA 配列の2次構造に関連した網羅的な解析を可能とするツール群の開発に成功した。これらのツール群は、miRNA、siRNA の標的予測や核酸医薬の開発に必要な基本的な解析ツールとして活用されることが期待される。

2. 1. 1. 3. 確率文法とカーネル法によるRNA配列情報解析技術の開発 集中研①、慶應義塾大学（1）

機能性 RNA の大きな特徴は、水素結合で結ばれる塩基対によって形成される二次構造であり、生体内での機能と相関があることが知られている。機能性 RNA の配列解析では、二次構造の自由エネルギー最小化や二次構造をモデル化する確率文脈自由文法などの確率文法に基づく手法が非常に有効であることが知られている。また、様々な分野でカーネル法によるパターン認識が盛んに研究されており、その有効性が明らかになっている。我々のグループでは、これらの手法を組み合わせることにより、画期的な RNA 配列情報解析技術の開発を行った。

2. 1. 1. 3. 1. 確率文法による RNA 配列解析

確率文脈自由文法による RNA 二次構造予測では、用いる文法構造が予測精度を大きく左右する。この研究では、ノンパラメトリックベイズ法の一つである階層ディリクレ過程を用いて確率文脈自由文法を拡張することによって、訓練データから最適な文法構造を学習し、その結果、予測精度が向上することを示した (Sato *et al.*, WABI2009 で口頭発表、Journal of Bioinformatics and Computational Biology に採択)。表 1 では、(Dowell *et al.*, 2004) で提案されている 9 種類の RNA 文法 (G1~G8) を用いて、通常確率文脈自由文法 (SCFG) と階層ディリクレ過程で拡張した確率文脈自由文法 (HDP-SCFG) を比較し、すべての場合において提案手法 HDP-SCFG が二次構造予測精度で SCFG を上回ることを示した。とくに、G1, G3, G4, G5 のように SCFG では精度が非常に低い文法でも、HDP-SCFG に拡張することにより大きく精度を向上させることができるという特徴を持つ。

表 1. MCC における確率文脈自由文法 (SCFG) と提案手法 (HDP-SCFG) の比較

grammar	SCFG	HDP-SCFG	grammar	SCFG	HDP-SCFG	grammar	SCFG	HDP-SCFG
G1	0.32	0.61	G4	0.19	0.58	G6s	0.56	0.57
G2	0.59	0.60	G5	0.04	0.58	G7	0.57	0.58
G3	0.42	0.58	G6	0.56	0.57	G8	0.56	0.59

また、本プロジェクト開始前より開発を行っていた RNA ホモロジー探索ツール PHMMTS を拡張し、位置特異的スコア行列を導入したアルゴリズム PSSMTS を開発した。与えられた共通二次構造を元に、整列されていない配列群から EM アルゴリズムを用いて位置特異的スコア行列を学習する。相同性が低い場合においても、PSSMTS は既存の手法よりも高い精度で RNA ホモロジー検索が可能であることを示した (Sato *et al.*, Journal of Mathematical Biology 56(1-2), pp.201-214, 2008)。

2. 1. 1. 3. 2. カーネル法による RNA 配列解析

(1) ステムカーネルの開発

配列群の多重アラインメントを直接計算することなく、形成しうる全ての二次構造を考慮に入れたカーネル関数であるステムカーネルを開発した。カーネル法の代表的な手法であるサポートベクターマシンに適用し、機能性 RNA のファミリー分類において非常に高精度の識別を実現した (Sakakibara *et al.*, *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 5(5), pp.1103-1122, 2007)。

(2) ステムカーネルの高速化

ステムカーネルは、サポートベクターマシンによる識別実験では高い識別性能を発揮するが、計算量が膨大であるために実用的ではないという大きな欠点があった。そこでこの欠点を克服するために、塩基対確率行列から非循環有向グラフ (Directed Acyclic Graph; DAG) を構築し、この上でカーネルを計算することによってステムカーネルを高速化する手法を開発した。また、塩基対確率行列をプロファイル化することによって、マルチプルアラインメントに対するステムカーネルを計算する手法を開発した。サポートベクターマシンによる識別実験では、RNAz の学習に用いられている RNA アラインメントのデータセット (12 ファミリー, 7169 アラインメント) を使用し、表 2 に示すように、既存の手法よりも高精度の結果が得られることを確認した。また、カーネル階層クラスタリングでは、Rfam から選んだ配列 (503 ファミリー, 3901 本) を用い、得られたクラスターと Rfam のファミリーとの一致度を ROC スコアで評価した。既存手法の LocARNA では 0.781 に対し、我々の手法では 0.894 となった。これらの結果から、我々が新しく開発した手法は既存の手法よりも構造を持つ機能性 RNA の類似度として信頼性が高いと言える (Sato *et al.*, *BMC Bioinformatics*, 9:318, 2008)。

表 2. サポートベクターマシンによる識別実験の結果

	ROC score	Specificity	Sensitivity
Profile-Profile Stem Kernel (本手法)	1.000	0.997	0.995
Profile-Profile Local Alignment Kernel	0.973	0.995	0.789
RNAz	0.981	0.944	0.927

(3) BPLA カーネルの開発と線虫ゲノムへの適用

これまで開発してきたステムカーネルよりも高速かつ高精度な BPLA カーネルを開発した (Morita *et al.*, *Nucleic Acids Research* 37(3), pp.999-1009, 2009)。ステムカーネルでは、二本の RNA 配列の塩基対の組み合わせをすべて考える必要があるため、膨大な計算時間が必要であった。BPLA カーネルでは、与えられた RNA 配列の塩基対確率行列を、それ

ぞれの塩基が自身の左側（上流）と塩基対を組む確率、右側（下流）と塩基対を組む確率、どちらも塩基対を組まない確率、という三種類の確率値に要約し、ローカルアラインメントカーネルと同様にしてカーネル値を計算する。既知 snoRNA 配列で学習した本手法を用いて線虫 *C. elegans* ゲノムをスキャンしたところ、図 1 に示すように高い識別性能を確認することができた。さらに、既知 snoRNA には含まれないが確率値の高いものを新規 snoRNA 候補として、候補に対してプライマーを設計し定量的 RT-PCR 実験を行った（図 2）。実験を行った 48 候補中、Ct 値 25 以下（ネガティブコントロールがひとつも発現しない Ct 値）で発現を確認することができたものは 6 候補、Ct 値 26.5 以下（ネガティブコントロールがひとつのみ発現する Ct 値）で確認することができたものは 14 候補であった。これらの Ct 値で得られた候補のゲノム配列に対する p-value はそれぞれ $3.6e-12$ 、 $2.8e-32$ であり、効率がよい予測とすることができる。

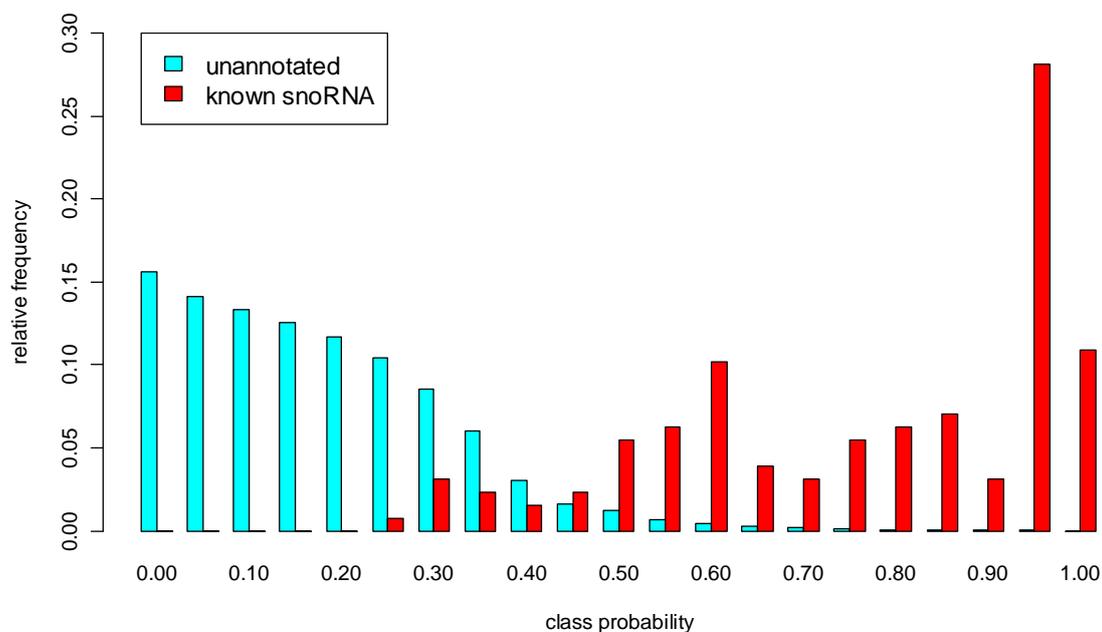


図 1. 線虫 snoRNA のゲノム中における確率値の分布

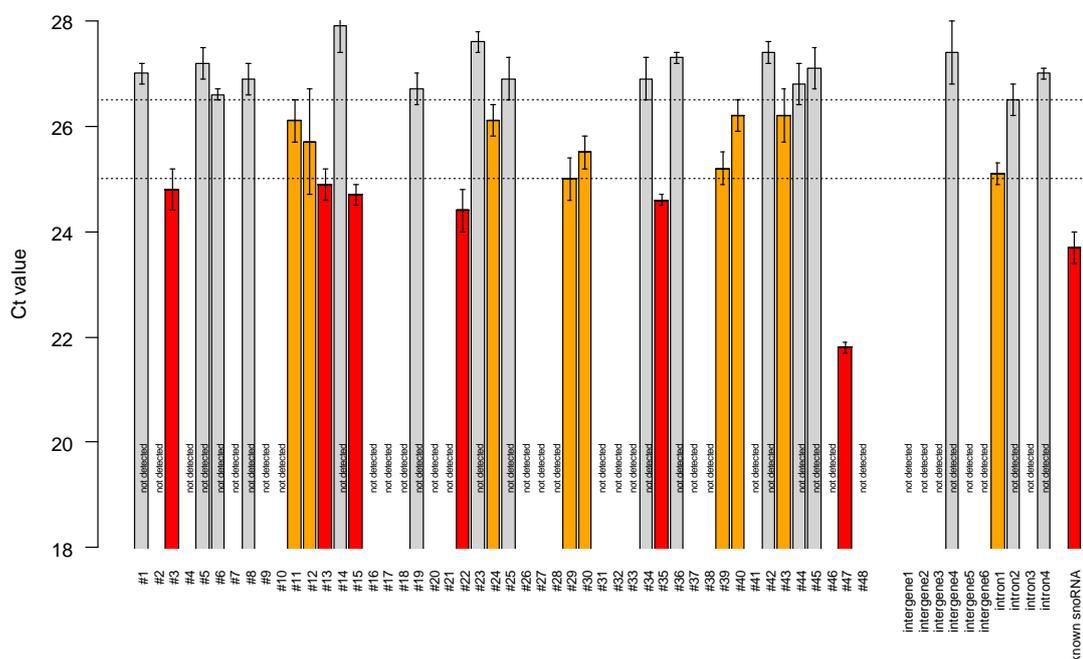


図2. 新規 snoRNA 候補の qRT-PCR による発現確認実験

(4) BPLA カーネルのホヤゲノムへの適用

BPLA カーネルによる機能性 RNA 探索と予測候補の発現・機能解析までを一貫して行う実験系の確立を目指し、カタユウレイボヤ *C. intestinalis* ゲノムから snoRNA を探索し、発現確認を行った。まず、C/D box snoRNA が持つ2つのモチーフ配列に挟まれた配列を *C. intestinalis* ゲノムから抽出し、BPLA カーネルを用いて snoRNA か否かを判定させた。次に snoRNA と判定された配列からプライマーを作成し、5' (3') RACE によって発現確認と配列を決定した。全長を決定した有力候補について再度ホヤゲノムに BLAST を用いて当てたところ、2つの隣接する遺伝子、GDP-L-fucose synthetase 遺伝子と tRNA pseudouridine synthetase 遺伝子のイントロン領域とその遺伝子間の intergenic 領域の合計8箇所にコーディングされてクラスターを形成していることが判明した (図3)。最終的に得られた snoRNA 候補に対して *in situ* hybridization を行うことで各 snoRNA 候補の細胞内局在を決定することに成功した (図4)。

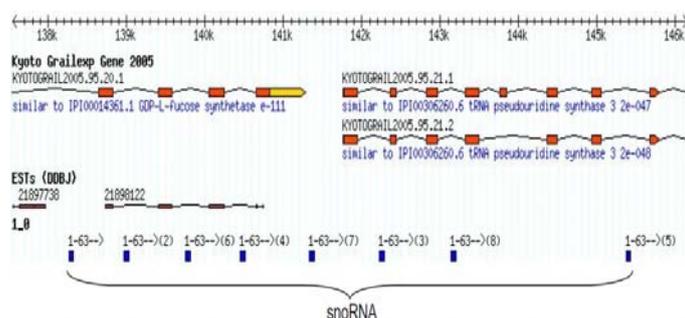


図 3. 8箇所へマップされた snoRNA 候補

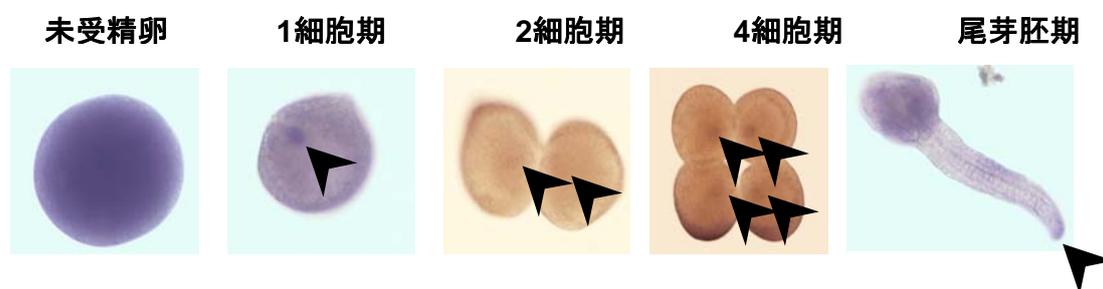


図 4. *in situ* hybridization による予測 snoRNA の局在同定

(5) BPLA カーネルのメダカゲノムへの適用

これまでに開発してきた手法を用いて実際のゲノム上から機能性 RNA コード領域を網羅的に予測し、その予測候補に対して実際に RACE 法による機能性 RNA コード領域の全長決定とシーケンサーによる配列決定を行い、その結果をカーネル関数の学習にフィードバックすることにより、機能性 RNA 予測の情報システムの精度を向上させることを第一の目的とした。この目的を達成する研究として、メダカゲノムにおける機能性 RNA の探索と解析を行った。実験対象生物として、ヒトと類似した遺伝子組成を有するメダカを選択した。BPLA カーネルを用いてゲノムから snoRNA の配列予測を行った。その際、メダカゲノムと同じ二塩基組成を持つ疑似メダカゲノムを作成し、配列予測を行うにあたっての条件検討を行った。次に、メダカゲノム上から C/D box モチーフに挟まれる領域を抽出し、これをテストデータとして予測を行った。さらに、既存の snoRNA 配列予測ツールである snoSCAN を用いて予測を行い、BPLA カーネルによる予測結果との比較を行った (表 3)。インシリコ実験で得た 95 個の予測配列をウェット実験によって検証した。まず、Hd-rR 系統のメダカの産卵後 7 日経過した受精卵(ステージ 39)から total RNA を抽出した。次に予測した配列に対し、10 塩基程度離してプライマーを 2 カ所で設計した。これを用いて 5' RACE 法を行い、各予測配列に対し発現確認を行った (図 5)。ここで発現が確認された配列をクローニングし、

塩基配列を決定した。5' RACE 法により、データベースに登録された snoRNA 配列 15 個、新規 snoRNA 配列 2 個 (図 6) の発現を確認した、図 6 (b):OL-BPLA93 はデータベースに登録されている snoRNA (SNORD60) と共通の特徴を有していることから、同様の機能を持つ snoRNA である可能性が高い(図 7)。また、BPLA カーネルと snoSCAN で共通に予測されたものは 14 個で、ターゲット配列とメチル化部位を推定することができた。

表 3. BPLA カーネルによる予測結果と、BPLA カーネルと snoSCAN の共通予測結果

Length[nt]	40-50	50-60	60-70	70-80
BPLA kernel	11	49	33	2
BPLA×snoSCAN	0	9	11	2
DB snoRNA	0	8	11	0

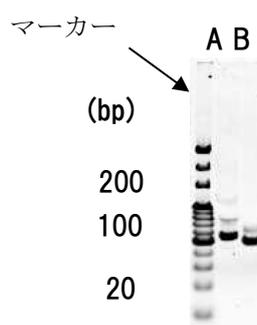


図 5. 5' RACE 法による snoRNA の発現確認: 1 本の予測配列に対し、10 bp 程度ずらしてプライマーを設計した。A, B はその結果増幅された長さの異なる部分配列である (矢印)。

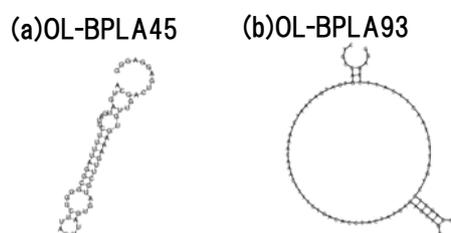


図 6. 本研究で発見された新規 snoRNA

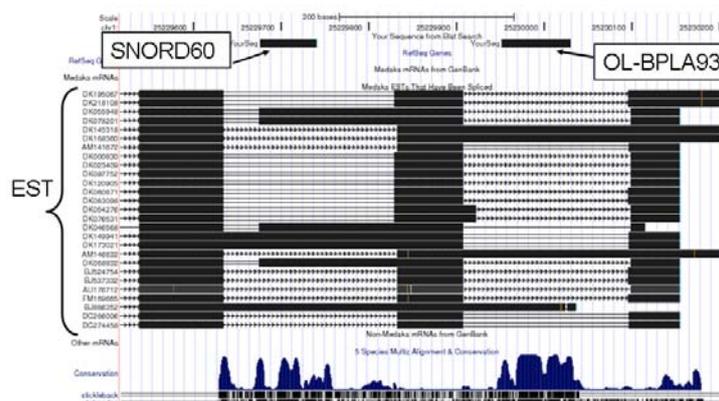


図7. 図6 (b) を BLAT で貼り付けた結果 (下の青いピークは他の魚類との配列保存度を示す)

(6) BPLA カーネルのプロファイル拡張

BPLA カーネルのアルゴリズムを拡張し、ゲノムアラインメントからの機能性 RNA の探索に適用できる新しい予測手法を提案した。提案手法は、機能性 RNA の二次構造の情報を、単一の配列ではなくアラインメントデータから抽出することによって、予測の信頼性を向上する。本手法は、アラインメントのベンチマークデータを用いた評価実験において、既存手法のステムカーネルよりも高い予測精度を示した (表4)。また、拡張された BPLA カーネルの予測ツールとしての実用性や性能特性に関して様々な観点から検討し、既存手法との詳細な比較を行なった。その結果、既存手法の RNAz (SCI) やステムカーネルが苦手とする、ノイズの混入した低品質なアラインメントデータに対する予測精度の頑健性 (図8)、未知の機能性 RNA ファミリーの探索 (図9) といった実用上の重要な課題に対して、本手法の有効性が明らかになった。今回提案された拡張 BPLA カーネルは、ゲノムアラインメントからの機能性 RNA の探索を高精度に行なうことができる。本手法は、入力のアラインメントデータがノイズを含む場合でも比較的頑健な予測が可能であり、探索ツールとして実用性が高いと言える。

表 4. BPLA カーネルとステムカーネルの予測精度の比較

Family	ROC score	
	BPLA kernel	Stem kernel
C/D snoRNA	0.951	0.779
H/ACA snoRNA	0.973	0.865
miRNA precursor	0.960	0.880
RNase P RNA	0.913	0.825
SRP RNA	0.998	0.977
Riboswitch	0.946	0.805
tmRNA	0.998	0.946
tRNA	0.987	0.929
Average	0.966	0.876

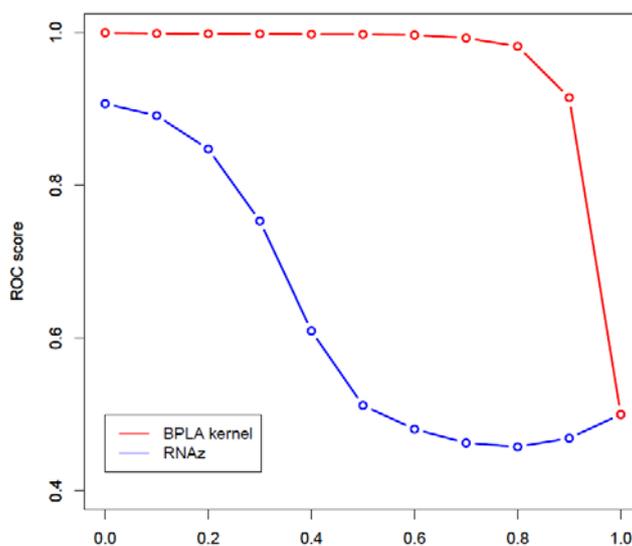


図 8. 低品質なアラインメントデータに対する予測精度。入力のアラインメントデータに含まれるエラーの量に対して、BPLA カーネルと既存手法 RNAz の予測精度の頑健性を評価した。ROC スコアは 1 に近いほど予測精度が高いことを示す。

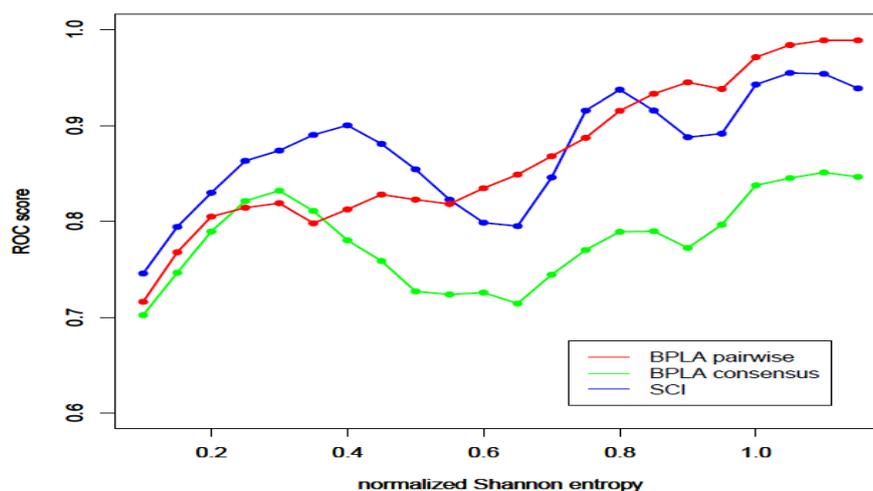


図9. 未知の機能性 RNA ファミリーに対する予測精度の比較。進化的距離の様々なアラインメントについて、提案手法 BPLA カーネルと既存手法 SCI の予測精度を評価した。normalized Shannon entropy は大きいほど進化的距離が遠いことを示し、ROC スコアは 1 に近いほど予測精度が高いことを示す

(7) BPLA カーネルのパラメータ最適化法の開発

BPLA カーネルには、いくつかのハイパーパラメータが存在し、その値が性能を大きく左右するため、グリッドサーチなどで最適化する必要があるが、これには多くの時間が必要となる。そこで、勾配法を基にしたハイパーパラメータ最適化法を開発し、表 5 に示すように最適化に要する時間を大きく削減することに成功した (Sato et al., Genome Informatics, 23(1), pp.128-138, 2009)。

表 5. 本手法とグリッドサーチによるハイパーパラメータ最適化の比較

Family	gradient-based optimization			grid search		
	N	AUC	time (h)	N	AUC	time (h)
5S rRNA	24	0.997 (0.956)	1.8	7776	0.997	149.0
tRNA	15	0.993 (0.957)	0.6	7776	0.995	67.5
C/D snoRNA	25	0.843 (0.773)	1.8	7776	0.887	124.8
H/ACA snoRNA	23	0.879 (0.832)	3.5	7776	0.906	248.0
miRNA	20	0.995 (0.971)	1.1	7776	0.995	89.0

(8) 比較ゲノムによる機能性 RNA の大規模探索手法の開発

これまで開発してきた機能性 RNA 配列解析のためのカーネル関数群を、比較ゲノム手法と組み合わせることにより、任意の複数種のゲノム配列群から機能性 RNA 領域を高速に検出する手法を開発した。RNAz に代表される機能性 RNA 識別手法の多くは、入力として配列アラインメントを必要とする。そのため、機能性 RNA のゲノム探索では、複数種のゲノムを比較して保存領域を抽出する処理が重要となる。しかし、既存の比較ゲノム手法の多くは塩基配列の相同性のみ注目しており、機能性 RNA の特徴である二次構造の保存を考慮していない。そこで、ゲノムの二次構造を高速に比較する新しい手法を提案した。二次構造の文字列表記法を利用し、RNALfold で得られる二次構造予測の結果を文字列として直接比較する (図 10)。比較のアルゴリズムには、当研究グループで開発された極めて高速な比較ゲノムツールである Murasaki を用いる。これにより、数億塩基対からなる高等生物の広大なゲノムから短時間で二次構造の保存された領域を検出することができる。本手法の有効性を示すために、線虫 *C. elegans* のゲノムを同じ線形動物門に属する *C. briggsae* および *P. pacificus* と比較した。RNAz の主要な識別指標である MFE Z-score と SCI を用いた評価により、本手法で検出された領域は従来の比較ゲノム手法よりも熱力学的に安定で有意に保存された 2 次構造を形成しうることが示唆された (図 11)。

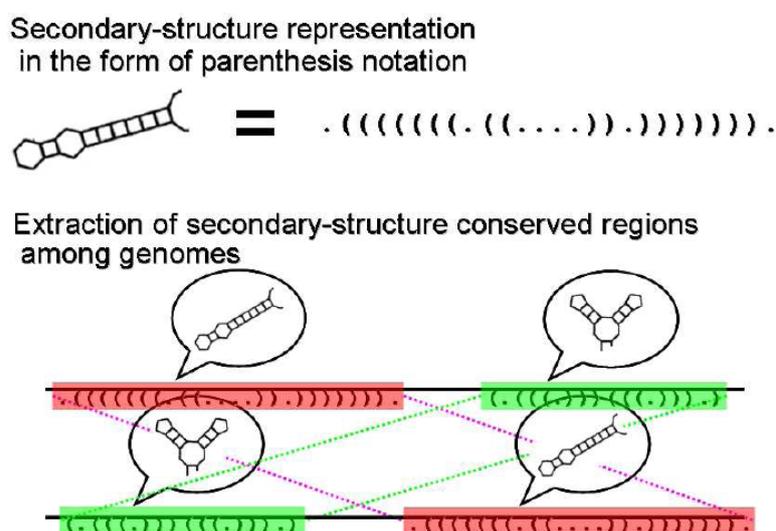


図 10. 本手法の概略：(上段) RNA の 2 次構造の文字列表記法 (下段) ゲノム上に予測された 2 次構造を文字列として比較し、保存領域を高速に検出する。

表 6. 抽出された領域の熱力学安定性による評価

	Our method	homology-based
vs. <i>C. briggsae</i>		
MFE Z-score	-1.52	-0.35
similarity	35.8%	80.6%
coverage	0.43%	0.66%
vs. <i>P. pacificus</i>		
MFE Z-score	-2.27	-0.86
similarity	34.6%	68.6%
coverage	0.035%	0.049%

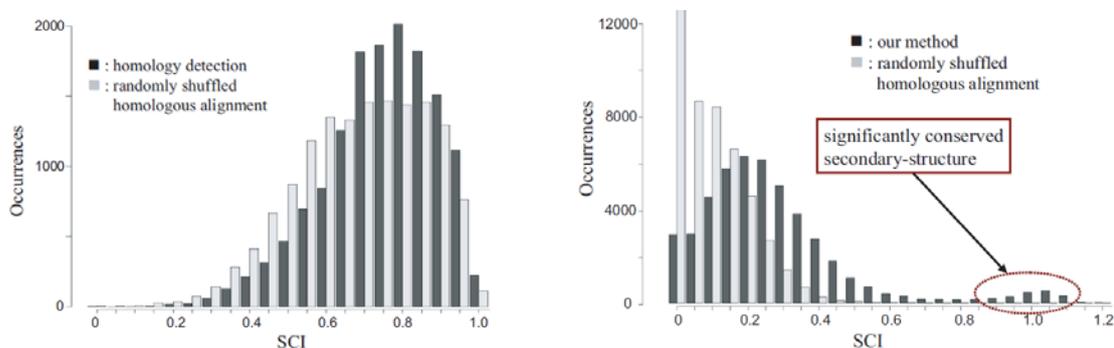


図 1 1. 抽出された領域における 2 次構造の保存. SCI の値を対応する帰無分布と比較した。高い SCI は、その領域に強く保存された 2 次構造が存在することを意味する。左：塩基配列の相同性に注目する従来手法では、SCI の値は帰無分布と差が無かった。右：2 次構造の保存に注目する本手法は、帰無分布よりも有意に SCI の高い領域を検出することに成功した。

2. 1. 1. 3. 3. まとめ

本研究課題では、RNA 配列解析のための新しい確率文法モデルを開発した。とくに、ノンパラメトリックベイズ法による確率文法モデルは与えられたデータから最適な文法規則を学習することが可能であり、RNA 二次構造に関する解析（二次構造予測、二次構造を考慮した相同性検索、二次構造を持つ機能性 RNA 遺伝子発見など）に広く応用することが可能である。

また、カーネル法による RNA 配列解析技術を確立し、ウェット実験でその実用性を確認した。とくに、これまでの手法では難しいとされてきた snoRNA の予測において非常に高い精度が得られており、本手法の有効性を示すことができた。カーネル法による解析は、相同性検索の他に、機能性 RNA 遺伝子の発見、クラスタリングによる未知遺伝子の機能解析、mRNA との相関分析などに応用することが可能である。

これらの技術は RNA 配列解析における基盤技術と位置付けられるものであり、これらを基にしてさまざまなアプリケーションの開発が可能である。このことから、機能性 RNA 解析のためのバイオインフォマティクスの中核を担う技術の一つであると言える。

2. 1. 2. ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測

JBIC 集中研①、分室 2 (インテック W&G)

共同実施先： 産総研①、東京大学 (1 ; 浅井)、三菱総合研究所

ヒトなどの高等生物ではタンパクをコードしていない RNA が数多く存在し、発生・分化や疾患の過程において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。それらは機能性 RNA または non-coding RNA (ncRNA) と呼ばれている。機能性 RNA の生体内での役割を理解するためには、ゲノムに存在する機能性 RNA を網羅的に発見する必要がある。本項目では、ヒトゲノムから機能性 RNA を効率よく発見するインフォマティクス技術確立すること目標として研究を進めた。そして、インフォマティクス技術とマイクロアレイによる発現解析を組み合わせて機能性 RNA を効率よく発見する基盤技術を開発した。また、産業上重要である micro RNA (miRNA) を高精度に発見し機能解析するインフォマティクス技術を開発し、論文発表と特許出願を行った。また、偽遺伝子の特徴を利用した機能性 RNA の予測技術を開発し、その有効性を示した。そして、発見された機能性 RNA 候補の中から癌の診断マーカーとなるものを見出し特許出願を行った。

平成 18 年度はヒトゲノムから機能性 RNA を網羅的に予測するパイプラインを開発した。そして平成 19 年度以降から予測した機能性 RNA に対するマイクロアレイを用いた発現解析実験を行った。また、平成 19 年度以降は miRNA の予測/機能解析手法と、偽遺伝子の特徴を利用した機能性 RNA 予測手法を開発した。プロジェクト期間における研究の進捗状況を図 1 に記す。

		平成				
		17	18	19	20	21
機能性 RNA 予測パイプラインの開発			→			
アレイによる発現確認				→	→	→
独自手法の開発	miRNA 予測		→	→	→	→
	偽遺伝子の特徴に基づく予測				→	→

図 1. プロジェクト期間における研究の進捗

2. 1. 2. 1. 機能性 RNA 予測パイプラインの開発

(1) 概要

RNAz や snoSeeker などの既存の機能性 RNA 予測手法と、我々のグループで独自開発したアルゴリズムを組み合わせて機能性 RNA の網羅的な予測を行うパイプラインを開発した。

我々のパイプラインは、①オルソログスな領域からの機能性 RNA 予測、②パラログスな領域からの機能性 RNA 予測、③2次構造モチーフに基づく機能性 RNA 予測の3種類かからなる。以下にそれぞれのパイプラインの概要を記す。

①オルソログスな領域からの機能性 RNA 予測 (Synseg パイプライン)

多くの機能性 RNA は重要な機能をもち進化的に保存されている。したがって、機能性 RNA の予測には生物種間の比較ゲノムが有効である。我々はシンテニー領域（遺伝子の並び順が保存された領域）にある遺伝子間領域を独自開発した mxscarna プログラムにより網羅的にアライメントした。mxscarna は2次構造を考慮したアライメントを行うため、機能性 RNA 領域を正確にアライメントすることができる。また、非常に高速であるため大規模な領域に対してアライメントを実行できる。得られたアライメントに対して RNAz プログラムを実行することで機能性 RNA を予測する。

②パラログスな領域からの機能性 RNA 予測 (Self-Chain パイプライン)

多くの機能性 RNA の多くはヒトゲノム内にパラログとして存在する。実際、我々はヒトゲノム同士の相同性検索により得られた自己アライメントのなかに既知機能性 RNA の約80%が含まれていることを見出した。本パイプラインでは、まずヒトゲノム同士の相同性検索を CBRC で開発された Last プログラム (<http://last.cbrc.jp/>) により行い、得られた自己アライメントに対して RNAz プログラムと snoSeeker プログラムを実行することにより機能性 RNA を予測する。本パイプラインでは進化的に保存度の高くない機能性 RNA を検出できる可能性がある。

③2次構造モチーフに基づく機能性 RNA 予測 (RNAmine パイプライン)

我々が開発した RNAmine プログラムは大量の DNA 配列が与えられたときに2次構造モチーフを抽出するツールである。本パイプラインではヒトゲノム内で進化的に保存した領域を大量に収集し、RNAmine プログラムを実行することで2次構造モチーフを抽出する。そして抽出した2次構造モチーフをクエリーとして infernal プログラム (<http://infernal.janelia.org/>) を使ってヒトゲノムを検索することで機能性 RNA を予測する。

(2) マイクロアレイ実験

上記①～③のパイプラインに加え、miRRim プログラム（独自開発）による miRNA 候補、進化的に保存度の高い遺伝子間領域 (Ultraconserved region)、独自のコントロール領域などの加え、合計 10000 以上の機能性 RNA 候補に対してマイクロアレイ実験を実施した。表 1 はマイクロアレイに載せた機能性 RNA 候補の内訳である。

マイクロアレイは実験コストに優れたアジレント・テクノロジー社の 44K フォーマット

アレイ（1枚のアレイに41000以上のプローブを搭載可能）を用いた。さらにプローブ設計を自前で行うことで実験に必要なコストを下げる事が出来た。実験に必要な total RNA は実験グループの廣瀬研究室からいただいた。アレイ実験は、日立ソフトエンジニアリング(株)の横井氏の協力により行われた。

表 1. マイクロアレイに載せた領域の内訳

種別	候補数	説明	高発現 ^{a)}
①SelfChainパイプライン	2158	パラログ領域の比較ゲノムに基づく機能性RNA候補	267
②Synsegパイプライン	5310	オルソログ領域の比較ゲノムに基づく機能性RNA候補	627
③RNAmineパイプライン	108	RNAmineによる2次構造モチーフ	11
miRNA候補	279	miRRimによるmiRNA予測	24
Ultra conserved region	1325	進化的に強く保存された領域	108
Ultra stable fold	30	非常に安定した2次構造を持つ領域	3
Human accerelated region	49	ヒトだけで置換が見られる領域	2
Inverted duplication	29	逆位重複に由来するヘアピン構造	1
コントロール1	468	Rfamに登録された既知機能性RNA	262
コントロール2	211	既知のタンパクコード遺伝子	100

a) 4つ以上の組織/細胞で発現量が高い領域

(2) - 1. プローブ設計

プローブの設計はフリーソフトである OligoArray2.0

(<http://berry.engin.umich.edu/oligoarray2/>)を用いて行った。既知のタンパクコード遺伝子を第1の背景配列として用い、これらにクロスハイブリするとみなされたプローブはすべて除外した。さらにヒトゲノム全域を第2の背景配列として用いた。ヒトゲノムへのクロスハイブリの個数はプローブ選択の基準のひとつとして用いられた。

(2) - 2. 実験した組織/細胞

平成19年度中に Brain、Testis、Hela cell、Thymus の4組織/細胞に対する予備的な実験結果を得た。tRNA や snoRNA など様々な組織で発現量が高い機能性RNAについては、高い発現強度が検出できた。このことは我々の設計したアレイの有効性を示すものである。そこで、平成20年度は、さらに癌細胞、癌細胞と隣接する正常細胞、核や核小体から抽出したRNAなどに対するマイクロアレイ実験を行い、合計で23組織/細胞における網羅的な発現データを得た。表2に、23組織/細胞の内訳を記す。

表 2. マイクロアレイ実験を行った 23 組織/細胞

組織/細胞	画分
1 HeLa	
2 Brain	
3 Thymus	
4 Liver	
5 Lung	
6 Muscle	
7 Prostate	
8 Testis	
9 Bladder	Normal
10 Bladder	Tumor
11 Kidney	
12 Spleen	
13 Cervix	
14 Colon	Normal
15 Colon	Tumor
16 Liver	Normal
17 Liver	Tumor
18 Prostate	Normal
19 Prostate	Tumor
20 HeLa	Cytosplasm
21 HeLa	Total
22 HeLa	Nucleolar
23 HeLa	Nuclear

(3) マイクロアレイ結果に基づく有望な機能性 RNA 候補の抽出

マイクロアレイはノイズの多い実験手法なので、有望な機能性 RNA 候補を抽出する際には複数の実験で発現量が高いものを選択すべきである。そこで、4 つ以上の組織/細胞で基準値以上発現している候補を“高発現”と判定した。一般に snoRNA は発現量が十分に高いことが知られている。そこで、コントロールとしてマイクロアレイに載せた snoRNA の発現量を基準値として用いた。表 1 の第 4 カラムにグループごとの高発現領域数を記す。コントロールとして用いた既知の機能性 RNA はやはり高発現と判定される割合が多かった。

(4) Exosome のノックダウン実験

Exosome は細胞内の様々なタイプの RNA 分子を分解するタンパク質複合体である。Exosome をノックアウトすれば普段は分解されて発現が観測できない RNA の発現を観測できると考えられる。図 2 は Exosome ノックダウン前後におけるマイクロアレイ結果の比較である。ノックダウン実験は HeLa 細胞を用いて行った (機能解析グループ 廣瀬研究室)。対角線よりも右側にあるプロットは、Exosome ノックダウン後に発現量が増加したプローブである。Exosome ノックダウン実験により発現量が増加したプローブを 243 個抽出した (図 2 の点線丸の部分)。これらのプローブから 15 個を選択しリアルタイム PCR による検証実験を行ったところ 10 個が Exosome ノックダウン後に発現量が増加することが示された。したがって、

Exosome ノックダウン実験により効率よく発現している機能性 RNA を発見できると考えられる。また、Exosome ノックダウン実験により発現量が増加したプローブ（243 個）と表 1 で高発現と判定された候補を比較すると、重複は 17 個のみであった。したがって、Exosome の実験により必ずしも発現量が高くないが発現している機能性 RNA 候補を効率よく発見できると考えられる。

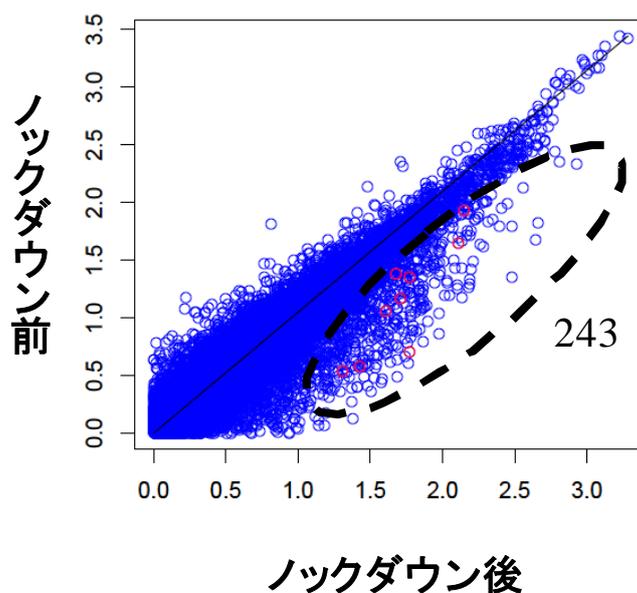


図 2. Exosome ノックダウン後の発現量の変化。

X 軸、Y 軸の数値はノーマライズした発現強度である。

(5) まとめ

インフォマティクス技術により 1 万個の機能性 RNA 候補を抽出し、マイクロアレイを利用することで合計 1,500 個以上の発現している機能性 RNA 候補を抽出することが出来た。Exosome ノックダウン実験では、発現量が必ずしも高くない機能性 RNA を効率よく発見出来るという点で独自性がある。我々が行った機能性 RNA 候補の抽出、すなわちインフォマティクス技術とマイクロアレイを組み合わせたパイプラインは、発現している機能性 RNA を効率よく発見するために有効な基盤技術であると考えられる。現在、本パイプラインで発見した機能性 RNA の中から生物学的に興味深いものを選択し詳細な実験を行っている。一例として、機能解析グループ廣瀬研究室では我々が発見した機能性 RNA 候補の中からエピジェネティックな遺伝子制御に関与するであろう候補を発見し機能解析を進めている。

2. 1. 2. 2. miRNA 遺伝子の予測と機能解析手法の開発

(1) 概要

miRNA はその部分塩基配列が標的であるmRNAに配列相補的に結合し、遺伝子発現制御に関与する重要な非コードRNA のファミリーである。ヒトゲノムに見つかるmiRNAは年々増え続けており未発見のmiRNAが多数存在すると考えられる。我々は平成19年度からmiRNA予測手法の開発に着手し、高精度miRNA予測プログラムmiRRimを開発した (Terai et al., RNA 13(12), pp. 2081-2090, 2007)。miRRimで予測されたmiRNAは、機能解析グループ塩見研究室のago-associated small RNAの検出結果と比較され、いくつかは真のmiRNAであることが示された。その後、更にアルゴリズムを改良し、予測精度の向上と成熟miRNA部位の予測を可能とする手法を開発した(miRRim2)。

(2) アルゴリズムの概要

miRNA 前駆体は安定したヘアピン構造をとり、その塩基配列は進化的に強く保存されているものが多い。また、miRNA 前駆体ヘアピンのステム領域はループ領域と比較し相対的に強く保存されている傾向がある。miRRim はそれらの傾向を隠れマルコフモデルによりモデル化することでmiRNA を予測する手法である。

miRNA前駆体ヘアピンはDroshaとDicerによるプロセッシングを経て成熟miRNAとなる。最近、miRNA前駆体のプロセッシングに必要な2次構造制約がいくつかのグループにより報告された。たとえばDroshaはmiRNA前駆体のもっとも外側の塩基対を認識し、その12~13bp先の塩基対を切断する。したがって、成熟miRNAの5' 末端の上流12~13bpは塩基対を形成しやすく、そのさらに上流は塩基対を形成しにくいはずである。それら新たに判明した2次構造的特徴を正確に捉えることが出来ればmiRNAの予測精度を向上させることが出来るはずである。現在開発中のmiRRim2ではHMMアーキテクチャをより精緻なものにすることで新たに判明した2次構造的特徴を捉えられるようにした。また、従来のみRRimでは用いられなかった新たな特徴量を3種類加えることで予測精度を向上させることに成功した。

(2) - 1. HMM アーキテクチャ

miRRim2 で用いられている miRNA モデルの HMM アーキテクチャを図 3 に記す。miRNA 前駆体ヘアピンは成熟 miRNA 部位が 5' 側のステムに存在する場合、3' 側のステムに存在する場合、そして両側のステムに存在する場合がある。図 3 で示したアーキテクチャはそれら 3 つのケースに対応したサブアーキテクチャをもっている。これにより、成熟 miRNA 部位に見られる進化的保存度や 2 次構造的特徴を捉えることが出来ると同時に、成熟 miRNA 部位の予測が可能となる。

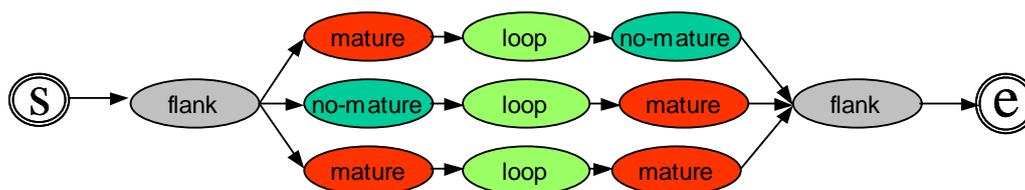


図3. miRNA モデルのアーキテクチャ概要

二重丸で囲った s と e はそれぞれ開始状態と終了状態を表す。楕円はサブアーキテクチャを表す。

(2) - 2. miRRim2 で用いられる特徴量

miRRim2 ではヒトゲノムの各ポジションを 7 種類の特徴量で表現する。miRRim2 で用いられる 7 つの特徴量は下記のとおりである(下線は新たに追加した特長量である)。

- 特徴量 1. PhastCons の保存度スコア
- 特徴量 2. PhyloP の保存度スコア
- 特徴量 3. 最小自由エネルギーの Z-score (※1)
- 特徴量 4. 最大塩基対確率 (※2)
- 特徴量 5. 塩基対間距離 (※3)
- 特徴量 6. ステム保存度差 (※4)
- 特徴量 7. 塩基 (A, T, G, C)

※1 ある部位を中心として周辺 100-bp 領域の最小自由エネルギーの Z-score

※2 ある部位が他の部位と塩基対を組む確率(塩基対確率)の最大値。

※3 最大塩基対確率が 50%以上のとき、塩基対を組む 2 つの塩基の距離

※4 最大塩基対確率が 50%以上のとき、塩基対を組む 2 つの塩基周辺の保存度差

(3) 予測精度

図4に miRNA 前駆体ヘアピンの予測精度と他種法との比較を示す。miRRim2 は改良前の miRRim と比較して高精度に miRNA を予測出来る。他種法と比較しても miRRim2 の予測精度は優れている。

miRRim2 の有用な特徴は成熟 miRNA 部位を予測することが出来ることである。成熟 miRNA とターゲット遺伝子の相互作用を規定するのは成熟 miRNA 部位の 5' 末にある seed 配列であることが知られている。したがって miRNA のターゲット予測を行うためには成熟 miRNA の 5' 端を予測することが重要である。図5は、成熟 miRNA 部位の予測精度を示したものである。miRRim2 では Sensitivity \approx 0.3、PPV \approx 0.3 で成熟 miRNA の 5' 末端を正確に(1bp の誤りもなく)予測することが出来る。5' 末端の位置を 1bp 隣まで正解と考えると、Sensitivity \approx 0.5、PPV \approx 0.5 で予測することが可能である。

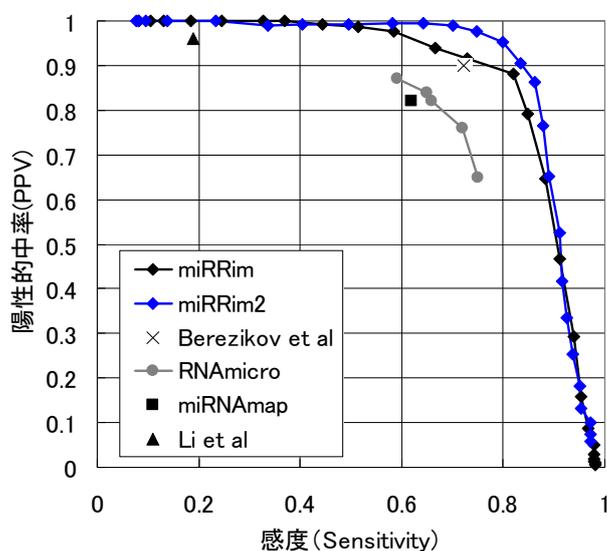


図 4. miRNA 前駆体ヘアピンの予測精度

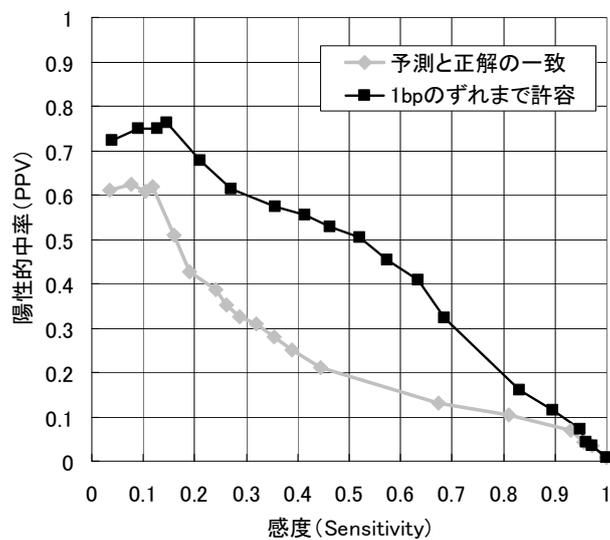


図 5. 成熟 miRNA の 5' 末端の予測精度

(4) まとめ

miRRim2ではmiRNAモデルを精緻化し、新しい特徴量を取り入れることで予測精度を向上させることが出来た。さらにmiRRim2では成熟miRNA部位の予測が可能である。これにより予測したmiRNA前駆体の機能解析 (=ターゲット予測) を行うことが可能である。

2. 1. 2. 3. 偽遺伝子の特徴を利用した機能性 RNA 予測手法の開発

(1) 概要

見つけたい遺伝子の偽遺伝子を見つけることが出来れば、その相同領域をゲノムから抽出することで目的の遺伝子を発見することが出来る。問題は目的の遺伝子を知ることなしに、どのように目的遺伝子の偽遺伝子だけを発見するかである。

レトロ転移により生じた偽遺伝子には2タイプの特徴が生じる。1つは偽遺伝子周辺に現れる Poly-A や、Target Site Duplication (TSD) と呼ばれる短い重複配列である。もう1つは、偽遺伝子にしばしば見られる 5' 側の逆位 (5' -inversion) である。我々はそれらの特徴の有無に基づき偽遺伝子とその親遺伝子のペアを発見する手法を開発した。発見した偽遺伝子：親遺伝子ペアのなかからタンパクコード遺伝子を除くことで機能性 RNA の偽遺伝子：親遺伝子ペアを抽出する。

(2) 偽遺伝子周辺の特徴を利用した偽遺伝子：親遺伝子ペアの抽出

レトロ転移により生じた偽遺伝子の周辺には3種類の配列特徴が生じることが知られている (図6)。1つめは偽遺伝子の3' 側に生じる長さ5~20bp程度の Poly-A tail である。2つ目は、偽遺伝子の両側に生じる Target site duplication (TSD) と呼ばれる5~20bp程度の重複配列である。3つ目は5' 側の TSD と重複して現れる TTAAAA モチーフである。この TTAAAA モチーフを持たない偽遺伝子もしばしば存在する。



図6. 偽遺伝子周辺の配列特徴

我々は上記の3つの配列特徴を高精度に検出するアルゴリズムを開発し、ソフトウェア TSDscan として実装した。TSDscan では、偽遺伝子候補配列の上流と下配列を特殊なスコアリングによりアライメントすることで Poly-A tail や TSD を検出する。

TSDscan を使って図7に示すような領域をヒトゲノムから抽出する。まず、ヒトゲノム内で相同性のある領域ペアを網羅的に同定する。ある領域ペアのどちらかの領域に Poly-A tail-TSD が検出された場合、その領域ペアを偽遺伝子：親遺伝子ペアとみなす。最後にタンパクコード遺伝子に相同性のある偽遺伝子：親遺伝子ペアを除く。残った領域を機能性 RNA の偽遺伝子：親偽遺伝子ペア候補とする。



図7. 遺伝子・偽遺伝子領域ペアの配列パターン

(3) 5' -inversion を利用した遺伝子・偽遺伝子ペアの抽出

遺伝子から転写された mRNA が逆転写されゲノムに挿入される際には、その mRNA の 5' 側が逆位 (5' -inversion) を起こすことがある。そこで、図 8 のような相同性パターンをもつ領域ペアをヒトゲノムから網羅的に抽出する。そして、タンパクコード領域に相同性のある領域ペアを取り除くことで機能性 RNA の偽遺伝子：親遺伝子ペアを抽出する。



図8. 5' -inversion をもつ偽遺伝子：親遺伝子領域ペアの配列パターン

(4) 偽遺伝子：親遺伝子ペアの抽出結果

機能性 RNA に由来する偽遺伝子：親遺伝子ペアの抽出結果を図 9 に記す。偽遺伝子周辺の特徴を利用して 280822 個のペアを検出した。タンパク質遺伝子に由来すると思われるものを除くことで 1644 個のペアを得た (①)。5' -inversion の特徴を利用して 660 個のペアを検出した。タンパク質遺伝子に由来すると思われるものを除くことで 29 個のペアを得た (②)。①と②が重複するのは 1 ペアであった。

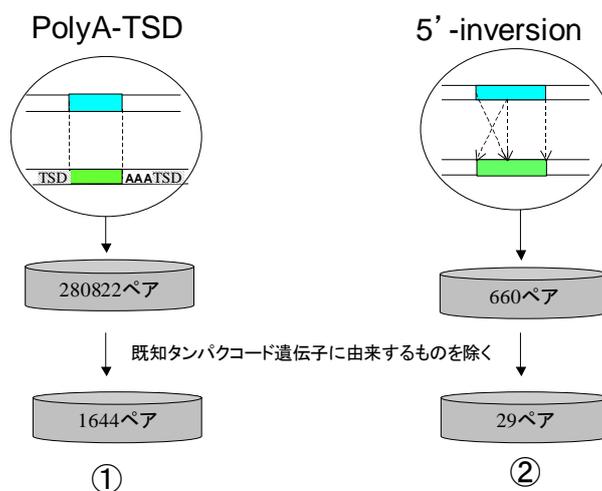


図9. 機能性 RNA 由来の偽遺伝子：遺伝子領域ペアの抽出結果

(5) 発見した新規機能性 RNA 候補の一例

上記手法で発見された機能性 RNA の一例を図 10 に記す。この機能性 RNA (以後、R75) はタンパクコード遺伝子のイントロンにあり 2 つの偽遺伝子を持っている (図 10)。R75 の予測 2 次構造は H/ACA 型 snoRNA の典型である 2 つの長いステムを持ち、ループ領域には進化的に保存された ACA-ボックスを持っている。このことから、R75 は新規の H/ACA 型 snoRNA 遺伝子であると考えられる。機能解析グループ廣瀬研究室の協力により R75 に対して Ribonuclease protection assay を実施したところ、R75 は確かに発現していることを確認した。

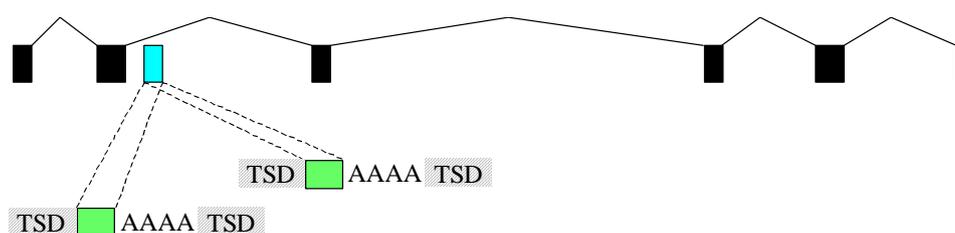


図 10. 発見した機能性 RNA 候補の一例

水色のボックスは、機能性 RNA 候補 (R75)、緑色のボックスは R17 の偽遺伝子、黒のボックスはタンパクコード遺伝子のエクソンを示す。

図 11(a) は R75 の 2 次構造を模式的に書いたものである。ほとんどの H/ACA 型 snoRNA は図 11(b) のような構造をとるが、R75 は典型的な snoRNA とは違う構造をとるようである。

偽遺伝子の特徴を利用した方法は、既知機能性 RNA との配列/2次構造の類似性に依存しないため、このような非典型的な機能性 RNA を発見できるという強みをもつ。

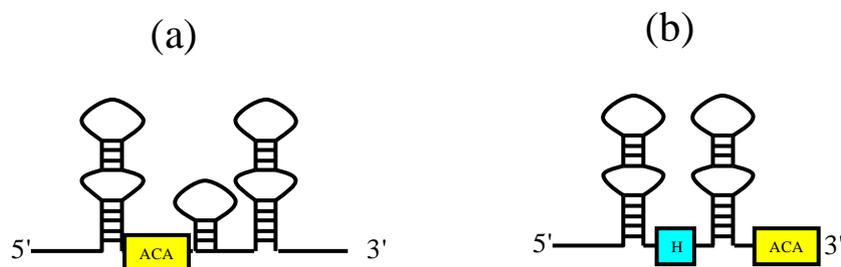


図 1.1. R75 の 2 次構造の模式図

(a) R75 の予測 2 次構造、(b) 典型的な H/ACA snoRNA の 2 次構造

(6) まとめ

偽遺伝子の特徴を利用した機能性 RNA 発見手法を提案し、ヒトゲノムに対して網羅的に実行した。予測結果の中には新規 H/ACA 型 snoRNA と思われる候補や、がん細胞特異的に発現する機能性 RNA 候補（結果は示さない）が含まれていることを発見した。本手法は既存手法では用いられない特徴を予測に用いるので、これまで発見できなかった機能性 RNA を発見できる可能性がある。TSDscan については、Terai et al., *Nucleic Acids Research* 38(4), pp. 1163–1171, 2010 に論文発表した。

2. 1. 2. 4. 結論

本研究課題ではヒトゲノムから 1 万個以上の機能性 RNA をインフォマティクス技術により予測し、カスタムアレイを使って 1500 個以上の発現している機能性 RNA 候補を抽出した。このプロセスは機能性 RNA を効率よく発見する基盤として有用である。また産業上重要である miRNA 遺伝子を現時点では世界最高精度で予測できる手法を開発した(miRRim2)。miRRim2 では、成熟 miRNA 部位を予測することが出来るので、予測した miRNA の機能推定が可能である。また偽遺伝子の特徴を利用した機能性 RNA 発見手法を提案した。有望な候補について実験的検証を行い、提案手法の有用性を示した。さらに提案手法で予測した機能性 RNA 候補のなかから癌特異的に発現するものを発見し、癌診断マーカーとして特許出願を行った。

2. 1. 3. 機能性RNAデータベースの構築

JBIC 集中研①、分室 2 (インテック W&G)

共同実施先： 産総研①、東京大学 (1 ; 浅井)

従来のほとんどのゲノム解析プロジェクトやゲノムデータベースが、タンパク質コード遺伝子を中心に構築されてきたために、機能性 RNA に特化し、かつ網羅的なデータベースは不十分であった。本研究開発項目では、単に既知の機能性 RNA 配列のデータを蓄積するだけでなく、予測した機能性 RNA 配列、予測の元となった様々な情報解析結果、次世代シーケンサーによって読まれた機能性 RNA 断片のデータなどを集積し、新規機能性 RNA の発見と絞り込み、機能解析に活用できるデータベースの開発を行うことを目標に、研究開発を進めることにした。同時に、実験グループから提供される RNA 配列データを解析し、開発したデータベースを活用して新規機能性 RNA の発見する研究にも取り組んだ。

2. 1. 3. 1. 機能性 RNA データベースの設計と構築

既知の機能性 RNA とともに、新たに予測した新規機能性 RNA 候補について、塩基配列情報、ゲノム上の位置情報、組織別発現情報、文献情報などの各種情報を統合した機能性 RNA データベース (fRNAdb) を設計した。さらに、fRNAdb と連携して動作するゲノムブラウザ UCSC GenomeBrowser for Functional RNAs を開発して、ゲノム配列上における機能性 RNA の領域を可視化し、プロジェクト内で利用可能としたほか、一部を一般公開し、Kin et al., Nucleic Acids Research 35(Database issue), pp.D145-D148, 2007 で論文発表した。

機能性 RNA データベースは、図 1 に示すような、バイオインフォマティクスグループ内での綿密な連携によって構築された。

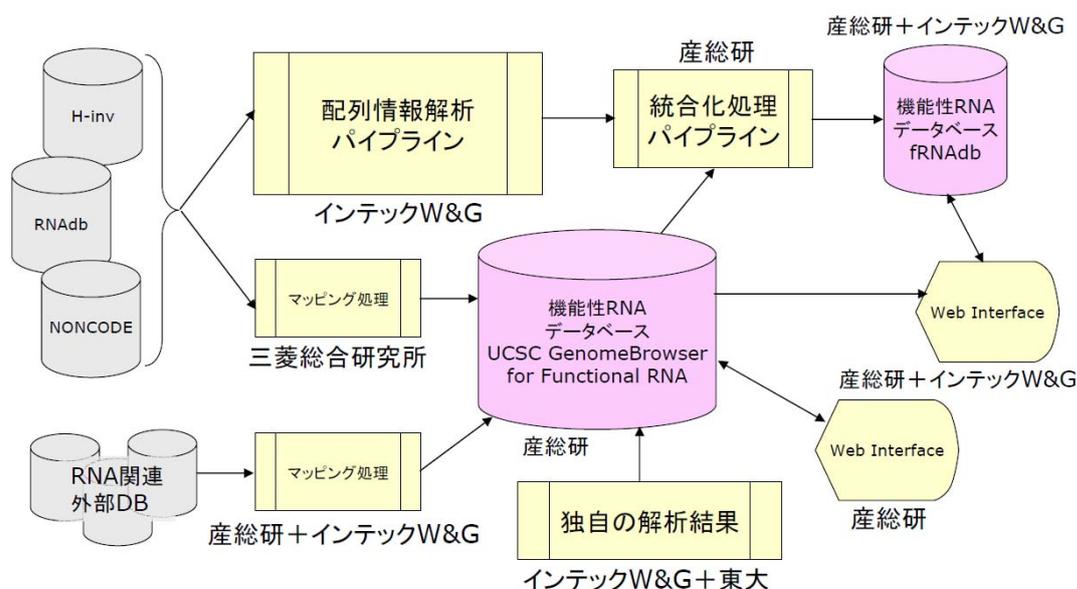


図 1. バイオインフォマティクスグループ内での綿密な連携によるデータベースの構築

機能性 RNA データベースの最も重要な用途は、既知の機能性 RNA と本プロジェクトで予測された新規機能性 RNA 候補情報の閲覧・検索である。図 2 に典型的な検索例を示す。各配列に関連付いた情報は詳細画面にて、図 3 に示すメッセンジャービジュアルライザーによって視覚化される。

fRNAdb --- Main Listing

This is the top page of the functional RNA database. Please click "refresh" button to perform query.

Last Update of Main Listing Table (summary): 2007/05/29 17:20:58 GMT+0

[View Table Scheme with Statistics](#) or [Class Summary](#) to get the overview of current dataset. Or go to [Help](#) folder.

Repository

Load/Save your selection condition from/to your personal folder

Select an item to load View your data folder

Class Basic DB/ID Expert Sort Column

Class Selection

Class selection lets you choose the target RNA class. Please use **Ctrl+Left Mouse Button**(for Windows or Unix) or **Apple+Mouse Button**(for Apple) to select multiple items in the list.

group I intron
group II intron
H19
hypothetical short protein
inhibitor of Rep2 protein synthesis
IPW
Literature curated
male hypermethylated (MHM) region noncoding nuclear RNA
miRNA
Mic F RNA
miRNA
miRNA precursor
mRNA-like RNA
noncoding nuclear RNA
Noncoding transcript
NTT
OxyS RNA
pec RNA
pRNA
Ribonuclease MRP RNA
Ribonuclease P RNA
Ribozyme
Sasaki & Hirose 2007
scaRNA
...DNA

①閲覧したい RNA
の種類を選択する

②refresh ボタン
をクリックする

Display Options

20 items/page Page: 1 / 32

Total hits: 621

Download

Clicking opens a detail information page, opens a sequence page, and opens a Genome Browser window. opens a sort form above.

no	ID	Acc.	Original	Common Name	Class	Length (nt)	# of exons	# of ESTs	# of mapped	GC%	Max. ORF length (aa)	Repeat Coverage (%)	Pin
1	FR006625	Z70203	u1136	let-7 RNA	miRNA precursor	73	0	0	1	42	21	0	
2	FR007360	AF480538	u1871	mir-100	miRNA precursor	80	1	0	1	46	25	0	
3	FR007361	AF480540	u1872	mir-101	miRNA precursor	75	1	0	1	40	18	0	

図 2. 機能性 RNA データベース fRNAdb の画面の一部。マイクロ RNA 前駆体を選択し、配列一覧を表示させている。検索結果一覧画面から、個々の配列の詳細画面や、ゲノムブラウザーへジャンプして、その遺伝子周辺のゲノム情報を閲覧することも可能になっている。

機能性プロジェクト内部では、機能解析グループにて新規機能性 RNA 遺伝子候補絞り込み作業で頻りに用いられ（産総研廣瀬グループ、東工大相澤グループ、徳島大塩見グループ、理研清澤グループ）、ツール開発グループ（東大鈴木グループ）においても利用された。デ

データベースは2006年10月からインターネット上で公開しているが

(<http://www.ncrna.org/>)、プロジェクト外では米国、ニュージーランド、フランス、ドイツ、デンマークなどからも多数アクセスされている。

配列構造情報ブラウザ fRNAdbは以下のような内容となっている：

- ア) 以下の配列情報を機能性RNA遺伝子候補として、(1) H-invitational の完全長cDNA配列情報でhypothetical short protein coding、non-protein coding と分類されているもの(2) RNAdbの予測RNA遺伝子、を登録した。
- イ) (1) NONCODEデータベース登録配列、(2) RNAdbの既知RNA遺伝子、を配列情報を既知RNA遺伝子として、登録した。
- ウ) 機能性RNAに関連する配列特性30項目(表1)の指標を計算機によって求めた。
- エ) 資料に基づいて配列の検索や絞込みをするためのインターフェースを開発した。

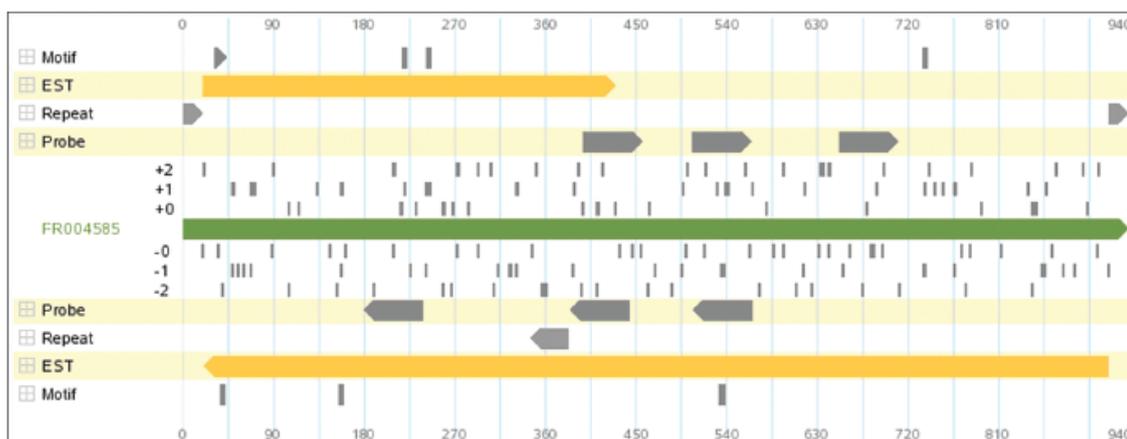


図3. メッセンジャービジュアルライザー画面 配列と EST やモチーフの関係を視覚化する。中央の緑の水平線が cDNA。センス、アンチセンス鎖それぞれのコドンフレームにおける終止コドンの位置と、マイクロアレイ・プローブの位置、リピート配列の位置、EST 配列の位置、Poly(A) シグナルなど、様々な配列モチーフの位置が示されている。

表 1. 機能性RNAに関連する 30 項目の配列特性

Description	
1	Length of the sequence (nt)
2	Number of exons
3	Number of overlapping ESTs
4	Number of mapped positions
5	GC Content (%)
6	Maximum length of potential ORF (aa)
7	Percentage of bases that is covered with repeat elements
8	Repeat elements reside proximal up/down stream
9	Known gene that is a potential sense/antisense of this transcript (exon overlapping)
10	Number of protein homologs (GenBank NR)
11	Known gene that includes this transcript within its intron
12	Known gene region that overlaps with the mapping extent of this transcript (strand not considered)
13	Known gene that overlaps with this transcript within its intron in different strand
14	Known gene where this transcript is possibly a part of its 3UTR
15	Known gene where this transcript is possibly a part of its 5UTR
16	Known gene within upstream 5kbp
17	Known gene within downstream 5kbp
18	Average conservation score over the mapped exonic region
19	Maximum conservation score over the mapped exonic region
20	Maximum conservation score within 500 base upstream from the mapped 5'
21	Overlapping UCSC Ultra Conserved region
22	Number of canonical splice signals in this transcript
23	Number of poly-A signals in this transcript
24	Number of CpG island
25	Associated Transposon Free Region
26	Number of RFAM known RNA motifs in this transcript
27	Number of RNAz predictive RNA motifs in this transcript
28	Number of EvoFold predictive RNA motifs in this transcript
29	Maximum Z-score of RNA secondary structure over this transcript. Scores lower than -6 are significant. Higher scores are considered insignificant. Stored
30	Number of cell lines responding to Affy probes in exon regions of this transcript (Affymetrix Transcriptome Phase 2 Tiling Array Analyses)

ゲノムブラウザ UCSC GenomeBrowser for Functional RNAs には、UCSC Genome Browser をベースに、表 2、表 3 に示す機能性 RNA に特化した情報を追加した。

表 2. 機能性RNAに特化したトラック情報

Track	Description
RNAz folds (6)	Secondary structure annotation of RNAz
ENOR (7)	ENOR (Expressed Noncoding Region) [Lifted from mm5]
Erdmann (8)	Erdmann noncoding RNAs
NONCODE (2)	Mapping information of NONCODE RNAs
RNAdb (3)	Mapping information of RNAdb RNAs
RNA Clusters	Small RNA genes often reside close to each other forming clusters. This track represents computationally identified RNA clusters in human genome.
Rfam seed folds	Genomic search results with INFERNAL and covariance models generated from RFAM seeds.
Rfam full	BLAT mapping results for RFAM full sequence dataset
antisense ChenJ NAR2004 (9)	Sense-antisense pairs among UCSC known genes
tRNAscan-SE (10)	tRNA genes predicted by tRNAscan-SE
Ultra Conserved Elements (11)	100% conserved elements (≥ 200 bp) in human, rat, and mouse
Ultra Conserved Elements 17way	100% conserved elements in 17 vertebrates (longer than 50 bp)
Transposon Free Region (12)	Regions longer than 5Kbp or 10 Kbp containing no LINES, SINES and LTRs.
Human Accelerated Region (20)	HAR non-coding gene candidates predicted by (20)
Z-score	Regions with Z-score lower (lower is better) than -6 (actual track score=Z-score x

表 3. マイクロRNAに特化したトラック情報

Track	Description
Known miRNAs	miRBase known miRNAs
Predicted miRNAs	miRNAMap and Berezikov's predicted miRNAs
Known targets	TarBase experimentally verified miRNA target sites
Predicted targets	RNAhybrid, PicTar, miRBase, and T-ScanS predicted miRNA

また、機能性 RNA の発見、機能解析を推進し、各ユーザに固有の非公開データと公開データを同時に表示した解析を行うため、以下の機能を追加した。

- ・ 共通2次構造表示機能～比較ゲノムの結果から共通RNA2次構造を予測した結果を視覚的に表示する機能を加えた。
- ・ ユーザー認証機能～ユーザーをユーザー名とパスワードで認証し、ユーザー専用のトラック情報を扱えるようにした。

2. 1. 3. 2. ショウジョウバエ AGO2 結合低分子 RNA のハイスループットシーケンス解析

機能性 RNA データベースを活用した機能解析グループの慶應義塾大学塩見研究室との共同研究によって、ショウジョウバエの新規内在性 siRNA が発見された (Kawamura et al., 2008 *Nature* 453:793-797)。

塩見研究室では、マイクロ RNA や siRNA の作用経路に関与するタンパク質のひとつである AGO2 タンパク質に特異的に結合する抗体の合成に成功した。この抗体を用いてショウジョウバエの生殖細胞から、AGO2 タンパク質を免疫沈降法により精製し、このタンパク質に結合していた低分子 RNA をハイスループットシーケンシングによってシーケンス解析を行ったところ、77,327 本の低分子 RNA 配列情報を得た。バイオインフォマティクスグループでは、共同研究の一環として、この大量配列情報の情報解析を担当した。我々は機能性 RNA データベースを活用して、これらの大量配列情報の由来を自動的に判定する独自のアノテーションシステムを構築し (図 4)、迅速に配列の由来を決定することに成功した。

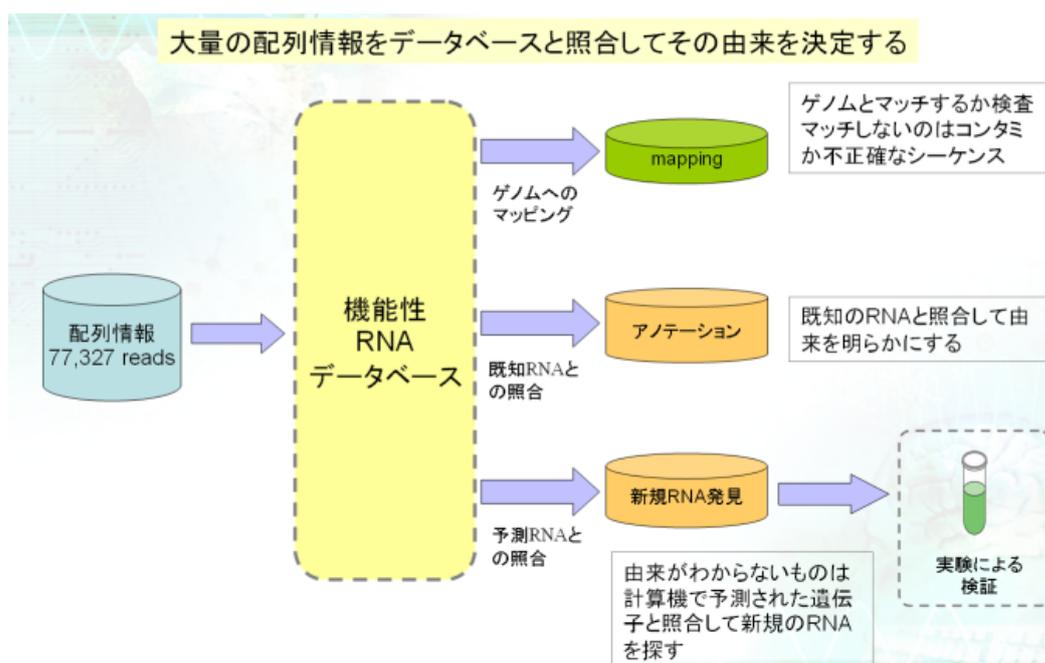


図 4. ショウジョウバエ AGO2 結合低分子 RNA の機能性 RNA データベースを用いた情報解析の流れ図

アノテーションシステムの処理の流れは次の通りである。配列情報は全てショウジョウバエゲノムへマッピングされる。完全一致の配列と 1 塩基のミスマッチを含むものだけを採用し、マッピングできなかった配列は後の解析には用いないようにして解析の信頼性を落とさないようにした。マッピングされた配列は、次にどの遺伝子や繰返し配列 (レトロトランスポゾンも含む) と重複しているか検査される。ここでの遺伝子とは、タンパク質遺伝子と機能性 RNA 遺伝子の両方を指す。まずは既知の遺伝子や繰返し配列との重複を検査し、次に予測された機能性 RNA 遺伝子との重複も検査する。図 5 に既知の遺伝子と判定

された低分子 RNA の内訳を示す。

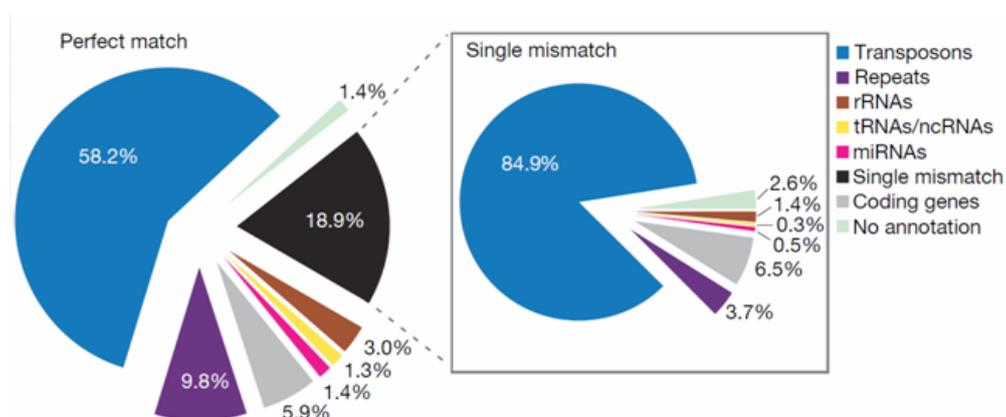


図 5. ショウジョウバエ AGO2 結合低分子 RNA のアノテーション結果

予測された機能性 RNA 遺伝子との重複によって、新規の機能性 RNA が自動的に検出可能である。いずれの遺伝子とも重複がなかったものについては、特に着目すべき特徴を持つものから順に手作業による検査を行い、2 個の新規マイクロ RNA を 2 つ発見した (図 6)。

どの遺伝子とも重複のなかった低分子 RNA のなかに、最も多く観測された低分子 RNA 配列が含まれていた。我々は、機能性 RNA データベースの一角である機能性 RNA ゲノムブラウザ UCSC GenomeBrowser for Functional RNA 上で、件の低分子 RNA 配列の由来を調べたところ、これらがゲノムの特定領域から発現していることがわかった。当該領域には転写産物がヘアピン構造をとるような配列が 20 回連続する特長的な領域であることを、機能性 RNA ゲノムブラウザ特有の機能を用いて瞬時に調べる事ができた (図 7)。このヘアピン構造が内在性 siRNA の母体となっていることが強く示唆された。他の競合グループも同様の発見を行ったが、我々は機能性 RNA データベースを用いる事によって迅速に作業を行ったことでより早く論文を投稿することに成功した。この実績によって、機能性 RNA データベースが低分子 RNA のハイスループットシーケンス解析において有用であることが明確に示されることとなった。

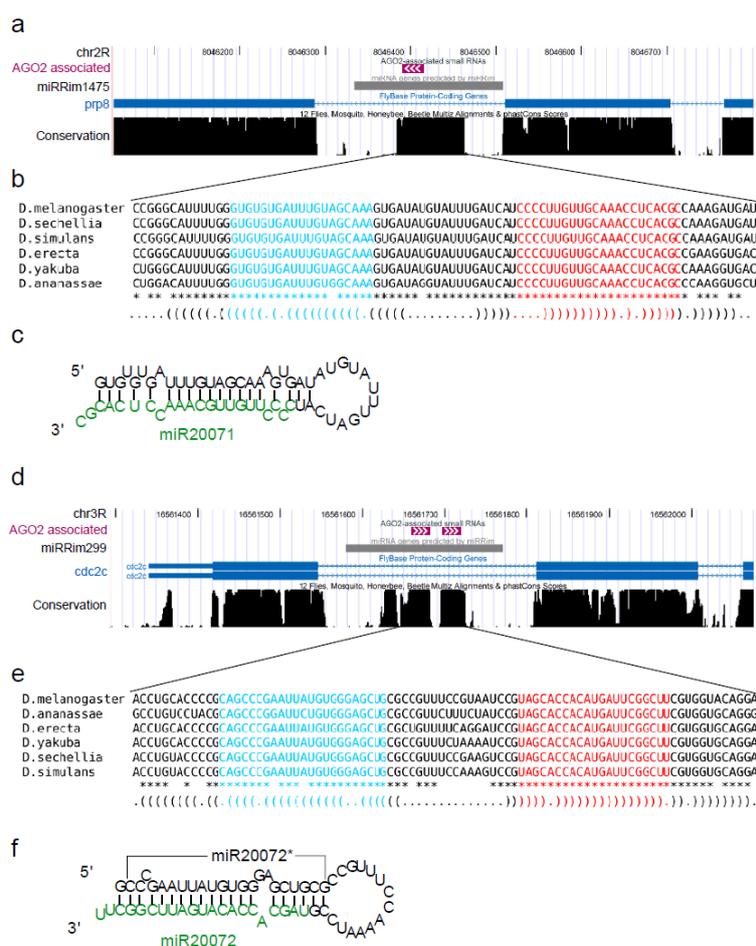


図 6. 機能性 RNA データベースを用いて発見された新規マイクロ RNA。一つは、我々独自のマイクロ RNA 予測手法である miRRim の予測によって得られたものである。

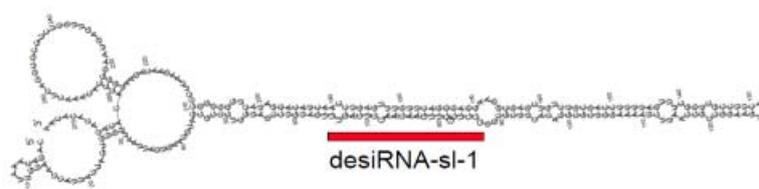


図 7. ショウジョウバエ AGO2 結合低分子 RNA の配列解析から発見された内在性 siRNA (赤線部) とその母体であるヘアピン構造の構造図

2. 1. 3. 3. ヒト AGO2 結合低分子 RNA のハイスループットシーケンシング解析

ヒト AGO2 タンパク質は、マイクロ RNA の生合成経路において、成熟マイクロ RNA を捕獲する重要な性質を持った RNA 結合タンパク質である。マイクロ RNA 合成機構の詳細を明らかにするためには、このタンパク質がどのような RNA を捕獲しているか詳細に調べる必要がある。

慶應義塾大学医学部塩見研究室（機能解析 Gr）実施のヒト AGO2 を標的にした IP-seq によって得られた配列情報からマイクロ RNA に相当する配列情報を選別する。マイクロ RNA 配列の性質を情報学的に解析することで、配列上の特徴を詳細に調査した。

その結果、マイクロ RNA には、最も頻繁に観測される regular form のほかに、異なる長さのものや塩基が付加されたバリエーションが多数観測された。特に 3' 端は 5' 端に比べて変化が大きかった（図 8）。さらに、新規マイクロ RNA を 5 件発見することができた（表 4）。そのうち 1 件は、①-2 で開発したマイクロ RNA 遺伝子予測プログラム miRRim で予測されていたものであった（これらは、マイクロ RNA の代表的データベースである miRBase に登録された）。上記の結果は、Azuma-Mukai A *et al.* 2008 *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(23):7964-7969. に発表した。

表 4. miRBase に登録されている本プロジェクト成果による新規マイクロ RNA の一覧。hsa-mir-1538（赤丸）は、独自のマイクロ RNA 予測プログラムの miRRim によって検出できた新規マイクロ RNA

Accession	ID [△]	Literature reference	Links
MI0007261	hsa-mir-103-1-as	✓	PubMed ID: 18524951
MI0007262	hsa-mir-103-2-as	✓	PubMed ID: 18524951
MI0007258	hsa-mir-1537	✓	PubMed ID: 18524951
MI0007259	hsa-mir-1538 ●	✓	PubMed ID: 18524951
MI0007260	hsa-mir-1539	✓	PubMed ID: 18524951

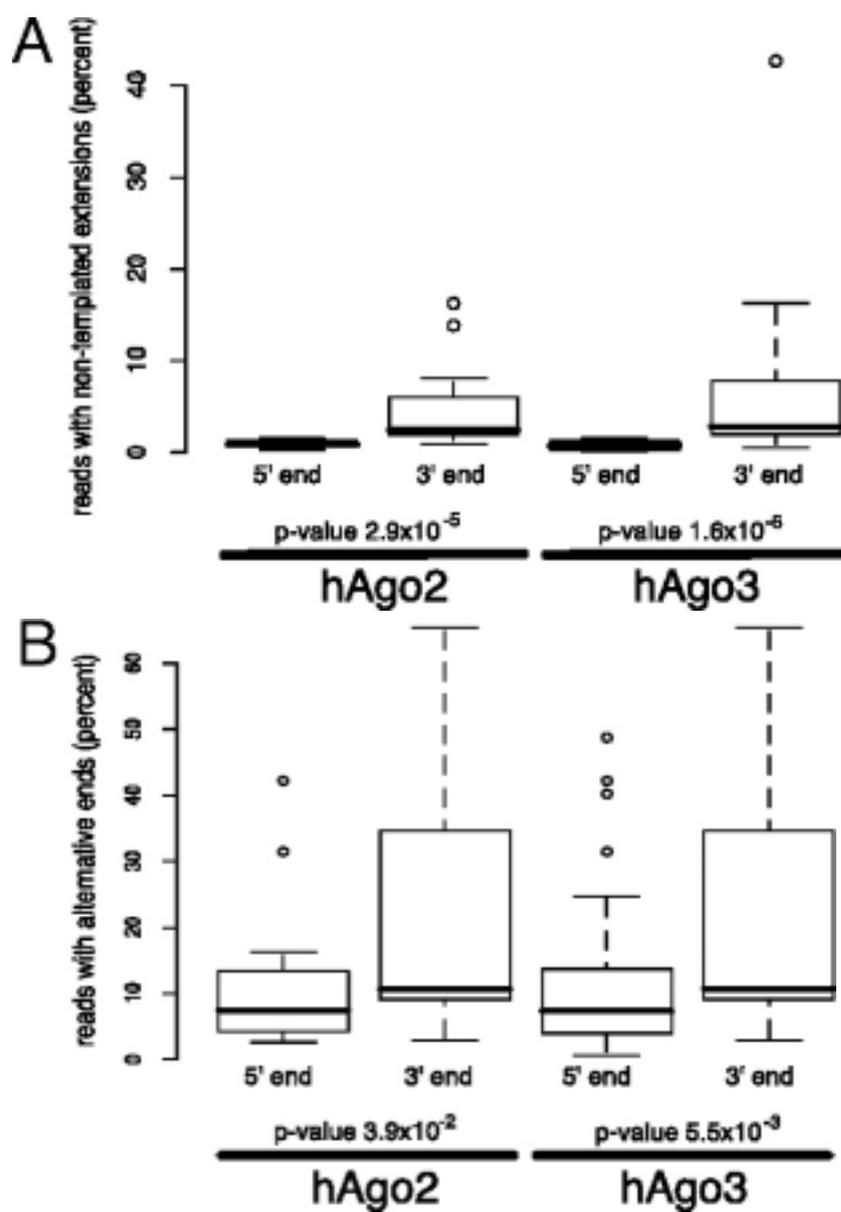


図8. A)マイクロ RNA の 5' 端及び 3' 端に、ゲノムに対応しない塩基が観測された頻度分布。B)Regular form に対する 5' 端、3' 端の長さの違いの分布。

2. 1. 3. 4. 機能性 RNA データベースの改訂

プロジェクトの中盤にあって、当初の絞込みによる候補は機能解析の段階に至ったが、新規機能性 RNA の探索と機能解析は、次世代シーケンサーの急速な普及によって大きく影響されることになった。完全長 cDNA シーケンシングのように一つ一つの転写産物をクローニングしてライブラリ化する段階を踏まずに、玉石混交の塩基配列を高速にシーケンシングして、情報解析によって詳細な内容を把握する手法が主流となった。このような状況が、機能性 RNA データベースを大量配列情報解析の情報基盤として発展させる契機となった。一方で、本プロジェクトを含め、世界全体での機能性 RNA 研究の進展に伴って、機能性 RNA の発見や機能解析に有用な情報が数多く発表されるようになった。これらの情報源に迅速に対応し、新規 RNA の発見と機能解析を支援するための、機能性 RNA データベースの改良及び拡張を行った。

機能性 RNA データベースは、配列データベースである「fRNAdb」とゲノムブラウザーである「UCSC Genome Browser for Functional RNA」が連携して動作する。

1) 配列データベース「fRNAdb」

既知の機能性 RNA 配列情報について、最新の情報に更新・追加する。登録配列は、次世代シーケンサーによる大規模シーケンス解析で得られた配列も含めて 510,055 配列となった。内訳は表 5 に示す。

表 5. 機能性 RNA データベース・バージョン 3 登録配列の内訳

種別	本数	内訳
既知 RNA	322,856	RNAdb Rfam miRBase NONCODE snoRNA-LBME-db European ribosomal RNA
予測 RNA	85,079	RNAdb (RNAz, EvoFold) H-invDB (NPCT)
大規模シーケンス	102,130	Gene Expression Omnibus
合計	510,055	

それぞれの登録配列について、配列の分類（オントロジー）に関する情報、塩基配列の特徴に関する指標、既知遺伝子との関連性、転写活性に関する情報を対応付けて、詳細画面にてそれらの情報が一覧できるようにした（図 9、10）。表示される属性の詳細について、表 6 に示す。また、大規模シーケンス解析によって得られた配列については、他の実

験との比較情報も表示する（同じ配列が他の実験で得られている場合）（図 1 1）。

fRNAdb の画面インタフェースを新しくし、表 6 に示したような詳細な属性について検索条件を絞り込むことが可能ないように、検索機能を強化した。図 1 2 に fRNAdb の画面を示す。fRNAdb のトップページ中段には 4 つのアイコンがあり、ここからデータベースの基本機能にアクセスできる。以下にそれぞれのアイコンの機能の詳細について示す：

	Catalog	登録配列の様々な属性（長さ、オントロジー分類、生物種など）による分類結果を示すことでデータベースの概要をつかみやすくし、あらゆる登録配列へのアクセスを容易にするためのインタフェース。
	Blast	NCBI Blast による配列相同性検索サービス
	Download	データベース情報のダウンロード画面
	Help	詳細なヘルプ情報（英文）

検索機能については、配列に関連付いた 26 項目について詳細な検索が可能ないように、それぞれの項目に対応したクオリファイア（修飾語句）が利用可能である。例えば、既知遺伝子の 3' UTR に重なるアンチセンス転写産物を検索するには、以下のように検索語を入力する：

%[ov_anti] AND %[ov_3utr]

表 6. 登録配列情報の詳細

分類	詳細項目	説明
基本情報	アクセション番号 オントロジー分類 由来生物種 ゲノムへのマッピング位置 外部 DB への相互参照 関連文献情報	
塩基配列の特徴	塩基配列 二次構造情報	既知構造が無ければ予測構造を表示する。予測構造では、進化的に保存された二次構造があればそれを表示し、そうでなければ単独の配列から予測した構造を表示する。
既知遺伝子との関連性	重複遺伝子との関係 隣接遺伝子との関係 OMIM 情報との関連	重複遺伝子とのセンス/アンチセンスの区別。重複領域が 5' UTR、エキソン、3' UTR、イントロンのいずれかの区別。 隣接（同じ転写クラスター※）内で、上流、下流のいずれかの区別。 ※転写クラスター=Affymetrix社の transcript cluster の定義に基づく。
転写活性に関する情報	Affymetrix GeneChip Invitrogen Ncode	配列上に各社のプラットフォームによるプローブが設計されていれば、その情報を表示する。

FR251213

[Return]

Summary		Sequence	Secondary Structure
Summary			
ID	FR251213		
Description			
Accession	AL137603		
Sequence Ontology	antisense_RNA		
Organism			
Homo sapiens	human, man		
Genome Mapping			
human(hg18)	1 region	chrY:2909725-2910547(+) Browse ?	
Cross Reference			
RNAdb v2.0	AS03699		
Gene Association / Sense Overlap / 3'UTR			
human(hg18)	ZFY ? uc004fqj.1 Browse , uc004fqj.1 Browse , uc010rwe.1 Browse , uc010rwe.1 Browse		
Sequence Similarity			
OMIM			
ID	Title	Locus	
490000 ?	ZINC FINGER PROTEIN, Y-LINKED; ZFY	Yp11.3(chrY:1-330000)	
MicroArray / Affymetrix GeneChip Exon Array / hg18			
Probe	Transcript Cluster	Probe Locus	
1760698	4028568 Browse	chrY:2909858-2909862(+) Browse	
5423723	4028568 Browse	chrY:2909888-2909912(+) Browse	
4697249	4028568 Browse	chrY:2910400-2910424(+) Browse	
MicroArray / Invitrogen Ncode Noncoding RNA Array / hg18			
Probe	Target Transcript	Probe Locus	
INGNh13844	AL137603 Browse	chrY:2910019-2910079(+) Browse	
Reference			
<p>1. RNAdb--a comprehensive mammalian noncoding RNA database. Pang KC, Stephen S, Engström PG, Tajul-Arfin K, Chen W, Wahlestedt C, Lenhard B, Hayashizaki Y, Mattick JS Nucleic Acids Res, 33(Database issue):D125-30, 2005 Jan cited in PMC: 27</p>			

図9. 配列の詳細情報表示画面

FR251213

[Return]

Summary Sequence **Secondary Structure**

Sequence

Evidence: putative(CentroidFold)

[Click here to view the PDF file.](#)

```

0      1      2      3      4      5      6
AUUUUGUGAUUGGCAGCCUCGAAAUUUUAGAUUAUUUGAUCUAGUUCUAAAUGUCUUUAUUCUAUUU
.....((((((((.....)))))))-((((.....))))-.....

7      8      9      0      1      2      3
GAUUUUAAACCUAGUACCAUCCAAAACCAUGUAUUGGAUUUUUAGAUUCUUAUAGGCCUUCUUAAGCCUUU
.....((((((((.....)))))))-((((.....))))-..

4      5      6      7      8      9      0
AUACAUUUCCUACCUGAUUUUUAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
.....((((((((.....)))))))-((((.....))))-(((

1      2      3      4      5      6      7
AAUCCUUUUAAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
.....((((((((.....)))))))-((((.....))))-(((
    
```

図 1 0. 配列の二次構造情報表示画面

FR040099

[Return]

Experiment	Method	Tissue	Read Number	PubMed
small RNAs from 14 libraries in 2008/06/02 Organism: <i>Drosophila melanogaster</i>	Illumina-Solexa	Imaginal disc	271	1 citation
endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells in 2008/05/08 Organism: <i>Drosophila melanogaster</i>	Roche-454	S2 cells, AGO2 IP	1	1 citation
small RNAs from cell lines and imaginal disc in 2008/05/01 Organism: <i>Drosophila melanogaster</i>	Illumina-Solexa	Imaginal disc	271	1 citation
small RNAs in 2008/04/30	Illumina-Solexa	Wild Type adult female ovaries, 18-29nt	204	1 citation
	Illumina-Solexa	dcr-2 ^{-/-} mutant adult female ovaries, 18-29nt	324	1 citation
	Illumina-Solexa	loqs ^{-/-} mutant adult female ovaries, 18-29nt	421	1 citation

図 1 1. 大規模シーケンスによって得られた RNA 配列の発現情報を示す画面。実験情報、実験手法、組織、発現量（リード数）、参考文献が確認できるようになっている。

[Top](#)
[Catalog](#)
[Blast](#)
[Download](#)
[ncrna.org](#)
[Help](#)



A comprehensive non-coding RNA sequence database ver. 3.4

fRNAdb is Web Service (SOAP, REST) Ready.

Total: 510,055 entries






Catalog Blast Download Help

Please input some query keywords for retrieving RNAs via simple text search e.g. "miRNA" or "snoRNA".
 Try add disease/tissue name to make your search more specific e.g. "miRNA oncogene".
 Or can be more specific e.g. "miRNA oncogene human".

[submit](#)

The icons used in this page are a part of Tango Desktop Project created by Tango Desktop Project which are available under CC BY-SA License.
 This site uses Yahoo! User Interface Library (YUI) which is available under BSD License.
 fRNAdb is licensed under a Creative Commons 表示-非営利-改変禁止 2.1 日本 License.
 Based on a work at www.ncrna.org.

図 1 2. 配列データベース「fRNAdb」トップページ 中段の4つのアイコンからデータベースの基本機能にアクセスできる。「Catalog」は、登録配列のカatalog画面で、様々な属性による配列の分類

2) ゲノムブラウザ「UCSC GenomeBrowser for Functional RNA」

ゲノムブラウザでは、ゲノムに関連する様々な因子の位置情報を画面上に表示する。位置情報のまとまりを「トラック」とよぶが、ゲノムブラウザには多数のトラックが掲載されている。本プロジェクトのための追加したトラックの一覧を表7～9に示す。これら追加トラックの一覧は、ウェブ上でも公開しており、www.ncrna.orgのトップページから「Project Specific Custom Tracks」をクリックして閲覧可能になっている。

トラック追加に加えて、次に示す独自の機能拡張も行った。主な拡張は、動的な二次構造予測機能と、秘匿トラック情報機能である。

動的な二次構造予測機能は、ゲノムの任意の領域で、進化的に保存された二次構造を予測する機能である。比較ゲノムのトラック（Conservationトラック）をクリックすると、画面に表示されている領域の二次構造について予測し、その結果を表示することができる（図14, 15）。比較ゲノムのトラックをクリックするようにしたのは、二次構造予測において比較ゲノムの結果を考慮した二次構造予測を行っているためである。予測にはバイオインフォマティクスグループで独自に開発したCentroidFoldプログラムを用いている。結果画面には、比較ゲノムと塩基対の関係を対比しながら確認するための表示と、二次構造を表示するのに良く用いられるグラフ図を示す。比較ゲノムと塩基対の表示においては、ゲノム配列の置換と塩基対の関係を次のように色分けして表示している：灰色＝塩基対に関与しない塩基で種間置換を示さないもの、紫＝塩基対に関与しない塩基で置換を示すもの、黒＝種間で保存されている塩基対、青＝塩基対は保存されているが、片方の塩基に置換があるもの、緑＝塩基対は保存されているが、両方の塩基が置換したもの、赤＝塩基対を形成しなくなる単塩基の置換、橙＝塩基対を形成しなくなる2塩基の置換、マゼンタ＝塩基対を形成しなくなるような欠損を含む置換（図13）。

%ID	offset	0	1	2
	Human	GTTATTCAGGCCAAAAATGCCTGAATTAC		
86.7	Megabat	GTCATTCAGGCCAAAAATCACTGAATTAC		
86.5	Tenrec	GTCATTCAGGCCAAAAATCCTTGAATTAC		
85.5	GuineaPig	ATTATTCAGGCCAAACATGCTGAATTAC		
85.1	Sloth	GTTATTCAGGCTGAAAATGACT--ATTAC		
	SS anno((((((.....)))))).....		
	pair symbol	abcde		edcba

図13. 比較ゲノムアラインメントと塩基対との関係を示す図。置換の種類によって色分けして表示する。

秘匿トラック情報機能は、ゲノムブラウザにユーザー認証機能を組み込むことによって、ユーザーごとにアクセスできる情報を制御することが可能になる。主には、共同研究に際して、共有したいが公開したくない情報をゲノムブラウザ上で取り扱うのに適している。

ゲノムブラウザには、カスタムトラックというユーザー独自のトラックを追加する機能があるが、これでは大規模な情報の取り扱いが難しい。また、公開サーバーを使わずに、非公開のサーバーに情報を格納し、VPNなどセキュアなネットワーク技術を使って情報共有する方法では、共同研究の数だけサーバーを立ち上げなければならない、その維持・管理の手間を考えると、複数の共同研究を同時に進行させるのは非現実的である。

表7. RNA 配列のマッピング結果と予測 RNA 情報のトラック (ヒト)

種別	内容	個数
分類済 RNA	tRNA, snoRNA, rRNA, snRNA, その他	6,652
予測 RNA	RNAz, EvoFold, snoSeeker, QRNA, intronic ncRNA, アンチセンス RNA, 機能解析グループの候補	270,800

表8. マイクロ RNA 関連のトラック (ヒト)

種別	内容	個数
既知 miRNA	miRBase	1,244
既知標的遺伝子	TarBase	233
予測 miRNA	miRRim, RNAmicro, Li2006, miRNAMap, Berezikov	11,616
予測標的部位	RNAhybrid, PicTar, miRBase Target, T-ScanS, PITA	2,384,525
miRNA 発現情報	Mammalian miRNA Expression Atlas	992

表9. 様々なゲノム因子のトラック (ヒト)

種別	内容	個数
進化的保存域	indel-based conservation, ultra-conserved, transposon-free	604,829
ヒストン修飾	H3K4me3	57,655
エンハンサー	Enhancer candidates, Tissue-specific enhancer candidates	7,748
cis 制御因子予測	Putative transcriptional cis-regulatory modules (PReMod)	123,510
核膜結合ドメイン	Lamina associated domains	1,344
スプライス部位予測	Predicted splice sites	1,058,924

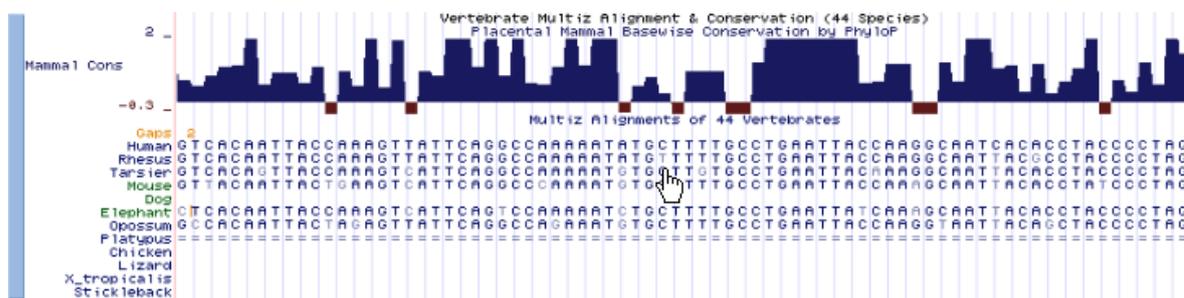


図 1 4. 比較ゲノムのトラックをクリックすると二次構造予測画面へ遷移する

RNA Secondary Structure Prediction

This view presents a result of evolutionary conserved RNA secondary structure predicted with **RNAalifold** from the corresponding multiple alignment. The result is computed and presented automatically on any region shorter than 500 bp whenever the corresponding region has potential RNA secondary structure. However, this does not mean that there is certainly conserved RNA secondary structure. This feature is aiming to provide supportive information for functional RNA analysis.

Highlighting compensatory mutations in RNA multiple alignments

- Gray: Not part of annotated pair, no substitution.
- Light purple: Not part of annotated pair, substitution.
- Black: Compatible with annotated pair, no substitutions.
- Blue: Compatible with annotated pair, single substitution.
- Green: Compatible with annotated pair, double substitution.
- Red: Not compatible with annotated pair.
- Orange: Not compatible with annotated pair, double substitution.
- Magenta: Not compatible with annotated pair, involves gap.

strand	minimum free energy (kcal/mol)	# of pairs, no substitutions
forward	-89.54	68
reverse	-94.84	77

Multiple alignment and RNA 2ndary structure (forward strand)

```

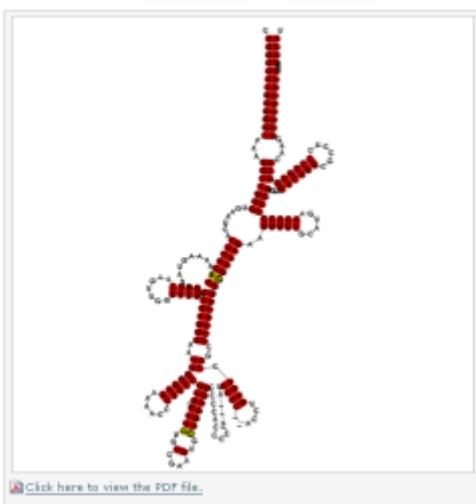
>ID offset 0 1 2 3 4 5 6
Human CTGGGAAAGGGGCAAGGCAAGGTTAAATCACTTTCTTAAAAAATATAAGCTCAAAGTGGAGTCCAGAGG
97.4 Chimp CTGGGAAAGGGGCAAGGCAAGGTTAAATCACTTTCTTAAAAAATATAAGCTCAAAGTGGAGTCCAGAGG
96.9 Gorilla CTGGGAAAGGGGCAAGGCAAGGTTAAATCACTTTCTTAAAAAATATAAGCTCAAAGTGGAGTCCAGAGG
SE anno .-(((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((
pair symbol abcdefghijklm nopqrst uvwxyz ABCDE EDCR DCBFG

offset 7 8 9 0 1 2 3
Human GAATGGGASAAAACCCTCCCGCTCCTGTCGTGGAAGTGTAGGAGCCGCCACCCCHAACTACTCHACTH
Chimp GAATGGGASAAAACCCTCCCGCTCCTGTCGTGGAAGTGTAGGAGCCGCCACCCCHAACTACTC--ACC
Gorilla GAATGGGASAAAACCCTCCCGCTCCTGTCGTGGAAGTGTAGGAGCCGCCACCCCHAACTACTC--ACC
SE anno C.-((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((
pair symbol H IJKLMNO ONHJIKLM NOPQ R R QPQNHKLM KLMN

offset 4 5 6 7 8 9 0
Human TGAATCCAGCCCTCTGGGAAAGGAGGGGGTGCATGAACTCCGCCCTAGTCACAGGGGCTCCCTGTGGC
Chimp TGAATCCAGCCCTCTGGGAAAGGAGGGGGTGCATGAACTCCGCCCTAGTCACAGGGGCTCCCTGTGGC
Gorilla TGAATCCAGCCCTCTGGGAAAGGAGGGGGTGCATGAACTCCGCCCTAGTCACAGGGGCTCCCTGTGGC
SE anno -)))--)))))(((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((
pair symbol MNR OI HGFEDCBAxyzwv uvwxyz yzvwxtsq qrstuv tutsrqp

offset 1 2 3
Human CCAAGGCCCTCTTCACTCCAT
Chimp CCAAGGCCCTCTTCACTCCAC
Gorilla CCAAGGCCCTCTTCACTCCAT
SE anno 1....)))))(((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((
pair symbol n mkljshgfe dcba
    
```

view the alignment in [Stockholm format](#) or [ClustalW format](#).



[Click here to view the PDF file.](#)

図 1 5 . 動的二次構造予測結果の表示画面 + / - の両側のストランドにおける二次構造を予測する。各ストランドで予測された塩基対の数と最小自由エネルギー (MFE) が示されるので、どちらのストランドでより安定な二次構造が形成されるかを判断する材料を提供する。

2. 1. 3. 5. ヒト RNA 編集領域の網羅的解析

東京大学鈴木研究室（ツール開発 Gr）との共同研究により、RNA 転写産物から、アデニンがイノシン酸になる RNA 編集（イノシン酸はシークエンサーによってグアニンとして観測される）が観測される部位をゲノムワイドに計測し、RNA 編集の機能についてマイクロ RNA との相互作用の側面から情報学的な検証を行った。

鈴木研究室では、ヒトの培養細胞を用いて、RNA 転写産物から RNA 編集が生じている部位を網羅的に測定した。測定結果を機能性 RNA データベースに登録し、RNA 編集がマイクロ RNA の標的領域としてどのような影響を与えるかを情報学的に検定するため、マイクロ RNA 標的予測プログラムである Miranda を用いて、RNA 編集部位が関与するマイクロ RNA 標的 部位を網羅的に列挙した。エディティングがある場合とない場合とで、マイクロ RNA 結合エネルギーの変化量を網羅的に予測した。予測に際しては、イノシン酸をグアニンとして扱った。後にイノシン酸をグアニンとして扱うと、結合エネルギーの計算において不正確となる問題が判明したため、現在イノシン酸に対応するエネルギーパラメータを用いて結合エネルギーの再評価を行っている最中である。

測定情報を東大本郷キャンパスから機能性 RNA データベースにオンラインでアップロードすると直ちに機能性 RNA ゲノムブラウザで閲覧できるような機能を開発した（図 1 6）。アップロードと閲覧にはあらかじめ登録したユーザー名とパスワードが必要となっており、セキュリティにも配慮した設計になっている。

マイクロ RNA の標的部位に対する影響の評価は現在も継続中である。



図 1 6. RNA 編集情報のアップロード画面

2. 1. 3. 6. 自動アノテーションシステムの開発

次世代シークエンサーによる大規模な転写産物 (RNA) の解析に対応するため、機能性 RNA データベースを応用した、自動アノテーションシステムの開発を行った (未発表)。これは、次世代シークエンサーから出力された配列情報をインターネット経由でアップロードすると、人手を介在させずに自動的にゲノムへマッピングし、アノテーションを付与するシステムである。マッピングやアノテーションの処理は、4-2. や 4-3. で実施した手順

を踏襲・改良したものである。

プロジェクト終了までにプロジェクト内で公開することを目指したが、平成22年2月末の時点でグループ内における試験運用段階にある。

図17に、自動アノテーションシステムの現時点のウェブ・インタフェース画面を示す。

図17. 自動アノテーションシステムの画面。「Sequence file」にシークエンサーからの配列ファイル名を指定し、ファイルの形式（fasta, fastq 形式に対応）を選択し、生物種を指定し、「Next」をクリックすると、ファイルがアップロードされ、アノテーションのバッチ処理が実行される。

2. 1. 3. 7. まとめ

機能性RNAデータベースの構築では、新規機能性RNAの探索と解析を支える強力な情報基盤となるデータベースを構築することを課題として実施した。プロジェクト完了後にデータベースが使えるようになるのでは無く、プロジェクト期間内に迅速にデータベースを構築し、有効に活用されることを意識した。さらに、プロジェクト完了後には、本プロジェクトの成果を発信する役割に加え、データベースが広く産業利用されうるような幅広い要求に応えられるものを提供するよう意識したことから、初期の研究に対応したバージョン1、中期～後期の研究に対応したバージョン3、プロジェクト終了後の産業利用を意識した「自動アノテーションシステム」と、大きく3つの開発フェーズを経ることとなった。我々は、単にデータベースの構築のみに終始するのではなく、データベースを利用した様々な情報解析も実施することで、実際の研究に役立つ情報ツールとしてのデータベースの構築を実践した。それによって、グループ間の連携を促進し、プロジェクト全体研究推進に直接的に貢献することができたと自負している。

2. 2 研究開発項目② 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

【成果の概要】

機能性 RNA 研究を強力に推進していくためには、新しい技術論・方法論の導入が求められている。本研究開発項目では、機能性 RNA を迅速かつ定量的に、そして網羅的に解析できる支援技術・ツール開発を行う。特に、発生や分化、疾患により変動する RNA を解析するため、測定感度を極限まで高めることで、細胞から抽出した微量な機能性 RNA を直接、測定する技術・手法を開発する。中間目標として、機能性 RNA を網羅的にかつ定量的に解析できるバイオツールの開発を目指し、平成 21 年度の最終目標としてサブフェムトモルオーダーでの直接解析を掲げた。

RNA マススペクトロメトリー (RNA-MS) の開発では、生体から抽出した微量な機能性 RNA を高感度質量分析法によって直接解析することを目指している。転写後プロセシングや修飾など、RNA が有する質的な情報を正確に読み取ることによって、RNA が関与する高次生命現象の解明や疾患との関連性を明らかにしていくことを主眼としている。プロジェクト開始 2 年目には、RNA-MS による高感度測定系の構築に成功し、最終目標値であったサブフェムトモルオーダーでの直接解析をクリアした。この成果が高く評価され、平成 19 年度には加速予算を投入いただき、本開発テーマの進展を加速させることができた。また、RNA-MS を支えるための周辺ツールとして、RNA-MS によって得られる膨大な質量情報を情報処理するためのアルゴリズムやソフトウェアの開発にも成功し、知財戦略の面でも優位に立った。さらに、世界初の全自動 RNA 精製装置 (往復循環クロマトグラフィー) の開発に成功し、細胞内に存在する微量な RNA の解析技術が飛躍的に向上した。RNA-MS は今や、機能性 RNA 研究のみならず、創薬や核酸医薬の開発を強力にサポートする基盤技術に成長した。これらの手法を駆使し、piRNA の末端修飾構造の同定や miRNA の直接プロファイリングなど、これまでの手法では不可能であった解析に成功している。

RNA 医薬品の開発を目的とした RNA の新規合成基盤技術開発では、高品質かつ安価な RNA の化学合成技術を確立することに成功した。実際に、この手法により、長鎖 RNA (110 塩基) の化学合成に成功し、生物活性を確認することができた。高品質かつ安価な合成 RNA を供給するシステムが整いつつあり、実用化と事業化に大きく前進した。

機能性 RNA の検出・同定技術の開発では、超高感度 (アトモルレベル) まで高めたマイクロアレイ技術を開発し、機能性 RNA の高精度な発現変動解析を目標としている。日本発でオリジナリティの高い多重伸長反応法および光クロスリンク法を駆使した RNA の高感度検出法を開発した。

【研究開発方針】

機能性 RNA 研究を強力に推進していくためには、新しい技術論・方法論の導入が求められている。本研究開発項目では、機能性 RNA を迅速かつ定量的に、そして網羅的に解析できる支援技術・ツール開発を行う。特に、発生や分化、疾患により変動する RNA を解析するため、測定感度を極限まで高めることで、細胞から抽出した微量な機能性 RNA を直接、測定する技術・手法を開発する。最終目標として、機能性 RNA を高感度(サブフェムトモルオーダー)で定量的かつ直接測定する手法の開発を掲げた。機能性 RNA の検出・同定技術の開発では、東京大学と島津製作所が担当する RNA マススペクトロメトリー (RNA-MS) は、生体から抽出した微量な機能性 RNA を高感度質量分析法によって直接解析する技術である。この手法では、微量な RNA を cDNA 化や標識をせずに生のまま解析することができる。細胞や組織から単離あるいは分画した微量な RNA をそのまま、あるいは断片化し、高感度質量分析法 (MS) により RNA 断片の質量を精確に測定することで、各断片に存在する RNA 修飾や末端構造の詳細な解析が可能となる。RNA が有する質的な情報を正確に読み取ることによって、RNA が関与する高次生命現象の解明や疾患との関連性を明らかにしていくことが期待される。また、miRNA を直接的に解析することによる診断技術の開発や、核酸医薬の薬物動態にも応用することが期待される。

オリンパス、北陸先端大は光クロスリンク法を RNA の検出に応用し、超高感度(アトモルレベル)まで高めたマイクロアレイ技術を開発する。さらに、武庫川女子大と DNA チップ研究所のグループは全く新しい発想に基づく多重伸長反応法 (MPEX 法) の開発に取り組み、実用的なマイクロ RNA のプロファイリング技術の確立を目標とする。

RNA 医薬品の開発において、日本が優位に立つために、高品質な RNA の化学合成技術が不可欠である。日本新薬と東京大学のグループは、革新的な核酸合成の技術を駆使し、実用的な RNA 合成法の確立と事業化を目標とする。

【各研究室における成果】

2. 2. 1 RNA マススペクトロメトリー法の開発

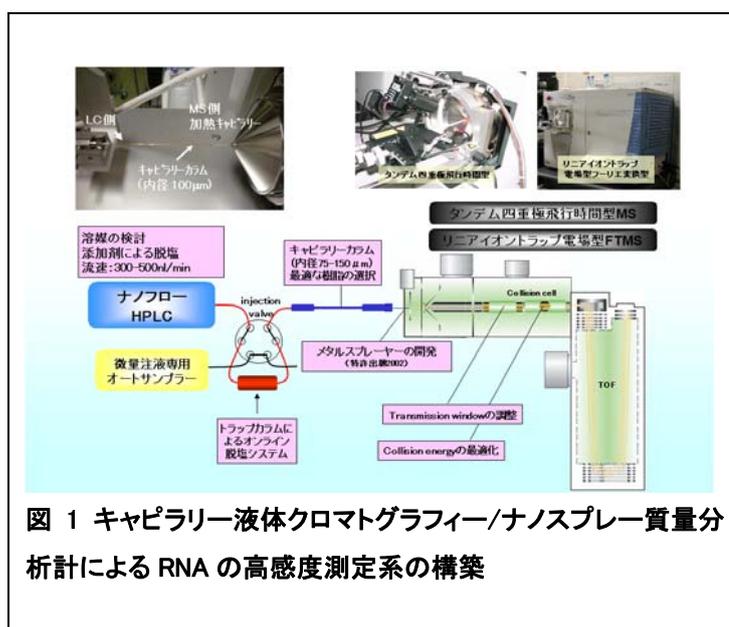
集中研②、分室4（島津製作所）

共同実施先： 東京大学（2；鈴木）

本研究開発項目では、RNA を“情報”として捉える従来型の解析方法から脱却し、RNA 分子を“もの”として捉える新しい方法論として、微量な機能性 RNA を直接的かつ定量的に解析する RNA マススペクトロメトリー（RNA-MS）の開発を行っている。通常、微量な RNA の解析法としては、逆転写と PCR を組み合わせた cDNA の解析が一般的であるが、ランダムプライミングやリンカーライゲーションの効率や PCR 増幅による cDNA のバイアスが生じるため、定量性に欠けるなどの問題点が指摘されている。さらに、末端構造や塩基修飾など、機能性 RNA が有する質的な情報を読み取ることができないという本質的な欠点がある。また、クローニングやシーケンスを含めると解析にかかる時間も考慮に入れなければならない。RNA-MS は、細胞及び組織より調製した微量な RNA を直接解析することができる。電気泳動や免疫沈降法によって単離あるいは分画した RNA を断片化し、高感度質量分析法によって解析することによって、断片の質量を正確に測定することができるため、各断片に存在する RNA 修飾の解析や、末端構造の詳細な解析が可能である。さらに、各 RNA 断片の分子量を正確に測定することで、シーケンス解析をすることなく、in silico 解析によって RNA 遺伝子の配列をゲノム上から迅速に同定すること（RNA マスフィンガープリント）も可能である。本基盤技術の開発は、RNA が関与する高次生命現象の解明や疾患との関連性を明らかにしていくことのみならず、将来的な RNA 創薬や再生医療、あるいは RNA を分子マーカーとした新しい診断技術へと応用が期待される。

2. 2. 1. 1. キャピラリー液体クロマトグラフィー/ナノスプレー質量分析計による RNA-MS の構築

当初、我々はプロジェクトの最終目標値として、数フェムtomolオーダーでの RNA の微量解析を掲げた。プロジェクト開始前の測定感度が数ピコmolであったことから、測定感度を3桁向上させることを目指したものである。平成17年度には、タンデム四重極飛行時間型質量分析装置の測定パラメータの最適化、キャピラリーナノフロー液体クロマトグラフィーシ



システムの構築（図 1）、トラップカラムを用いたオンライン脱塩システムの構築、溶離液と分離樹脂の検討、イオン源の最適化などを徹底的に行い、その結果、内径 75-150 μ m のキャピラリーカラムを用いて、流速 300-500nL/min で送液を行うことで、1-5 フェモトモルの RNA を高感度で測定することに成功しプロジェクトの最終目標値を 1 年目にしてクリアするに至った。

平成 18 年度は、更なる高感度化を目指し、解析システムの微調整と条件設定を重点的にを行い、更にはキレート剤添加によるサンプルの前処理技術の検討を行い、50 アトモル(0.05 フェモトモル)の測定感度を達成した（図 2）。この成果は RNA を増幅や標識をすることなく、直接的に測定することに成功した世界記録であり、PCR やハイブリダイゼーションに頼らない全く新しい解析技術 RNA-MS が誕生したことを意味している。加速財源の獲得にも成功し、質量精度の高い電場式フーリエ変換型質量分析装置(Orbitrap)を導入し、miRNA の直接解析などに活路を見出した。

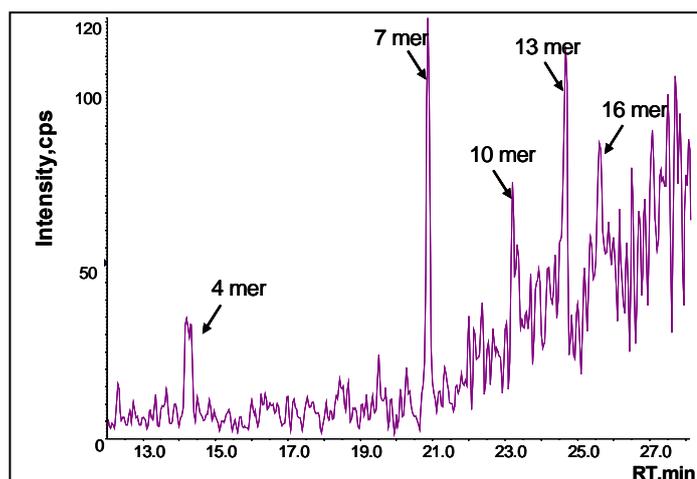


図 2 50 アトモルの世界最高感度を達成した

また RNA-MS 解析の膨大なデータを情報処理するためのツール開発を積極的に行った。RNA-MS デコンボリューション（著作物登録）（図 3）は、RNA の多価イオンを読み取り変換し、質量情報を算出するプログラムである。測定データを XML 形式に変換し、天然同位体分布を考慮した MS スペクトルのフィッティングと多価イオンをデコンボリューションすることにより、各 RNA 分子の質量を算出することを基本原理とする。また、RNA-MS

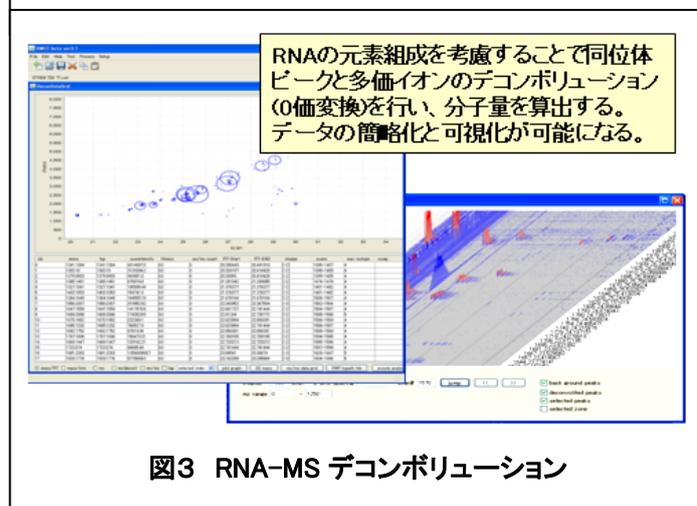


図3 RNA-MS デコンボリューション

による *de novo* シーケンスを強力にサポートする CID チェッカー（国際出願済）や、質量情報のみから計算科学的に RNA 遺伝子をゲノム上から同定する RNA マスフィンガープリント法（出願済）などを開発し、知的財産の戦略面でも優位に立っている。

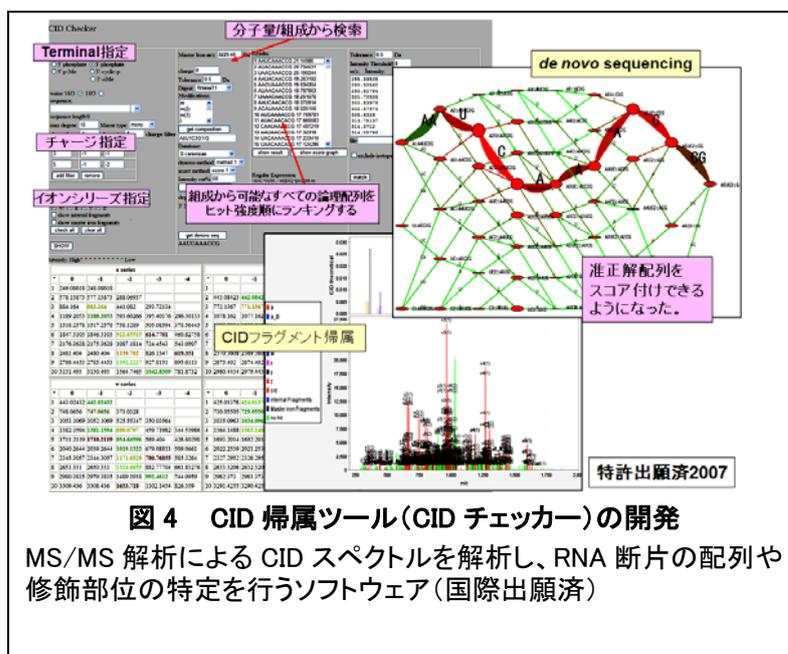
我々は RNA-MS を機能性 RNA の解析に積極的に活用している。機能未知遺伝子群から網羅的に RNA 修飾遺伝子を探索するアプローチ(リボヌクレオーム解析)や、RNA 修飾異常に起因する疾患の研究、RNA 修飾が決定する tRNA の細胞内局在化機構、ncRNA に含まれる RNA 修

飾の同定などは RNA マススペクトロメトリーの長所を生かした研究例である(業績参照)。特筆すべき成果として、マウス精巢に発現している Piwi- interacting RNA(piRNA)の3'末端が、ほぼ 100%修飾されていることを発見した(*Nat Struct Mol Biol.*, 2007)ことや、肝臓特異的に発現する miR-122 の 3' 末端がアデニル化されることで選択的に安定化される機構を見出した(*Genes Dev.*, 2009)ことなどが挙げられる。また、アーキアの tRNA から新規 RNA 修飾、アグマチジン(2-agmatinylcytidine)を発見し、生合成機構および機能解析に成功した(*Nat Chem Bio.*, 2010)。

2. 2. 1. 2. RNA-MS による配列解析技術と RNA マスフィンガープリント(RMF)法の開発

イオン化した RNA 分子は質量分析装置内で希ガスと衝突させることにより、解裂させることができる(CID=collision-induced dissociation)。CIDによって得られた内部配列に由来するプロダクトイオンを帰属することで、RNAの配列を de novo で決定することが可能である。通常、RNAの多価イオンから生じたプロダクトイオンは非常に複雑であり、人が目で見て解釈するのは困難を極める。そこで我々はCIDスペクトルを帰属するためのツールとして、CIDチェッカーを開発した(図4)。このアルゴリズムでは、塩基配列を探索するための有向グラフを作成し、有向グラフ上のノードとエッジを質量スペクトルに基づいて重み付けし、動的計画法を適応して、有向グラフ上の最適経路をたどることで塩基配列を解析している。さらに、RNA修飾を含んだ断片を解析することで修飾部位の特定にも威力を発揮する。

RNA マスフィンガープリント(RMF)法は RNA-MS で取得した質量情報を用い、RNA がコードされている遺伝子領域をゲノム上から in silico で探索するアルゴリズムである。RNA 断片の分子量特性を詳細に検討した結果、個々の RNA 断片の分子量はユニークな値を示すことが判明し、0.2 ダルトン以下の質量精度で測定すれば、個々の RNA 断片の塩基組成を一義的に決定できることが判明した。この知見を元に、我々は、RNA 断片の質量をクエリーとしてゲノム配列の表裏からその RNA をコードする領域を in silico で探索するアルゴリズム



(Genomic RMF)を開発した(図5)(特許出願済)。大腸菌、酵母に加えて、ヒトとマウスのゲノムから検索可能な Genomic RMF を開発し、実際にヒトとマウスの ncRNA の解析データを用いて、ゲノムの表裏(6 Gbp)上から遺伝子を特定することに成功している。また、CID チェッカーと組み合わせることにより、部分的に決定された配列情報を元に RNA 遺伝子の同定精度を飛躍的に向上させることが可能である。

RMF 法は、RNA の増幅や標識をすることなく、生の RNA を直接的に解析し、迅速に遺伝子領域を特定

することができる。この手法のアプリケーションとしては、RNA-タンパク質複合体(RNP)中に含まれる RNA 成分の同定が挙げられる。機能未知な RNA 結合タンパク質を免疫沈降法で精製し、結合している RNA を迅速に同定することで、新規の RNA-タンパク質の相互作用を明らかにすることができる。また、これまでによく調べられている RNP を解析することで、既知の RNA 以外に未知の RNA が見つかる可能性も大いに期待できる。実際に出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の発現ライブラリーを用い、いくつかの RNP の解析を行い、実際に RNA 遺伝子が同定できることを確認した。また、産総研で整備されたヒトの完全長 cDNA を用いて、機能未知な RNA 結合タンパク質をヒト培養細胞で発現させ、結合した RNA 成分の同定にも成功している。MS 解析から Genomic RMF による遺伝子の特定にかかる時間はわずか1時間程度であり、この手法は網羅的な RNA-タンパク質の相互作用ネットワークの解析に威力を発揮することが期待される。RNP の精製には、後述する往復循環クロマトグラフィーを用いることにより、多検体 RNP をハイスループットに精製し、網羅的な解析システムを構築していきたいと考えている。

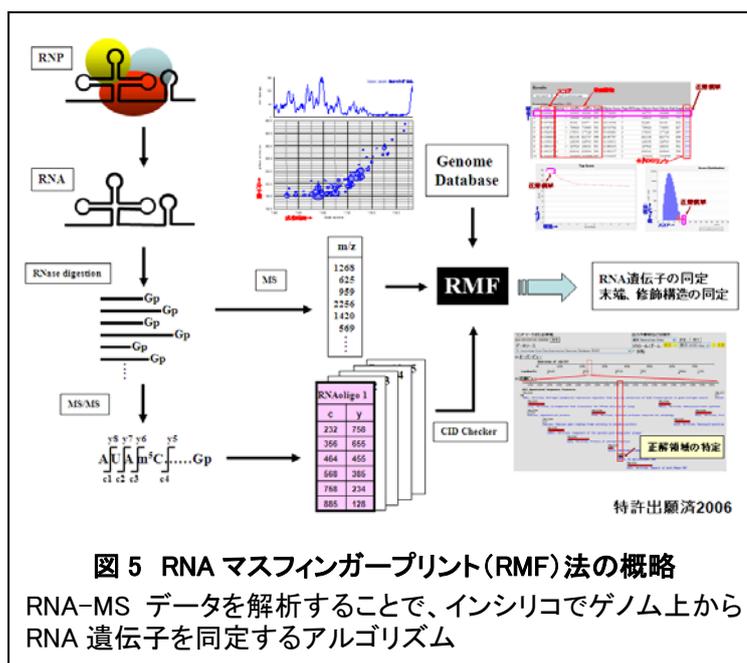


図5 RNA マスフィンガープリント(RMF)法の概略

RNA-MS データを解析することで、インシリコでゲノム上から RNA 遺伝子を同定するアルゴリズム

2. 2. 1. 3. マイクロ RNA の直接解析系の構築

miRNA の検出には、数多くの方法が開発されているが、定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) 法やマイクロアレイを用いた手法が主流になりつつある。最近では、次世代シーケンサーによる低分子 RNA の大量解析がマイクロアレイに取って代わる手法になりつつある。これらの手法は miRNA の網羅的な発現プロファイルを解析する手段としては実用的ではあるものの、逆転写酵素による cDNA への変換や、PCR による増幅、蛍光標識による増感といった間接的な検出方法に頼っているのが現状であり、これらの過程で生じるバイアスは定量解析

を行う上で決して無視できない問題である。また、cDNA 化や標識などの作業にかかる労力や時間も考慮に入れなければならない。さらに、miRNA には多くのプロセシングバリエーションが存在することが知られており、バリエーションごとに標的 mRNA が変化する可能性があることから、miRNA をバリエーションごとに分離して検出する必要がある。しかし、従来法では 1 塩基の違いのバリエーションを区別して検出するのが難しいという問題もある。我々は、従来法では解決することが困難な問題点を克服するために、RNA-MS を用いて miRNA を直接解析する系の構築を目指した。

miRNA は 6000-8000Da の分子量分布を有し、nanoESI 法でイオン化すると、マスペクトル上では、通常、7~10 価程度の多価イオンとして検出される。また、この程度の大きさの分子量になると個々のマスペクトルが天然同位体（主に ^{13}C ）に由来する複雑な同位体イオンによって占められており、これらの複雑なスペクトルを解読し、元の分子量を算出する必要がある。市販のプログラムでは RNA のスペクトルに対応していないため、独自に開発した RNA デコンボリューション（東大著作物）を用い、スペクトルから分子量を算出（0 価へ変換する）ことができるようになった。こうして得られた分子量は、通常は（修飾がなければ）、RNA の 4 つの塩基の組み合わせで計算することができるため、miRBase に登録されている miRNA の分子量と突合せを行うことで候補を割り出すことが可能である。更に、同じ塩基組成の miRNA を区別するためには、イオン化した RNA を CID によって分解し、生じたプロダクトイオンを CID チェッカー（国際出願）によって読み取ることによって、RNA の内部配列を決めることが可能である。

実際に、マウス臓器由来の miRNA について解析を行った。肝臓、脳、心臓から Total RNA を抽出し、定法にしたがって miRNA 画分を得た。約 3 pmol 分（肝臓の約 80mg に相当）の miRNA 画分を RNA-MS によって解析を行った。測定データは RNA デコンボリューションによりモノアイソトピック質量に変換した。また、いくつかの miRNA は CID 解析により部分配列を得た。各臓器から 100~200 個のピークが観測され、各分子量および CID によって得られた部分配列を、miRBase に登録されたマウス miRNA に対し参照した。各 miRNA にはプロセシングの位置が異なる両末端のバリエーションや、3' 末端に A や U が酵素的に付加されたバリエーションが存在するため、登録されている個々の miRNA ごとに末端バリエーションを考慮し検索を行った。その結果、RNA-MS で観測された miRNA 集団の中には、データベースに登録されていないバリエーションが多数含まれることが判明した。また、臓器ごとに特異的な miRNA が発現していることも確認された。また、分子量および CID のみから判定した miRNA の帰属が正しいかどうかを、検証するために、RNA-MS で解析に用いた miRNA 画分をディープシーケンスによって解析を行った。その結果、RNA-MS で帰属した全ての miRNA（バリエーションを含む）を確認したことから、本手法が信頼性の高い技術であることを示すことができた。

RNA-MS 解析によって観測された miRNA の各ピークの高さは、miRNA の存在量を反映しているが、マスペクトルのピーク強度は、各分子のイオン化効率や同時にイオン化される他の分子の影響を受けるため、ピーク強度から単純に存在量を算出することはできない。

一般的にマスマスペクトロメトリーによる定量解析では、 ^{15}N や ^{13}C などの安定同位体で標識した標品を内部標準物質として定量する手法が用いられている。実際に、プロテオミクス研究においては、SILAC 法や iTRAQ 法などに代表される安定同位体標識を利用したタンパク質の発現定量が盛んに行われている。RNA-MS においても、安定同位体標識した RNA を用いることで各ピークの定量解析が可能である。実際に、マウス肝臓で高発現している miR-122 の 4 種類のバリエーションに対する安定同位体 RNA を合成し、適当量を内部標準として、肝臓由来 miRNA 画分に混合して測定を行った。安定同位体 RNA は天然の RNA とその化学構造が同一であり、キャピラリー LC から同時に溶出されてくるため、イオン化の効率が完全に同じである。マスマスペクトル上では分子量が異なるためにそのピーク強度比から、天然 RNA の絶対量を見積もることが可能である。実際に、miR-122 の 4 種類のバリエーションの定常状態量を高い精度で測定することに成功している。通常、RNA の発現定量は、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) 法などに代表されるような相対定量法が主流であるが、安定同位体 RNA を内部標準として用いる方法は、分析化学の分野で用いられる精度と信頼性の高い絶対定量法である。このような定量法は、特に疾患などで発現量や定常状態量が変動する miRNA の解析に威力を発揮すると期待している。

ここ数年、固形癌や白血病をはじめとする様々な疾患で miRNA の発現変動が報告されている。また、血漿中に存在するエクソソーム (exosome) に miRNA が内包されており、細胞がエクソソームを介して、転移や細胞増殖に関わる情報をやり取りしている可能性が指摘されている。エクソソーム中に含まれる miRNA を調べることで、診断のみならず癌細胞の種類なども特定できる可能性があると考えられている。miRNA は細胞分化の指標であり、miRNA を定量的にプロファイリングすることで、様々な疾患の診断マーカーとして活用できると期待される。我々は、現在 RNA-MS を用いてヒト血清に含まれる miRNA のプロファイリング技術の確立を目指している。

2. 2. 1. 4. MALDI 型質量分析計による RNA の高感度測定系の構築

MALDI 型質量分析計は、操作が簡便で測定も迅速に行えることから、複雑な混合物の中から、特定の分子マーカーを検出したり、全体のプロファイリングを取得する測定系に適している。微量な RNA を MALDI 法でイオン化し、高感度で測定するためには、RNA を高効率でイオン化するためのマトリクスの開発が不可欠であった。従来オリゴ核酸はプロトンが付加された正イオンとして検出されてきたが、我々は、RNA が酸性分子であることの特性を生かし、RNA を負イオンとして検出することを指標にしてマトリクスを探索した。その結果、3-Hydroxypicolinic acid (3-HPA) に添加剤として Ammonium citrate dibasic (DAC) を用いた系で最適なマトリクスを見出し、数フェムトモルオーダーの RNA をイオン化することに成功した (特許出願済、島津で製品化の予定)。特に、MALDI 法では出にくいことが知られている、 -2 価のイオンを検出することに成功し、より高質量側での測定に活路を見出すことができた。

この手法を用い、マウス臓器由来のマイクロ RNA 画分を測定したところ、分子量 7000Da 付近に個々のマイクロ RNA 由来のシグナルが多数観測された (図 6)。正確な分子量と CID 解析の結果、個々のシグナルを各 miRNA 分子に帰属することに成功した。臓器ごとに発現している miRNA のサブセットは異なるパターンを示し、マイクロアレイや cDNA クローニングで文献的に報告されているデータとよい一致を示した。検出限界を測定したところ、臓器 2mg 由来の miRNA 画分 (43 fmol) でいくつかのメジャーな miRNA を検出できた。また、検量線を用いることで、個々の miRNA を定量的に解析することができる。この方法が実用化されれば、生検サンプルや摘出した臓器由来の miRNA 画分を迅速にかつ定量的に測定することができるため具体的な診断技術として確立できる可能性が高い。

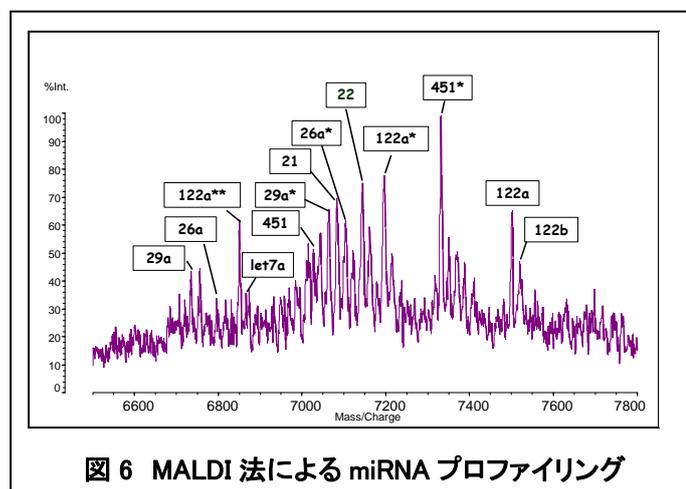


図 6 MALDI 法による miRNA プロファイリング

2. 2. 1. 5. 往復循環クロマトグラフィーを用いた全自動 RNA 精製装置の開発

微量な RNA 分子の単離精製は一般的に困難を極め、経験値やノウハウに左右される難易度の高い技術である。我々は長年 RNA 研究に携わってきた経験から、細胞内に存在する微量 RNA を単離精製する技術を開発してきた。往復循環クロマトグラフィー (*Nucleic Acids Res.*, 2007) (国際特許出願済) は全く新しい発想から生まれた多検体アフィニティークロマトグラフィーである (図 7)。マルチピペッターが搭載された自動分注機を用い、並列に並べたアフィニティーチップで同時に吸引、吐出、攪拌を繰り返すことで、全ての試料溶液を全てのアフィニティーチップに均一に循環させることを基本原理としている。異なる標的分子に対する複数のアフィニティーチップ (RNA の精製には DNA 固相化樹脂) をマルチピペッターに装着することで、試料溶液を同時に複数のアフィニティーチップに導入することが可能である。また、吸引と吐出後に試料溶液を攪拌させることで、原理的に吸引吐出量の数十倍の試料溶液からの精製が可能となる。またアフィニティーチップの作成が容易である点、吸着、洗浄、溶出の全工程の自動化が可能で

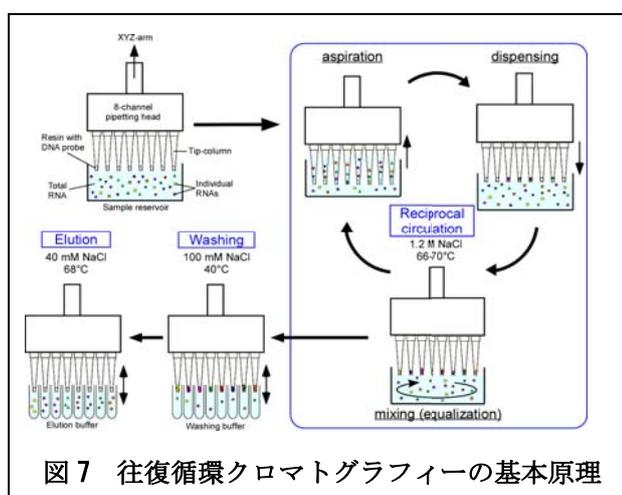


図 7 往復循環クロマトグラフィーの基本原則

ある点が特に優れている。さらに、マルチピペッターの本数を増やすことで同時に精製する検体数の拡張が容易である点が挙げられる。すでに我々は、8 検体用自動分注機をベースとし、DNA 固相化樹脂を詰めたチップカラムを用いることにより、全自動 RNA 精製装置の試作機を完成させている (図 8)。モデルを立て往復循環クロマトグラフィーの理論式を構築したところ、カラムに固相化したリガンド(DNA や抗体)と標的分子 (RNA やタンパク質) とのアフィニティー(平衡定数)により、

最終的な収率と十分な精製に必要な往復循環の回数を見積もることが可能である。一度に吸引する量やチップカラムの本数などを変化させた場合でも必要回数などの算出が容易である。このモデルの妥当性はすでに実験的に確かめられている。本試作機を用い、パン酵母およびマウス肝臓由来の ncRNA を

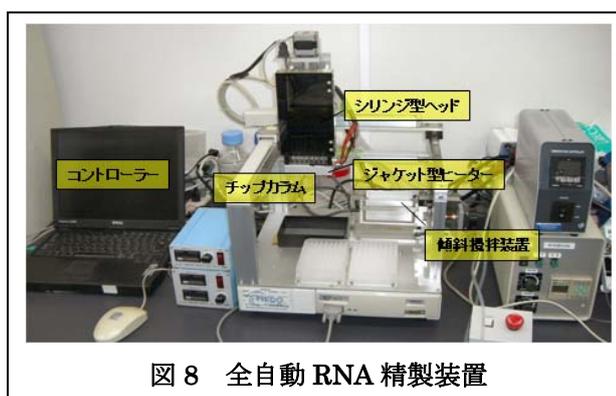


図 8 全自動 RNA 精製装置

全自動で単離することに成功している (図 9)。また、miRNA や mRNA の単離にも成功しており、本装置を用いることで細胞内に存在するほぼすべての RNA が精製可能であると考えて

いる。さらに、抗体を固定化したアフィニティーチップを用いることにより、全自動で多種類のタンパク質を同時に免疫沈降することにも成功しており、今後は本装置を用いて、様々な ncRNA を単離解析することで、RNA の機能発現に必要な修飾構造を決定したり、機能未知な RNA 結合タンパク質を精製し、結合している RNA を同定していきたいと考えている。

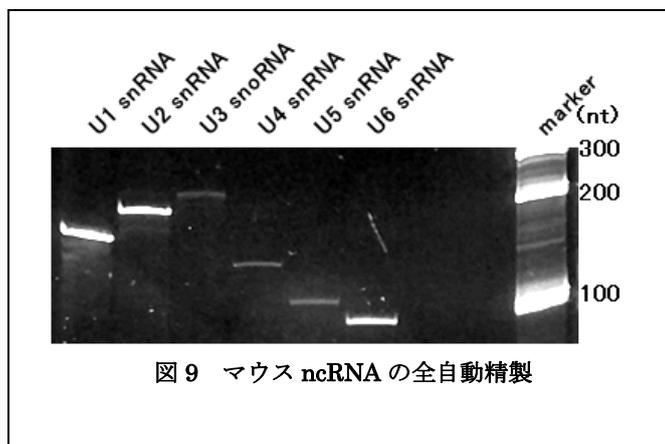


図 9 マウス ncRNA の全自動精製

現在、民間企業と世界初の全自動多検体アフィニティークロマト装置の商品化に向けた共同開発を行っている。

2. 2. 1. 6. ヒト脳トランスクリプトームにおけるイノシン修飾の網羅的同定

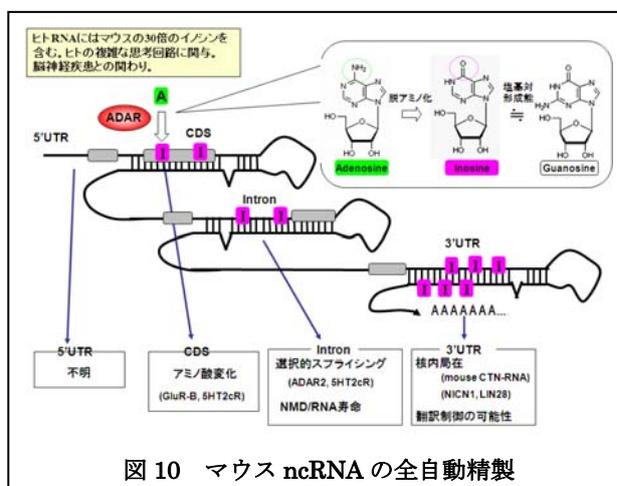
A-to-I RNA エディティングとは、二本鎖構造を形成した RNA 中のアデノシン(A)が脱アミノ化され、イノシン(I)へと修飾される機構である (図 10)。イノシンは化学構造上グアノシン(G)と類似しており、シトシン(C)との塩基対形成が可能である。そのため、イノシン化修飾により遺伝暗号や二次構造の変化が引き起こされる。この機構は二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ

(ADAR=adenosine deaminase acting on RNA)

により行われ、哺乳動物には ADAR1、ADAR2、

ADAR3 の 3 種類の酵素が存在する。ADAR1 ノックアウトマウスは胚性致死であり、発生段階で肝臓、心臓、椎骨などで異常なアポトーシスが観測される。特に肝臓では血球分化の際にインターフェロン応答が誘導され、アポトーシスが引き起こされることが知られている。この表現系から ADAR1 によるイノシン化修飾が発生や分化に関与していると考えられている。ヒト RNA にはマウス RNA の 30 倍ものイノシンが含まれていることが知られており、ヒトの複雑な思考や神経回路の形成に関わっていることが指摘されている。遺伝性対側性色素異常症 (DSH、Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria) の患者において ADAR1 のヘテロナンセンス及びミスセンス変異が発見されており、皮膚の色素斑/白斑、脳の石灰化、筋緊張異常や精神遅滞・機能低下等の症状が報告されている。グルタミン酸受容体のサブユニットである GluR-B の mRNA は ADAR2 の基質であり、エキソン 11 のグルタミンをコードする CAG コドン中の A がほぼ 100%の効率でイノシンに修飾され、アルギニンへとアミノ酸が変化する。このアミノ酸配列の変化がグルタミン酸受容体のカルシウム透過性をコントロールしているため、ADAR2 のノックアウトマウスではてんかん症状が起こり早期に死に至る。また、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の運動神経細胞では、この部位のエディティング効率が顕著に低下していることが発見されている。

イノシン化部位は逆転写反応で cDNA に変換すると G として読まれるため、見掛け上、A から G へ配列が編集される。イノシン化部位を同定するために、従来法では、同一組織または細胞由来のゲノムと RNA をそれぞれ PCR と逆転写 PCR で増幅し、配列を比較することでイノシン化部位を特定している。しかし、この手法では偽遺伝子に由来するシグナルや、シーケンスエラーやノイズなどと識別するのが困難であるなどの問題がある。我々はイノシン塩基特異的な化学修飾と逆転写反応を組み合わせた生化学的なイノシン化部位特定法である ICE (inosine chemical erasing) 法を開発した。化学修飾剤としてアクリロニトリルを用い、イノシン塩基の 1 位を特異的にシアノエチル化することで、逆転写による cDNA の伸長をイノシン化部位の手前で止めることができる。したがって化学修飾の処理と未処

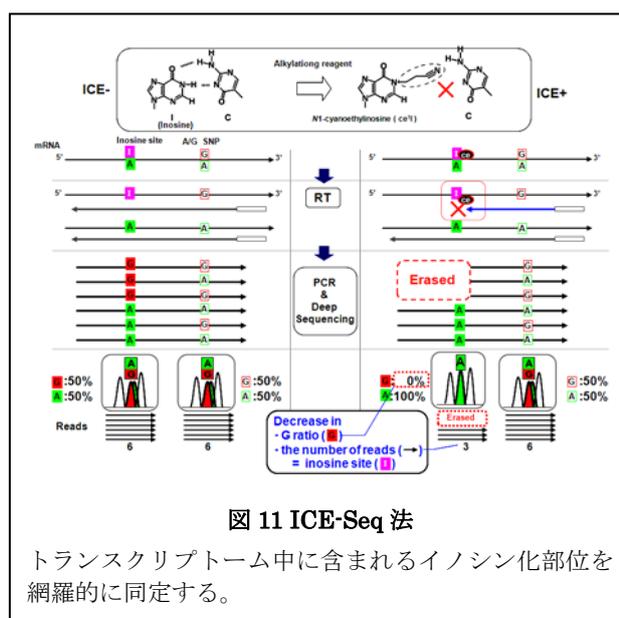


理で逆転写 PCR を行い cDNA を比較することで、イノシンに由来する G のシグナルを特異的に消失することが可能になる。この手法により、イノシン修飾を、アレル間の SNP やシーケンスエラーやノイズと明確に区別することができるようになった。また、ゲノムワイドなイノシン修飾の解析作業と同定部位の登録作業の効率化を図るため、各配列データのアライメント、イノシン化部位の正誤判定、イノシン化率の測定、データベースへの登録・閲覧を半自動的に行えるソフトウェア (ICE-CAFÉ) を開発した。

まずは、公開されている約500万のESTデータベースとヒトゲノム配列の比較から絞り込まれたA/G置換部位をA-to-Iエディティング候補部位とし、ICE法を用いたゲノムワイドな解析を行った。最終的に、約4,000領域の解析を実施し、約20,000箇所のイノシン化部位を特定した。解析した領域にはイスラエルのCompugenのグループが計算科学的な手法で予測したイノシン化部位が6,000箇所程度含まれていたが、このうちイノシンであることが確認できた箇所は3,800箇所程度(57%)に留まった。残りの4割強の箇所については、EST上で見られるSNPやシーケンスの間違い、あるいは我々が解析した個体では観測されないイノシン化部位であると考えられる。一方で全体の80%に相当する16,000箇所に関しては完全に新規部位であり、我々のICE法による同定手法の優位性が示されたことになる。同定された部位の多くはmRNAの長鎖3' UTR内に存在するAlu反復配列上に存在した。ESTデータベースや各mRNAについての報告から、これらmRNAにはバリエーションが存在し、イノシン化部位領域を全く含まない短鎖3' UTRを持つものとイノシン化部位領域を含む長鎖3' UTRをもつものが共存することが考えられる。

さらに網羅的にイノシン化部位を特定する手法として、ICE法と次世代シーケンサー (Genome analyzer, Solexa) を組み合わせた手法 (ICE-Seq) を考案した (図11)。

解析対象のRNAをイノシン特異的なシアノエチル化の処理 (ICE-) と未処理 (ICE+あるいはICE++) で調製し、cDNAを大量シーケンスを行い、全遺伝子に貼り付けた後で、ICE-の条件でA/G置換部位を検出する。イノシン化部位はシアノエチル化後 (ICE+あるいはICE++) でイノシンに由来するGのリードが特異的に減少するため、情報処理を行うことでイノシン化部位の検出が可能である。ヒト成人脳由来のポリA+RNAをシアノエチル化の処理と未処理で調製し、mRNA-Seqのプロトコルで約300塩基対のcDNAを合成した。Genome analyzerを用い、75塩基長のペア-エンドで最終的に27レ



グソフトウェアにBWA5.1を使用し、UCSC geneをリファレンス配列として各リードを貼り付けたところ、全体の約6割のリードを貼り付けることができた。結果として、ICE-が173億塩基、ICE+が156億塩基、ICE++（強条件）が171億塩基分のデータが得られた。遺伝子に貼り付けたリードの平均重複度が20X以上のものを解析対象とした。Gのリードの特異的な減少を指標にイノシン化部位を絞り込んだところ、現時点で約18,000箇所のイノシン化候補部位を絞り込むことに成功した。実際この中に、我々が先に特定したイノシン化部位が2,300箇所含まれていた。また、コーディング配列内には、約80か所のイノシン化部位が見出されたが、実際この中に、既報の19箇所が含まれていることから、ICE-Seqの同定精度の高さが窺える。最終的には、約30,000箇所の新規イノシン化部位を報告できる見込みである。

2. 2. 1. 7. まとめ

(1) 実施計画書記載の達成目標に対する到達度

RNA-MSの開発により、機能性RNAを高感度(サブフェムトモルオーダー)で定量的かつ直接測定する手法を開発する、という本プロジェクトの最終目標を十分に達成した。また、RNA-MSを実用化するために、試料の前処理システムや情報処理技術の開発にも成功し、国際特許の出願や著作物を登録しており、知財戦略の面でも優位な状況にある。

(2) 実用化・事業化の見通しについて

RNA-MSは機能性RNAの基礎研究のみならず、核酸医薬の品質管理や薬物動態にも十分に応用可能な技術として応用可能な手法である。RNA-MSデコンボリューション（東大著作物登録）、CIDチェッカー（国際出願）、RNAマスフィンガープリント法（国内出願）、往復循環クロマトグラフィー（国際出願）など主要な関連技術を確保しており、国内の企業を中心に技術移転を進めていく予定である。特にMSメーカー、製薬企業、臨床試験受託機関との連携を予定している。

2. 2. 2 機能性RNAの高感度検出システムの開発

集中研②、分室5（ノバスジーン/オリンパス）、分室6（DNAチップ研究所）

共同実施先：産総研②、東京大学（3；陶山）、北陸先端科学技術大学院大学（藤本）
武庫川女子大（村田）

2. 2. 2. 1. 光反応を利用した Photo-DEAN (DNA-Encoding-based ANalysis) 法および 1分子蛍光分析法による機能性RNA高感度検出システムの開発

集中研②、分室5（ノバスジーン/オリンパス）、

共同実施先：産総研（2）、東京大学（3）、北海道大学、
北陸先端科学技術大学院大学

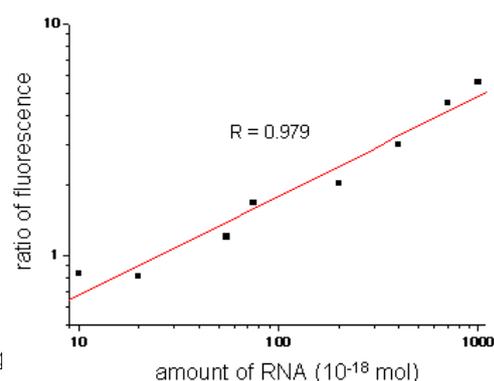
機能性RNAにはmicroRNAに代表される短鎖RNAやHIF1 α のNatural antisense RNA (NAT)、またmRNA型ncRNAなど様々な種類が存在している。よく研究されているmicroRNAの解析には、アレイや定量的PCRによる解析方法が開発されているが、これらの方法はmicroRNAに特化したものであり、microRNAとその他のRNAの定量解析する場合、各々異なった手法を用いる必要がある。そこで、本プロジェクトの開始以前から取り組んでいたcDNA高感度定量法 (DEAN法) によるmRNA定量検出方法を応用することにより、その鎖長やpolyA鎖の有無に関わらず同じ操作で定量開発する方法の開発を目指した。DEAN法による遺伝子発現解析はpolyA RNAをcDNAに変換したのち、標的cDNA配列をハイブリダイゼーションおよびライゲーションにより特性のよくわかった既知配列に置換し、増幅・標識を行い、発現解析を行うものである（特許取得済み）。そのためDEAN法ではPolyAを持たないRNAの解析は難しかった。そこで、藤本教授（北陸先端科学技術大学院大学）らにより開発された光ライゲーション技術を応用し、機能性RNAをダイレクトに既知配列へ置換することにより、機能性RNAの発現解析技術を可能とするPhoto-DEAN法の開発を行った。また、microRNAは血清中にintactな状態で存在することが知られる一方で、がんと正常細胞では発現レベルが異なっていることなどが近年の研究成果で判明しており、新たなバイオマーカー候補としての期待が高まっている。そこで、将来の臨床応用を視野にいたし、「非増幅でmicroRNAを定量検出するアッセイ系」の開発を行うことにより、非増幅atto molレベルの検出感度を達成することができた。

2. 2. 2. 1. 1. Photo-DEAN法による機能性RNA検出技術の検討

東大陶山研究室で開発されたDNAコンピューティングを活用したcDNA高感度定量法

(DEAN法)を、non-coding RNAに適用する研究を行った。DEAN法では、初期プロセスに標的cDNAを鋳型とする酵素ライゲーション反応が含まれるが、RNAを鋳型とする酵素ライゲーションは非常に効率が低く実用的ではない。そ

合成RNAサンプル量と蛍光強度比の相関



2.2.14

図1. Photo-DEAN法によるRNAの定量

こで北陸先端大藤本研究室で開発された、RNA を鋳型とする DNA 連結が可能な光ライゲーション技術を応用した (photo-DEAN 法)。

Photo-DEAN 法により、8 種類の合成 RNA (30mer) の混合サンプルに対して個別に定量することに成功しており (図 1. 参照)、検出下限 1amol (10^{-18}mol) の感度を達成した。また、光ライゲーション法の導入により、ライゲーションプロセスは数時間からわずか 5 分に迅速化された。DEAN 法は、現在のラボスケールで、600 種類の RNA を 2 チューブ・1 チップで同時に処理できるシステムなので、RNA ごとに個別の検量線が必要な qRT-PCR 法と比べて、photo-DEAN 法では、2 桁高いハイスループット性が原理的に実現可能である。

2. 2. 2. 1. 2. Photo-DEAN 法によるマイクロ RNA の検出技術の検討

Photo-DEAN 法を用いた miRNA の測定系を開発するため、先ず対象とする miRNA の選抜を行った。miRNA は 20~23 塩基と非常に短いため、測定可能な RNA は慎重に選抜する必要がある。Photo-DEAN 法に用いている光ライゲーション反応にはカルボキシビニルウリジンを用いており、連結相手はピリミジンである必要がある。そのため、測定する RNA 鎖にはプリンとアデニンが隣り合った配列、つまり、GA もしくは AA を内部に持っている必要が生じる。そこで、30 種類の miRNA を選抜してプローブの設計、合成を行った。本検討では、Photo-DEAN 法の miRNA への適合性を検証する目的で研究をおこなったため、カルボキシビニルウリジンのみを用いたが、カルボキシビニルシトシン、カルボキシビニルアデニンの合成にも成功しており、GG、AG、GU、AU を持つ miRNA に測定対象を広げる事も可能である。

選抜した 30 種類の miRNA を用いて Photo-DEAN 法を行った。以下にグラフを示すが、miRNA の種類に関わらず、RNA 量が 100amol の時にシグナルが 1、 1000amol の時にシグナルが 10 になる直線上に乗る状態が理想となるようにシステムを構築した。miRNA の違いによる上下のばらつきや傾きによって測定が上手く行っているかどうかを判断できる。MicroRNA の濃度を 20、100、 500amol と量を変化させて測定した結果、投入量に比例してシグナルが得られるものと、シグナルが低く、存在量に合わないものにグループ化できることが分かった。これらの配列を詳細に解析したところ、量比を反映しなくなっているものは、内部に小さなヘアピン構造を作るものが多い事が分かった。T_m を計算したところ、二重鎖の T_m が十分に分子内ヘアピンの T_m を上回っている場合はシグナルが得られるが、差が十分でない、もしくは、逆転しているような場合では量比を反映しなくなると考えられた。

これらの存在量と合わない miRNA の定量を改善するため、ハイブリダイゼーションの温度や反応液の塩濃度、およびデコイとなる核酸の影響について検討を行った。

反応温度を 30°C から、 4°C に変更する事で miR-96、miR-137、miR-141 において、存在量に応じたシグナルの変化が見られるようになり、定量性が改善したと考えられた (図 2)。

塩濃度は $50\sim 150\text{mM}$ までは大きな変化は無かったが、 200mM を越えると一気に定量性がなくなる事が分かった (図 3)。グラフから上下の差が大きくなり、傾きも緩くなっているのが分かる。

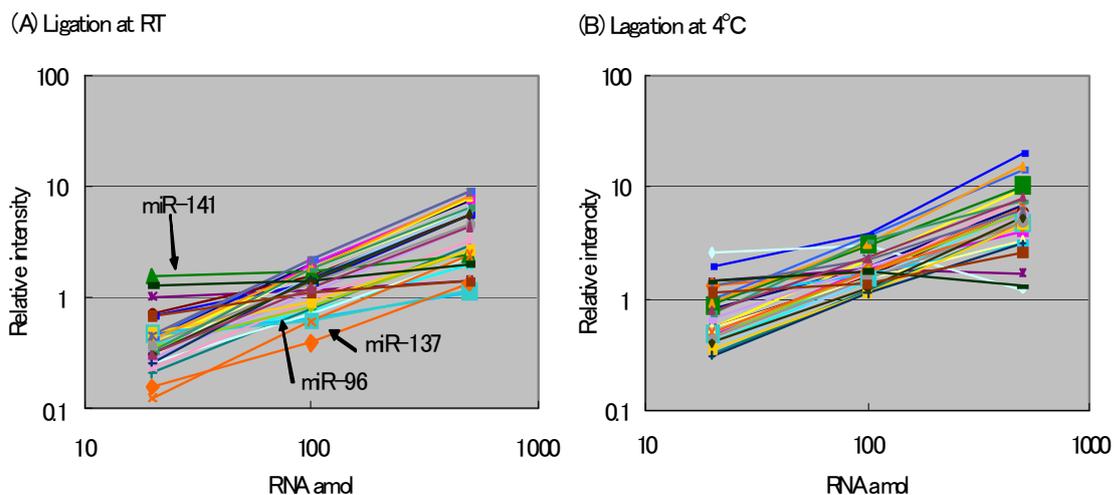


図2. Photo-Ligationの温度の影響。
Ligation 温度が30°C (A) に比べて、4°Cで行うとmiR-96、137、141で定量性が向上している。

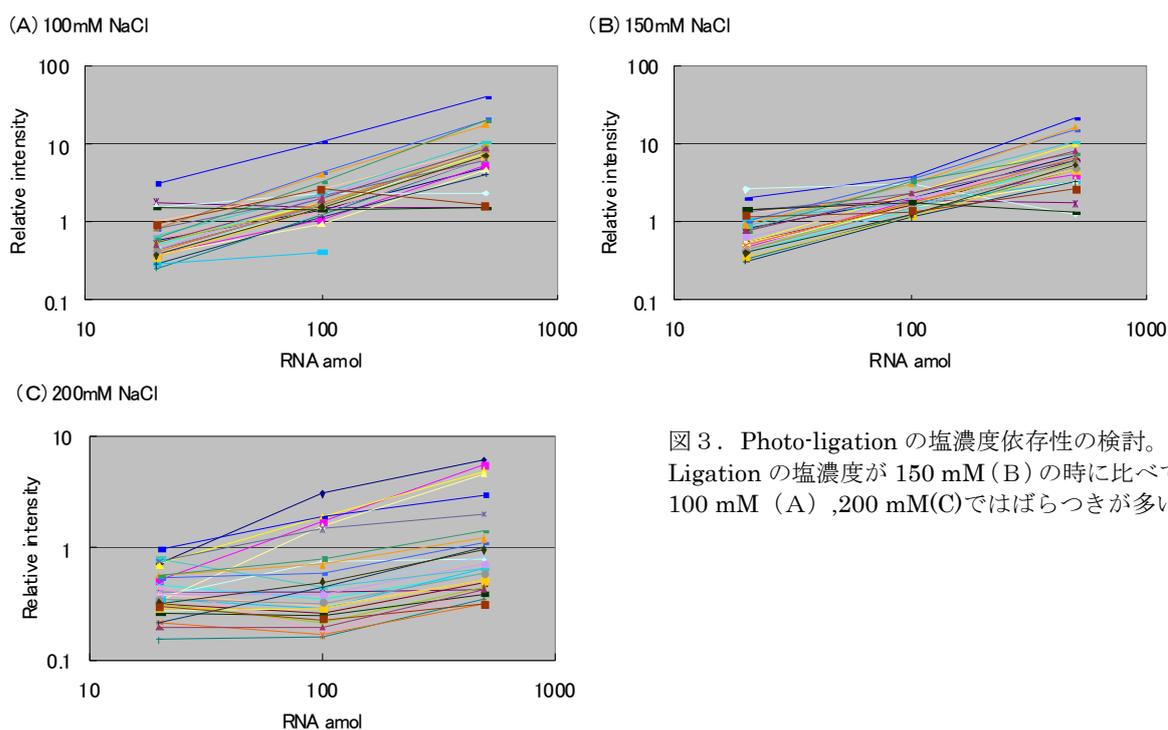


図3. Photo-ligationの塩濃度依存性の検討。
Ligationの塩濃度が150mM (B)の時に比べて、100mM (A)、200mM (C)ではばらつきが多い

さらに、非特異的な吸着の影響を考慮し、デコイとなるRNAおよびDNAを混合して実験を行った。測定対象のmiRNAとの干渉を避けるため、デコイRNAには大腸菌のtotal RNAを用い、デコイDNAには規格化配列とは異なり干渉しないことが分かっている正規直行配列を元に合成したオリゴDNAを用いた。その結果、miRNA間のバラつきが多くのmiRNAで減少した。さらに、酵母由来の標準RNAによる検量線ではガタつきが減少し、測定精度が向上した。

次いで、実サンプルの検証として、HeLa 培養細胞から抽出したトータル RNA を用いて検出実験を行った (図 4)。

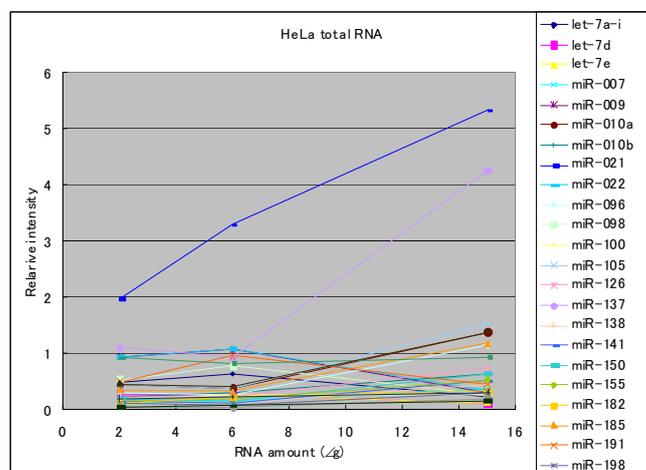


図 4. Hela total RNA を用いた Photo DEAN 法。miR-21 が投与した RNA に応じた変化を示した

その結果、高発現している報告の有る miR-21 について投入 RNA を変化させたときにそれに応じたシグナルが検出された。この事から、様々な RNA が存在する中で、実際に miRNA が検出可能で有る事が分かった。

また、選抜した miRNA の一部で FCS によるライゲーション効率の測定を行った (図 5)。

その結果、13 種類中、11 種類において十分な拡散時間の増加が見られ、約 20~60%の効率を示した。これは、Photo-DEAN 法による定量目的において十分な効率を示していると考えられる。一方、2 種類のものでは数%程度しか反応が進行していないものがあり、反応効率の向上が必要となるものが存在した。特に miR-16 については上記の DEAN 法測定においても結果が安定しない場合が多かったが、その原因としてライゲーション効率が低い事が考えられた。

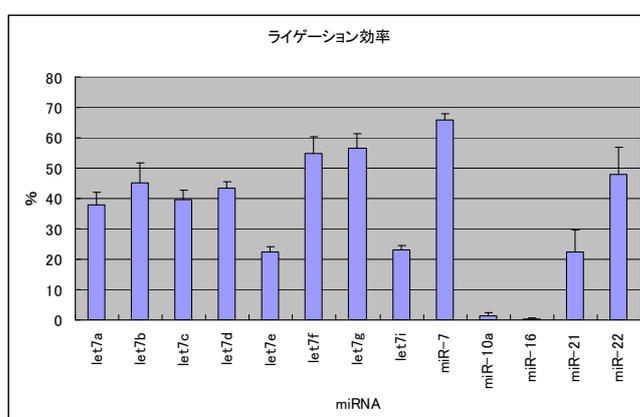


図 5. FCS による miRNA を鋳型とした光ライゲーションの効率

2. 2. 2. 1. 3. RNAをターゲットとした光ライゲーション反応の基礎的性質の検討（蛍光相関分光法を用いて）

上述のように、photo-DEAN 法を用いた RNA の発現解析技術では、miRNA のような短い RNA から polyA タイプの機能性 RNA や mRNA ような比較的長い RNA を同一のプラットフォームで定量解析することが可能となる。そのため、解析のハイスループット化や、同一プラットフォームによるデータの整合性等、有益な情報が得られることが期待できる。PolyA RNA のような長鎖 RNA では、特異的なプローブ設計が可能であり photo-DEAN 法により attomol レベルの検出感度が得られている。しかし、miRNA のように 22mer 程度の短い RNA では、各プローブの鎖長は 10mer 程度であり、その効率と特異性を得るための条件検討が重要である。そこで、特に特異性を得ることが難しいと想定される let7 ファミリーについて蛍光相関分光法を用いて、そのライゲーション効率と特異性について検証した。検証用のターゲットは合成 RNA とし、let7a をターゲットとして、ライゲーション効率を検証した。アンカープローブ（蛍光プローブ）は let7a 配列の 3' 側 10mer の相補的 DNA 配列に Tamra 標識したものを、アダプタープローブとして let7a の 5' 側 12mer に 69mer のコード配列を付加したものをを用いた。この両プローブが連結した場合、蛍光プローブのみの 10mer が、91mer となり拡散時間が増大することで連結したプローブの割合が求められる。ライゲーション温度を 10°C、5 分間光照射を行った結果、約 70% の蛍光プローブがライゲーションしていた。さらに、特異性を検証するために、let7b の合成 RNA をターゲットとし、let7a と同一条件で光照射を行った場合、let7a をターゲットとした場合と同程度のライゲーション効率であり特異性は得られなかった。そこで、ライゲーション温度を 10°C から 30°C まで変化させたところ、30°C で ligation した場合、特異的な let7a に対するライゲーション効率はほとんど変化せず、let7b をターゲットにした非特異的ライゲーションのみ減少した（図 6.A）。さらに、ホルムアミドを 2.5% 添加することにより、非特異反応の割合は 30% 程度となり特異性の向上がみられた（図 6.B）。

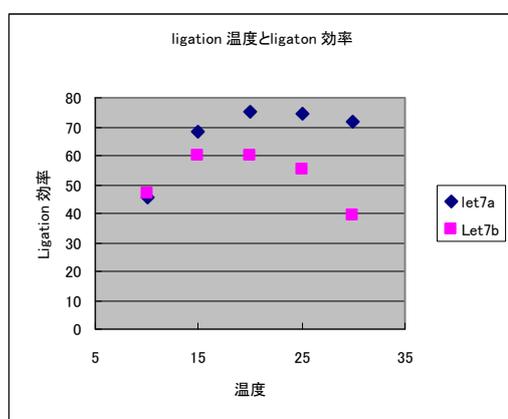


図 6.A ライゲーション温度と特異性

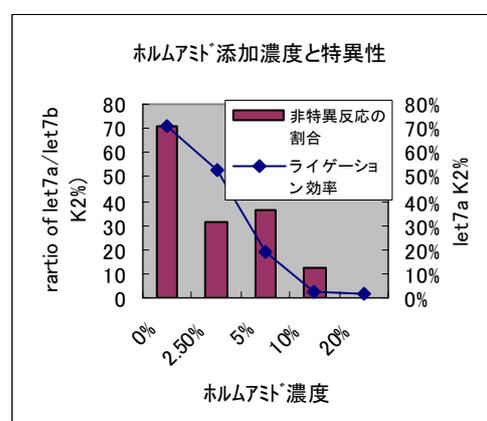


図 6.Bホルムアミド濃度と特異性

2. 2. 2. 1. 4. カルバゾール類縁体を用いた光可逆的な RNA クロスリンク反応開発

上述のように H19 年度までに、我々は光ライゲーショと蛍光相関分光法あるいは DEAN 法を組み合わせ miRNA の高感度定量検出方法を検討してきた。光ライゲーショ反応は、ピリミジン塩基が隣あっている必要があり、成熟 miRNA のような短鎖 RNA ではライゲーショポイントが限定され、特異的な検出の難しい場合があった。そこで、H20 年度からは、ターゲットの miRNA と検出プローブを結合させる新規な光クロスリンク反応を開発し、非増幅な miRNA 検出方法の開発に着手した。

光クロスリンク反応とは、光応答性塩基を含む ODN (oligodeoxynucleotides) と一本鎖 RNA をハイブリダイゼーションした後に、光照射することで光応答性塩基と RNA に含まれる塩基との間で光環化反応が進行して、塩基間を共有結合でつなぐ反応である。これまでに、DNA との光クロスリンク反応は数多く報告されているが、RNA との光クロスリンク反応はほとんど報告例がない。そこで、新しい光応答性塩基としてシアノビニルカルバゾールヌクレオシド (^{CNV}K) を合成して、その光クロスリンク反応を検討した (図 7)。^{CNV}K を含む ODN と RNA をハイブリダイゼーションした後に、366nm 光を 1 秒間照射したところ、^{CNV}K を含む ODN と RNA のピークが消失して、新しいピークとして光クロスリンク体が 97% の収率で得られた (図 8 A)。一方、その光クロスリンク体に 312 nm 光を 60 秒間照射したところ、それらのピークは消失して、元となる ^{CNV}K を含む ODN と RNA のピークが 97% の収率で生成した (図 8 B)。

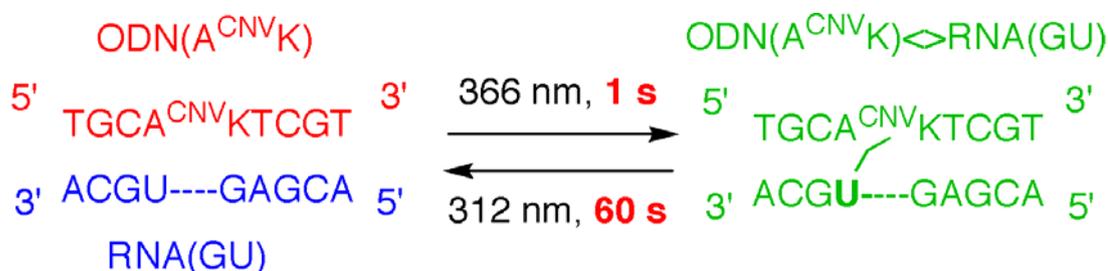


図 7. ODN(赤)中の CNVK は対合する塩基の 1 塩基 3'側のピリミジン塩基と光結合する (緑)。

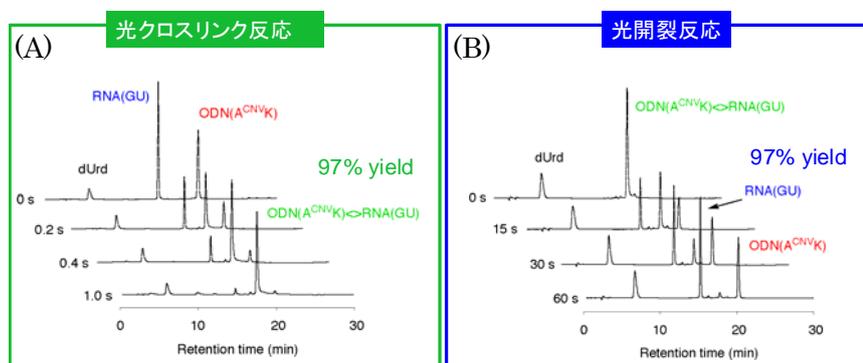


図 8. ^{CNV}K を含む ODN と RNA をハイブリダイゼーションし、366 nm の光を 1 秒間照射した。照射時間毎のサンプルを HPLC により解析したところ、1 秒で 97% の ODN と RNA のクロスリンクを観察した (A)。さらに 312 nm の光を 60 秒間照射すると 97% の効率でクロスリンクの解裂が観察された (B)。

2. 2. 2. 1. 5. 可逆的 RNA 光クロスリンク反応を用いた配列選択的 RNA 選別法の開発

図9は光クロスリンク反応を用いた配列選択的 RNA セレクションの模式図である。光応答性塩基である ^{CNV}K を持つ光応答性プローブを標的となる RNA が含まれる試料液に入れて、366nm の光を照射すると標的 RNA に対してのみ光クロスリンク反応が進行する。この段階で RNA のセレクションが行われる。次に、固相担体からなる光クロスリンク体を試料液から取り出すことで RNA が精製される。取り出した光クロスリンク体に 312 nm 光を照射することで、標的 RNA のみが回収されることになる。

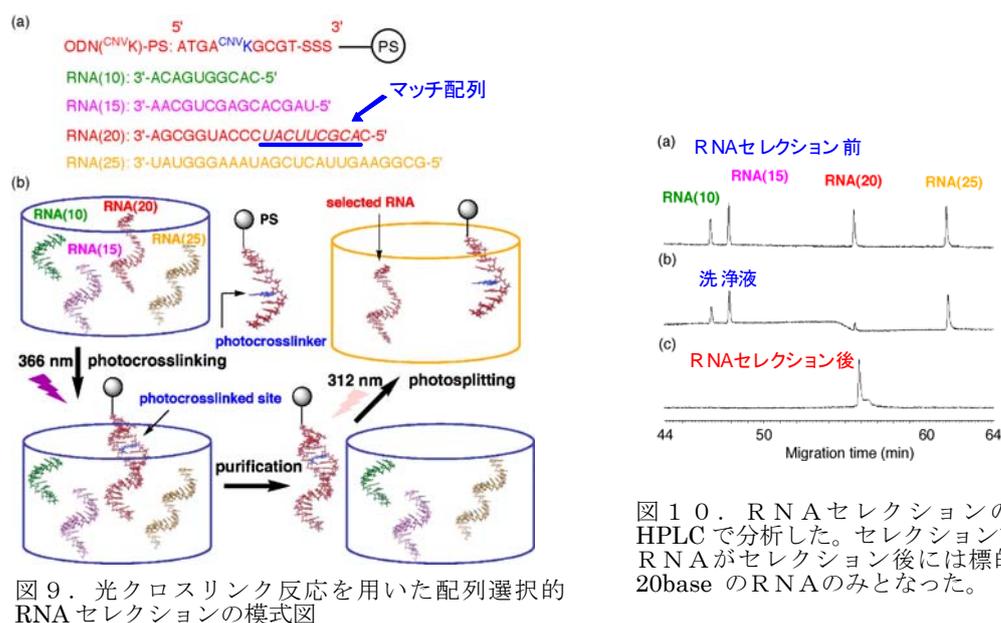


図9. 光クロスリンク反応を用いた配列選択的 RNA セレクションの模式図

図10. RNA セレクションの過程を HPLC で分析した。セレクション前4本の RNA がセレクション後には標的とする 20base の RNA のみとなった。

実際に、RNA セレクションの過程をキャピラリーゲル電気泳動で分析したところ、セレクション前は4本の RNA が存在するのに対して、洗浄することで3本の RNA に減少して、有効であることが示された。

さらに、我々は本方法により、複数の miRNA の中から目的の miRNA を配列選択的に選別することに成功した。図10は光クロスリンク反応を用いた配列選択的 RNA セレクションの模式図である。光応答性塩基である ^{CNV}K を持つ光応答性プローブを標的となる miRNA が含まれる試料液に入れて、366 nm の光を照射すると標的となる miRNA (let 7a) に対してのみ光クロスリンク反応が進行した。この段階で RNA のセレクションが行われる。次に、固相担体からなる光クロスリンク体を試料液から取り出すことで RNA が精製され、取り出した光クロスリンク体に 312 nm 光を照射することで、標的 RNA (let 7a) のみが回収されることになる。実際に、RNA セレクションの過程をキャピラリーゲル電気泳動で分析したところセレクション前は3本の RNA が存在するのに対して、洗浄することで2本の RNA に減少して、

本手法が選択的な microRNA 選別法に有効であることを見出した (図 1 1)。これらの結果について ChemBioChem, 2009, 10, 1473 に論文としてまとめた。

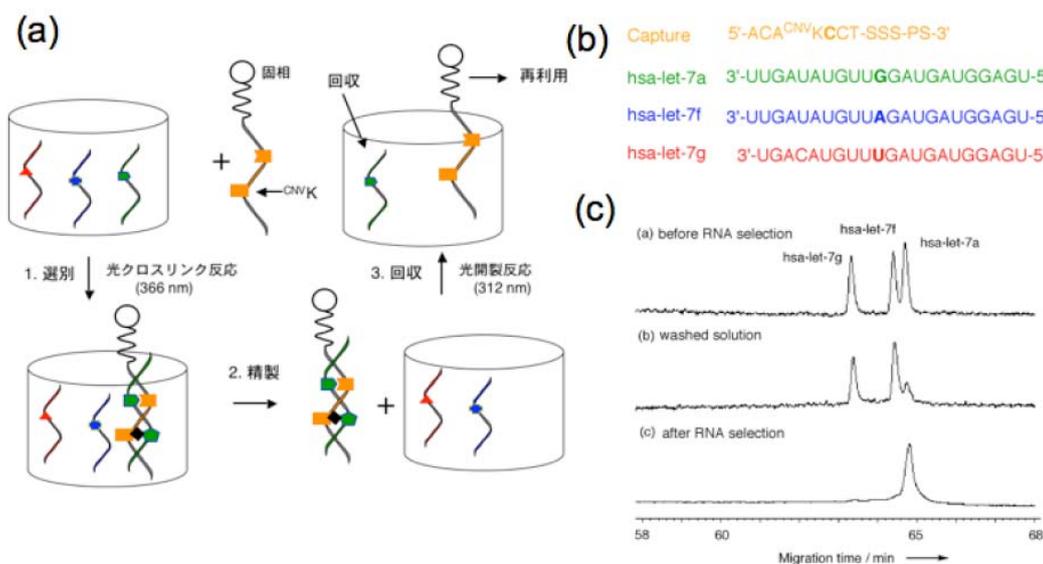


図 1 1 . (a) Strategy for selection of a target RNA sequence. (b) Capture and miRNA sequences used in this study. Italic characters indicate a matched sequence with a capture strand. Bold characters indicate a single mismatch. (c) CGE analysis for each operation: (a) before RNA selection; (b) the washed solution after irradiation at 366 nm; (c) after RNA selection.

本方法を利用することでマイクロ RNA のようなノンコーディング RNA といった翻訳を受けない RNA を網羅的にスクリーニングする方法として期待できる。さらに遺伝子クローニングでは、特定の RNA を細胞内から精製した後に RNA を転写する方法で行われている。本方法を応用することで、高い回収率で RNA を精製できるため、標的の遺伝子をクローニングする際に有用と思われる。

2. 2. 2. 1. 6. 1 分子蛍光法による非増幅高感度 miRNA 定量方法の開発

(1) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した FRET-FIDA 法の検討

H 1 9 年度まで我々は、光ライゲーション反応と蛍光相関分光法を組み合わせ、高感度な miRNA を定量する技術を開発してきた。光ライゲーション反応はピリミジンが隣あった配列であることが必要であり、miRNA のような短い RNA をターゲットにした場合、1 部の miRNA では特異性をもったプローブを設計できないという問題があった。また、蛍光相関分光法では実際の測定時間 (30 秒程度) では femto M オーダー (sub nM) の検出能であり、より高感度な測定が望まれた。そこで、より高感度に測定できる 1 分子蛍光法として、蛍光

強度分布解析法 (FIDA 法 Fluorescence Intensity Distribution Analysis:FIDA) と蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) を組み合わせることで高感度な測定系の開発を行った。蛍光相関分光法は、共焦点領域内に入出入りする蛍光の時間による揺らぎをもとに解析する。一方 FIDA 法は測定溶液中に 2 種類以上の異なる蛍光強度をもった分子が存在する場合に B/F 分離をせず、蛍光分子の蛍光強度と分子数を計測する方法である。本方法を用いると、レーザー照射領域を回転することにより、FCS より希薄な溶液であっても、短時間で測定できる。そこで、FIDA 法を miRNA の測定に応用するために FRET と組み合わせ、非増幅で miRNA を定量できる新規な方法の開発 (FRET-FIDA 法) を行った。

図 1 2 は miR-21 と相同な配列をもつ合成 DNA を本方法により検出した例である。マイクロ RNA、miR-21 と相同な配列をもつ 1 本鎖 DNA を 0 attomol ~ 5 fmol/ μ L の範囲で添加し、検出限界と定量性を検証した。その結果少なくとも 250 amol/50 μ L の検出感度があることがわかった。また 1 fmol/ μ L でも飽和していないことから 1nM のプローブ濃度で、atto mol から femto mol まで少なくとも 10^3 のダイナミックレンジで測定可能である。今回の検討例はプローブ濃度を 1nM 程度としたが、プローブ濃度をさらに低濃度とすることで、検出感度をより向上させることも可能であると考えられる。本アッセイ法に関しては特許出願を行った。

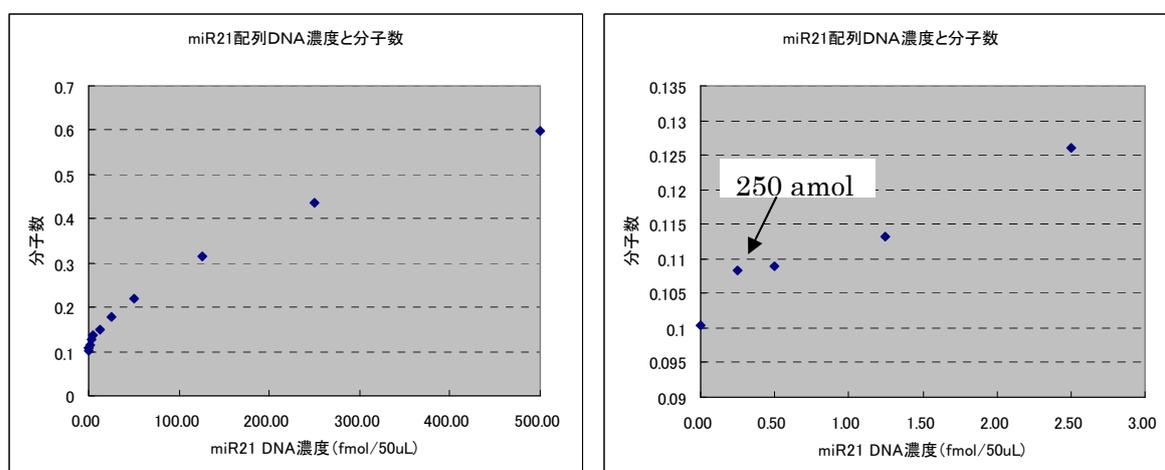


図 1 2. FRET と FIDA を組み合わせた高感度 miRNA 検出方法における測定例。miR21 と相同な配列をもつ合成 1 本鎖 DNA を本法で検出した。MF20 による測定では、1 ウェルあたり 50 μ L 程度の溶液が必要であり、x 軸は 50 μ L に含まれる miR21 配列 DNA 量を表している (250 attomol のとき濃度は 5 pM となる)。測定系を工夫することで 10 μ L 以下のサンプル量にすることも可能であるので、50 attomol 程度の検出も可能である。

(2) FRET-FIDA 法にクロスリンクを組み合わせた高感度検出方法の検討

FRET-FIDA 法は 250 attomol/50 μ L の miRNA を非増幅で検出できるシステムであるが、1 分子蛍光法は室温測定であるため、室温中での蛍光標識 probe とターゲット RNA の平衡反応となるため、サンプル中に存在するターゲット RNA の類似配列 RNA との非特異的

なハイブリダイゼーションを防ぐことが難しい。そこで、本 FRET-FIDA 法に北陸先端大で開発された光クロスリンクを組み合わせたことによる特異性の向上について検討を行った。光クロスリンク反応を用いることにより、特異性の高い温度あるいは溶液条件でプローブとターゲット miRNA のハイブリダイゼーションとクロスリンクが行われることで非平衡な状態となり、室温測定でもストリンジェンシーの高い環境が保持され、特異性高く測定できる。

Tamra 標識プローブに光クロスリンク剤である ^{cnv}K を 1～2 箇所を導入したプローブを用い、光クロスリンクによるクロスリンクを行ったのち、終濃度 50% となるようにホルムアミドを添加し、クロスリンクしていないプローブを解離させることでそのクロスリンクの効率を検討した。

図 1 3 は検討結果である。X 軸は光照射の有無 (+/-) とホルムアミドの添加の有無 (+/-) である。本検討では、ターゲット miRNA とハイブリダイゼーションをした時にプローブの蛍光が消光するようにプローブを設定している。そのため Y 軸は、ターゲット miRNA とハイブリダイゼーションしていないプローブ数をあらわしている。X 軸の右端の光照射無し、ホルムアミド添加では、全てのプローブで 30 以上の蛍光プローブがハイブリダイゼーションしていないのに比べて、光照射後では、^{cnv}K を含んでいないプローブのみが、

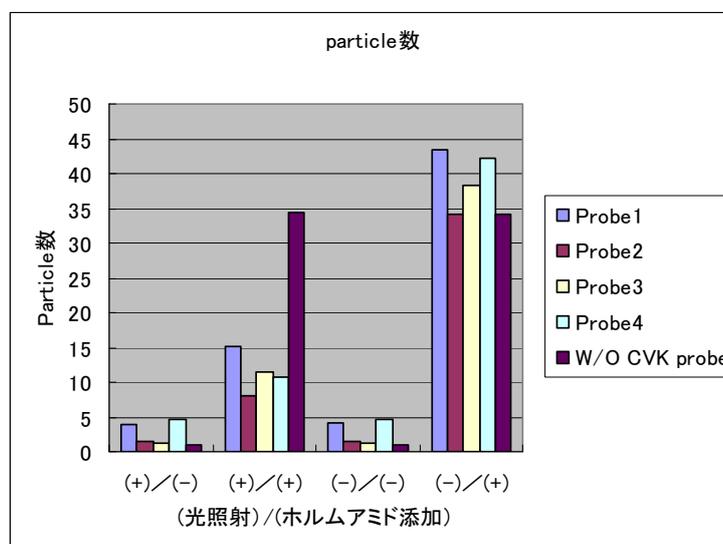


図 1 3. ^{cnv}K の位置と光クロスリンクの効率

突出してハイブリダイゼーションをしていないフリーな状態で計測され、クロスリンクは有効に作用していることがわかった。Probe-1 は ^{cnv}K の導入位置が、中央であるため、ハイブリダイゼーション効率が低く、クロスリンクしているプローブ数も少ないものと考えられた。そこで最もクロスリンク効率の高い Probe-2 を用いて miR-21 配列と相同な合成 RNA を用いて感度を検討した。プローブ濃度は 1nM とし、添加 miR-21RNA 濃度を 500fmol/50 μ L までとした。その結果、5 fmol/50 μ L の検出感度であった。

FRET-FIDA 法に光クロスリンクを組み合わせることで特異性が高くなる可能性が見えた反面、感度では1桁程度悪くなっていた。この原因を詳細に分析した結果、蛍光 probe 内での鎖内2次構造が影響している可能性が考えられた。そこでさらに適合性について検証を行い、pM から nM の範囲で線形近似で決定係数 (R^2) が 0.9985 となる直線性を示し、またさらにその検出限界が、15 pM から 30 pM であるようなアッセイ系を開発することができた。これは、1 μ l 換算で 30 attomol の測定も可能であると考えられた。さらに特異性を伴って検証するために、miR-21 配列を含み全 8 種類の合成 RNA をターゲットとし、測定したところ、miR-21 のみに特異的に測定することができた。

2. 2. 2. 1. 7. まとめ

(1) 実施計画書記載の達成目標に対する到達度

1 分子蛍光法と北陸先端大 藤本研により開発された応答性ヌクレオシドとして 3-シアノビニルカルバゾール分子 (CNVK) を組み合わせることで、15 pM ~ 30 pM の miRNA 検出感度を達成した。本濃度は 15 attomol/ μ l に相当する。現状の測定装置では 384 well plate で測定するため、30 μ l の測定容量が必要であるため、450 attomol レベルであるが、1 分子蛍光法は原理的に 1 μ l 以下のサンプル容量で測定可能であるため、装置改良により 10 attomol 以下の miRNA の測定も可能であり、達成目標に到達している。Micro RNA は血清中で pM の程度の濃度で存在する可能性が指摘されており、本測定系は血清中の miRNA 測定が可能なレベルに到達したと考えられる。北陸先端科学技術大学院大学では昨年開発した光クロスリンク反応を用いた miRNA の選択的回収法の開発に成功した。

また、Photo DEAN 法による機能性 RNA 検出も attomol レベルの検出感度に到達しており、マルチプレックスに血清中の miRNA を測定することができるレベルに到達している。

(2) 実用化・事業化の見通しについて

マイクロ RNA はがんの制御に関わっていることが知られており、がんのバイオマーカーとして注目されている。また、血清 1 μ l あたり 10,000~100,000 個程度あるといわれており、これは、pM レベルの濃度で血清中に存在していることになる。これらのマイクロ RNA の高感度解析は、RNA を DNA に変換した後、定量的 PCR により定量している。本研究成果では、これらのマイクロ RNA を日本発の技術である光クロスリンク反応とオリンパスの保持技術である 1 分子蛍光法により、非増幅で検出できることを示したものである。

今後がんのバイオマーカーとしてマイクロ RNA が確立されることにより、本技術を応用した、がんの転移診断、予後診断、あるいは早期発見に応用可能と考えられる。

2. 2. 2. 2. MPEX法を用いたRNAの微量検出法の構築 DNAチップ研、武庫川女子大

RNAの検出技術に関しては、マイクロアレイに代表される集積型の発現量解析技術と、PCR増幅反応を応用したリアルタイム検出技術が確立されている。しかし近年話題となっている非常に短い機能性RNA分子を検出するためには、様々な技術改良が必要であった。本研究開発の開始当時におけるマイクロアレイ技術では、検出感度が通常のmRNAの検出感度と比較して数百～千倍程度も悪く、本研究開発中に発表されたアジレント社のアレイでは感度の問題は解消されたものの、精製したマイクロRNA(miRNA)を解析に使用できないなど説明不可能な現象も生じている(本論参照)。PCR技術ではABI社のTaqMan miRNA検出キットが毎年のように改良を重ね、初期のころの多種類同時検出の不便性を解消してきた。しかし同時に数百種類のmiRNAを検出するためには、数百万円にもなる初期投資が必要であり、これはアレイの実験でも同様である。

DNAチップ研究所では、住友ベークライトと共同開発により、アレイ上で通常の酵素反応を行える表面コーティングの開発に成功していた。このアレイコーティングを使用することにより、アレイ表面に固定したオリゴDNAをプライマーとしてDNAの伸長反応を行うことが可能であり、MPEX(Multiple Primer Extension)反応として特許を取得した。この時点では、RNAを使用する際には一度チューブ内で逆転写反応を行った後に、DNAをアレイ上で増幅・標識することを想定しており、RNAウイルスであるノロウイルスの検出法などを確立した。本研究開発では、この技術をmiRNAに応用するあたり、miRNA分子の短さからくる逆転写反応のバイアスなどを除くために、アレイ上に直接miRNA溶液を乗せて逆転写反応を行う実験系が可能かどうかという検証から始めることとした。もしこの反応が可能であれば、これまでのマイクロアレイの常識を覆し、通常のチューブ内の酵素反応と同様に実験による個人差がほとんど無く、アレイ本体および検出試薬の値段も安く、一般の研究者に受け入れられ得るツールを開発できる可能性があると考え、本研究開発を開始した。

2. 2. 2. 2. 1. 目標

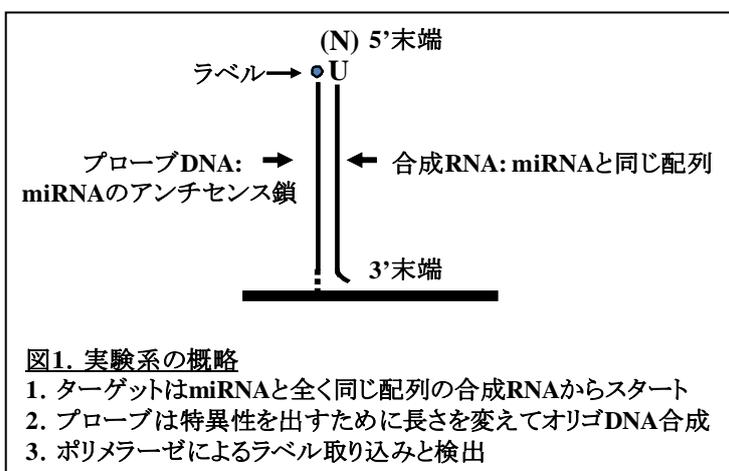
本研究開発では機能性RNAの発現解析を簡便にできるツールを開発した。機能性RNAの中でも50塩基以上のRNA分子に関しては、既存のマイクロアレイ技術や定量的PCR実験等の手法で十分解析可能である。そのため我々は解析が非常に難しい低分子機能性RNA、特にmiRNAをターゲットとして、マイクロアレイ上で多くの分子を同時に解析できる実験系の開発を行った。低分子RNAでは、①標識効率を上げること、②検出用プローブの自由度を上げて配列特異的認識を行うこと、③ハイブリダイゼーション(アニール)の効率を上げること、の大きく3点が問題になると考えられるが、本実験法の原理では全てを簡単な実験法で解決することができる。上記3点をクリアする際の目標として、

1. 検出限界の数値目標：1～数attoモル(=10⁶分子)レベル
2. 網羅性と配列特異性の両立(・バランス)
3. 実験手法の簡便性(とそれに伴うデータの安定性)

の3項目を挙げた。これらの項目を全て達成することができれば、先行している外国メーカーのツールに対抗することが可能になるだけでなく、マイクロアレイ実験に精通していない研究者に於いても、通常の酵素反応等と同様に一般的な実験法として普及する可能性が大きい。様々な高次生命現象過程を研究している研究者が、手元にあるサンプル群を使用して各々の分子マーカーを探索する国産ツールとして、非常に大きな役割を担えるものと考えている。

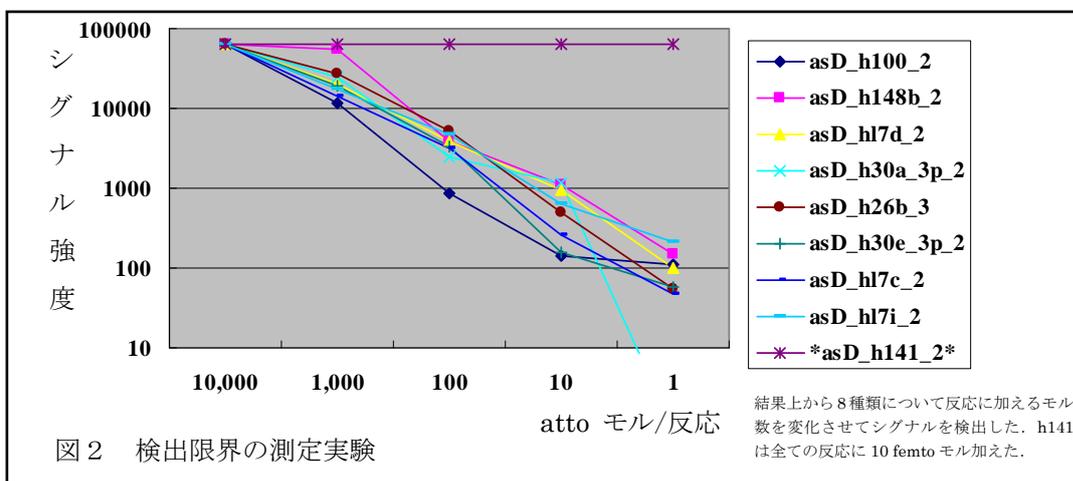
2. 2. 2. 2. 2. マイクロアレイ基板を用いた低分子機能性 RNA の高感度検出実験技術の構築

マイクロアレイ基板 S-Bio を用いた MPEX 反応 (DNA チップ研・住友ベークライト共同開発) による低分子機能性 RNA (特に miRNA) の高感度検出技術の開発として、本プロジェクトに於いて4年間研究を進めてきた。本開発では非常に短い RNA 分子を対象としており、その取り扱いを容易にする

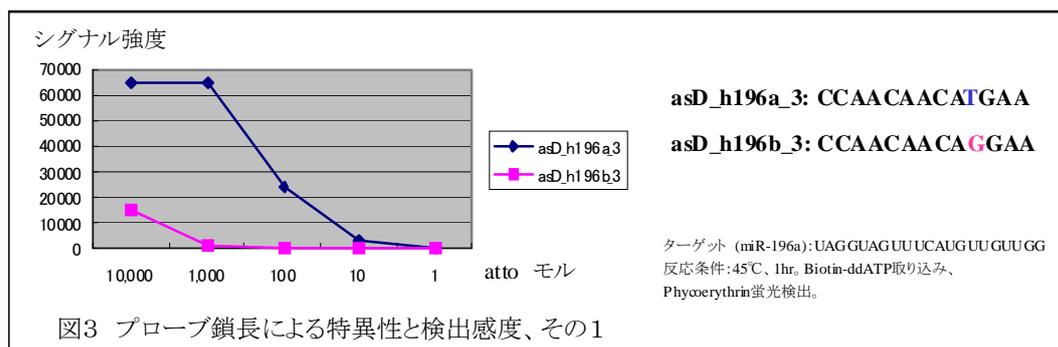


ため、アレイ上にて直接短い RNA を反応させる逆転写酵素を用いた実験系を採用した (図 1)。アレイ表面に固定化されたプライマーを用いて伸張反応を実現することにより、多種類の分子を一度に解析することが可能になる。標識の取り込みはビオチン化 ddATP・ddUTP を用いて miRNA 1 分子あたり 1 分子の標識を行い、プローブの設計に於いてその 3' 末端に A または T を取り込むようにした。長さは特異性を持たせるために後述する項目 2. の実験系により実証しながら調整した。また全ての実験において生化学的な反応の評価をするために、合成 RNA にて miRNA と全く同じ配列を作成して、反応液中のモル数 (分子数) をコントロールしながら解析を行った。

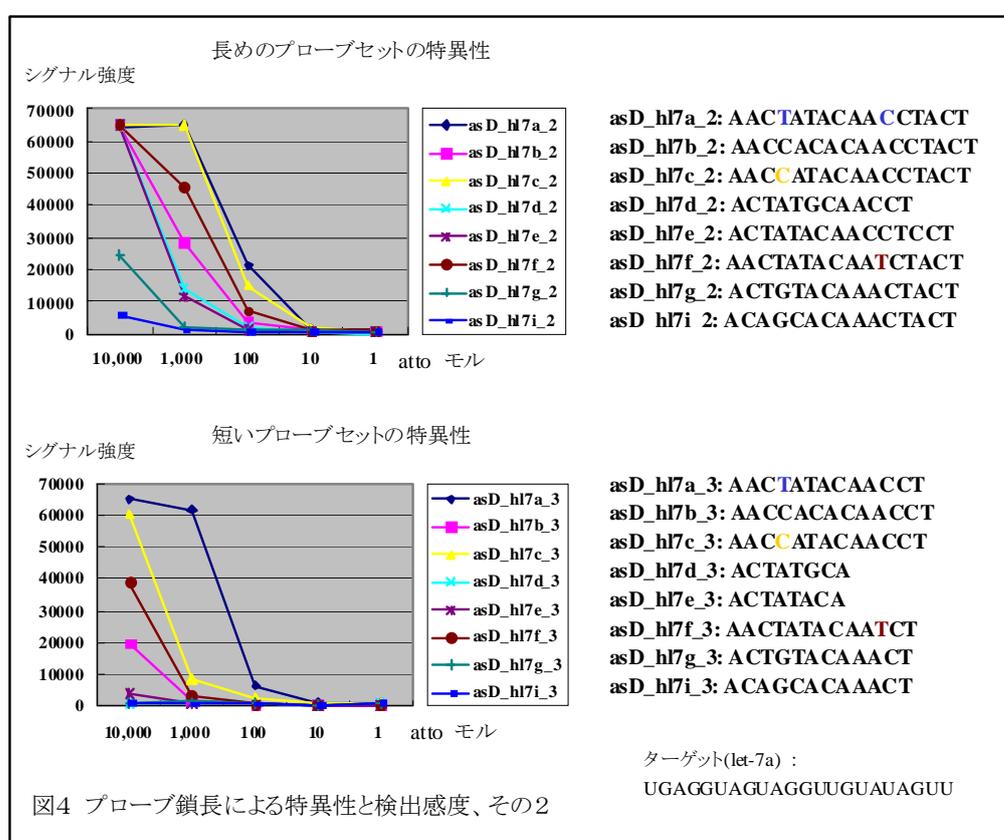
まず目標の項目 1. であるが、図 2 に示すようにほぼ全てのプローブについて 10 atto モルにて、バックグラウンドノイズの 100 付近より有意に高い値になった。1 atto モルで検出できるものは 1/5 ~ 1/10 程度しかないが、それ以外のプローブでも数 atto モルまでは検出可能であり、当初の目標を平成 19 年度の半ばにしてクリアすることができた。h17i (let-7i) や h148b のように 1 atto モル付近でもシグナルが検出できるプローブもある反面、h100 の様に 10 ~ 1 atto モルで数値が変わらなくなってしまうものもあり、プローブの再設計を行う必要がある。19 年度後半からは検出感度の向上を目的として試薬類および反応条件の最適化に取り組み、感度向上とノイズの低減により 1 atto モルで検出可能なプローブの割合が増加しつつあるため、今後も改良を重ねて感度の改善を図る。



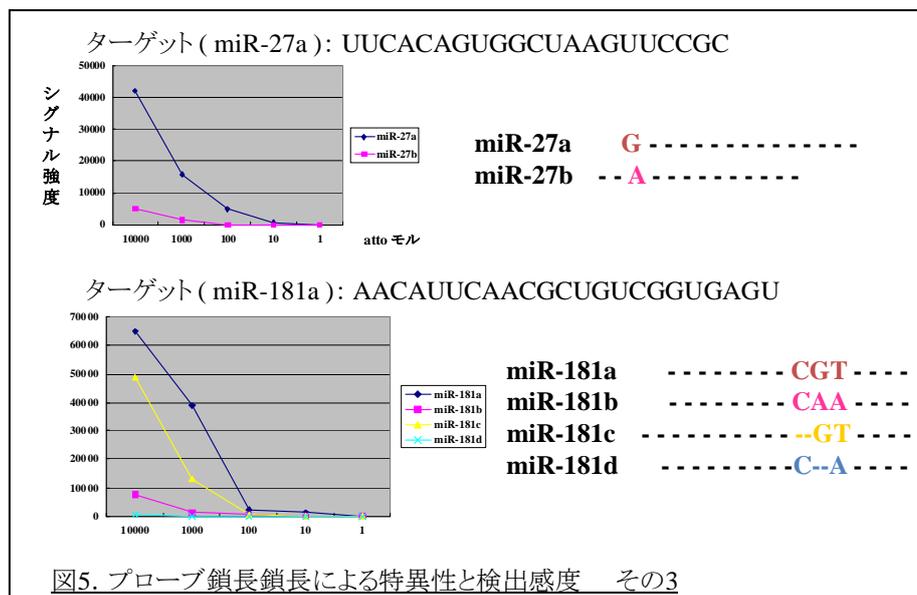
次に項目2.の網羅性と特異性については、特異性を出すためのプローブ設計が可能かどうか重要なため、各 miRNA に関して似たような配列を持つ組み合わせのリストを作成し、各分子の間で非特異的なシグナルが検出されるかどうかを検証した。まず図3のプローブ h196a については、ほぼ中央に1塩基のみ変異のある196b に対して、長いプローブでは特異性が出ないが（データ非表示）、短い13塩基のプローブでは特異性を持って検出できた（図3）。10 atto モルでも蛍光強度にて2000程度のシグナル値が検出されたため、検出限界も数 atto モル以下と問題なかった。



更に複雑な let-7 ファミリーに関しては図4に示す様に、長めのプローブ（図4上）では a と c が区別できないが、短い13塩基のプローブ（図4下）では10倍程度のシグナル値の違いとして判別可能であった。ただし let-7 の場合には検出の特異性を出すためにプローブを短くすると検出限界が10 atto モル程度になってしまい、数 atto モルの感度を保証するためには特異性を多少犠牲にしなければならない。製品化に際しては長短両方のプローブを搭載し、研究対象によってどちらのデータを採用するかを選んでもらうような、解析上の工夫を施す必要がある。



それ以外のプローブに関しても実験を進行中であり例を図5に示した。miR-27では、変異の箇所が5'側になるため、変則的なプローブの配列で対応している。27aと27bは10倍程度の差で特異的に検出が可能であった。一方miR-181では、4種類のファミリー遺伝子の配列中で3塩基の部分に互いに変異がある。181aとcでは1塩基の欠失(挿入)変異があるが、半分弱程度クロスしてしまう結果であった。27も181も、10attoモルで500以上のシグナル値を示しており、検出限界は数attoモルであった。

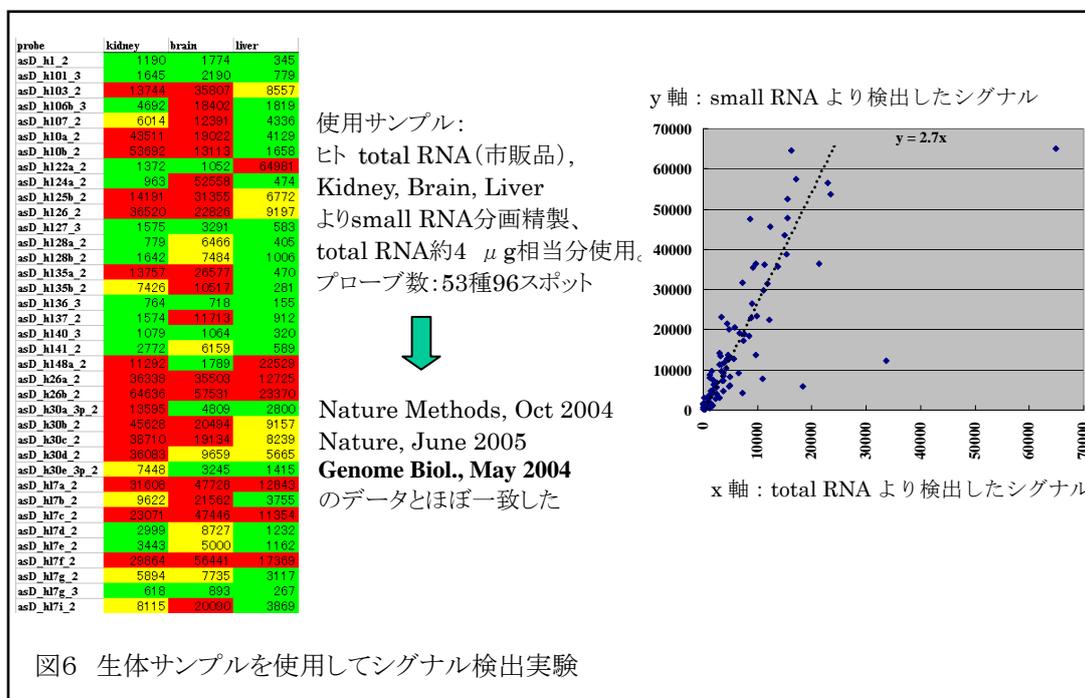


平成 19 年 8 月に引き続き、平成 20 年 4 月と半年ごとに miRBASE (miRNA のデータベース) が大きくバージョンアップを繰り返しており、ヒト miRNA の数もそれまでの 470 種類程度から、900 種類以上へと増加しつつある。そのため mature (major) に分類されたものをほぼ全てと、star (*) の一部を含む約 800 種類にまでプローブ設計を継続してきた。各分子の間で非特異的なシグナルが検出されるかどうかを検証し、再設計を行うというサイクルを繰り返しながら、使用できるプローブを増やす作業を続けている。またシグナル値の標準化を目指した内部コントロールの検討も行ったが、様々な small RNA について検討を行ったものの最良な分子が特定できなかった。アジレント社の miRNA アレイでも内部コントロールは搭載されておらず、標準化に疑問を呈している現状があるため、引き続き状況を見極めながら対応していく予定である。

2. 2. 2. 2. 3. Total RNA と small RNA 分画を実サンプルとして用いた実験結果の検討

最後に項目 3. の実験操作の簡便性であるが、実際に生体サンプルを用いて反応を行なった (図 6)。左図は簡易カラムによる small RNA 分画を直接反応系に入れた場合のシグナル値を表にしたもので、各臓器におけるシグナル強度のパターンは既報論文とほぼ一致した。右図は small RNA と total RNA を反応した場合のシグナル値の相関図であるが、右下の 2 点 (同一プローブ) を除いてほぼ相関していることが分かった (右上の 1 点はシグナル値が飽和していたため本来の値は不明)。相関しないプローブについては、total RNA に含まれる様々な種類の mRNA 分子、あるいはリボゾーム RNA 分子等によりシグナルが検出されていると考えられ、設計を変更して再度検証実験を行っていく必要がある。対象とする miRNA

の種類が増えた際には同様の実験にて検証を行い、必要があれば再設計へと同様のステップを踏んでいくことになる。



また変動が特徴的な10種類のmiRNA分子について、TaqMan PCRによる検定もを行い、アレイ上でのMPEX反応と定量的PCR実験という全く異なる実験系において、発現変化について同じ傾向を確認することができた(図7)。本開発アレイとTaqManのデータは、発現比の値がTaqManの方が大きめに出る傾向があるが、ほぼすべてのプローブに於いて相関が見られた。一方現在最も競合する製品と考えられるアジレント社のmiRNA解析アレイツールでは、TaqManデータとの相関はあるものの発現比の値はTaqManより大小ばらついていて、その結果、本開発アレイとアジレント製品とのデータ間の相関性はあまり見られなかった。

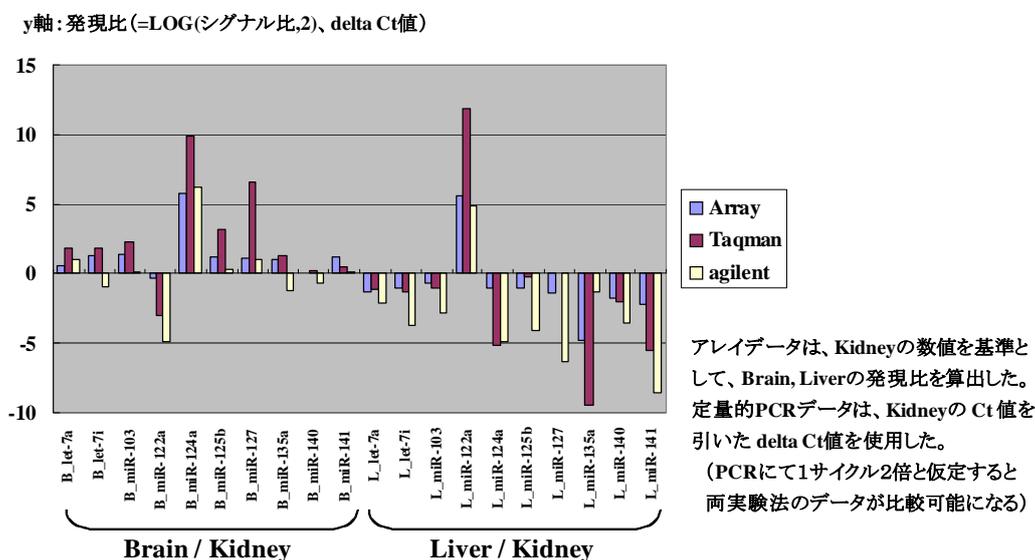
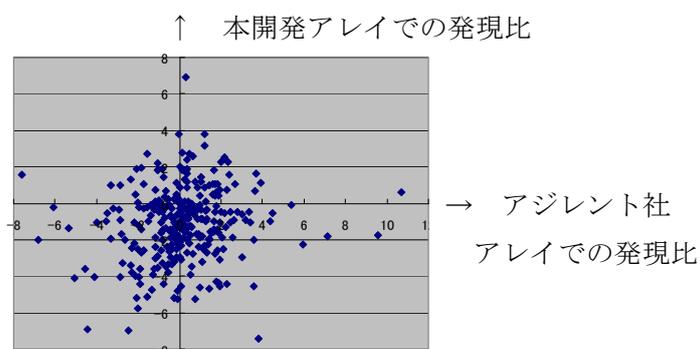
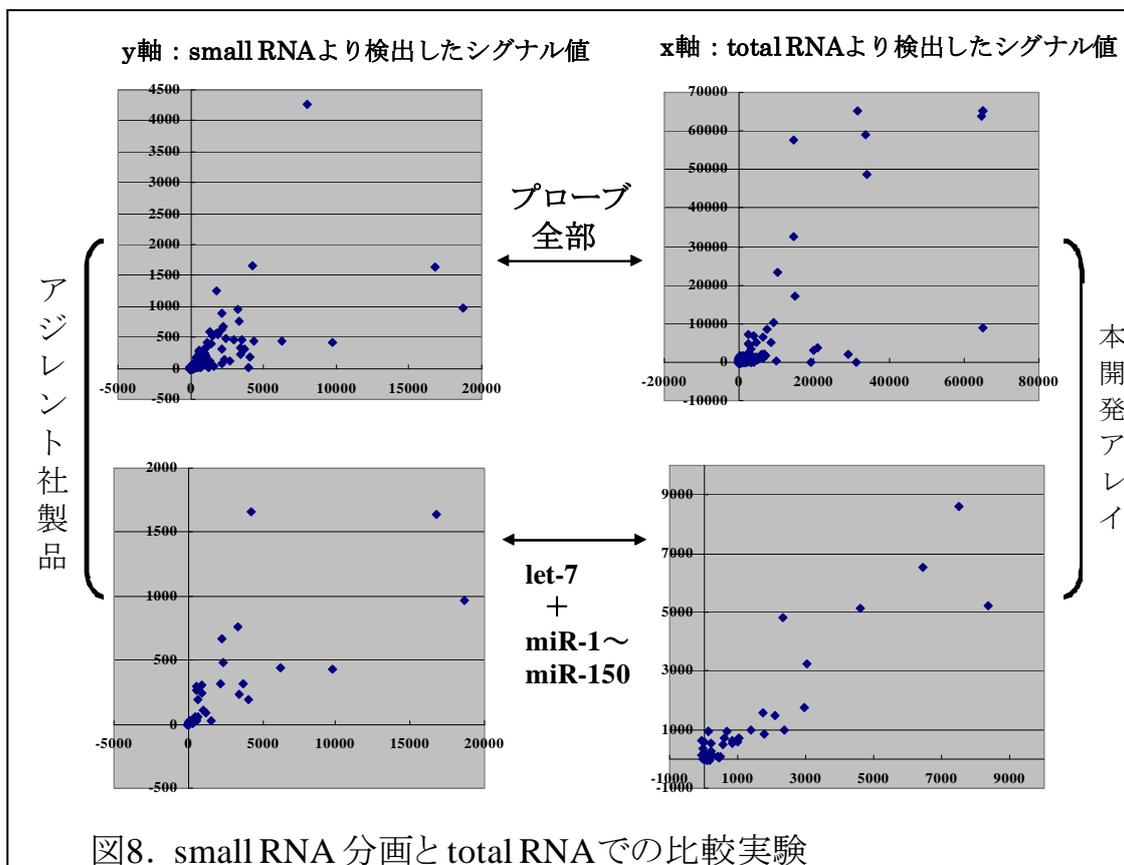


図7. アレイ実験と定量的PCR(Taqman)実験結果の比較

本開発アレイでは total RNA と small RNA でデータが相関していることを図6で示したが、アジレント社では small RNA の使用を推奨していない。図8に total RNA、small RNA の両データのプロット図を示した。特に下段の中～低発現（シグナル）領域に於いて、本開発アレイでの相関性の高さを確認できた。アジレント社のデータから何が起きているのかを推測することは難しいが、本開発製品のデータの明瞭性を示すことができた。

図7に於いてPCRのデータと各アレイ実験のデータは良く相関しているように見える。しかし2種類のアレイデータ間の相関性は必ずしも高くない。その相関を確かめるために図9のようにプロットしてみたところ、PCRで検証したmiRNA分子以外も含めた解析でも相関性はほぼ無いという結果であった。これは、アジレント社のアレイでは total RNA と small RNA で実験結果が大幅に異なる現象が一因ではないかと推測できる。(注：アジレント社では total RNA のみを使用するよう指定している。本実験でも total RNA を使用した。)



アジレント社 miRNA アレイと本研究で開発したアレイを用いて臓器間の発現比 (log2 値) を算出し、それぞれ X 軸、Y 軸にプロットした。

この結果が本開発ツールの優位性を示すものかどうかは議論が分かれることになるが、既存ツールとデータの互換性がほぼ無いということは、すでに miRNA アレイを使用している研究者が、本開発ツールに乗り換えることはほぼ不可能であると想像できる。冒頭にも述べたとおり、サンプルを保有・保管しているが、アレイ実験の経験がない研究者をターゲットに、開発の的を絞ることが肝要であることが明らかになった。

開発項目としては挙げなかったが、miRNA 分子の検出実験を行う上で、実際に機能する

20 塩基程度の mature miRNA の他に、生体内には未成熟の pre-miRNA 分子も存在する。pre-miRNA 分子の配列中には mature miRNA の配列が含まれるため、シグナル検出の際に両方の分子を検出してしまう可能性がある。これを検証するために、ツール開発チームの日本新薬との共同研究として、4 種類の pre-miRNA 分子と同じ配列を長鎖 RNA 合成して供給して頂いた。図 10 のように、mature miRNA 分子と比較して、pre-miRNA 分子は数十分の一～数百分の一以下のシグナル値しか示さず、ほとんど検出されないことが明らかになった。Pre-miRNA 分子はヘアピンループの二次構造を取っていることが知られているため、反応条件によっては二次構造がほどかれてシグナルが検出される可能性があると考え、反応前に熱変性を行ったのちに逆転写反応を行ったり、逆転写反応を酵素の活性限界である 60℃ 前後まで上げて反応したりしたが、いずれも pre-miRNA ではシグナルが検出されなかった。Pre-miRNA 分子を検出するためには、二次構造をほどいた状態で安定化させるような、例えば mature miRNA の配列以外の部分をカバーするカウンターオリゴ DNA などの特殊な処理が必要と考えられるが、まだ検証できていない。以上より、本開発ツールでは、成熟タイプの mature miRNA 分子のみを検出することが明らかになった。

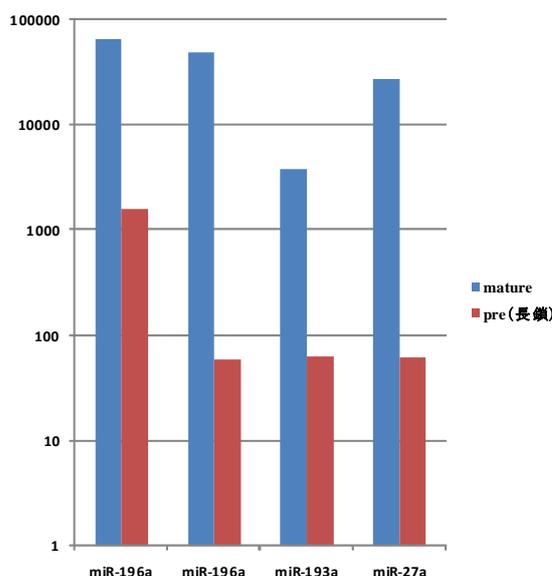


図 10. mature miRNA と pre-miRNA 分子を用いたシグナル検出実験

mature miRNA のシグナルと青いバーで、pre-miRNA (長鎖) のシグナルを赤いバーで示した。縦軸は蛍光のシグナル値で、100 以下はバックグラウンドレベルである。

2. 2. 2. 2. 4. 実サンプルを用いたシグナル検出実験

後半 2 年間は、実サンプルを用いたシグナル検出実験を推進し、miRNA の発現変動を解析することを主目標とした。まずヒトサンプルについては市販の各臓器 total RNA および精製 small RNA 分画、培養細胞から抽出した total RNA を用いて実験を行った (図 11)。

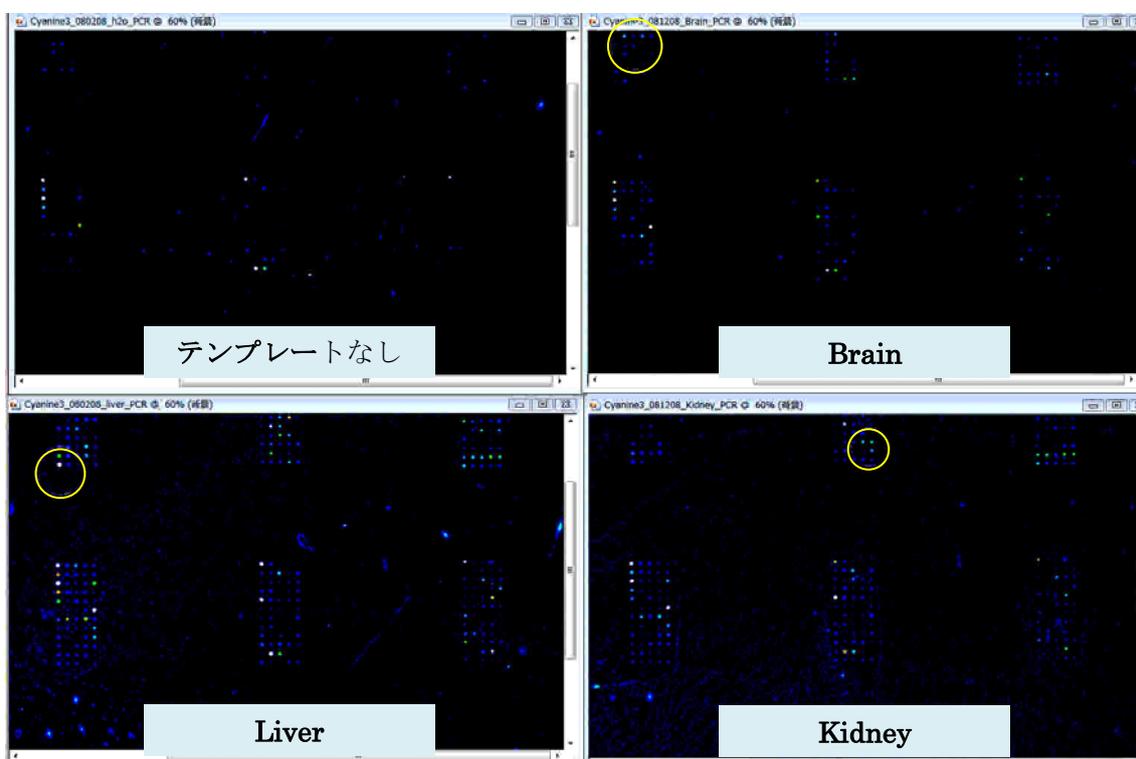


図 11. Brain, Liver, Kidney の total RNA を使用したシグナル検出実験結果

コントロールとしてテンプレートなしの実験も行った。組織ごとに異なるシグナルが幾つか見られ、代表的なスポットを黄色い丸で示した。

更に、ヒトとマウスでは miRNA 分子の約 70% が共通であり、マウスをサンプルとして使用することも想定しているため、ヒトとマウスの臓器での miRNA 検出実験も行った。図 12 はその一例で、肝臓での結果を示した。



図 12. ヒトおよびマウスの肝臓を用いた miRNA 発現量の解析

ヒト (左側) で発現量が多いものを黄色の丸で、マウス (右側) で発現量の多いものを赤色の丸で示した。

発現している分子のパターンはよく似ているが、その中でもヒトあるいはマウスに特異的な分子が発現しているのが分かった（注：マウスではシグナルの得られないスポットもあるので画像だけでは判別不能である）。

マウスにて miRNA 分子を検出可能であることが明らかになったため、研究代表者が以前に共同研究していた、ストレス前後での遺伝子発現変動解析に用いていたサンプルを使用して、miRNA の発現変動について実験を試みた。血液、脳、肝臓、腎臓、肺について実験を行い、そのうち血液（図 13）、肝臓（図 14）、肺において良好な結果が得られた。残りはサンプルの長期保存により RNA そのものが劣化した可能性もあり、今後の検討課題である。



図 13. ストレス負荷マウスの血液を用いた miRNA 発現変動の解析

ストレス前（上）で発現量が多いものを黄色の丸で、ストレス後（下）で発現量が多いものを赤色の丸で示した。

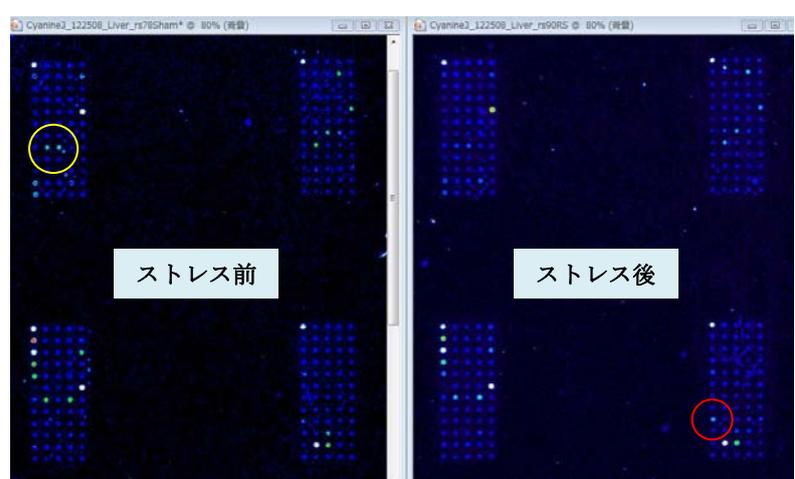


図 14. ストレス負荷マウスの肝臓を用いた miRNA 発現変動の解析

ストレス前（左）で発現量が多いものを黄色の丸で、ストレス後（右）で発現量が多いものを赤色の丸で示した。

以上の実験に用いたストレス負荷マウスのサンプルは既に 5 年以上保存されており、かつメッセンジャーRNA（mRNA）の発現解析に既に使用したものであるためサンプル量に限り

があり、パイロットデータとして解析することは可能であるが、他の実験法での確認実験など更なる解析に発展することは難しい。幾つかでも有意な miRNA の変動が観察された場合には、ストレス関連で新たな共同研究先を探す必要がある。

また、今回用いたサンプルはストレス前後という、コントロールとエンドポイントのみでの実験系である。miRNA は多くの論文で生体器官の発生分化に関わっていることが報告されているため、時系列での発現解析能力が必要になることは明白である。この点に関しては学内に、ヒトおよびマウスの免疫細胞を用いた分化誘導実験系をテーマにしている研究室があり、指導を仰いでいる。図 15 にヒト骨髄系がん細胞である HL-60 を用いた分化誘導に伴う miRNA 遺伝子発現解析実験を示した。

本開発研究中ではまだ予備的な実験までしか到達できなかったが、培養および分化誘導実験に必要な器材は学内にて調達できる目処が立ったため、分化誘導に関わる miRNA 分子の発現変動について時系列での解析に取りかかる予定である。

またデータは示さないが、微量サンプルにも対応するため、血液一滴（数十 μ l 程度）より small RNA 分画を精製して、miRNA の発現量を測定できた。最近の報告で各種の体液中に miRNA 分子が分泌されているとの記述があるため、その役割を究明するためのツールとしても使用できることが明らかとなった。

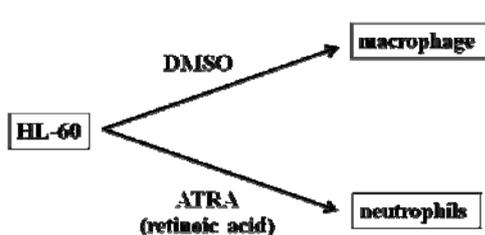
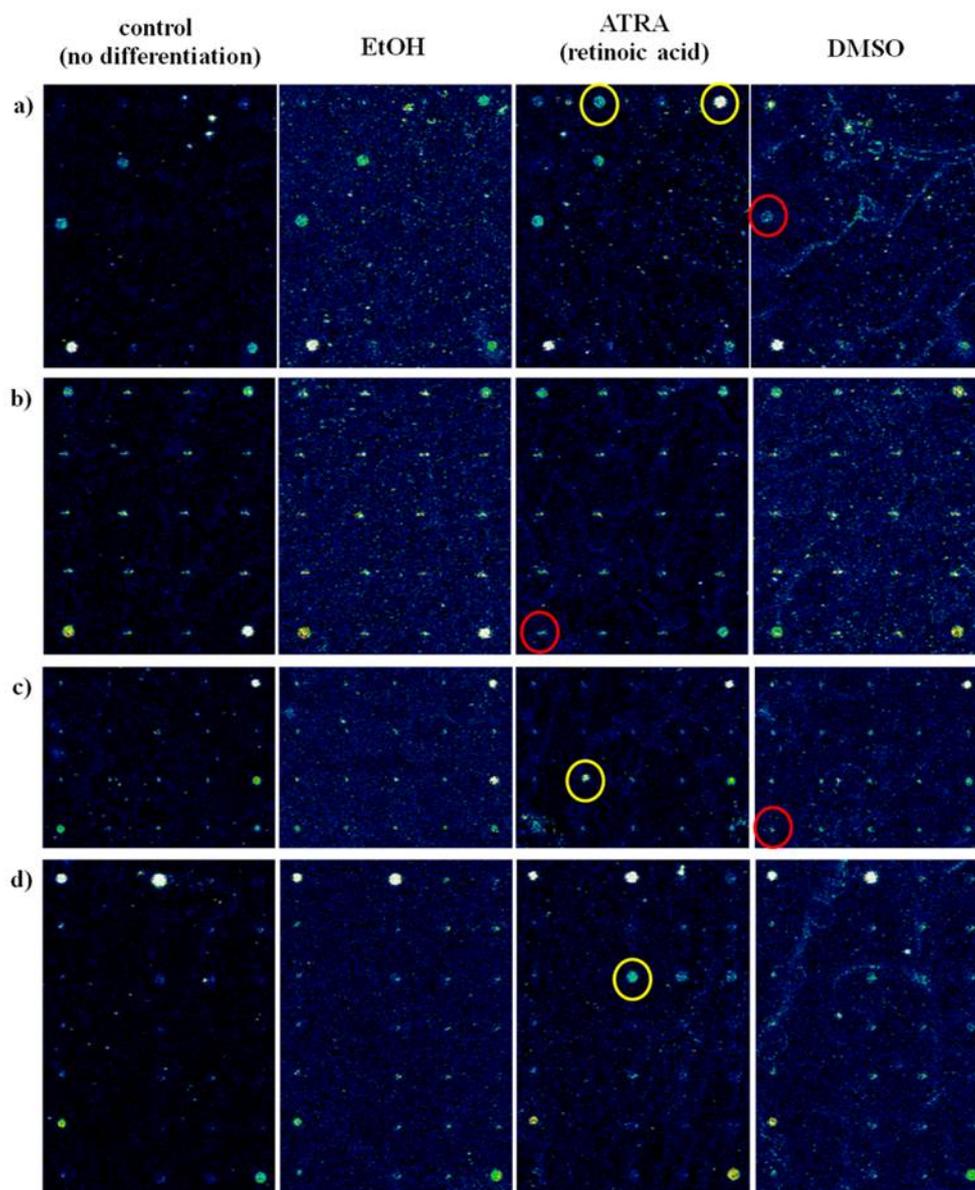


図 15. ヒト HL-60 細胞の分化誘導に関わる miRNA の解析
 ATRA (レチノイン酸) により好中球に、DMSO によりマクロファージに分化する。EtOH は ATRA の溶媒。特異的に発現が上昇した miRNA のスポットを黄色い○で示し、発現が下降した (抑制された) miRNA を赤い○で示した。カラム a~d はアレイ中の別のスポット位置を表す。

2. 2. 2. 2. 5. 検出結果の可視化についての検討

上にも述べた通り、既存の miRNA 検出ツールが競争相手として存在するため、項目 3. の特徴を更に生かして一般の研究者に広く受け入れられるツールを開発する必要がある。平成 19 年度末までに、蛍光検出の手順をストレプトアビジン-IP と BCIP-CIP による色素沈着反応に置き換えることにより、ターゲット濃度に依存して色素が沈着することを確認できた。その後、検出感度向上や検出のダイナミックレンジを拡大するために様々な実験条件の検討を行ったが、若干の向上が見られるにとどまった。しかし沈着色素を画像データとして取り込む方法として、PC 用スキャナーを用いて画像を取り込むことが可能になり、画像の解像度および濃淡の階調が数段上がった。顕微鏡のデジタル取り込み画像（画像調整済み）と、スキャナーでの取り込み画像を図 16 に示す。顕微鏡では解像度が低く（性能に依存）、また画像の四隅での画像のゆがみも見受けられたが、スキャナーでは平面的に画像をスキャンするため問題なかった。図 17 には検出感度のグラフを示した。

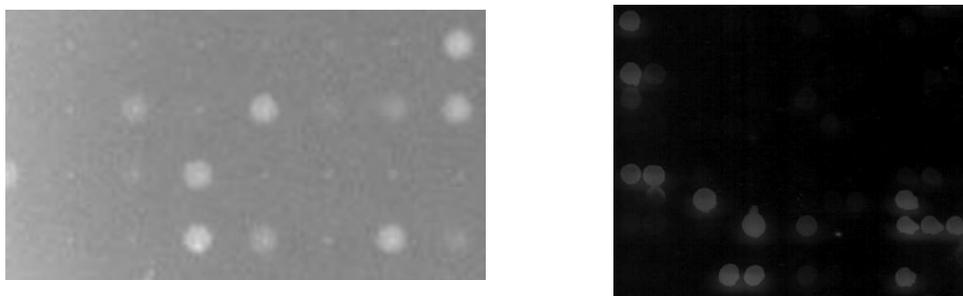


図 16. 色素沈着実験例の顕微鏡画像（左）と PC 用スキャナー画像（右）の比較
両方ともネガ画像に変換しているが、顕微鏡画像のみコントラスト調整を行っている。

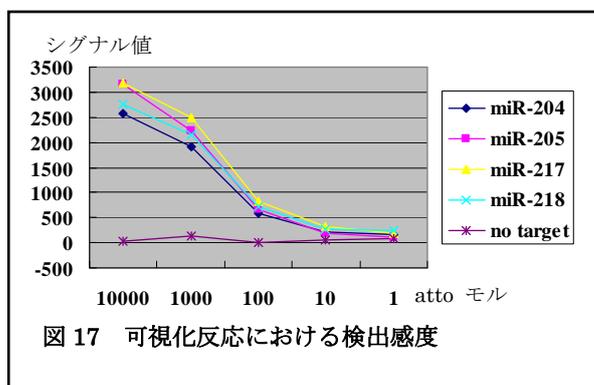


図 17 可視化反応における検出感度

ただし、PC スキャナーの場合にはスライドガラス本体の反射光や、本体が透明なため露光調整がうまくいかないことがあり、ソフトウェア上での設定が必要になる。この点を解消する目的もあり、また沈着色素の量を画像変換する際の効率も考えて、現在住友ベークライトで開発中の白色スライドガラスの使用を検討している。現段階では耐熱温度が 80℃ のため、逆転写反応後の完全洗浄ステップでの加温が十分にできないが、プラスチックの配合調整により耐熱温度を上げられるよう改良を求めている。

2. 2. 2. 2. 6. 反応のサイクル化による感度向上に向けた技術開発

現在の逆転写反応は1回のみであるため、通常のハイブリダイゼーションによる検出よりは高感度であるが、ABI社のTaqMan miRNA PCRキットには到底及ばない。現在は開発目標のattoモル(10の6乗分子)レベルでの検出感度を何とか達成できたところである。この逆転写反応をサイクル化することができれば、PCRのような指数関数的ではないが、リニアにシグナルを増強することが可能になる。それが理論的に可能になるのは、現在のプローブ(プライマー)設計が T_m 値を40-45°Cに設定しており、使用している逆転写酵素の耐熱温度が60-65°Cであることによる。つまり、60°Cと42°Cの2ステップのサイクルを完全に温度調節できれば、熱変性とアニール・酵素反応は可能になると考えられる。

その実現には技術的な開発が必要になる。マイクロアレイは平面上での反応になるため、反応液の温度を完全に制御することが非常に難しい。住友ベークライトの試作機で、アレイの両面からヒートブロックを押し当て、各ヒートブロックの間を移動していく器械により実現に一歩近づいた。しかし実際に反応を行うと、数十マイクロリットルの反応溶液の中でかなり温度にムラがあることが分かった。現在はスライドガラスそのものにも加工を施し、また反応溶液を密封するシール素材の検討も行い、ようやく反応溶液の温度コントロールが可能になってきたところである。ただしまだ量産できる体制ではないため、今後もし引き続き反応条件などを検討して、検出感度の向上に努めていく。

2. 2. 2. 2. 7. まとめ

(1) まとめ

これまでの研究開発によって、当初の3つの目標項目は全て達成できた。また精製total RNA、small RNA分画を用いたシグナル検出実験においても十分に発現解析が可能であることが示された。また現在進行中である培養細胞を用いた分化誘導実験系に於いて、分化に関わるmiRNA遺伝子群の抽出を試みている。以上の実験開発データを学会発表しており、今後論文などで報告することにより本ツールの有用性を認識してもらえよう努力し、今後の製品化に踏み出せるよう研究を継続する。現状での1サンプルあたりの実費は1万円前後であり、製品化に際しても他のキット(クローニングキット等)と同程度のコストでマイクロアレイ解析が可能になると想定される。現在進行中の応用実験例の提示と、可視化技術の実用性が示されれば、本研究開発の最終目標である、「マイクロアレイ実験に精通していない研究者が、通常の酵素反応等と同様に一般的な実験法として採用し、手持ちのサンプルでmiRNAの網羅的発現解析を行い、有用なmiRNA分子を抽出できる」安価な国産技術のツールとして市販化でき、かつ普及する可能性が大きいと考えている。

(2) 実施計画書記載の達成目標に対する到達度

目標であるmicroRNA検出のための基礎技術の開発項目として、1. 検出感度、数attoモルレベル、2. 網羅性と特異性のバランス追求、3. 簡便な実験系の開発、の全ての項目に関してモデル実験系を用いて目標値を達成できた。今後の製品開発に向けて生体サンプルでの実験系も行い、基礎段階をクリアできたと考えている。

研究応用の一例として培養細胞の分化誘導系を用いて、時系列での miRNA 発現解析研究を遂行中であり、ツールとしての性能評価についても今後推進していく必要がある。最後に、既製品との違いを明確にするためにも、項目 3. に関して簡便性を追求するためにレーザーキャナ等のマイクロアレイ専用機器類を使用しない実験検出系を検討することが求められる。以上により、日本独自のツール開発を目指して今後も努力して行きたい。

2. 2. 3 RNA の新規合成基盤技術開発と化学分子設計

集中研②、分室 7（日本新薬）、分室 8（ヤマサ醤油）

共同実施先： 産総研②、東京大学（4；和田）

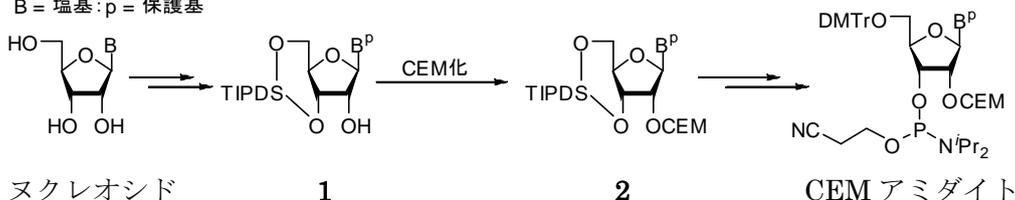
近年 RNA の生命現象に対する役割が次々と明らかにされている。これに伴い、生体内での役割を解析するツールとして純度の高い化学合成 RNA の必要性が高まっている。我々は RNA 合成法を改良し 2-cyanoethoxymethyl (CEM) 基を新規保護基とした新規 RNA 合成法 (CEM 法) を開発したことを既に報告している¹⁾。CEM 基の特長は従来の RNA 保護基と比べ、立体障害が非常に少ない点にある。これは化学合成において 1 塩基ずつアミダイトをつなげていく際の収率へと反映される。また、立体障害が小さいことを利用して、従来困難であった修飾型核酸を化学合成することも可能となる。我々は、この新規核酸合成技術を土台として、新たに見出された機能性 RNA の生体内での機能を検証するとともに、CEM 基の反応性の高さを活用した修飾型核酸を創製し、将来の機能性 RNA の医薬品化に応用できる基盤技術を開発することを目的として検討を行った。プロジェクト前半では、原料アミダイトの合成法、および、長鎖機能性 RNA 合成条件の検討を行い、プロジェクト後半では、修飾体や長鎖合成 RNA の応用を中心とした新規機能性核酸の合成検討を行い、所定の成果を得ることが出来た。本技術は、プロジェクトの成果を、抗ガン剤、抗ウイルス剤といった核酸医薬品や再生医療に応用し産業化するために不可欠の基盤技術である。

2. 2. 3. 1. 原料となる CEM アミダイト合成法の確立（集中研、日本新薬）

新規合成法により RNA を大量に化学合成するためには、その原料となるモノマーブロックすなわち 2-cyanoethoxymethyl (CEM) アミダイトを大量に調製する必要がある。そこで、これを合成する上で鍵反応となる CEM 基を導入する反応（1 から 2 への反応、以下、CEM 化反応と記載）を検討した。この CEM 化反応以外の工程は従来の方法論と類似の条件を適用できるため、この工程を改良することができれば、スケールアップも問題なく対応できる（スキーム 1）。

スキーム 1

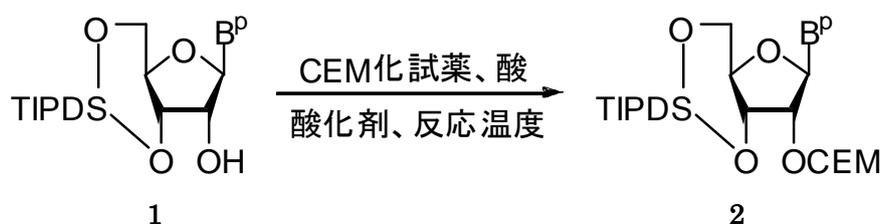
B = 塩基; p = 保護基



既に報告した CEM アミダイト合成法¹⁾ (*Organic Letters*, 2005) における、CEM 化反応

条件では、次のような問題点があった。1) 反応に用いる試薬が高価であり、発煙する程度活性が高く、扱いには特に注意が必要である。2) 反応を超低温で制御しなくてはならないため、スケールアップが困難である。3) 塩基の種類によっては収率が低いものがあり、異なる合成ルートでの合成が必要であった。そこでこれらの問題点を解決するために、1) 反応性が高く高価な試薬類を使用しない方法に変更すること。2) スケールアップが容易とするために反応制御の容易な温度で効率良く反応が進行すること。および、3) 塩基の種類によらず同じ合成ルートで合成できること。以上3点を目標として条件検討を行った。その結果、反応試薬としては、安価で反応性が低く取り扱いが容易なメタンスルホン酸とヨウ素を使用できることを見出した。また、反応温度も従来法より制御が容易な条件である摂氏0度で、塩基の種類によらず高収率で目的とする化合物2を得ることに成功した(スキーム2)。この結果は、平成18年8月に特許出願を行った(特願2006-210439号)。

スキーム2



	酸	酸化剤	反応温度	収率
旧条件	トリフルオロメタンスルホン酸 ^{※1}	N-ヨードスクシニミド ^{※2}	-40℃	45-89%
新条件	メタンスルホン酸 ^{※3}	ヨウ素 ^{※4}	0℃	80-88%

※1 非常に強力な酸で発煙を生じ、通常はアンプルにて保存。日本では劇物に指定。

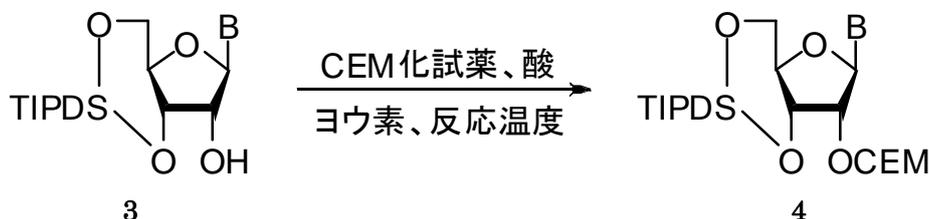
※2 反応性が高く実験室レベルで広く使用されている。反応性が高い反面、試薬の安定性が低く冷凍保存する必要がある。非常に高価である。

※3 発煙は生じず、アンプル保存の必要はない。劇物に指定されていない。

※4 反応性が低く非常に安価である。常温にて保存可能。

次に、CEM アミダイト合成のさらなる改良を目指し、合成ルートの検討を行った。従来の方法では塩基部を保護した後に CEM 基を導入していたが、CEM 基をまず導入してから、塩基部を保護するルートを検討した。この利点として次のことが挙げられる。1) 合成中間体(3, 4等)の結晶性向上により、精製が簡便化できる。2) 塩基部保護基の脱離を回避できる。3) 塩基部保護基導入が簡便化できる。4) 塩基部無保護のモノマーブロックの合成が可能となる。塩基部無保護による CEM 化反応を検討した結果を以下に示す(スキーム3)。

スキーム 3



Entry	塩基	反応温度	酸	収率
1	シチジン	0 °C	トリフルオロメタンスルホン酸 (触媒量)	88%
2	アデノシン	-40 °C→-10 °C	トリフルオロメタンスルホン酸 + BF ₃ · Et ₂ O	94%
3	グアノシン	-40 °C→-15 °C	トリフルオロメタンスルホン酸	41%

シチジン誘導体については、従来に比べ穏和な条件で同等の収率で目的物を得ることができた。アデノシン誘導体においても塩基部が反応しないように条件をコントロールすれば、従来と同等の収率で目的物を得ることができた。本反応ルートは上述のルートに比べて効率的であり、有用性が高いと考えられる。この結果は、平成 19 年 1 月に特許出願を行った(特願 2007-011813 号)。

最後に、原料合成法が確立したことから、RNA 合成の「グラムスケール」までのスケールアップ検討を行った。一般に、「実験室レベル」から「グラムスケール」までスケールアップ出来れば、さらにスケールをあげて、「工業スケール」で合成をおこなうことは、ほぼ障害無く進めることが可能である。CEM 法を用いてグラムスケールで RNA を合成した場合、従来法 (TBDMS 法) と比べ約 3 倍以上の収量が得られることを確認した (データ示さず)。

以上、プロジェクト前半では天然型 RNA 合成のための原料アミダイトの合成法確立に注力し、工業化可能である合成法をほぼ確立することが出来た。

2. 2. 3. 2. 長鎖機能性 RNA (110-mer pre-miRNA) の化学合成 (集中研、日本新薬)

CEM 保護基の特長は従来の RNA 保護基と比べ、立体障害が非常に少ないという点にある。これは化学合成においてアミダイトをつなげていく際の収率向上に反映されるため、数多く連結反応を繰り返す長鎖の RNA 合成において CEM 法は従来法より圧倒的に有利である。従来の RNA 合成法では、鎖長が 30 程度までの短鎖 RNA 合成は可能であるが、鎖長が 50 以上の長鎖 RNA オリゴマーの合成は非常に困難であった。今回、CEM 法の特長を生かし、これまで化学合成としては世界で報告例がない鎖長が 110 におよぶ長鎖機能性 RNA オリゴマーの化学合成を行った。合成した RNA は機能が確認されている²⁾ miR-196a の前駆体 RNA³⁾ (pre-miRNA, 図 1) である。

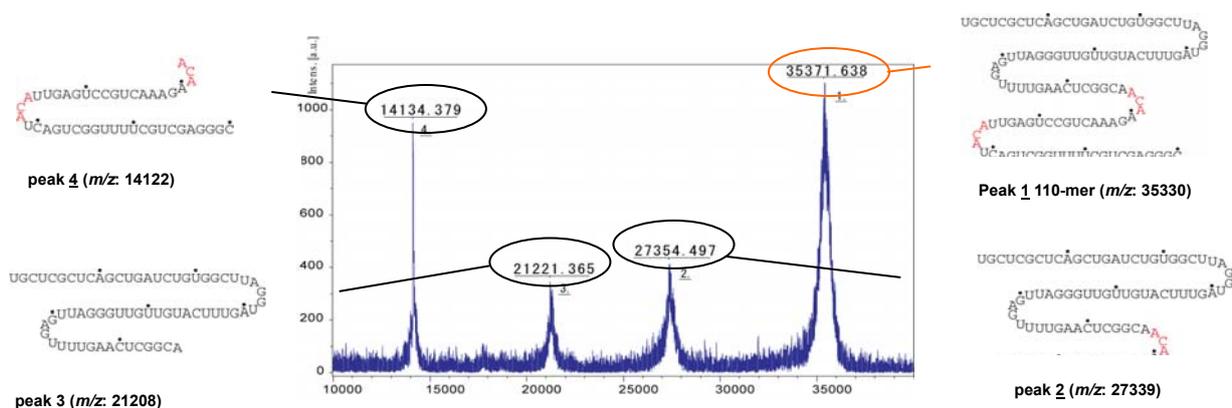


図4. 110-mer pre-miRNA 酵素消化物の TOF-Mass 解析

次に、miR-196a の標的配列を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイ系を構築し、化学合成した 110-mer pre-miRNA の生物活性を調べた。図 5A に示すように、110-mer pre-miRNA は標的とする遺伝子の発現を成熟型 22-mer 二本鎖 RNA と同程度に抑制した。この結果から我々は、化学合成した 110-mer pre-miRNA が細胞内で正常にプロセスされ、生じた miRNA が発現を抑制したものと結論付けた。

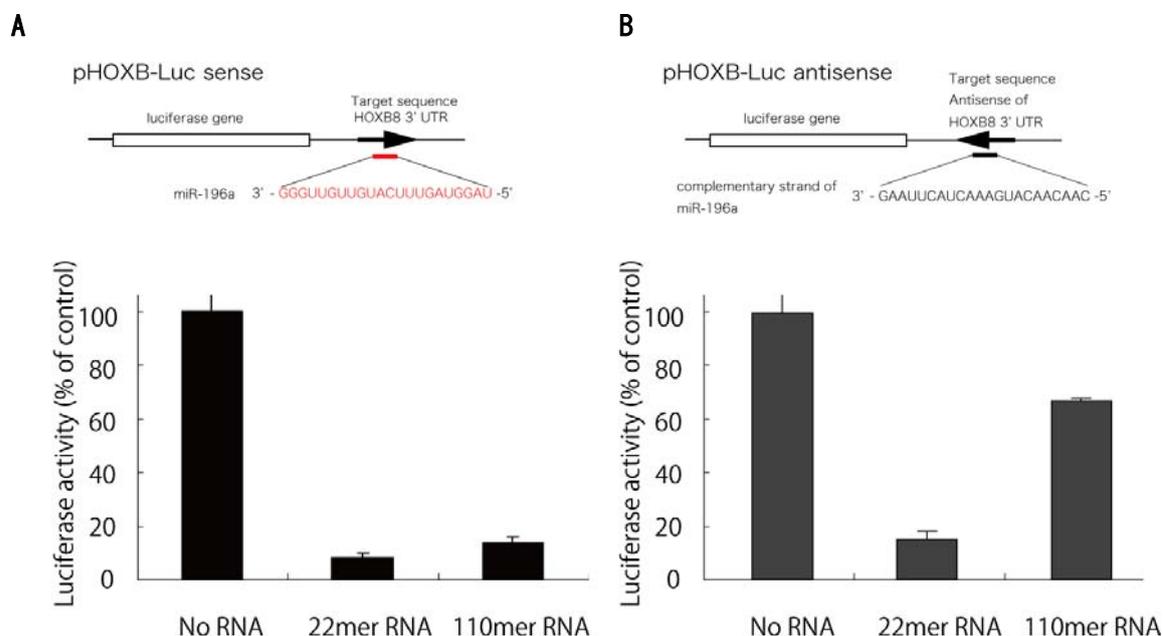


図5. 化学合成した 110-mer pre-miRNA の標的配列のセンス配列(A)とアンチセンス配列(B)をそれぞれ標的として組み込んだレポーター系での発現抑制効果

さらに 110-mer pre-miRNA の標的とする配列の鎖選択性を調べた。成熟型 22-mer 二本鎖 RNA は標的のセンス鎖配列、アンチセンス鎖配列に選択性を示さないのに対し、110-mer pre-miRNA はセンス鎖配列選択的に作用し、発現を抑制することを見出した(図 5B)。この結果は pre-miRNA 特異的な性質を示しており、siRNA を利用した遺伝子発現抑制においてしばしば問題となる相補鎖由来のオフターゲット効果を回避できる可能性を示すものである。

以上まとめると、我々は、CEM 基を用いた新規 RNA 合成法 (CEM 法) を用いることで 110-mer pre-miRNA を高収率、高純度で化学合成した。この配列はこの時点で、世界最長の化学合成 RNA である。長鎖 RNA の構造を確認することは困難であるが、化学合成した 110-mer pre-miRNA を酵素分解と MALDI-TOF MS 分析により構造確認を行った。さらに生物活性を測定し、成熟型 22-mer 二本鎖 RNA とは異なる pre-miRNA に特異的な標的鎖選択性を示すことを見出した。これらの結果から、我々が開発した CEM 法は鎖長が 100 を超える RNA 合成を可能とする実用性の高い方法であり、機能性 RNA 分子を化学合成し、生理機能を解析する方法論が有効である一例を示すことができた。この成果は学術論文として報告した

(*Nucleic Acids Res.*, 2007)。また、長鎖合成 RNA は、共同研究としてプロジェクト内に供給を行い、機能性 RNA の機能解析等に使用した。

2. 2. 3. 3. 人工 mRNA の合成 (集中研、日本新薬)

生体内に存在する RNA には 5' 末端に Cap 構造を持つものが存在し、代表的なものが mRNA である。さらに、タンパク質をコードしない機能性 RNA にも Cap 構造を有しているものがあり、Cap 構造を有する RNA の合成は、機能性 RNA の解析において有意義である。また、mRNA の人工的な合成により新たな応用分野を開く可能性もある。我々は、化学合成による長鎖 RNA の利用の一例として、人工 mRNA の合成を行った。合成したのはペプチドホルモンである GLP-1 の配列をコードした mRNA である。

RNA の 5' 末端を Cap 化するためには、RNA の 5' 末端をジリン酸化する必要がある。しかし、ジリン酸化体の作製は、酵素法では適切な方法が無く、化学的にも、2004 年に報告のあった従来法⁵⁾では副産物が多く、収率が低いためジリン酸化体を得ることは困難であった。そこで、我々は効率的なジリン酸化反応を可能とする新規リン酸化試薬の開発を行った(図 6)。生体内ではリン酸化は免疫反応やシグナル伝達など非常に重要な役割を担っており、開発したリン酸化試薬は合成物質の応用範囲を広げるものと考えている。また、このリン酸化試薬は RNA のみならず、低分子やペプチドなどのリン酸化にも応用可能であり有用性が高いことから、リン酸化試薬およびリン酸化試薬の効率的な精製法について、それぞれ特許出願(特願 2010-10260、特願 2009-279488)を行った。

新規リン酸化試薬による
モデル配列のリン酸化反応

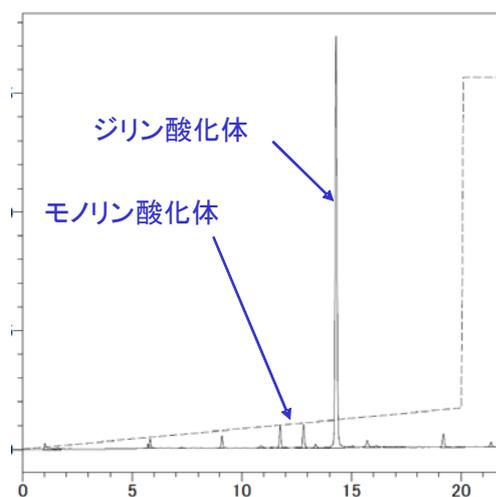


図6. 従来法および新規リン酸化試薬を用いたモデル配列 (3-mer) ジリン酸化反応産物の HPLC(陰イオン交換カラム)による分析

次に、人工 mRNA の合成を行った。作成法の概略を図7に示した。主鎖となる 119-mer～130-mer の RNA を CEM 法で化学的に合成し、次に化学的にモノリン酸化、続いてジリン酸化を行い、ジリン酸化体とした。化学合成したジリン酸化 130-mer RNA は精製後、HPLC で分析し、その純度が極めて高いことを確認した (図8A)。その後、酵素反応にて 5' 末端を Cap 化し、poly(A) polymerase により 3' 末端に poly(A) テール付加反応を行い、5' -UTR の長さや Kozak 配列³⁾の有無を変えた 5 種類の人工 mRNA を合成した。Cap 付加の確認は、5' 末端を含む MazF 切断断片の分子量を MALDI-TOF-MS で測定することで、Poly(A) テールの付加は鎖長をポリアクリルアミド電気泳動で確認することにより行い、それぞれ正しく付加されていることを確認した (データ示さず)。さらに、GLP-1 をコードする 130-mer RNA に CEM 法で 40 mer の poly(A) を付加した 170-mer RNA のジリン酸化体を化学合成し (図8B)、さらに酵素反応で Cap 付加を行い人工 mRNA を作成した。ここで化学合成を行った 170-mer RNA の配列は現時点で世界最長である。

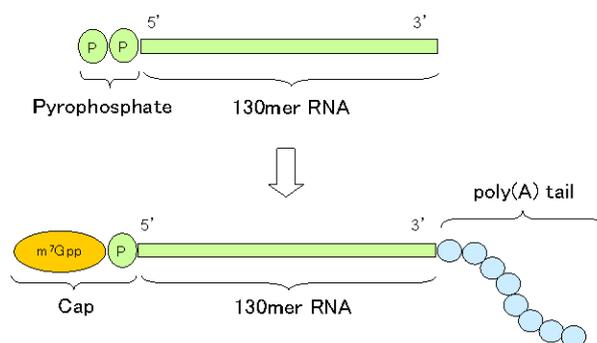


図 7. 人工 mRNA の作成

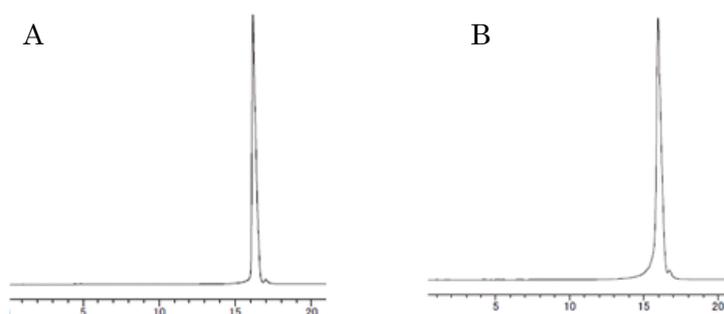


図 8. 130-mer (A)、170-mer (B) のジリン酸化体の HPLC (陰イオン交換カラム) による分析

さらに、合成した人工 mRNA を用い、小麦胚芽無細胞発現系で GLP-1 (7-37) の発現を行った。その結果、主に 5 種類中 4 種類で mRNA 濃度依存的な GLP-1 (7-37) の発現を確認することができた (図 9)。さらに、作成した mRNA をエレクトロポレーション法により HEK293T 細胞に導入したところ、培養細胞においても GLP-1 (7-37) が発現することを確認できた (データ示さず)。

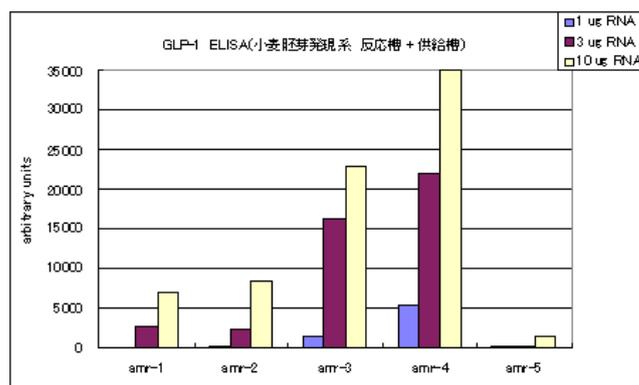


図 9. 無細胞発現系での GLP-1 ペプチドの発現

化学合成により poly(A) を付加した 170-mer mRNA についても小麦胚芽無細胞発現系において GLP-1(7-37) の発現を確認することが出来た (図 10)。

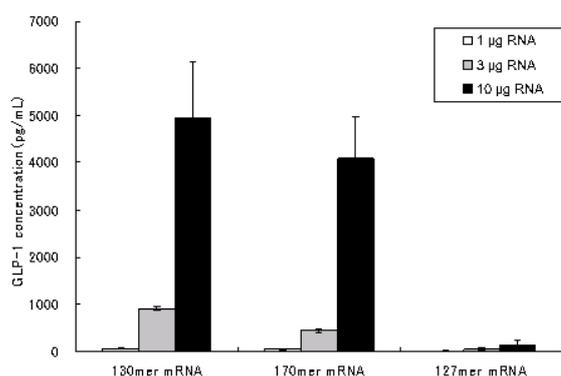


図 10. Poly(A) まで含めた配列を化学合成した 170-mer mRNA の GLP-1 ペプチド発現

以上をまとめると、CEM 法によるこれまでの最長 (110-mer) を超える 119-mer~170-mer の GLP-1 をコードする長鎖 RNA のジリン酸化体を合成した。この過程で、高収率でジリン酸化体が得られる新規のジリン酸化試薬およびリン酸化試薬の効率的な精製法を見出した。次いで、酵素による長鎖 RNA の 5' 末端の Cap 化反応、及び 3' 末端の poly(A) 付加反応を行い、人工 mRNA を合成することに成功した。酵素反応の確認は MALDI-TOF-MS および電気泳動で行い、Cap 構造、poly(A) とともに付加していることを確認した。このようにして作成した mRNA を用いて小麦胚芽無細胞発現系で GLP-1(7-37) の発現を行ったところ、mRNA 濃度依存的な GLP-1(7-37) の発現が認められた。また、作成した mRNA を電圧ポレーション法により HEK293T 細胞に導入したところ、細胞においても GLP-1(7-37) の濃度上昇が認め

られた。

タンパク質をコードしない機能性 RNA と考えられていた RNA が短いペプチドをコードしていた例も見つかっており、また、ショウジョウバエにおける *oskar* RNA のように卵形成の初期には non-coding RNA として働き、胎児形成期には mRNA として働く例も見出されてきていること⁶⁾から、広義の機能性 RNA 解析のためには Cap 構造を保持する RNA で短いペプチドをコードする可能性をもつ RNA も含めた検討が不可欠であると考えられる。また、人工 mRNA の合成はインフルエンザウイルスや未知の RNA ウイルスによるパンデミックに対応できる RNA ワクチン開発の基盤技術となり、新たな医療への応用につながることを期待される。この成果は学術論文として報告する予定である。

2. 2. 3. 4. 非天然型修飾 RNA の合成研究 (東京大学、集中研)

(1) ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成と性質

核酸医薬品の実用化には、生理活性を有する核酸修飾体の開発が必要である。核酸のリン原子部分は核酸修飾の対象の一つであるが、リン原子にキラリティーがあるため、従来の化学合成法で得られる誘導体は多くの立体異性体の混合物となっていた。リン原子の立体配置によって核酸の熱的安定性やヌクレアーゼ耐性などが大きく異なることが知られているため、それらの立体選択的合成は極めて重要な課題である。我々が開発したリン原子の絶対立体配置が完全に制御されたホスホロチオエート DNA の実用的な合成法であるオキサザホスホリジン法⁴⁾を応用して、オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート RNA の立体選択的合成法の開発を行なった (図 11)。

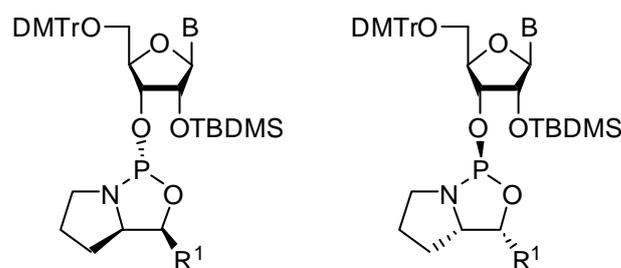


図 1 1. 光学的に純粋なオキサザホスホリジンモノマーの構造

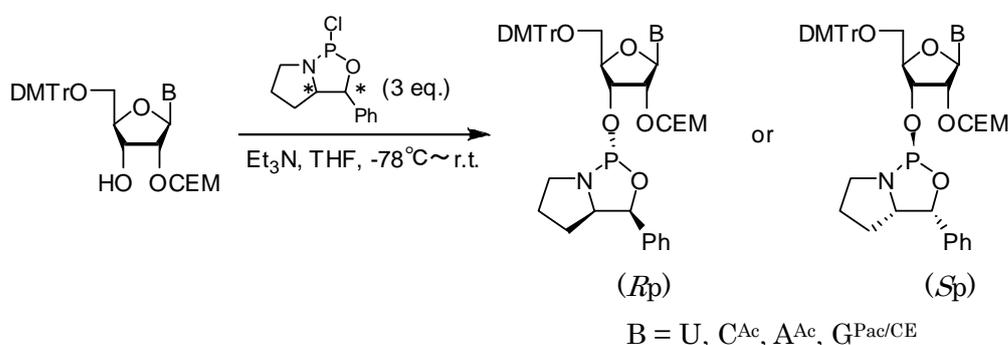
2' -*O*-TBDMS 保護リボヌクレオシド 3' -*O*-オキサザホスホリジンモノマーの立体選択的合成を検討し、4 種類の核酸塩基を有する、光学的に純粋なモノマー *S_p* 体および *R_p* 体を良好な収率で得ることができた。次に、液相法および固相法により、ジリボヌクレオシドホスホロチオエートの立体選択的合成を検討し、ApsU、CpsU、UpsU、GpsU それぞれについて、2 種類のジアステレオマーを 99:1 以上の立体化学的純度で得ることに成功した。さらに、10 量体の固相合成を行ない、光学的に純粋な all-*R_p*-(Ups)₉U および all-*S_p*-(Ups)₉U を得ることができた。2 量体以上の立体化学的に純粋なホスホロチオエート RNA の化学合成は

これが世界で初めての例である。得られたオリゴマーの二本鎖形成能を T_m 測定（高塩濃度条件下）を行なうことにより評価した。all- R_p -(Ups) $_9$ U/(Aps) $_9$ A の T_m 値は 28.9°C であり、天然型 RNA 二本鎖 (Ups) $_9$ U/(Aps) $_9$ A (25.7°C) よりも高い T_m 値を示した。一方、all- S_p -(Ups) $_9$ U は相補的な (Aps) $_9$ A と二本鎖を形成せず、リン原子の立体が制御されていない random-(Ups) $_9$ U/(Aps) $_9$ A の T_m 値は 10.3°C であった。以上の結果は、リン原子の絶対立体配置がホスホロチオエート RNA の二本鎖形成能に大きな影響を及ぼすことを示しており、化学修飾型機能性 RNA の分子設計に対してきわめて重要な知見が得られたといえる。

(2) 2'-*O*-CEM 基を有するオキサザホスホリジン型モノマーの合成

オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート RNA の立体選択的合成は、これまで一般的な保護基である 2'-*O*-TBDMS 基を用いていた。ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成の反応効率を高め、種々の配列ばかりでなく長鎖への応用を可能とするため、RNA 合成において高い縮合収率が期待できる 2'-*O*-CEM 基を有するモノマー S_p 体および R_p 体の合成を検討した。原料に対してキラル補助基を導入したところ、いずれの塩基の S_p 体および R_p 体の合成においても、高立体選択的に (>99:1) 反応が進行することが確認された（スキーム 4）。本モノマーを用いて、UpsU の固相合成を行い、(R_p)-モノマーからは (S_p)-UpsU が、また (S_p)-モノマーからは (R_p)-UpsU がそれぞれ 99:1 以上の高い立体選択性で得られることを確認した。また、all-(S_p)-AGCU のホスホロチオエート 4 量体の合成を行い、平均カップリング収率が約 98% となり、TBDMS 基を有するモノマーを用いた場合（約 77%）と比較して、高いカップリング収率を示した。さらに、ホスホロチオエート 12 量体を高収率で合成することにも成功している。以上の結果より、我々が開発した CEM 基は非天然型修飾 RNA の合成においても非常に有用な保護基であることを証明した。今後は、合成したホスホロチオエート 12 量体の R_p 体、 S_p 体それぞれの酵素耐性を確認する予定であり、その結果が出次第、特許出願および論文投稿を行う予定にしている。

スキーム 4



(3) ボラノホスフェート RNA の合成研究

非天然型修飾 RNA の合成の一環として、核酸のリン原子上にホウ素を導入したボラノホスフェート RNA の合成研究を行った。ホウ素を導入した RNA では、次のような特徴や性質を獲得できると期待できる。

- 1) 化学的安定性の向上（リン酸結合の化学的修飾による）
- 2) 酵素耐性の向上（リン酸結合の化学的修飾による）
- 3) 細胞膜透過性の向上（ホウ素原子の疎水性による）
- 4) 低毒性（ホウ素原子は生体内に存在する原子である）
- 5) ホウ素中性子捕捉療法への適応（ホウ素の核分裂によるがん放射線治療）
- 6) 高 siRNA 活性

我々が開発した 2' 位水酸基の保護基である 2-cyanoethoxymethyl (CEM) 基を用い、ボラノホスホトリエステル法により、ボラノホスフェートアデノシンダイマー ($\text{Ap}^{\text{b}}\text{A}$) を合成することに成功した。合成したダイマーはリン原子にキラリティーを有するが、立体異性体を分割することにより、光学的に純粋なボラノホスフェート RNA ダイマーを単離することに成功した。さらにこれら光学的に純粋なダイマーが以下のような特性を持つことを明らかにすることができた。

合成したボラノホスフェートダイマー $\text{Ap}^{\text{b}}\text{A}$ は 2 分子の poly(U) と三本鎖複合体を形成した。その融解曲線を解析した結果、 S_p 体と推定されるボラノホスフェート $\text{Ap}^{\text{b}}\text{A}$ は天然型である ApA より poly(U) に対して高い親和性を示し、 R_p 体と推定される $\text{Ap}^{\text{b}}\text{A}$ は天然型より低い親和性を示すことが明らかとなった (図 12)。一方、poly(dT) に対するこれらダイマーの親和性は同程度であった。また、 S_p 体、 R_p 体どちらの異性体もヘビ毒ホスホジエステラーゼやヌクレアーゼ P1 に対して高い酵素耐性を示した。これら結果は、ボラノホスフェートダイマー $\text{Ap}^{\text{b}}\text{A}$ はオリゴヌクレオチドに組み込むための有用な合成シントンの可能性を有していることを示している。特に、 S_p 体と推定されるボラノホスフェートを有するオリゴヌクレオチドは、天然型のオリゴヌクレオチドより RNA に対して高い親和性を示し、高い特異性が期待できることから、基礎研究および診断の分野において機能性 RNA の単離や検出へ応用が期待される。これらの成果について、論文発表、及び学会発表を行った。

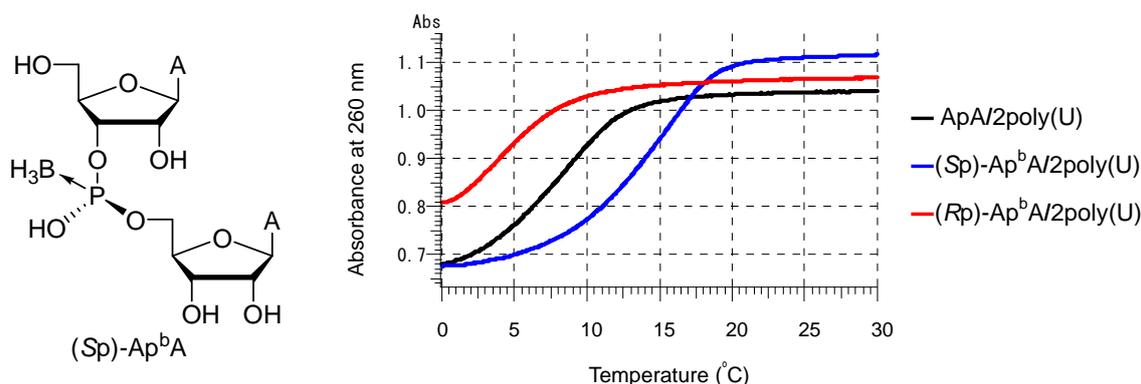


図 1 2. Ap^bA と poly(U) との融解曲線

今後は、東京大学と日本新薬で共同研究契約を締結し、立体選択的な新規修飾核酸合成法の開発研究を継続したいと考えている。その一例として、A以外の塩基でもボラノホスフェートダイマーが合成できることを確認した後、このボラノ修飾を RNA オリゴマーへ導入し、他の修飾体を上回る生物活性を示す RNA オリゴマーを開発していきたいと考えている。

2. 2. 3. 5. まとめ

「CEM アミダイト合成法の確立」により原料アミダイトの大量合成が可能となったことから、H19 年度より CEM 法による研究用試薬としての RNA 合成事業を開始した。さらに、核酸医薬品の原料合成を目指して、グラムスケールでの核酸製造法を確立し、核酸製造メーカーに対して新規 RNA 合成法の技術移管を行った。「長鎖機能性 RNA の化学合成」により新規 RNA 合成法は、合成純度、収率において従来法よりも優れており、鎖長が 100 程度の長鎖 RNA 合成が可能であることを実証した。「人工 mRNA の合成」は、広義の機能性 RNA 解析のためには不可欠である Cap 構造を保持する RNA の合成を実現し、また、ペプチド発現や抗ウイルス作用への応用の可能性を示した。また、その過程で新規ジリン酸化反応法を開発した。「非天然型修飾 RNA の合成研究」では、通常、立体異性体の混合物となるリン原子上に修飾を加えた RNA の光学的に純粋な修飾体合成を行った。光学的に純粋な化合物は、単一の化合物であることから、医薬品として考えた場合、活性本体の純品であり、活性および規格の面で有利である。

本プロジェクトにおいて、我々は国内 6 件、海外 2 件、合計 8 件の特許申請を行った。今後 CEM 法は、長鎖 RNA の世界的な標準合成法の一つとなることが期待できる。長鎖 RNA、修飾 RNA の需要は、世界の RNA 研究が進展するにつれて年々増加しており、試薬、診断薬、および核酸医薬品への利用が考えられる。これらの成果は、核酸を医薬品として応用する上での基盤技術として産業発展に役立つものと考えている。

2. 2. 3. 6. 参考文献

- 1) Ohgi, T., Masutomi, Y., Ishiyama, K., Kitagawa, H., Shiba, Y. and Yano, J. (2005) A new RNA synthetic method with a 2'-O-(2-cyanoethoxymethyl) protecting group. *Org. Lett.*, **7**, 3477-3480.
- 2) Yekta, S., Shih, I.-H. and Bartel, D.P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, **304**, 594-596.
- 3) Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A.J. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D140-D144.
- 4) Ohkubo, A., Aoki, K., Seio, K. and Sekine, M. (2004) A new approach for pyrophosphate bond formation starting from phosphoramidite derivatives by use of 6-trifluoromethyl-1-hydroxybenzotriazole-mediated O-N phosphoryl migration. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 979-982
- 5) Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8125-8148
- 6) Jenny, A., Hachet, O., Závorszky, P., Cyrklaff, A., Weston, M.D., Johnston, D.S., Erdélyi, M. and Ephrussi, A. (2006) A translation-independent role of oskar RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development*, **133**, 2827-2833
- 7) Oka, N., Yamamoto, M., Sato, T., Wada, T. (2008) Solid-phase Synthesis of Stereoregular Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates Using Bicyclic Oxazaphospholidine Derivatives as Monomer Units. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 16031-16037

2.3 機能性RNAの機能解析

【成果の概要】

研究開発項目③では、機能未知の ncRNA 群の中から重要な機能を果たしている機能性 RNA を取得し、その機能解明を行うことを目指す。中間目標（平成 19 年度）は、様々な側面の解析から機能性 RNA 候補をできるだけ多く取得し、それらの実験系を整備することであり、最終目標（平成 21 年度）は、その中から重要な機能性 RNA の機能を解明し応用研究への道筋をつけることにある。ncRNA 群の中でも世界的な激しい競争が予想される miRNA については、サブ項目③-1 で、参加グループの有する有用かつユニークな細胞系から効率よく機能性 miRNA を単離し、それらをいち早く特許化して医療技術応用を見据えた機能解析を実施した。一方ほとんど基盤知見がないその他の ncRNA については、サブ項目③-2 で、ncRNA の隠された新規 RNA 特性や生体機能を発見することを目指した。

③-1 では、再生医療関連やアレルギー疾患関連の細胞から調製した低分子 RNA の大量配列解析を行い、併せて 1300 種以上の新規 miRNA 候補を取得し特許出願した。さらにこの中から幹細胞の分化制御活性やマスト細胞の脱顆粒制御活性をもつ機能性 miRNA とそのターゲットの候補を同定した。癌細胞増殖の制御活性のある miRNA とその標的 mRNA を同定し、マウスゼノグラフトで長期的な miRNA 効果の持続を確認した。また miRNA の個体レベルでの機能解析を実施するために、特定の miRNA のノックアウトマウスを作製した。その結果、下垂体機能産生ホルモンの合成経路を miRNA が制御していることを見出し、この miRNA 破壊によって雌性不妊となる興味深い表現型を見出した。この他に iPS 細胞の作出効率を著しく上昇させる miRNA を同定した。これらの成果は世界的に活発な miRNA 研究分野の中でも、十分オリジナリティの高い成果であり、これらの miRNA を用いた医薬品開発の重要な基盤技術になることが期待できる。

③-2 では、データベースから選別した長鎖 ncRNA の基盤情報として、組織特異的発現と核内局在という二つの基盤的特性を見出した。次いで核内 ncRNA の機能解析のための効率よいノックダウン系を世界に先駆けて開発し、この系を活用して核内構造体形成能を持つ ncRNA や DNA 複製に呼応した転写制御に関する ncRNA 機能を発見した。さらに長鎖 ncRNA の相互作用タンパク質の同定のための解析系を整備し、癌や神経変性疾患タンパク質との相互作用を見出した。またセンス-アンチセンスペアを形成する ncRNA を約 3000 ペア選別し、ヒトの腫瘍組織で発現バランスが変動するペアを多数発見した。このほかに間葉系幹細胞の分化に伴って発現変動する ncRNA 様転写物から小さなペプチドをコードするものを取得した。また線虫からリボソーム生合成に関わる機能性低分子 ncRNA を取得した。

miRNA 経路の中心的な因子である Argonaute ファミリーでショウジョウバエの生殖組織で特異的な Piwi, Aub, Ago 3 が新規低分子 piRNA 群と複合体を形成し、一方体細胞の Ago2 が内在性の新規低分子 esiRNA 群と結合していることを見出した。これらは、主にゲノム中の可動性因子のサイレンシングを行いゲノムの安定性維持に関わることを明らかにした。さ

らに miRNA とは全く異なる piRNA の生合成経路のモデルを提唱し、piRNA の両末端形成機構に関する基盤を確立した。さらに複数のヒトやマウスの Argonaute タンパク質と結合している miRNA の情報を得た。

全体的に、新しい機能性 RNA カテゴリー確立を含めた多数の新規機能性 ncRNA の発見、そして RNA 機能に留まらず相互作用タンパク質の同定を含めた多彩でオリジナリティの高い成果が得られ、当初掲げていた最終目標を大きく凌ぐものとなった。③-1 では予想以上の多数の機能性 miRNA を取得し特許化まで漕ぎ着け、医薬品開発に向けた個体での解析にまで研究が進行した。③-2 でも長鎖 ncRNA についての基盤特性とそれに即したオリジナルな解析系が確立され、ncRNA の新機能の発見に至った。また相互作用因子の解析から ncRNA と疾患との接点を見出すに至った。また piRNA や esiRNA のような全く新しい機能と生合成に関する知見を得る事ができた。このように ncRNA 全般をカバーした質の高い研究が展開できた。また基盤的な知見にも疾患との接点が見出されており、今後の新しい医薬品開発の全く新しい視点を提供することができた。

【研究開発方針】

世紀の変わり目に現れた「機能性 RNA」には、RNA 干渉の発見から派生したマイクロ RNA(miRNA)と、ポストゲノム解析として実施されたトランスクリプトーム解析により発見された長鎖 noncoding RNA(ncRNA)が含まれる。このうち miRNA に関する研究は、世界中で非常に勢いで多彩な研究が進んでいる。miRNA は、ヒトでは数百種類見出されており、個々の miRNA が複数の標的 mRNA に対して作用するので、ヒトの全タンパク質遺伝子の半数以上が miRNA によって発現調節を受けると見積もられている。miRNA の研究進展が目覚ましいのは、一重にすべての miRNA に対して一般化できる共通の作用機構が明らかになっているからである。miRNA は、共通して標的 mRNA の 3' 非翻訳領域と塩基対を形成して結合し、標的 mRNA の翻訳を抑制したり、mRNA の安定性を低下させる機能を果たしている。よって個々の miRNA が、いかに重要な mRNA を標的にしているかを明らかにすることに研究が移行している。標的となる mRNA には、癌を初めとした多数の疾患遺伝子の転写物が含まれるので、この発現を抑制する miRNA を発見できれば、有望な核酸医薬品開発の標的となりうるわけである。また miRNA と標的 mRNA の相互作用を人為的に操作することによっても疾患発症経路を改善することが可能である。このようなコンセプトのもとで、miRNA の医薬品応用のポテンシャルに注目が集まっている。

一方、トランスクリプトーム解析によって明らかにされた長鎖 ncRNA については、その膨大な配列情報が故に様々な可能性が取りざたされており、新たなゲノム機能として注目が集まっている。例えば、ゲノム中の非コード領域の割合は、ヒトでは実に 98%にも及び、この値は生物が単純になればなるほど減少する傾向にある。バクテリアでは 10%程度である。よって非コード領域から生み出される ncRNA が生物の複雑性を規定するような新たな役割を果たしているという仮説が生まれた。こうした推測とは裏腹に、機能が解明されている長鎖 ncRNA は、せいぜい 20 種程度であり、その機能も遺伝子発現の様々な段階での制御に及んでおり、miRNA のような一般化できる制御メカニズムは今のところを明らかにしていない。また長鎖 ncRNA は、細胞のどこで機能しているのか、あるいはどのような発現形態をとるのか、といった基盤情報も欠如している。さらには、ncRNA はそれ自身だけでは機能できず、タンパク質と複合体を形成し作用していると考えられるが、そうした相互作用因子の情報もほとんど存在しない。つまり配列情報から機能解明との間には大きなギャップが存在していると言わざるを得ない。こうした状況から、世界的にも長鎖 ncRNA の機能解明は、未だほとんど進んでおらず、研究体系を基盤から組み立てる必要性が求められているといえる。前述の miRNA は、ゲノムから産生される低分子 ncRNA の一種であるが、実は低分子 ncRNA には、miRNA 以外にも様々な種類のものが存在していることが明らかになり始めている。つまり miRNA の一般的な機能は、数ある低分子 ncRNA の 1 つに過ぎず、低分子 ncRNA のポテンシャルはまだ奥深いことが明らかになり始めている。

上記のような状況の中で、本研究開発項目では、第一に miRNA 機能に焦点をあわせ、疾

患や再生医療の分野の新たな技術基盤となりうる機能性 miRNA の獲得を目指すグループ(③-1) と、一方で未だ基盤が整わず混沌とした長鎖 ncRNA の基盤的な機能解明と低分子 ncRNA の新しい機能解明によって、全く新しい機能性 RNA 機能の発見を目指すグループ (③-2) の2つの研究体制によって研究を推進した。

【各研究室における成果】

2. 3. 1. ヒト疾患に関連する機能性RNAの迅速で高効率な同定

2. 3. 1. 1. ヒト疾患に関連する機能性RNAの同定とその機能解析

分室9（協和発酵キリン）

共同実施先： 大阪大学（岡部）、岡山大学（清水）

2. 3. 1. 1. 1. 疾患関連 miRNA の同定、発現・機能解析と創薬への応用

（協和発酵キリン）

我々は「機能性 RNA」の中でも、作用機構がある程度判明しており、生物学的な機能が明らかになりつつあったマイクロ RNA (miRNA) に集中して研究を遂行してきた。miRNA は 22 塩基長前後からなる低分子機能性 RNA であり、発生や分化等の重要な生物学的過程に関与していることが明らかになっている。miRNA と疾患との関係については、本プロジェクトの開始時点には判明している事項は多くなかったが、近年、癌をはじめとする様々な疾患に miRNA が関与することが次々と明らかになってきた。そのため miRNA は創薬標的としても急速に注目を集めつつあり、過剰な miRNA を抑制すること、あるいは不足する miRNA を補充することで、疾患を治療しようという試みが世界中で始まっている。欧米ではこうした「miRNA 創薬」を標榜するベンチャー企業も多く設立され、既に臨床試験に入る薬剤も出てきているなど競争が激化しつつある。

我々は、「疾患関連 miRNA の同定、発現・機能解析と創薬への応用」を協和発酵キリン（株）（2008.9 まで協和発酵工業（株））、「遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの miRNA の機能解析」を大阪大学・岡部研究室、「ヒト癌患者由来の臨床検体を用いた miRNA 発現・変異・機能解析と疾患・治療への応用」を岡山大学・清水研究室で行うという役割分担を行い、研究を遂行した。特に、厳しい競争や急速な外部状況の変化に柔軟に対応し、臨機応変に研究戦略を修正しながら研究を進めた。

2. 3. 1. 1. 1. 1. 疾患関連 miRNA の同定、発現・機能解析と創薬への応用

協和発酵キリン（株）では、1. 新規の miRNA を発見し強力な知財権を取得する、2. 疾患に係る miRNA の新たな機能を見出し、診断・治療への応用への道筋をつける、という 2 つの目標を立てて研究を進めた。本研究の開始当時は、miRNA をはじめとする低分子 RNA 研究の方法論が確立されていなかったため、同定、発現・機能解析に必要な手法を自ら開発しつつ、研究を推進した。

（1）新規ヒト miRNA の同定

miRNA の発現は組織・細胞によって大きく異なることが予測されたため、新規 miRNA 取得のためのソースとしては、「疾患への応用が期待されかつ解析が進んでいなかった（2005 年当時）」ヒト細胞を選択した。具体的には、1）再生医療等への展開が期待されるヒト間葉系幹細胞(hMSC)、2）免疫・アレルギー領域での展開が可能なヒトマスト細胞株（肥満細胞）の 2 種を材料に選択した。方法は、当初は＜低分子 RNA をプラスミドにクローニングして配列解析(hMSC、マスト細胞)＞という方法で実施したが、その後＜MPSS (Massively

Parallel Signature Sequencing)法による解析（マスト細胞）>を導入し、より大量の低分子 RNA の配列解析を実施した。

得られた低分子 RNA が miRNA か否かを判定するためには、その前駆体の予測と二次構造予測が必要となる。我々は取得される大量の低分子 RNA 断片情報を効率的に解析するために独自のシステムを構築した。既存の相同性解析、二次構造予測プログラム等を自作スクリプトで連結することで、配列解析からクラスタリング、ゲノムマッピング、二次構造予測、miRNA の可能性判定までを、自動的に実施できるシステムを完成させた（図 1）。

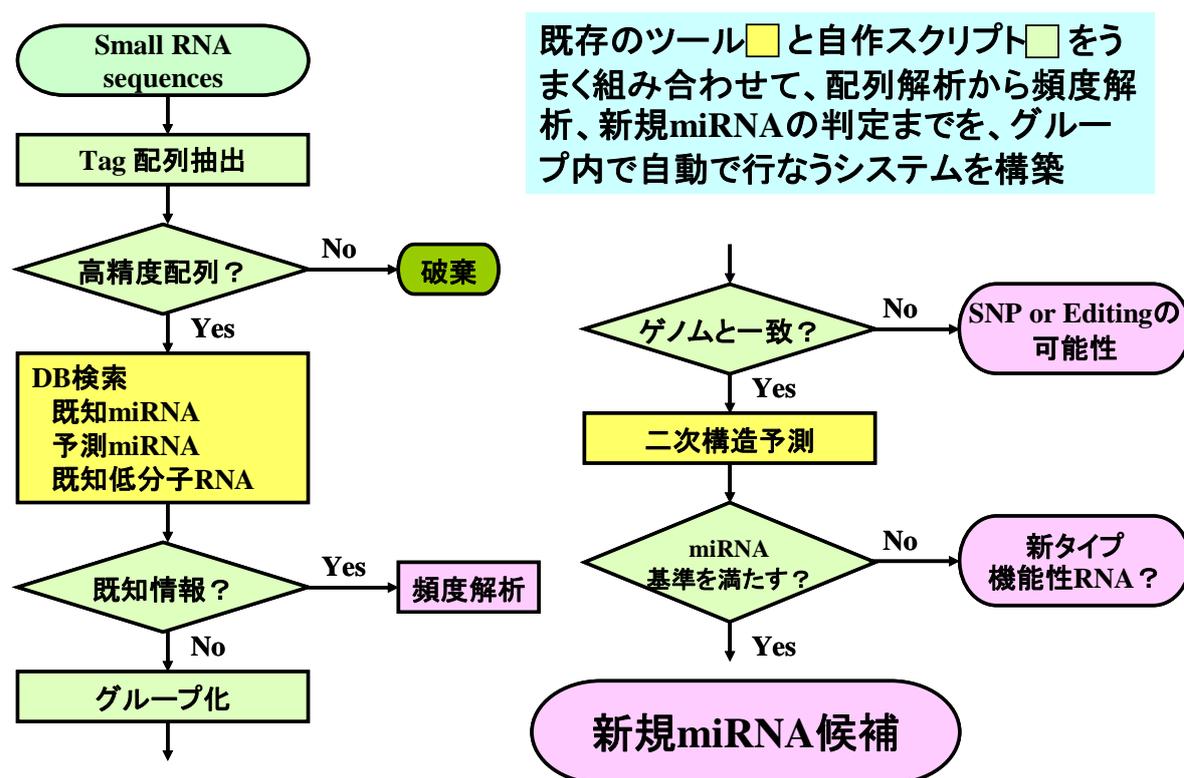


図 1. 低分子 RNA 断片からの miRNA の自動判定システムの構築

まず、hMSC を対象に miRNA のクローニングを実施した。hMSC より低分子 RNA 画分を分画し、Bartel 研&Tushul 研の方法を改良して低分子 RNA ライブラリを作製、そこから計 3584 配列を上記の<低分子 RNA 配列解析・miRNA 自動判定システム>を用いて解析した。得られた配列の 75%が既知の miRNA と一致し、極めて良質のライブラリが作製できた。配列解析の結果、総計 29 種の新規 miRNA 候補の同定に成功、物質特許を出願した。

続いて、ヒトマスト細胞株 LAD2 を用いて同様のクローニング、配列解析を実施し、計 5442 配列から新規 miRNA 候補 33 個を同定した。さらに新規 miRNA と発現情報の取得のため MPSS 法を実施した。大量配列処理に対応できるように改良した miRNA 判定システムを用い、約 100 万の取得配列から全 43305 種の Small RNA 配列情報を解析、新規 miRNA 候補として 1303 個を同定した。クローニング由来のものと合せ計 1336 種の大量新規 miRNA 候補について

2006.12に物質特許を出願した。この解析数は次世代シーケンサー登場前の当時としては極めて大量である。その後の3年間にヒトmiRNAのデータベース(miRBase)登録数は470(2006.12:Ver. 9.1)から904(2009.9:Ver. 14.0)へと約2倍に増えたが、増加分の434個中、13%の57個が我々の特許出願配列中に含まれており、多くの新規miRNAの取得を達成することができ、今後の優位性につながると考えられる。また、残りの配列中にも大量の真の新規miRNAが含まれていると考えられる(図2)。

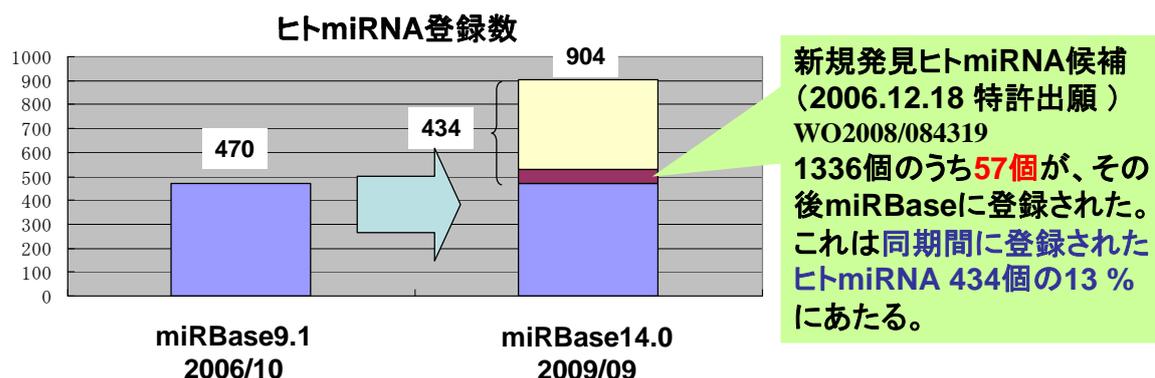


図2. 新規特許出願 miRNA の現況

(2) miRNA の標的予測

miRNA の機能解析のためにはその標的遺伝子の同定が必須である。標的予測については様々なアルゴリズムが提唱されているが、未だ決定版はない。我々はまず公開されている4種のアルゴリズムによる予測結果を一つに統合し、標的候補遺伝子を取り出すシステムを開発した。続いて最新のmiRNA標的認識理論に基づきゲノム及びcDNA配列から網羅的に標的候補配列を抽出し、遺伝子領域にマップするプログラムmiGTS(miRNA Global Target Search)の独自開発を実施した。「3' -UTR領域の推定」「種間保存性」を加味した予測も可能とし、本法を用いて全ヒト・マウス既知miRNAの標的予測を実施しWebから結果を容易に取得できるようにすると共に、新規取得のmiRNAの標的予測も可能とした。特にhMSCやマスト細胞、癌細胞への導入で表現型を示したmiRNAや、大阪大・岡山大で着目したmiRNAについては詳細解析を実施し、Wet実験へと進める標的の選抜に役立てた。

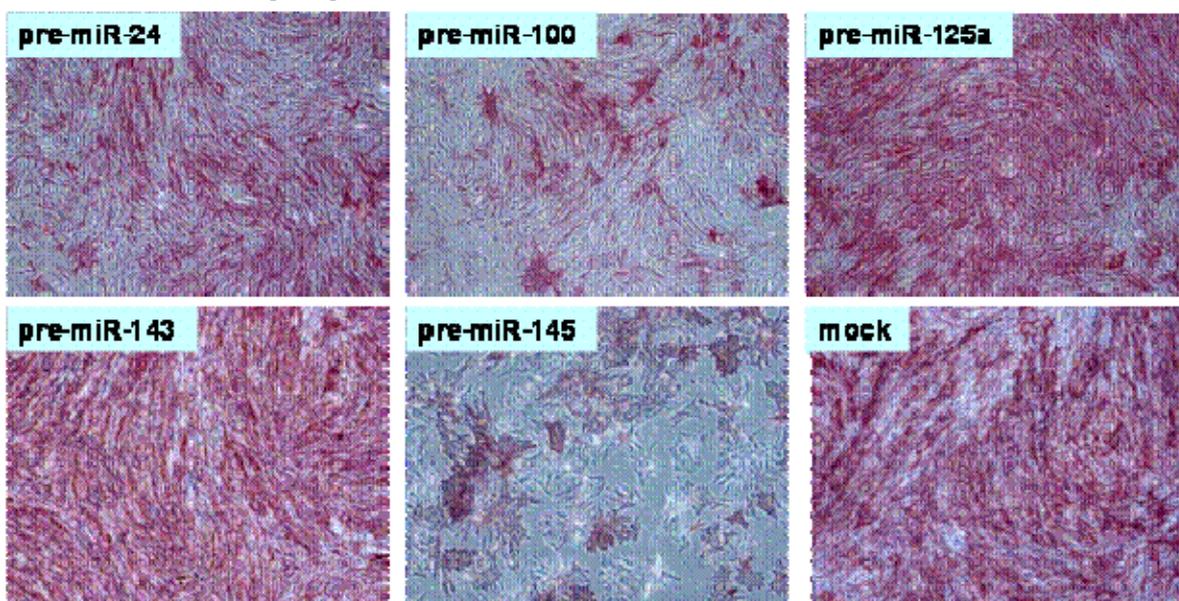
(3) ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の分化に関与するmiRNAの解析

hMSCの骨芽細胞及び脂肪細胞への分化に伴う発現変動をmiRNAマイクロアレイとリアルタイムPCRにより経時的に調べ、特徴的な発現変動を示したmiRNAについて前駆体導入実験を実施した。その結果、miR-145等5種のmiRNAが骨芽細胞への分化及び増殖抑制活性を有することを見出した(図3)。

特に強活性を示したmiR-145については、独自に構築した標的予測システムmiGTSを用いて標的遺伝子候補を4種選抜し、各々のsiRNAをhMSCに導入した。その結果、細胞骨格蛋白質Adducin3または転写因子CBFbのsiRNA導入によりmiR-145導入時と類似の骨芽分

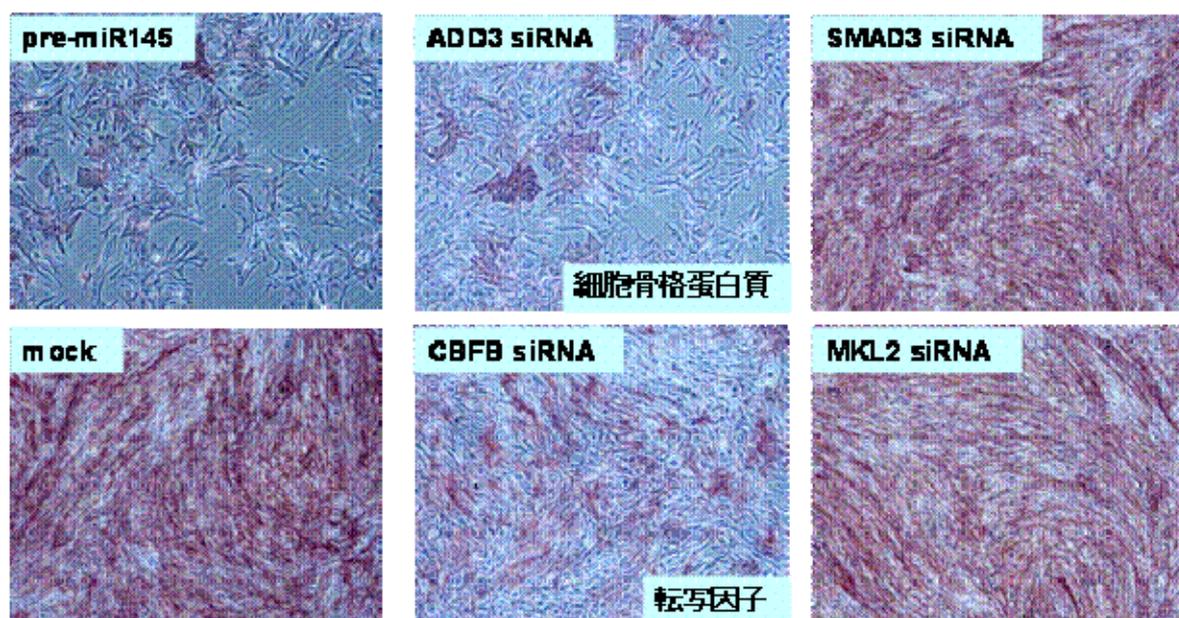
化誘導の抑制が見られた（図4）。miR-145 前駆体の導入時に両蛋白質の発現量が減少することも、両者が miR-145 の標的であることを強く示唆する（図5）。以上の結果から miR-145 が骨芽細胞分化を制御していると考えられ、これは hMSC の分化への miRNA 関与を示す初めての知見であり、特許出願を実施した。さらに、持続的な miRNA 発現を目指して、レンチウイルスベクターによる miRNA 発現系を構築し、hMSC への強制発現を確認した。

pre-miRNAを導入したhMSCを骨芽分化誘導させ、
2週間後にalkaline phosphatase染色にて分化した細胞を検出 (導入濃度20nM)



miR-145: hMSCの骨芽細胞への分化と増殖を抑制
miR-100, miR-24: 骨芽細胞への分化を抑制

図3. 骨芽細胞分化・増殖を抑制する miRNA の同定



ADD3 siRNA: hMSCの骨芽細胞への分化と増殖を抑制. miR 145導入に類似
CBFB siRNA: 骨芽細胞への分化を抑制 (終濃度 20nM)

図4. miR-145 の標的遺伝子の同定

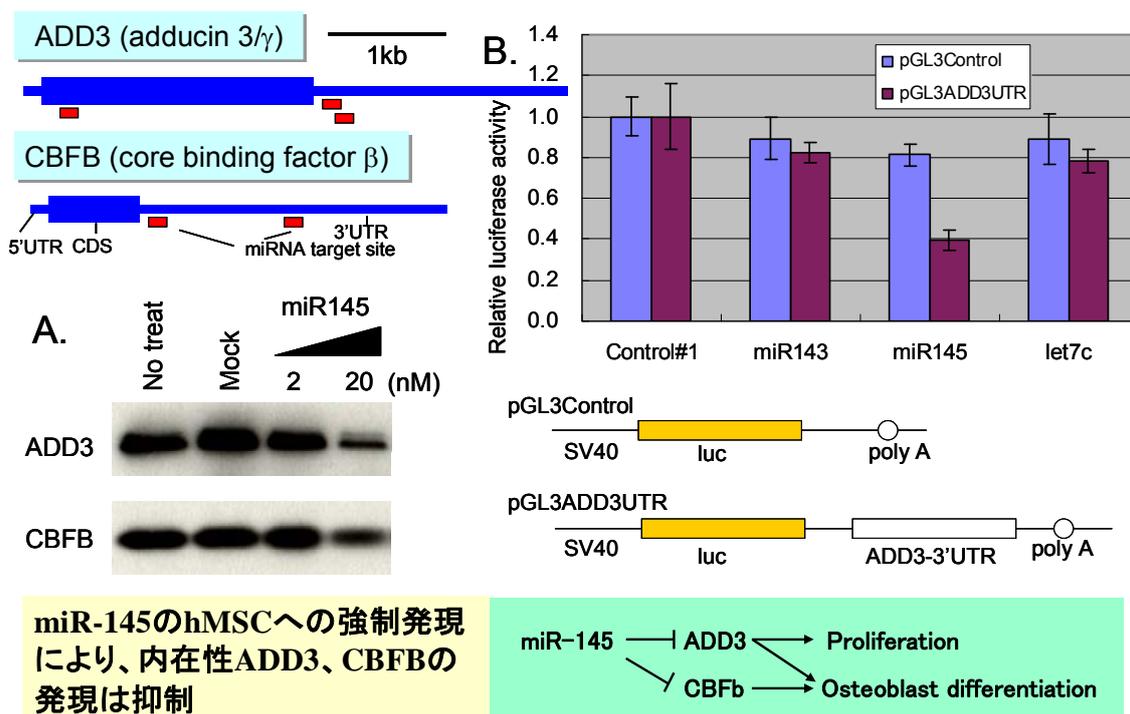


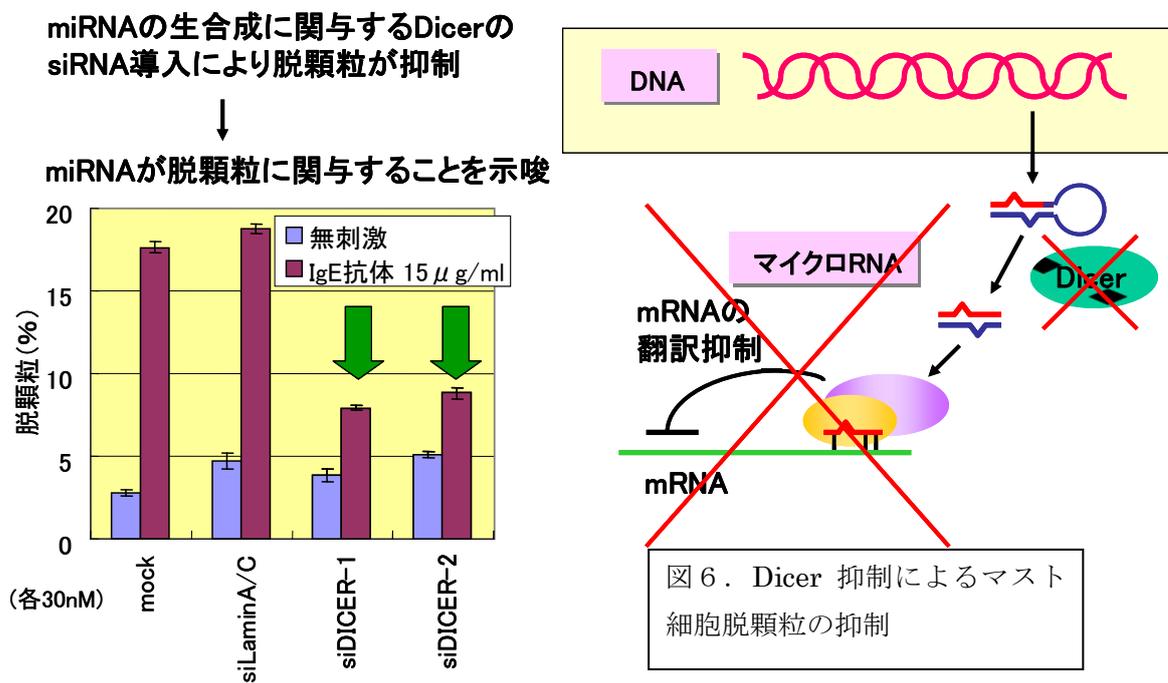
図5. Add3、CBFbはmiR-145の標的遺伝子

A: Western Blotting、 B: レポーターアッセイ

(4) ヒトマスト細胞株由来 miRNA の単離と解析

二番目の miRNA 解析対象として、アレルギー疾患等で中心的な機能を果たし創薬への展開が期待されるマスト細胞を選択した。

まず、ヒト培養マスト細胞株 LAD2 に miRNA の生合成に必要な Dicer 遺伝子の siRNA を導入したところ、2種の異なる siRNA で脱顆粒の抑制が見られた。このことから、miRNA 経路がマスト細胞の脱顆粒に関与していることが示唆された (図6)。



さらにマスト細胞の脱顆粒を制御する miRNA の網羅的スクリーニング（前駆体、アンチセンス）を行い、脱顆粒を抑制する miRNA、促進する miRNA を複数見出し、特許を出願した。その中で、前駆体導入により脱顆粒を促進しアンチセンス導入により抑制する miRNA として、miR-F を見出した。Dicer siRNA による脱顆粒抑制のうち IgE 抗体刺激時の脱顆粒については、miR-F を共導入することにより回復することを示した。一方、IgE 受容体を介さない compounde48/80 刺激時の脱顆粒も Dicer siRNA により抑制されるが、こちらは miR-F の共導入により回復せず、別の miRNA が関与していることが示唆された（図7）。

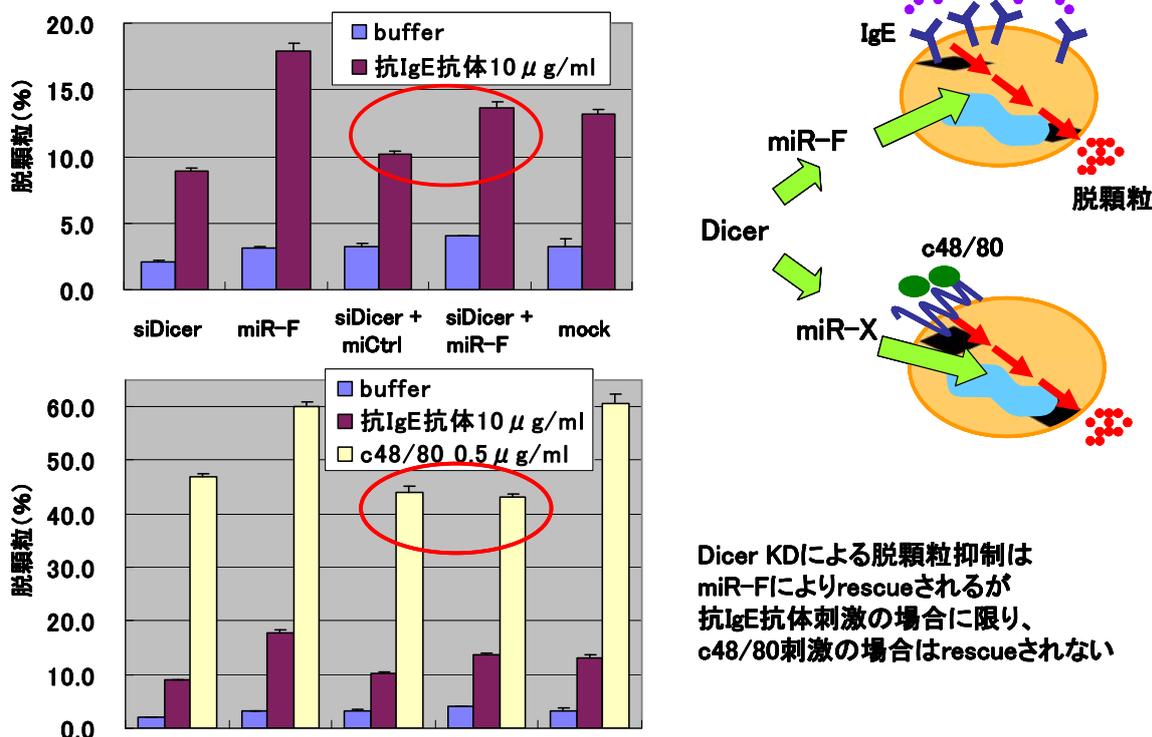


図7. マスト細胞の IgE 依存的な脱顆粒を促進する miRNA、miR-F の同定

そこで、miR-F の標的遺伝子解析を実施し、*in silico* の標的予測、標的候補 siRNA 活性、mRNA アレイ結果などから 4 遺伝子に絞込み、miR-F 導入時の蛋白質発現の抑制が見られた 2 遺伝子を標的として同定した。さらにこの miR-F のノックアウトマウスの作製を阪大と共同で進めた。組換え ES 細胞の樹立からキメラマウスの作製まで終了した。引き続きホモノックアウトマウスの作製を目指した研究が進行中であり、作製できたらマスト細胞をはじめとする血球系の分化に関する影響を個体レベルで解析する予定である。

脱顆粒を抑制する miRNA については、LAD2 における内因性発現も高く、ヒト血球細胞において発現することが確認されている miR-24 に着目し、詳細解析を実施した。miR-24 は *in vitro* における脱顆粒測定試験において LAD2 の IgE 介在性脱顆粒反応を約 5 割抑制することを見出した。この抑制は IgE 介在性の脱顆粒に限っていた (図 8)。

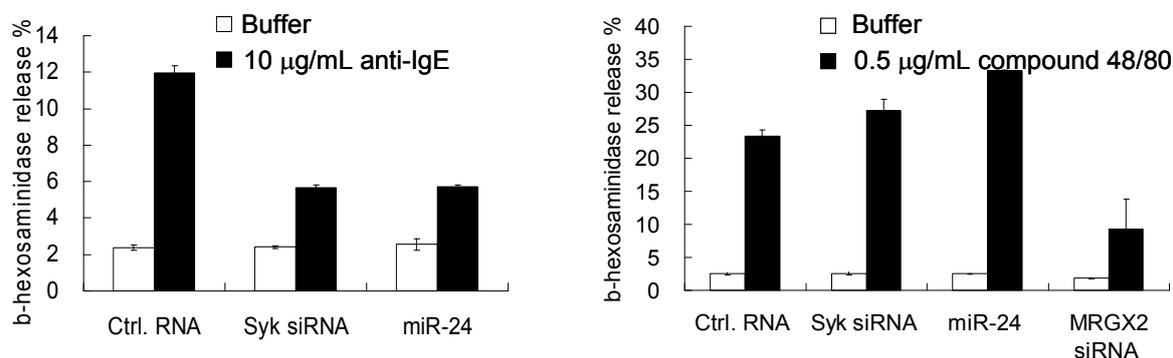


図8. miR-24によるマスト細胞脱顆粒抑制活性
左: IgE依存性脱顆粒、右: IgE非依存性脱顆粒

脱顆粒抑制に関与する miR-24 の標的探索は、miGTS 等による *in silico* 予測と、マイクロアレイによる mRNA 発現プロファイル、そして標的候補遺伝子の siRNA の導入により脱顆粒抑制が起こるか、といった複数の観点を組み合わせた絞込みにより実施した。その結果、MAPK7 (mitogen-activated protein kinase 7)、SIRP α (signal-regulatory protein alpha) の 2 遺伝子を標的遺伝子として同定した。これら遺伝子の標的配列を有するレポーター遺伝子を miR-24 が抑制するが、変異体は影響しないこと、内在性の MAPK7、SIRP α 蛋白質の発現を miR-24 が抑制すること、これら 3 種の遺伝子の siRNA が脱顆粒を抑制すること等から、miR-24 はこれら 3 種の標的遺伝子を介してマスト細胞の脱顆粒を抑制していることが示唆された (図9)。miR-24 は MAPK7 や SIRP α などのシグナル伝達因子の発現制御を介して、IgE 介在性脱顆粒反応を負に制御するという作用機序が想定される。

脱顆粒を促進する miRNA (miR-F 等) の発現・機能抑制剤 (アンチセンス等)、脱顆粒を抑制する miRNA (miR-24 等) の補充剤は、マスト細胞の脱顆粒を抑制することで抗アレルギー薬として展開できる可能性がある。投与法の検討も含め、個体レベルでの評価が今後の課題である。

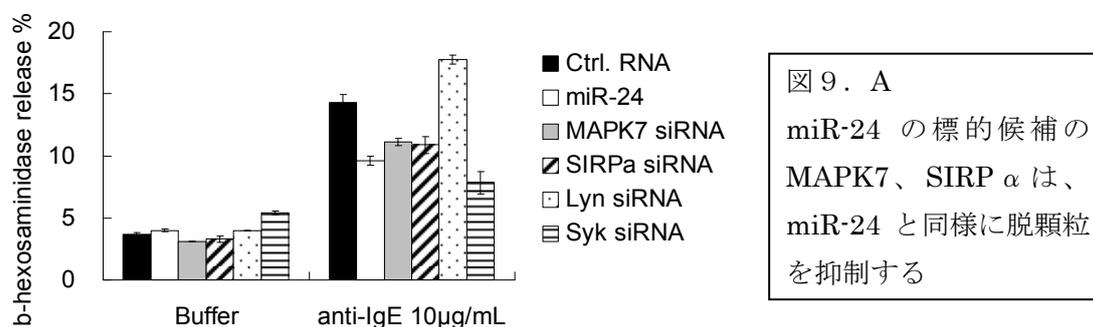
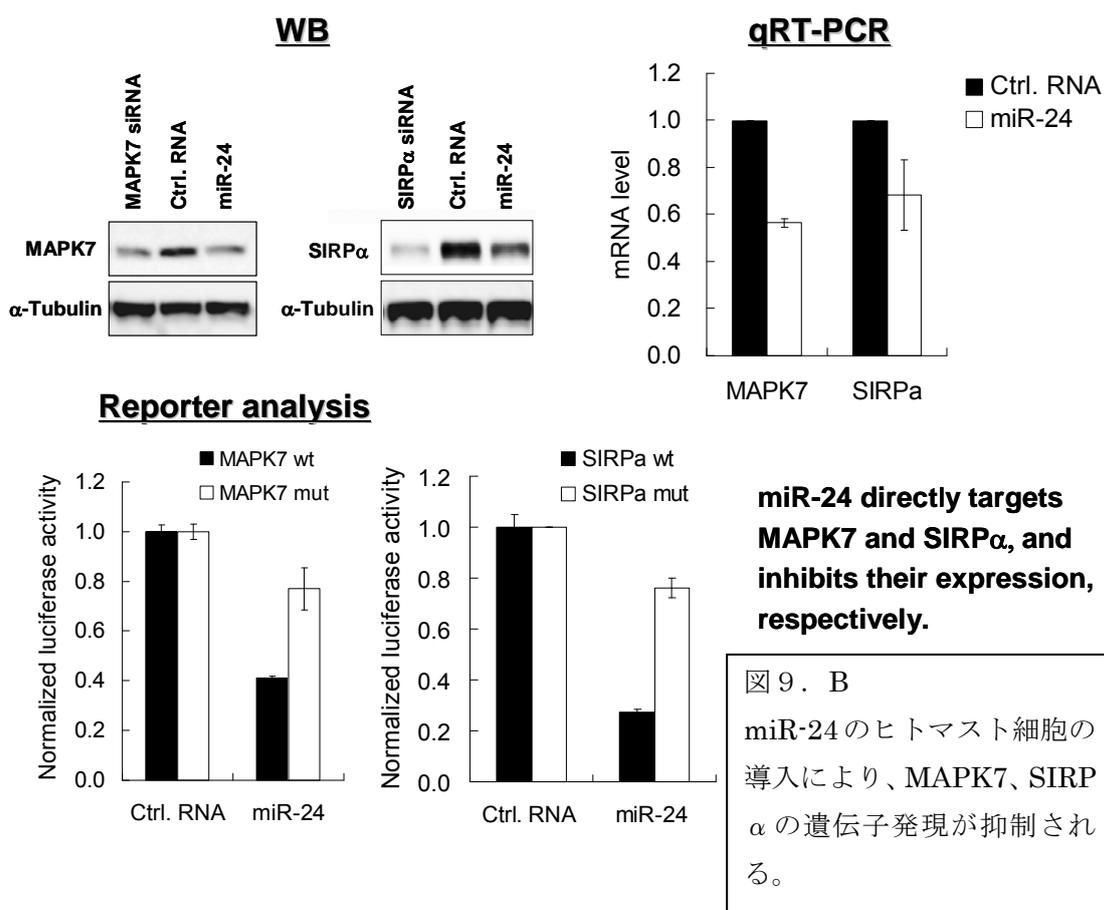


図9. A
miR-24 の標的候補の MAPK7、SIRP α は、miR-24 と同様に脱顆粒を抑制する



(5) 癌細胞の増殖、細胞死に関連する miRNA の探索

最近、癌と miRNA の関係が注目されており、癌細胞での miRNA の発現変化が数多く報告されているが、機能面からの解析はまだ少ない。我々は癌細胞の増殖・細胞死に関連する miRNA を探索するため、miRNA ライブラリの導入による機能スクリーニングを実施した。ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 及び卵巣癌細胞株 A2780 に対して、既知ヒト miRNA を網羅する前駆体、アンチセンス体ライブラリ (miRBase9.2, 各 471 種) を導入し、一次スクリーニングとして抗細胞活性を評価、二次評価として種々の表現型を観察した (図 10)。その結果、強い増殖抑制活性、アポトーシス誘導活性を示す miRNA を多数見出した (図 11)。その中には癌細胞増殖抑制の報告のある miR-15, miR-16, let-7 等が含まれていたのに加え、今まで癌との関係の報告がない miRNA も多数含まれていた。ヒット miRNA 導入細胞の詳細顕微鏡観察から、導入 miRNA により扁平化・凝集化など異なる細胞形態を示すこと、共通シード配列をもつ miRNA は細胞形態が類似していること、を見出した。これらの結果に関しては特許出願を実施した。

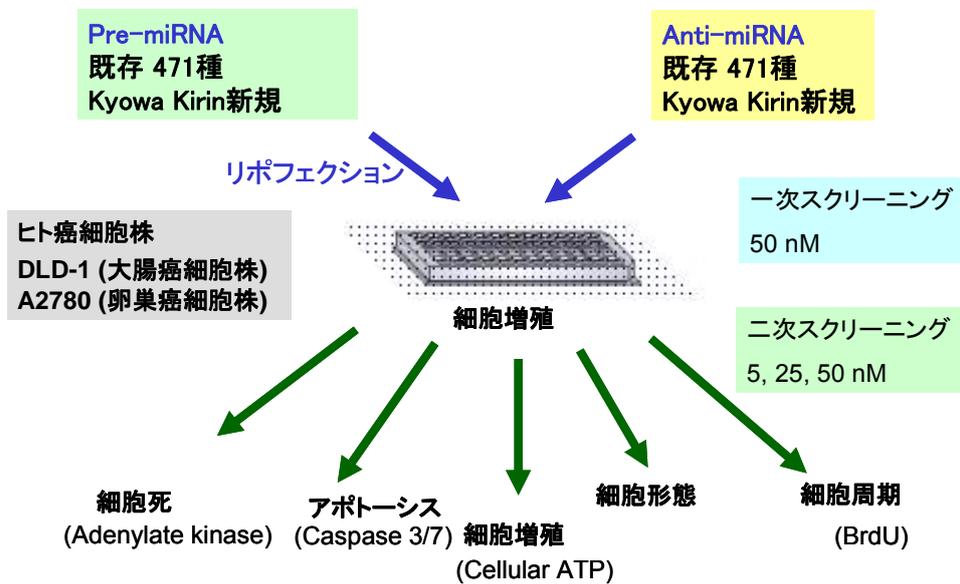


図 1 0 . 癌細胞の増殖・細胞死を制御する miRNA のスクリーニングの方法

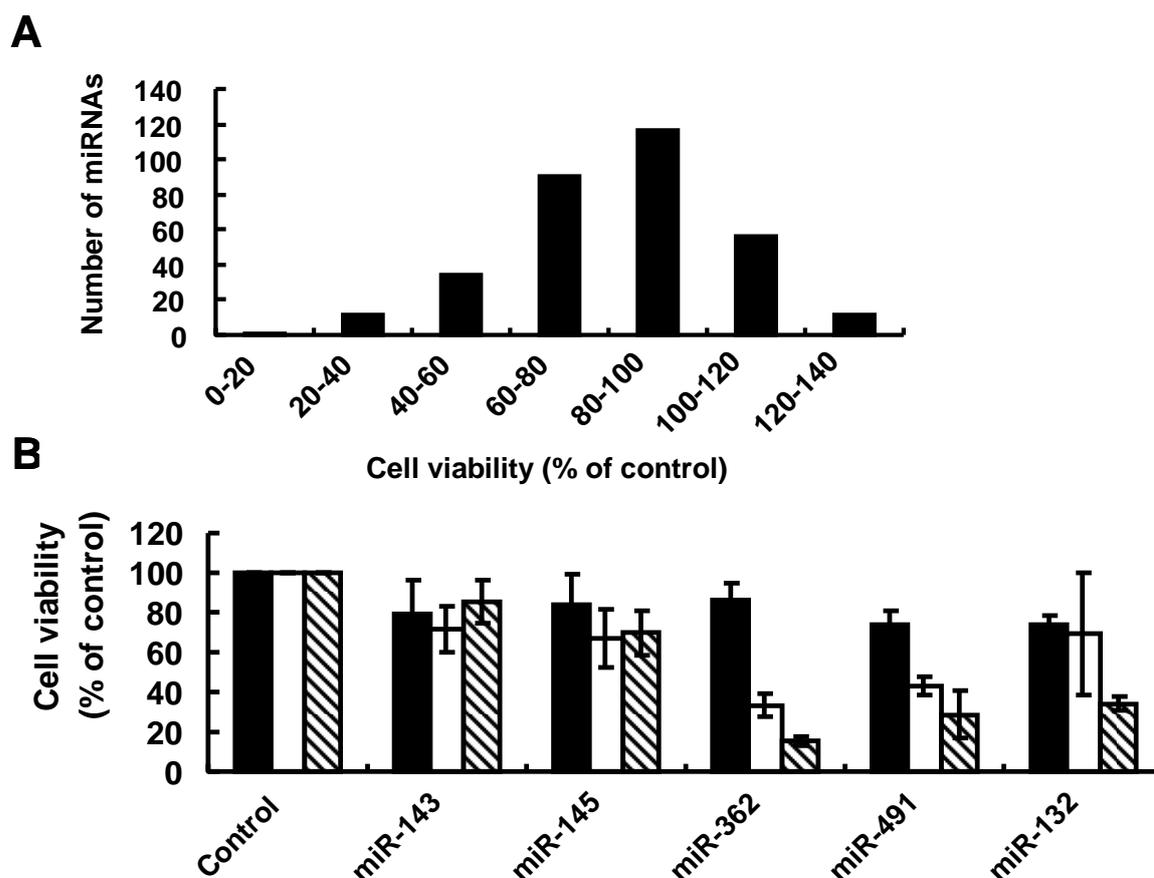


図 1 1. 大腸癌細胞株 DLD-1 に細胞死を誘導する miRNA の探索

A, マイクロ RNA 導入 (50 nM) による DLD-1 細胞における生細胞活性分布
 マイクロ RNA mimic ライブラリをリポフェクション導入、3 日後に生細胞活性を測定。

B, 細胞増殖抑制マイクロ RNA の導入濃度依存性

上位の細胞増殖抑制活性を持つマイクロ RNA を選抜、生細胞活性における導入濃度依存性を検討。5 nM (solid bar), 25 nM (open bar) 50 nM (hatched bar) 導入、3 日後に生細胞活性を測定。miR-143 と miR-145 は公知の大腸癌抑制マイクロ RNA。

これらの中で特に新たに強い抗細胞活性を見出した miR-491 について、詳細解析を実施した。miR-491 を DLD-1 細胞に導入すると、カスパーゼ 3/7 活性化を伴うアポトーシス誘導活性を示した。また、このカスパーゼ 3/7 活性化は DLD-1 のみならず、別の大腸癌細胞株である HCT116 や SW480 でも見られた(図 1 2)。標的遺伝子解析を実施した結果、抗アポトーシス遺伝子 Bcl-XL が標的の一つであることを、ウェスタンブロッティング、RT-PCR、レポーター解析により確認した(図 1 3)。さらに、miR-491 を導入した DLD-1 細胞をヌードマウスに移植したところ、造腫瘍性の抑制が観察された(図 1 4)。本結果については論文発表(Nakano, et. al., International J. Cancer, DOI: 10.1002/ijc.25143)済みである。

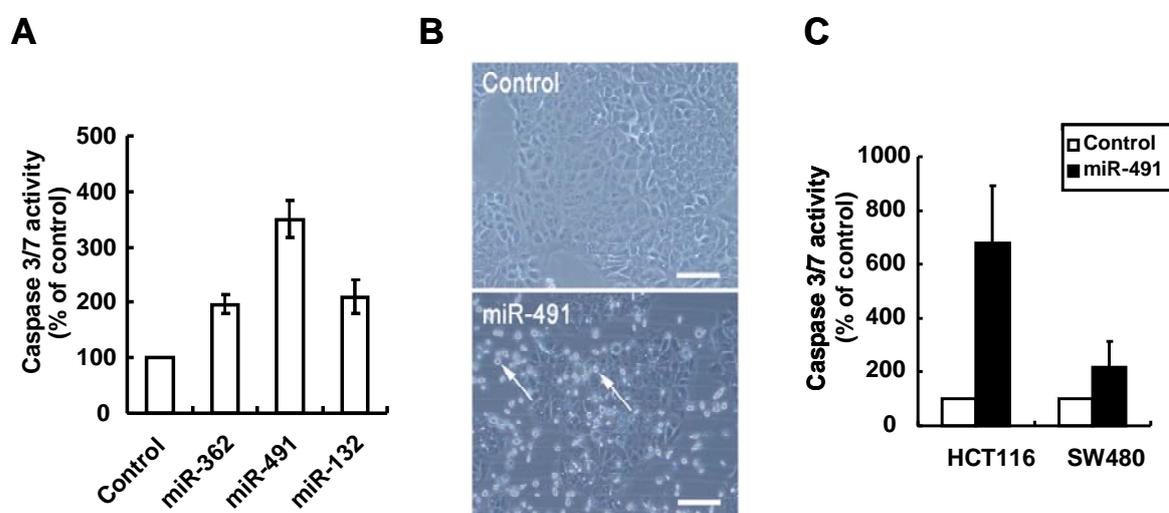


図 1 2. miR-491 によるアポトーシス誘導活性

A, miR-362, miR-491, miR-132 (25 nM) 導入によるカスパーゼ 3/7 活性化 (導入 2 日後)

B, miR-491 (25 nM) 導入による DLD-1 細胞形態 (矢印: アポトーシスを起こした細胞) スケールは 100 μ m

C. 大腸癌細胞株 HCT116、SW480 における miR-491 導入によるカスパーゼ 3/7 活性化 (導入 2 日後測定)

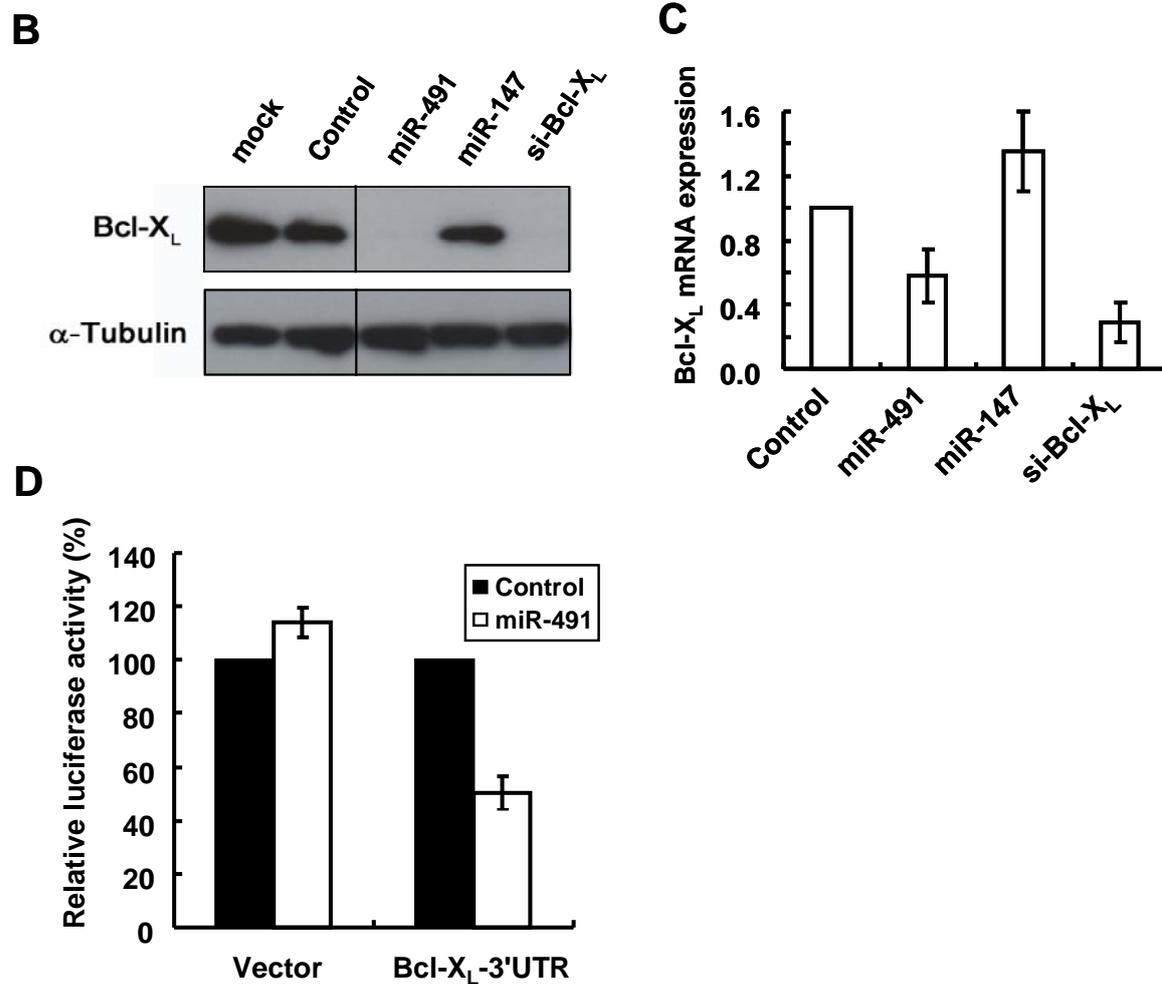


図 1 3 . miR-491 による抗アポトーシス遺伝子 Bcl-XL の発現制御の検証

B, miR-491 導入による Bcl-XL タンパク質発現の抑制(ウェスタンブロッティング)

C, miR-491 導入 DLD-1 細胞における Bcl-XL mRNA 発現制御の検証 (qRT-PCR)

D, Bcl-XL-3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイ pGL3-Bcl-XL-3' UTR と miR-491 (25 nM)を DLD-1 細胞に共導入後、Firefly/Renilla ルシフェラーゼ活性を測定(導入 1 日後測定)

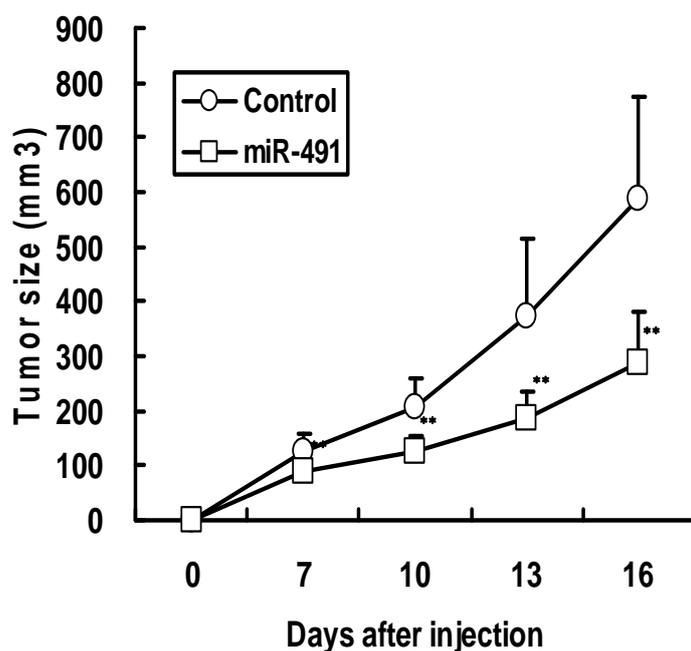


図 1 4. miR-491 による腫瘍形成の抑制

miR-491 (50 nM) 導入した DLD-1 細胞をヌードマウスに移植、腫瘍サイズを測定 (squares) ネガティブコントロール導入区 (open circles) 測定点は 12 腫瘍の平均値+SD (** t-test; $p < 0.01$)

同様にヌードマウスでの腫瘍増殖抑制活性を有する miRNA を他に 2 つ見出している。うち一つは、細胞周期関連遺伝子 cyclin D1 とアポトーシス抑制遺伝子 Bcl-XL の 2 種を共に標的とすることを示した。このように、miRNA は複数の標的を同時に抑制することができるという特徴をもっており、特に抗癌剤創薬への展開において有効である可能性がある。

また、機能スクリーニングにおいては、逆に癌細胞株の増殖を促進する miRNA についても複数見出している。これらについてはアンチセンス等による抑制剤が抗癌剤につながる可能性があり、現在検討を継続中である。

新規に見出した miRNA についても、約 400 本を合成し各種癌細胞株に対する抗細胞活性等の評価を実施した。その中には、既存の miRNA と同程度以上の強い抗細胞活性を示すものも複数見出している。

また、細胞増殖・細胞死以外の指標とした癌に関与する miRNA の探索も行い、細胞周期に影響を及ぼす miRNA を複数見出し、特許出願を行った。

以上の研究から見出した癌関連 miRNA から、個体レベルでの検討、臨床癌との関係等の検討を実施し、抗癌剤への展開を目指した研究を継続していく。

2. 3. 1. 1. 1. 2. まとめ

本プロジェクトを開始した時点では miRNA と疾患との関係を示す報告は極めて限定されたものしかなかったが、この数年で状況は一変し、癌関連を筆頭に疾患に関連する miRNA の報告は急激に増大し、創薬・診断への応用研究を目指す競争も急速に激化している。Non-coding RNA の機能は非常に多種に渡っていると考えられるが、現在のところその作用機構の概要が判明しているのは極めて限られており、我々が本プロジェクトで miRNA にフォーカスして研究を進めたのは、少なくとも産業応用につなげるという点においては妥当な選択であったと考えている。

2005 年の本研究の開始時点で知られていたヒトの miRNA の個数は約 200 余りに過ぎず、我々はまだ新規のヒト miRNA を発見し知財権を確保できる可能性があると考え、間葉系幹細胞とマスト細胞から miRNA の単離・解析を実施した。その結果、新規 miRNA 候補を多数取得、2006 年に 2 件の物質特許出願を行った。現在のヒト miRNA の登録総数は約 900 まで増えているが、数の伸びも頭打ち傾向であることを考えると、少なくとも重要な機能を有する miRNA はほぼ発見されてしまったと考えられる。我々の出願特許に含まれる miRNA のうち 50 余りがその後データベースに登録されたことを考えても、新規の miRNA の発見競争にぎりぎり間に合い、一定の成果を上げられたと考えている。その手法については、バイオインフォマティクスからの予想という手法をとらず、「モノとしてとらえる」ことにこだわったが、結果として種間の保存性が少ないものも含め、効率的な新規 miRNA の取得ができたと考える。特に次世代シーケンサーが利用可能になる前に MPSS 法を用いた大量配列取得を行ったことは、新規 miRNA の取得という点で極めて有効であった。

疾患に関与する miRNA の選抜においては、一般的には DNA マイクロアレイ等を用いた発現プロファイルから始める例が多いが、我々は敢えて異なる「機能スクリーニング」から入るアプローチを採用した。結果として細胞の表現型を変化させる miRNA を効率的に見出すことができたと考えている。機能スクリーニングを多数の miRNA について網羅的に実施するにはハイスループットなアッセイ系の確立が重要であるが、医薬探索で培ってきたノウハウを生かし、効率的な系の構築を実施できた。その結果、「間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化・増殖制御」「マスト細胞の脱顆粒制御」「癌細胞の増殖・分化制御（大腸癌、卵巣癌）」「細胞周期制御」といった多数の系において活性を示す miRNA を多数見出すことに成功し、5 件の用途特許出願を実施できた。医薬応用を考えた場合には発現・機能の両方が重要となることは言うまでもないが、特に「miRNA の補充による治療」を考えた場合には、疾患部位での該 miRNA の発現は必須ではないので、こうした機能スクリーニングからのアプローチの方が、有効に活性 miRNA を多数とらえることができたと考えている。

また、miRNA の機能解明には標的遺伝子の同定が極めて重要である。この分野の研究はまだ発展途上であり決定版となる方法は確立されていないが、我々はその時点での最新のサイエンスと自分達で確立した miGTS 等の方法論を効率的に組み合わせ、生物学的な意義も加味して多数の重要な miRNA の標的を同定することに成功した。また、開発した標的予測法は大阪大学、岡山大学の注目した miRNA の標的予測にも役立たせることができた。

今後の実用化に向けての応用という観点では、癌分野が最も近いと考えている。癌細胞

に増殖抑制・細胞死誘導を起こすことを見出した多数の miRNA の中には、臨床癌で正常臓器よりも発現の低下が見られるものが複数含まれている。そうした癌に該 miRNA を補充することによって、癌を治療するという戦略が考えられる。図 1 4 で示したように既に腫瘍増殖抑制活性を示す miRNA を複数見出しており、今後はこれらの miRNA についてゼノグラフィ系等の動物モデルの全身投与で抗腫瘍活性を見出していくことが急務である。その際に最も問題となるのは「腫瘍へのデリバリー」である。これは本プロジェクトでは全く手をつけなかったが、核酸医薬として先行する siRNA に関してリポソームをはじめとする各種のデリバリー技術が開発されて来ており、miRNA の場合もそれらを利用することで全身投与で有効な抗癌剤への展開ができると期待している。

マスト細胞の脱顆粒を制御することを見出した miRNA については、免疫・アレルギー分野の治療薬としての応用が考えられる。この分野もデリバリーは重要であるが、喘息であれば吸入剤、アトピー性皮膚炎であれば塗布剤としての開発も考えられ、全身投与を目指す抗癌剤等に比べると局所投与で済むこれらの薬剤の方がハードルは低い可能性もある。脱顆粒の促進に関与する miR-F については、抑制剤としての開発が考えられるが、これについてはまもなく完成するノックアウトマウスの表現型を見て実用化の可能性を見極めていきたい。

新規 miRNA 候補として特許出願した 1300 種余りから約 400 種を選抜・合成して様々な機能解析を実施中であり、幾つかの興味深い生物活性を既に見出している。上記の実用化に向けての研究は既知の miRNA が先行しているが、新規の miRNA で創薬応用へとつなげられれば大きな優位性となる。そうした観点から、新規 miRNA の機能解析の研究も力を入れて続けていきたい。新たなアッセイ系への展開も検討していきたい。

本プロジェクトにおける我々の研究全体を振り返ると、当初の目的であった「miRNA の創薬研究への基盤を確立する」という観点において、知財権、研究方法の確立、疾患との関係の解明、創薬標的の発見というそれぞれの点で十分な成果を上げられたと考えている。周知の通り医薬の研究開発はステップが多く、長い時間がかかるために、「実用化」＝「薬品の上市」と考えると、まだ最初のステップをクリアしたに過ぎない。しかし、ヒトで miRNA が発見されてまだ 10 年足らずという歴史を考えると、決してその進展は遅くはない。

miRNA の創薬応用にはまだまだ課題も数多いが、本プロジェクトの成果と他のグループで得られた基礎的知見（薬効や副作用、あるいは投与構造等を考える上で非常に重要である）、先行する siRNA 創薬の知見等を組み合わせて、そうした課題をクリアしていきたい。今後、miRNA 創薬をめぐる研究開発競争はますます厳しくなると予測されるが、本プロジェクトで得られた成果を基盤として、基礎と応用を密接に連携させて一步一步着実に研究開発を進めていくことで、「日本発の miRNA 医薬品」の実現へと進めていきたいと考えている。

2. 3. 1. 1. 2. 生命機能に寄与する機能性 RNA の個体レベルでの解析 (大阪大学)

マイクロ RNA (miRNA) は哺乳類のみならず線虫やショウジョウバエ等においても保存され、植物にも存在している。その機能は標的となるメッセンジャー RNA (mRNA) の 3' -UTR に特異的に干渉することにより、遺伝子発現を転写後レベルで抑制すると考えられている。これまでにいくつかの miRNA について、その標的遺伝子や機能が明らかとなっているが、疾患と直接的に関わる miRNA については不明な点が多い。本研究の目的は miRNA を欠損したマウスを作製し、その表現型から miRNA が寄与する生命現象を浮き彫りにすることで、miRNA と疾患の関わりを明らかにすることを目的とした。

2. 3. 1. 1. 2. 1. 精巣で発現している miRNA の同定

これまで、マウスの各臓器における miRNA の発現プロファイルは Tuschl のグループより報告されており (Current Biology, vol. 12, 735-739)、精巣では 17 種の miRNA の発現が確認されていた。その中から、精巣で発現しているものを選び出しノザンプロット法により miRNA の発現を確認した。その結果、miR-92 と miR-143b は様々な臓器で発現していることが報告されていたが、今回調べた結果でも脾臓、肝臓、脳、精巣で発現を確認することができ、全身性に発現していることがわかった。一方で、miR-200b は腎臓や肺などでも発現が見られたが、精巣においては減数分裂が開始される 2 週令の精巣で発現が最も高く精巣の成熟にともなって発現が低くなる興味深い発現を示すことがわかった。miR-200b のゲノム情報を調べてみた結果、miR-200b は miR-200a と近接しており、クラスターを形成していることが予想された。これらの結果をもとに、精巣で発現していることが確認された miR-200b を標的としてノックアウトマウスの作製を試みることにした。

2. 3. 1. 1. 2. 2. miR-200b のターゲティングベクターと相同組換え ES 細胞の作製

miR-200b の前駆体 (70 塩基) をネオマイシン耐性遺伝子と置き換えたターゲティングベクター (図 1 a) を作製し、ES 細胞にエレクトロポレーション法を用い組換え ES 細胞の作製を試みた。また、本ターゲティングベクターを作製する際に multi-Gateway のシステムを利用して新規の構築法を確立した (図 2)。Short-arm の組換えを PCR でスクリーニングし、432 クローンの中から 4 つの組換え ES 細胞を得た。Long-arm 側の組換えは *VspI* と *XhoI* で消化した ES 細胞のゲノム DNA を long-arm の外側のプローブを用いサザンハイブリダイゼーションすることにより検討し、すべてのクローンで正しい組換えが起こっていることを確認した (図 1 b)。これら組換え ES 細胞のカリオタイプを調べ、正常な核型を示す #6f, #39 クローンを C57BL/6 マウスのブラストシストにインジェクションしキメラマウスを得た。

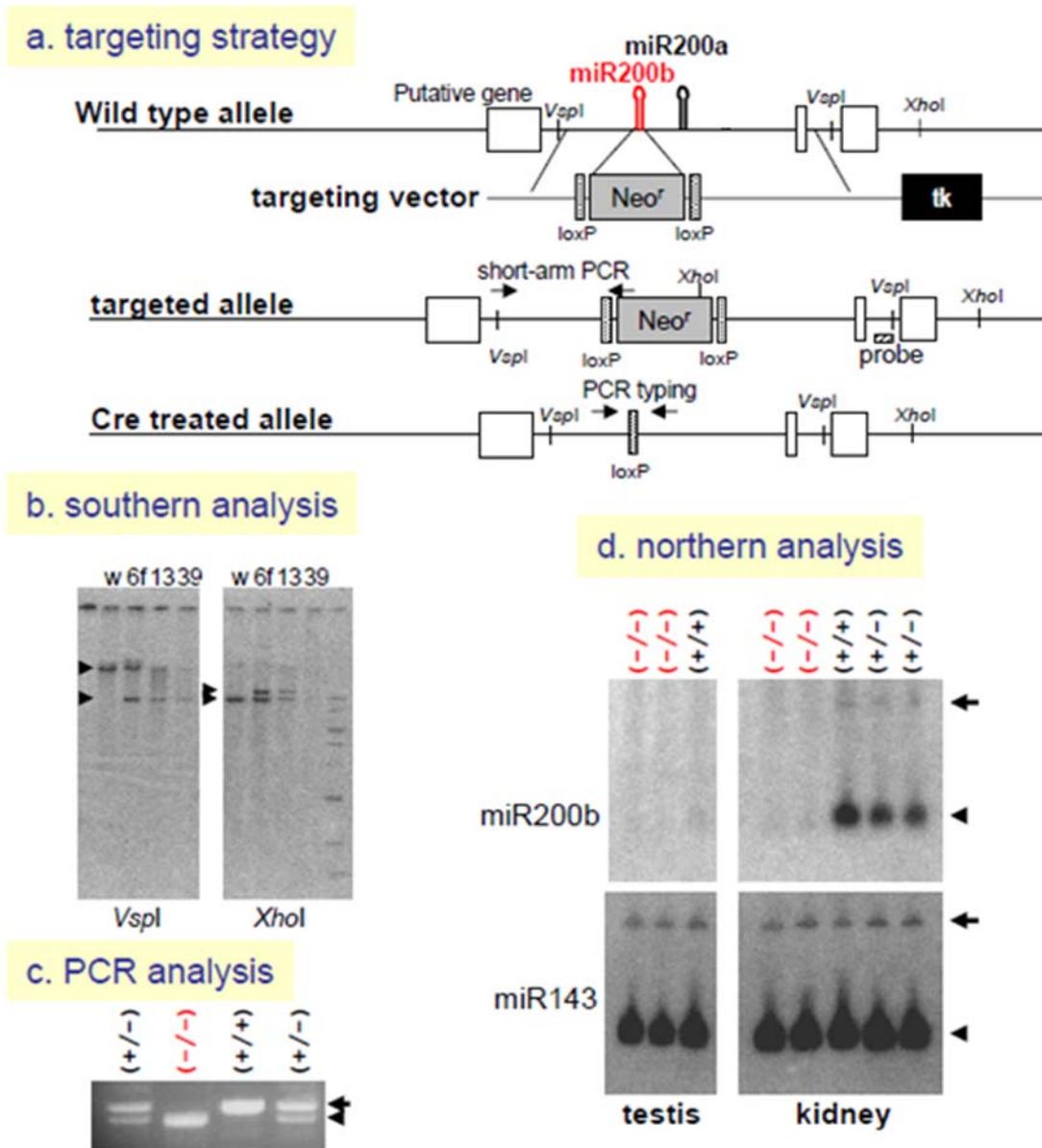


図1. ターゲティングストラテジーとノックアウトマウスの樹立

- a) ターゲティングストラテジー
- b) 組み換え ES 細胞のサザンブロット解析
- c) 組み換え ES 細胞の PCR 解析
- d) ノックアウトマウスのノザンブロット解析

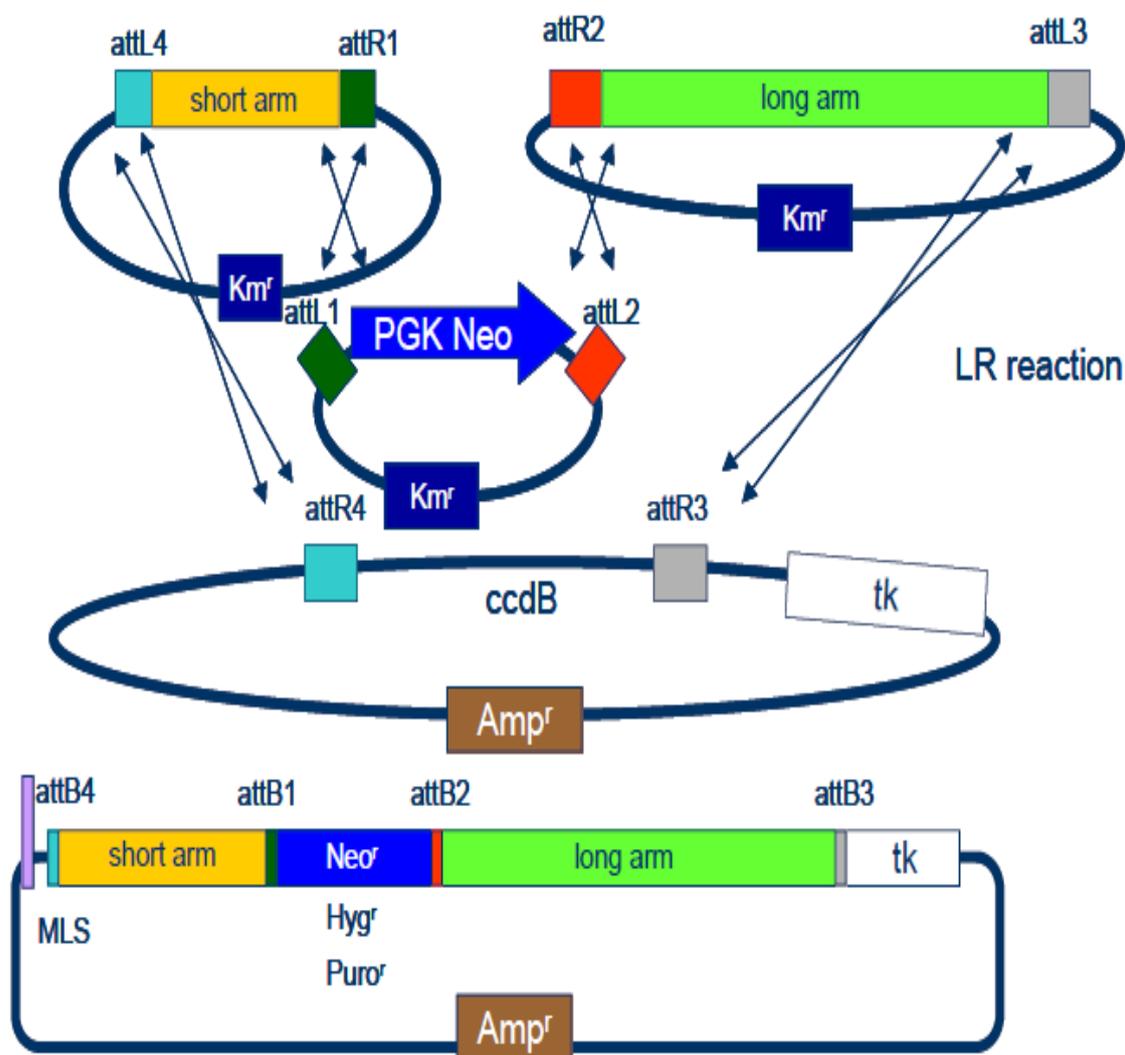


図2. Gatewayを用いた gene targeting vector construction system

2. 3. 1. 1. 2. 3. miR-200b ノックアウトマウスの樹立

ブラストシストインジェクションにより得られた2系統のキメラマウスをC57BL/6マウスと交配させヘテロ欠損マウスを得た。次に、miR-200b領域に挿入されたネオマイシン耐性遺伝子による影響を取り除くことを目的として、ヘテロ欠損マウスの雄を全身でCreを発現するトランスジェニックマウスの雌と交配させ、ネオマイシン耐性遺伝子を取り除かれmiR-200bがloxPサイトと置き換わったアレルをもつヘテロ欠損マウスを得た。これらのマウスを交配させ、ホモ欠損マウスを得ることに成功した。各マウスの遺伝子型はPCR法により検定し、ノザンプロットングによりホモ欠損マウスではmiR-200bが欠損していることを確認した(図1c, d)。ホモ欠損マウスは見た目の異常は無く、健康であった。また、F1とC57BL/6へ戻し交配で得られたF3のヘテロマウスの雌雄を交配して得られた産子

の遺伝子型はメンデルの法則にしたがって得られており、miR-200b 欠損マウスは発生過程においても異常がないことがわかった (表 1)。

表 1. ヘテロマウスの交配で得られたマウスにおける遺伝子型

		total	(+/+)	(+/-)	(-/-)	n
#39	F1	56	21	27	8	13
	F3	108	20	55	33	18
	Total	164	41 (25.0%)	82 (50.0%)	41 (25.0%)	31
#6f	F1	43	16	20	7	6
	F3	28	5	16	7	4
	Total	71	21 (29.6%)	36 (50.7%)	14 (19.7%)	10
Total		235	62 (26.4%)	118 (50.2%)	55 (23.4%)	41

n は母親マウスの数を示す。

2. 3. 1. 1. 2. 4. miR-429 の発見と変異による欠損

本研究の開始時にはおよそ 100 の miRNA 遺伝子が見つかったが、その後の研究によりマウスでは 500 前後の miRNA が見つかった。miR-200b の近傍には miR-200a が存在し、クラスターを形成していることがわかっていたが、新たに miR-429 もその近傍に存在し、miR-200b, miR-200a とクラスターを形成していることが明らかになった (図 3)。これら 3 つの miRNA は配列が類似しており、miR-200b と miR-429 は共通のシード配列をもっていることから、共通の遺伝子を標的としている可能性が高い。

本研究で使用したターゲティングベクターに miR-429 も含まれていたことから、ノックアウトマウスにおける発現を miR-200a と共にノザンプロット解析で調べたところ、miR-200a は野生型マウスと同様に発現していたが、ノックアウトマウスでは miR-200b と同様に miR-429 の発現も無くなっていることがわかった (図 4)。その原因を調べたところ、miR-429 の一部にミューテーションが入っており、それが原因で miR-429 が発現しなくなることが明らかになった。本研究では miR-200b のみを欠損させたマウスを用いて研究を遂行することを目的としていたが、同じシード配列をもつ miR-429 も同時に欠損していたため両方の miRNA が欠損したノックアウトマウス (DKO マウス) を以後の実験に用いた。また、研究の本筋とは離れてしまうが、偶然に挿入された miRNA 中のミューテーションが成熟型 miRNA の発現を無くすことがわかり、1 つの点変異が miRNA の欠損につながる可能性を明らかにした。

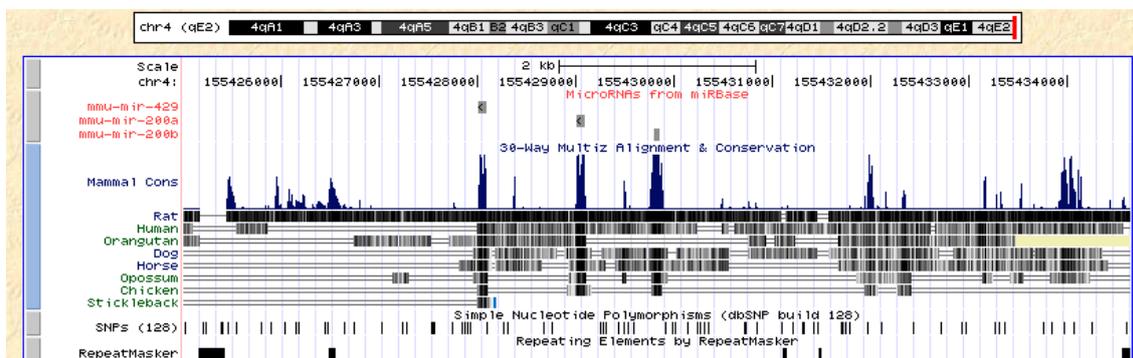


図 3. miR-200b~200a~429 クラスター (UCSC ブラウザー)

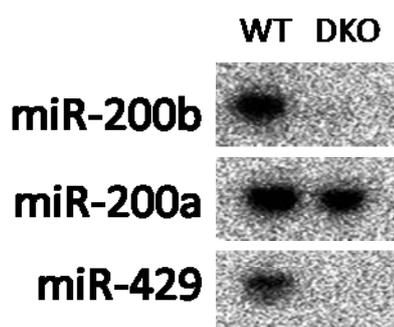


図 4. DKO マウスにおける
miR-200b~200a~429 クラス
ターのノザンプロット解析

2. 3. 1. 1. 2. 5. 表現型の解析 (雌性不妊)

miR-200b は精巣で発現していることから雄性不妊や精子形成異常などの表現型を期待したが、コントロール群と同様な妊孕性を示し、特に異常は観察されなかった。また、腎臓や肺においても強く発現しているためこれらの組織切片を作製し観察したが、異常はみとめられず野生型と変わらず健康であった。

しかしながら、DKO マウスの雄からは野生型マウスと同等の産子が得られたのに対し、雌の DKO マウスからは、たまにしか産子が得られないことがわかった。そこで、産子が得られない原因を調べるために膣栓を指標として交尾行動を調べたところ、野生型にくらべて DKO マウスは 3 倍以上の頻度で交尾していることがわかった。しかしながら、妊娠成立率は 10% 以下となり、交尾をするにもかかわらず不妊の表現型を示すことがわかった。不妊の原因を調べるために、交尾後の輸卵管から卵子を採取することを試みたが、野生型の場合

10 個前後の排卵された卵子を採取することができたが、DKO の場合は排卵を示す輸卵管膨大部の膨張が見られず排卵されていないことがわかった。また、卵巢切片を作製し観察すると、排卵後に見られる黄体が形成されておらず、卵巢の形態からも排卵不全となることがわかった (図 5)。これらのことから、DKO マウスは排卵不全による雌性不妊の表現型を示すことを明らかにした。

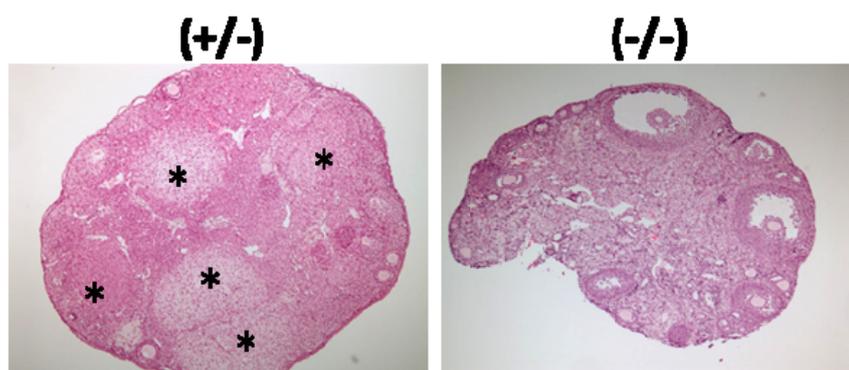


図 5. 交尾後の卵巢切片 *は黄体を示す

2. 3. 1. 1. 2. 6. 表現型の解析 (卵巢機能解析)

排卵は視床下部-下垂体-卵巢が密に相互作用することにより、マウスの場合は 4~5 日に 1 回の割合で排卵する。DKO マウスで見られた排卵不全による不妊の表現型を詳細に解析するために、下垂体前葉から分泌される卵胞成熟ホルモンと排卵ホルモンによる過排卵実験を行った。その結果、野生型マウスと同様に DKO マウスにおいても 30 個前後の排卵が起こることがわかった。以上の結果から、DKO マウスの卵巢は卵胞成熟ホルモンと排卵ホルモンに対し正常に反応し排卵を誘発することから、排卵不全の表現型は卵巢の異常ではなく、下垂体前葉あるいは視床下部の機能に異常がある可能性が示唆された。

さらに不妊の原因組織を明らかにするために、下垂体と視床下部における miR-200b および miR-429 の発現をノザンプロットにより解析したところ、視床下部では全く発現していなかったが、下垂体において非常に強く発現していることがわかった。このことから、不妊の原因組織は下垂体であり、下垂体の機能維持に miR-200b と miR-429 が関与していることが示唆された。

2. 3. 1. 1. 2. 7. 表現型の解析 (下垂体機能解析)

下垂体での表現型を詳細に解析するために、野生型マウスと DKO マウスから下垂体を摘出しその形態を観察したが、大きさや形態は変わらなかった (図 6)。さらに詳細に解析するためにパラフィン切片を作製し排卵ホルモンである Lh-b 抗体染色すると、Lh-b 陽性細胞が減少していることがわかった。さらに、リアルタイム PCR で発現をみると、Lh-b と共に卵胞成熟ホルモンである Fsh-b の発現が減少しており、miR-200b と miR-429 は下垂体前葉

の排卵をつかさどるゴナドトロフ細胞において、Lh-b および Fsh-b の発現を制御していることが考えられた。

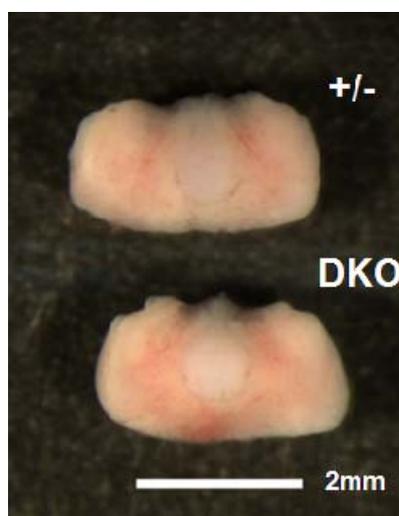


図6. DKO マウス下垂体

2. 3. 1. 1. 2. 8. miRNA 標的遺伝子の検索

これまでの解析により、miR-200b と miR-429 は下垂体前葉で排卵ホルモンを制御していることが考えられたが、これらの排卵ホルモンには共通のシード配列をもつ miR-200b と miR-429 の標的配列は無く直接の標的とは考えにくい。そこで、同じシード配列をもつ miR-200b と miR-429 が標的としうる可能性のある遺伝子について協和発酵グループが作成した標的予測プログラムを用いて配列解析を行った。その結果、このプログラムでは 1000 以上の遺伝子が候補として挙げられた。これら多数の標的候補の中でどれが有力な標的候補遺伝子となるのかに関して、すべてを検討することは不可能である。そこで、標的候補遺伝子を絞り込むために、マウスとヒトで共通に認められる遺伝子の中から標的配列を 2 ヶ所以上含む転写関連因子 10 個を絞り込んだ。これらの標的候補遺伝子について DsRed2 蛍光遺伝子をレポーターとしたベクターを作製し miRNA 発現ベクターとともに培養細胞に導入することで、miRNA の標的遺伝子となりえるかどうかについて検討した。図 7 に示すように任意の miRNA により制御される遺伝子について DsRed2 の蛍光の減弱によって判定し、10 個中 8 個の遺伝子が miR-200b により抑制されることがわかった。その中でも、抑制型の転写因子である Zfhx ファミリー遺伝子が強く抑制されることを明らかにした。

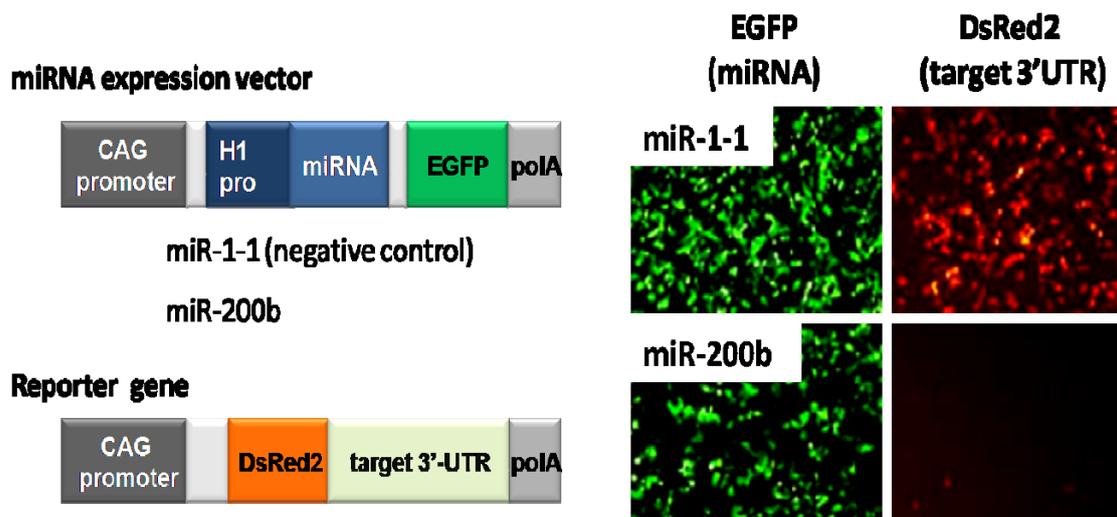


図7. miRNA 標的候補遺伝子のレポーターアッセイ

2. 3. 1. 1. 2. 9. 個体レベルでの標的遺伝子の解析

これまでに培養細胞を用いた系で見出した標的遺伝子について、DKO マウスの組織を用いて、ウエスタンブロットを行うことで実際に表現型に寄与している可能性のある標的遺伝子の絞り込みを行った。サンプルとする組織は、miR-200b と miR-429 が発現し表現型が観察された下垂体と miR-200b と miR-429 が発現していない視床下部をコントロールとして用いた。その結果、DKO でタンパク質量が増加している遺伝子として Zfhx ファミリー遺伝子を1つ見出した。他の研究から、この遺伝子が Lh-b の発現を制御していることが示唆されており、表現型に関連した標的遺伝子であることが示唆された。これらの結果から、シード配列を出発点として多くの標的候補遺伝子があげられるが、真に生命現象を調節している遺伝子は少数しかない可能性が考えられた。

2. 3. 1. 1. 2. 10. まとめ

miRNA ノックアウトマウスを作製し、表現型から miRNA が寄与する生命現象を浮き彫りにすることに成功した。その表現型は雌性不妊であり、miRNA の異常が疾患に関わっている可能性を示すことができ、miRNA およびその標的遺伝子は新たな疾患治療のターゲットになりえる可能性が高いことが考えられた。また、miRNA ノックアウトマウスを疾患モデルマウスとして用いることで、miRNA や siRNA などの低分子 RNA を利用した治療法を開発するための有用なツールとして創薬産業の発展に貢献するものだと考えられる。

2. 3. 1. 1. 3. 腫瘍組織で高発現している miRNA の解析 (岡山大学)

最近の研究において、miRNA の発現変動には発癌やアポトーシスと密接な関連があることも報告されており、疾患との関係も注目されている。我々は癌の発症機構に関与する miRNA の同定とその機能解析を目的に研究を行った。肺癌において、我々は正常組織より腫瘍組織で高発現している miR-183 を同定した。しかし *in silico* 標的予測解析で 1000 以上の遺伝子が候補としてあげられたため、miRNA の真の標的遺伝子を同定するためには新しいアプローチが必要と考え、ここでは二つの方法を提案した。一つは、ビオチン標識した miRNA を用いて行う *in vitro* pull-down 法であり、標識 miRNA と物理的に結合する標的遺伝子を同定する方法 (IVPD 法) であり、る。もう一つは、miRNA もしくは anti-miRNA-LNA を細胞に導入し比較対象細胞株を作成し、その変動蛋白質をプロテオミクス解析して標的遺伝子を同定する方法である。今回、これらの方法で miRNA の真の標的遺伝子を同定することに成功した。

2. 3. 1. 1. 3. 1. マイクロアレイによるプロファイリング

我々は癌と microRNA(miRNA)との関連を見出すため、臨床検体 (頭頸部腫瘍 4 例、肺癌 5 例、骨軟部腫瘍 2 例) の癌部(T)と隣接非癌部(N)における miRNA の発現量の比較をマイクロアレイを用いて検討した。頭頸部腫瘍では、4 例中 1 例についてはどの miRNA も発現差のない結果であったため、3 例間の比較となった (図 1)。

頭頸部腫瘍1	頭頸部腫瘍2	頭頸部腫瘍3	頭頸部腫瘍4	肺癌1	肺癌2	肺癌3	肺癌4	肺癌5	滑膜肉腫1	滑膜肉腫2
hsa_miR_147	hsa_miR_148b	hsa_miR_196a		hsa_miR_148b	hsa_miR_142_3p	hsa_let_7g	hsa_miR_148b	hsa_miR_10a	hsa-miR-133a	hsa-miR-147
hsa_miR_19a	hsa_miR_147	hsa_miR_19a		hsa_miR_147	hsa_miR_154	hsa_miR_142_3p	hsa_miR_147	hsa_miR_147	hsa-miR-147	
hsa_miR_196b	hsa_let_7g	hsa_let_7g		hsa_let_7g	hsa_miR_19a		hsa_miR_137	hsa_miR_520b		
hsa_miR_148b	hsa_miR_127	hsa_miR_196b		hsa_miR_136	hsa_miR_147		hsa_miR_141	hsa_miR_141		
hsa_miR_299_5p	hsa_miR_186	hsa_miR_181b			hsa_let_7g		hsa_miR_127	hsa_miR_199a_AS		
hsa_let_7g	hsa_miR_154	hsa_miR_520b					hsa_miR_149	hsa_miR_192		
hsa_miR_186	hsa_miR_196b	hsa_miR_302a					hsa_let_7g	ambi_miR_7076		
hsa_miR_449	hsa_miR_192						hsa_miR_151	hsa_miR_196a		
hsa_miR_137	hsa_miR_133a						hsa_miR_155			
hsa_miR_154	hsa_miR_299_5p						hsa_miR_154			
hsa_miR_372	hsa_miR_10a						hsa_miR_135a			
hsa_miR_190	hsa_miR_194						rno_miR_20_AS			
hsa_miR_324_3p	hsa_miR_141						hsa_miR_186			
hsa_miR_136	hsa_miR_197						hsa_miR_34b			
hsa_miR_142_5p	hsa_miR_150									
hsa_miR_192										
ambi_miR_7076										
hsa_miR_152										
hsa_miR_135a										
hsa_miR_520h										
hsa_miR_380_3p										
hsa_miR_199b										
hsa_miR_10a										
hsa_miR_127										
hsa_miR_30d										
hsa_miR_30e_3p										
hsa_miR_520b										
hsa_miR_521										
hsa_miR_432										
hsa_miR_302a										
hsa_miR_142_3p										
hsa_miR_301										
hsa_miR_141										
hsa_miR_519e										
hsa_miR_125a										

頭頸部腫瘍	肺癌	滑膜肉腫	全て		
hsa_let_7g	3/3	hsa_let_7g	4/5	hsa_miR_147	8/10
hsa_miR_196b	3/3	hsa_miR_147	4/5	hsa_let_7g	7/10
hsa_miR_147	2/3	hsa_miR_148b	2/5	hsa_miR_148b	4/10
hsa_miR_19a	2/3	hsa_miR_141	2/5	hsa_miR_141	4/10
hsa_miR_148b	2/3			hsa_miR_19a	3/10
hsa_miR_186	2/3				
hsa_miR_141	2/3				
hsa_miR_299_5p	2/3				

図1 臨床検体におけるmicroRNAの発現比較

頭頸部腫瘍 3/3 例で let-7g・miR196b、2/3 例で miR-147・miR-19a・miR-148b・miR-186、miR141・miR-299-5p が癌部(T)で正常部(N)に比べて 1.5 倍以上の数値を示した。肺癌部では 4/5 例で let-7g・miR-147、2/5 例で miR-148b・miR-141 が、滑膜肉腫では miR-147 が 2/2 例で高発現していた。癌種は異なるが、miR-147 (8/10 例)、let-7g (7/10 例)と共通して癌部での発現が高いことが分かった。しかし、どの癌部(T)においても発現が低下する miRNA で共通するものは見られなかった。

これらマイクロアレイの結果を検証するため、同一検体 RNA を用いて 157 種の miRNA の TaqMan 定量 RT-PCR を行ったところ、変動 miRNA の一部で一致するものもあったが、マイクロアレイと同様の結果を得ることが出来なかった。これはアレイのプローブ標識に用いる低分子 RNA の純度に左右されると考えられる。図 2A のように高分子 RNA の分解により、低分子域に蓄積されると標識プローブとしては使えなくなる。これとは対照的に 18S、28S のピークが確認され、RNA の分解が見られない、もしくは少ないものは標識プローブとして有利である(図 2B)。臨床検体の場合、血行遮断から摘出、そして摘出後の室温放置時間など RNA 分解の要因となる問題を解決する必要がある。

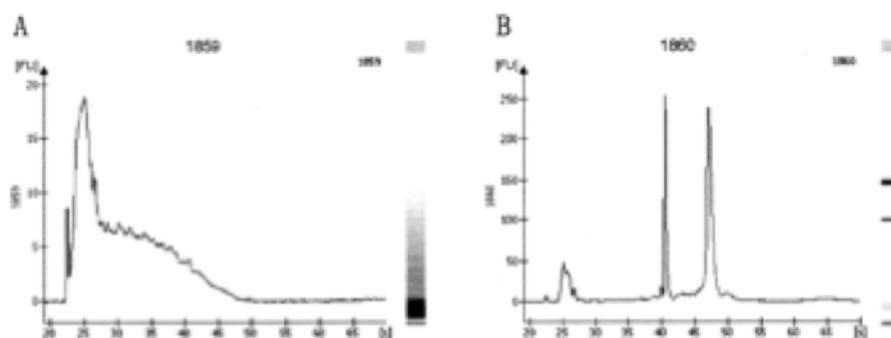


図2 臨床検体から抽出したRNAのHPLC精製

2. 3. 1. 1. 3. 2. TaqMan 定量 RT-PCR によるプロファイリング

成熟 miRNA の検出とコスト的には多検体の比較が可能なことから、TaqMan 定量 RT-PCR を用いて miRNA のプロファイリングを行った。癌種は肺癌と shwannoma について検討した。

肺癌において、13 例全てに共通して増減している miRNA は確認されなかったが、miR-183 は 10 例の癌部(T)で発現の増加が確認された(表 1)。軟部腫瘍においては各患者の正常組織が入手困難であったため癌部 18 例と正常部 1 例との比較であるが、17 例の癌部(T)で共通に高発現するものと、18 例に共通して発現が低下しているものが確認された。

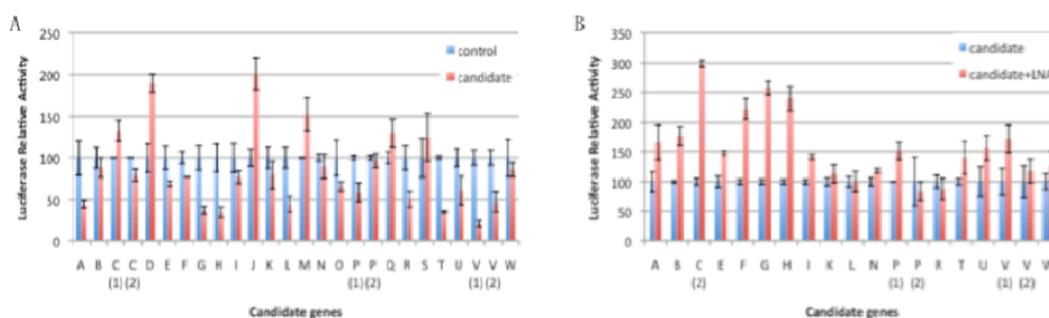
miR	検体数(n=13)	%
miR-9	9	69.2
miR-9*	6	46.2
miR-21	7	54.8
miR-31	8	61.5
miR-96	8	61.5
miR-105	8	61.5
miR-127	7	54.8
miR-128L	8	46.2
miR-137	6	46.2
miR-148a	7	54.8
miR-149	7	54.8
miR-182	7	54.8
miR-182*	9	69.2
miR-183	10	76.9
miR-198	8	61.5
miR-205	9	69.2
miR-210	6	46.2
miR-221	6	46.2

表1 肺癌で発現が増加しているmiRNA

2. 3. 1. 1. 3. 3. miR-183 の標的遺伝子の探索

今回の肺癌のプロファイリングにより、13 例中 10 例 (77%) の癌部(T)で発現が増加していた miR-183 に関して標的遺伝子の探索を試みた。協和発酵キリンの開発した標的遺伝子予測ソフト miGTS (miRNA Global Target Search)の結果 (1495 候補) から、標的遺伝子候補として AMID (apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrion-associated inducer of death)、CTNNA2 (Catenin α -2)、POLR2D (Polymarase II RNA Subunit D)、DAP (Death-Associated Protein)を選び、その標的配列 (23bp) をもちいて luciferase 解析を行ったところ、miR-183 による発現抑制が確認された。しかし 3' UTR 全長を用いた luciferase 解析では、その抑制効果は見られなかった。

我々は、細胞増殖、アポトーシス、癌抑制遺伝子というキーワードと seed 配列の 7 塩基が完全一致し非 seed 配列内で 5 塩基以上が一致する条件で標的遺伝子予測ソフト miGTS の結果から、新たに 23 個の遺伝子候補 (候補 A-W) を選択し、その標的配列 (23bp) を用いて luciferase 解析を行った。コントロールと比較して、miR-183 は C(1)、D、J、M、Q、S を除く候補遺伝子において luciferase 活性の抑制することができた (図 3A)。また、これら抑制効果のみられた候補遺伝子に対して、anti-miR-183 LNA を加えて miR-183 をノックダウンすると、大半の候補遺伝子で luciferase 活性が復活することも分かった (図 3B)。



【図3】 luciferase assay

真の標的遺伝子を同定するためには、miRNA と物理的に結合した mRNA を捕まえてはならないと考えたため、FLAG 等のタグを付けた AGO1、AGO2 発現ベクターを用いた pull down 法 (図 4) と IVPD 法を試行した。数回の試行後、AGO1 もしくは AGO2 による pull down 法は、特定の miRNA に特異的な標的遺伝子を同定することは困難であったため断念した。センス鎖の 3' をビオチン化した IVPD 法を行うにあたり、標識ビオチン化二本鎖 miRNA が細胞内で成熟 miRNA になることと、miRNA を取り込んだ RISC 複合体と標的遺伝子の結合に最適な緩衝液条件を予備実験で確認した。

ビオチン化 IVPD 法により得られた mRNA に候補遺伝子 A-W

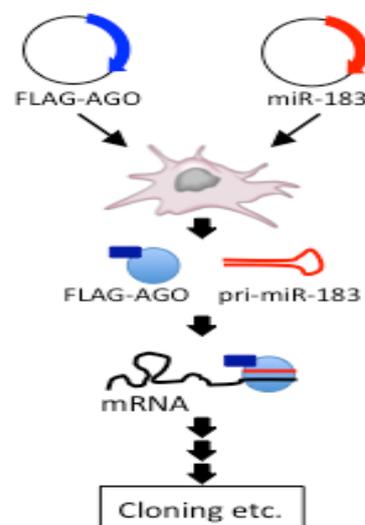


図4 FLAG-AGOを用いた pull-down法の概略図

が含まれるかを確認するため、それぞれ遺伝子の特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。候補遺伝子 A-W を標的としていない let-7b を比較対象とした。また miR-183 の標的遺伝子として報告された Ezrin (W) をポジティブコントロールとした。

RT-PCR の結果、候補遺伝子 E はポジティブコントロールの W と同程度のバンド強度を示し、次いで A、F、N、P、O でバンドが検出された。

比較対象とした Let-7b ではいずれのバンドも検出されなかった (図 5)。

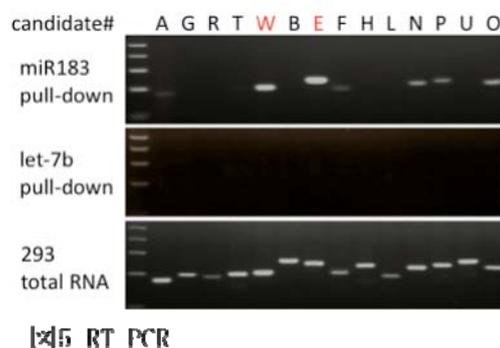


図5 RT PCR

候補遺伝子 E、F、P、O について、miR-183 による転写後の抑制がなされているかを確認するために western blot を行った。miR-183 を過剰発現させるために、pri-miR-183 を組み込んだ pSilencer ベクターを 293FT に導入した。ネガティブコントロールと miR-1 を比較対象として用いた。

候補遺伝子 E は miR-183 により顕著に発現を抑制されていることが分かった。また miR-183 の候補遺伝子 F に対する抑制レベルは、比較対象をほとんど変わらないものであった (図 6)。候補遺伝子 P、O は非特異バンドが多かったため、今回は解析を見送った。

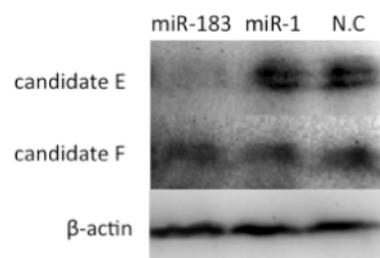


図6 Western blot

以上の結果より、候補遺伝子 E は miR-183 の真の標的遺伝子の一つであることが示唆された。この標的遺伝子 E はセリン-スレオニンホスファターゼのサブユニットであり、DNA 修復や癌抑制に関与していることが報告されている。

また、ビオチン化 IVPD 法は、in silico 標的予測システムやマイクロアレイと組み合わせることにより、miRNA の標的遺伝子の同定を容易にすることが示された。

2. 3. 1. 1. 3. 4. 標的遺伝子 E の発現抑制による細胞の影響

標的遺伝子 E が DNA 修復の関与することから、カンプトテシン (CPT) により DNA 損傷を誘導し、標的遺伝子 E の有無による細胞への影響を調べた。miR-183 低発現の Lu99c 肺癌細胞株に miR-183 発現ベクターを導入後、CPT (終濃度 0-1000 nM) を添加し、24 時間後に細胞数を測定した。miR-183 により標的遺伝子 E の発現を抑制することにより、アポトーシスが促進され細胞数の減少がみられ、DNA 修復の阻害だけではなく、CPT に対する感受性も高くなることか示された (図 7)。

また、標的遺伝子 E が癌抑制にも関与することから、miR-183 高発現の Lu65a 肺癌細胞株に標的遺伝子 E 発現ベクターを導入し過剰発現させ、生存細胞数を測定した。標的遺伝子 E を強制発現させた細胞では、日毎に細胞数が減少していることが分かった (図 8)。

これらの結果は、肺癌における miR-183 の過剰発現が標的遺伝子 E の発現を翻訳レベルで阻害し、DNA 安定性および癌抑制機能の欠如を引き起こすことにより発癌に関与することを示唆した。

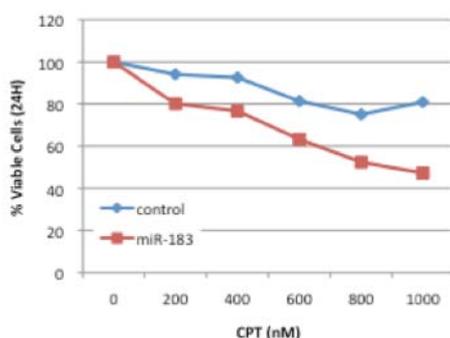


図7 CPTに対する感受性

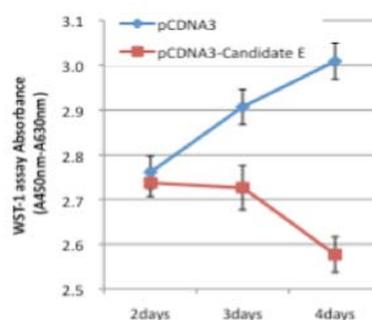


図8 標的遺伝子 E の癌抑制能

2. 3. 1. 1. 3. 5. 発現変化の見られた miRNA と Host 遺伝子との関係

マイクロアレイ実験において癌部で発現亢進/低下していた miRNA が host 遺伝子の発現変化によるか確認するため、host 遺伝子の発現を定量 PCR で検討した。試料はマイクロアレイに供した RNA (滑膜肉腫 1, 舌癌 2, 肺癌 5 例) を用いた。結果は miRNA と host 遺伝子の発現量の増減に相関は見られず、miRNA の発現変化は単独で起きていることが示唆された。

2. 3. 1. 1. 3. 6. 5-Aza Cytidine 処理により発現増加する miRNA

癌細胞において promoter のメチル化により転写抑制された miRNA は癌抑制系に関与すると考えられるため、8 種細胞株 (U937, MUTZ-1, HCT116, MKN45, A549, YaFuss, SY01, HTB93) を 5-AzaC 処理し発現が増加 (回復) する miRNA をマイクロアレイで調べ、以下の 6 種の miRNA を見出した Let-7g (6/8)、miR-10a (6/8)、miR-520h (5/8)、miR-372 (4/8)、miR-147 (4/8)、miR-150 (3/8)。滑膜肉腫 3 種のみで比較すると、miR-141、miR-10b、miR-196b、miR-19a、let-7g は共通に発現が増加していた。miR-10a については単独 promoter の解析を進めており、luciferase assay により 10 倍以上の promoter 活性を示す領域を同定した (図 9)。Bisulfite-sequencing 法を用いてメチル化解析を行ったが、そのプロモーター領域には 5-AzaC 処理の有無で変動する CpG アイランドのメチル化は検出されなかった。

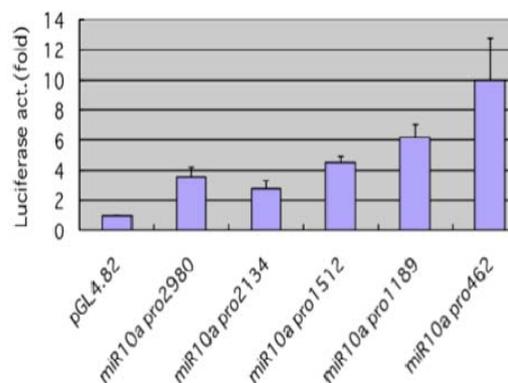


図9 miR 10a の promoter 解析

2. 3. 1. 1. 3. 7. Tet 誘導型 miRNA 発現細胞株を用いた解析

多くのがん細胞で過剰発現している miRNA cluster の標的蛋白の同定と発癌機構の解明、がんの分子標的治療薬法の開発を目指し、miR17-92 cluster を EGFP の 3' untranslated region (UTR) に導入し、HEK293/Tet 誘導細胞株を樹立した (図 10)。Doxycyclin の作用群と非作用群からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動により蛋白解析を行った。蛍光染色したゲルイメージ像について、画像解析ソフトを用いて約 2000 スポット蛋白の検出及び定量比較を行い、両群間のタンパク発現量の差を比較解析した。発現量の有意な上昇が認められた 67 個のスポットを切り出し、液体クロマトグラフィー質量分析計 (アジレント社ナノフロー LC/MS/MS システム) を用いて同定した。この中から miRNA の真の標的タンパク質を同定する為に、同定されたタンパク質に対応する遺伝子 mRNA の 3' UTR について miRNA 標的配列の確認を行い、標的遺伝子 1 種 (CD2AP 遺伝子) を絞り込んだ。この miRNA 標的配列を Luciferase レポーター遺伝子の 3' UTR に導入し Luciferase レポーター解析を実施した。その結果、標的遺伝子候補の miRNA 標的配列を 3' UTR に導入すると、逆鎖を導入したコントロールに比し Luciferase 活性が減少する遺伝子を選別した。さらに、miRNA の antisense LNA の導入により、Luciferase レポーター活性の上昇が確認できた。しかし、miRNA アンチセンス鎖 (LNA) 存在下のウエスタンブロット法では蛋白の変動が観察されなかった。

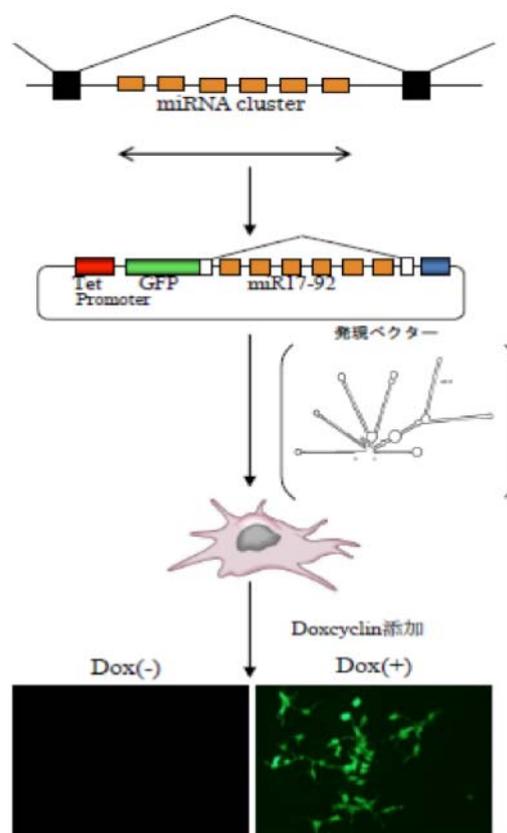


図10 影響を受ける蛋白の同定

2. 3. 1. 1. 3. 8. miRNA 高発現細胞株を用いた標的蛋白の解析

31 種類の癌培養細胞に対して TaqMan Real-time PCR を行い、miR17-92 cluster の高発現株を 4 種類 (小細胞肺癌細胞 SBC3、乳がん細胞 MCF7、び慢性 large lymphoma 細胞 DHL4、急性 T 細胞白血病細胞 Jurkat) を選定した (図 11)。これらの培養細胞に対し蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いて導入効率を検討し、導入効率の高かった細胞株 SBC 3、MCF 7 についてさらなる検討を進めた。これらの培養細胞 2 種に対し anti-miRNA LNA を導入後、miRNA cluster の発現が抑制されることを確認した。anti-miRNA LNA の作用群と非作用群からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動により蛋白解析を行った (図 12)。

Cell line	miRNA Expression (miRNA/US RNA)					
	miRNA-A	miRNA-C	miRNA-D	miRNA-E	miRNA-F	miRNA-G
SYD-1New	0.081	0.041	0.034	0.118	0.068	0.112
SYD-1	0.024	0.039	0.048	0.151	0.072	0.11
HT893	0.208	0.035	0.095	0.161	0.167	0.182
A549	0.303	0.051	0.056	0.125	0.177	0.137
NCI-H520	0.784	0.026	0.104	0.183	0.209	0.141
PC-14	0.447	0.029	0.069	0.112	0.231	0.274
HS-SY-11	0.303	0.12	0.123	0.176	0.235	0.195
YafuSS	0.176	0.085	0.099	0.195	0.295	0.273
NOH60	0.446	0.052	0.118	0.182	0.308	0.193
SBC-5	0.591	0.038	0.133	0.217	0.377	0.266
NALM17	1.391	0.286	0.492	0.549	0.556	0.598
LK-2	2.499	0.079	0.075	0.224	0.654	1.052
S05	0.872	0.236	0.191	0.328	0.655	0.369
Luz9n	1.072	0.124	0.246	0.464	0.694	0.24
NCI-H23	1.281	0.232	0.317	0.406	0.7	0.903
BEH	1.064	0.314	0.356	0.39	0.731	0.534
PC-3	0.557	0.097	0.214	0.401	0.79	0.625
p30/DRKUBO	1.385	0.176	0.354	0.56	1.037	0.782
UB37	0.608	0.536	0.494	0.542	1.068	0.572
NALM6	2.065	0.277	0.45	0.735	1.193	0.568
RERF-LONG	1.85	0.232	0.528	1.226	1.293	1.333
KOPN8	1.046	0.387	0.593	0.798	1.343	0.939
HeLa	3.011	0.152	0.467	0.832	1.501	2.299
Lud5A	1.499	0.494	0.505	0.824	1.562	1.042
NALL1	4.634	0.612	1.057	1.614	2.553	2.068
LK-79	4.171	0.654	2.019	2.517	3.287	3.435
MCF-7	7.18	0.235	1.241	2.586	4.405	7.071
293TF	3.76	2.636	3.707	4.617	5.356	4.259
SBC-3	5.849	1.659	2.781	4.052	6.694	4.439
Jurkat	6.277	3.628	6.79	7.7	14.24	9.957
DHL-4	29.97	3.104	18.92	28.82	80.34	31.53

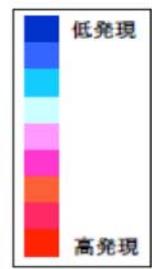


図11 miR clusterの発現比較

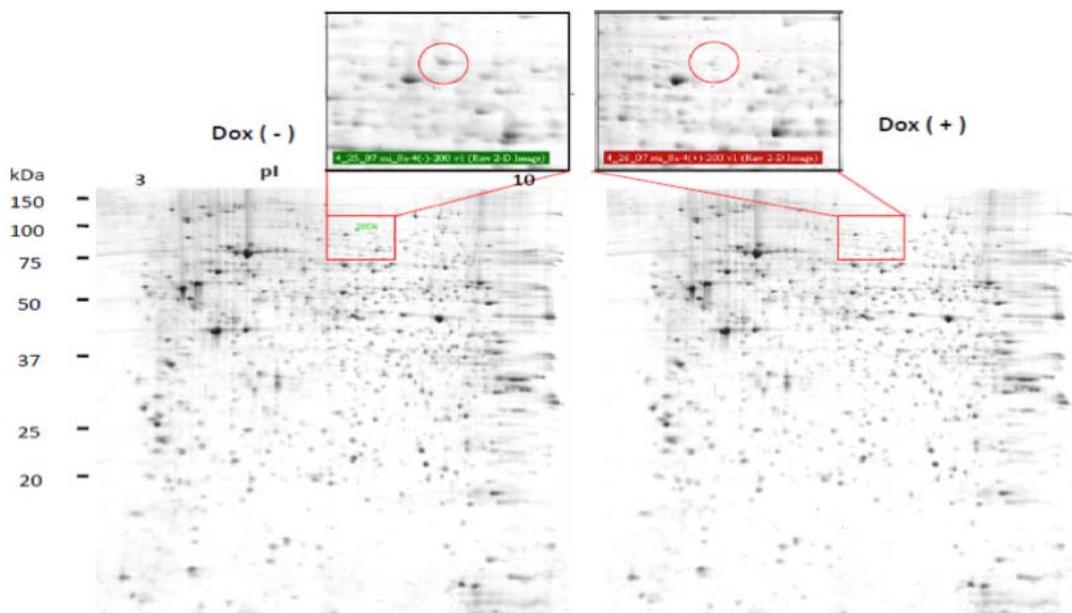


図12 Tet miRNA cluster導入細胞の2D解析による標的蛋白の同定

蛍光染色したゲルイメージ像について、画像解析ソフトを用いて約 2000 スポット蛋白の検出及び定量比較を行い、両群間のタンパク発現量の差を比較解析した (図 13)。発現量の有意な上昇が認められた 135 個のスポットを切り出し、液体クロマトグラフィー質量分析計 (アジレント社ナノフロー LC/MS/MS システム) を用いて同定した。この中から miRNA の真の標的タンパク質を同定する為に、同定されたタンパク質に対応する遺伝子 mRNA の 3' UTR について miRNA 標的配列の確認を行い (図 14)、標的遺伝子 14 種を絞り込んだ。これらの miRNA 標的配列を Luciferase レポーター遺伝子の 3' UTR に導入し Luciferase レポーター解析を実施した。標的遺伝子候補の miRNA 標的配列を 3' UTR に導入すると逆鎖を導入したコントロールに比し Luciferase 活性が減少する遺伝子を候補として選別した (図 15A)。これらのうち、miRNA の antisense LNA の導入により、Luciferase レポーター活性が復活する遺伝子を miRNA の標的遺伝子候補として 9 種同定した (図 15B)。各蛋白に対する抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったところ、miRNA アンチセンス鎖 (LNA) 存在下で蛋白変動を示す標的蛋白を 3 種、miR17-92 の標的蛋白として確認した (図 15C)。2 種については抗体が市販されていないので判定不能であった。

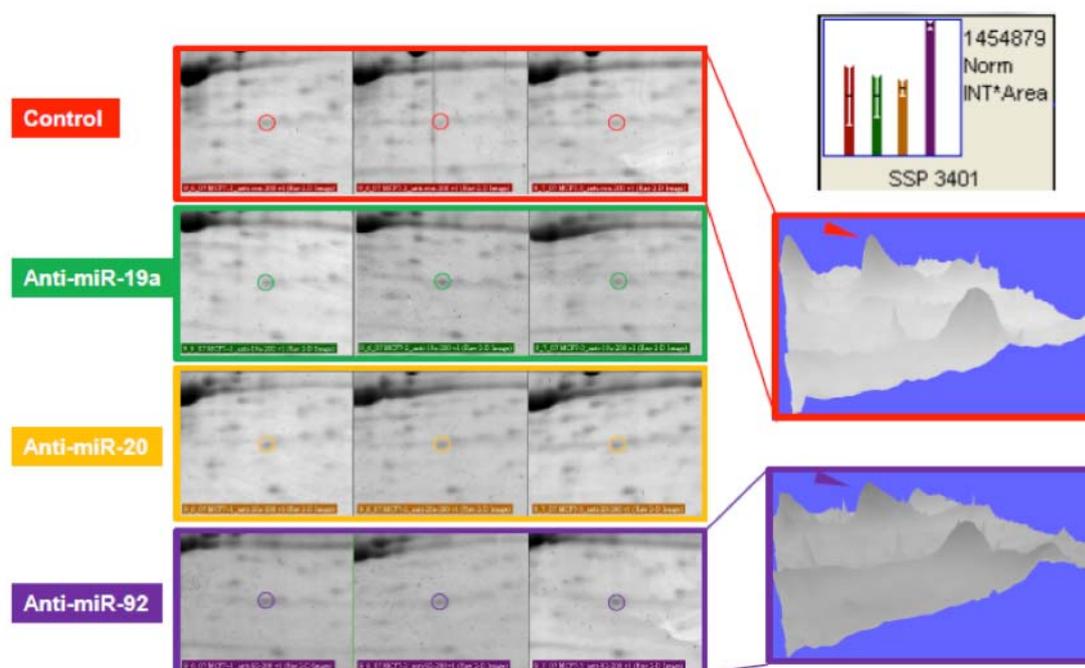


図13 検出スポットの定量比較

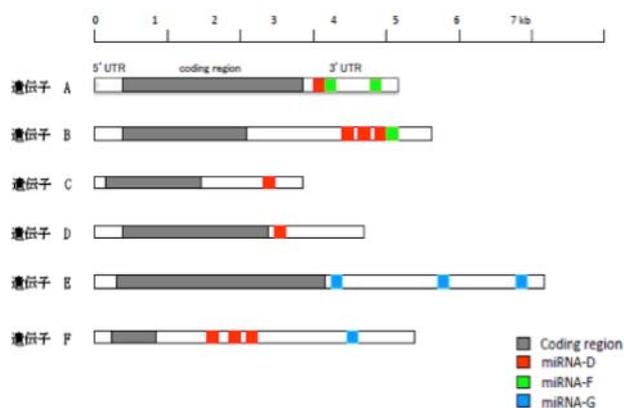


図14 標的遺伝子候補とmiRNAのseed領域

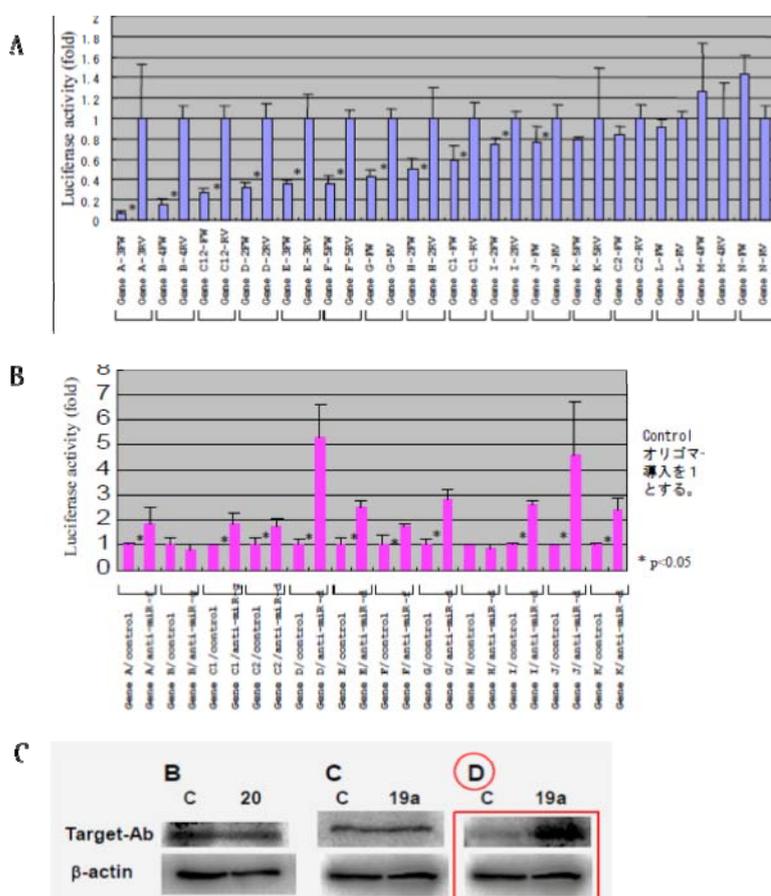


図15 luciferase assayとwestern blot

2. 3. 1. 1. 3. 9. 蛋白アレイ解析による miRNA 標的候補遺伝子の蛋白解析

miR17-92 cluster の高発現株である小細胞肺癌細胞 SBC3 を、miR17-92 の antisense LNA の存在下、非存在下で培養し、72 時間後に蛋白を回収した。蛋白アレイ解析 (Panorama Ab Microarray, Filgen) を用いて、miR17-92 の標的蛋白を選別した。その中でも 2 遺伝子に絞り、標的 mRNA 3' UTR 結合配列を持つ Luciferase ベクターを作成し解析を行った。1 遺伝子は、標的遺伝子候補の miRNA 標的配列を 3' UTR に導入すると、逆鎖を導入したコントロールに比し Luciferase 活性が減少し、さらに、miRNA の antisense LNA の導入により、Luciferase レポーター活性が復活した。本遺伝子蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロット法を行ったところ、miRNA アンチセンス鎖 (LNA) 存在下で蛋白変動を示すことより、確かに本遺伝子は miR17-92 の標的遺伝子であることが確認できた。一方、残りの SMARCA2 遺伝子は miR17-92 の antisense LNA に影響を受けなかった。

2. 3. 1. 1. 3. 10. アルゴリズム解析による miRNA 標的候補遺伝子の蛋白解析

種々の miRNA 標的予測プログラムを用いて、miR17-92 の標的 mRNA 3' UTR 結合配列を選別した。その中でも 2 遺伝子に絞り、標的 mRNA 3' UTR 結合配列を持つ Luciferase ベクターを作成し解析を行った。2 遺伝子とも、標的遺伝子候補の miRNA 標的配列を 3' UTR に導入すると、逆鎖を導入したコントロールに比し Luciferase 活性が減少した。さらに、miRNA の antisense LNA の導入により、Luciferase レポーター活性が復活した。これらの蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロット法を行ったところ、miRNA アンチセンス鎖 (LNA) 存在下で蛋白変動を示すことより、確かに本遺伝子は miR17-92 の標的遺伝子であることが確認できた。

2. 3. 1. 1. 3. 11. まとめと今後の展望

癌に関連する機能性 RNA の同定とその機能を解析することを目的に、我々は臨床検体を用いて研究を進めてきた。臨床検体の利用は、病変部での異常な miRNA を同定できるという利点がある。しかし RNA 分解を最小限に抑えるため、臨床サイドの協力を得て病変部摘出後すぐに凍結または RNA 抽出を行う必要があった。miRNA 発現プロファイリングの結果、我々は肺癌において発現が高くなっている miR-183 に注目し、その標的遺伝子を探索することにした。In silico 標的予測システム、luciferase 解析および我々が開発したビオチン化 IVPD 法を活用し、miR-183 の真の標的遺伝子を同定することができた。また miRNA により発現の変動した蛋白をプロテオーム解析することにより、miRNA cluster の標的遺伝子を同定することができた。

miRNA とその標的遺伝子が 1 対 1 ではないということは、これまでに報告されている研究からも明らかである。miRNA が一つもしくは複数の標的遺伝子をどのように認識するのか、その機構はほとんど解明されていない。分子標的治療において miRNA による発現制御機構を対象とするならば、今後はその標的認識機構を解明しなければならないと考える。

2. 3. 1. 2. 機能性RNA解析に基づくゲノム医学研究

分室11 (東レ)

共同実施先： 京都大学（1；辻本）、京都大学（2；山中）、千葉大学（関）

2. 3. 1. 2. 1. 機能性RNA検出用マイクロアレイ技術の確立

(東レ)

哺乳類を含む高等生物の細胞中には、従来のタンパク質をコードするRNAとは異なり、タンパク質をコードしていないにもかかわらず転写されるnon-coding RNA (ncRNA：非コードRNA) が多数存在する。これらは、機能性RNAとして発生や細胞分化の過程のみならず、疾患の発生において重要な役割を果たしている。

そこで、既知の機能性RNAや本プロジェクトにて予測、或いは単離された機能性RNAを高感度、かつ網羅的な解析が可能なシステムを開発することを目的に機能性RNA検知システムの確立を目指した。本プロジェクトでは3D-Gene基板特性に加え、「プローブ配列の最適化」「RNA調製・標識化プロトコルの最適化」により大幅なS/N比の向上を達成し、当初目標通り機能性RNAを高感度、かつ網羅的に解析できるマイクロアレイ技術を確立した。

2. 3. 1. 2. 1. 1. 機能性RNA検出用マイクロアレイ技術の確立

発生や分化などの生命現象で重要な機能を持つ機能性RNAは発現が極微量であることが知られており、各段階における発現量や発現変動を精確に捉えるためには高感度なバイオツール開発が不可欠である。本プロジェクトでは、機能性RNAを高感度、定量的、かつ網羅的に解析できるマイクロアレイ技術を確立することを目的に、高感度マイクロアレイ基板3D-Geneをプラットフォームとし、(1) プローブ配列の最適化、(2) RNA調製・標識化プロトコルの最適化、(3) 他手法との比較実証を実施した。

(1) プローブ配列の最適化

本プロジェクトにおいて予測された機能性RNAの高感度かつ定量的検出に特化したマイクロアレイを作製することを目的に、既知miRNAをモデルに選定して検出用プローブを設計・合成し、繰り返し数、リンカー配列の長さ、核酸の種類等について検討した。

最初にHeLa細胞で発現様式の異なる12種類のmiRNAを選別し、繰り返し数やリンカー配列の長さなどを変化させて5種類のプローブ配列を設計した後、合計60種のオリゴを合成してDNAチップを作製した。次いでHeLa細胞由来RNAから200塩基以下のRNAを調製・標識した後、DNAチップと反応させてシグナル感度とプローブ構造との相関を評価した結果、高感度プローブの設計指針を以下のように決定した(図1)。

- ・繰り返し回数：2回
- ・リンカー配列：5'末端に(T)5
- ・核酸の種類：デオキシリボ核酸

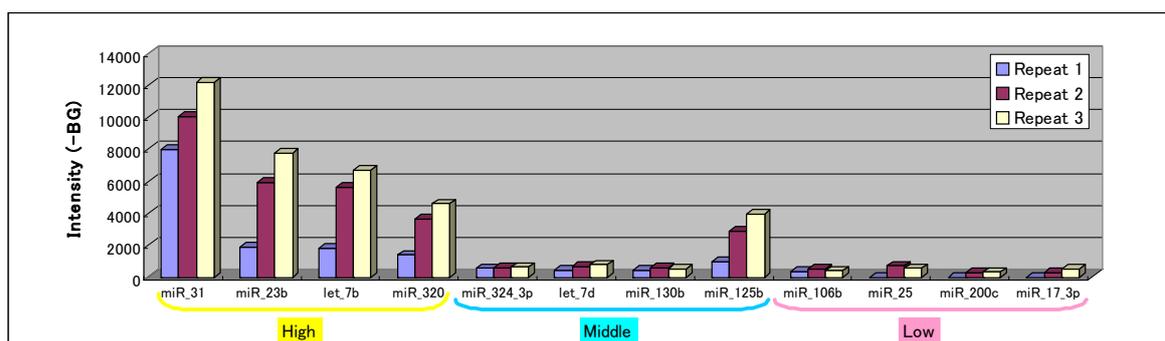


図 1. 作製したプローブの構造とシグナル強度との相関（シグナル分布毎の比較）

(2) miRNA 調製・標識化プロトコルの最適化

3D-Gene 基板に最適な RNA 検出用プロトコルを確立することを目的に、各種 RNA 調製・標識化キットの性能を評価した（下記）。その結果、下記○印に示す RNA 調製キットで 200 塩基以下の RNA を精製して標識化キットで標識、さらに精製用カラムを適正化することでノイズの大幅な低減を達成した。すなわち、既存システムではノイズとなるような極低発現の機能性 RNA を検出でき、かつ約 4 桁の検出ダイナミックレンジをもつプロトコルを確立した。

RNA 調製

*mirVana*TM miRNA Isolation Kit
 flashPAGETM Fractionator
 PureLink miRNA Isolation Kit (○)

RNA 標識

*mirVana*TM miRNA Labeling Kit (○)
 NcodeTM miRNA Labeling system

標識色素

Alexa647, 555
 Cy5, Cy3 (○)

(3) 他手法との比較実証

3D-Gene 基板を用いたシステムの性能を評価することを目的に、既知 miRNA の検出をモデルに市販のマイクロアレイシステム、および TaqMan システムと感度、および精度を比較した。同一の RNA サンプルを用いて B 社、N 社アレイシステムと比較した結果、有効スポット数から検出感度として 10 倍高感度であることが推察された（図 2）。同様に同一の RNA サンプルを用いて TaqMan システムと精度を比較した結果、コピー数の相対倍量は TaqMan と高い相関があることが判明した。さらに検出困難な分化・脱分化誘導に関わる miRNA 候補の絞り込みに成功する等、機能性 RNA の高感度かつ定量的検出に特化したマイクロアレイ

技術を確立した。

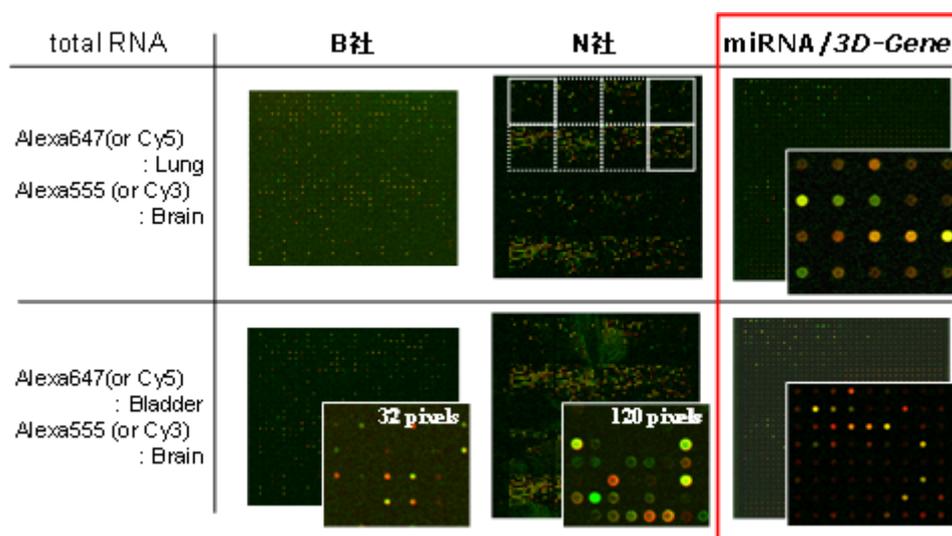


図2. 市販システムとの画像比較

2. 3. 1. 2. 1. 2. まとめ

当初の目標のうち、「プローブ配列の最適化」「RNA 調製・標識化プロトコルの最適化」について、プローブデザインのコンセプトを確立し、一方で精製カラムの適正化等によりノイズ低減による S/N 比の向上を可能とし、目標通り機能性 RNA を高感度、かつ網羅的に解析できるマイクロアレイ技術を確立することに成功し、計画通りの成果となった。

また「他手法との比較実証」において既知 miRNA の検出を FS として行い、目標性能を上回る技術であることが確認でき、実用レベルにあることを示すとともに、検出困難な分化・脱分化誘導に重要な miRNA 候補の絞り込みを可能とした。以上、当初設定した目標に対する達成レベルから、総じて計画通りの成果であったと判断できる。

今後、本プロジェクトで構築した機能性 RNA データベースを活用してプローブを選択・設計することで機能性 RNA 検出用マイクロアレイの開発も可能となり、発現情報などのウェット情報を適宜入力更新することでデータベースの充実化のみならず、マイクロアレイ解析による新規機能性 RNA の探索が可能となる。

さらに研究成果として、癌抑制のターゲットとなる機能性 RNA、癌診断マーカーとなる機能性 RNA、これらを標的とする核酸医薬品による難治性癌治療への応用をはじめ、細胞の分化・脱分化誘導に重要な機能性 RNA やそれらをターゲットとする新規な再生医療技術、核酸医薬品などの再生医療への展開につながると期待できる。

2. 3. 1. 2. 2. microRNA 標的遺伝子予測システムの開発/長鎖合成 RNA オリゴを用いた基盤研究 京都大学（辻本グループ）

辻本グループでは研究期間前半では、機能性 RNA の中でも microRNA に特化して研究開発を行って来た。解析の為にプラットフォームならびにツール開発として、東レグループとの高感度 microRNA マイクロアレイの開発を目指した基盤研究、microRNA 標的遺伝子予測システムの開発を行った。また microRNA の機能探索の為に、細胞分化に関与する microRNA の探索ならびに解析を進めた。後半では核酸医薬品の開発を見据えた長鎖 RNA オリゴ（プロジェクト内の日本新薬による提供）を用いた核酸医薬に向けた基盤研究を進めた。

2. 3. 1. 2. 2. 1. microRNA 標的遺伝子予測システムの開発

microRNA の機能解析の為に標的遺伝子の効率的な同定が必要である。microRNA は翻訳の抑制だけでなく、標的 mRNA の分解も引き起こすことが報告されており、標的遺伝子中には microRNA と発現が負に相関するものがあることが期待される。そこで microRNA と mRNA の発現の相関性と既存 microRNA ターゲット予測プログラムとを組み合わせた新規方法論の開発を行った（図 1）。16 種類の人培養細胞で、microRNA（凡そ 150 種類）と mRNA（凡そ 25,000 種類）の発現プロファイル

をとり、microRNA と mRNA の発現の相関性と既存 miRNA ターゲット予測プログラムとを組み合わせた新規方法論の開発に成功した。従来法では数千種類ものターゲット候補を予測されていたのが、本手法により数十遺伝子への絞り込みを実現した。また、本手法の際立った特色として、microRNA と標的遺伝子を 1 対 1 の関

係として捉えるのではなく、microRNA の共通制御を受けるターゲット遺伝子間の相関関係を最尤推定法により算出することにより、microRNA による共通制御を受ける遺伝子ネットワークの構築にも成功した点がある。本手法は特許申請を行っており、京大・薬ならびに千葉大グループでの研究に活用された。

2. 3. 1. 2. 2. 2. 分化に関わる microRNA の探索

microRNA の機能を探索する為に分化の前後で発現が変動する microRNA の探索を行った。培養細胞をモデルとして、大腸がん細胞株 T84 細胞を用いた上皮形成モデル(Tuchiya et al. 2009)、白血病細胞株 K562 細胞も用いた巨核球系細胞への分化モデル (Ichimura et al.

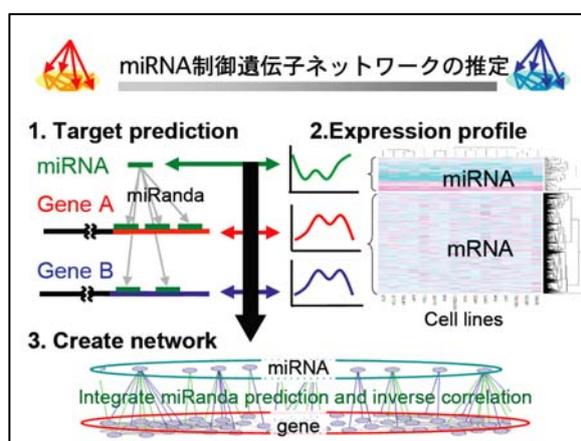


図 1. 新規 microRNA 標的遺伝子予測法の概念図

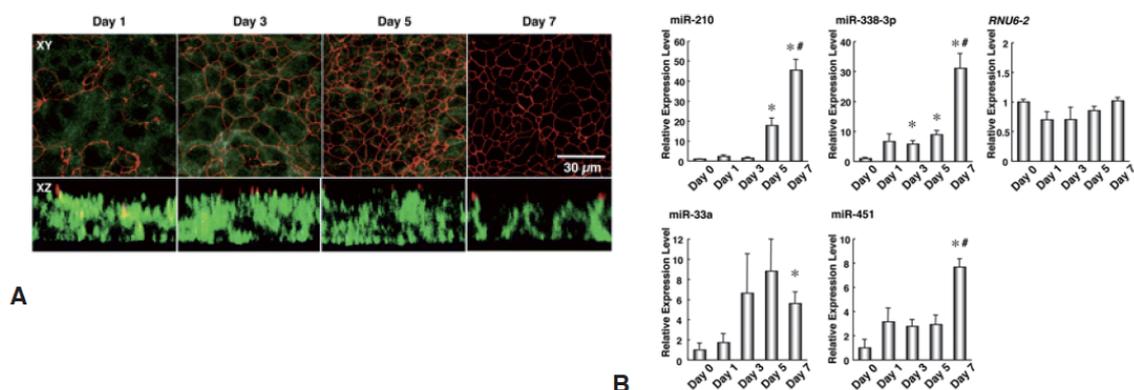


図 2A、B. 上皮形成に伴って発現が亢進する microRNA

2010)、ラット副腎髄質由来細胞株 PC12 細胞を用いた神経分化モデル (Terasawa et al. 2009) を行った。上皮分化モデルでは 253 種類の microRNA の発現を TaqMan 法によるリアルタイム PCR で調べ、4 つの microRNA が分化に伴って発現が亢進することを見出した。図 2A は分化の程度を示すもので、培養 7 日後に上皮細胞に特徴的な細胞極性が形成されていることを示している。apical 側での網目状のタイトジャンクション (TJ) 形成 (赤色：抗 ZO1 免疫蛍光染色) と basolateral 側への $\beta 1$ インテグリン (緑色：免疫蛍光染色) の局在が見られる。図 2B は、同定した microRNA の系時的变化を示す。上皮構造が形成された 7 日目に miR-338-5p の顕著な発現の亢進が見られた。次にこれら microRNA の機能を阻害剤で抑制したところ、miR-338-5p と miR-451 において、TJ 形成の正常に起こったが、basolateral 側への $\beta 1$ インテグリンの局在に異常が見られた (図 2C)。他の二つの miRNA では上皮形成に異常は見られなかった。これら結果は初めて上皮形成に microRNA が関与することを初めて示したものである。多くの癌で上皮の細胞極性の喪失が知られており、癌と microRNA との関連も多数報告されている。同定した microRNA は上皮形成の促進、維持の機能を持つことが考えられ、癌の新たな治療法の開発につながることを期待している。

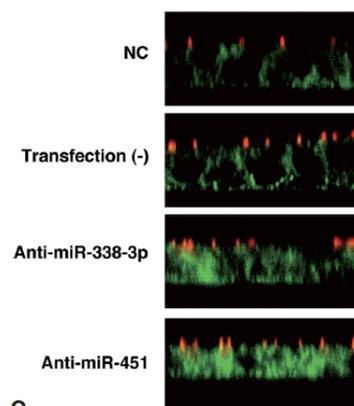


図 2C. microRNA の阻害による上皮形成への影響

巨核球系細胞モデルでは、K562 細胞を PMA 刺激によって巨核球様細胞に分化させ、250 種類の microRNA の発現を調べ、3 つの microRNA (miR-34a, miR-221 および miR-222) が分化に伴って発現が顕著に亢進することを見出した。分化誘導による microRNA 発現変動を図 2D に示す。神経分化モデルでは、PC12 細胞を NGF で刺激し神経突起伸張を促し神経様に分化させ、156 種類の microRNA を調べ 2 つの microRNA (miR-221 と miR-222) 発現が分化前後で顕著に

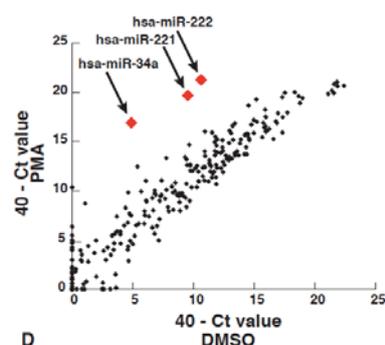


図 2D. 巨核系細胞分化に伴って発現が亢進する microRNA

亢進することを見出した。どちらのモデルでも microRNA は刺激後数時間から誘導が確認され、刺激によって活性化する ERK1/2 経路の活性化が誘導に必要であることが分かった。いずれの場合も microRNA の阻害や、過剰発現によって分化の抑制、促進は観察されなかったが、K562 細胞モデルでは miR-34a の過剰発現によって細胞増殖の抑制が見られた。さらに ERK1/2 経路のシグナルをネガティブフィードバック的に miR-34a が制御することを示した。microRNA による翻訳抑制レベルでのフィードバック制御の報告例はまだ少なく、この分野での研究の発展に多いに寄与することが期待される。

2. 3. 1. 2. 2. 3. 長鎖合成 RNA オリゴを用いた基盤研究

microRNA は分化などの様々な生命現象、癌などの疾患に関与することが明らかにされてきており、もともと生体内にある分子であるので安全性が高いと考えられることから、新たな創薬分子として近年

注目されつつある。また分化に関与する microRNA は、分化促進因子として再生医療への利用も考えられる。一方、任意の遺伝子をノックアウトできる siRNA もまた新たな医薬品として期待されている。本プロジェクトの技術開発項目「RNA の新規合成基盤技術開発と科学分子設計（日本新薬）」では、新たに効率の

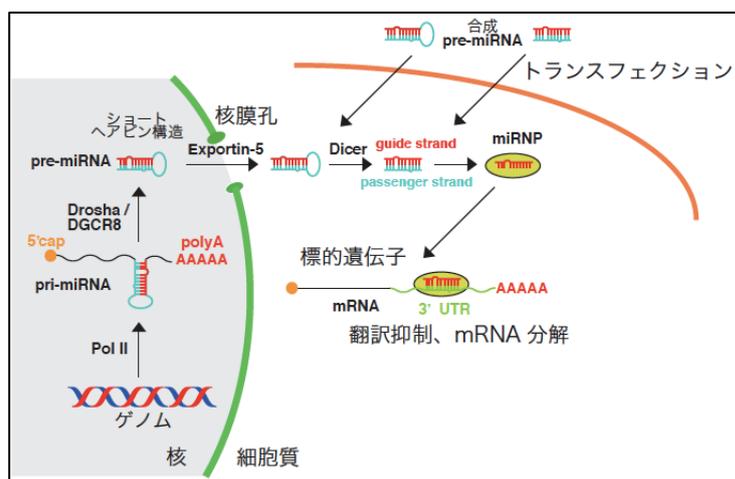


図 3A. microRNA の生合成経路ならびにその機能

の良い長鎖 RNA の合成法の開発に成功しており、彼等の開発した方法は大量合成も容易であり長鎖 RNA を用いた核酸医薬の実用性が高まった。そこで長鎖 RNA を用いた microRNA ならびに siRNA の医薬品開発を見据えた基盤研究を行った。microRNA はゲノムから長い前駆体として転写され、核内で Drosh/DRG8 によるプロセッシングを受けショートヘアピン形の pre-miRNA となり、核外に輸送され次いで Dicer によるプロセッシングを受け、片側の鎖が microRNA として RISC に取込まれ機能する（図 3A）。合成 microRNA の遺伝子導入としては、二本鎖で pre-miRNA を模したもの（市販の pre-miRNA）と完全に pre-miRNA を模したものが考えられる（図 3A）。Dicer によるプロセッシングとその後の RISC への取込みの機構の詳細は明らかでないが、Dicer と RISC が結合していることが報告されておりプロセッシングと RISC 取込みは密接に関連していることが考えられる。完全に pre-miRNA を模したものは Dicer によるプロセッシングから生合成経路入るのでより機能的であることが期待される。siRNA もまた RISC に取込まれて機

能することが明らかにされている。合成 siRNA は一般に 22mer 程度の RNA の二本鎖の短鎖 siRNA を用いることが多い。この場合もショートヘアピン構造を取った合成 shRNA の方が経路に効率的に入りより機能的であることが期待される。pre-miRNA や shRNA には 60mer 程度の RNA 合成が必要な為、従来の RNA 合成法では効率が悪く不向きであったが、本プロジェクト内で開発された長鎖 RNA 合成により実現性が高まった。そこで日本新薬か

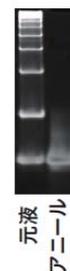


図 3B. 合成 pre-miRNA のアニーリング処理

らまず 3 種類の microRNA の pre-miRNA 配列を持った合成 RNA オリゴの提供を受け解析を進めた。未変性ポリアクリルアミドゲル泳動の解析 (図 3B に一例を示す) から、元液では分子間でアニールシラダー状のバンドが多数見られたが、熱変性・徐冷によりほぼ単一のバンドになり、分子内でダイマー形成したショートヘアピン構造を取ったことが期待された。アニールさせた合成オリゴはリコンビナント Dicer を用いたクリベージアッセイによりいずれも切断を受け (切断効率は若干異なるが)、ヘアピン構造をとることが強く示唆された。次に細胞内でプロセッシングを受けるかをノザンプロット法で検討した。樹立ヒト細胞株である HEK293 細胞にトランスフェクションし 24 時間後に精製したトータル RNA を用いてノザンプロットを行った (図 3C)。いずれの microRNA も mature 産物と推定される位置にバンドが検出され、細胞内でプロセ

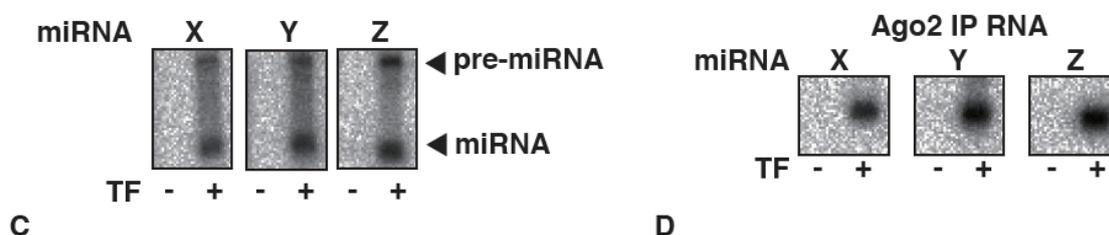


図 3C、D. 合成 pre-miRNA の細胞内でのプロセッシングと RISC への取込み

シングを受けることが明らかになった。またプロセッシングを受けていない pre-miRNA と考えられるバンドも見られた。さらに RISC の構成因子である Ago2 を免疫沈降し RISC に含まれる RNA を精製した。この RNA を用いてノザンプロットを行い、合成 pre-miRNA がプロセッシングを受け RISC に取込まれることも確認した (図 3D)。またこれら microRNA を標的としたレポーターアッセイを行ったところ、市販の二本鎖タイプの pre-miRNA と同等の活性を示すことが分かった (図 3E に一例を示す。wt は標的部位をもったレポーターで mt は標的部位を変異により破壊したレポーターである。wt の場合のみ特異的にレポーター遺伝子の発現を抑制している)。これら結果より合成 pre-miRNA は細胞内でプロセッシングを受け microRNA として機能することが明らかにできた。

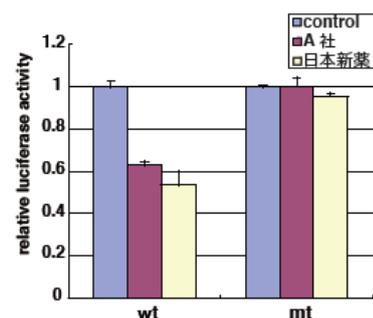


図 3E. 合成 pre-miRNA と市販 pre-miRNA の比較

次に合成 shRNA の検討を行った。siRNA のコントロールとして良く用いられるラミン A/C

遺伝子を標的とした合成 shRNA の提供を受けた。siRNA と
なるアンチセンス鎖は、seed 配列が Dicer の切断に関係な
く決まる様に 5' 端側にした。アンチセンス鎖の長さを変
えたもの 2 種類と 3' 端側中央に欠失の挿入し pre-miRNA
に似せたもの 2 種類の計 4 種類を用意した (図 4A)。ルー
プ配列は既知 microRNA の配列を流用し設計した。樹立ヒ

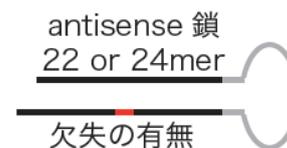


図 4A. 合成 shRNA の模式図

ト細胞株である HeLa 細胞にトランスフェクションし 48 時間後に WB 法 (図 4B #1 と #2 はア
ンチセンス配列がそれぞれ 24mer、22mer のもので #1' と #2' はそれらに欠失を挿入したも

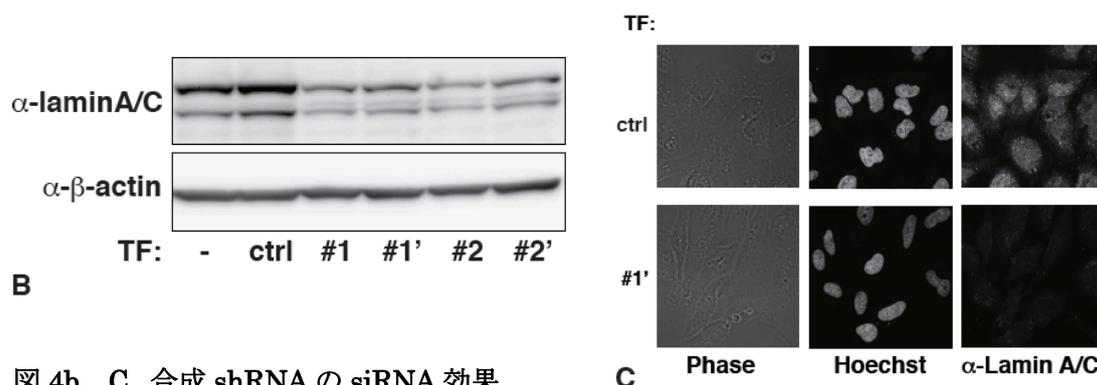


図 4b、C. 合成 shRNA の siRNA 効果

の) と免疫蛍光抗体法 (図 4C 一例を示す) を用いてラミン A/C の発現を調べた。いずれの
shRNA も効率的に内在性のラミン A/C 遺伝子の発現の顕著な減少が確認できた。

そこで 22mer のものを基に設計した二本鎖の短鎖 siRNA との比較を行った。上述の WB 法
では同程度の活性を確認できた (図 4D)。活性を定量的に比較するため、ラミン A/C 遺伝子
の標的部位をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだレポータープラスミドを作成しレ
ポーターアッセイを行った。HeLa 細胞にレポーターを RNA の量を変えトランスフェクショ
ンしレポーター活性を測定した。短鎖 siRNA も合成 shRNA もコントロールをトランスフェ
クションした場合と比して有意にレポーターの活性を抑えたが、shRNA の方がより効率的に
発現を抑制できることが分かった (図 4E RNA 量は細胞 3×10^4 当りを示す. shRNA は 0.25pmol
でも siRNA 2.5pmol 相当の活性を示した. 他の shRNA もほぼ同様の結果を得た)。なおいず
れの RNA も siRNA 標的部位を組込んでいな
いレポーターの活性には影響を与えない
ことは確認している。合成 shRNA 由来のア
ンチセンス鎖は二本鎖 siRNA のものより
RISC への効率よく取込まれる為効果的な
抑制ができた可能性が考えられる。そこで
RISC への取込みを調べた。FLAG タグを付

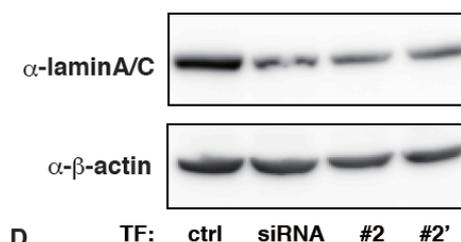
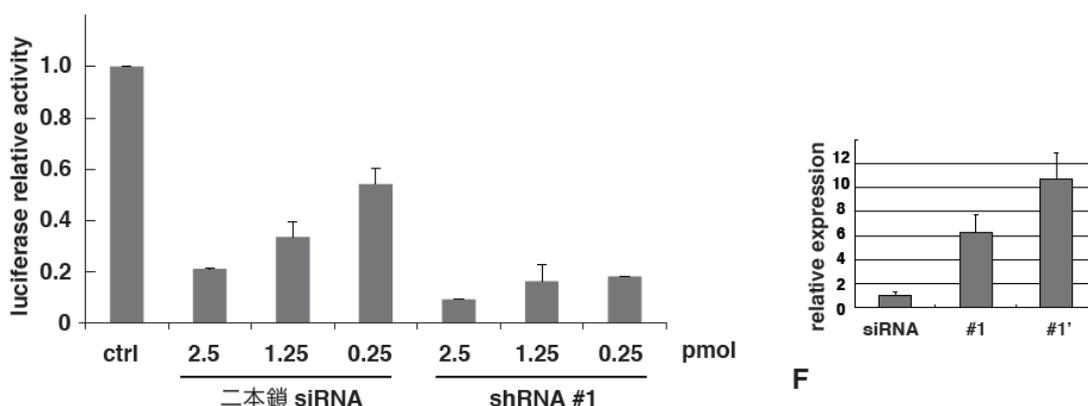


図 4D. 合成 shRNA と従来型 siRNA の比較

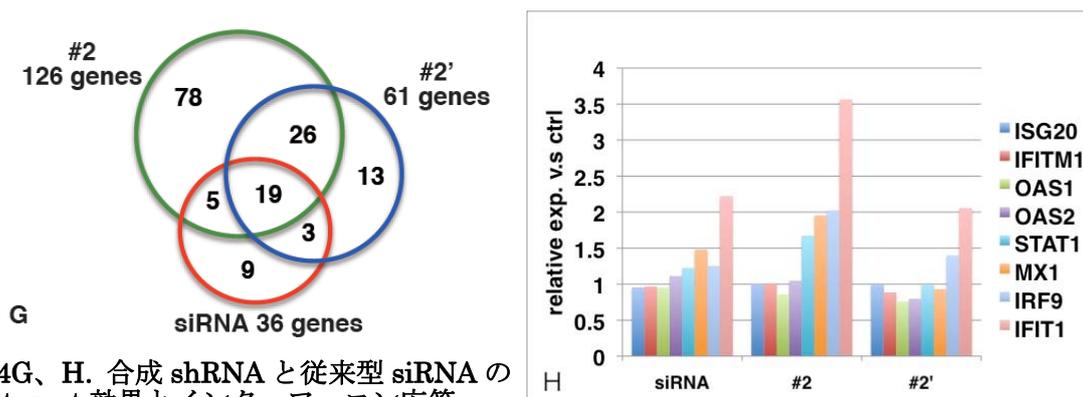
けた Ago2 を恒常的に発現す HEK293-FLAG-Ago2 細胞に短鎖 siRNA、合成 shRNA をトランスフ
ェクションし Ago2 を免疫沈降し免沈産物より RNA を回収し、定量 RT-PCR 法で RISC 中のア

ンチセンス鎖を定量した (図 4F HEK293 細胞で高発現している miR-21 を内部コントロールとしてノーマライズした)。合成 siRNA と比べて合成 shRNA は 6~10 倍程度多く RISC に取込まれた。合成 shRNA は RISC に効率的に取込まれるため活性が高いことが示唆された。



E F
図 4E、F. 合成 shRNA と従来型 siRNA の活性と RISC 取込みの比較

短鎖 siRNA と合成 shRNA の off-target 効果ならびにインターフェロン応答に関してはマイクロアレイ解析を行った。HeLa 細胞に RNA をトランスフェクションし、48 時間後の約 2 万個の遺伝子発現を調べた。図 4G にコントロールと比べて 2 倍以上の発現抑制が見られた遺伝子の数を示す。短鎖 siRNA と比べて合成 shRNA は off-target 遺伝子が多く見られたが、欠失を導入し pre-miRNA に似せることで、4 倍 (#2) から 2 倍 (#2') 程度まで off-target は減じた。理由としては RISC に取込まれる際にセンス鎖よりアンチセンス鎖の取込みが亢進したことが考えられる。図 4H にインターフェロン応答を示す。ここでも合成 shRNA (#2) は短鎖 siRNA より応答を引き越した。しかしながら pre-miRNA に似せたもの (#2') では、顕著な改善が見られた。なお上述のように、合成 shRNA は短鎖 siRNA より活性が高い。今回同量の RNA を用いて実験を行っているので、低濃度で使用することで off-target 効果、インターフェロン応答が減じることが期待される。



G H
図 4G、H. 合成 shRNA と従来型 siRNA の off-target 効果とインターフェロン応答

2. 3. 1. 2. 2. 4. まとめ

本プロジェクトで目標とした長鎖合成 RNA を用いた核酸医薬開発の為の基盤研究の概ねの項目は達成できた。合成 shRNA は従来の短鎖 siRNA より RISC に取込まれやすく高い RNAi 活性を持つことが明らかになり、短鎖 siRNA より低濃度で活性を持ち核酸医薬品として有望であることが示せた。さらに pre-miRNA はもともと生体内に存在するため、pre-miRNA の構造に似せた shRNA は安全性が高いことも期待できる。実際合成 shRNA で見られた off-target 効果やインターフェロン応答は、欠失を挿入し shRNA を pre-miRNA の構造に似せたものでは改善することができた。またループ部分はプロセシングに必須でないので活性に影響を与えることなく修飾塩基等の導入し付加機能を持たせることもできると考えられ、短鎖 siRNA ではできないショートヘアピンタイプならではの高機能な siRNA を設計も期待できる。ループ部分の最適化や、アンチセンス鎖を選択的に取込ますための設計法などのアルゴリズムの開発を今後重要になる。さらに実用化に向けては従来の短鎖 siRNA との薬効比較・off-target 効果の検定などの基礎的な研究と、RNA の分解や自然免疫を制御する修飾核酸の導入をさらに押し進める必要があると思われる。

2. 3. 1. 2. 3. iPS細胞の樹立に関与するmiRNAの機能解析 京都大学（山中グループ）

1998年にヒト胚性幹細胞（embryonic stem cells, ES細胞）が樹立されたことにより、脊髄損傷や1型糖尿病患者などに対する細胞移植治療への期待が大きく高まった。これはES細胞の高い自己複製能と多分化能、すなわち多能性幹細胞としての性質による。なぜなら、①多能性幹細胞を体外で必要なだけ分化させ、②目的の細胞へ分化させ、③患者に移植することが可能になれば、多くの患者を治療できると考えているからである。しかしながら、ES細胞は①②を満たすが、③に関しては拒絶反応の問題があり、これを回避することが重要である。このために患者自身から採取した体細胞から多能性幹細胞を作成することが望まれた。

2006年以前には、体細胞から多能性幹細胞を作成する方法は2つ報告されていた。1つは体細胞から遺伝情報を持った核を採取し、未受精卵の核と入れ替えるという核移植であり、もう一つは体細胞とES細胞を「細胞融合」させてES細胞用の細胞を作成する方法である。しかしながら、これらは卵子提供の問題や4倍体細胞からのES細胞由来の染色体の除去など技術的な問題が未解決のままであった。

このような中、本研究開始当初の2006年、我々の研究室ではマウスの繊維芽細胞にOct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4の4つの因子を導入、発現させると、ES細胞様の性質を有す細胞を誘導できることを発見した。これを人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells)と名付け、体細胞から多能性幹細胞を作成する第3の方法として報告した。

2. 3. 1. 2. 3. 1. 目的

iPS細胞は増殖能、分化能、遺伝子発現など、様々な点でES細胞とほぼ同等の性質を有していたが、iPS細胞の樹立効率が低いことや樹立の際に染色体に組み込まれる（傷つける）レトロウイルスベクターを用いているなどの問題点があり、細胞移植治療の実現に向けて、安全かつ効率よいiPS細胞の樹立方法の確立が必要であった。また、体細胞からES細胞様の細胞が生み出される過程、すなわち初期化のメカニズムに関してはほとんどわかっていなかった。

一方、microRNA（以下miRNA）は、タンパク質をコードしない19-25塩基からなる小さなnon-coding RNAであり、マウスでは約700種、ヒトでは約1000種のmiRNAが同定されていた。様々な疾患、生命現象との関連が報告されていたが、不明な点も多かった。約1/3の遺伝子がmiRNAによって転写後調節を受け、1つのmiRNAが200種類以上の遺伝子を標的にしているという報告もあり、このことからmiRNAがES細胞やiPS細胞の多能性、増殖能や体細胞の初期化に関与している可能性が十分考えられた。

また、ES細胞はクローン間で分化傾向に違いがあることが報告されており、iPS細胞でも分化傾向や安全性にばらつきがあることが考えられ、iPS細胞バンクを作成する際に、iPS

細胞の質の評価が重要となる。その際の判定基準の一つとして、通常の遺伝子発現と同様、miRNA が有用である可能性が考えられた。

iPS 細胞の臨床応用へ向けて、miRNA 研究ができることとして、下の図 1 に示すように、①安全で効率の良い iPS 細胞の樹立方法への応用、②初期化メカニズムの解明、③miRNA 発現量による iPS 細胞クローンの質や安全性の判定、④目的の細胞への分化誘導法への応用などが考えられた。我々は、平成 18 年から平成 21 年度までの 4 年間で、主に①②③に関しての研究をおこなった。

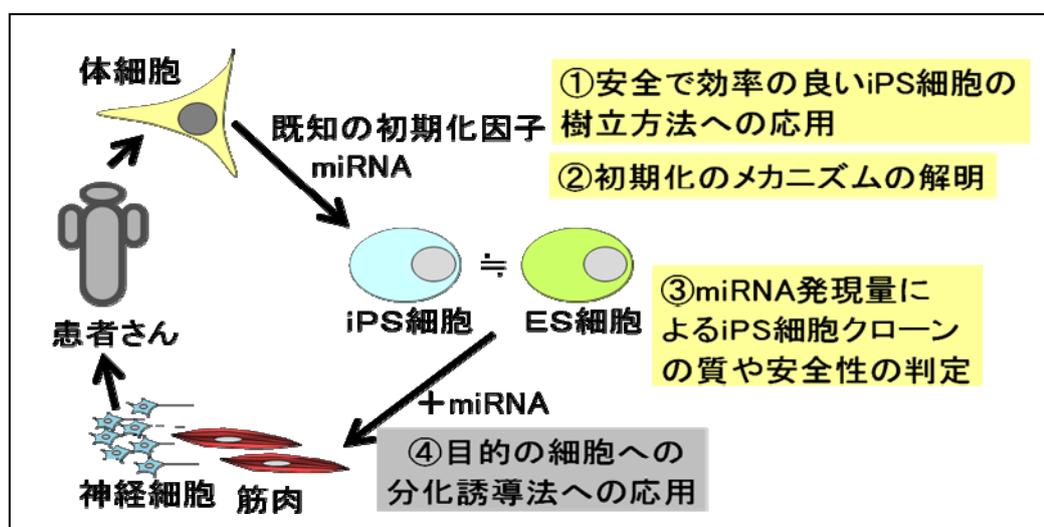


図 1. iPS 細胞の臨床応用へ向けて miRNA 研究ができること

すなわち、miRNA を安全で効率の良い iPS 細胞の樹立方法へ応用できるかを検討し、iPS 細胞の樹立に関与する miRNA の機能を解析することによって、初期化のメカニズムの一端を明らかにすること、また、miRNA の発現プロファイリングを iPS 細胞クローンの質や安全性の判定に応用できるかどうかを検討することを目的とした。

2. 3. 1. 2. 3. 2. マウス ES 細胞、iPS 細胞、胎児線維芽細胞における miRNA の発現プロファイリング

初期化に必要な 4 因子は ES 細胞で特異的に発現しているか、あるいは ES 細胞において重要な働きをしている遺伝子の中から同定された。よって、miRNA に関しても、ES 細胞あるいは iPS 細胞において体細胞に比べて高く発現しているものが初期化にも関与するのではないかと仮説をたてた。まず、ES 細胞、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)、iPS 細胞における miRNA の発現量を調べるため、RNase プロテクションアッセイ、miRNA マイクロアレイ、リアルタイム PCR の 3 つの方法を検討した。

RNase プロテクションアッセイは、定量性もあり、細胞間での miRNA の微妙な発現量の違いを見るには有効であったが、操作の煩雑さからスクリーニングには不向きではあった。

また、京大辻本グループの協力を得て、東レと Invitrogen 社の miRNA マイクロアレイを用いて、ES 細胞、MEF、iPS 細胞（数クローン）での miRNA の発現量の違いを網羅的に検証したところ、第 1 世代 iPS 細胞（Fbx15 遺伝子の発現をマーカーとした iPS 細胞, Fbx iPS）より ES 細胞に近い第 2 世代 iPS 細胞（Nanog 遺伝子の発現をマーカーとした iPS 細胞, Nanog iPS）では、通常の遺伝子発現と同様に、miRNA の発現に関しても、より ES 細胞と似た発現パターンを示すことがわかった（図 2）。しかしながら、RNase プロテクションアッセイで検出できたような各細胞間での発現量の微妙な差を検出するほどの感度、定量性は得られなかった（2006 年当時）。また、各細胞における miRNA の発現量の違いを Invitrogen 社のリアルタイム PCR を用いて調べた。定量性、操作の簡便性、感度、ともに、前述の 2 法より優れており、プロファイリングに一番適していると考えられた。また、ES 細胞で高く発現している 155 種類の miRNA の発現を調べることで、ES 細胞でのみ高く発現する miRNA 群、ES 細胞での発現が分化した細胞での発現よりも高い miRNA 群、第 1 世代 iPS 細胞で高く発現している miRNA 群を抽出することができた。

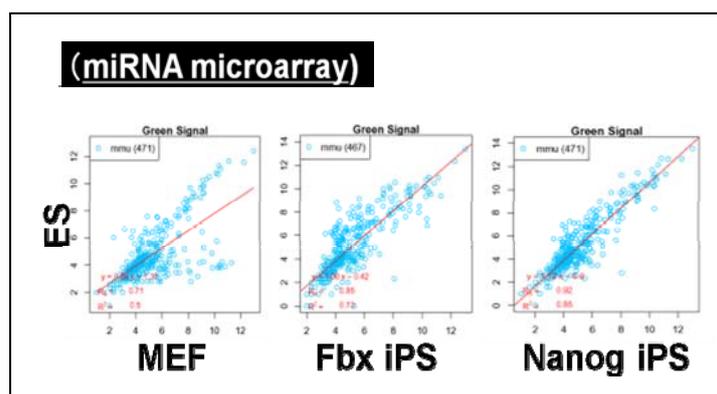


図 2. マウス線維芽細胞、iPS 細胞と ES 細胞における miRNA 発現の比較

2. 3. 1. 2. 3. 3. マウスにおいて iPS 細胞の樹立効率を上昇させる miRNA の同定

平成 18 年度にリアルタイム PCR を用いて抽出した miRNA 群を Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 (OSMK) 4 因子と共発現させて、ES 細胞で特異的に発現する Nanog 遺伝子の発現を指標にしたレポーターマウスの系を用いて iPS 細胞化の効率を検討した。その結果、ES 細胞で特異的に発現する mir-295 を共発現させたとき、コントロールに比べて有意に iPS 細胞化の効率が上昇することがわかった。

また、Myc を除いた Oct3/4, Sox2, Klf4 (OSK) による誘導は、4 因子による誘導に比べると、iPS 細胞の樹立効率が低く、ES 様のコロニーが現れるまでの時間も長くかかることがわかったが、mir-295 を OSK と共発現させ、マウス成体尻尾線維芽細胞から iPS 誘導をおこなうと、共発現させない場合に比べて有意に iPS 細胞の樹立効率が上昇することがわかった（図 3A）。また、OSK と mir-295 を共発現させることによって樹立した細胞は ES 細胞マ

一カー遺伝子を発現し (図 3B)、成体キメラマウス誕生にも寄与する (図 3C) ことから、mir-295 を共発現させることで樹立した iPS 細胞の質が低下しているわけではないことがわかった。また当研究室では、OSK3 因子で樹立した iPS 細胞は OSK に Myc 遺伝子を加えた OSMK 4 因子で樹立した iPS 細胞に比べて、生まれてくるキメラマウスのキメラ率が低いことがわかっているが、mir-295 を共発現させて樹立した iPS 細胞クローン由来のキメラマウスのキメラ率が mir-295 を共発現させたことで上昇することは観察されなかった (図 3D)。

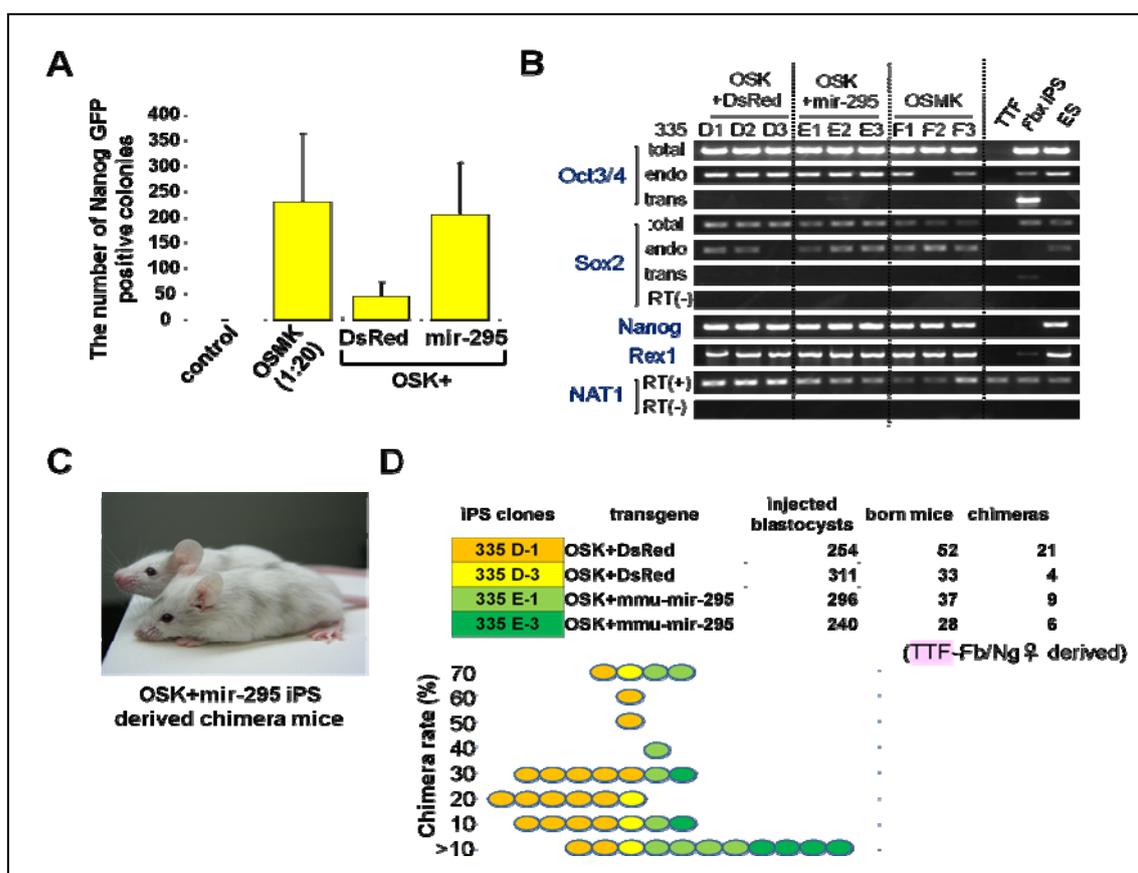


図 3. マウス mir-295 による iPS 細胞樹立効率の上昇と Myc なし 3 因子+mir-295 iPS 細胞の質の検討

2. 3. 1. 2. 3. 4. ヒトにおいて iPS 細胞の樹立効率を上昇させる miRNA の同定

平成 20 年度は、前年度までのマウスに加え、ヒト成人皮膚線維芽細胞からの多能性幹細胞の誘導に積極的に関与している miRNA のスクリーニングを行った。その結果、ヒト ES 細胞で特異的に高発現している mir-302 クラスター (mir-302a, b, c, d) を OCT3/4, SOX2, KLF4 の C-MYC なし 3 因子と共に発現させた場合、クラスターを発現させていない時にくらべて 5 倍程度の効率の上昇が確認された (図 4A)。また、OSK+h-mir-302s で樹立された iPS 細胞は、human ES 細胞様の形をしており (図 4B) 胚葉体を介した in vitro 分化誘導の実験において、三胚葉系に分化することがわかった (図 4C)。(β-III tubulin は外胚葉のマーカー、α-SMA は中胚葉のマーカー、SOX17 は内胚葉のマーカー)

また、1 つのヒト成人皮膚線維芽細胞株でのみ、OCT3/4+h-mir-302s の 2 因子で OSK の 3 因子よりも効率良く、hES 様の多能性幹細胞を樹立することができた。なぜ、この 1 細胞株でのみできるのかは原因不明であるが、現在も検討中である。

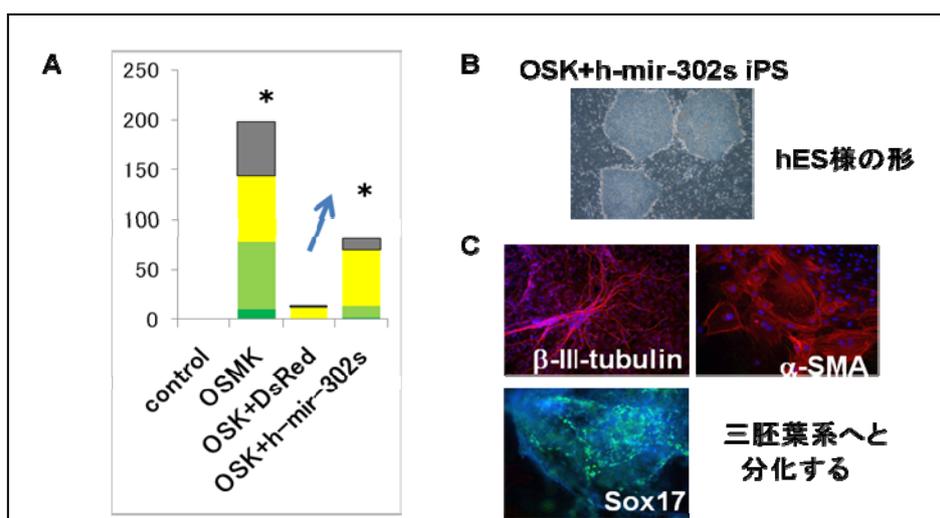


図 4. ヒト mir-302s による iPS 細胞樹立効率の上昇と Myc なし 3 因子+h-mir-302s iPS 細胞の質の検討

2. 3. 1. 2. 3. 5. 初期化のメカニズムの解明と miRNA 発現量による iPS 細胞クローンの質や安全性の判定

(1) 初期化のメカニズムの解明へ向けて

マウスにおいて iPS 細胞の樹立効率を上昇させる効果のあった mir-295 は、iPS 細胞の誘導初期において、初期化因子と共に強制発現させた場合、細胞周期の制御に関わる遺伝子 p21 や Rb12(p130) を RNA, タンパクレベルで抑制していることがわかった。我々の研究室では、p53-p21 経路を抑制することで初期化の効率が大きく上昇することを報告しており、

mir-295 を発現させることによる iPS 細胞の樹立効率上昇のメカニズムの一つは p21 の発現を抑制し、増殖を促進することであると予想される。また、マイクロアレイを用いた解析から、mir-295 は細胞周期に関連する因子以外にも作用して体細胞を ES 細胞へ近づける働きをしていることがわかった。

(2) miRNA 発現量による iPS 細胞クローンの質や安全性の判定

研究開始当時(2006年)と比較して、この4年間で、様々な細胞(線維芽細胞以外に肝臓や胃の上皮細胞など)から、様々な手法(レトロウイルスベクター以外にプラスミドやセンダイウイルスベクターなど)を用いて iPS 細胞を樹立できることがわかった。由来細胞、樹立方法が異なっても、樹立した iPS 細胞は同質のものであるかを調べるために、マウスの様々な体細胞(MEF(胎児線維芽細胞)、TTF(尻尾線維芽細胞)、Hep(肝細胞)、Stm(胃上皮細胞)に4因子(OSMK)あるいは3因子(OSK)を導入することによって作成した様々な iPS 細胞クローンと ES 細胞における miRNA の発現を Agilent 社の microRNA microarray を用いて調べた。その結果、ES 細胞で特異的に発現している mir-290-295 クラスターに含まれる miRNA 群(mmu-miR-290-5p, 3p, 291a-5p, 3p, 292-5p, 3p, 293, 293*, 294, 294*, 295, 295*)は、成体キメラマウスの誕生に寄与する iPS 細胞クローンでは ES 細胞と同等に発現していたが、成体キメラマウスの誕生に寄与に関与しない第1世代の Fbx iPS 細胞4クローンにおいては、ES 細胞と比較して低い発現量しか示さなかった。このことから、これらの miRNA 群は成体キメラマウスの誕生に寄与する第2世代の iPS 細胞であるか否かのマーカーとして使用できると考えられる。また、iPS 細胞間で発現にばらつきがみられる miRNA 群も抽出できた。これらの miRNA の発現は germline transmission が観察されない iPS 細胞クローンでの発現が低い傾向がみられた。つまり、Germline transmission を確認できるような ES 細胞に非常に近い iPS 細胞であるかどうかのマーカーとしてこれらの miRNA 群の発現を調べることは有用であると期待される。

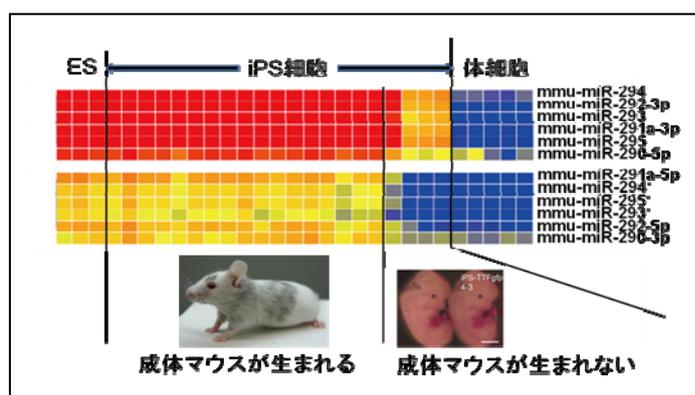


図5. 様々な iPS 細胞における mir-290-295 クラスターの発現比較

2. 3. 1. 2. 3. 6. まとめ

iPS 細胞はマウスやヒトの体細胞に初期化因子を導入することによって作成され、ES 細胞と共に、無限の増殖力と様々な細胞へと分化できる能力を持った多能性幹細胞として、細胞移植治療をはじめとする臨床への応用が期待されている。一方で、近年、19-25 塩基の長さからなる non-coding RNA である microRNA (miRNA) が様々な生物学的現象を制御しており、また、ES 細胞において自己複製能や多能性を制御する中心的なネットワークと非常に密接に関与していることが知られている。我々は miRNA が iPS 細胞の樹立過程にも密接に関与していると予想し、体細胞の iPS 細胞化に関与している miRNA の機能を明らかにすることによって、miRNA の新しい役割だけでなく、リプログラミングの過程そのものについても明らかにすることを期待した。リプログラミングの過程に積極的に関与する miRNA を同定するために、我々は、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) に比べて ES 細胞で高発現している miRNA を既知の初期化因子と共に強制発現させて、iPS 細胞の樹立効率を調べた。その結果、ES 細胞で特異的に発現する miRNA の一部が OSMK, OSK と共発現させたときに iPS 細胞の樹立効率を上昇させることがわかった。また、ヒトにおいても ES 特異的に発現する miRNA が OSK と共発現させたときに、リプログラミングの過程に積極的に関与していることがわかった。これらの結果は ES 特異的に発現する miRNA が線維芽細胞からの多能性細胞の誘導に密に関与していることを示している。また、さらに研究をすすめることにより、(1) ES 特異的な miRNA はリプログラミングの過程で様々な役割を果たしていること、(2) iPS 細胞の miRNA の発現プロファイリングと iPS 細胞の質とは関連性があること、を明らかにした。

2. 3. 1. 2. 3. 7. 総括および今後の展望

(1) 本研究から、マウス、ヒト共に ES 細胞で特異的に発現する miRNA 群の一部が iPS 細胞の樹立効率の上昇に関与していることがわかった。アンチセンス RNA や siRNA が単一の遺伝子を分解することに対し、miRNA は一つで数百もの遺伝子の発現を制御するとも言われており、miRNA の導入が従来になかった分子生物学的な手法になりう

ることが期待されている。医薬品としてではないが、miRNA を iPS 細胞の樹立効率の改善や、既に報告されている初期化因子の代替として用いることが可能となれば、ゲノム DNA を傷つけることなく、必要な時期に一過性に発現させることによって、より高い多能性をもった良質な iPS 細胞を作成する一つの方法として用いることができる。と期待される。

- (2) iPS 細胞における miRNA の発現はもとの体細胞と比較して ES 細胞と非常に似通っていた。しかしながら、iPS 細胞クローン間で発現量に違いのある miRNA も存在した。ES 細胞や iPS 細胞ではクローン間で分化傾向や安全性にばらつきはあることが示唆されており、今後、細胞移植治療へ向けて、iPS 細胞バンクを作成する際に、iPS 細胞の質の判定基準を設定することが一つの課題であるとされる。本研究で、miRNA の発現プロファイリングと ES/iPS 細胞の性質との関連性を示すことができた。通常の遺伝子発現、ジェネティクス、エピジェネティクスと合わせて、miRNA の発現プロファイリングも iPS 細胞の質の判定基準の一つとして有用であることが期待される。

2. 3. 1. 2. 4. *miR-145*の癌抑制遺伝子機能と新規 RNA ネットワークの解明 (千葉大学)

ポストゲノムシーケンス時代において、遺伝子の新たな発現調節機構としてタンパク質をコードしない機能性 RNA の存在が明らかとなりその解析が進行している。機能性 RNA のひとつであるマイクロ RNA (miRNA) は 19-23 塩基の短鎖 RNA 分子であり、タンパク質コード遺伝子の発現を翻訳後あるいは転写レベルで制御している分子である¹⁻³⁾。現時点において、ヒトゲノム中には約 800 種の miRNA の存在が報告されている。miRNA の特徴は、標的遺伝子の 3' 領域内に結合するが、その結合は配列特異的であるが数塩基のミスマッチも容認するため、一つの miRNA は複数の遺伝子の制御を行うことが可能であることである。そのため、ゲノム中に存在する遺伝子の約 30%~40%が miRNA の制御を受けているという報告もある⁴⁾。

近年、癌の分野においてはゲノム科学的なアプローチから、癌細胞と正常細胞を比較し、癌細胞における miRNA の発現異常がさまざまな癌種で報告されている。癌細胞において発現異常を認めた miRNA を指標とした機能解析から、癌遺伝子や癌抑制遺伝子と機能する miRNA の存在が明らかとなってきた^{5,6)}。当初 miRNA の発現異常と癌との関連は慢性リンパ性白血病 (CLL) において報告された。CLL 細胞にはしばしば 13q14 領域の欠失が認められ、この領域に存在する原因遺伝子として 2 種類の miRNA (*miR-15a* と *miR-16-1*) が単離された⁷⁾。さらに、これら miRNA はアポトーシス関連遺伝子である BCL2 を制御している事が明らかとなり、miRNA の癌への関与が明確になった⁷⁾。同様の事例として、肺癌で発現が抑制されている miRNA として *let-7* が探索され、その標的遺伝子として *Ras* 遺伝子が同定されている⁸⁾。この事実は、癌遺伝子機能を有する miRNA の発現亢進と癌抑制遺伝子発現抑制という新たなパスウェイが発癌や癌の進展のメカニズムを知る上で重要な情報を我々にもたらすことを示している。

我々は、癌における新たな RNA ネットワークの探索を目的に、頭頸部癌、食道癌、膀胱癌、前立腺癌などの固形癌の miRNA の発現プロファイルを作製した^{9, 10)}。この過程で、複数種の癌で発現が抑制されている miRNA として *miR-145* を見出した。我々は、*miR-145* は癌抑制遺伝子として機能していると予測し、*miR-145* の癌抑制機能について検討し、その標的遺伝子 *FSCVI* の同定を行ったので報告する。

2. 3. 1. 2. 4. 1. 対象と方法

(1) 癌臨床検体を用いた miRNA 発現プロファイルの作製

臨床検体は、千葉大学医学部附属病院にて外科手術を試行した症例から採取した。検体の採取に際して、十分なインフォームドコンセントを行い、文書にて患者より同意を得た。本研究は、千葉大学の生命倫理審査において承認されている。採取した検体は術後迅速的に RNA 保存液 (RNALater; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に保存した。保

存検体は、液体窒素を用いて粉碎し、TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を回収した。

miRNA 発現解析は、TaqMan Low density Array Human MicroRNA Panel ver.1.0 (Applied Biosystems) を用いた。この解析では、365 種類の miRNA について real-time PCR 法で発現が測定できる。得られた Ct 値は、 $2^{(40-Ct)}$ で変換し、*RNU44* または *RNU48* の発現値で標準化した。

(2) miRNA および siRNA 導入による癌細胞増殖抑制効果および浸潤抑制効果

癌細胞株へ遺伝子導入する miRNA として、合成 miRNA である Pre-miR™ (*miR-145*) および scramble miRNA (コントロール RNA) (Applied Biosystems) を使用し、Lipofectamine™ RNAi-MAX (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて行なった。miRNA の導入効率の評価については、Pre-miR™ である *miR-1* を導入し、その標的遺伝子である *PTK9* の mRNA 発現により評価した (*miR-1* は *PTK9* の mRNA を直接分解することが報告されている)。siRNA についても miRNA と同様に癌細胞株へ導入を行った。

細胞増殖は miRNA 導入 72 時間後に XTT アッセイ (Roche Applied Science, Tokyo, Japan) にて解析を行った。癌細胞の浸潤能については核酸導入 48 時間後のマトリジェル (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) 通過細胞数を計測し解析した^{9,10)}。

(3) *miR-145* の標的遺伝子の探索と同定

標的遺伝子の探索は、1) *miR-145* 導入細胞を用いた発現解析データ、2) 頭頸部扁平上皮癌臨床検体におけるプロテオーム解析データから *miR-145* の標的候補遺伝子の選択を行った。その後、標的候補遺伝子について公共の miRNA データベース (miRBase::Sequences; <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) にて標的部位の検索を行った。

標的遺伝子候補の一つである *FSCN1* の 3' UTR について、*miR-145* の標的部位 4 箇所をそれぞれ psiCHECK-2 ベクター (Promega, Madison, WI, USA) に組み込み、癌細胞株に導入し、dual-luciferase assay system (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性の測定を行い標的部位の検討を行った。

(4) 癌細胞株および臨床検体における *miR-145* および標的遺伝子 *FSCN1* の発現

miRNA (*miR-145*) の測定は Stem-loop RT-PCR (TaqMan™ MicroRNA Assays, Applied Biosystem) を用いて行った。*FSCN1* の測定は TaqMan Gene Expression Assay (Hs00979631-g1) を用いた。内部標準の遺伝子として、miRNA は *RNU44* を用いた。また、*FSCN1* では *GAPDH* を用いた。臨床検体における標的遺伝子 *FSCN1* の蛋白発現については、パラフィン包埋ブロックを薄切、脱パラフィン後、抗 *FSCN1* モノクローナル抗体 (abcam) で一次染色した後、ビオチン標識抗 IgG マウス抗体 (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) で二次染色を行った。その後、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンで反応させ、ヒストファ

インシンプルステイン DAB 溶液で発色、ヘマトキシリン溶液で対比染色し検鏡した。

2. 3. 1. 2. 4. 2. 結果

(1) 癌臨床検体を用いた miRNA 発現プロファイル

頭頸部癌、食道癌、膀胱癌、前立腺癌における miRNA 発現プロファイルの比較から、癌に共通して発現変動を認める miRNA の探索が可能であった。表 1 に食道癌細胞において発現が抑制されている miRNA のリストを示した。このリストの中で、頭頸部癌、膀胱癌、前立腺癌においても発現が抑制されている *miR-1*, *miR-133a*, *miR-145* について下線で示した。*miR-145* は共通して発現が抑制されている 3 つの miRNA の中で最も発現が抑制されていた miRNA であった。

表 1. Down-regulated miRNAs in esophageal cancer based on miRNA expression signature

miRNA	P-value	Normalized data		Fold change
		Normal	Tumor	Tumor/Normal
miR-375	4.46E-06	363.33	6.36	0.018
Let-7c	5.77E-06	398.76	71.78	0.180
<u>miR-145</u>	1.25E-05	588.41	91.82	0.156
miR-143	1.25E-05	367.59	38.70	0.105
miR-100	1.25E-05	945.27	157.57	0.167
<u>miR-133a</u>	5.55E-05	84.31	2.30	0.027
miR-99a	5.55E-05	629.04	125.14	0.199
miR-133b	7.30E-05	75.10	4.01	0.053
<u>miR-1</u>	1.06E-04	229.36	12.62	0.055
miR-30a-3p	1.31E-04	118.39	21.94	0.185
miR-504	7.90E-03	0.10	0.02	0.200
miR-139-5p	1.03E-03	3.20	0.56	0.175
miR-204	1.09E-02	9.42	0.45	0.048
miR-203	8.85E-02	8151.32	1448.84	0.178
miR-326	1.09E-02	0.25	0.04	0.160

(2) 癌細胞株における *miR-145* の癌抑制機能

成熟型の *miR-145* (合成した 2 本鎖 RNA) を 5 種類の癌細胞株 (SAS・口腔癌由来、FaDu・咽頭癌由来、PC3・前立腺癌由来、TE2・食道癌由来、BOY・膀胱癌由来) に導入し、72 時間後の細胞増殖を XTT アッセイにて解析した (図 1)。その結果、コントロールとなる scramble RNA 導入細胞に比べ、*miR-145* を導入した 5 種類全ての細胞で細胞増殖の抑制が認められた

($P < 0.05$)。

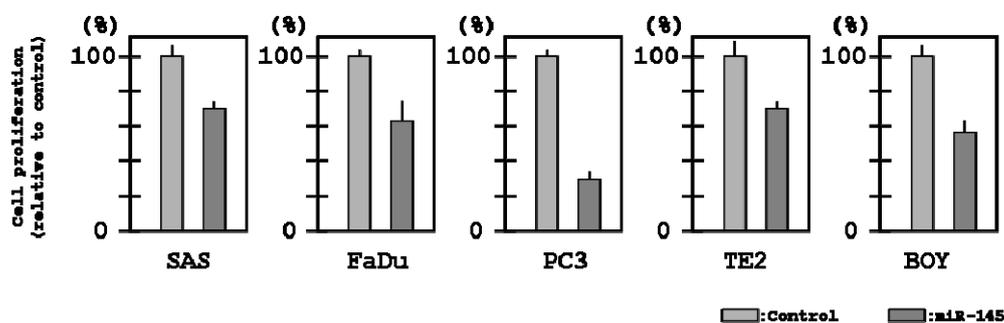


図 1. マイクロ RNA (*miR-145*) 細胞導入による癌細胞増殖抑制効果

5 種類の癌細胞株 (SAS、FaDu、PC3、TE2、BOY) に *miR-145* を導入し、72 時間後の細胞の増殖を XTT アッセイにて解析した。miRNA は ABI 社の Pre-miR™ を使用した。導入する miRNA のコントロールとして同じく ABI 社の Scramble RNA を用いた。Scramble 導入細胞株の細胞数を 100% として各々の細胞増殖抑制効率を示した。解析は 3 回ずつ独立して行い、全てで有意差を認めた ($P < 0.05$)。

同様に、*miR-145* を 5 種類の細胞に導入し、細胞の浸潤能について解析を行った (図 2)。方法は細胞増殖の解析と同様にコントロールとなる 21 塩基 RNA 導入細胞を基準として、24 時間後にマトリゲルを通過するそれぞれの細胞数の変化を解析した。図 2 に示すように、全ての細胞において *miR-145* を導入する事により、強い細胞浸潤能の抑制が認められた ($P < 0.05$)。

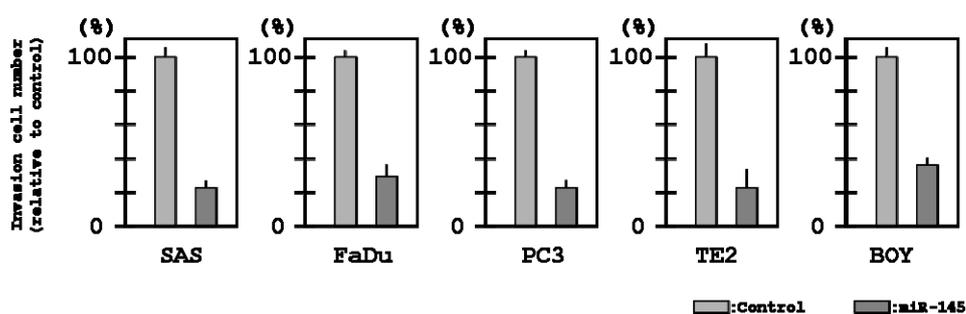


図 2. マイクロ RNA 細胞導入 (*miR-145*) による癌細胞浸潤能抑制効果

図 1 同様に細胞株に *miR-145* および scramble を導入し、48 時間後にマトリゲルを通過した細胞を計測した。Scramble 導入細胞株を 100% として各々の細胞浸潤能抑制効率を示した。解析は 3 回ずつ独立して行い、全てで有意差を認めた ($P < 0.05$)。

(3) *miR-145* の標的遺伝子としての *FSCN1*

細胞増殖抑制効果や細胞浸潤能抑制などの癌抑制機能を有する *miR-145* の標的遺伝子を探索するため以下の方法を駆使した。1)、*miR-145* 導入細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析、2) サンガーセンター、microRNA データベース (miRBase::Sequences) を用いた標的遺伝子探索である。マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析から *FSCN1* (Fascin homolog 1: accession number, BT006636) が有力な標的遺伝子候補として探索された。更に、*FSCN1* についてデータベースを検索するとその 3' UTR に *miR-145* の結合予測配列が存在する事が判明した (図3)。

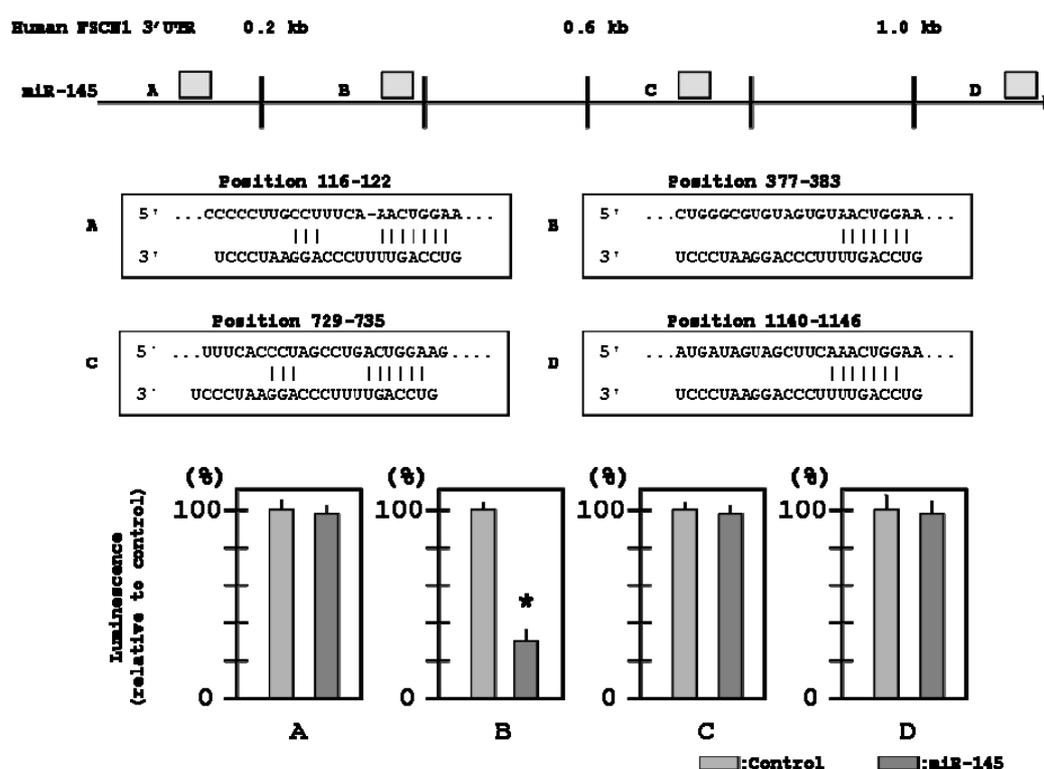


図3. マイクロ RNA (*miR-145*) の標的遺伝子の同定

図3の上部に *FSCN1* 遺伝子の 3' UTR (untranslated region) に存在する *miR-145* の結合部位を示した。結合予測部位は miRNA データベース (miRBase::sequence) を参考にした。図3下部は、4箇所のみRNA結合部位に対してルシフェラーゼアッセイを行い、miRNAの直接的な結合部位を決定した。*miR-145* は position 377-383 に結合することが明らかとなった。癌細胞株、TE2を使用し、解析は3回ずつ独立して行い、有意差を認めた ($P < 0.05$) 群に*を記した。

次に、*miR-145* が直接 *FSCN1* を制御しているか生化学的な検証を行った。図3に示すように *FSCN1* の 3' UTR には、4箇所の *miR-145* の結合予測配列が存在するため、それぞれの配

列を含む 50~100bp の cDNA 断片 (図 A~D) を各々 psiCHECK-2 ベクターに組み込み、TE2 細胞に導入後ルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。その結果、*miR-145* では図 3 の B の配列 (position 377-383) においてルシフェラーゼ活性が有意に低下する事が示され、これら配列に直接 *miR-145* が結合することが判明した (図 3)。更に TE2 細胞に *miR-145* を導入し、*FSCN1* の mRNA およびタンパクレベルの発現を解析した結果、*miR-145* 導入によって *FSCN1* の mRNA、タンパク共に発現レベルの低下を観察した (図 4)。

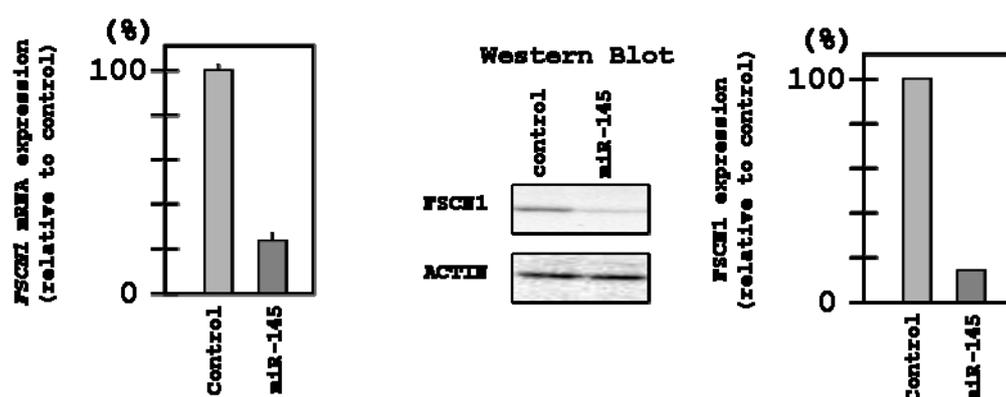


図 4. マイクロ RNA (*miR-145*) 導入による *FSCN1* の発現抑制

癌細胞株 (TE2) に図 1 同様 miRNA を導入し、72 時間後に細胞を回収し、*FSCN1* の mRNA およびタンパクを回収した。mRNA は定量 PCR 法により測定した。Scramble 導入細胞株を 100%として *FSCN1* の発現を示した。有意差を認めた ($P < 0.05$) 群に*を記した。*FSCN1* タンパクの解析は Western Blot 法により行った。beta-actin をコントロールとして用いた。miRNA 導入により *FSCN1* の mRNA およびタンパクレベルの発現が抑制された。

(4) 癌細胞株における *FSCN1* の癌遺伝子機能

2 種類の癌細胞株 (SAS、TE2) を用いて *FSCN1* の癌遺伝子としての機能解析を行った。方法は、*si-FSCN1* 導入により内在性の *FSCN1* をノックダウンし、72 時間後の細胞増殖と細胞浸潤能を解析した。使用した 2 種類の癌細胞株において、*FSCN1* をノックダウンにより細胞増殖抑制と細胞浸潤能抑制を認めた (図 5) ($P < 0.05$)。

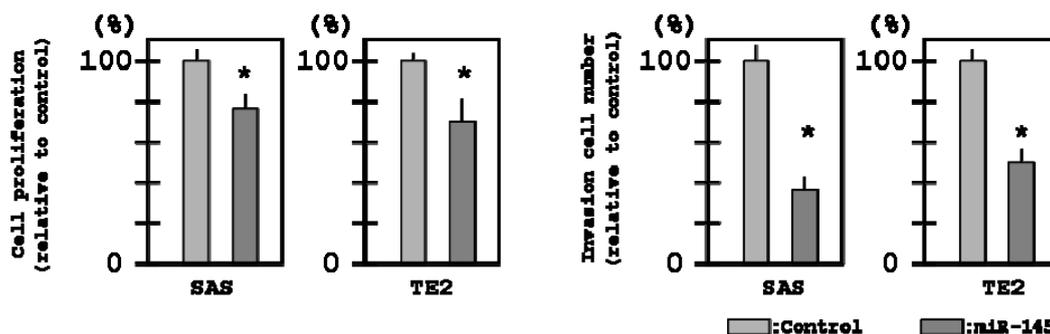


図5. *si-FSCN1* 細胞導入による癌細胞浸潤能抑制効果

2種類の癌細胞株 (SAS、TE2) に *si-FSCN1* を導入し、72 時間後の細胞の増殖を XTT アッセイにて解析した。図1同様に細胞株に *si-FSCN1* を導入し、48 時間後にマトリゲルを通過した細胞を計測した。解析は3回ずつ独立して行い、有意差を認めた ($P < 0.05$) 群に*を記した。

(5) 扁平上皮癌臨床検体における *miR-145* および *FSCN1* の発現

癌細胞株を用いた解析から、*miR-145* は癌抑制機能を有する事、また、これら標的遺伝子として *FSCN1* のタンパク質発現を制御している事が示された。実際の食道扁平上皮癌臨床検体においてこれら miRNA および *FSCN1* がどのような発現様式を呈するか、mRNA レベルおよびタンパクレベルで解析を行った。*miR-145* の miRNA について、20 症例の臨床検体を用いて定量 PCR 法にて解析を行った結果、癌部で非癌部に比べ有意に ($P < 0.05$) 発現の低下を認めた (図 6A)。これに対して *FSCN1* は、癌部において有意に ($P < 0.05$) mRNA の発現の亢進が認められた (図 6A)。臨床検体について、タンパクレベルにおける *FSCN1* の発現を免疫組織染色にて確認した結果、癌細胞において *FSCN1* の発現が認められた (図 6B)。

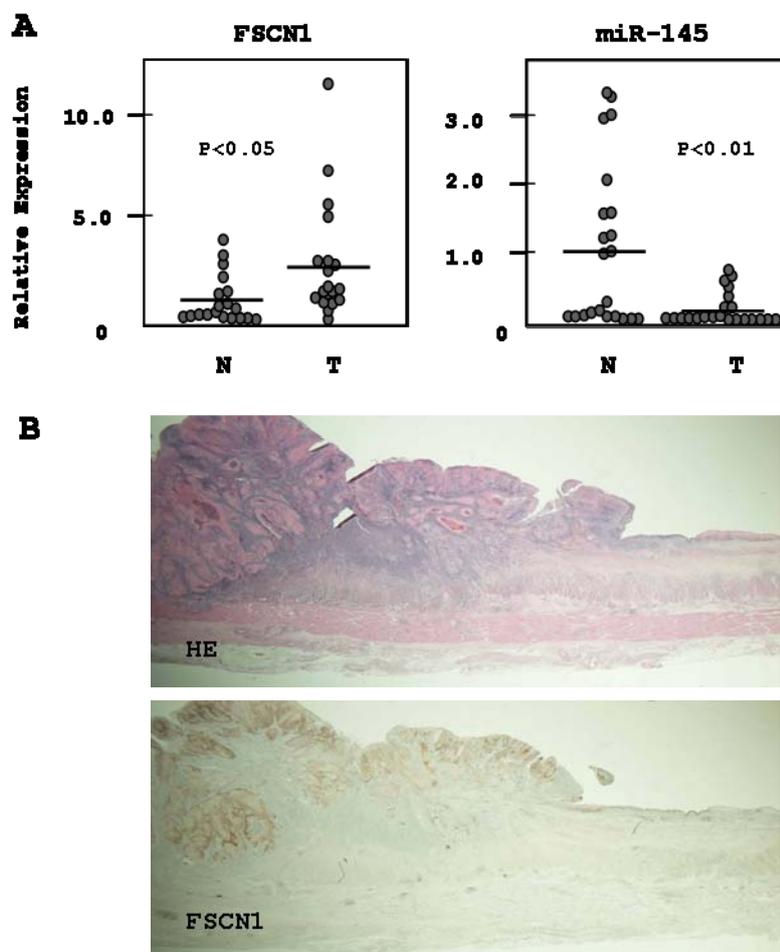


図6．頭頸部扁平上皮癌臨床検体におけるマイクロRNAおよび*FSCN1*遺伝子の発現
 (A) 食道扁平上皮癌臨床検体20症例の癌部・非癌部について、*miR-145*の発現を定量PCRにて測定した。使用したプライマーはABI社のTaqMan™ MicroRNA Assayを使用し、内部標準遺伝子として*RNU44*を用いた。*miR-145*は非癌部に対して癌部で有意に($P < 0.05$)発現が低下していた。同様に*FSCN1*遺伝子の発現を測定した。使用したプライマーはABI社のTaqMan™ Gene Expression Assayを使用し、内部標準遺伝子として*GAPDH*を用いた。*FSCN1*のmRNAは、非癌部に対して癌部で有意に($P < 0.05$)発現が亢進していた。

(B) 食道扁平上皮癌臨床検体における*FSCN1*タンパクの発現について*FSCN1*抗体で免疫染色を行った。いずれの症例においても癌細胞で*FSCN1*タンパクの高発現が認められた。

2. 3. 1. 2. 4. 3. 考察

近年、タンパク質をコードしない機能性 RNA 分子がゲノム中に存在し、タンパクコード遺伝子の制御を行っていることが報告されている。機能性 RNA の中で、miRNA は最終的に 21 塩基の 1 本鎖 RNA として機能する短鎖核酸である。この分子の機能は、標的となるタンパクコード遺伝子の 3' UTR に結合し、タンパク質合成阻害や RNA 分解により遺伝子の発現制御を行うことである。近年、癌の分野においては、miRNA の発現プロファイルに基づいた解析が盛んに行われており、癌細胞で発現変動する miRNA の報告が相次いで成されている¹³⁻¹⁵⁾。今後これら癌で発現変動する miRNA の機能解析とその標的遺伝子の探索が進むものと考えられる。我々も独自に固形癌の臨床検体を用いた発現プロファイルを作製し、癌抑制遺伝子として機能する miRNA の探索を行っている^{9,10)}。他の研究グループの miRNA プロファイルと我々のデータの比較から、*miR-145* が癌細胞で有意に発現低下している事を見出し、癌抑制機能を有する miRNA である可能性が示唆された^{10,11)}。そこで本研究では、*miR-145* が癌細胞で癌抑制機能を有するか、またその標的遺伝子は何か、について検討を行った。

細胞増殖抑制能については 5 種類の由来の異なる癌細胞株を用いて検討を行った。*miR-145* は解析した全ての細胞株の増殖を抑制した。更に浸潤能抑制効果については、*miR-145* 導入により癌細胞の浸潤能の低下が認められた。これらの結果は、*miR-145* は癌細胞において癌抑制遺伝子として機能していることを強く示唆するものである。

miRNA の生体内における機能は標的遺伝子の制御であるため、癌抑制遺伝子としての *miR-145* の標的遺伝子の探索は重要である。我々は、癌細胞株に *miR-145* を導入し、その前後に発現変化する遺伝子の探索から *miR-145* の標的候補遺伝子として *FSCN1* (accession number, BT006636; Fascin homolog 1) を見出した。驚くことに、miRNA データベース (miRBase::Sequences) を調べてみると、*FSCN1* 遺伝子の 3' UTR には 4 箇所 *miR-145* 結合部位が存在することが明らかとなり、これら miRNA が *FSCN1* を制御していることが強く示唆された。実際の生化学的な解析から、*miR-145* は *FSCN1* 遺伝子の 3' UTR に 1 箇所の結合部位を有し、mRNA を分解することによって *FSCN1* タンパクの制御を行っていることが示された。*FSCN1* は 55kDa のタンパク質であり、細胞骨格のアクチンを束ねる機能を有しており細胞膜の突起を誘導する¹²⁾。*FSCN1* と癌との関連の報告を調べてみると、肺癌では *FSCN1* の発現の亢進が予後不良と相関する報告¹³⁾、浸潤型の高分化型星状細胞腫では *FSCN1* の発現が認められる報告¹⁴⁾ など多くの報告が成されている。扁平上皮癌である食道においても、予後不良症例で *FSCN1* タンパクの亢進が報告されている¹⁵⁾。この様に、*FSCN1* の過剰発現は癌細胞の浸潤能を高め、結果として転移や浸潤を引き起こし予後不良となることが明らかとなってきた。我々の *FSCN1* ノックダウンによる機能解析からも癌遺伝子機能を有することが示された。

実際の扁平上皮癌臨床検体において、*miR-145* の発現低下と *FSCN1* の発現亢進が認められるか mRNA レベルの解析と臨床検体の免疫染色を行った。臨床検体においても *miR-145* の発現抑制と、標的遺伝子である *FSCN1* の過剰発現が認められた。つまり、癌細胞において

*miR-145*の発現が低下することにより、本来制御している *FSCN1* の制御が不能となり、*FSCN1* タンパクの発現が過剰になることを証明することが可能であった。癌の発生や進展には多くの遺伝子が関与していることは周知の事実であり、現在のゲノム科学的解析により網羅的な遺伝子・タンパク質の探索が進行している。遺伝子の発現制御には染色体の構造異常やメチル化などのエピジェネティックな変化が知られている。今回の解析で新たに miRNA の発現低下によるタンパクコード遺伝子の過剰発現の機構が明らかとなり、ますます癌の分子機構の難解さが呈された。しかしながら miRNA は、合成可能な短鎖核酸分子であること、生体内の内在性遺伝子の一つであること、一つの miRNA が複数の遺伝子の制御を行っていることなど癌治療の標的分子であり、miRNA を含めた癌の RNA ネットワークの解明は我々に重要な知見を提供してくれると考える。

2. 3. 1. 2. 4. 4. まとめ

近年、遺伝子の新たな発現調節機構として、タンパクをコードしない機能性 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) が注目されている。miRNA とは 19-23 塩基の短鎖 RNA 分子であり、遺伝子発現を翻訳阻害あるいは mRNA の分解を通して制御している。miRNA は複数の遺伝子を標的とすることが報告されている。そのため、miRNA の発現異常は細胞内における遺伝子の攪乱を引き起こし、疾患の発生機序に重要な役割を担っていることが報告されている。我々はこれまでに、固形癌臨床検体を用いた miRNA の発現プロファイルから、*miR-145* が複数の癌種の癌細胞で発現抑制されていることを見出した。ヒト固形癌における *miR-145* の癌抑制機能の解析と、これら miRNA の標的遺伝子の同定を試みた。miRNA とタンパクコード遺伝子のネットワークを明らかにすることにより、癌における分子機構の新たな情報が得られるものと考えられる。

2. 3. 1. 2. 4. 5. 文献

- 1) Bartel DP, MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281-287, 2004
- 2) Ambros V, The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**:350-355, 2004
- 3) He L, Hannon GJ, MicroRNAs: Small RNAs with a big role gene regulation. *Nat.Rev.Cancer* **5**:522-531, 2004
- 4) Lewis BP, Burge CB, Bartel DP, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**:15-20, 2005
- 5) Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat.Rev.Cancer* **6**:259-269, 2006
- 6) Calin GA, Croce CM, MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev.Cancer* **6**:857-866, 2006
- 7) Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al., miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Pro.Natl.Acad.Sci.* **102**:13944-13949, 2005
- 8) Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al., RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**:635-47, 2005
- 9) Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al., Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int.J.Cancer* **125**:345-362, 2009
- 10) Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al., miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int.J.Cancer* in press, 2010
- 11) Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, et al., miR-145 and miR-133^a function as tumor suppressors and directly regulate FSCN1

expression in bladder cancer. *Br. J. Cancer* **102**: 883-891, 2010

- 12) Adams JC, Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:590-596, 2004
- 13) Pelosi G, Pastorino U, Pasini F, et al., Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **88**:537-547, 2003
- 14) Peraud A, Mondal S, Hawkins C, et al., Expression of fascin, an actin-bundling protein, in astrocytomas of varying grades. *Brain Tumor Pathol.* **20**:53-58, 2003
- 15) Hashimoto Y, Ito T, Okumura T, et al., Prognostic significance of fascin overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**:2597-605, 2005

2. 3. 2. 機能性RNAに関する基盤的知見の獲得とそれを基にした機能性RNA同定

2. 3. 2. 1. 機能性ncRNAの多面的選別法の確立と機能解明

集中研③、分室12（日立ソフトウェアエンジニアリング）

共同実施先：産総研③、東京工業大学（相澤）、弘前大学（牛田）

2. 3. 2. 1. 1. 細胞核内ncRNAの機能解析

（集中研、日立ソフト、産総研③）

ヒトゲノムの98%を占める非コード領域から多数のRNAが産生されていることが明らかにされたが、その機能はほとんどのものが不明のままであった。これらの長鎖ncRNAの中で機能が解明されているものは、高々20種類程度に過ぎず、その機能もエピジェネティック制御、転写因子の活性制御、タンパク質の会合、タンパク質輸送などの過程に関わる例など多岐に渡っている。つまりmiRNA研究で確立されている一般的な機能に裏打ちされたカテゴリーではないことに注意が必要である。そこで本グループでは、ゲノムの暗黒物質とも呼ばれる長鎖ncRNAの基盤的な特徴を注意深く解析し、その中からncRNAの生合成、細胞内挙動、機能に関する特有の基盤的ルールを見出すことを目標にし研究を実施してきた。例えば、タンパク質をコードするmRNAには、その機能の特徴付ける「トリプレットコードン」が存在し、それが機能単位となっている。一方、タンパク質をコードしたncRNAには、このような機能単位は存在せず、その代わりにRNA自身が機能を果たすために必要な機能ユニットが存在していることが考えられる。一方で、こうしたncRNAの機能ユニットは、RNA自身の配列や構造によって規定されるだけでなく、そこに相互作用するタンパク質因子によって規定される可能性も重要である。よってncRNAの作用機序を解明し、その機能ユニットを同定するためには、RNAと相互作用タンパク質の双方を同時に解析する必要がある。このように、ncRNAの研究はこれまでのタンパク質遺伝子を標的にして展開してきた研究の常識にとらわれず、ncRNA独自の基盤ルールを見出して、それに基づいた研究手順を構築する必要がある。またこうした研究基盤が整備されない限り、ゲノムの暗黒物質の機能に至る事は困難であり、本プロジェクトの方向性である機能性RNAを用いた産業技術を確立するために、こうした基盤的知見の獲得が不可欠であると考えられる。

本研究では、まず細胞内でncRNA特有の挙動を見出すために、細胞内局在解析と遺伝子発現プロファイリング解析を実施した。次に、そこで見出されたncRNA特有の基盤情報を基に、細胞核内に局在するRNAを簡便にノックダウンする機能解析法を開発し、このオリジナル手法を用いて機能解析を実施した。一方で、ncRNAが機能する上で不可欠な相互作用タンパク質の情報を得るための方法として、ヒト完全長cDNAリソースを利用すること、網羅的なRNA干渉ライブラリーの作成、そしてCLIP法の改良などを実施し、その組み合わせによって相互作用タンパク質因子を同定する有効性を示した。こうした機能解析の結果、全く新しいncRNAの機能を見出すことができ、同時にその相互作用タンパク質についての既

知情報から疾患と ncRNA との接点を見出す事に成功した。

(1) 長鎖 ncRNA の基盤情報の獲得

H-Invitational データベース (H-InvDB) Ver 2 に 2005 年当時登録されていた 5498 個の non-protein coding transcript (最大 ORF 長 80 アミノ酸) を基に図 1 に示すフローチャートに乗っ取って、独立の転写単位から転写され、両末端が完全長 cDNA として登録されており、さらにリピート配列を多く含まない 150 種類の cDNA クローンを解析対象の機能性長鎖 ncRNA として解析に用いた。これらの 150 種類の ncRNA について特異的なプライマーセットを設計し、これらを用いて定量 RT-PCR によって発現量を定量することを基本解析技術として取り入れた。基盤的な情報として、1) 細胞内局在情報、2) 組織別の発現特異性の検索を執り行った。細胞内局在の解析には、常法とされている非イオン化性界面活性剤を用いた HeLa 細胞の細胞質画分と核画分の分離し、さらに得られた核画分をさらにショ糖密度勾配遠心にかけて、低密度核画分と高密度核画分、核小体沈殿を得た。その後、各分画から調製した RNA を用いて 158 種類の ncRNA 量を測定した。その結果を図 2 左に示す。HeLa 細胞で発現が確認された約

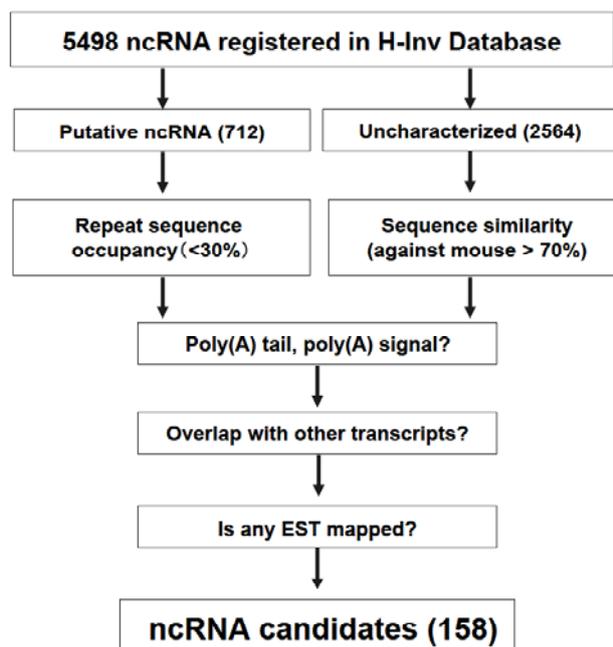


図 1. H-InvDB からの機能性 ncRNA 候補の選別手

約 100 種類の ncRNA の内、80%程度が細胞核内に局在しており、明らかに mRNA の局在パターンとは異なることが明らかになった。また高密度画分に局在するものもあり、これらは何らかの構造体内に含まれていることが推測された。次にヒトの 10 組織由来の RNA サンプルを用いて、158 種類の ncRNA の発現プロファイリング解析を行った。その結果、単一の組織でのみ発現が認められたものが約 1/4 あり、少数組織でのみ発現するものを併せると 70%でものぼることが明らかになった。こうしたことから、ncRNA は特定の組織で発現し機能してい

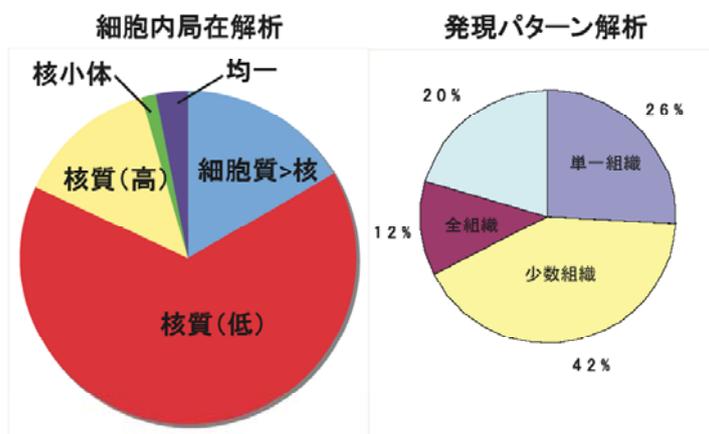


図 2. 長鎖 RNA の基盤知見：細胞内局在パターン (左) と発現組織特異性 (右)

るものが多く、各組織特有の生理現象にリンクした機能を果たしている事が示唆された。

(2) 細胞核内 RNA の解析法の開発

細胞核内に存在する長鎖 ncRNA の機能解析には、それぞれの ncRNA を特異的に機能阻害し、それによって引き起こされる変化を検出する必要がある。通常、タンパク質遺伝子の機能解析には、siRNA を用いた RNA 干渉法が一般的に用いられている。しかしながら、哺乳類細胞では、RNA 干渉は細胞質に限られて起こる現象なので、核内の ncRNA を標的に RNA 干渉によってノックダウンを行う事は困難であった。そこで RNA 干渉に代わる核内 RNA を標的にしたノックダウン手法の開発を行った。原理としては、標的 RNA に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を設計し、さらに細胞内で安定化させるために 2 種類の化学修飾を施し、これをヌクレオフェクションによって効率良く細胞核内に導入する事によって、標的 RNA と ASO とのハイブリッドを形成させた。その結果、細胞核内に存在する RNaseH 活性によって標的 RNA が分解を受け、その後エクソヌクレアーゼによって標的 RNA が分解される (図 3)。この方法によって RNA 干渉では決して分解できなかった 50 種類以上の核内 ncRNA を効率良く、且つ簡便にノックダウンできることを示した (Ideue et al., 2009)。またこのノックダウン効果は、ヒト、マウスの 10 種類以上の培養細胞で認められた。

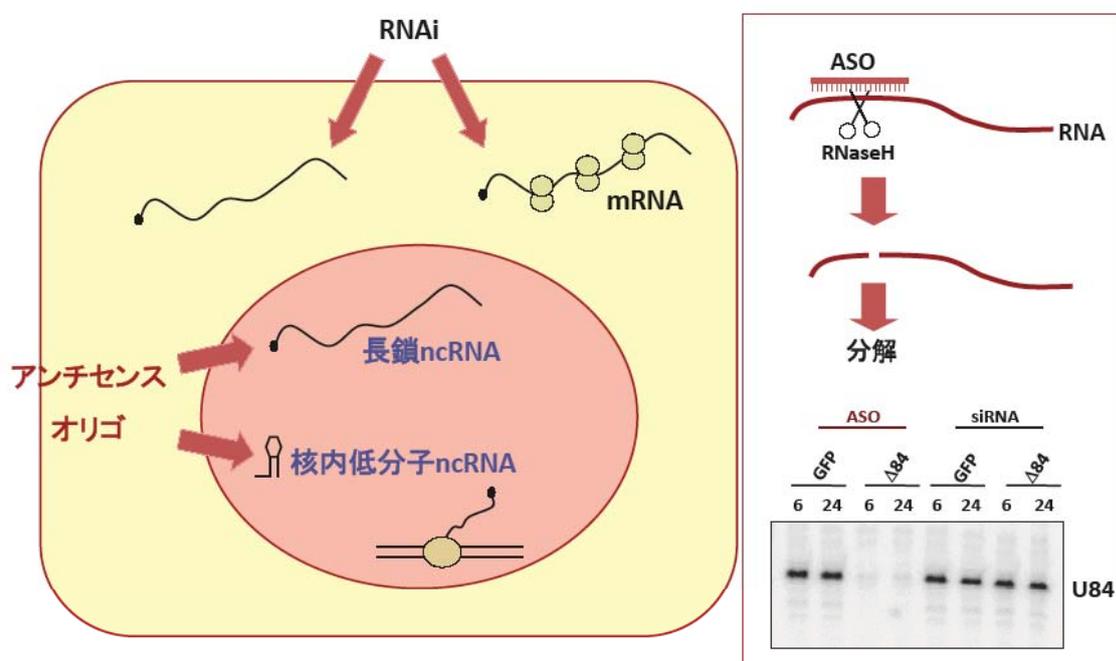


図 3. 核内 RNA ノックダウン法の開発。RNA 干渉では分解が困難な核内 RNA をアンチセンスオリゴと RNaseH 活性を利用してノックダウンする。siRNA では不可能だった U84 が効率良く分解されている。

次に、ノックダウン後に引き起こされる細胞内での変化を U7 snRNA を例に検出した。U7 snRNA はヒストン mRNA の例外的な 3' 末端プロセッシングに関わることが知られていたが、U7 snRNA のノックダウンによって、ポリ A が付加されたヒストン mRNA の検出と、それに伴う細胞周期 S 期の著しい遅延が検出された。これによって特異的な核内 ncRNA のノックダウンによって、予想された表現型変化が引き起こされることが証明され、この解析系の有効性が確認された（特願 2008-014036）。

（3）細胞核内 ncRNA の機能解析

上記の核内 RNA ノックダウン法を駆使して、ヒト細胞の核内に局在する長鎖 ncRNA と低分子 ncRNA の機能解析を実施した。図 2A で核内局在が示された長鎖 ncRNA の中から 40 種類の ncRNA についてノックダウンを確認した。その中でユニークな高密度核画分に局在していた HIT56250 (MEN ϵ / β) について RNA FISH を実施したところ、核内に数個のドット状の構造体に局在していることが検出された。この構造体の正体を突き止めるために、既知の核内構造体タンパク質マーカとの共染色を実施し、これがパラスペックルであることを明らかにした。次に核内 RNA ノックダウン法を用いて、MEN ϵ / β ncRNA を特異的にノックダウンした結果、パラスペックル構造が崩壊することを見出した (Sasaki et al., 2009)。パラスペックルは、2002 年に Fox らによって RNA を含有する新規核内構造体として見出されたが、本研究によってコアとなる RNA 種が同定できた。同時のこの発見は、ncRNA が細胞内の構造構築に寄与している事を示す初めてのものであり、ncRNA の新しい機能概念でもある。この他の核内 ncRNA については、発現量が少ないことから RNA-FISH によって詳細な局在解析を行うことが困難であった。唯一高い発現レベルを示す HIT57502 (MEN α) は、スプライシングスペックルに局在するが、この ncRNA のノックダウンによって、この構造体の崩壊は起こらなかった。よって MEN ϵ / β の役割とは異なる役割を果たしていると考えられる。ちなみに MEN α のノックダウンによって MEN ϵ / β の蓄積レベルが 40% にまで現象することが A549 細胞において見出された。こ

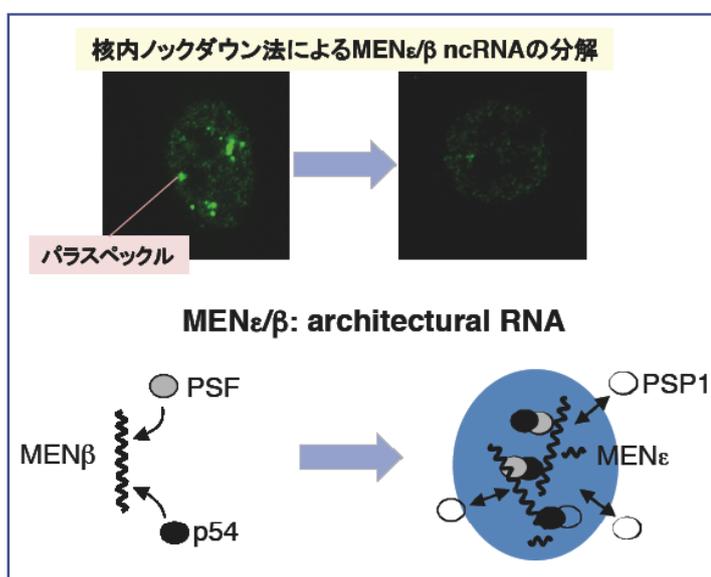


図 4. MEN ϵ / β ncRNA による核内構造体パラスペックルの構造構築。核内ノックダウン解析によるパラスペックルの崩壊（上）。既知のタンパク質と ncRNA によるパラスペックル構築モデル（下）。

のことは MEN κ と MEN ϵ / β との間に機能的な相互作用が存在していることが示唆される。さらにパラスペックルとスプライシングスペックルは、顕微鏡下で一部が隣接して存在することが知られているので、双方の核内構造体間での因子の行き来がある可能性も考えられる。

核内低分子 RNA の中から U7 snRNA, オーファン snoRNA、テロメラーゼ RNA などノックダウンすることに成功した。このうち U7 snRNA については、上述の通り、ヒストン mRNA のプロセッシングに関わることが明らかになっているが、今回のヒト培養細胞におけるノックダウン実験によって、様々な細胞周期ステージでの解析や表現型解析が可能になった。その結果、ヒドロキシウレアで DNA 合成を阻害させた際に起こるヒストン遺伝子の転写阻害が、U7 snRNA をノックダウンした細胞では起こりにくいことが明らかになった。つまりこのことは、U7 snRNA には、DNA 合成時にヒストン遺伝子発現を促進する mRNA レベルの制御機能があるだけでなく、DNA 合成を阻害した際にヒストン遺伝子発現を抑制する新しい機能があることが明らかになった (図 5)。U7 による転写抑制のメカニズムを明らかにするために、2' -O-メチル化アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて精製した U7 snRNP の構成成分を、産総研バイオメディシナル情報研究センターの夏目研究室の超高感度マスペクトロメトリーで分析したところ、新たな U7 結合タンパク質(U7BP1)が同定できた。そこで

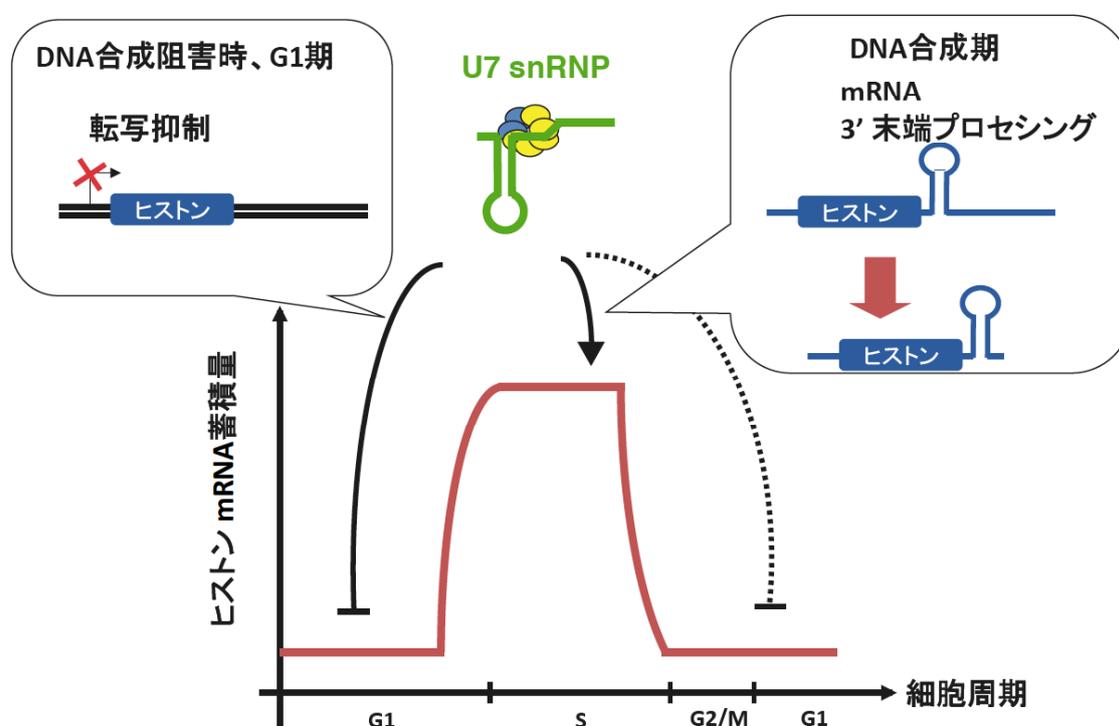


図 5. U7 snRNA の新しい機能の発見。通常の DNA 合成期には、ヒストン mRNA の 3' 末端 RNA プロセッシングに関わっているが、DNA 合成を阻害した場合や S 期の外では U7 snRNA はヒストン遺伝子の転写抑制に関与している。

U7BP1 の過剰発現とノックダウン解析を実施した結果、この因子がヒストン遺伝子発現の負の制御因子であることが明らかになった。snRNA が転写の抑制に関わる例は、これまでには報告がなく RNA を介していかに U7BP1 が作用しているかを明らかにすることが今後の課題である。またもし U7 snRNA が転写抑制のための特異性を規定しているのであれば、snRNA の配列をデザインすることによって、人為的な特異的な転写抑制技術の開発にもつながる可能性が期待できる。核内低分子 RNA のノックダウン解析については、複数種のターゲットが未定のオーファン snoRNA についても実施し、標的の同定を目標に研究を遂行した。その解析では、HBII295 オーファン snoRNA が部位特異的なメチル化活性を有する事が証明でき、さらに核小体においてそのメチル化反応が行われていることも併せて証明できた。一方既知のタンパク質遺伝子は、核小体には局在していないため、オーファン snoRNA の標的 RNA は特別のメカニズムによって核小体に局在している可能性がでてきた。これまでに U97 と HBII295 のノックダウン細胞から調製した RNA を用いて次世代シーケンサーによる RNA seq を執り行い、ノックダウンによって発現変動する遺伝子リストを得た。今後この中から真の標的 mRNA が同定されることを期待している。

(4) 組織特異的 ncRNA の機能解析

図 2B で示す通り、発現プロファイリング解析によって見出された組織特異的 ncRNA の中から重要な機能を果たしている ncRNA を同定するために、胸腺特異的な ncRNA に注目した。胸腺は免疫系 T 細胞の成熟化が起こる組織であり、この過程で起こる様々な現象の制御に関わる ncRNA を同定できることが期待される。そこで H-InvDB の 5498 個の ncRNA の発現をモニターするために開発したオリジナルなマイクロアレイ解析を脳、胸腺、肝臓、精巣に対して実施し、そこで得られた胸腺特異的な転写物と上記の定量 RT-PCR 解析によって同定したものを併せて計 10 種類の胸腺特異的 ncRNA を同定した。次に林原生物化学研究所が保有する T 細胞の様々な分化ステージ由来の培養細胞株 17 種類における発現プロファイリング解析を実施した結果、大部分がほとんどのステージ由来の細胞で発現が認められたが、HIT14168 の発現は、ステージ III の未熟 T 細胞に限られていた (図 6)。そこで HIT14168 (Thy-ncR1) を個別に機能解析した。その結果、非常に複雑な選択的スプライシングによって 12 種類以上のアイソフォームが生み出され、それらは細胞質のポリソーム様複合体内にアイソフォーム毎に少し異なる画分に局在することが明らかになった。同時に細胞質に移行するにも関わらず、mRNA 品質管理機構の NMD の標的にはならず、分解を免れている事も明らかになった。RNA 干渉によって Thy-ncR1 をノックダウンし、マイクロアレイによって発現変動する遺伝子を日立ソフトグループとの共同研究で検索したところ、細胞外マトリクス結合性で血球細胞の増殖促進活性を有する MFAP4 mRNA のレベルが上昇することが明らかになった。MFAP4 mRNA は、NMD 経路に関わる hUPF1 によって負の発現制御を受けており、hUPF1 による RNA 分解経路は、Thy-ncR1 が関わる経路とオーバーラップする

ことも明らかになった。MFAP4 mRNA の分解は、hUPF1 に依存的なのに対して hUPF2 には依存しないので、NMD 経路とは異なる新しい分解経路であると考えられ、その経路を ncRNA が制御しているスキームは新たな細胞質での遺伝子発現制御機構の存在を示唆するものである。

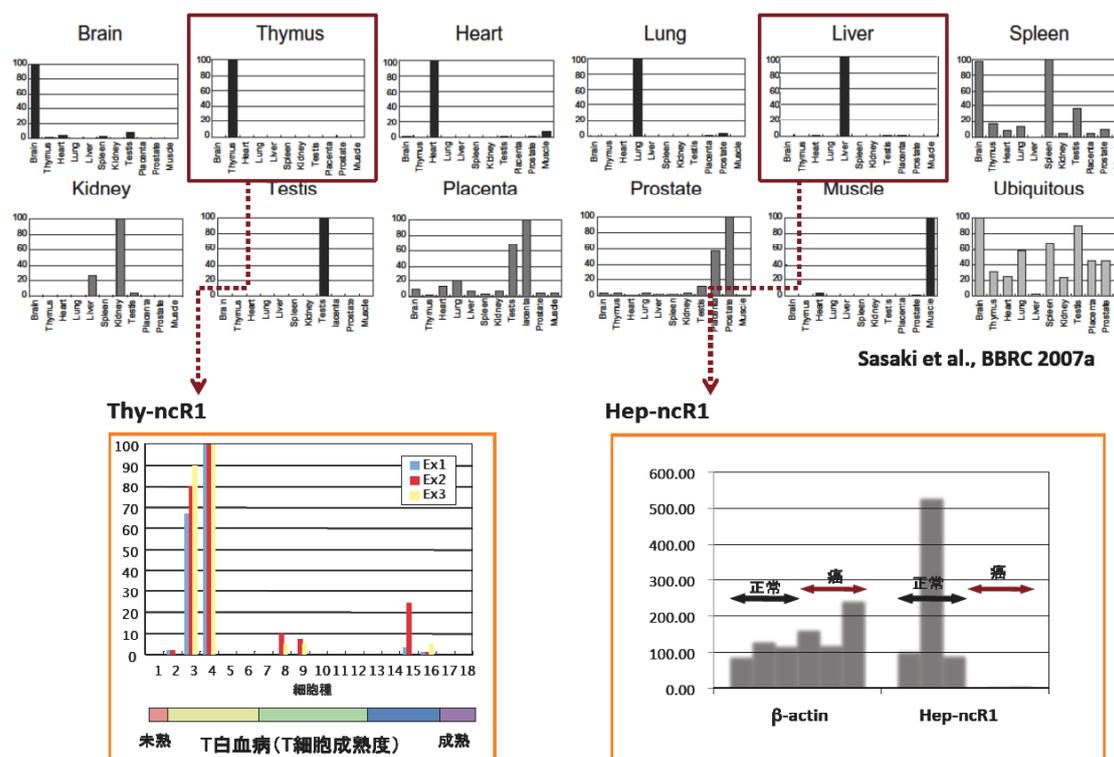


図 6. 組織特異的 ncRNA からの機能性 RNA の選別。ヒトの様々な組織で特異的に発現する ncRNA の発現パターンを上段に示す。胸腺特異的 ncRNA の中から未分化な T 細胞ステージで特異的に発現する Thy-ncR1 を選別し、肝臓特異的 ncRNA から肝細胞癌で発現サイレンシングする Hep-ncR1 を同定した (下段)。

(5) ncRNA と相互作用するタンパク質因子の同定と機能解析

ncRNA 機能に迫るために重要な相互作用タンパク質を同定するために、上記の MEN ϵ / β ncRNA を用いた解析を実施した。新しいアプローチ法として産総研バイオメディシナル情報研究センターの五島グループが所有しているヒト完全長 cDNA 由来の Venus タンパク質融合クローンを用いて、ヒトの約 15,000 種のタンパク質の細胞内局在情報を基にパラスペックル様の核内構造体に局在するタンパク質の cDNA クローンを選別した。その後、内在性のパラスペックルタンパク質 PSF との共局在解析によって、確実にパラスペックルに局在する 34 種類のタンパク質を同定した。さらに局在しているタンパク質が内在性のパラスペックルタンパク質と同じ挙動を示すのかどうかを調べるために、転写阻害剤のアクチノマイシン

ンD を処理した際に核小体傍に移行するかどうかを検定した結果、同定した 34 種類すべてが移行することが明らかになった。これを受けて同定した 34 種類のタンパク質を PSP3～36 と命名した。これらのタンパク質の大部分は RNA 結合タンパク質のモチーフを有しており、10 個については疾患との関係が報告されている因子であった。次に同定したパラスペックルタンパク質をそれぞれ個別に RNA 干渉によって機能阻害し、それによって引き起こされる MENε/βncRNA とパラスペックル形態変化を調べた。その結果、MENε と MENβ の発現に

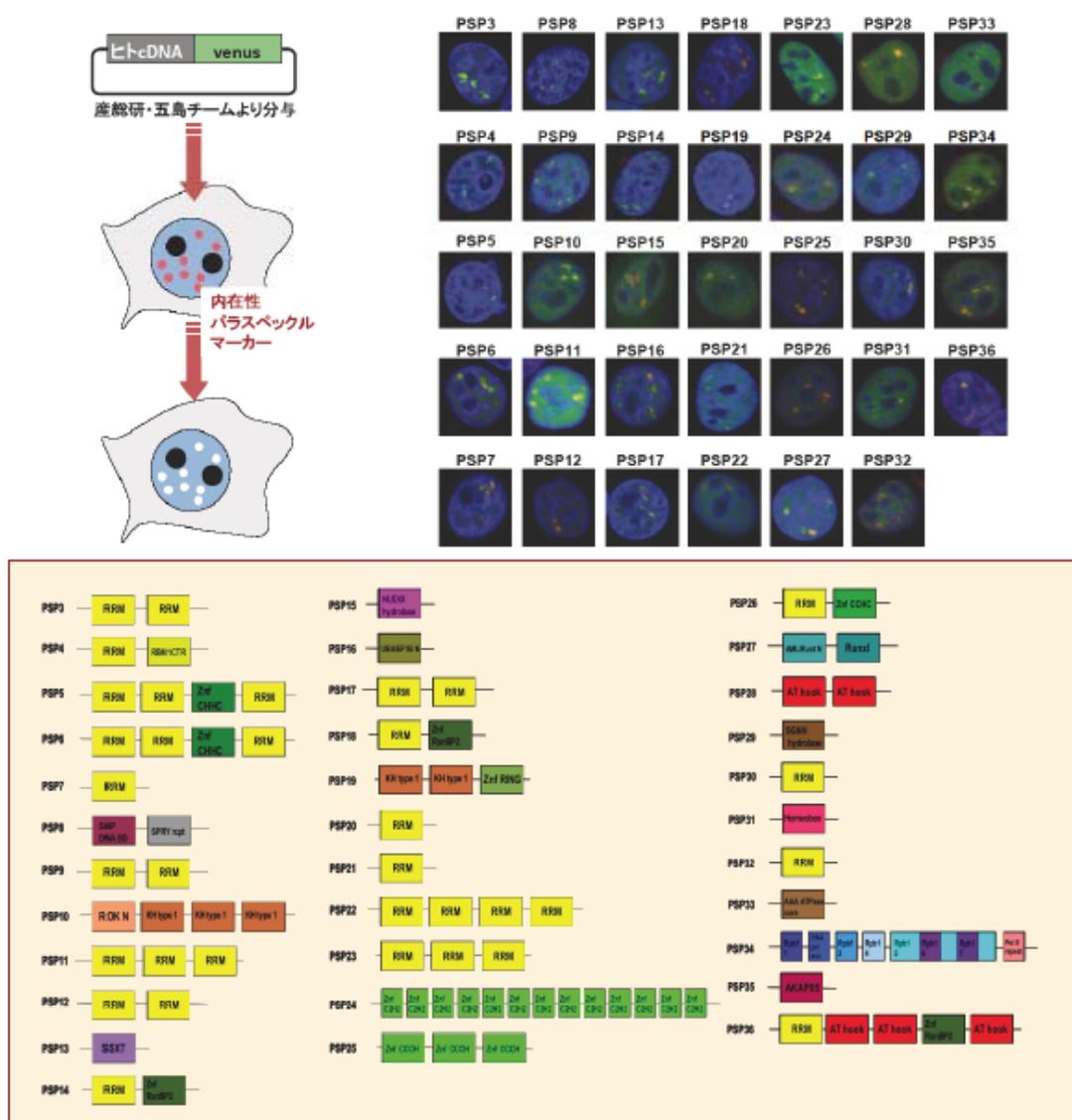


図 7. MENε/β と共局在するタンパク質因子の同定。ヒト完全長 cDNA リソース (産総研) BIRC 五島グループ) を利用して、パラスペックル様の核内構造体に局在するタンパク質を選別し、パラスペックルのマーカーとの共染色によって実証した (上段)。各タンパク質のドメイン構造を下段に示す。

特異的に働く因子、双方の蓄積に必要な因子などを同定した。また MEN β の蓄積がなくなるとパラスペックルが形成できなくなることを明らかにした。さらに MEN β は、選択的 3' RNA プロセッシングによって、MEN ϵ の形成を阻害することによって産生され、その阻害因子が PSP10 であること、逆に MEN ϵ の 3' 末端プロセッシングを促進する PSP4, 5 を同定した。このように局在情報を基にパートナータンパク質を同定し、網羅的 RNA 干渉によって、その結合の重要性を検定することは、今後の ncRNA の結合因子を同定する上で有効な手段であることが明らかになった。そこでヒトの核内 RNA 結合タンパク質と核内 RNA 分解タンパク質で既知の約 200 個を網羅的に RNA 干渉によって解析できる RNA 干渉ライブラリーを作成し、個々の siRNA の効力を確認した。これらは今後の解析リソースとして威力を発揮すると期待できる。一方で次に重要な情報となってくる相互作用タンパク質の結合領域をマップする方法としては、UV 架橋後に RNA を金属イオンによって断片化し、目的の相互作用タンパク質とクロスリンクした RNA 断片だけを回収し定量 RT-PCR でマッピングを行う簡易 CLIP 法を開発した。この方法により、1. 完全長 cDNA クローンを用いた相互作用タンパク質候補の選別、2. 網羅的 RNA 干渉による機能検証に続く解析として、相互作用タンパク質の結合領域のラフなマッピングを行うことが可能になる。今後さらに RNA 断片化条件とクロスリンク部位のファインマッピング法を至適化することによって、詳細なマッピングを目指す予定である。

(6) 精製核内構造体の RNomics 解析

パラスペックルにおいて特異的な ncRNA が核内構造体に局在化して機能していたことが明らかになり、その他の核内構造体に局在する RNA 種を解析することによって、新たな機能性 ncRNA が発見できる可能性が浮上した。そこで RNA が含まれていることがこれまでに分かっており、精製手順がある程度確立されている Cajal 体を細胞分画法を組み合わせ高度に精製した。その後、この画分に含まれる RNA を調製し、このサンプルをエクソンアレイ解析及び次世代シーケンサーによる RNA seq 解析を行うことによって、Cajal 体画分中の RNA 種を探索した。まず snoRNA の宿主遺伝子の転写物とマイクロ RNA の転写物が複数 Cajal 体画分に濃縮されることが明らかになった。この転写物を UHG RNA を例にとり詳細に解析した結果、スプライシング以前の前駆体 RNA の 5' 側の断片が数多く存在していることが明らかになった。このことは、snoRNA ホスト遺伝子の転写段階で Cajal 体上で転写アレストが起こり、中間体が蓄積している可能性が考えられた。またこの転写アレストは、イントロン上にコードされた snoRNA の生合成に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。さらに Cajal 体には、ヒトで特異的にエクソンシャッフリングによって多様化した神経芽腫瘍と関連のある遺伝子のイントロン中の繰り返し配列由来の RNA が高度に濃縮していることも明らかになっている。現在この RNA の実体と Cajal 体に局在する意味について解析中である。

(7) バイオインフォマティクスにより予測されたゲノム領域から発現するエピジェネティクス制御に関わる機能性 RNA 候補の解析

染色体上でのエピジェネティック制御に関わる ncRNA は、疾患関連遺伝子の発現制御に関わる有望な機能性 RNA である。そこで、バイオインフォマティクスグループが予測した 10,000 ヶ所のヒトゲノム中の保存二次構造領域からこのような染色体上で機能する ncRNA が発現している可能性が考えられたので、この領域を網羅的に解析できるマイクロアレイを駆使して発現解析を行った。出芽酵母などの知見から、こうした ncRNA は、通常 exosome と呼ばれる RNA 分解装置によって細胞内では非常に低いレベルに抑えられているので、Exosome 成分の Rrp40 を RNAi によって機能阻害し ncRNA が分解されなくなった状態でアレイ解析を実施した。HeLa 細胞から 300 ヶ所を超える保存二次構造領域が、exosome 感受性の ncRNA を産生していることが明らかになった。その中には、白血病などの様々な疾患に関わるエピジェネティック制御遺伝子などの複数の疾患関連遺伝子のプロモーター領域由来の ncRNA が含まれており、exosome の機能阻害によって数百倍の発現上昇が確認された。さらにその ncRNA の下流から転写される上記遺伝子の発現も ncRNA のレベル上昇に伴って数倍程度上昇している事も確認できた。以上のことから、プロモーター領域由来の ncRNA と下流タンパク質遺伝子の発現の間には、メカニスティックな相互作用が存在することが示唆された。この作用機構の解明が今後の課題である。

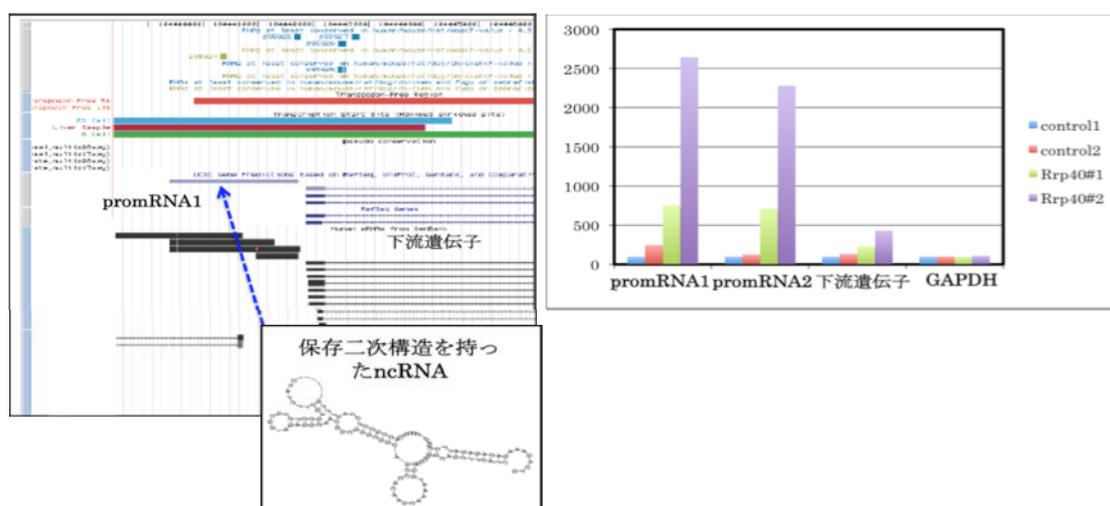


図 8. バイオインフォマティクスによって予測された保存二次構造領域から転写されるプロモーター制御機能を有すると考えられる ncRNA。Exosome 成分の Rrp40 の RNA 干渉によって、発現変動することを示すグラフを右に示す。

(8) まとめ

①医薬品開発に向けた ncRNA と疾患との接点について

これまで述べてきた長鎖 ncRNA に関する様々な基盤的な知見を、医薬品開発のために活用するためには、長鎖 ncRNA が如何なる形で疾患と関わっているかを明らかにする必要がある。これまでに解析した ncRNA には、様々な形で疾患との接点が見出されている。まず第一に核内構造体形成を行う MEN ϵ / β ncRNA と共にパラスペックル構造を形成するタンパク質の中には、10 種類の疾患関連タンパク質が含まれている。多くのものは、癌、白血病の原因となるものであり、その他に神経変性疾患、精神疾患、生殖器系の疾患などユニークなものも含まれている。そのうちの一つは、昨年家族性の神経変性疾患の原因遺伝子として同定された因子であり、この因子が MEN ϵ / β ncRNA と共にパラスペックル構造構築に関わっていることが、この因子の RNA 干渉実験や ncRNA との共発現実験によって明らかにされている。このように ncRNA が疾患制御タンパク質の機能をモジュレートしている可能性が浮上し、その作用点の解明が次の重要な目標である。

U7 snRNA と相互作用しヒストン遺伝子の発現抑制を行っている U7BP1 の遺伝子 SNP は、冠動脈新疾患や突発性心筋梗塞のリスクと相関があることが示されている。また U7BP1 は、アデノウィルスの E1B 55kDa と相互作用しウィルス遺伝子の発現を促進していることも示されている。U7 snRNA 機能を改変することによる U7BP1 機能の人為的制御の可能性は、検討すべき点である。

数多くの組織特異的 ncRNA の中から個別解析した Hep-ncR1 は、肝臓特異的な ncRNA であるが、この発現は肝細胞癌組織ではほぼ完全にサイレンシングされることが示された。特に新潟大学医学部との共同研究で、様々な悪性度の肝細胞癌サンプルを用いて発現解析を行ったところ、極めて初期の癌組織において発現低下が起こっていることが明らかになった。よって肝細胞癌の診断マーカーとして有望な RNA 分子であると考えられる。さらに Hep-ncR1 の染色体上近傍のタンパク質遺伝子の発現をモニターしたところ、脂肪酸合成反応経路の酵素で肝臓機能に関わりのある遺伝子の発現が、Hep-ncR1 の発現と呼応して癌組織でサイレンシングされることが明らかになった。このことから、Hep-ncR1 は染色体上で近傍遺伝子の発現調節を行うコントローラーの役割を果たしている可能性が浮上した。

最後にバイオインフォマティクスによって予測され、exosome によって大きく発現抑制を受けている ncRNA の中には、複数の癌関連遺伝子のプロモーター領域由来のものが存在する。上述の通り、プロモーター領域からのこれらの ncRNA の発現は、下流遺伝子の発現制御に関わっている可能性が高いので、今後疾患遺伝子のプロモーター領域由来の ncRNA の作用機序を解明することによって、エピジェネティック制御における ncRNA の役割を明らかにでき、新しい医薬品開発のための作用点を見出す事が可能になると考えられる。

②長鎖 ncRNA 研究の展望

5年間のプロジェクト研究の成果として、長鎖 ncRNA についてのいくつかの重要な知見が得られた。得られた ncRNA に関する知見から、当初予想していた通り、ncRNA には独自の発現機構、局在機構、機能が存在することが明らかになったといえる。細胞核内に留まって機能する ncRNA には、明らかに mRNA とは異なる細胞内制御メカニズムが存在するはずである。またそもそも ncRNA の多くには、タンパク質遺伝子の 90%以上が有するイントロンが存在しないものがあり、転写とエピジェネティクス制御、転写後の制御共に特有の機構が存在することが類推できる。これらの基盤的メカニズムの理解も将来的な ncRNA 自体をターゲットにした医薬品開発を念頭に置くと重要な点となるはずである。一方、ncRNA 機能については、遺伝子発現の様々なレベルを制御していることが示唆され、その中でも核内の構造体構築に関わるということが明らかになった。ncRNA が関わる新しい細胞内機能をさらに明らかにするには、さらなる機能解析系の開発、相互作用因子の解析が益々重要になるだろう。ncRNA はクロマチン上の転写イベントとカップルして機能する例が、酵母などで示されており、この場合 RNA 干渉や核内ロックダウン法を駆使しても、本来の ncRNA 機能を解析することは困難である。転写レベルの進行を特異的に抑える新しい技術の開発が今後の課題となるだろう。相互作用因子の同定については、王道である RNA-タンパク質複合体の精製からその構成成分を分析する方法が最も有効だが、ncRNA が微量にしか存在しないことや、精製によって完全な相互作用が乱される可能性があるため、*in vivo* での相互作用をキャプチャーし感度よく検出する方法が必要である。本研究によって試行された細胞内局在情報、RNA 干渉、CLIP 法の組み合わせによる解析は、微量に ncRNA と相互作用するタンパク質を同定する上で有効かもしれないが、取りこぼす事も十分考えられるので、新たな方法を考案する事が望まれる。世界的にも長鎖 ncRNA の機能解析は、遅々として進んでいない。本研究によって整備された様々な基盤技術や基盤知見が今後のオリジナルな ncRNA 研究に生かされることを強く望む。

2. 3. 2. 1. 2. ヒトノンコーディング RNA から創薬資源の発見 ～新規機能性ペプチド群の同定および機能解析～ (東京工業大学)

本プロジェクトが始まった2005年に、哺乳類の組織や細胞から抽出されたRNAの網羅的解析が進み、これら高等動物のゲノムから数千種類のmRNA型ノンコーディングRNA(ncRNA)が転写されることが発見された。当時は、siRNAやmiRNAの小さいncRNA研究が世界規模で活発に行われていたこともあり、mRNA型ncRNAも新規遺伝子調節因子として期待されていたし、その期待度の高さは現在までも変わっていない。実際に、数千種類もの長いncRNA群の中には、これまでの分子生物学が見逃していた生命現象を支配する鍵となる遺伝子が含まれる可能性は高いことから、mRNA型ncRNA研究がバイオテクノロジーの分野に新たな潮流を生み出すことに対する期待は大きい。しかしながらmRNA型ncRNA研究の進展には、小さいncRNA研究にはない難しさがあり、それを克服するためのアイデアが必要であった。

mRNA型ncRNA研究の最大の難点は、機能予測にある。小さいncRNAの場合は、それぞれの1次構造あるいは2次構造により機能分類が可能であるという有利な点がある。例えば、「20ヌクレオチド前後の長さの一本鎖が、70ヌクレオチド長のステム構造に由来する場合、このRNAはmiRNAである可能性が高い、すなわちこのRNAは標的mRNAと塩基対を形成して翻訳阻害という機能を有する」といえる。核小体RNA(snoRNA)や転移RNA(tRNA)も、その2次構造からそれぞれエディティングと翻訳に関わることは強く示唆できる。一方、mRNA型ncRNAの場合は、1次および2次配列が分かっても、それらの機能予測につながるケースは皆無に等しい。

そこで東京工業大学グループは、mRNA型ncRNAの機能予測に資する知的基盤を得るため、ヒト間葉系幹細胞分化システムを用いて、機能をもちうるmRNA型ncRNAだけを選別し、それらncRNAの配列及び構造の解析を進めた。幹細胞の分化過程では、細胞分化に特化したncRNAだけでなく、細胞の基本機能(細胞周期、細胞増殖、細胞運動など)を支えるncRNAも関与している可能性がある。そのため本研究は、再生医療だけではなく、バイオテクノロジー全般への産業応用が可能なmRNA型ncRNAに関する知的基盤の獲得が可能になると期待され、実際に重要な成果を得るに至った。

2. 3. 2. 1. 2. 1. 研究成果

(1) ヒト mRNA 型 ncRNA 専用の発現解析プラットフォームの構築とその活用

バイオインフォマティクスグループ(東大浅井、産総研光山)および機能解析グループ(産総研廣瀬、日立横井、東工大相澤)のプロジェクト内連携開発研究として、ヒトゲノムから転写されるncRNAの発現量を網羅的に定量するために、ヒトmRNA型ncRNA専用マイクロアレイを作成した。その後、我々東工大グループはこのマイクロアレイを活用して、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)が組織細胞(脂肪細胞及び骨芽細胞)へ分化する際に発現量が

有為に増加あるいは減少する ncRNA を約 200 種類同定した。この結果は、既知のタンパク質遺伝子と同様に、多くの ncRNA も細胞分化という生命の基本現象の一つに深く関与することを示すと共に、これら ncRNA の中には再生医療や創薬に有用な新規遺伝資源が存在することを暗示するものであった。

(2) hMSC 分化誘導の制御に関わる RNA の個別解析

その後東工大グループは、マイクロアレイ解析で同定した約 200 種類の RNA のうち、最も発現量が劇的に変動した 6 種類の RNA について個別に、詳細な配列解析および機能解析を実施した。その目的は、「mRNA 型 ncRNA」と呼ばれている機能未知 RNA の基盤的な知識を蓄積させ、それら RNA 群の産業応用への可能性を検証することにあった。そして実際に個別解析を実施したところ、「mRNA 型 ncRNA」研究の産業化の新たな方向性を見いだすことに成功した。その方向性とは、mRNA 型 ncRNA 群を、過去におそらく誰にも注目されてこなかった「新規のペプチド創薬シーズあるいは創薬ターゲットタンパク質」として活用するということである。

(3) 新規タンパク質遺伝子の発見

我々の研究対象の RNA 群は当初、「タンパク質をコードしない RNA」と公共データベース上では注釈されていたわけであるため、このような方向性は一見矛盾を含んでいるように見える。しかし我々は本プロジェクト研究により、ヒト ncRNA の中から、それぞれ 63 と 153 アミノ酸からなる比較的短いタンパク質を翻訳する RNA を 2 種類発見した (図 1)。前者の 63 アミノ酸からなるタンパク質 (以下、AGD3) はデータベースに登録されていない、完全に新規であった。データベース全盛のポストゲノム時代にあつて、タンパク質遺伝子をヒトゲノムから新規に同定できたことは知財戦略上、大きな成果である。実際に我々は AGD3 タンパク質のアミノ酸配列および、同タンパク質に対する抗体について物質特許を出願、公開するまでに至っている。

もう一方の 153 アミノ酸からなるタンパク質 (以下、p153) についても、配列及び機能解析の第一段階が終了しており、以下のことが明らかになっている: ①p153 にはパラログが存在し、②それらファミリータンパク質は共に、形質膜上である重要な生理機能制御に関わっている。この結果から、この新規タンパク質ファミリーはドラッグターゲットとなりうると期待できる。近日中に、本タンパク質の研究成果を特許出願及び論文発表する予定である。

(4) ヒト ncRNA 群を対象にした新規タンパク質の同定

上述の研究から、これまで ncRNA と考えられてきた RNA の中には、産業上有用な新規タ

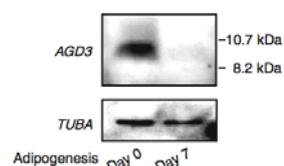


図 1. 63 アミノ酸からなるタンパク質 (AGD3) の翻訳発現量が、hMSC 脂肪分化 7 日目で完全に抑制されている。TUBA はローディング・コントロール。

ンパク質をコードする RNA が他にも多数存在することが示唆された。そこで我々のグループは、それまでに蓄積してきた「ncRNA の中から新規タンパク質遺伝子を見つけるためのノウハウ」をアルゴリズム化し、ヒト ncRNA 群の一部に対して新規タンパク質の探索を行った。その結果、新規タンパク質をコードする RNA を 27 種類、同定することに成功している。これらタンパク質も現時点ではデータベースには登録されていないが、上述の 2 種類のタンパク質と同様に重要な生命機能の制御に関わる可能性がある。

(5) 脂肪細胞分化に関わる可能性の高いタンパク質遺伝子の同定

hMSC 脂肪細胞分化に関わる ncRNA の探索の過程で行った対照実験から、同細胞の脂肪細胞分化時に発現量が有為に変化する既知タンパク質遺伝子を同定した。その中には、これまで脂肪細胞分化への関与が報告されていない 6 種類のタンパク質遺伝子が含まれていた。これらタンパク質は、脂肪細胞分化脂肪代謝のメカニズムに深く関わっている可能性がある。

2. 3. 2. 1. 2. 2. まとめ

(1) 目標の達成度

東工大グループの研究目標である「機能性 ncRNA の多面的選別法の確立と機能解明」はほぼ達成されたといえる。本プロジェクト開始当時、ヒトゲノムから発現するとされた約 6,000 種類の mRNA 型 ncRNA 群について、それらの機能的情報が皆無であっただけでなく、これら RNA が機能を有するのかどうかさえ分からない状態であった。そのような状況から本プロジェクトを開始し、これまでに我々は ncRNA 群から新規タンパク質をコードする RNA を発見し、その機能の一部を明らかにした。さらには、ヒト ncRNA 群から新規タンパク質をコードする RNA を選別する方法を見だし、実際にその方法を用いて別の新規タンパク質を同定することで、本法の実用性を示すことができた。繰り返しになるが、mRNA 型 ncRNA 研究の大きな方向性の一つを提唱できたことは大きな成果といえる。

未達成要因は、新規タンパク質の機能解析が予想以上に難航し、創薬シーズとしての産業利用の可能性を明白に示すことができなかつた点にある。これは、プロジェクト終了後も引き続き研究を推進することで解消していく。

(2) 成果の意義及び、考えうる波及効果

ヒト mRNA 型 ncRNA 群に、新規タンパク質および新規タンパク質ファミリーを見いだした本グループの成果の意義は極めて大きい。その理由を以下に列挙する：

- ・ヒト mRNA 型 ncRNA の中から、タンパク質をコードする遺伝子を探索・機能解析する研究はこれまでほとんど報告されていないため、ncRNA 研究の新たな方向性を見いだした本成果は世界最高水準にあるといえる。

- ・本プロジェクト期間中に同定した新規タンパク質は 29 種類に留まっているが、探索アル

ゴリズムの改良とゲノムワイドの探索をさらに進めることで、少なくとも 100 種類の新規タンパク質遺伝子をヒトゲノムからリストアップすることができるであろう。このリストは、従来の遺伝子の定義を再考するための重要な知的基盤となるだけでなく、新薬開発上貴重な財産になるにちがいない。

- ・現時点ではこれら新規タンパク質はデータベースに登録されていないため、ヒト細胞あるいは個体内で機能を有するアミノ酸配列を物質特許化することができ、その後の研究開発および製品化において知財戦略上優位となる。

- ・本プロジェクトでは我々はヒトの mRNA 型 ncRNA に特化したのが、ここで蓄積された知的基盤は他の生物種にも適応可能である。農作物、家畜、微生物などといった産業的価値のあるさまざまな生物種においても機能未知 RNA はすでに数多く同定されており、また今後も配列解析の加速化によりさらに莫大な種類の機能未知 RNA が同定されることから、我々の探索アルゴリズムの改良および適用を迅速に進めることで、これら機能未知 RNA の中から産業資源となりうる新規タンパク質配列の知財確保につながると期待できる。

本グループは、上述のように mRNA 型 ncRNA の新たな産業利用価値を見いだした。よって、投入された予算に見合った成果を修めることができたといえるであろう。

(3) 知的財産権等の取得

機能解析を行った 2 つの新規タンパク質のうち、AGD3 のアミノ酸配列および、本タンパク質に対する抗体に関する物質特許を国内出願済みである。国際特許の出願は、AGD3 タンパク質の創薬シーズとしての可能性をより強く示す実験データを取得後に検討する予定である。P153 タンパク質については、本年中に物質特許の出願を検討する。

新規タンパク質探索アルゴリズムは特許化せずに秘密性を保持しつつ、周辺技術の特許化の方針である。この一貫として、27 種類の新規タンパク質の知的財産権については、それらの分子機能を示すデータを取得後随時特許化する予定である。

(4) 成果の普及

hMSC 分化制御に関与する ncRNA の同定、および AGD3 タンパク質の発見についてはすでに、英国一流科学雑誌への掲載を済ませている。AGD3 タンパク質の詳細な機能解析、および P153 タンパク質の同定および機能解析については、今後随時論文発表を行う。

以上の成果について、国内外の学会・シンポジウムあるいは大学で、様々な聴衆に対してこれまで数多く講演し、ncRNA 研究の新しい局面を広く情報発信してきた。

(5) 実用化、事業化の見通しについて

現状のままでは産業技術として活用することができないが、引き続き開発を進めることで実用性の高い「新規ヒトタンパク質ライブラリー」を構築できると考えている。創薬シーズの不足が新薬開発のボトルネックになっている現状を考えると、本ライブラリーの需

要は小さくはない。実際にこの方向性で、複数企業と共同研究を計画している。

本ライブラリーの実用化に向けた技術的な課題は特になく、探索アルゴリズムの改良、およびゲノムワイドの探索を行った後、ライブラリーの調製を常法に従って行うことで実用可能なライブラリーを構築することができる。唯一の課題は開発資金の調達であり、現在様々な研究開発助成への申請を検討しているところである。

また本探索アルゴリズムはヒト以外の生物種ゲノムにも適用可能であり、特にノンコーディング DNA 領域が大部分を占める高等生物のゲノムに対してその効力をさらに発揮する。そのため社会的ニーズに合った生物種に対しても探索スキームの微調整を行い、新規タンパク質ライブラリーの構築を検討しているが、現時点では具体的に共同研究を計画はしていない。

2. 3. 2. 1. 3. モデル生物線虫を用いた機能性RNAの選別と機能解析 (弘前大学)

プロジェクト開始当初、生体内に存在する非翻訳 RNA (ncRNA) 種を網羅する試みが、国内外を問わず、盛んに行われ、多くの機能未知 ncRNA が哺乳動物を始めとしたあらゆる生物種でリストアップされるに至った。しかし、それらの多くは当然のことながら機能未知であり、それらがいつ、どのような細胞・組織に、どのような状況のもとで発現しているかさえも不明であった。これらの RNA の生理機能および分子機能を知るために、本研究ではモデル生物である線虫を用いて解析を行うことにした。線虫は他生物種に比べてゲノムや細胞に関する情報および実験技術の蓄積が充実しており、発生、分化、行動といった高次生命現象について、RNA を基盤にした分子レベルでの解析を細胞、個体レベルでの解析に発展させることができる。また、線虫で得た知見は哺乳動物へと応用することが可能であり、ヒトの老化や疾患に関係した機能性 RNA の発見につながることを期待できる。実際多くのヒト疾患原因遺伝子が線虫にも共通に見られることや、プログラム細胞死のような重要な現象が線虫での研究をきっかけに発展したこと、RNAi の発見が線虫の研究に端を発していることは、線虫での研究がヒトの病気の機構解明に役立つことを示している。ヒトでは解析が難しい、個体レベルでの ncRNA の発現挙動を追跡することで、機能性 RNA を選別し、また、機能破壊変異体を分離／作製してその表現型を解析し、新規 RNA の生理機能や分子機能の解明につなげることを目指した。

2. 3. 2. 1. 3. 1. 研究の成果

(1) ncRNAの発現と細胞内局在

プロジェクト開始当初は、独自に生化学的手法で単離してきた新規ncRNA候補31種類を解析の対象とした。プロジェクト遂行中に、さらなる新規ncRNA候補 (50 nt以上の大きさをもつものに限定) が52種類報告されたので、途中からはこれらも加えて、最終的に合計83種類の線虫新規ncRNA候補を解析の対象とした。これらに対して、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) を行い、それぞれのRNAが発生過程のどの時期に、どの細胞に発現しているか解析した。同時に、個々のRNAの細胞内局在についても調べた。核小体局在が示されたRNAについては、既知snoRNPを構成する主要なタンパク質 (フィブリラリン、Nop56、dyserin、Nop10) の発現をRNAiにより抑制することで、細胞内局在もしくは発現にどのような影響が出るか調べた。

83種類のRNAのうち、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) によって発現が確認されたものは42種類であった。同時に行った12種類の既知ncRNAの結果をあわせると、合計54種類のncRNAの時空間を追った発現パターンを明らかにすることができた。特筆すべき結果の一つは、生殖系列の細胞に特に強い発現を示す6種類のncRNAが見つかったことである。このうち1種類はL1幼虫からL3幼虫にいたるまでは、全ての細胞に発現しているが、L4幼虫

で生殖細胞での発現が強くなり、成虫では生殖細胞にのみシグナルが検出されるようになった。また、成虫の生殖細胞では、特に減数分裂のパキテン期にあると予想される細胞に強いシグナルが観察された。他の5種類はいずれも虫が孵化した時点ですでに生殖細胞特異的な発現を示した。そこで胚発生過程におけるそれぞれのRNAの発現パターンをFISHにより解析し、生殖細胞の形成、分化と各RNAの発現にどのような相関が見られるか調べた。初期胚ではどのRNAのシグナルもすべての細胞に検出された。しかし卵割が進むにしたがってシグナルは弱くなり、やがてほぼ消失するに至った。再度シグナルが観察されるようになったときには、いずれも始原生殖細胞であるZ2細胞、Z3細胞にしか検出されなかった。発現がZ2細胞、Z3細胞に現れ始める時期はRNA種により異なる。これらの結果は、それぞれのRNAが卵母細胞から初期胚に持ち込まれるものの、時間の経過とともに分解されること、その後、胚発生が進んで2つの始原生殖細胞が現れてから、あるいは現れると同時に、あらたに転写が開始されることを示唆している。このとき、体細胞系列の細胞では各RNAの発現は抑えられている。これらの発現がどのようなシステムのもとに制御されているか明らかにすることは今後の課題の一つである。

(2) 受精卵における核小体RNAの局在の多様性

FISHの結果からは既知ncRNAについても興味深い知見が得られた。U3、U17/snR30、U18はいずれも進化的によく保存されたU snoRNAである。U3とU17/snR30はrRNA前駆体の切断に、U18はrRNAの2' -O-メチル化に働く。これらのRNAの線虫ホモログについて、その核小体局在を初期胚で観察したところ、それぞれが核小体に集まってくる時期が異なっていることがわかった。U3は受精直後の卵において、まだ雌性前核と雄性前核が互いに接近するか否かの時点で、すでにそれぞれの前核に集合している。U18は同じ時期に一部は前核に集まっているが、細胞質のシグナルもまだ残っている。ただし、両前核が融合するころには細胞質のシグナルはほとんど消失し、核に集まっている。これらに対して、U17/snR30は2細胞期になっても核にシグナルは現れず、細胞質全体に拡散している様子が観察された。卵母細胞の成熟過程においては、いずれも同様のシグナルを呈し、それらの挙動は大きく変わらないことを示唆する。また、成熟した精子においてはいずれのシグナルも観察されないことから、受精卵におけるそれぞれのRNAは卵母細胞由来であると推定される。初期胚におけるこれら核小体RNAの挙動は、rRNAの修飾や切断を通して、接合子で新規に合成されるリボソームの活性や性質、量に影響を与えるのかもしれない。

(3) RNP形成の有無

生殖細胞特異的な発現を示すRNAについて、複合体形成の有無を調べるため、線虫の細胞抽出液をグリセロール密度勾配遠心法により分画し、それぞれの画分からRNAを精製して、ノザンハイブリダイゼーションを行った。細胞抽出液を分画した場合と、細胞抽出液をフェノールクロロホルム処理してタンパク質を除いた後に分画した場合に分け、それぞれ目的の

RNAを含むフラクションを調べた。この結果、解析したRNAのうち3種類が15-20S程度の大きさの複合体を形成していることが示唆された。

(4) 機能未知CeR-2 RNAの機能解析

<CeR-2の核小体局在と関連タンパク質の推定>

CeR-2 RNAは他に配列の類似性を示さない新規ncRNAの一つであり、その構造からは機能を推定できない新規ncRNAの一つであった。FISHによる発現解析の結果は、これが全身の細胞に、初期胚から成虫に至るまで、強く発現していることを示した。細胞内局在は核小体であった。核小体RNAの多くはrRNAの修飾をガイドするC/D snoRNAもしくはH/ACA snoRNA、rRNA前駆体の切断に機能する数種類のRNAに分類される。これらのRNAは、それぞれフィブリラリン、Nop56、dyskerin、Nop10などのタンパク質と結合する。そこで、これらをRNAi (dsRNAインジェクション法) によりロックダウンして、CeR-2の核小体局在や発現に影響を及ぼすか調べた。その結果、Nop56の発現が低下した場合に局在の変化が観察された。フィブリラリンやdyskerinをロックダウンした場合には虫が死んでしまい、はっきりした結果は得られなかった。Nop10をロックダウンしても影響は見られなかった。以上から、CeR-2はNop56と関係することがわかった。

CeR-2 RNAは典型的なC/D snoRNAもしくはH/ACA snoRNAと判断されるようなボックスモチーフのセットや二次構造をもたない。このことから、CeR-2 RNAはrRNAの修飾ではなく、rRNA前駆体の切断に機能することが予想された。酵母では5種類 (U3、U14、U17/E1/snR30、snR10、MRP) の、脊椎動物では8種類 (U3、U14、U17/E1/snR30、U8、U22、MRP、E2、and E3) の核小体RNAがrRNA前駆体の切断に働く。このうちNop56と結合する、あるいはその可能性が示唆されているものは、U3、U14、U8、U22の4種類である。線虫のU3およびU14ホモログはすでに報告されていること、それらとCeR-2は配列も構造も類似していないことを考えると、CeR-2がU3もしくはU14のホモログである可能性は低いと予想された。

<cer-2a欠失変異株の表現型>

CeR-2 RNAには互いに98%の配列類似性を示すホモログが存在する、一方をCeR-2a、他方をCeR-2bと名付けた。両遺伝子*cer-2a*、*cer-2b*はいずれもIV番染色体上に位置する。線虫変異体ライブラリーから*cer-2a*、*cer-2b*を欠失している個体を同定し、ホモ変異体にすることを試みた。*cer-2a*に関しては、CeR-2aコード領域とその上流約500 bpを欠損した変異株MT16939を単離できた。この株は*cer-2a*上流にあるタンパク質遺伝子の3' -UTRコード領域の一部も欠く。*cer-2b*変異株は単離できなかった。

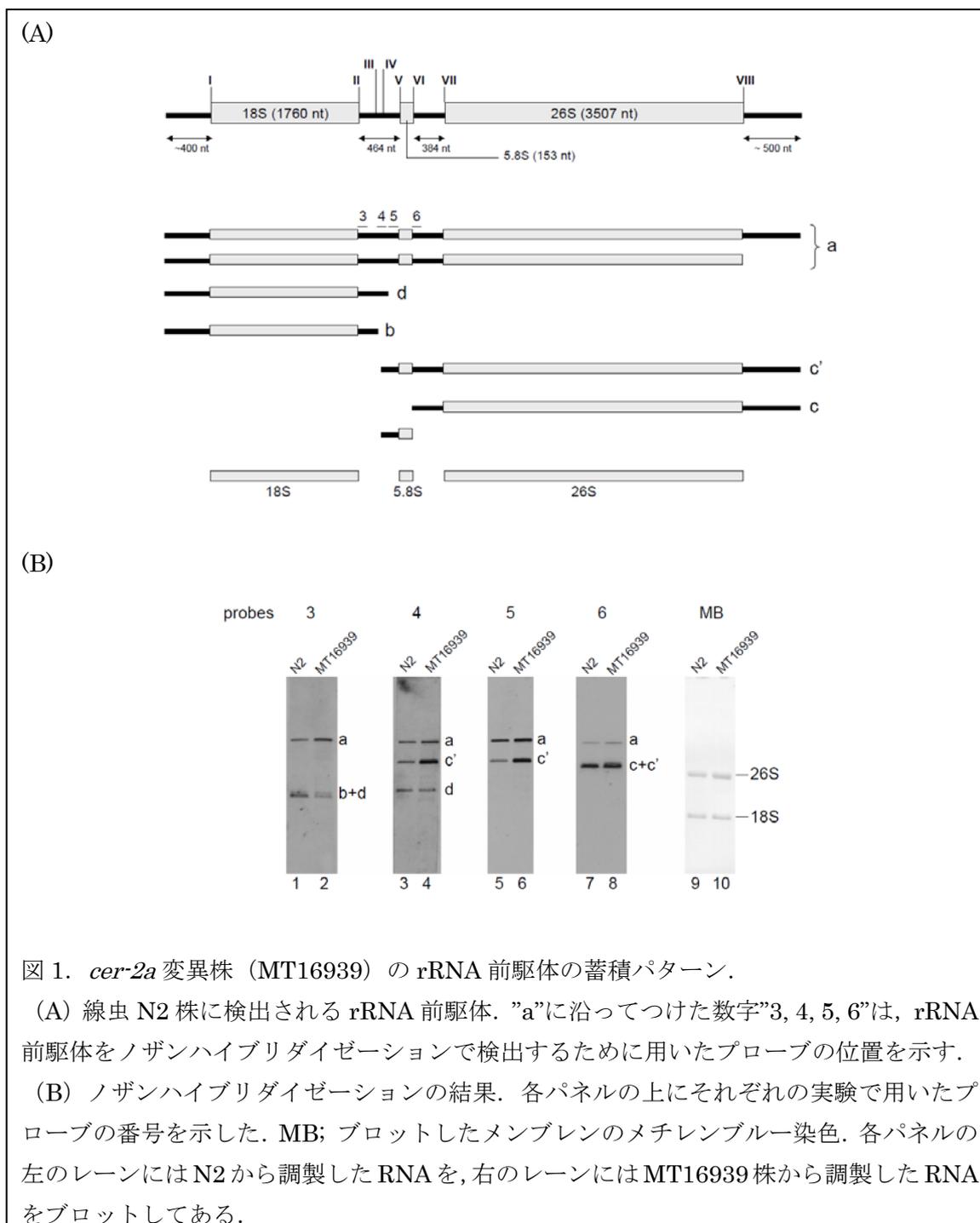
MT16939において、CeR-2の発現は野性株 (N2) の約1/3に減少していた。N2とrRNA前駆体の蓄積パターンを野性株 (N2) と比較したところ、図1に示したような結果となった。顕著に見られた違いは、MT16939で前駆体c'が増加したこと (レーン3と4、レーン5と6を比較) と、前駆体bが減少したこと (レーン1と2を比較) の二点である。前者は5.8S rRNAと26S rRNA

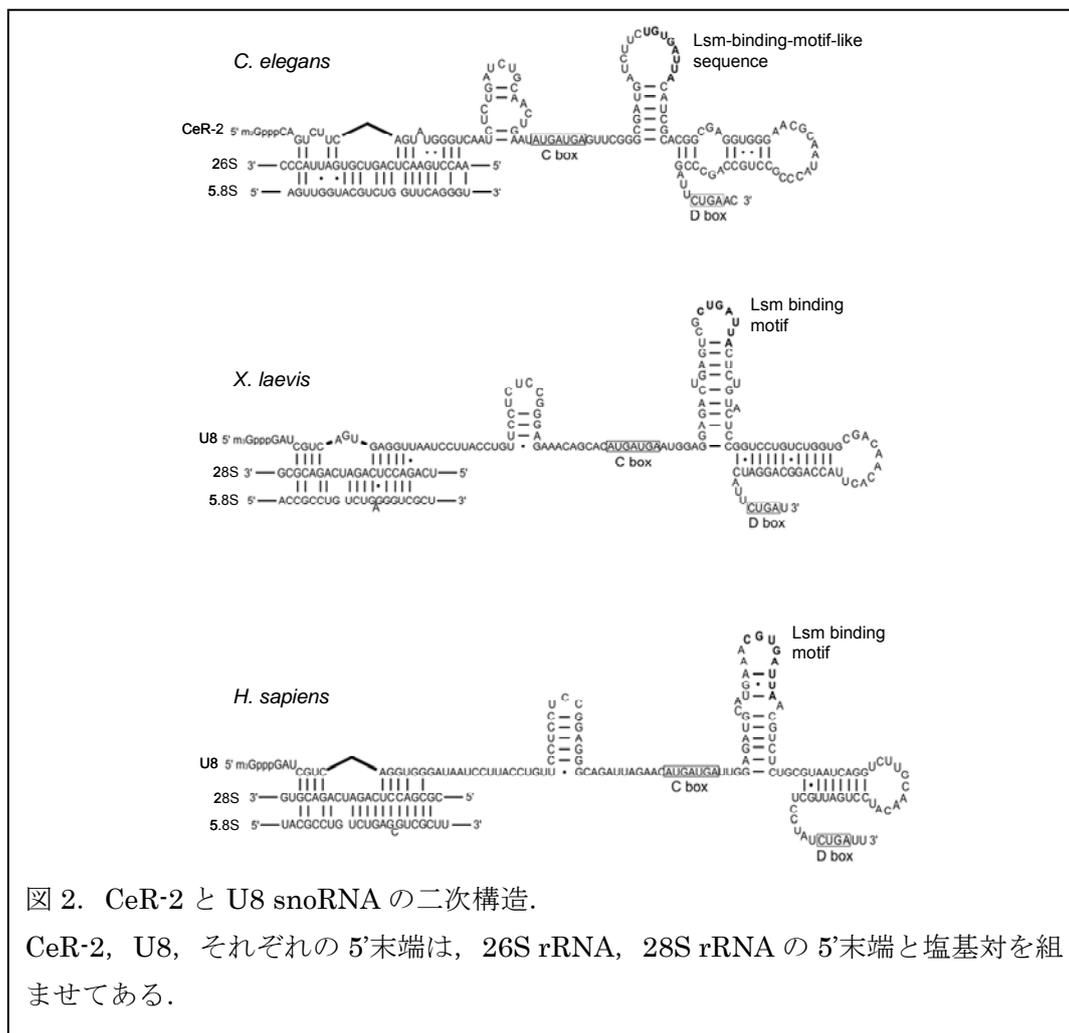
を含む大サブユニットrRNA前駆体のプロセッシングがc' から次の段階に進みにくくなったことを示す。反対に後者の結果はMT16939において18S rRNAの成熟がN2よりも速やかに行われるようになったことを予想させる。このような違いにも関わらずMT16939とN2の間で成熟したrRNAの量に大差が見られないのは、MT16939にCeR-2bが残っており、これが機能しているためと考えられる。

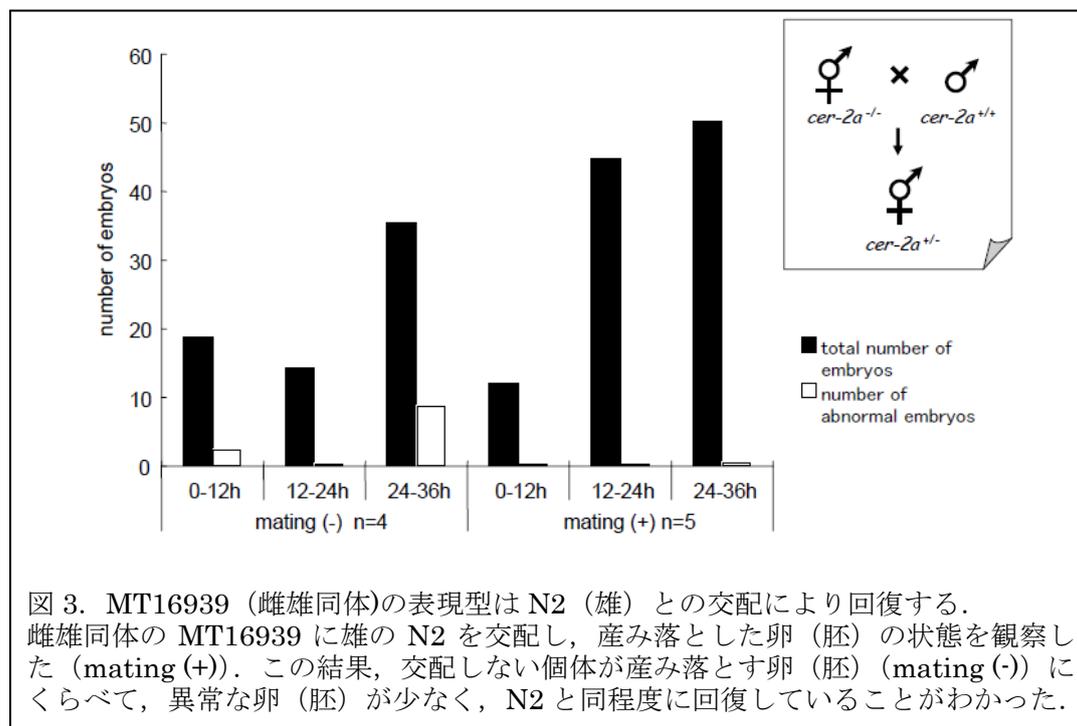
CeR-2が核小体局在を示すこと、Nop56ノックダウンにより局在を変化させること、LSU rRNA前駆体の切断と関係するであろうことが実験により示された。これらの特徴を示すRNAで、まだ線虫にホモログが見つかっていないものはU8 snoRNAであった。そこで、あらためてCeR-2とU8 snoRNAの構造を比較した。U8 snoRNAの5'末端は28S rRNAの5'末端と塩基対を形成して、LSU rRNA前駆体の5.8S rRNAと28S rRNAの間にあるITS2の切断に貢献する。CeR-2がU8ホモログだとすれば、同様の塩基対形成がCeR-2の5'末端と線虫26S rRNAの5'末端との間に形成されることが予想された。この点に着目しつつCeR-2の二次構造を組むと、CeR-2単独の二次構造からは見えてこなかったU8 snoRNAとの類似性が示唆された(図2)。U8にはLSmタンパク質が結合する進化的に保存されたオクタマー配列が存在する。興味深いことに、CeR-2にも同様の配列(脊椎動物で保存されている8 ntのうち6 ntが一致する)が、二次構造上の一致する位置に見られた(図2、CeR-2、のLSm-binding-like-motif sequenceとU8のLSm binding motif)。

<MT16939の表現型>

CeR-2の減少が個体レベルでどのような変化を引き起こすか知るため、MT16939を顕微鏡で観察し、N2との違いを調べた。この結果、MT16939はN2に比べて未受精卵を高頻度に産み落とすことがわかった。MT16939(雌雄同体)にN2(雄)をかけあわせたところ、未受精卵の排出は野性株と同程度まで減少し、受精卵の排出頻度が回復した(図3)。このことから、CeR-2 RNAの減少は精子形成に影響を及ぼす可能性がある。本研究の成果は、rRNAのプロセッシングやリボソームの生合成が生殖細胞の分化や増殖に寄与することを示唆し、その全体像やメカニズムの詳細を解明することにつながる。







2. 3. 2. 1. 3. 2. まとめ

本研究では、モデル生物線虫をつかうことによって、細胞系譜に即したncRNAの発現解析を中心に行うことにより、その組織特異性や時期特異性を示した。一方、機能未知であったCeR-2に関しては、これがrRNAのプロセッシングに関与し、その量が減少すると受精に影響が現れることを明らかにした。

本研究で用いた線虫 *C. elegans* は寄生性ではないが、近縁種には、ヒトに感染して重篤な症状を引き起こすものや、植物に寄生して深刻な農作物被害や森林被害を起こすものがある。今回解析したncRNAの中には、線虫特異的に存在すると思われるものがあったので、本研究の成果を近い将来の実用化、事業化に反映させようとするれば、これらncRNAまたはその遺伝子をマーカーとして利用することが想定される。また、中・長期的には、組織特異性・時期特異性を示すncRNAの発現制御メカニズムや分子機能、生理機能を明らかにすることで、あるいは生殖細胞の分化・増殖や受精といったイベントについてリボソームの生合成といった観点から解析を進めることで、本研究の成果は将来的に疾患の診断、治療、創薬、農薬の開発などの応用につながるものと期待できる。

2. 3. 2. 2. マイクロRNAの作用機構の解明

分室13 (大塚製薬)

共同実施先： 徳島大学 (塩見)

低分子 ncRNA (non-coding RNA) には、古典的に良く知られている tRNA や snoRNA も勿論含まれるが、ここ十数年の研究から、20-30 塩基長という小さな RNA が少なからず存在し、重要な役割を担っている事が判ってきた。これら小分子 ncRNA は small RNA とも呼ばれる。short interfering RNA (siRNA)、microRNA (miRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) などがその代表例である。

small RNA によって引き起こされる遺伝子発現抑制機構を総称して「RNA サイレンシング」と呼ぶ。その代表例は 1998 年に論文に発表された RNAi (RNA interference : RNA 干渉) である。RNAi の発見以来、RNA サイレンシング研究は飛躍的に進み、この機構が発生や代謝、ウイルス感染防御といった、生命に欠かせない多くの現象を制御していることが明らかになってきた。ある種の癌の様に、RNAi 関連分子の機能異常が発症原因として疑われる疾患も次第に見つかってきている。これらの結果は、我々がこれまでに培ってきた、生命を司るための遺伝子情報発現の仕組みに関する理解 - 遺伝情報はどのようにゲノムに蓄えられており、発現するのか、それらがどのように生物の発生や種の保存を制御しているか - を大きく変えようとしている。

RNA サイレンシングに関わるタンパク質因子も、数多く存在する事が明らかになった。その中でも特に RNA サイレンシングにおいて中核的な役割を担う因子は Argonaute タンパク質 (Ago) である。RNAi では Ago2 が siRNA と特異的に結合する事によって標的 RNA を認識し (つまり Ago2 は RNA 結合タンパク質である)、最終的に Ago2 が標的 RNA を切断する (つまり Ago2 は endo-nuclease でもある)。多くの生物は複数の Argonaute を発現する。ショウジョウバエでは 5 種類の Ago (AGO1、AGO2、AGO3、Aubergine、Pwi1) が、マウスでは 7 種類の Ago (Ago1、Ago2、Ago3、Ago4、Mili、Miwi、Miwi2) が発現する。これらは、違った種類の small RNA と結合する事によって独立した経路で機能すると予想されるが、まだその実体は不明である。

RNA サイレンシングを遺伝子治療へと応用する試みは、日本、欧米で精力的に進められている。しかし、基礎研究を基盤とする知見が追いついておらず、今なお試行錯誤が行われているのが現状である。RNA サイレンシングは医療業界をはじめ多くの産業界において非常に有効な応用技術となりうる潜在性をもつ。その潜在性を十分に引き出し、正しく有効に応用するためには、RNA サイレンシングに関する基礎研究を迅速に遂行し、深く理解する事が不可欠である。

本研究では、microRNA (miRNA) をはじめとした機能性 small RNA (20-30 塩基) が関与する特異性の高い標的遺伝子発現制御等、分子経路を解明し、それを医薬開発・疾患治療等へ応用する基盤を確立する。

2. 3. 2. 2. 1. 研究目的

(1) miRNA 作用機序の解明

miRNA は 21~23 塩基からなる一群の機能性 small RNA であり、塩基配列に従って標的 RNA に作用することによって標的遺伝子の発現を制御する。miRNA をコードする遺伝子は、線虫、ショウジョウバエ、植物、ヒトといった多くの生物種のゲノムに観察される。ヒトにおいては総遺伝子（タンパク質をコードする遺伝子）の約 60% が miRNA によって制御されると見積もられている。miRNA は、標的遺伝子発現の制御を介し、個体発生や細胞周期、代謝経路、といった生命維持に不可欠な事象を巧妙に調節し、正常に維持する機能をもつことが次第に示されてきている。しかし、各々の miRNA が、①どの遺伝子を実際に標的として、②どういった機構で発現制御を行っているか、に関する知見は、未だ少ないのが現状である。成熟型 miRNA の Argonaute タンパク質へのローディングや、Argonaute タンパク質のリサイクリングまでも含めて、miRNA の作用機序を全面的に分子レベルで解明する事を目指す。主にショウジョウバエと哺乳動物細胞をモデル生物として用いる。

(2) 新規機能性 RNA の同定及びその機能解析

最近、生体内で発現する miRNA 以外の機能性 small RNA に注目が集まっている。rasiRNA (repeat-associated short interfering RNA) や tasiRNA (trans-acting short interfering RNA) といった分類名が付けられている。miRNA が 21 から 22 塩基であるのに対して、rasiRNA や tasiRNA は 24 から 29 塩基という様に少し長い事を特徴とする。多くの rasiRNA/tasiRNA は、transposon やゲノム上に見られる repeat 領域の配列を持つため、こういった領域の転写が両方向に起こり、2本鎖となった RNA から作られるのではないかと考えられているが、その機構は不明である。また実際、この様な small RNA の機能に関する情報も乏しい。Argonaute ファミリーのうち、ショウジョウバエ AGO1 は、miRNA に特異的に結合することによって miRNA 経路において、一方 AGO2 は、siRNA に結合する事によって RNAi 経路において機能している事はすでに明らかになっているが、その他の 3 メンバー (Aubergine、Piwi、AGO3) がどんな small RNA (rasiRNA / tasiRNA、あるいは新規機能性 small RNA) に結合し、どんな遺伝子発現の制御機構 (あるいはその他の分子経路) において機能しているか、に関する知見は殆ど無い。各 Argonaute に特異的に結合する機能性 small RNA を同定し、その small RNA の機能を明らかにする事を目指す。この内容に関しては、ショウジョウバエに限らず、哺乳動物の Argonaute タンパク質に対する抗体も作製し、研究を進める。脆弱 X 症候群の原因遺伝子 FMR1 は、RNAi 経路における必須因子 AGO2 と特異的に結合する。これまで AGO2 は外来性 siRNA と結合し、RNAi において機能する事は見出されているが、AGO2 に結合する内在性 siRNA は、未だ同定されていない。AGO2 に結合する内在性 small RNA を同定すれば、精神遅滞症を導く新規 small RNA の発見につながる可能性があり、これを明らかにする事を目指す。

(3) 標的遺伝子の miRNA 制御回避機構の解明

ショウジョウバエ後期胚において特異的に発現する miRNA である bantam の標的 mRNA は、hid である。我々は、これまでの解析から、bantam が発生に伴って発現してくると、bantam の標的配列を失った hid mRNA が増加する事を見出した。標的配列が無いという事は、bantam による制御を受けない、つまり回避機構が存在するという事である。この現象がどういった理由で、どのような分子メカニズムで起こるかに関する知見はないため、これらを明らかにする事を目指す。

2. 3. 2. 2. 2. 研究成果

(1) miRNA と特異的に結合するショウジョウバエ Ago 1 の機能解析¹⁾

ヒト細胞で恒常的に発現する Argonaute は 4 種類存在する。これらはいずれも miRNA とともに siRNA と結合する。しかし、Ago2 のみが標的 RNA を切断する活性 (Slicer 活性) を有すると報告された。ショウジョウバエでは恒常的に発現する Argonaute は 2 種類ある。そのうち、Ago1 は miRNA と Ago2 は siRNA と特異的に結合する事によって、独立した RNA サイレンシング経路において機能する。ショウジョウバエ Ago2 は RNAi に必須な因子であり、よって Slicer 活性を持つ事が期待されるが、本研究から Ago1 にも Slicer 活性がある事が判明した。miRNA は通常、標的 mRNA の翻訳を抑え、mRNA の切断は伴わないと考えられていた。何故、Ago1 にも Slicer 活性があるかは、未だ不明である。

ショウジョウバエ Ago2 が無い条件下においては、siRNA duplex が duplex のまま存在する事が判った。これは Ago2 の Slicer 活性が siRNA の一本鎖化に必要である事を示唆する。実際、siRNA duplex のうち、passenger 鎖が Ago2 の Slicer 活性依存的に切断される事を実験的に示す事が出来た。Ago2 Slicer によって作られない duplex を作成したところ、これを用いては RNAi を誘導出来ない事も判明した。Dicer2 活性によって長鎖二本鎖 RNA から切り出された siRNA duplex は一旦、duplex として Ago2 と結合し、Ago2 が passenger 鎖を切断する事によって siRNA が 1 本になる事が強く示唆された。

(2) ショウジョウバエ卵巣において発現する Piwi に結合する small RNA の同定及び解析²⁾

Piwi (P-element induced wimpy testis) タンパク質は、ショウジョウバエ生殖細胞において特異的に発現する Argonaute の一つである。これまで遺伝学的な解析により、Piwi は germline stem cell の新生・維持に必須である事が判っていた。また、piwi 遺伝子変異体においてはトランスポゾンの発現量が上昇する事が知られていた。しかし、Piwi タンパク質の分子機能は不明のままであった。Piwi タンパク質に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、これを上手く利用する事によって、ショウジョウバエ卵巣より Piwi タンパク質を免疫沈降により単離精製した。この沈降物から RNA を抽出し、P³² ラベル法によって可視化したところ、24-30 塩基長の RNA が Piwi に結合している事が判明した。これら RNA

の塩基配列を同定したところ、大半の RNA がショウジョウバエゲノム上に点在するトランスポゾンやその他の繰り返し配列を伴う遺伝子間領域を由来とする事が判明した。さらに解析をすすめたところ、*ras*iRNA と称される small RNA 群である事もわかった。Piwi タンパク質には miRNA も RNAi を誘導するために用いる siRNA も結合しない。また、卵巣内の Ago1 には miRNA が、Ago2 には siRNA が結合するものの、*ras*iRNA は結合しない事も明らかになった。つまり、*ras*iRNA は Piwi タンパク質と特異的に複合体を形成し、トランスポゾンなどの発現抑制に関わる事が示唆された。Piwi 抗体を用いて卵巣及び精巣を免疫染色したところ、卵巣では全ての細胞で Piwi は高く発現する事、しかし、精巣においては体細胞のみにおいて強く発現する、つまり精巣内 Germline stem cell では Piwi の発現は非常に弱い事も判った。Piwi 以外の 4 種類のショウジョウバエ Argonaute は細胞質に局在するが、Piwi は核内に局在する事も判明した。Piwi は核内で、転写レベルにおいて遺伝子発現抑制を担う Argonaute であるのかもしれない。

(3) ショウジョウバエ卵巣において発現する Argonaute の機能解析：piRNA 生合成経路の分子機構の解明³⁾

ショウジョウバエは 7 種類の Argonaute を発現する。このうち、3 種類の Argonaute (Aubergine; Aub, Piwi, Ago3) は生殖巣特異的に発現する事が判っている。Aub と Ago3 に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、卵巣で発現する両タンパク質を免疫沈降で回収し、各々に結合する small RNA を P³² ラベル法で可視化したところ、それぞれに 24-29 塩基長の small RNA が特異的に結合している事が判明した。これら small RNA の塩基配列を同定したところ、それらの多くはトランスポゾン由来の piRNA である事が判った。Aub に結合する piRNA の多くはアンチセンス鎖を由来とし、また、5' 末端に U を多く持つ事を特徴とする。これに反し、Ago3 に結合する piRNA は多くの場合センス鎖を由来とし、5' 末端から 10 番目において A が多い事が判った。以前解析した Piwi に結合する piRNA の場合、Aub に結合する piRNA と同様に、多くの場合、アンチセンス鎖を由来とし、また、5' 末端に U を持つ事が判明した。in vitro での標的 RNA 切断アッセイを行う事によって、Aub、Piwi、Ago3 いずれも切断活性を持つ事も明らかとなった。これらを考え合わせると、piRNA 生合成に Aub、Piwi、Ago3 の切断活性が関わるのではないかと考えられた。すなわち、Aub-piRNA 複合体 (あるいは Piwi-piRNA 複合体) がセンス鎖のトランスポゾン転写産物を標的とし、それを切断する (この切断によって piRNA の 5' 末端が決定される)、その後、さらなるプロセッシングが起こり、成熟型 piRNA になった後に Ago3 と結合する、センス鎖由来の piRNA と複合体を形成した Ago3 は続いてアンチセンス鎖のトランスポゾン転写産物を標的とし、それを切断する、その後、さらなるプロセッシングが起こり、成熟化 piRNA となった後に Aub (あるいは Piwi) と結合する、という仮説が成り立った。以前の研究からショウジョウバエ piRNA の生合成には dicer は必要でないという結果が得られており、本研究で提唱したモデルはその概念と一致する。但し、piRNA の 3' 末端を決定する因子は未だ同定されてい

ない。また、Aub や Piwi の切断活性を介して作られた piRNA がどのように Ago3 と結合するか、に関しても実体は未だ不明である。

(4) ショウジョウバエ piRNA の末端修飾に関わる因子の同定及び機能解析⁴⁾

ショウジョウバエ生殖細胞特異的に発現する Argonaute である Aubergine、Piwi、Ago3 は piRNA と特異的に結合する事によって生殖細胞特異的な RNA サイレンシング機構において機能する。これまでの beta-elimination 解析によりショウジョウバエ piRNA は 3' 末端のリボースにおいて何らかの修飾を受けている事がわかっていた。本研究において、この piRNA 修飾を mass 解析によって同定したところ、2' -O メチルである事が判明した。植物では miRNA が同様の修飾を受ける事が判っており、また、この反応を担う酵素は Hen1 である事も既に報告されていた。そこで、Hen1 のショウジョウバエ相同体に着目し、これがショウジョウバエ piRNA の修飾酵素であるかどうか検討する事にした。Hen1 のショウジョウバエ相同体の変異体を入手し、この卵巣より piRNA を回収して beta-elimination 解析したところ、野生型のそれに反して末端修飾を受けていない事が判明した。Hen1 相同体が piRNA 修飾酵素である可能性が示唆された。続いて、Hen1 相同体リコンビナントタンパク質を作成し、これを用いてアッセイを行った。予想通り、Hen1 相同体には一本鎖 RNA をメチル化する活性を示した。Hen1 相同体活性中心に変異を導入したタンパク質では、メチル化活性はみられなかった。Hen1 相同体は Piwi や Aub、Ago3 と結合する事が判明した。しかし、Ago1 とは結合しなかった。ショウジョウバエの miRNA がメチル化修飾を受けない理由はここにあると考えられる。Hen1 ショウジョウバエ相同体に Pimet (piRNA methylating enzyme) と名付けた。

(5) ショウジョウバエ卵巣・精巣において機能する piRNA の同定と解析⁵⁾

ショウジョウバエは 7 種類の Argonaute を発現する。このうち、3 種類の Argonaute (Aubergine; Aub、Piwi、Ago3) は生殖巣特異的に発現する事が判っている。Aub に対する特異的なモノクローナル抗体を作成し、卵巣で発現する Aub を免疫沈降で回収したところ、24-28 塩基長の small RNA と特異的に結合している事が判明した。これら small RNA の塩基配列を同定したところ、それらの多くはトランスポゾン由来の piRNA である事が判った。これら piRNA の多くはアンチセンス鎖を由来とし、また、5' 末端に U を多く持つ事を特徴とする。精巣内 Aub に結合する piRNA の解析もすすめた。これら piRNA 中には Su(Ste) locus を由来とするものが多く含まれた。Su(Ste) locus は Stellate 遺伝子の発現を抑制する locus として以前より知られていた。この locus から small RNA が発現し、Stellate 遺伝子の発現を抑制する事、このサイレンシングに Aub が関わる事は既に遺伝学的な解析から判っていたが、Su(Ste) locus を由来とする small RNA が piRNA であり、Aub に結合する事を示したのは本研究がはじめてである。Su(Ste)由来の piRNA と結合した Aub は Stellate mRNA を切断する活性を示した。よって、Aub は Stellate 遺伝子の mRNA を切断する事によ

って *Stellate* 遺伝子の発現を抑制していると考えられる。精巣内で Aub に結合する piRNA の中にはこれまで annotate されていなかった遺伝子間領域から発現するもの (AT-chX と命名) が含まれる事が判明した。興味深い事に AT-chX piRNA は *vasa* mRNA と強い相同性を示した。Aub 変異体精巣における *Vasa* タンパク質の発現量を検討したところ、野生型のそれに比べ、上昇している事が判った。また、AT-chX piRNA と結合した Aub は *vasa* mRNA を切断する活性を示した。これらの結果は Aub は AT-chX piRNA と結合することによって *vasa* 遺伝子の発現を負に制御している事を強く示唆する。

(6) ヒト Ago2 および Ago3 に結合する miRNA の解析⁶⁾

ヒトは 8 種類の Argonaute タンパク質を発現する。このうち、4 種類 (Ago1、Ago2、Ago3、Ago4) は恒常的に発現する Argonaute であり、主に miRNA 経路で働くと考えられていた。しかし、これらの報告は全て強制的に細胞内で発現させた Ago1 から Ago4 を用いた解析結果であり、内在性 Ago に焦点を当てた解析はなされていなかった。そこで、ヒト Ago1 から Ago4 に対するモノクローナル抗体を作成し、それぞれの Ago を細胞より回収した後に各 Ago 結合する miRNA の解析を試みた。Ago1-Ago4 に対する抗体は作成できたが、免疫沈降に用いる事ができる抗体は Ago2 と Ago3 のみであったため、これらを利用することによって、解析をすすめた。Jurkat 細胞より特異的モノクローナル抗体を用いる事により、Ago2 と Ago3 を回収し、これらに結合する small RNA の同定を試みたところ、お互いに良く似た miRNA 群と結合する事が判明した。ある miRNA 群は Ago2 に特異的にあるいは Ago3 に特異的に結合していた。この miRNA sorting 機構に関しては不明である。本研究における miRNA の解析から、miRNA にはすでに登録されている miRNA と両末端配列を異にする miRNA アイソフォーム群が存在する事が判明した。miRNA は 5' 末端から数え 2-8 塩基配列特異的 (この配列をシード配列とよぶ) に標的 mRNA を選別する事が判っている。つまり、5' 末端に塩基が不可した場合、異なった標的 mRNA を認識してしまうはずである。標的 RNA 切断アッセイを立ち上げ、実際に同じ pre-miRNA から生成された miRNA アイソフォームに異なる標的を認識する機能があるかどうか検討したところ、期待通りの結果が得られる事が判った。5' 末端に 2 塩基付加が起こった miRNA アイソフォームは塩基付加を持たない miRNA アイソフォームの標的を基質として認識しなかった。つまり、miRNA 遺伝子は異なる機能をもった miRNA を複数発現する機能を有する事が判明した。

(7) 内在性 siRNA の同定及びバイオインフォマティクス解析⁷⁾

ショウジョウバエ RNAi 機構においては Ago2 が siRNA と結合する事によって中核的な役割を担う事が判っている。Ago2 は恒常的に発現する Argonaute タンパク質であるが、常に外来からの siRNA を待ち受けているのであろうか、それとも内在性の siRNA がショウジョウバエに存在し、これと複合体を形成することによって何らかの RNA サイレンシング機構において機能するのであろうか？この疑問に答えるために以下の実験を行った。

我々の研究室ではすでにショウジョウバエ Ago2 抗体を作成済みであった。そこで、RNAi 反応を誘導していない S2 細胞より Ago2 を免疫沈降によって単離精製し、それに結合する small RNA の回収をおこなった。21 塩基長をピークとする small RNA 群が得られたため、次世代シーケンサーによって塩基配列を決定したところ、その多くはトランスポゾン由来とする small RNA である事が判明した。これによって、ショウジョウバエにも内在性 siRNA (endogenous siRNA; endo-siRNA) が存在する事が明らかとなった。外来性 siRNA は長鎖二本鎖 RNA から Dicer2 の RNaseIII 活性を介して生成する事が判っている。Dicer2 をノックダウンした条件下において endo-siRNA の生成効率も著しく低下する事が判明した。また、Dicer2 欠損体ショウジョウバエにおいては多くのトランスポゾンのサイレンシングが解除されている事も判った。endo-siRNA は Dicer2 によって生成され、Ago2 に特異的に結合する事によって、トランスポゾンのサイレンシングに関わる事が明らかとなった。

(8) miRNA-RLC 及び miRNA-RISC の解析⁸⁾

ショウジョウバエ miRNA 機構において miRNA は pre-miRNA から Dicer1 によって生成され、Ago1 へ特異的に結合する。この miRNA プロセシング反応において、Ago1 は Dicer1 と結合する。この後、Ago1 は結合した miRNA の塩基配列に従って標的 mRNA を選別し、それに miRNA を介して結合する事によって、この mRNA がタンパク質合成の鋳型となる事を阻害する。この翻訳阻害反応においては Ago1 には GW182 タンパク質が結合する事が判っている。GW182 は Ago1 の標的 mRNA の cap 結合タンパク質および PABP に直接結合する事によって、標的 mRNA 上でのリボソームの会合を阻害すると報告されている。つまり miRNA 機構において Ago1 は Dicer1 と GW182 と結合する機会を持つが、この結合はどのように制御されているのだろうか？本研究を通してまず、Dicer1 と GW182 は同時には Ago1 に結合しない事が判った。それぞれの複合体を S2 細胞株より単離精製し、そこに含まれる RNA を解析したところ、Ago1-Dicer1 複合体には pre-miRNA と共に miRNA duplex が含まれるが、Ago1-GW182 複合体には成熟型 miRNA のみが含まれる事が判った。pre-miRNA を miRNA へと変換する反応において Ago1 は Dicer1 と結合するが、一旦、miRNA と複合体を形成した後は、Ago1 は Dicer1 から解離し、GW182 と結合する事が示唆された。miRNA との結合が、Ago1 がパートナー因子を変える原動力となっていると考えられる。実際、Ago1-Dicer1 複合体には pre-miRNA をプロセスする活性があるのに対し、Ago1-GW182 複合体にはそのような活性は見られなかった。また、GW182 を RNAi によってノックダウンした条件下においても miRNA の発現量に変化はみられなかった。GW182 は miRNA 生合成経路には必要でない事が明らかとなった。RNAi 経路においては siRLC と siRISC が形成される事が判っている。siRLC は siRISC の前駆体に相当し、時間経過とともに siRLC は siRISC へと置換される。これらの複合体の可視化には複数の研究グループが成功している。miRNA 経路においても miRLC 及び miRISC 複合体が形成されると考えられていたが、これらの可視化は未だなされていなかった。pre-miRNA を S2 細胞抽出液と混合し、反応させた条件下で miRLC と miRISC 複合体の可視化を検討したとこ

ろ、それに成功した。miRLC も miRISC も siRLC、siRISC に比べ、小さい事が判明した。

(9) 内在性 siRNA の生合成に関する研究⁹⁾

ショウジョウバエでは3種類の小分子 RNA が内在的に発現する (miRNA、endo-siRNA、piRNA)。これらはいずれも RNA サイレンシングにおいて機能する事が判っている。piRNA は Dicer 非依存的に生成されるが、miRNA と endo-siRNA はそれぞれ Dicer1 と Dicer2 に依存的に生成する。これまでの解析から miRNA の生成には Dicer1 のパートナー因子である Loquacious (Loqs) が重要な役割を果たす事が判っていたが、最近の研究から、Loqs は endo-siRNA の生成機構においても機能する事が示された。この調節はどのように行われているのか? この疑問に答えるために、以下の研究を進めた。

Loqs には4種類のアイソフォームがある (PA、PB、PC、PD)。これら4種類の Loqs cDNA を獲得し、Dicer1 と Dicer2 との結合様式をしらべたところ、Loqs-PB と Loqs-PA は Dicer1 と、Loqs-PD は Dicer2 と特異的に結合する事が判明した。各 Loqs アイソフォームを RNAi でノックダウンした条件下で endo-siRNA の生成度を確認したところ、Loqs-PD を特異的にノックダウンした際に、endo-siRNA の生成量のみが減少する結果が得られた。これらの結果は Loqs-PD が Dicer2 と結合する事によって endo-siRNA の生成経路で機能する事を強く示唆する。S2 細胞内において myc-tag を付加した状態で4種類の Loqs を発現させ、myc を介して精製したタンパク質複合体で small RNA プロセッシングアッセイを行った。Loqs-PA 及び Loqs-PB 複合体は pre-miRNA を miRNA へとプロセスする活性を示したが、Loqs-PD 複合体は示さなかった。一方、Loqs-PD 複合体は長鎖二本鎖 RNA を siRNA へとプロセスする活性、および pre-endo-siRNA を endo-siRNA とプロセスする活性を示した。Loqs-PD 複合体には R2D2 が含まれる事が western blot 解析から判明した。Dicer2 はある程度の割合で Loqs-PD と R2D2 と三者複合体を形成する事によって、長鎖二本鎖 RNA および pre-endo-siRNA いずれの分子も基質として認識し、プロセスする事が明らかとなった。Dicer2 および Loqs-PD のリコンビナントタンパク質を作成し、これらを利用する事によってアッセイを行う事によって Loqs-PD には Dicer2 の活性を促進する機能がある事が判った。R2D2 にはそのような活性は見られない事から、R2D2 の small RNA プロセッシング反応への機能的寄与は不明である。興味深い事に、endo-siRNA precursor は Loqs-PD 複合体によってプロセスされるが、pre-miRNA 様となった endo-siRNA precursor 中間産物は Loqs-PB 複合体によって基質と認識され、プロセスされる事が判った。また、この中間産物から得られた small RNA は miRNA と同様に Ago1 に結合することも明らかとなった (endo-siRNA は通常 Ago2 に結合する)。

2. 3. 2. 2. 3. まとめ

small RNA を自在に用いて遺伝子治療等に用いようとする試みは欧米をはじめ、各国盛んに進められているのが現状である。しかし、RNA サイレンシングによる遺伝子発現抑制の効果や基質特異性が高い事は理解されてはいても、small RNA の作用機序が十分に解明されて

いない状況下においては、その‘特徴’を発揮する、あるいは応用する事はほぼ不可能に等しい。数年前、マウスを用いた研究より、small RNA を大量に体内に導入（あるいは発現）した場合、内在性の RNA サイレンシング経路を阻害してしまい、非特異的な効果しか得られないという結果も報告された。我々が本研究を通して得た成果—例えば、Argonaute の持つ Slicer 活性が siRNA の成熟化に必須である、ヒト細胞において内在的に発現する Ago3 には Slicer 活性を持たない、miRNA 遺伝子からは違う機能をもった miRNA アイソフォームが生成される可能性がある、など—は、今後の RNA サイレンシングの応用研究に非常に役立つと期待される。

我々はさらに、生殖細胞特異的に起こる RNA サイレンシング経路に関しても研究を遂行した。生殖細胞には恒常的に発現する Argonaute タンパク質もちろん発現してはいるものの、生殖細胞特異的に発現する Argonaute タンパク質に比べると、その発現量は非常に少ない。機能的寄与も少ないといっても過言ではないであろう。よって、生殖細胞にて RNA サイレンシング機構を応用する場合、piRNA 経路を用いる方が効果的であると予想される。我々の研究を通して、piRNA の発現様式や、機能の仕方は miRNA や siRNA のそれと大きく異なり、非常に特徴的で独特なものである事が判明しつつある。こういった理解がさらにすすめば、piRNA 経路を利用した治療など（不妊や子宮頸癌関連などに関する）も将来可能になるのではないかと期待される。

2. 3. 2. 2. 4. 文献

- 1) Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, and Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* 19:2837-2848. 2005
- 2) Saito K, Nishida KM, Mori T, Kawamura Y, Miyoshi K, Nagami T, Siomi H, and Siomi MC. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* 20:2214-2222. 2006
- 3) Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, and Siomi MC. A Slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315:1587-1590. 2007
- 4) Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, and Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* 21:1603-1608. 2007
- 5) Nishida KM, Saito K, Mori T, Kawamura Y, Nagami-Okada T, Inagaki S, Siomi H and Siomi MC. Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine-piRNA complexes in *Drosophila* male gonad. *RNA* 13:1911-1922. 2007
- 6) Azuma AM, Oguri H, Kin T, Qian ZR, Asai K, Siomi H and Siomi MC. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 7964-7969. 2008
- 7) Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC, and Siomi H. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. *Nature* 453: 793-797. 2008
- 8) Miyoshi K, Okada TN, Siomi H, Siomi MC. Characterization of miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in *Drosophila* miRNA pathway. *RNA* 15: 1282-1291. 2009
- 9) Miyoshi K, Miyoshi T, Hartig J, Siomi H, Siomi MC. Functional molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and micro RNA biogenesis pathways in *Drosophila*. *RNA* 16: 506-515. 2010

2. 3. 2. 3. アンチセンスRNA機能解析

共同実施先： 理化学研究所（清澤）、慶應義塾大学（2；金井）

近年のゲノム・トランスクリプトーム解析の結果、多くのモデル生物において以前考えられていたより遙かに多くの内在性のセンス-アンチセンス RNA (sense-antisense transcript、以降 SAT) が存在することが明らかになった。これら RNA には非翻訳性と予想される RNA (non-coding RNA: ncRNA) のものが存在することも判明した。内在性アンチセンス RNA の存在は、哺乳動物において 20 年ほど前から知られていたが、ゲノムデータによる解析以前 (7-8 年前まで) は 20-30 個程度が知られているのみであった。このような状況で我々は約 6 万のマウス cDNA 配列を用いて、世界に先駆けて約 2,500 にも及ぶ SAT 遺伝子対を同定した。この個数は遺伝子全体の約 2 割に相当する。当時アンチセンス RNA に対する関心が現在ほど高くはなかったが、二本鎖 RNA (dsRNA) を介した RNA 干渉が哺乳動物でも働くとの発表がなされ始めた頃であり、これほど多くのナチュラルなアンチセンス RNA は dsRNA 形成もしくは他の方法により、遺伝子発現制御を行っているであろうと考えた。ほぼ同数の SAT 遺伝子対が他のモデル生物で公表され始めたのは全て我々のマウスにおける発表以後である。

我々は情報科学的解析によるデータがそろそろとこれらデータを用い、センス鎖、アンチセンス鎖を区別して発現解析を可能とするカスタムオリゴマイクロアレイを作製し、発現解析を行った。その結果として、(1) 情報科学的に同定された SAT 遺伝子対のほとんどが実際の組織、細胞で発現しており、センス鎖・アンチセンス鎖の発現比も組織によって違いがあり、(2) SAT 遺伝子座からは非常に複雑な転写様式を介して多様なサイズの転写産物が産生され、(3) これらの転写産物の多くは核内に留まり、通常の mRNA とは異なりポリ A 鎖を持たないものが多い、ということを見出した。

また、我々が同定した SAT 遺伝子対の約半分は coding RNA/ncRNA の遺伝子対である。それ故、我々の発現解析は世界初の ncRNA のゲノムレベルでのデータであるともいえる。

このような状況で、本プロジェクトでは以下の解析を試みた。

- 1) 最新のゲノム・cDNA 配列情報を用いて今まで行ってきたマウスのみならず、ヒトにおいても情報科学的に SAT 解析を行い、より多くの SAT 遺伝子対の同定をする。
- 2) 上記情報科学的なデータに基づき、ゲノムレベルでのカスタムマイクロアレイを作製し、主要組織において発現データの収集、解析を行う。
- 3) 配列レベル、及び発現レベルにおいて(機能性解析への第一歩として)ヒト・マウス間の相同性解析を行う。
- 4) 疾患及び対応する正常サンプルを用いて疾患特異的に変動する内在性アンチセンス RNA を同定する。
- 5) 内在性アンチセンス RNA が近傍のゲノム修飾(ゲノムのメチル化)に影響を及ぼし、ひ

いてはセンス鎖 RNA 発現に影響する報告があるため、SAT 遺伝子座近傍のゲノムメチル化を解析するためのマイクロアレイを作製、データの収集を行い、アンチセンス転写との関連を解析する。

- 6) 特定の SAT 遺伝子座を選定し(できれば疾患に関わる遺伝子座)、SAT の発現様式を詳細に解析することにより、機能性解析を開始する。
- 7) マイクロアレイ解析で蓄積したゲノムレベルでの発現データ、ゲノムメチル化データをベンチの実験科学者が利用しやすいビューワーを開発する。

2. 3. 2. 3. 1. 研究の成果

2. 3. 2. 3. 1. 1. マイクロアレイ解析に先立つ条件検討

(1) マイクロアレイ解析は通常 2 つのサンプル間の比較を目的とする場合が多く、2 カラーシステムで行うことが多かったが、今回は多くのサンプルデータの蓄積・解析を目的としているため、1 カラーシステムを採用することとした。その際、過去に蓄積したデータとの整合性を保つため、2 カラーシステムと 1 カラーシステムの相関解析を行い、問題がないことを確認した。

(2) ヒト疾患サンプルの品質に関する検証

ヒト疾患サンプル解析には肝臓及び大腸腫瘍とその周辺の正常組織を用いたが(筑波大学消化器内科よりのサンプル)、手術中の採取の状況、その後の保存状態などにより品質に相当ばらつきがある。アジレント社のバイオアナライザーを用いて、サンプル RNA 中のリボソーム RNA の品質を指標として、アレイ解析として使用可能性の検定を行い、おおむね 4 割程度のサンプルがアレイ解析に適する品質を有していることを示した。

2. 3. 2. 3. 1. 2. 情報科学的な SAT 遺伝子、ncRNA 候補遺伝子の抽出

(1) H-invitational、FANTOM3、NCBI RefSeq、NCBI UniGene に登録されている転写産物の配列をゲノム上にマッピング(配列相同性検索によりゲノム上の位置を特定)し、ゲノム上の近傍にマッピングされた転写産物同士をクラスタリングすることにより(図 1)、SAT 遺伝子の抽出(ヒトおよびマウス)を行った。その結果、ヒトで 3,524 個、マウスで 5,351 個の SAT 遺伝子対を抽出した。またこれら SAT の詳細な情報(ゲノム上の位置やエキソン・イントロン構造)を管理し、解析に使用するための内部データベース(プログラミング言語 Perl の nstore 形式や Python の pickle 形式)を構築した。

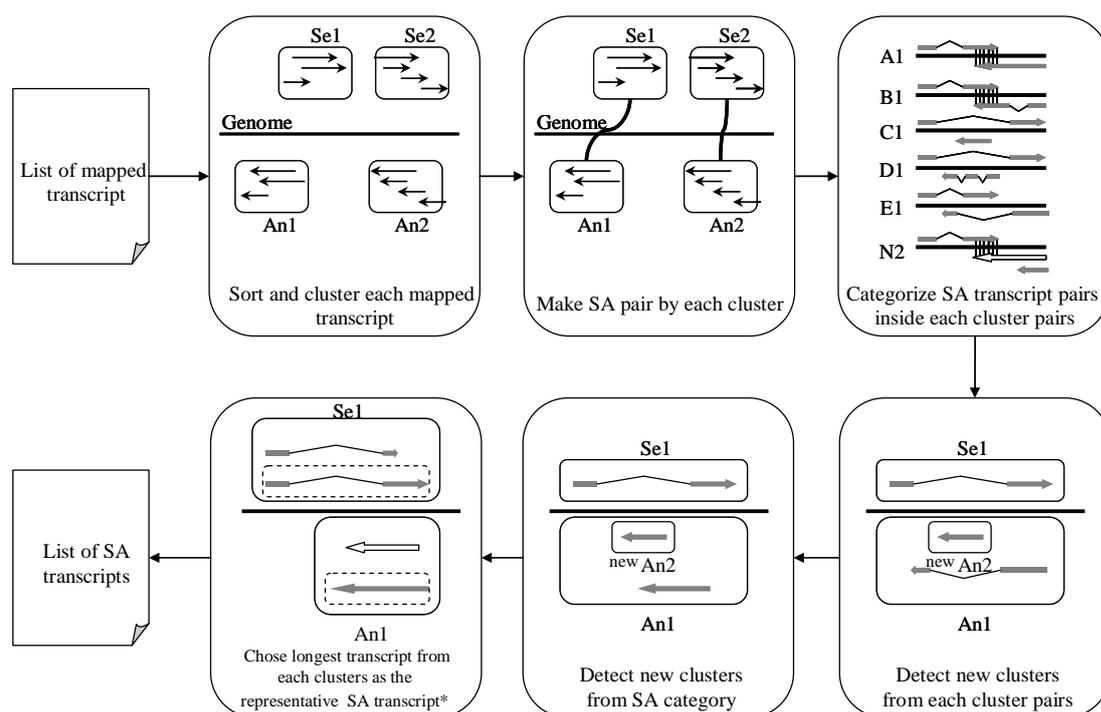


図 1. 転写産物のゲノムへのマッピング、SAT の抽出法の概要

(2) 転写産物の配列のうち、コード領域としての配列上の特徴を持っておらず、タンパク質との相同性も低いものを ncRNA と考えその抽出を行い、ヒトで 5,422 個、マウスで 4,519 個の候補を得た(シンテニー解析に基づく候補に関しては後述)。

	ヒト	マウス
cDNA ベースのセンス-アンチセンスペア抽出による cDNA 数	12,306	15,274
シンテニー解析に基づくペア候補抽出による cDNA 数	10,197	6,774
ncRNA 候補数	5,422	4,519
合計	27,925	26,567

2. 3. 2. 3. 1. 3. カスタムマイクロアレイ (発現解析用) の作製

上記 SAT 遺伝子ペア、ncRNA、更に腫瘍関連遺伝子 (oncogenes)、ゲノム刷り込みを受け
る遺伝子 (imprinted genes)、oncogenes/imprinted genes を人工的に逆鎖にした配列
(artificial antisense 配列: AFAS 配列)、情報科学的にアンチセンス転写産物が同定さ
れていない遺伝子などの配列を整理・管理し、マイクロアレイ用プローブ選定ツール
“OligoWiz” を使い、プローブ配列の設計を行い、マイクロアレイを作製した (44k マウ
ス及びヒトカスタムマイクロアレイ、アジレント社製)。(以降、AFAS 配列に対して設計さ
れたプローブを AFAS プローブと呼ぶ。)

2. 3. 2. 3. 1. 4. マイクロアレイ（発現解析用）のハイブリダイゼーション

プロジェクト採択以前にアジレント社製の 11k フォーマットにおいてカスタムマイクロアレイを作製していたため、上記 44k フォーマットにおけるアレイが完成するまで、11k フォーマットのアレイを用いてハイブリダイゼーションを行い、先行してアレイ解析を行った。また、ポリ A 鎖のない RNA も標的とするため、ハイブリダイゼーションは常に oligo dT プライミングと random プライミングの両方で行い、データを取った。

(1) マウス (11k)

- ・ 12 正常組織、培養細胞
- ・ 2 乳がんサンプルと 1 正常乳腺

(2) ヒト (11k)

- ・ 5 正常組織
- ・ 大腸がんと正常部位のペア (6 患者)
- ・ 肝臓がんと正常部位のペア (5 患者)

(3) マウス (44k)

- ・ 13 正常組織サンプル
- ・ 培養細胞 (ES 細胞、線維芽細胞など)
- ・ 発生分化
 - 精巣内での germ cell 発生分化過程 3 ポイント
 - ES 細胞から神経細胞への in vitro 発生分化 5 ポイント
- ・ 細胞内分画 (3T3 細胞、核内/細胞質)
- ・ Dicer ノックアウト細胞とそのコントロール
- ・ 疾患
 - 軸索変性疾患モデルマウスの脳サンプルとコントロール
 - 乳がんモデルマウス GRS の乳がんコントロール (乳がんは 7 サンプル)
 - 乳がんモデルマウス SHN の乳がんコントロール (乳がんは 2 サンプル)
- ・ RNA Polymerase II 阻害 (Pol II 以外で転写される ncRNA 検索のため、3T3 細胞)
- ・ RNA Polymerase III 阻害 (Pol II 以外で転写される ncRNA 検索のため、3T3 細胞)
- ・ 単為発生胚とそのコントロール (インプリント遺伝子解析のため)
- ・ 脳由来低分子 RNA (20-40nt 分画、40-100nt 分画)

(4) ヒト (44k)

- ・ 14 正常組織サンプル
- ・ 大腸がんと正常部位のペア (16 患者)
- ・ 肝臓がんと正常部位のペア (9 患者)

2. 3. 2. 3. 1. 5. アレイデータの発現解析のまとめ

(1) ヒト 11k アレイによる疾患サンプルの解析

特に興味深いものは腫瘍組織における AFAS 配列プローブの発現である。アレイ作製の項目で説明したように AFAS 配列は、アンチセンス遺伝子のあるなしにかかわらず、人工的に oncogene の反対鎖配列を設定したもので、通常の cDNA 配列データを利用する限りプローブを設定できない配列を多く含み、常識的には発現が見られないはずである。それにもかかわらず疾患サンプルにおいて発現がみられ、しかも、正常と疾患サンプルでは正反対の発現を示すものが発見された(図 2)。

各サンプル群は正常部分の組織と腫瘍部分の組織からなり、正常部分組織からの RNA を用いてアレイ解析をしたところ、6 サンプル全てにおいて、oncogene (CDK4) の反対鎖に人工的に

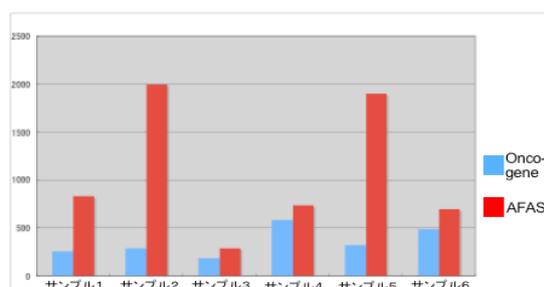
設定した AFAS 配列プローブに対する発現の方が高かった(図 2)。ちなみに CDK4 の反対鎖には遺伝子はおろか、EST さえも存在しなかった。

一方、腫瘍部分サンプルを用いた解析では、全く正反対の結果が得られた(図 2)。縦軸のシグナルは、発現量をあらわし、500 以上あれば通常ノーザンプロット上で容易にバンドが検出されるレベルである。

この結果は random プライミング法により RNA サンプルをラベルしたものである。AFAS 配列方向に EST すら発見されていないのは、ポリ A 鎖のついた RNA がこの遺伝子座領域に存在しない為と思われ、random プライミングによりラベルしたため、このように特徴的なセンス-アンチセンス RNA 発現パターンが得られたものと考えられる。ちなみに通常の oligo dT プライミング方を用いた場合はアンチセンス RNA は全く検出されなかった(図 2 における赤色の棒グラフの値は全てのサンプルにおいてほぼ 0 であった)。

上記結果を受け、我々はさらに正常サンプルと癌サンプルで SAT の発現比の逆転の程度を測る指標を開発し、これを用いて random プライミング法を用いたとき、発現が逆転するようなペア 44 個を抽出した。さらにこれらのセンス・アンチセンス RNA の発現比のクラス

正常



腫瘍

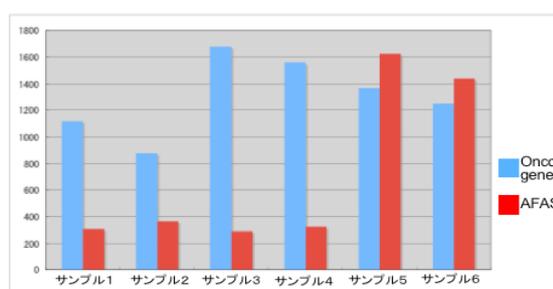


図 2. ヒト腫瘍における AFAS の発現

タリングを行った(図3)。oncogene/AFAS 配列の比が高いほど緑色になり、低いほど赤色になっている。すなわち、random プライミング法を用いた発現解析において、腫瘍では oncogene の発現が高いが正常組織部分では AFAS の発現が高いものを集めて示している。一方、oligo dT プライミング法を用いたとき、同じ 44 ペアの発現比がどのようなパターンを示すかを調べたところ、ほとんどのペアでセンス側の発現の方が高いことが分かった。センス側の裏から発現する RNA の多くはポリ A 鎖を持たないことがここでも示唆される。

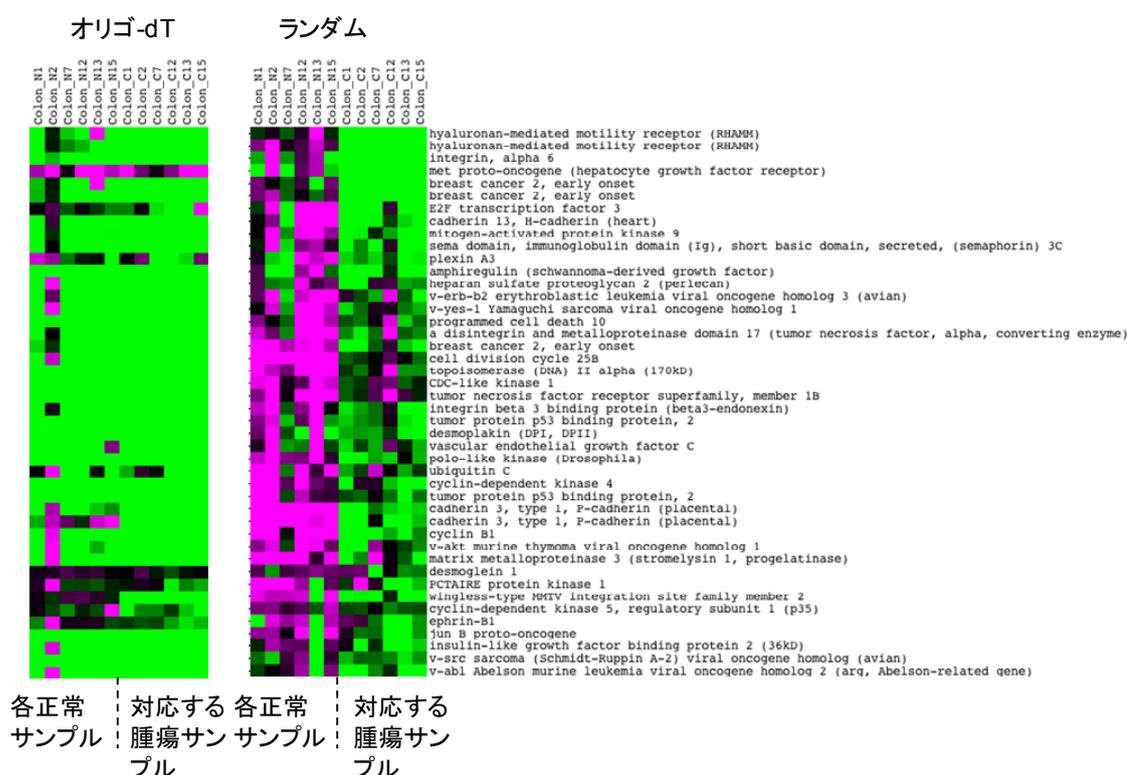


図3. ヒト腫瘍と正常組織の発現比較のクラスタリング

(2) ヒト 11k アレイとマウス 11k アレイデータを用いたヒト・マウス SAT 間の発現比較解析

マイクロアレイを用いた解析では、ヒトとマウスの両種で共通に観測された 291 個の SAT のうち、33%で類似した遺伝子発現パターンが観測された。また両鎖における相対的な発現量が精巣特異的に逆転するものが多く観測された。さらに in situ hybridization によって、精子形成期に応じて発現量が逆転してゆく SAT が存在することが確認された。我々はさらにこの中から興味深い SAT を選んでノーザンブロットを行った。その結果、SAT 間のエクソンがゲノム上で重なっている領域の一部から small RNA が発現していることが観測された (siRNA や miRNA とは異なる 50-100nt 程度の RNA)。発見の確率から考えて、これら新

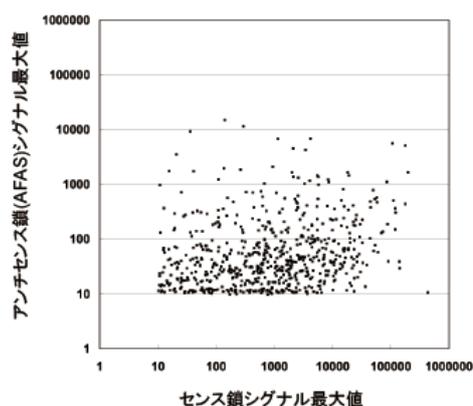
規低分子 RNA の存在は普遍的であると予想される。これまでゲノムワイドな SAT の解析は配列レベルに限られていたが、本解析では発現というより高次のレベルから SAT の解析を行い、発現制御に関連するような SAT の新規特徴を抽出することができた。

(3) マウス 44k アレイを用いた発現解析

マウス 44k アレイ発現データにおいては、AFAS の解析を中心におこなった。本手法は、最終的には、特定の遺伝子群（例えばがん関連遺伝子や、シグナル伝達系に関わる転写因子群など）に適用することによって、それらの発現制御に関わるアンチセンス転写の有無を網羅的に一度に把握するという応用可能性がある。一部は先行してヒト 11k アレイを用いて AFAS 配列も用いたアンチセンス RNA 解析を行ったが、ここではマウスを用いて、AFAS 配列を用いた発現解析の基礎的な検証を行った（マウスの方が実際の組織での発現を *in situ hybridization* で検討するなど、その後の解析で便利のため）。その前段階として、cDNA 配列がとれていない場合でも、アンチセンス転写の発現シグナルを得ることができるのかを確認するために、ヒト-マウス間のゲノムシソーナ情報をもちいた解析をおこなった。具体的には、ヒトにおいて cDNA によって予測される SAT のうち、マウスゲノムとのシソーナ領域に存在し、マウスゲノム上ではセンス-アンチセンス転写産物 (SAT) として予測されていないものを対象とした。

正常 13 組織の発現データにおいては、一部の AFAS プローブから一定以上のシグナルを観察することができた (図 4)。アレイ間ノーマライズに用いた平均値以上のシグナル値を示す AFAS プローブは oligo-dT プライミング、random プライミングそれぞれ 4.7%、23.4%

(A) Oligo-dTプライミング



(B) Randomプライミング

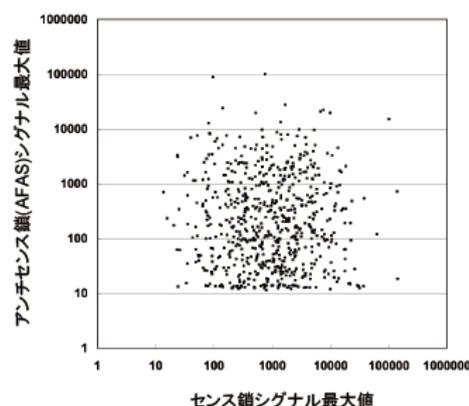


図 4. マイクロアレイ解析における AFAS プローブのシグナル強度の確認

であり、random プライミングのほうがより高いシグナル値になるという結果を得た。このことはシグナル値の平均においても見られ、同じ遺伝子群のセンス鎖に設計したプローブ

では、oligo-dT プライミングのほうが random プライミングよりも値が高かったため、アンチセンス転写産物が poly(A)-negative であるという知見に合致する結果を得た。また、ゲノムシンテニー情報によって絞り込んだ AFAS プローブのシグナル値平均を、そもそもアンチセンス鎖に cDNA や EST のない遺伝子群（ネガティブコントロール）における AFAS プローブのシグナル平均と比較すると、oligo-dT プライミング、random プライミングいずれの場合においても、前者のほうの平均値が高かったことから、ゲノムシンテニー情報をもちいる方法によって、cDNA 配列で予測できないアンチセンス転写産物が濃縮されてきていることを示唆している（今後、新規のアンチセンス転写産物の予測の向上に寄与する可能性がある）。

正常組織をもちいた AFAS の解析によって得られた新規のアンチセンス転写産物候補のうち、10 個程度を in situ hybridization 解析のために選定した。その際、二組織間で比較し、random プライミングのみでセンスとアンチセンスの発現に逆転のあるものを中心に選定した（図 5）。

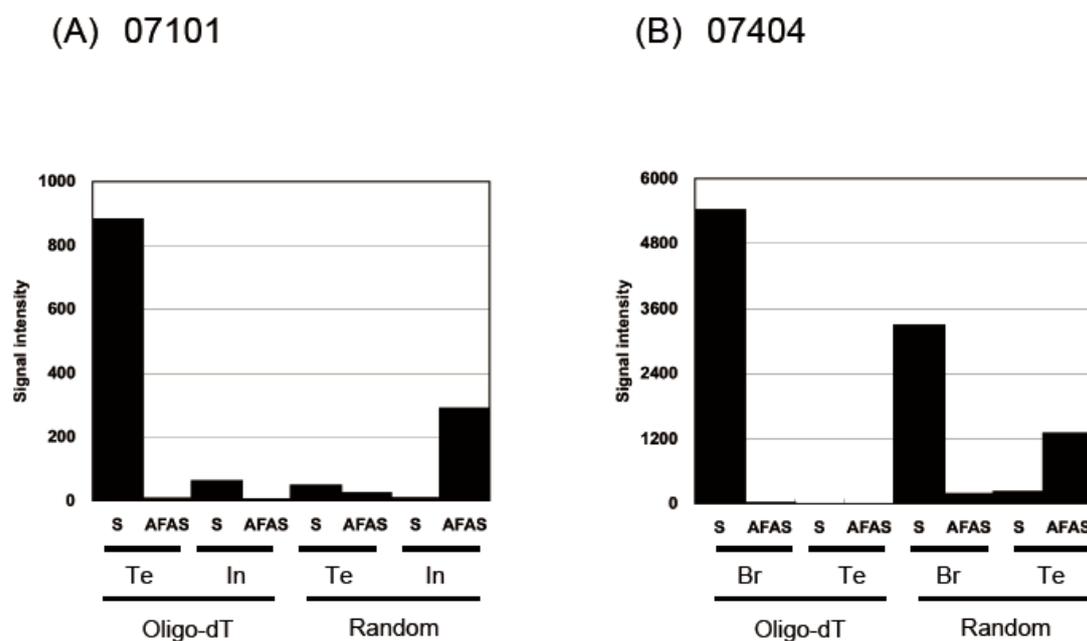


図 5. AFAS プローブによる新規アンチセンス RNA 発現同定の 2 つの例。Te:精巣、In:小腸、Br:

図6では in situ hybridization で実際に AFAS プローブによって組織における発現が確認された例を挙げた。興味深いことに精子の発生過程（パキテン期 → 円形精子細胞 → 伸長精子細胞）において、センス鎖は発生が進むにしたがって発現が減少し、アンチセンス鎖の発現は逆の発現パターンを示した（図6）。

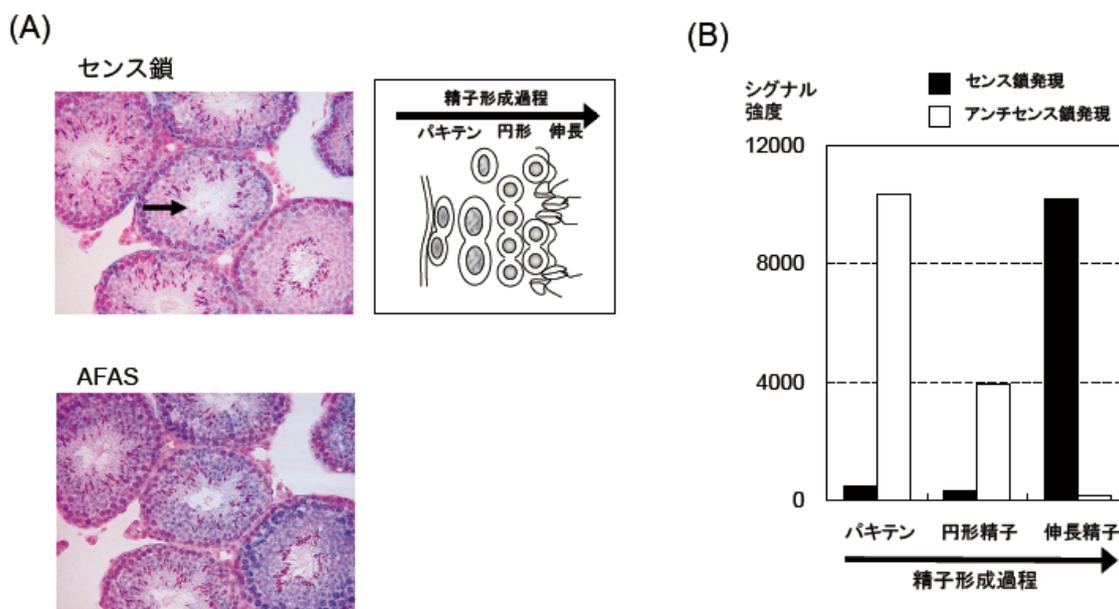


図6. AFAS 転写産物の組織での発現例
 (A) 精巣内におけるセンス鎖とアンチセンス鎖 (AFAS) の発現。精巣内における精子形成過程の模式図を写真の右横に示す。(B) 精子形成過程に従って分画したサンプルを用いたアレイ解析の結果。センス鎖とアンチセンス鎖 (AFAS) の発現が逆転している。

同様の解析を乳がんモデルマウス (GRS) を用いて行い、腫瘍特異的な新規 AFAS 転写産物を同定し、in situ ハイブリダイゼーションにより組織内での発現を確認した。がん組織で発現が上昇している新規 AFAS 転写産物のアレイデータと in situ ハイブリダイゼーションの例を図7に示した。

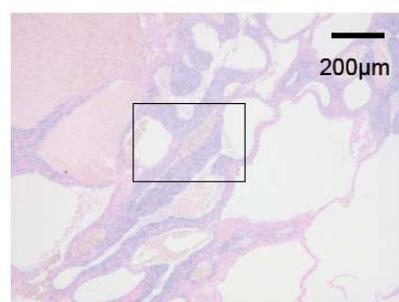
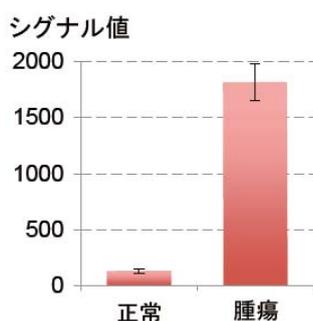
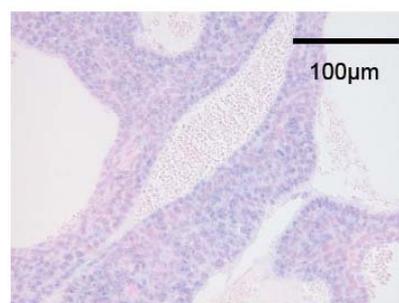


図7 乳がんモデルマウス (GRS)における AFAS 転写産物の発現例
 (上) 腫瘍に特異的に発現上昇が見られる AFAS RNA。(右) 実際の乳がん腫瘍組織における AFAS RNA の発現。



2. 3. 2. 3. 1. 6. SAT 遺伝子座に見られる低分子 RNA を標的とした発現解析

(1) マイクロアレイ解析とノーザン解析

SAT 遺伝子のエクソン同士が重なる領域から新規低分子 RNA が検出されることをうけて、低分子 RNA (40-100nt 分画、マウス脳由来) をターゲットとして 44k マイクロアレイを用いてハイブリダイゼーションを行った。発現の高かった上位 26 プローブに関して、マイクロアレイ上のプローブ配列 (60mer) と同じ配列のオリゴプローブを用いてノーザン解析を行ったところ、11 プローブ (42. 3%) においてノーザンブロット上に 50-100nt 程度のシグナルを認め、その存在の普遍性が確認された。

(2) 低分子 RNA の網羅的配列決定

上記、ノーザン解析からの低分子 RNA 存在の普遍性の結果を受けて、マウス脳低分子 RNA (40-100nt 分画) の Roche GS20 によるパイロット配列決定を行った。この分画ではほとんどが tRNA 由来と予想されたが、それを見込んだ上で試みた。43, 049 リードの配列が得られ、両端にアダプターの残る配列を選定し、重複を含む 33, 125 配列をその後の解析対象とした。配列長は、20 塩基、40 塩基、60-80 塩基周辺にピークをみることができた。既知 RNA 配列 (注) への相同検索の結果、大半は tRNA、rRNA、snoRNA、snRNA と相同な配列であったが、8% (2807 配列) は既知 RNA 配列との相同性は見られなかった。既知 RNA と相同でなかった 2807 配列は、ゲノム上にマッピングすると 214 個の転写単位に由来しており、既知 mRNA (RefSeq)、UniGene に登録された EST 配列と相同なものは、それぞれ 39 個、42 個だった。UniGene に登録された EST 配列に対して相同性がないものは、遺伝子間領域から発現する small RNA である可能性がある。

(注) 既知 RNA 配列セットとは、Rfam、miRBase 中のマウス miRNA、NCBI RefSeq 中で ID が NR ではじまるもの、マウスミトコンドリア DNA (NC_005089) の tRNA、rRNA を統合したものの (全 34072 配列) をさす。

2. 3. 2. 3. 1. 7. 遺伝子のエピジェネティックな発現制御に関わるアンチセンス RNA の解析

(1) SAT 遺伝子座近傍のゲノムメチル化と SAT 発現との関連の解析

アンチセンス RNA の転写がセンス鎖遺伝子のプロモータ領域の CpG アイランドのシトシンをメチル化することにより、センス鎖遺伝子の発現を抑えていると考えられている例が知られている。同様の役割を有する可能性があるアンチセンス RNA をスクリーニングするため、SAT 遺伝子の発現マイクロアレイと並行的に SAT 遺伝子座近傍の CpG アイランドのメチル化を解析できるアレイ (MeDIP アレイ) を設計し、マウス正常組織 (12 組織) 及、培養細胞、乳がんサンプルにおけるデータを取得した。

図 8 にその例を示した。肝臓や腎臓ではアンチセンス鎖の発現が高く、逆にセンス鎖の発現が低くなっており、それに伴って CpG 領域のメチル化が特に肝臓で高くなっている。MeDIP アレイによるシグナルと実際のゲノムメチル化の状態の相関は Bisulfite シーケンスにより確認している。

また、培養細胞を用いた時のゲノムメチル化のデータと SAT 発現解析データ

の両方を解析することにより、Mex3a 遺伝子座においてはアンチセンス鎖発現とゲノムメチル化の相関が得られた。そこでアンチセンス RNA を強制発現させたところ、センス鎖発現が有意に低下した (アンチセンス強制発現後にセンス鎖の RNA 量が約 4 割に減少)。この減少におけるゲノムメチル化の係わりに関する解析は今後の課題である。

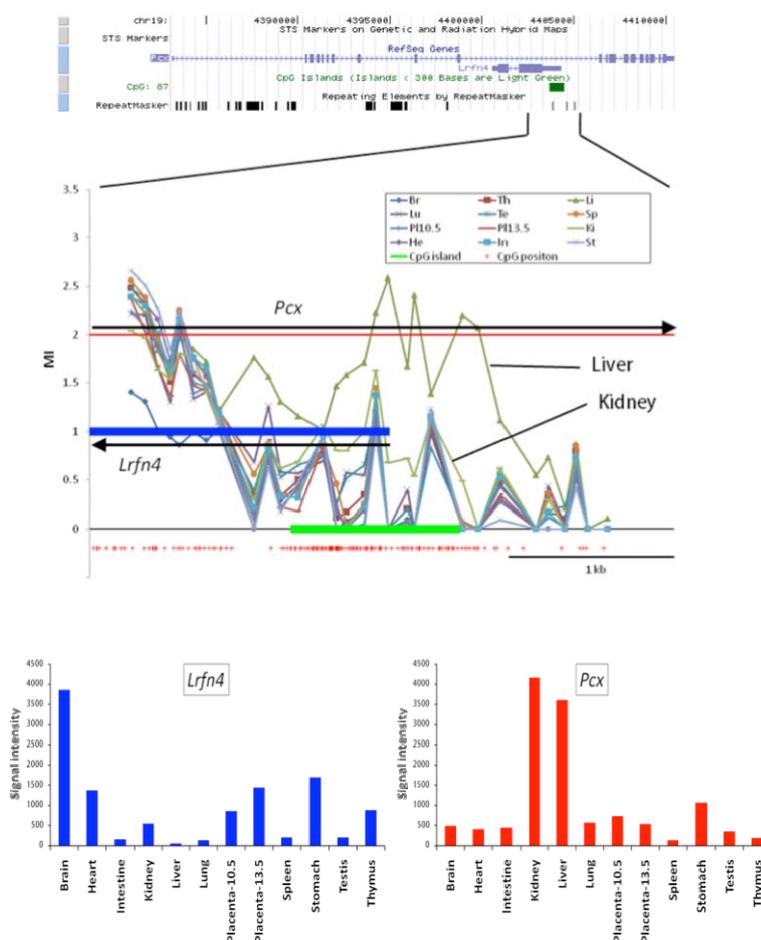


図 8 SAT 遺伝子座とその周辺の CpG アイランドのメチル化状態の例。(上段) SAT 遺伝子のゲノム構造。(中段) SAT 遺伝子座近傍の CpG アイランド領域の拡大とゲノムメチル化状態のグラフ。縦軸が高いほど高メチルを現す。(下段) SAT 遺伝子の各組織における RNA 発現 (発現アレイによる)。

(2) Ube3a 遺伝子座におけるアンチセンス転写とゲノム刷り込み現象の解析

Ube3a 遺伝子は Angelman 症候群（重度の精神遅滞・てんかん・失調歩行などを主徴とする奇形症候群）の原因遺伝子であり、ゲノム刷り込み遺伝子（母方もしくは父方からのどちらか片方の対立遺伝子しか発現していない遺伝子）でもある。遺伝子自体は2つあるにも関わらず、1つの遺伝子しか発現していないため、疾患の原因になりやすい。Ube3a 遺伝子は更に特異な発現をしており、脳以外では2つの対立遺伝子が発現しているが、脳でのみ（神経細胞と報告されている）母方の遺伝子のみの発現が見られる。Ube3a 遺伝子座では超長鎖のアンチセンス RNA 発現が知られており、我々はこのアンチセンス RNA 発現がゲノム刷り込みに関与していると考え、Ube3a 遺伝子発現制御を最終目的として、解析を開始した。

通常、ゲノム刷り込みは生殖細胞の発生過程で刷り込まれるため、その刷り込み過程の解析が困難である。しかし、組織特異的なインプリントであれば ES 細胞をその組織に *in vitro* で発生分化させることにより、ゲノム刷り込みが確立する過程の再現が可能となる。ES 細胞の神経細胞への発生分化は既に確立されているが、マウス ES 細胞研究においては主に近交系マウス 129 由来の ES 細胞が使われている。129 などの純粋に近交系由来の ES 細胞は対立遺伝子間に多型がないため、対立遺伝子の区別（母方由来か父方由来かの区別）ができない。

そこで我々は標準的なマウス近交系（現在ゲノム配列データが公開されている）C57BL/6J（以降、B6）と B6 に対して多くの多型を有する日本産野生マウス由来の MSM/Ms（以降、MSM）間のハイブリッド ES 細胞を樹立し、様々な条件設定を加味することにより、神経細胞特異的なゲノムインプリントを刷り込むことができる発生分化系確立に成功した。我々の系では生体での発生により近い状態を維持し、その後の再生医療などへの応用も考慮し、レチノイン酸付加などはしていない。

この神経細胞への分化系において、Ube3a が母方発現にスイッチする際に父方からのアンチセンス RNA 発現が約 1000 倍上昇することを突き止めた（Ube3a 遺伝子座アンチセンス鎖上の 2 ポイントにおいて確認）。そこで以前我々が作製した Ube3a 遺伝子座近傍の SNP アレイを利用して、ES 細胞から神経細胞へと分化する過程におけるアンチセンス鎖のゲノムレベルでの発現状況を解析した。この SNP アレイでは Ube3a 遺伝子座アンチセンス鎖上の 379 もの SNP の位置において一気に母親・父親由来の発現の区別が可能である。その結果、神経幹細胞から神経突起を伸ばす時期に急速に父方染色体からのみ、Ube3a 遺伝子座全体にわたってアンチセンス RNA の発現が急上昇することが確認された。

今後の方向性は、このアンチセンス鎖転写がエピジェネティックな変化を伴うのか、また、アンチセンス転写の発現を強制的に変えることにより Ube3a 遺伝子自体の発現様式を変えることができるのかなど、Angelman 症候群疾患原因究明へつながる解析が可能である。

2. 3. 2. 3. 1. 8. マイクロアレイデータのビューワー化

マイクロアレイの発現データやゲノムメチル化のデータを各 SAT 遺伝子対、サンプルの種類ごとにセンス鎖とアンチセンス鎖の発現比較が一目で判明するようなビューワーを製作した。主にベンチで実験をする研究者を対象としている (図9)。

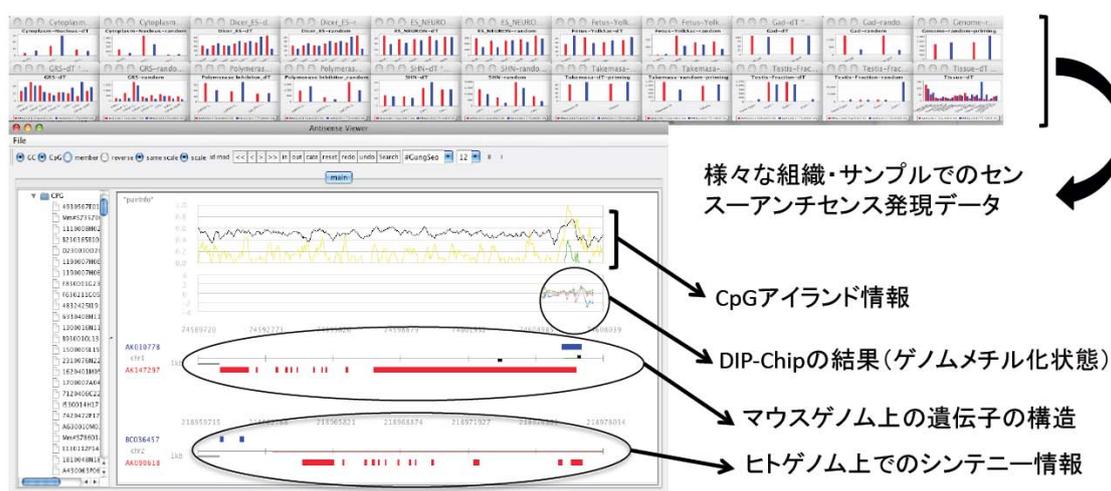


図9 アンチセンスビューワーのスクリーンショット

マイクロアレイ上の SAT 遺伝子座及び AFAS 配列の発現情報とゲノム上での SAT 遺伝子の構造、ゲノムメチル化データの情報がまとめられている。棒グラフではセンス鎖 (青色) アンチセンス鎖 (赤色) の様々なサンプルでのセンス/アンチセンス発現比が一目で判明できる。

各個人の PC 上で (スタンドアローンで) Java で動くように設計されているため PC の OS は問わない。現時点では共同研究ベースでいつでも提供可能である。機能を省略化した雛形バージョンのビューワーは論文発表済みで、以下のサイトで閲覧が可能である。

<http://www.brc.riken.jp/archives/Kiyosawa/HMG08/>

http://www.brc.riken.jp/archives/Kiyosawa/BMC_Genomics09/

2. 3. 2. 3. 2. まとめ

本プロジェクトの研究において、情報科学的なアプローチで網羅的に内在性アンチセンス RNA を同定し、それら情報をもとにマイクロアレイを作製し、実際の組織において数千対にも及ぶアンチセンス RNA が実際に組織、細胞内で発現していることを証明した。

また、ヒト・マウスの両方における解析を行うことにより、両種で保存されたアンチセンス RNA を同定した。異なる種間における保存性は機能性解析への第一歩となるデータである。

人工的にアンチセンス鎖を同定するプローブ (AFAS プローブ) を設定し、ラベル法に random プライミング法を用いることにより、今までゲノム・cDNA データによっては検出されないアンチセンス RNA を検出することに成功し、アンチセンス転写がゲノムレベルで普遍的におきていることをしめし、更にこれら AFAS プローブで検出される新規アンチセンス RNA にも疾患特異的は発現をするものが数多く存在することを証明した。

アンチセンス転写とゲノムメチル化の相関を解析するため、SAT 遺伝子座近傍のゲノムメチル化のデータを取得し、相関のある遺伝子座を同定した。

SAT 遺伝子の発現情報、ゲノムメチル化情報の可視化のためのビューワー、及びデータ解析の基盤となる情報科学的な解析手法を確立した。

内在性のアンチセンス RNA の網羅的な発現解析の後にはいくつかの SAT 遺伝子座において個々の遺伝子座におけるアンチセンス RNA 機能解析が望まれるが、内在性のアンチセンス RNA の多くは cDNA として単離された形で細胞内に存在していないことも多く、ポリ鎖の無い RNA の場合も多い。その為、転写単位の同定が難しく、機能解析を行うには遺伝子座ごとの詳細な転写単位の同定から行う必要があることも判明した。

その為、本プロジェクト期間内ではアンチセンス転写そのものの特徴、及び新規アンチセンス RNA の発見、その中でも疾患特異的なアンチセンス RNA の同定など、トランスクリプトーム解析を主とした。

特定の遺伝子座 (Ube3a 遺伝子座) において、アンチセンス RNA とセンス鎖遺伝子のエピジェネティックな発現制御の関連を示唆するデータを得た。

新規アンチセンス RNA 同定自体のプラットフォーム、方法などは確立したので、今後希望の疾患及び様々な生命現状を対象としたアンチセンス RNA の同定が可能となった。我々の開発したプラットフォームは既にマイクロアレイ解析受託会社にライセンスされている。このプラットフォームを利用した場合のデータのビューワー化も可能である。

IV. 実用化の見通しについて

研究開発項目①「機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」

①-1 「機能性 RNA に特化したバイオインフォマティクス技術の開発」で開発された 2 次構造を考慮した RNA 配列情報解析技術を用いたソフトウェアは、今後の核酸医薬開発に大きな力を発揮するものと期待される。特に、動的計画法を駆使したソフトウェアによって、核酸分子間の相互作用とその位置の予測精度が向上するため、既に核酸医薬の開発に協力している。また、正確な 2 次構造予測が可能となったことにより、2 次構造予測に基づく立体構造解析が可能となりつつあり、タンパク質との相互作用も含む創薬研究が加速されることが期待される。

①-2 「ゲノム配列からの機能性 RNA の網羅的予測」で開発された予測機能性 RNA のカスタムマイクロアレイ（日立ソフトエンジニアリング(株)）は、今後 RNA 創薬のための解析ツールとして価値があり、新規技術による改良を加えながら、商品化の方向を検討する予定である。

①-3 「機能性 RNA データベースの構築」で開発された機能性 RNA データベースは、単に機能性 RNA だけでなく、ゲノム中の様々な因子を網羅的に解析するための情報基盤として機能しており、①-1 で開発された情報解析技術と組み合わせて、エピゲノム解析、個人ゲノム解析などに活用することが可能である。

研究開発項目②「機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発」

②-1 「RNA のマススペクトロメトリー法の開発」で開発された RNA マススペクトロメトリー（RNA-MS）は cDNA 解析に頼らない全く新しい RNA の解析技術であり、機能性 RNA の基礎研究のみならず、核酸医薬の品質管理や薬物動態にも十分に応用可能な技術として応用可能な手法である（東大）。RNA-MS デコンボリューション（東大著作物登録）、CID チェッカー（国際出願）、RNA マスフィンガープリント法（国内出願）、往復循環クロマトグラフィー（国際出願）など主要な関連技術を確認しており、国内の企業を中心に技術移転を進めていく予定である。特に MS メーカー、製薬企業、臨床試験受託機関との連携を予定している。

②-2 「機能性 RNA の高感度検出システムの開発」では、多重伸長反応（MPEX）法や光化学反応法を利用した新規の手法を開発した。MPEX 法に関しては miRNA をプロファイリングするためのマイクロアレイを開発し商品化へのめどをつけた（DNA チップ研）。

③-3 「RNA の新規合成基盤技術開発と化学分子設計」では、「CEM アミダイト合成法の確立」により原料アミダイトの大量合成が可能となり、世界最長の RNA の合成に成功し、H19 年度より CEM 法による研究用試薬としての RNA 合成事業を開始した。さらに、核酸医薬品の原料合成を目指して、グラムスケールでの核酸製造法を確立し、核酸製造メーカーに対して新規 RNA 合成法の技術移管を行った。今後 CEM 法は、長鎖 RNA の世界的な標準合成法の一つとなること

が期待できる（日本新薬）。長鎖 RNA、修飾 RNA の需要は、世界の RNA 研究が進展するにつれて年々増加しており、試薬、診断薬、および核酸医薬品への利用が考えられる。これらの成果は、核酸を医薬品として応用する上での基盤技術として産業発展に役立つものと考えている。

研究開発項目③「機能性 RNA の機能解析」

③-1 「ヒト疾患に関連する機能性 RNA の迅速で高効率な同定」では、腫瘍増殖抑制活性を示す miRNA を複数見出しており、核酸医薬として先行する siRNA で開発されつつあるリポソームをはじめとする各種のデリバリー技術を用いて、全身投与で有効な抗癌剤への展開ができると期待される。マスト細胞の脱顆粒を制御することを見出した miRNA については、免疫・アレルギー分野の治療薬としての応用が考えられる。この分野もデリバリーは重要であるが、喘息であれば吸入剤、アトピー性皮膚炎であれば塗布剤としての開発も考えられ、全身投与を目指す抗癌剤等に比べると局所投与で済むこれらの薬剤の方がハードルは低い可能性もある。脱顆粒の促進に関与する miR-F については、抑制剤としての開発が考えられるが、これについてはまもなく完成するノックアウトマウスの表現型を見て実用化の可能性を見極めていきたい。（協和発酵キリン）

本研究から、マウス、ヒト共に ES 細胞で特異的に発現する miRNA 群の一部が iPS 細胞の樹立効率の上昇に関与していることがわかった。医薬品としてではないが、miRNA を iPS 細胞の樹立効率の改善や、既に報告されている初期化因子の代替として用いることが可能となれば、ゲノム DNA を傷つけることなく、必要な時期に一過性に発現させることによって、より高い多能性をもった良質な iPS 細胞を作成する一つの方法として用いることができると期待される。本研究で、miRNA の発現プロファイリングと ES/iPS 細胞の性質との関連性を示すことができた。通常の遺伝子発現、ジェネティクス、エピジェネティクスと合わせて、miRNA の発現プロファイリングも iPS 細胞の質の判定基準の一つとして有用であることが期待される。（京都大）

③-2 「機能性 RNA に関する基盤的知見の獲得とそれを基にした機能性」では、疾患と接点を持つ長鎖 ncRNA が見いだされた。まず第一に核内構造体形成を行う MENε/β ncRNA と共にパラスペックル構造を形成するタンパク質の中には、10 種類の疾患関連タンパク質が含まれている。多くのものは、癌、白血病の原因となるものであり、その他に神経変性疾患、精神疾患、生殖器系の疾患などユニークなものも含まれている。そのうちの一つは、昨年家族性の神経変性疾患の原因遺伝子として同定された因子であり、この因子が MENε/β ncRNA と共にパラスペックル構造構築に関わっていることが、この因子の RNA 干渉実験や ncRNA との共発現実験によって明らかにされている。U7 snRNA と相互作用しヒストン遺伝子の発現抑制を行っている U7BP1 の遺伝子 SNP は、冠動脈新疾患や突発性心筋梗塞のリスクと相関があることが示されている。また U7BP1 は、アデノウィルスの E1B 55kDa と相互作用しウィルス遺伝子の発現を促進していることも示されている。これらの RNA の

機能を人為的に制御する可能性を検討すべき点であると考えている。（産総研）

また数多くの組織特異的 ncRNA の中から個別解析した Hep-ncR1 は、肝臓特異的な ncRNA であるが、この発現は肝細胞癌組織ではほぼ完全にサイレンシングされることが示された。特に新潟大学医学部との共同研究で、様々な悪性度の肝細胞癌サンプルを用いて発現解析を行ったところ、極めて初期の癌組織において発現低下が起こっていることが明らかになった。よって肝細胞癌の診断マーカーとして有望な RNA 分子であると考えられる。（産総研）

また本研究において、人工的にアンチセンス鎖を同定するプローブ（AFAS プローブ）を設定し、ラベル法に random プライミング法を用いることにより、今までゲノム・cDNA データによっては検出されないアンチセンス RNA を検出することに成功し、これら AFAS プローブで検出される新規アンチセンス RNA に疾患特異的は発現をするものが数多く存在することを証明した。開発した AFAS プローブは既にマイクロアレイ解析受託会社にライセンスされている。（理研）

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日
産業技術環境局
製造産業局

1. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス利活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等をとりとまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

¹ 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく in silico スクリーニング手法を確立する。

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発 (運営費交付金)

①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金)

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (運営費交付金)

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される iPS 細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、iPS 細胞に関連した産業応用事例創出の促進を行う。

②技術目標及び達成時期

2013年度までに、安全で効率的なiPS細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となるiPS等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平成17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

II. 再生医療

II-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフリー型再生デバイス及び自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

III. 医療機器

III-1. 医療機器の開発

(1) がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

① 概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能なより早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

② 技術目標及び到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

③ 研究開発期間

2010年度～2014年度

(うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度)

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

②技術目標及び達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性及び機械的・電気的・生物学的な安全性の評価を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

Ⅲ－2. 医療機器の開発に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

③研究開発期間

2008年度～2010年度

Ⅳ. 福祉機器

Ⅳ－1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費

用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個

人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

[産業間連携]

- ・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。
- ・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。
- ・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。

[プロジェクト等間の連携について]

- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。
- ・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。
- ・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

[関係機関との連携]

- ・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

[その他]

・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したものは、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

- (1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。
- (2) 平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。
- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム（平成12・12・27工総第13号）は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成14・02・25産局第4号）は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成14・02・05産局第2号）は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成15・01・23産局第4号）及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成15・03・07産局第17号）は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成16・02・03産局第12号）は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成17・03・25産局第1号）は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成18・03・31産局第2号）は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成19・03・20産局第5号）は、廃止。

- (11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成20・03・25産局第6号）は廃止。
- (12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成21・03・26産局第3号）は廃止。

(健康安心イノベーションプログラム)
「機能性 RNA プロジェクト」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現し、個の医療を通じた健康寿命の延伸、生活の質の向上を図り、今後、成果に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現をめざすことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

Non-coding RNA (ncRNA : 非コード RNA) は、タンパク質をコードする mRNA 以外の RNA の総称である。細胞内に存在する全転写産物には相当量の ncRNA が存在することが推測されており、細胞機能を理解する上でそれらの機能解析は欠くことのできない重要課題である。昨今、このように機能を有すると推定される ncRNA、即ち、機能性 RNA による遺伝子発現調節機構が生命の発生や細胞の分化に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。したがって、生体における機能性 RNA の機能を解析し、その機能の抑制や促進による生体応答を総合的に把握する基盤研究をさらに強力に進めることは、再生医療や疾患治療等の実現に資する重要な課題である。

本プロジェクトにおいては、バイオインフォマティクスの活用による機能性 RNA を推定する技術の開発、機能性 RNA 解析のための新たな支援技術・ツールの開発、及び機能性 RNA の機能解析を実施する。これらを通して、その遺伝子発現調節機構を明らかにすることにより、細胞分化誘導因子、遺伝子発現抑制因子、タンパク質翻訳調節因子等の機能を持った機能性 RNA を同定し、成果をすばやく特許化することにより、バイオの新たな基盤形成を目指す。これにより、再生医療や RNA 医療、遺伝子治療、疾患治療等、産業応用の促進、新産業の創出が期待される。また同時に、機能性 RNA を解析する手法及びツールの開発により、機能性 RNA 解析研究を飛躍的に進めることで、本分野における我が国の優位性の確立を目指す。

(2) 研究開発の目標

(最終目標：平成 21 年度)

機能性 RNA 候補をゲノム上から推測するバイオインフォマティクス技術を確立する。また、機能性 RNA を高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい方法、手法の確立と、機能性 RNA をゲノムワイドに解析するためのツールを確立する。これらのツールを活用して、機能性 RNA の機能解明に取り組む。また、ヒト疾患に関連する機能性 RNA 及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性 RNA 候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

(中間目標：平成 19 年度)

二次構造、機能を有する RNA 配列を推測する。機能性 RNA の分子機構の発現に必須の因子を同定するとともに、必要な実験系の確立を行う。また、疾患関連等の細胞をターゲットに機能解析を行

うことができる実験系を確立する。

(3) 研究開発の内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

- ① 機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発
- ② 機能性 RNA 解析のための支援技術・ツールの開発
- ③ 機能性 RNA の機能の解明

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

本研究開発は、平成17年度に経済産業省産業技術環境局研究開発課及び製造産業局生物化学産業課において基本計画を策定し事業を実施したが、平成18年度以降は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下「NEDO技術開発機構」という）において委託して実施する。「委託契約事務の取扱いに関する機構達（平成15年機構達第8号）第14条 公募によらない場合の適用基準」に基づき、NEDO技術開発機構において公募による研究開発実施者の選定は行わない。

また、独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 研究技術統括 渡辺公綱氏を研究開発責任者（以下「プロジェクトリーダー」という）とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に1回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の期間は、平成17年度から平成21年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDOは、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成19年度に、事後評価を平成22年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じ、プロジェクトの加速、縮小、中止等見通しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係わる技術動向、政策動向や当該研究開発の推進状況等に応じて、前倒しする等、適宜見

直するものとする。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

①共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、実施者において普及に努めるものとする。

(a) 機能性 RNA の探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術

(b) 機能性 RNA 解析のための支援技術・ツール

(c) 機能性 RNA の機能の解明に係る技術

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発成果については、知的基盤整備又は標準化との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報 (TR) 制度への提案等に努めることとする。

③知的所有権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第 25 条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④成果の産業化

a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを立案するとともに、立案した取り組みのあり方とビジネスモデルについて、研究開発の進捗等を考慮して、本研究開発期間中に必要な見直しを行う。

b) 受託者は、上記 a) で立案した取り組みとビジネスモデルを本研究開発終了後、実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

NEDO技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 15 条第 1 項 2 号に基づき実施する。

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)等、研究開発関連の指針を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成 16・12・24 製局第 1 号)を厳守しな

ければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成18年3月制定。ただし、本事業は、平成17年度に経済産業省の直轄事業として開始され、経済産業省において基本計画が策定されている。
- (2) 平成20年6月、[イノベーションプログラム基本計画の制定により、「\(1\) 研究開発の目的」の記載を改訂](#)。また、人事異動に伴いプロジェクトリーダーの所属・役職を改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」

1. 研究計画の必要性

膨大な塩基配列データから、機能を持つRNA配列部分をすべて実験によって発見することは困難であるため、ゲノム配列・cDNA配列などから機能性RNAを網羅的に発見する情報技術が必要である。また、配列類似性と同時に二次構造が重要な機能性RNAの情報解析には、既存の配列相同性解析だけでは不十分であり、機能性RNAに特化したバイオインフォマティクスの研究開発が必要である。さらに、本プロジェクト等で得られた情報を広く一般に効果的に活用するために、そのデータベースを構築することが必要である。

2. 研究開発の具体的内容

機能性RNA配列を予測するバイオインフォマティクス手法の開発を実施する。また、このような技術等を活用し、ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的な予測を行い、さらに機能性RNAのデータベースを構築する。

(1) 機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術の開発

二次構造の類似性を考慮できるRNA配列に特化した、配列比較・検索手法を開発する。また、RNA配列の整列、配列群からの二次構造予測、機能推定を行う情報技術を開発する。また、機能性RNAをターゲットとするマイクロアレイ情報の解析技術を開発する。

(2) ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的予測

機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術を活用し、ゲノム配列全体から機能性RNAを網羅的に予測する。

(3) 機能性RNAデータベースの構築

機能性RNAデータを広く一般に効果的に活用するため、機能性RNAデータベースを構築する。

3. 達成目標

(中間目標：平成19年度)

ゲノム配列から機能性RNAを網羅的に検出するバイオインフォマティクス技術を確立する。機能性RNAの機能を予測するための情報技術を開発する。

(最終目標：平成21年度)

バイオインフォマティクス技術を活用して新規の機能性RNA候補を網羅的に予測し、機能性RNAデータベースを構築する。

研究開発項目②「機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発」

1. 研究開発の必要性

現在、機能性RNAを単離、精製して *in vitro* 実験で解析する手法・ツールは、開発されつつあるが、感度面と安定性において課題が残っている。特に機能性RNAは発現が極微量でありながら、発生や分化などの生命現象で重要な機能を持つことが知られており、機能性RNAの発現量や発現変動を捉えるためには高感度なバイオツール開発が不可欠である。さらに、機能性RNA解析を加速するため、*in vitro* 実験においてハイスループットに解析する手法・ツール開発が必要である。

2. 研究開発の具体的内容

機能性RNAをハイスループットに、網羅的に、かつ定量的に再現性をもって解析できるバイオツールの開発を行う。また、発生・分化・疾患等により変動する機能性RNAの発現変動を網羅的に解析する技術の開発を行う。さらに、RNAはタンパク質と比較して更に微量であるため、測定を極限まで高感度化をはかることで、細胞から抽出した超微量な機能性RNAを高感度で直接測定する技術・手法を開発する。

3. 達成目標

(中間目標：平成19年度)

機能性RNAを網羅的に、かつ定量的に再現性をもって解析できるバイオツールの開発。

(最終目標：平成21年度)

機能性RNAをハイスループット、高感度、網羅的に解析できるバイオツールを開発する。また、超微量な機能性RNAを高感度(サブフェムトモルオーダー)で直接測定することが可能な方法・手法等の開発。

研究開発項目③「機能性RNAの機能解析」

1. 研究開発の必要性

種々の機能性RNAが、どの遺伝子を標的として、どういった機構で作用することによって発現制御を行っているか、また、機能性RNA自身の発現・機能調節はどの様に行われているか、等に関する知見は極めて少ないのが現状であり、これらの機能性RNAに関する発現・機能制御機構の解明が非常に重要となっている。さらに、疾患に関連した機能性RNAを同定、解析し、診断マーカーとしての展開、及び疾患治療や再生医療等を目指した医薬品の開発基盤を確立することも必要である。

2. 研究開発の内容

ヒト疾患に関連する機能性RNAの同定とその機能解析、機能性RNAの作用機序の解明、また発生・分化など重要な働きを示す機能性RNAの同定とその機能解析を行う。

(1) ヒト疾患に関連する機能性RNAの同定とその機能解析

ヒト疾患に関連する機能性RNA候補を選抜し、疾患細胞株、疾患モデル動物等での評価を実施し、疾患で変異あるいは発現変動が見られる機能性RNAを同定する。これらの各種疾患関連機能性RNAに対して、*in vitro*、及び*in vivo*系で各種解析手法を駆使して機能解析を行う。特定された機能性RNAについては、核酸関連低分子化合物等を用いて機能性RNAの発現・機能を制御するための研究開発を行う。

(2) 発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す機能性RNAの同定とその機能解析

発生・分化等におけるダイナミックな機能性RNAの発現変動解析、同定を行い、新規な機能を有する機能性RNAの発見を目指す。さらに機能性RNAの生体細胞内での生合成経路、局在、結合パートナーの同定を通して、機能性RNAの機能を解明し、その機能を人為的に制御するシステムを構築する。

3. 達成目標

(中間目標：平成19年度)

数十個～百個程度の機能性RNA候補を取得する。それらの機能解析のための*in vitro*、及び*in vivo*系で各種解析手法を確立し、有用かつ重要な機能性RNAの発見と機能解析を行う。

(最終目標：平成21年度)

ヒト疾患に関連する機能性RNA及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性RNA候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

創薬・診断分野

健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上は世界全体の願いであり、特に、今後、少子高齢化が他国に先駆けて進行する日本にとっては、喫緊の課題である。このために創薬・診断分野では、①「疾患の早期診断」、「適切な治療法の提供」によって、より良い医療サービスを提供していくとともに、②「予防医療による健康維持増進」によって、治療から予防へと転換し、より個人に適切に対応する「個の医療」を実現することを目指す。また、これらの手段の進展に伴い、健康産業のプレーヤー及び市場の拡大が見込まれる。

創薬・診断分野の目標実現に向けた各般の取組みを進めるため、導入シナリオ、技術マップ、技術ロードマップからなる技術戦略マップを策定する。導入シナリオは関連施策を含む、当該分野の全体像をまとめたものであり、技術マップ、技術ロードマップは以下に示す技術の観点から策定されている。

- ・ 治療にあたっての医薬品開発、疾患の早期発見及び個人の遺伝情報等に合わせた医薬品の投与を可能とする診断技術
- ・ 医療関連分野において共通基盤となるポストゲノム研究に係る知見・技術

また、技術戦略マップの策定にあたっては、医薬品の開発・上市には長期間を要することを踏まえて、今後 20 年間程度を見据えたものとする。

創薬・診断分野の技術戦略マップ

I. 導入シナリオ

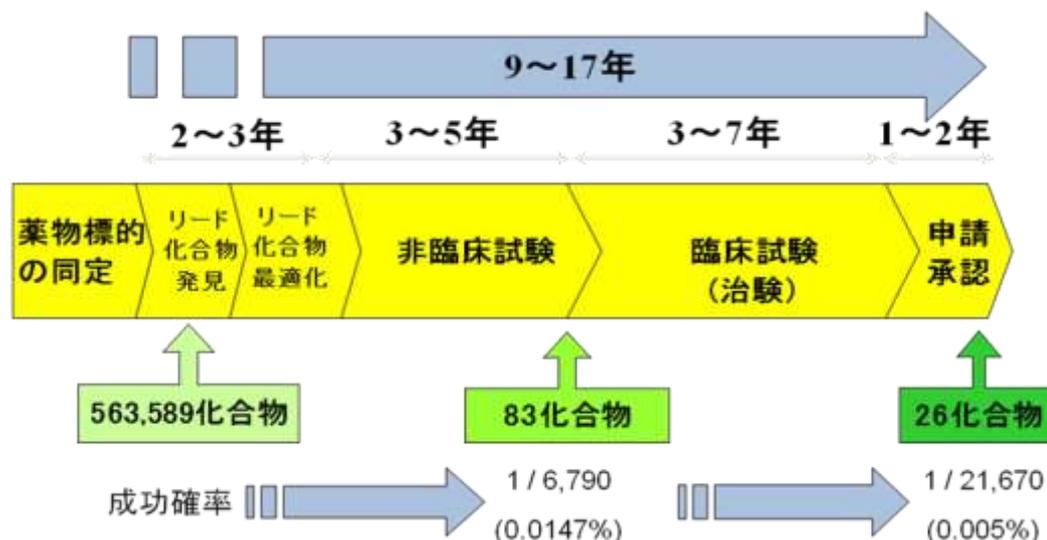
(1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像

今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは、喫緊の課題である。そのために創薬・診断分野が果たす役割は大きい。具体的には、①疾患を予防することによる健康維持増進、②疾患の早期診断・早期治療による迅速な社会復帰、③適切な治療法の提供による個々の医療の実現を通じて健康寿命の延伸、QOLの向上を図るとともに、本分野における関連産業の国際競争力強化を目指す。

(2) 研究開発の取組み

現在の創薬プロセスにおいては、1つの医薬品が製品化されるまでに9～17年程度の期間及び500億円を超える開発費が必要であるといわれている。研究開発費のうちの7割強は臨床試験までに投入されている。

図1 新薬開発の特質 (03年～07年の例)



出典：てきすとぶっく 製薬産業 2009

また、臨床試験開始後の成功確立が減少傾向にあることから、製薬企業における研究開発費の総額は増大し、創薬におけるR&Dリスクはますます高まる傾向にある。

我が国の企業の研究開発投資は、欧米と比べると規模で劣る。例えば全世界・日本の製薬企業の研究開発投資トップ5社を比べると、研究開発費・売上高ともに、規模の格差が顕著である。また、政府の研究開発規模も10倍近くの差がある。

一方で、このような状況下、売上高は必ずしも多くないが、医薬品の世界売り上げランキング50位以内に日本オリジンの医薬品が9品目入っており、差別化された領域

での強みが伺われる。

図2：全世界・日本の製薬企業トップ5社の比較

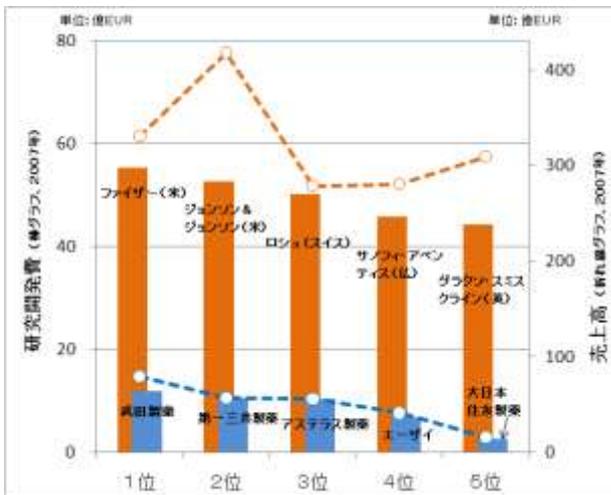
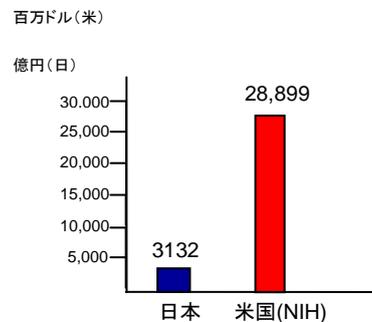


図3：政府における研究開発費の日米比較(2007年)



(出典) NIHホームページ、総合科学技術会議ライフサイエンスPTより経済産業省作成

(出典) European Commission The 2008 EU Industrial R&D Investment Scoreboard より経済産業省

また、バイオベンチャーは他分野ベンチャー企業以上に重要な役割を担うところであるが、企業数、ベンチャーキャピタルからの投資額、開発起源企業別にみたバイオ医薬品数において我が国のバイオベンチャーは、欧米との比較において未成熟といえる。

このため、我が国が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくためには、基礎研究の成果を迅速に臨床に橋渡ししていくことを含め、産業界のニーズや我が国の強みを踏まえつつ、創薬プロセスにおける初期段階で成功率を高める研究開発に政府予算を投資していくことが重要である。

このような状況の中、経済産業省においては、ポストゲノム研究等により進展してきている遺伝子やタンパク質、糖鎖、RNA等の生体分子の機能・構造・ネットワーク解析やそれら研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に活用するためのデータベース整備等を行うことにより、個々人に適切に対応した医療、予防医療の実現や画期的な新薬の開発、健康維持・増進に係る新しい産業の創出に係る取組を行ってきたところである。また、文部科学省、厚生労働省、経済産業省における創薬分野の関連予算を俯瞰した図を【参考資料 1：平成 20 年度→21 年度医薬品研究俯瞰図】に示す。

また、日本製薬工業会が「革新的創薬等のための官民対話」において平成21年度重点化施策として「安全性バイオマーカー」や「疾患の進行度や治療効果の度合いを示すバイオマーカーの探索」を基礎研究領域として提言しているように、これまでのプロジェクト等により定量・同定されたバイオマーカーデータの生物学的意味づけと検証が今後重要となってくることがうかがえる。

(3) 関連施策の取組み

創薬・診断分野における将来像を実現するためには、研究開発のみならず、開発の迅速化や成果普及につながる制度整備、標準化等の関連施策を一体的に推進する必要がある。このため、政府関係機関において以下の取組がなされている。

[起業・事業支援]

- ・ バイオベンチャーの抱える諸問題に対し、「革新的創薬等のための官民対話」ベンチャーWG等の場を通じた取組。
- ・ 「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等の実施。

[導入補助・支援]

- ・ 個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用
- ・ バイオインダストリー安全対策調査の実施
- ・ バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究の実施

[ガイドライン整備]

- ・ 検体の品質管理マニュアル(JCCLS)、テーラーメイド医療用診断機器(DNAチップ)ガイドラインの積極的活用。
- ・ 「分子遺伝学的検査における精度保証に関するガイドライン」(OECD)に準拠した日本版ガイドラインの策定と積極的活用。

[規制・制度改革・他省庁との連携]

- ・ 総合科学技術会議が推進するライフサイエンスPT、革新的技術戦略、社会還元プロジェクト、iPS(induced pluripotent stem cell)細胞研究WGの下での関係府省間における適切な連携の実施。
- ・ 内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間で2009年2月に改訂した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」に基づき、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価など、本分野における研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援の実施。【参考資料2-1：革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略の概要】
- ・ 「革新的創薬等のための官民対話」の場を通じ、医薬品分野のイノベーション創出と産業の国際競争力強化に係る諸施策の方向性に対する製薬業界、教育・研究機関、行政(内閣府、文部科学省、厚生労働省、経済産業省)のトップの認識の共有化。
- ・ 2008年7月22日に設置された「健康研究推進会議」による、先端医療開発特区(スーパー特区)制度の推進と各省が実施している臨床研究や橋渡し研究を一体的に運用していくための司令塔機能の発揮。【参考資料2-2：平成21年度健康研究関係施策額】

〔基準・標準化〕

- ・ バイオチップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化活動の推進。

〔知的基盤整備〕

- ・ 研究開発の企画段階から研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施や研究開発の実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組の実施をサポート。

〔特許化〕

- ・ 特許庁は、2008年10月より現行の早期審査よりも更に早期に審査を行う「スーパー早期審査制度」を創設、早期の事業化を目指す発明やライフサイクルが短い発明への早期審査のニーズを充足させるべく制度を構築。

（４）海外での取組み

米国では、NIHにおける約3兆円の研究開発予算のうち、83%が大学や病院といった外部研究に充当され、10%がNIH クリニカルセンターなどの内部研究に充てられている。また、NIHにおける生物医療学研究を推進するため、NIHに属する27研究所全体として取り組むべき研究分野を見極めることを目的にNIHロードマップを2003年9月に作成している。

NIHロードマップでは以下の主要テーマについて取組が行われている。

①New Pathways to Discovery :

生体メカニズムの理解を主眼とした細胞や組織を構成する生体分子のネットワーク、分子イメージング、構造生物学、バイオインフォマティクス、ナノ医療等に係る研究開発。

②Research Team of the Future

専門分野を越えた学際的研究を行うチーム、新しい組織モデルの検討。

③Re-Engineering the Clinical Research Enterprise

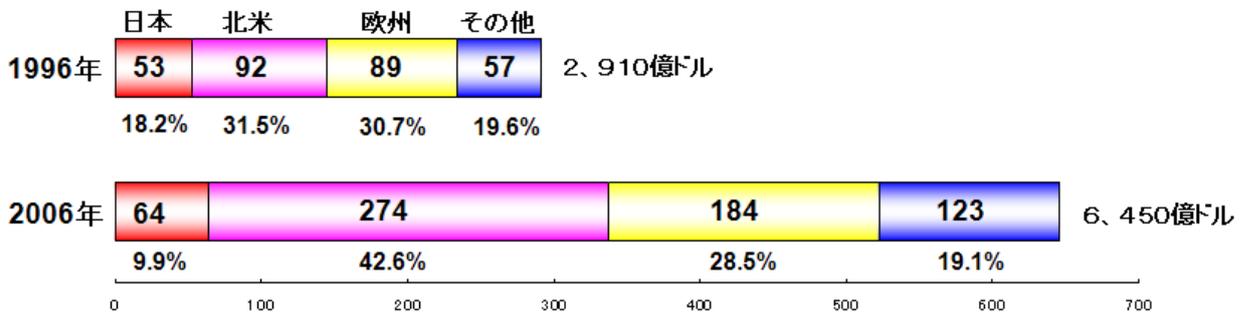
研究上の発見や諸成果を迅速に臨床現場に展開するためのシステム構築。

欧州では、科学技術に関する総合的なプログラム（Framework Programme）を3～4年単位で実施している。2006年12月には2007年～2013年の取組を示したFP7が策定・開始されている。FP7においては欧州レベルでの官民パートナーシップを実現化する新たな手法として共同研究イニシアチブが取り組まれており、6領域のイニシアチブの1つとして「革新的医薬品イニシアチブ」が展開されている。当該イニシアチブではアンメットメディカルニーズを含む医療領域に研究成果の迅速な橋渡しを促進する仕組みを構築することを狙いとしている。

（５）民間での取組み

過去10年で世界の医薬品市場はおおよそ倍近く拡大しているが、日本市場の伸びは2割程度にとどまり、結果として日本が占める割合は半減している。

図 4 世界の医薬品市場の推移



出典：「革新的創薬等のための官民対話」資料（IMS Health, IMS World Review 1998 2007）

こうした中、経営基盤の強化を図るため、企業間の再編や外部リソースの活用が進んでいる。

表 1：近年の再編動向（国内）

統合年	主たる企業名
2005年	・アステラス製薬（山之内製薬、藤沢薬品工業） ・大日本住友製薬（大日本製薬、住友製薬）
2007年	・第一三共（三共、第一製薬） ・田辺三菱製薬（田辺製薬、三菱ウェルファーマ）
2008年	・協和発酵キリン（協和発酵、キリンファーマ）

外部リソースの活用は経営基盤の強化を図ることに止まらず、企業にとってこれまで研究が立ち後れていた有用技術の早期導入に役立っているケースもあり、技術が国境を越える一つの契機にもなっている。

また、主要薬が相次いで特許切れになる「2010年問題」を見据え、米国企業を中心とした大規模な買収・合併の動きが加速していることも、今後の企業における研究開発に影響を与えることが予想される。

表 2：国境を越えた組織再編・技術提携

公表時期	内容
2008年5月	武田薬品工業がミレニアム・ファーマシューティカルズ社（米）を88億ドルで買収
2008年9月	ベーリンガーインゲルハイム（独）と北海道大学発ベンチャー、イーベックが5,500万ユーロで抗体作成技術のライセンス契約を締結
2009年1月	ファイザー（米）がワイス（米）を680億ドルで買収
2009年3月	メルク（米）がシェリング・プラウ（米）を411億ドルで買収
2009年3月	ロシュ（スイス）がジェネンティック（米）を468億ドルで買収

なお、iPS細胞研究をめぐる新しい動きとして、2008年7月に、京都大学をはじめ

とする iPS 細胞研究成果の産業界への円滑な移転を促進するため、「有限責任中間法人 iPS ホールディングス」が京都大学及び金融機関 3 社により設立された。

このほか、日本製薬工業会において、2008 年 11 月から活動期間 1 年として、iPS 細胞関連技術を研究する大学など各研究機関の知財戦略構築・遂行を支援するプロジェクトを開始している。

診断関連市場としては、2017 年には医療分野において 1 兆 3,000 億円、健康管理・予防分野において 1,500 億円の市場規模が見込まれる。特に医療分野では今後 10 年で 2,000 億円の伸びが見込まれ、製薬企業と素材・分析機器メーカー等の診断技術開発企業との連携、制度整備、標準化等のさらなる取組が重要となっている。

こうした中、診断ツールとして大きな役割を担う DNA チップをはじめとするバイオチップの標準化を推進することにより、バイオチップ関連の産業化の促進及び市場の創生を目的としたバイオチップコンソーシアムが 2007 年 10 月に設立され、国内連携を軸に DNA チップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化の取り組みを開始した。

(6) 改訂のポイント

- 世界・日本の製薬会社のトップ5の比較、政府における研究開発費の日米比較、世界の医薬品市場の推移のベンチマーク等を策定、変更した。
- 民間での取組みに、京都大学が中心となって設立した「有限責任会社 iPS ホールディングス」の記述を挿入した。
- 関連施策として、「健康研究推進会議」及び「先端医療特区」の記述を追加した。
- 導入シナリオに新規プロジェクトを追加した。

II. 技術マップ

(1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、病気になった場合に早期に健康状態に戻れること、そして、そもそも病気にならず健康であり続けることに大きく二分される。この 2 つのニーズに対応するためには、副作用の少ない最適な医薬品の提供を可能とするとともに、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、各人において日々の健康管理を行える環境の整備が重要となっている。

このため、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造（治療から予防への転換）」を研究開発の柱として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰した。

① より良い医薬品の開発・提供

個々人の病態や遺伝的背景に応じて薬剤を選択することを可能とするためには、画期的な医薬品の開発を促進し、薬剤の母数を拡大することが重要であり、このためには、疾患メカニズムを踏まえ、医薬品のターゲットとなるタンパク質、糖鎖、RNA 等

の生体分子を探索・特定し、これを医薬品としていち早く市場化することが必要である。また、薬効や副作用の大小は個々人により異なるため、多数の医薬品の中から個々人に応じた最適な医薬品の選択・処方が求められている。このため、技術マップでは、画期的な医薬品開発のための技術課題と医薬品の最適な使用のための技術課題に分け、前者については、医薬品の種類と医薬品開発プロセスという軸から技術課題を整理している。

なお、疾患と医薬品との関係については、がんやその他の疾患を見ても、その疾患メカニズムはある特定の疾患の中でも異なっており、また治療用のターゲットが複数存在することから、開発過程において、それぞれの疾患に対し固有の医薬品形態にとられない複数のアプローチが取られている。

② 健康産業の創造

病気を予防するためには、自らの罹患リスクを遺伝的に認識した上で、日々の健康管理を行える環境の整備が必要であり、このための技術課題を整理している。さらに、バイオマーカーに着目し、当該技術より可能な予防及び超早期診断による健康維持のあり方について深化して検討を行い、技術マップを整理している。

また、①、②の戦略を推進するうえで重要となる「ゲノム情報等をベースとした新規診断技術」のビジネスモデルを【参考資料3】に示す。このビジネスモデルから以下の点が見込まれる。

- 現在の臨床現場における利用は治療に比べて相対的に保険点数が低いものの、健康産業を含む公的保険以外の自己負担、民間保険、雇用主負担等でカバーするエリアでの展開は有望である。
- 医薬品開発におけるファーマコゲノミクスの進展により、医薬品と診断法の一体化開発や臨床現場での薬物療法における投薬前診断分野における市場の成長性が期待できる状況である（ただし、この分野では診断技術を提供する企業と製薬企業との密な協業が必要）。

(2) 重要技術の考え方

この分野の具体的目標である

- ・ 画期的な医薬品をより早く効率的に提供することにより、優れた治療法を提供する。
- ・ 個の医療を支える薬剤のバラエティを拡大し、幅広い選択肢を提供する。
- ・ 個々人の特性・病態に合わせた最適な医療を実現する。
- ・ 疾患・罹患リスクの把握とこれに対応した予防・早期診断による適切な健康管理を実現する。

を踏まえて、下記の観点から重要技術を抽出し、技術マップに示している。

なお、我が国発の技術として脚光を浴びているヒト iPS 細胞については、再生医療分野だけでなく、創薬分野においても「健常人 iPS 細胞に由来する健常モデル細胞（心筋細胞、肝細胞など）を用いた毒性評価」、「患者 iPS 細胞由来の疾患モデル細胞を用

いた創薬スクリーニング」系の構築による創薬プロセスの効率化（成功率の向上やスピードアップ）や疾患メカニズム解明による新規医薬品の創出などに資する重要技術として幅広い観点から期待されており、技術マップ及びロードマップの該当箇所に明示している。また、iPS細胞研究の展開には、これまで取り組んできているES細胞及び体性幹細胞における知見が大いに活用されるものであり、我が国における幹細胞研究全体の加速が期待できる。

① 「画期的な医薬品・診断技術の開発」

創薬シーズの創出、バイオマーカーの探索、疾病状態における細胞内分子状態の把握等、画期的な医薬品及び診断技術の開発のために重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、画期的な医薬品ターゲットや各種診断マーカー探索のために重要となるゲノム、プロテオーム、糖鎖、RNA等の生体分子とこれらの相互作用解析や、研究を支援する研究ツール・機器の開発といった診断・医薬品開発への応用に必要な技術開発が挙げられる。

② 「医薬品開発の効率化」

成功確率の向上、製造コスト低減、開発期間短縮等、医薬品開発の効率化のために重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、医薬品開発の早期段階において毒性や薬剤有効性の評価に利用されるモデル生物系（iPS細胞から構築されるモデル細胞を含む）の構築、細胞ネットワーク解析、バイオマーカーの活用、化合物ライブラリーの充実、ファーマコゲノミクス等が挙げられる。

③ 「QOLの向上」

診断の正確さや早期性・簡便性を向上し、日々の健康状態を把握し、疾病状況に応じた適切な医薬品投与や治療を可能とする技術・機器、また、将来の疾患リスクを予測可能とし、日々の健康状態の把握により疾患を未然に防ぐ技術・機器。

具体的には、遺伝子情報と疾患との関連解明のための研究開発で得られた情報を有効に活用したバイオマーカーの同定、薬剤投与前に医療現場において安価かつ迅速に個人毎の疾患状態を詳細に診断するためのツールの開発と測定データの評価方法の標準化、薬物動態の個人差を考慮した薬効・毒性把握等が挙げられる。

④ 「日本の強みが活かせる技術分野の更なる強化」

日本における研究が進んでいる分野や他分野での技術力を踏まえた分野等、現在及び将来の技術競争力を保持する上で重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、糖鎖、完全長cDNA、iPS細胞作製技術、発酵技術、中間体生産技術、微細加工技術等が挙げられる。

⑤ 「波及効果の高い技術」

他分野への波及も含め、波及効果の高い技術・機器。

具体的には、新たな研究領域として開拓されつつあり、画期的な医薬品開発への寄与が期待される機能性 RNA 等が挙げられる。

(3) 改訂のポイント

- バイオマーカーの利用のうち、バイオチップについて「データの標準化」を追加した。

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

技術マップで抽出された重要技術を中心として作成したロードマップにおいては、個別技術の進展を示すⅢ、「技術進捗」、技術の進展により得られる直接的な効果を上記の重要技術の分類のうち①～③毎に示したⅡ、「具体的効果」、及び、この「具体的効果」がもたらす医療現場における変化をⅠ、「医療現場における進展」として三段階に分けて整理した。

例えば、具体的効果の部分では、①2010 年にはがんの抗体医薬のターゲットがほぼ探索され、2025 年には自己免疫疾患や生活習慣病及び精神・神経疾患等の発症メカニズムがほぼ解明されているなど、種々の疾患に対する分子レベルでの解明が進むとともに、これを活用した医薬品の開発が進展することが予想される。②また、医薬品の臨床時のドロップアウトを低減する、ヒト臨床症状を反映した疾患モデルの作製技術の確立等により、医薬品の成功確率が現在の 5%程度から 2025 年には 50%程度まで向上するなど医薬品の開発効率の向上が予想される。③更に、早期診断・確定診断に有効な疾患マーカー、罹患リスク診断マーカー及び健康モニターマーカーが順次開発され、予防のための環境が整備されるとともに、1 つの診断ツールで複数の薬剤の薬効を評価できるなど 2015～2025 年には個々人の特性を踏まえた治療方法を提供するための技術の確立が見込まれる。

これらの技術的効果により、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になるなど、個別化医療が進展していると考えられる。

(2) 改訂のポイント

- 疾患モデル動物に「ヒト化マウスによる疾患モデル系の確立」を挿入した。

Ⅳ. その他の改訂のポイント

○ベンチマーキングの更新

- 研究開発投資額・企業数の各国比較を追加した。
- 国際競争力ポジションの改訂を行った。
- 参考資料に平成 21 年度健康研究関係施策内示額を追加した。

創薬・診断分野の導入シナリオ

現状(2009年)

2010年

2015年

2025年

健康維持増進

～「疾患を予防する」ことが幅広く行われ、病気になる人が減ると共に、健康産業が拡大される～

疾患の早期診断

～疾患の早期診断により、早期段階での治療を行い、より早く回復すると共に医療費増大が抑制可能となる～

適切な治療法の提供

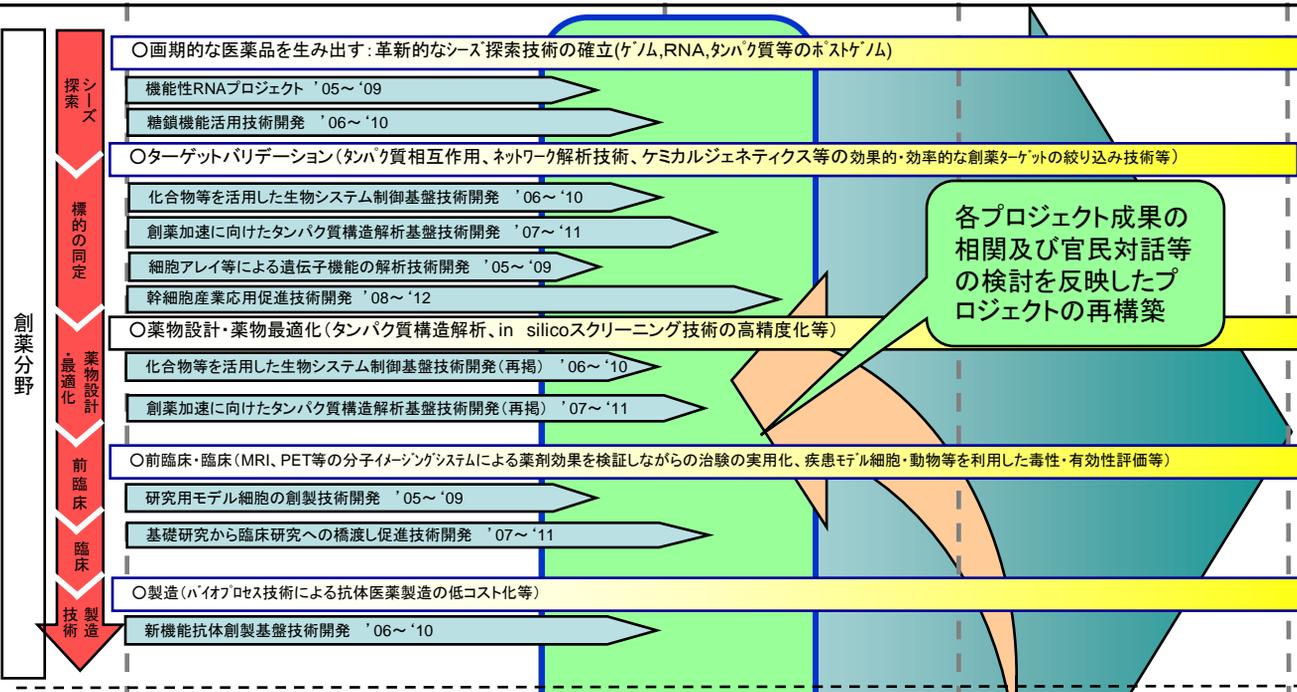
～治療がより低侵襲になり回復が早くなるとともに、患者の病状や個人差に基づき適切な治療法が選択できるようになり、治療効果の向上、QOLの向上が図られる～

将来像

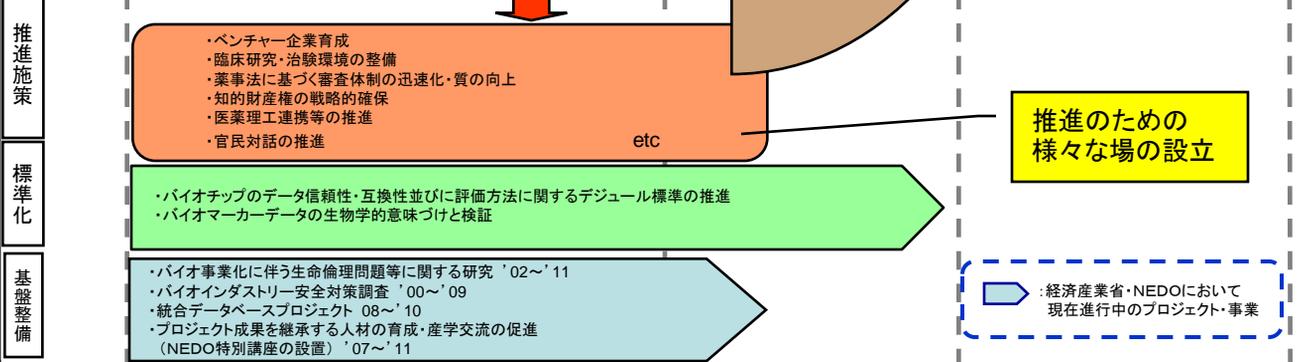
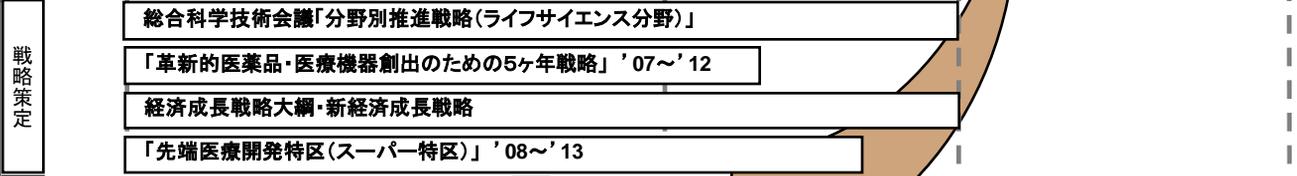
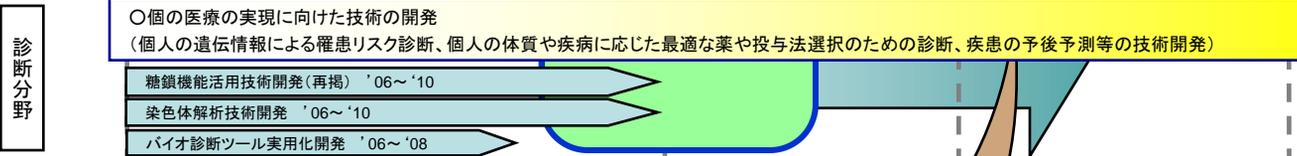
疾患別・目標	がん患者 5年生存率	60% (20%向上※1)
	<生活習慣病関連> ・糖尿病 ・脳卒中 ・心疾患	・発生率の20%改善※1 ・死亡率の25%改善※1 ・死亡率の25%改善※1

※1:健康フロンティア戦略(2005年-2014年)による。

産業構造	創薬	創薬ベンチャーの増加 異業種参入の進展	創薬開発プロセスの分業化の進展
	健康	健康管理と医療の連携による健康サービス産業の創出	
			健康産業の拡大



創薬パイプラインに即した基盤技術の確立



創薬・診断分野の技術マップと重要技術(1/2)

重要技術の抽出項目	凡例
画期的な医薬品・診断技術の開発	水色
医薬品開発の効率化	黄色
QOLの向上	ピンク
強みが活かせる技術分野の更なる強化	茶色・太字
波及効果の高い技術	下線・太字

*) マップ上、上記のいずれかの色がついている技術が重要技術

ニーズ

戦略1 より良い医薬品を生み出し、利用できるようにする

【革新的なシーズ探索技術の確立】

シーズ探索

○シーズを探索する方法としては、
 ・文献や学会発表の先行品調査から推測
 ・民間伝承療法(薬)調査から推測
 ・病態研究から明らかになった新規生理作用から推測
 ・ゲノム情報、新規疾患遺伝子から推測

従来技術

★臨床データとゲノム研究の統合的推進による疾患メカニズムの解明

○遺伝子機能解析
 ・ゲノム解読(DNAシーケンサー、PCR、ゲノム・mRNA、ゲノムの多様性(SNP、欠失等)、エピジェネティクス、比較ゲノム)
 ・遺伝子操作・導入技術(マイクロインジェクション、ベクター、導入試薬、機能性RNA)

○疾患遺伝子の推定
 ・マイクロアレイ、SNPs、ゲノム・染色体構造解析
 ・SNPアソシエーション

○タンパク質の取得技術
 ・組換えタンパク質(動物細胞)
 ・無細胞タンパク質合成系
 ・ペプチド合成技術(修飾体・長鎖)
 ・新規原理に基づくタンパク質分離担体/手法
 ・特定機能分子の作出(ファージディスプレイ、キメラ抗体、ヒト抗体)

○タンパク質の機能解析
 ・発現頻度解析(マイクロアレイ、MS)
 ・相互作用解析(MS、プロテインチップ、SPR、クウォーツ、光学顕微鏡)
 ・一分子ソーティング技術

○タンパク質の構造解析
 ・結晶化技術
 ・タンパク質構造解析(電子・X線顕微鏡、NMR、X線レーザー、中性子線回折)

○タンパク質修飾
 ・糖鎖解析・制御
 ・糖鎖付加部位の推定(特にムン型)
 ・タンパク質/ペプチドへの糖鎖付加技術

○代謝物
 ・メタボローム解析

○幹細胞操作技術
 ・幹細胞作製・樹立技術
 (iPS細胞、ES細胞、組織間細胞等)

○幹細胞共通技術
 ・幹細胞の培養・分離
 ・分化・培養(クローン技術、分化マーカー)
 ・分離(フローサイトメトリ、セルソーター)

○細胞活用関連技術
 ・遺伝子/タンパク質発現の検出、一分子計測
 ・細胞内外分子の機能(定性・定量)
 ・動態解析(蛍光・共焦点・全反射顕微鏡)
 1細胞解析

○統合バイオロジー
 ・臨床インフォマティクス
 ・健康インフォマティクス

○研究基盤整備
 ・バイオリソース(サンプル、完全長cDNA、細胞株、微生物株、モデル生物等整備)
 ・各種データベース

★革新的な創薬コンセプトアプローチ技術の開発
 ○既存薬剤のマルチターゲット化技術
 ○ネットワーク創薬技術
 ・転写制御メカニズムの解析技術
 ○エピジェネティクス創薬技術
 ・環境・年齢要因などによる遺伝子発現
 ・RNA遺伝子
 ・メチル化、アセチル化解析技術

様々なレベルの情報を統合し生命現象の解明へとつな

【個別製品毎に特異的に見られる課題】

ターゲットハ'リデーション

○創薬標的タンパク質の同定方法としては、
 ・タンパク質の分離は二次元電気泳動法に依存する
 ・タンパク質の同定は伝統的な方法による
 ・遺伝子改変生物(ノックアウトマウスなど)も用い同定する
 ・評価用の標的タンパク質は、少量しか得られない
 ・ハイパフォーマンスを利用し配列情報検索、データマイニング'実施

○標的タンパク質の同定・解析技術
 ・微量タンパク質操作技術
 ・定量的質量分析
 ・同一遺伝子からのmRNAの多様性(SV、TSSなど)やゲノムの多様性(cSNP、欠失など)を考慮したタンパク質解析技術

○標的タンパク質探索効率化
 ・標的タンパク質構造解析技術
 ・分子間相互作用解析技術
 ・膜タンパク質の汎用的解析技術
 ・ケミカルジェネティクス
 ・解析用タンパク質の大量発現系構築
 ・翻訳後修飾の反映・活性を保持したタンパク質生産
 ・膜タンパク質等難溶性タンパク質無細胞合成系・汎用解析系
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)
 ・細胞内ネットワーク解析技術

○糖鎖機能からのターゲット探索技術

○疾患特異的RNAの同定技術

○対象標的の同定技術

○体外細胞処理技術
 ○細胞機能測定技術
 ○特定細胞の分離・回収技術

○治療効果・副作用等評価技術

バイオマーカーの同定

○バリデーション、アッセイ法に関する技術開発
 ○ファーマコゲノミクス進展のための薬物の生体内作用機構の解明
 ○薬物と生体タンパク質の相互作用データベース

低分子化合物の薬物設計・

○創薬標的タンパク質と反応する化合物の選別・最適化
 ・多数の化合物をスクリーニングし候補化合物を見出す
 ・試行錯誤的にリード化合物の最適化を行う
 ・薬物構造活性相関(SAR)を利用して薬物構造を設計する
 ・invitro invivo試験で薬効スクリーニングを行う
 ・研究者の経験や勘に負うところが多い

○標的タンパク質に最適な薬物設計
 ・構造多様性に富んだ化合物ライブラリの構築
 ・ケミカルライブラリーの化合物機能アノテーション
 ・ドッキングベースの in silicoスクリーニング
 ・低分子・タンパク質親和性解析技術
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)
 ○標的の特異的デリバリーを保持した薬物設計

バイオ医薬品の薬物設計・薬物最適化

○生体適合性と効果の最適化
 ・ナチュラルタイプに近い製剤を製造
 ・効果を向上させる技術は未完成

○効果的な抗体の作製技術
 ・抗体の半減期の適正化
 ・低分子化、アブタマー化
 ・特異性の向上
 ・無細胞系での発現系、宿主の改良
 ・抗体の改変技術

○ORNA配列設計技術
 ・サイレンシング効果の高い配列設計技術
 ・効果を高めるモディフィケーション技術

○遺伝子組換え細胞の作成技術(発現系、支援機器/試薬)
 ・迅速発現安定株
 ・発現調整技術(KO、KI/KD/OE)

疾患状態の適切な把握に基づき薬剤評価

前臨床・臨床

○治療対象化合物の薬効/安全性の確認
 ・疾患モデル動物を用いて既存薬との効果/安全性を比較
 ・薬物動態試験の実施
 ・製剤技術の開発
 ・急性/亜急性/慢性など毒性確認技術の実施

○生体そのまま薬効効果を検証できるイメージング技術
 ○疾患モデル細胞・動物(疾患ヒトiPS細胞の活用等)を利用したヒトでの有効性・問題点評価技術
 ○薬物動態シミュレーション
 ○細胞・臓器モデル(健康ヒトiPS細胞の活用等)による薬物代謝および安全性評価技術
 ○投与方法変更技術(静注から経口へ)
 ○ターゲットへのデリバリーシステムの開発
 ・DDS等の新規投与法の開発

○品質(保存安定性)のための技術

○治療用ベクター開発(組込部位の特定・遺伝子毒性の低減技術)
 ○細胞内への高効率導入技術
 ○siRNA、ncRNAの作用メカニズム解析

○安全性評価

○安全性評価、品質管理

○細胞機能/細胞内の分子挙動の測定技術/機器・試薬
 ・In vitro 安全性(毒性)・代謝・薬効評価技術

投与前診断ツール開発

○安価で迅速な疾患関連遺伝子多型等解析技術
 ○安価で迅速な細胞診断技術(遺伝子・タンパク質等の薬効標的分子・バイオマーカー)
 ○DNAチップの信頼性向上
 ○患者に負担をかけない生体試料採取法

製造技術

○最適な製造方法の確立
 ・化学合成法による製造技術を確立する
 ・発酵法による製造技術を確立する
 ・精製技術を確立する
 ・品質安定化技術を確立する

○医薬品中間体製造のための発酵技術

○低コスト、高効率な生産系の開発
 ・発現系・発現宿主・培養技術開発
 ・糖鎖修飾制御

○低コスト、高効率な生産系の開発
 ・発現系・発現宿主・培養技術開発
 ○抗体製造の低コスト化技術
 ・動物細胞以外のヒト抗体産生の宿主開発
 ・精製技術開発

○天然糖質原材料の開発技術(糖質医薬品)
 ・グリコサミノグリカン糖鎖原材料製造技術

○細胞タイピング技術
 ○移植後の長期安全性、トラッキング

○DNAワクチン技術
 ○感染診断・検査技術

1. 画期的な医薬品をいち早く生産できるようにする

課題解決のための技術

病気がなつたとしてもいち早く健康に戻りたい

健康で長生き

2. 医薬品の最適な使用方法を確立する

戦略2における活用

個々の医療、健康安心社会の実現(個人に合わせた優れた治療法の提供・予防)・産業競争力の強化

・画期的な医薬品の迅速・効率的な提供
 ・薬剤パラエティの増加

個々の特性に応じた使用方法の確立

全医薬品共通

低分子化合物薬

(糖)タンパク質医薬

抗体医薬

核酸医薬(遺伝子治療含む)

糖質医薬

細胞医薬

ワクチン

診断ツール、診断キット

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

ニーズ
病気になる前、健康でいたい
健康で長生き

戦略2 健康産業を創造する(治療中心から予防中心へ)

バイオマーカーの探索

戦略1のシーズ探索技術の活用

現状と将来像
疾患の発生や健康状態の回復のエビデンスとして有用な分子やプロファイリングデータを探索。

対象サンプル
○生体試料
・遺伝子(配列情報)
・血液
・組織・疾患組織
・代謝産物

○遺伝子
・ゲノム解読(DNAシーケンサー、PCR、ゲノム・mRNA、ゲノムの多様性(SNP、挿入・欠失等)、エピジェネティクス、比較ゲノム)
・遺伝子操作・導入技術(マイクロRNA、ベクター、導入試薬、**機能性RNA**)
・マイクロアレイ、SNPs、ゲノム・染色体構造解析
・SNPタイピング技術

○タンパク質
□サンプルの前処理技術
・メジャータンパク質の除去技術
・クロマトの多重化、多段階システム化
・分子分離分取技術
□機能解析
・発現顕度解析(マイクロアレイ、MS)
・相互作用(インタラクトーム解析(MS、プロテインチップ、SPR、クウォーツ、光学顕微鏡))
・分子ソーティング技術
□修飾
・糖鎖解析

○代謝物
・メタボローム解析
・非侵襲サンプル(呼吸、汗、唾液、尿等)からのターゲットマーカー探索

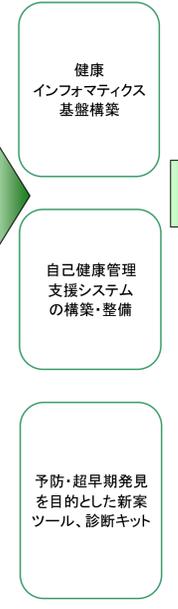
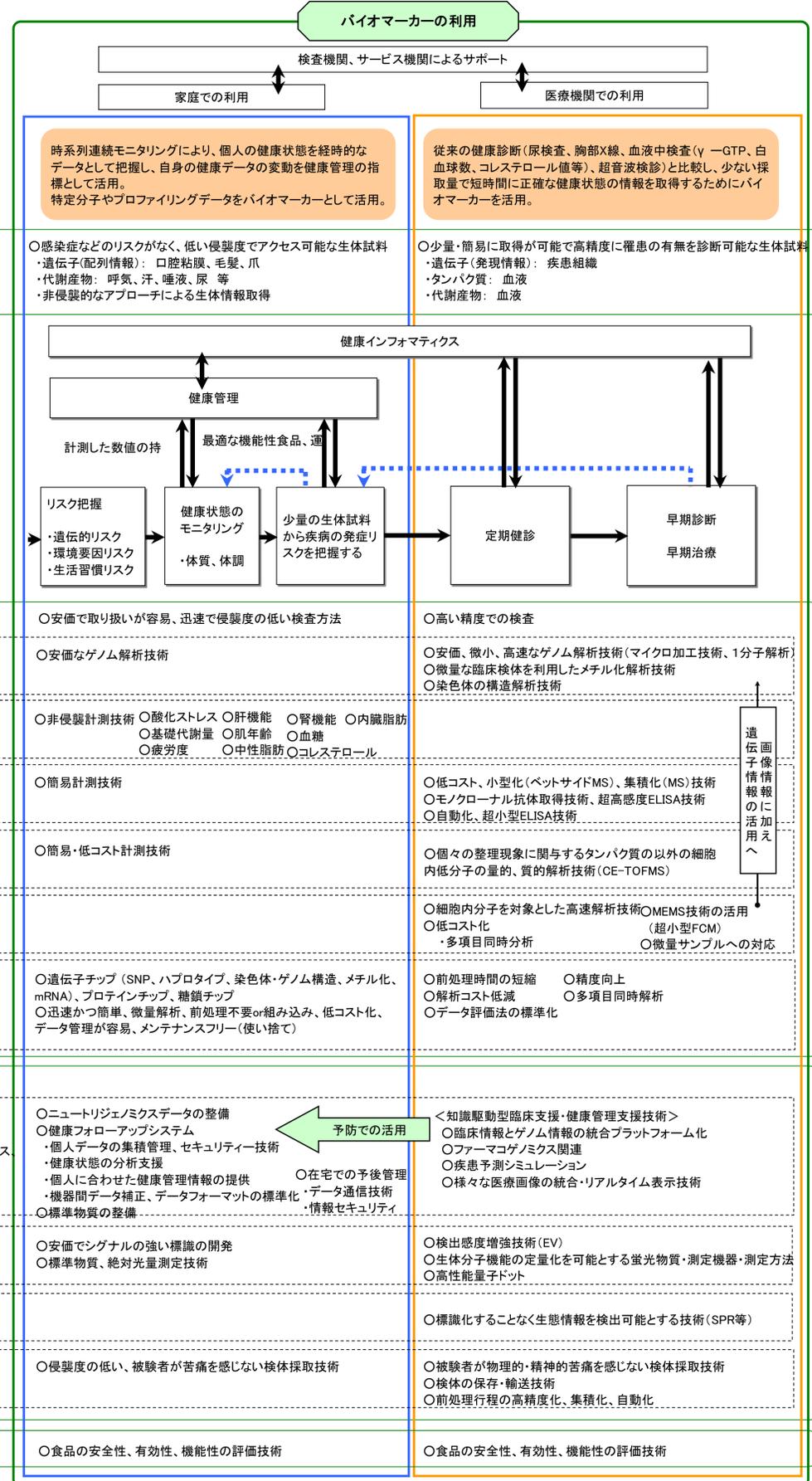
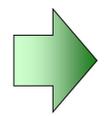
○細胞
・iPS細胞の作製
・遺伝子/タンパク質発現の検出、一分子計測
・細胞内外分子の機能(定性・定量)
・特定細胞の培養・分離
・動態解析(蛍光・共焦点・全反射顕微鏡、細胞アレイ、1細胞解析)
・分化・培養(クローン技術、分化マーカー)
・分離(フローサイトメトリ、セルソーター)
・細胞表面特異的抗体の開発

○組織
・細胞間情報伝達(サイトカイン技術)
・染色技術(in situハイブリ、免疫染色)
・保存(凍結保存技術)

○統合バイオロジー
・臨床インフォマティクス
・健康インフォマティクス

○エピジェネティクス
・環境・年齢要因などによる遺伝子発現
・RNA遺伝子
・メチル化、アセチル化解析技術
・血液中のメチル化DNA検出技術

○臨床サンプル
・統計学的な視点を持った臨床サンプル収集
・臨床サンプルの保管や処理技術のプロトコル化



・医療費の削減
・早期回復、健康維持

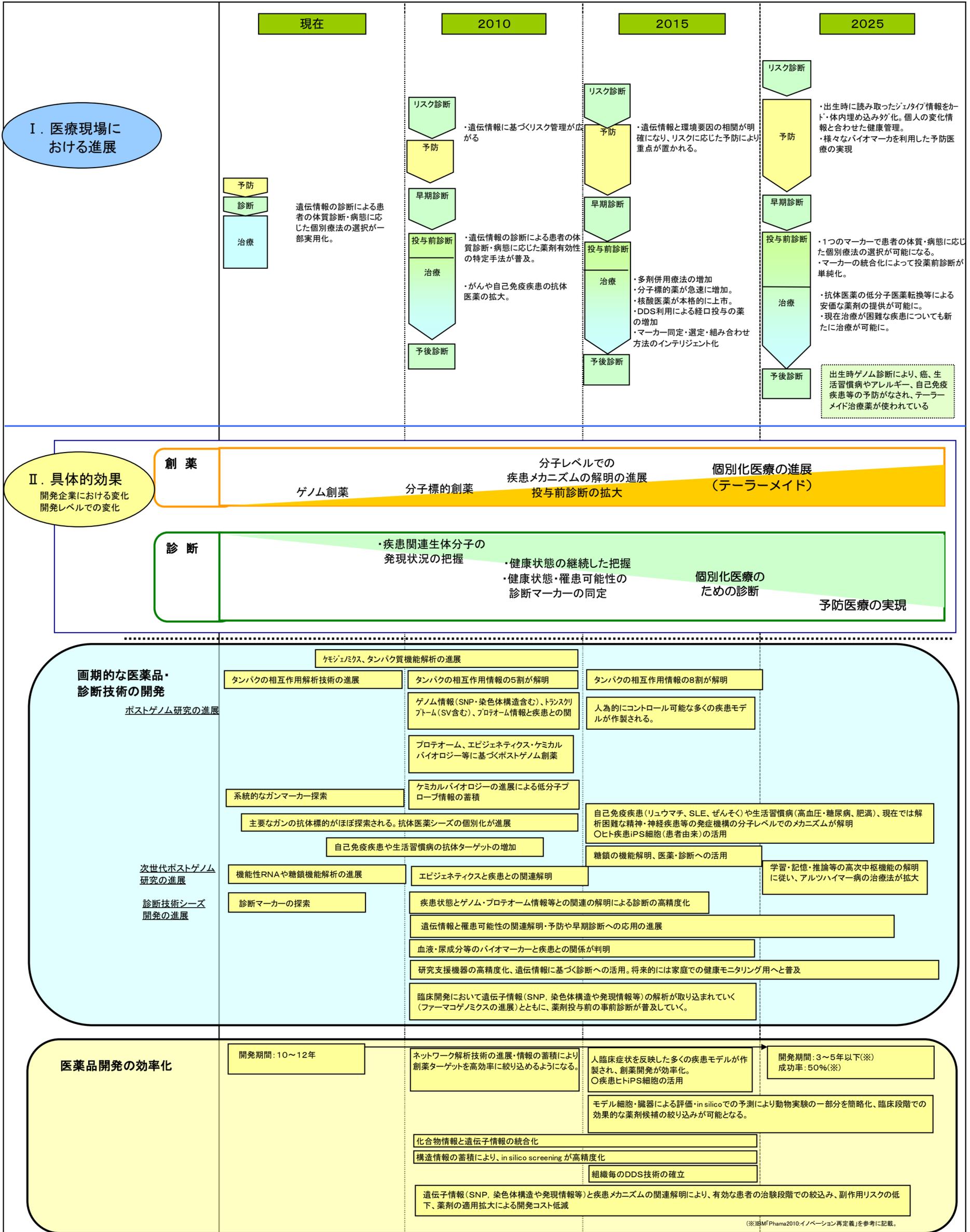
個の医療、健康安心社会の実現(個人に合わせた優れた治療法の提供・予防)・産業競争力の強化

検査手段	検査基盤
<p>○安価で取り扱いが容易、迅速で侵襲度の低い検査方法</p> <p>○安価なゲノム解析技術</p> <p>○非侵襲計測技術 ○酸化ストレス ○肝機能 ○腎機能 ○内臓脂肪 ○基礎代謝量 ○肌年齢 ○血糖 ○疲労度 ○中性脂肪 ○コレステロール</p> <p>○簡易計測技術</p> <p>○簡易・低コスト計測技術</p> <p>○遺伝子チップ(SNP、ハプロタイプ、染色体・ゲノム構造、メチル化、mRNA)、プロテインチップ、糖鎖チップ ○迅速かつ簡単、微量解析、前処理不要or組み込み、低コスト化、データ管理が容易、メンテナンスフリー(使い捨て)</p>	<p>○高い精度での検査</p> <p>○安価、微小、高速なゲノム解析技術(マイクロ加工技術、1分子解析) ○微量な臨床検体を利用したメチル化解析技術 ○染色体の構造解析技術</p> <p>○低コスト、小型化(ベットサイドMS)、集積化(MS)技術 ○モノクローナル抗体取得技術、超高感度ELISA技術 ○自動化、超小型ELISA技術</p> <p>○個々の整理現象に関するタンパク質の以外の細胞内低分子の量的、質的解析技術(CE-TOFMS)</p> <p>○細胞内分子を対象とした高速解析技術 ○MEMS技術の活用 ○低コスト化(超小型FCM) ・多項目同時分析 ○微量サンプルへの対応</p> <p>○前処理時間の短縮 ○精度向上 ○解析コスト低減 ○多項目同時解析 ○データ評価法の標準化</p>
<p>ゲノム解析</p> <p>フェノタイプ解析</p> <p>タンパク質診断装置</p> <p>代謝物診断(メタボローム解析)装置</p> <p>細胞診断装置</p> <p>バイオチップ</p>	<p>バイオインフォマティクス情報基盤</p> <p>標識法、標識物質</p> <p>非標識解析技術</p> <p>検体採取、検体処理</p> <p>健康訴求食品</p>

← 予防での活用

遺伝画像情報に活用へ

創薬・診断分野の技術ロードマップ



		現在	2010	2015	2025
医薬品の変化	低分子医薬	ゲノム情報に基づいた分子標的薬シーズの創製(標的:GPCR,核内レセプター,キナーゼ等)	より多くの疾患において、分子標的薬が活用されていく。	抗体医薬の機能を代替する低分子医薬実現	多くの疾患について低分子医薬が製造される。薬剤の適用拡大も進展。
	抗体医薬		ガンに対する抗体医薬がほぼ提供され、テーラーメイド型抗体治療が開始される。(例:個々人のガンの状態に合わせた抗体を処方できる)	パーキンソン・アルツハイマーに対する抗体療法が行われている。 抗体医薬の低分子化 DDS利用の抗体医薬(※)が上市される。(※:抗体そのものをDDSを利用して組織へ集中させる。) 細胞内分子を標的とする抗体が創製される。	
	核酸医薬		siRNAのサイレンシング機能を薬剤に利用 導入効率が良く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。	RNAiの薬剤として使用が開始される。	
	(糖)タンパク医薬	バイオジェネリック(後発品)の上市	タンパク修飾技術やDDS利用の第2世代タンパク医薬への置換えが進む	プロテオーム情報に基づく新たなタイプのタンパク医薬が作られる。	
	糖質医薬				人工的グリコサミノグリカン医薬品
	細胞医薬		体外で分化させた細胞を用いた治療法が始まる。	遺伝子を改変した細胞を用いた治療が始まる。	特定の目的に応じて自在に細胞を制御できる技術が確立(人工臓器)
	ワクチン	細胞性免疫を誘導するワクチン開発(臨床試験開始)		免疫機能を増強制御する薬剤・方法が開発される。	生体防御機構の誘導を自在にコントロールできるワクチン
診断情報		診断情報をフィードバックし、医療情報と連携を図る	診断手法の標準化 検査対象マーカーのバリデーションによるEBD(科学的根拠に基づいた診断)が本格化	個別化医療への応用	
予防・早期診断	早期診断、確定診断に有効な"疾患診断マーカー(遺伝情報、タンパク、糖鎖情報等)"の開発	疾患メカニズム解析の進展により、罹患リスク診断に有効な"リスク診断マーカー"の開発が進展	遺伝的なリスクと生活習慣の相関解析の進展により、日々の健康管理に有効な"健康モニターマーカー"の開発が進展	集学的診断法の樹立による疾患の特定精度と信頼性の向上 マルチマーカーの利用により、複数の疾患を同時に診断可能	
最適な治療の選択	医薬品と診断薬の同時開発により、薬剤選択に有効な"薬剤応答性マーカー"の開発	単剤ごとの"薬剤応答性マーカー"	遺伝情報に基づく薬剤投与前の副作用リスク・薬剤有効性の判定が普及	1つの薬剤応答性マーカーで複数の薬剤選択が可能なマルチマーカーの開発が進展	バイオマーカーの統合的利用 様々なバイオマーカーの組み合わせ利用 シミュレーションによる治療プロセスの医師と患者での共有化 臨床インフォマティクスの充実
標準化の推進		検体の採取・保存・管理方法 測定データの評価方法 機器・試薬による新規測定方法 データ処理		個人の時系列データの解析による基準値設定	
ガンにおける分子標的薬	分子標的薬に対応したマーカー数はほとんどない(現在10:グリベック、イレッサ、リツキサン、ハーセプチン等)		がん治療薬の5割に分子標的薬が登場し、マーカーの需要性が増す	がん治療薬の9割に分子標的薬が登場し、マーカーの需要性が増す	
診断場所	検査センター		患者のそば(POCT)	生活の場で、自分でモニター	タイムラグの短縮 家庭での精度の高い簡易検査及びモニタリング 出生時に読みとったジェノタイプ情報をカード・体内埋め込みタグ化。埋め込みセンサーで適宜計測する個人の変化情報と合せた健康管理
検査対象	分子機能		細胞・臓器機能	個体機能	

	現在	2010	2015	2025
<p>Ⅲ. 技術進捗</p> <p>創薬(診断)</p> <p>【シーズ探索・ターゲットバリデーション】</p>				
シーケンサー	DNA解読技術の進展	現在の100倍の速度	現在の1000倍の速度:個人のゲノム解析が安価で可能に	疾患リスク把握・予防技術への展開
エピジェネティクス	癌との関連等、一部で機能が示唆される。	癌メカニズムとの関係説明	ターゲット分子のエピジェネティックな制御に利用	移植医療への応用
機能性RNA	in vitroでの転写制御に利用	創薬ターゲット同定への活用	特定遺伝子の転写・翻訳制御による治療の実施	
DNA・発現頻度等解析技術	研究用の基本技術が確立しつつある。データの互換性や機器毎のデータの一致率の低さに課題。	同時多項目診断チップの実用化 (コンテンツが順次増加するとともに、医療機関から家庭へと普及)	薬剤投与前の有効性・副作用診断ツールとしての活用が一部で実用化	●多くの疾患の効果判定がゲノム解析で可能となる。
プロテインチップ・抗体チップ	検出感度の向上・タンパク質発現技術等要素技術の開発	血液・尿中のバイオマーカーの同定のためのツールや診断チップとして利用	診察所で簡便かつ安価に活用される。	個人・家庭レベルでの罹患可能性把握・健康モニタリング機
タンパク質取得技術	・組換えや発現が一般化し成熟しているが、インタクトなタンパク質の発現技術としては不十分。 ・無細胞合成系が実験室で実用 ・ペプチド合成技術が一般化し成熟	・発見・分離・精製技術が向上し、膜タンパク質/タンパク質の取得技術が確立 ・8割のタンパク質を取得	・(ヒト発現臓器と同等の糖鎖構造や修飾をもつ)天然型糖蛋白質の発現や合成が自由自在となり、自動化されている。	・必要に応じて患者別に治療に必要な治療薬を選択するための検査が可能(→「1分子ソーティング」の項)となり、「個の組換え体」がGMPで低コストで供給される。(ワクチン、抗体など)
分離担体・機器修飾	・合成担体等を利用した化学的クロマトグラフィーによる「分子群」ソーティング ・機械駆動型ポンプによる送液系 ・分光光学的モニタリング	・コンベンショナルな「分子群ソーティング」から「1分子ソーティング」への移行が模索され、実用化研究が進展。	・高速な「1分子ソーティング」が可能となり、生体分子は1分子毎に多数のパラメータ(サイズ、修飾、切断など)が解析され、その集合データによって特定の分子と病態との関連が調べられている。 ・用途によって、「分子群ソーティング」と「1分子ソーティング」が使い分けられる。	・「1分子ソーティング」が高速スケールアップされ、短時間で膨大な分子データの獲得が可能となり、個の医療・診断に活用されている。 ・極少量の検体から、同時に多数の分子について、それぞれ多項目パラメータの取得が可能となり、確定診断や健康管理に活用されている。
タンパク質相互作用解析	広範に解析中であり、いくつかの系では成果が出ている。	ハイスループット化・汎用性・検出効率・相互作用部位解析精度の向上	リアルタイムでタンパク質相互作用が1分子レベルで測定可能 (相互作用検出の蛍光プローブ等が進展)	
糖鎖機能解析	構造解析の基盤技術に目処	構造解析装置が普及。糖鎖解析が本格化、診断技術、バイオ医薬品評価等への実用化	ガン、感染症、免疫等の分野において糖鎖機能の幅広い応用が行われている。	
構造解析技術	膜タンパク質発現技術の向上 結晶化の効率化	・NMR・軟X線レーザー・中性子線・低温電子顕微鏡(高分子量タンパク質への適用拡大) ・単粒子解析等新たな構造解析技術の進展	膜タンパク質以外については、一次構造から推定可能に。 タンパク質の動的な構造変化が観察可能になる。	・特別な施設や機器を保有しなくても、検査対象となる高分子の構造や修飾は、制限られたパラメータを取得してデータベースで検索可能。
メタボローム解析	・ヒト、モデル動物由来の細胞、組織、その他生体材料(血液、尿、唾液など)中の代謝物の網羅的解析で、病態や薬剤応答性(薬効、毒性)のバイオマーカーの探索が始まっている。	・ヒト臨床サンプルやモデル動物でのメタボロームのプロファイリングデータベースの蓄積とアルゴリズムの進展で、ヒトの疾患マーカーや動物モデル系(げっ歯類)におけるヒト臨床予測マーカーが数多く見出されている。	・ヒトおよびモデル動物でメタボローム統合データベースが完備する。	・ヒト生体サンプルのメタボローム解析で、即日の病態診断、薬剤応答性予測が可能となる。

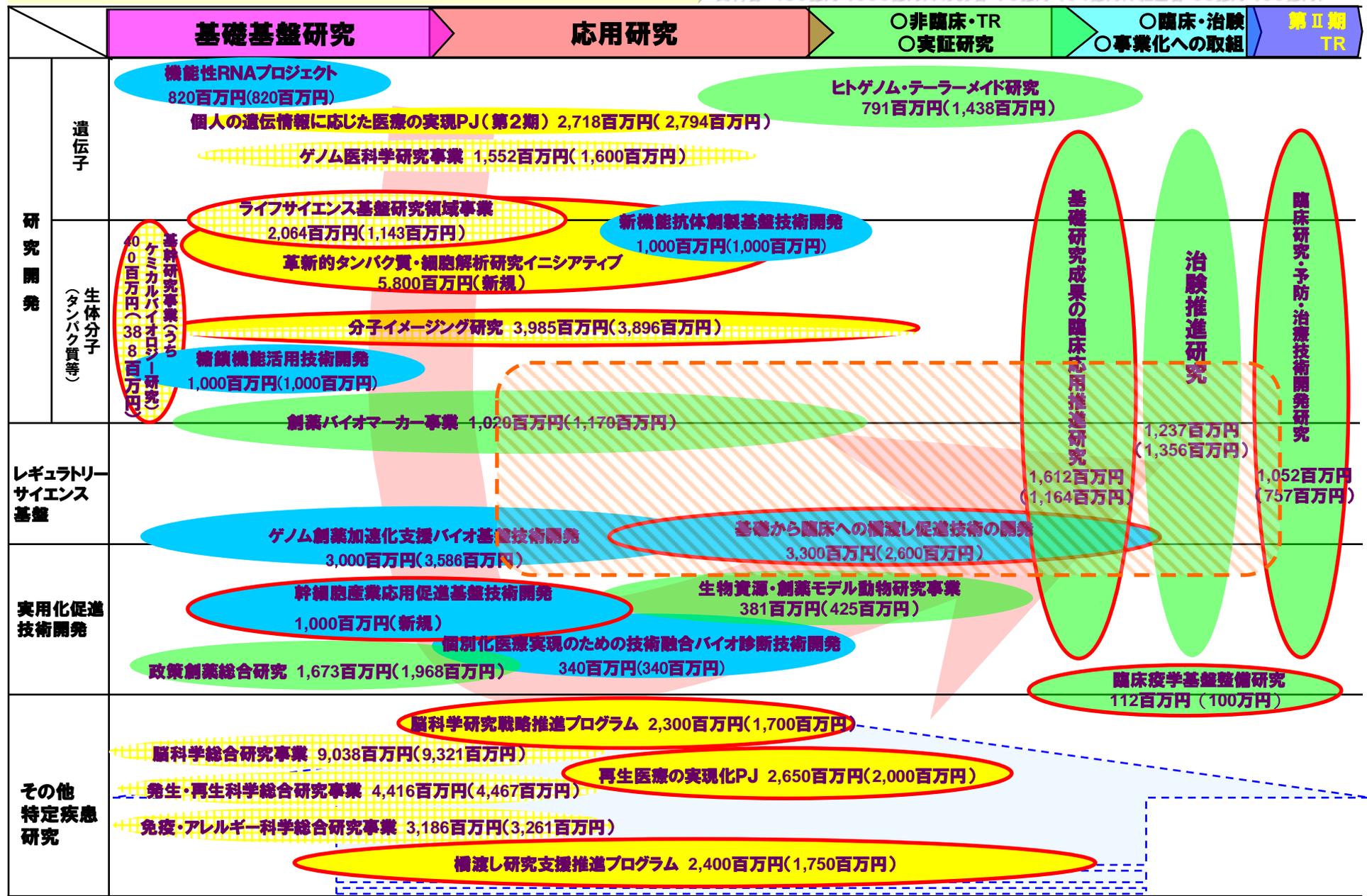
※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。

	現在	2010	2015	2025
特定細胞・組織の培養・分離	<ul style="list-style-type: none"> 浮遊細胞については、1細胞単位での分離が可能。 付着細胞については、レーザーを利用した特定細胞の分離が可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 性質を維持したインタクトながん細胞の分離培養が可能となりターゲット探索、薬剤開発が効率化される。 1細胞分離の全く新たな原理が登場。 		
疾患モデル動物・細胞系	<ul style="list-style-type: none"> 臓器モデル・細胞モデル(※)による創薬ターゲット絞り込み・ネットワーク解析(※)iPS/ES細胞等ヒト細胞による疾患モデル系の構築 多様な生物を活用した疾患モデル系の構築 疾患モデル数が少なく(特に霊長類)、データベースも不十分で、かつ統合されていない。 導入遺伝子の発現コントロールによる、疾患の程度の調節ができるモデル動物の開発は途上段 	<ul style="list-style-type: none"> ヒト化マウスによる疾患モデル系の確立 霊長類を含め、疾患モデル動物の作成技術の進展により、モデル数、種類が増加し、それら動物の維持・分与システムが確立される。 	<ul style="list-style-type: none"> 患者毎の性質を維持したインタクトながん細胞の分離培養が可能となる。 疾患モデルの動物種ごとのプロテオーム・メタボローム、メタボリズム(生理学的)解析法が確立し、系統化される。 	<ul style="list-style-type: none"> 主要な疾患全てにおいてモデル動物が整備される。
細胞内ネットワーク解析 ／セローム	<ul style="list-style-type: none"> 細胞アレイによるネットワーク解析 セロミクス技術の進展 <浮遊細胞> 1細胞単位での分析が可能。 レーザー光学系や高速演算系を備えたフローサイトメトリやセルソーターなどの配備が基幹施設で稼働 抗体磁気ビーズなどを利用した細胞の大量分離が可能。造血幹細胞移植などの移植細胞濃縮や不要細胞の除去が自動化、臨床利用。 一部に、診断目的で細胞膜マーカーや細胞内分子を定量的に測定。 移植細胞の品質管理に利用。 機器機材や消耗品となる試薬が高価で、運用が高コスト。 走化性因子の探索、走化性測定法の開発 	<ul style="list-style-type: none"> フローサイトメトリ用の機器開発元は、寡占状態から脱し、国内外各社で開発・市販される。特に低廉で小型な装置の実用化が始まる。 ハードウェアは次世代に移行し、より高速で安定な分離と解析が実現。 1細胞解析の全く新たな原理が登場。 抗体に依存しない細胞標識法や、分子標識法が登場し、実用化途上。 1細胞から多数(30以上)のパラメータが同時取得可能となっている。 走化性関連研究の成果として、細胞動態を指標とする創薬スクリーニングシステム開発 走化性関連研究の成果として、細胞動態制御薬の開発開始 	<ul style="list-style-type: none"> 低価格のペンチトップ型のフローサイトメトリ装置が広く普及し、多様な疾患において細胞マーカーの検出類型や、定量化された臨床データが豊富に蓄積されている。 特定の表現型をもつ細胞に、1細胞単位で、核酸や蛋白質などを導入したり、機能を欠失する機能など、新たなモードが実現。 新たな原理に基づいた細胞解析装置や標識法、可視化法が実用化され、研究用に活用されている。 走化性関連研究の成果として、癌転移制御薬の開発 走化性関連研究の成果として、動脈硬化制御薬の開発 	<ul style="list-style-type: none"> 個々の細胞の表現型と遺伝子型の参照データセットが揃っており、最少のパラメータセットを測定することによって、それぞれの細胞や細胞群、組織や臓器の運命や機能の変化について予測可能となる。 走化性関連研究の成果として、癌の転移の大半が薬により抑制可能に。
細胞内イメージング技術	<ul style="list-style-type: none"> 細胞内での各分子の挙動が平均値として検出されている。 分子間相互作用解析結果の生細胞内での検証 	<ul style="list-style-type: none"> 個々の分子の挙動がリアルタイムで解析可能になる。 分子イメージングのスループットの向上・高精度化によりスクリーニングに応用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子レベルでの解析可能 1分子レベルでの分子イメージングのスループットの向上・高精度化によりスクリーニングに応用可能。 	
臨床インフォマティクス	<ul style="list-style-type: none"> 検査値の統合処理 多変量解析が一部で実施(卵巣癌) 	<ul style="list-style-type: none"> 情報の蓄積が可能となり、①シーズ探索に活用できる 血液・尿成分のバイオマーカーと疾患の関係が判明 テーラーメイド医療の有効性の検証。 臨床データと各種omicsデータの統合 免疫ゲノム検査に至るまで 検査方法の標準化・データの統一化が可能と 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床インフォマティクスデータが蓄積され、バイオマーカーのプロファイリングによるテーラーメイド医療の治療が普及。 検査の多変量解析による効率化により、個人別基準値の設定・管理ができる 	<ul style="list-style-type: none"> 超早期発見、超早期診断が可能となり、罹患時点・罹患早期で治療が可能となる。 個人別の基準値データベースのカード化
【薬物設計/前臨床・臨床】				
<ul style="list-style-type: none"> ライブラリー構築、 化合物アノテーション、 低分子-タンパク相互作用解析 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質相互作用解析技術(Y2H, MS, タンパクチップ, SPR等) 化合物アノテーション・ケミカルジェネティクス HTS技術の進展 コンピケム・分子インプリンティング、構造多様性に富んだライブラリー構築 	<ul style="list-style-type: none"> in silicoと連携した化合物設計がハイスループットで可能に。 		
In silico スクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> 精度向上・情報量拡大により構造情報に基づいたドラッグデザインが可能。 複合体や標的タンパク質の相互作用も含めたスクリーニング 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞機能をシミュレート可能なバーチャルスクリーニング技術が確立 	<ul style="list-style-type: none"> コンピュータ上での薬剤設計 	
抗体作製技術	<ul style="list-style-type: none"> 抗体の特異性向上・製造コスト低減技術 宿主の多様化 低分子化・アプタマー化 		<ul style="list-style-type: none"> 細胞内タンパクをターゲットとする抗体医薬の作製技術が確立 	
細胞医薬	<ul style="list-style-type: none"> 体外での細胞の分化制御技術 	<ul style="list-style-type: none"> 免疫原性の低い細胞の創出 	<ul style="list-style-type: none"> 疾患状態や外部刺激に応じて効用や細胞機能が制御できる細胞医薬 	
核酸医薬	<ul style="list-style-type: none"> siRNAを活用した核酸医薬開発におけるベクターの開発 	<ul style="list-style-type: none"> 導入効率が高く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。 		
ヒト細胞による毒性・有		<ul style="list-style-type: none"> 細胞チップ技術とモデル細胞・臓器との組み合わせ 		
生体のまま薬剤効果を検証できるイメージング技術		<ul style="list-style-type: none"> 情報のデジタル化による網羅的解析・スループット向上 動物実験に適用するための分解能の向上・小型化 		
薬物動態シミュレーション	<ul style="list-style-type: none"> 半減期・変異原性については簡単に分かる。それ以外で課題がある。候補化合物を実際にアッセイせずに評価できるようにする。既に設計の段階でどの酵素に代謝を受けるかは織り込んだ上で開発が進展している状況。 	<ul style="list-style-type: none"> in silicoでの予測による動物実験の簡略化 	<ul style="list-style-type: none"> 個人差も反映したシミュレーションが可能になる(試験の対象の選択にも利用可能) 	

※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。

		現在	2010	2015	2025	
DDS (低分子・抗体)		<ul style="list-style-type: none"> ・ターゲティング、持続時間延長、溶解温度の改善等々、要素技術が多い。 ・ガンの場合はターゲティングが主要課題 ・ガン以外においては抗体医薬もデリバリーが課題 	<ul style="list-style-type: none"> リボソーム型の一部実用化、様々な接着因子の利用 ①低分子をリボソームに包み、膜上に抗体を入れることでターゲティング ②がん細胞と正常細胞内での代謝酵素の活性の差を利用する手法も存在。これらが実用化されていく。 	DDS利用抗体の実用化		
	DDS (核酸)		<ul style="list-style-type: none"> (共通) プラッドブレンバリア(BBB)の制御 導入効率が高く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。 siRNAのサイレンシング機能を薬剤に利用 	RNAiの薬剤としての使用が開始		
【製造技術】						
製造技術		<ul style="list-style-type: none"> バイオリジクス製造技術の改良(宿主:ウシ・ニワトリ・植物や糖鎖改変技術等) バイオリジクス製造技術の改良(分離精製技術・大量生産・低コスト化) 				
【検査手段の開発】						
診断	ゲノム診断装置	<ul style="list-style-type: none"> ・DNAシーケンサーを利用 ・SNP解析が実施されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ・疾患別解析ゲノムの統一化 ・解析装置の小型化・高速化 	異型・多型を含めた個人レベルでの遺伝子情報解析	個人データのカード化・体内埋め込み型	
	タンパク質診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 一般生化学検査では、化学的多項目自動測定が可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 質量分析装置に定量性を付加する技術の開発 	<ul style="list-style-type: none"> ・定量的MSの普及 ・蛋白質/糖/核酸などの広範囲なマーカー検出に定量的MSが利用される。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ベンチトップ/ベッドサイドMSの開発 ・生体1分子毎に多項目(サイズ、修飾、切断など)が、同時計測可能となり、集合データによって特定の分子と病態との関連が調べられる。 	
	代謝物診断(メタボローム解析)装置	<ul style="list-style-type: none"> 分子特異的定量分析では、RIAやELISA。 	<ul style="list-style-type: none"> GC-MS、LC-MS、CE(キャピラリー電気泳動)-MS、NMRの活用により、多くの代謝物種の網羅的解析が可能 	<ul style="list-style-type: none"> すべての代謝物種の網羅的解析を可能とする、定量的・高感度解析手法が開発される。 	<ul style="list-style-type: none"> ベンチトップ/ベッドサイドで使用可能な低コスト化解析装置が開発される。 	<ul style="list-style-type: none"> メタボロームデータベースの蓄積、アルゴリズムの進展で、オールインワン型病態診断装置が開発される。
	細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 光学的分子標識が必要/細胞膜分子 FCM:1細胞計測(散乱光・蛍光) ・高額大型装置(海外製寡占) ・高コストな運用 ・診断/臨床利用は限局(主に研究) 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光標識法が多様化/細胞内分子 FCM:1細胞計測(散乱光・蛍光) ・高性能高額機と低価格機の二極化 ・既存機器の低価格小型版が普及 ・診断/臨床利用へ展開 	<ul style="list-style-type: none"> ・ポストソーティング解析技術の融合 ・1細胞動的解析技術(*)の適用 ・非標識による細胞分子同定が可能 FCM/CS高性能低価格機の普及 ・診断/臨床ベッドサイドで常用 	<ul style="list-style-type: none"> ・浮遊細胞・付着細胞の双方について、1細胞の動的変動 多変量パラメータ ・細胞表現型と遺伝子型のプロファイリングデータによって、細胞/組織/臓器の運命や機能変動の予測が可能 	
	細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> ※FCM:フローサイトメトリ 1分子計測技術装置の発展と普及 ・標識法(高寿命蛍光・蛍光/分子プローブ) ・細胞内分子標識法 ・高出力半導体レーザー ・装置(顕微鏡装置/検出器/制御装置)の単純化と低価格化 ・新原理の出現 	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞機能改変技術の進展(核酸、蛋白質等の無毒性 高効率導入、機能発現/機能抑制/刺激付加) 		<ul style="list-style-type: none"> ・1分子計測・1細胞計測が高速かつスケールアップされ多変量パラメータを高速演算が可能となる。 ・これにより、表現型と遺伝子型のプロファイリングや疾病/病型/疫学的データとの連鎖解析が可能となる。 ・その後、出力の単純化により、細胞/組織/臓器/個体の運命を予測可能となり、確定診断個の健康管理に活用 	
	細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 化学的クロマトグラフィーや電気泳動法による分子群分離～分子群モニタリング 	<ul style="list-style-type: none"> 分子群分離から1分子ソーティングへ 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子ソーティングと1分子解析の融合 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子計測値の集積により、特定分子群の特性を把握 	
バイオチップ	<ul style="list-style-type: none"> 共通基盤 マイクロfluidicチップ ・サンプルの微量化 ・操作の簡便化 ・検査時間の短縮 		<ul style="list-style-type: none"> ナノfluidicチップ(20マーカー、100検体同時測定) マルチ解析の臨床応用(100マーカー以上、非標識検出) ・人工リガンド 	<ul style="list-style-type: none"> 統合バイオチップ:確定診断精度の飛躍的向上 複数のマーカーを利用して、1つの疾患の診断精度を向上 マルチバイオチップ 1つのバイオチップで複数の疾患を同時診断 パネル化して利用普及 		
核酸	DNAチップの実用化		<ul style="list-style-type: none"> ・低コスト化 ・標準化 ・汎用化 			
タンパク質	抗体チップの実用化					
細胞	プロテインチップの実用化					
組織	セルアレイの実用化					
組織	ティッシュアレイの実用化					
【検査基盤】						
バイオインフォマティクス	<ul style="list-style-type: none"> 臨床情報のデータベース化進展 ・タムの統一 ・画像データのストレージ ・データベース間の相互利用の実現 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床情報とゲノム情報の統合プラットフォーム化 ニュートリジェノミクスデータの整備 遺伝子と食品の関係が明らかとなり、リスクに合わせた食生活の選択が可能になる。 ネットワークの拠点構築 多様性をもったゲノム情報の取得 高速で高精度な多変量解析技術の進展 	<ul style="list-style-type: none"> コンピュータ健康支援システムの普及 診断支援に活用 	<ul style="list-style-type: none"> 個別化された健康管理手法の確立 		
標識法、標識物質、可視化	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光発光感度(ng) ・BKGの抑制剤が一部開発されている(MPCホリマー)。 ・病理標本のテレメディスン化が一部実施され 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光発光の感度UP (→fg) 	<ul style="list-style-type: none"> 標識体及び検出機器の改良により感度が更に向上し、複数の標識体が同時に使用可能(100マーカー)となりコストダウンする。 病理標本の画像解析システムが一般化 			
非標識解析技術	<ul style="list-style-type: none"> ・安定同位体による解析が研究レベルで使用されている。 	<ul style="list-style-type: none"> MS・MSの解析能があがり感度向上する。 	<ul style="list-style-type: none"> ベンチトップMS・MSの開発により普及 	<ul style="list-style-type: none"> 定性的検査から定量的検査へ 		
検体採取、検体処理	<ul style="list-style-type: none"> 侵襲度の低い検体採取技術の開発 汗、呼吸、尿、唾液などの侵襲度の低い検体の利用技術 抽出方法が施設・項目により異なる。フィルター上でDNA保存(標準化迄至っていない) 	<ul style="list-style-type: none"> DNA・RNA抽出の標準化 保存・輸送技術の一般化 	<ul style="list-style-type: none"> 保管する上での倫理規定を整備 			
共通基盤	<ul style="list-style-type: none"> バイオリソース (cDNA、微生物、動植物、モデル生物等) データベース整備(ゲノム、cDNA、SNP、ハプロタイプ、発現頻度、細胞内局在等の情報の統合化) 					

※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。



革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略の概要

<参考資料2-1>

平成19年4月

平成20年5月(改定)

平成21年2月(改定)

内閣府・文部科学省

◎厚生労働省・経済産業省

世界最高水準の医薬品・
医療機器を国民に提供

医薬品・医療機器産業を日
本の成長牽引役に

日本先行開発・日本参加の世界同時開発を目指した施策群

①研究資金の集中投入

- ・医薬品・医療機器関連予算の重点化・拡充
- ・産官学による重点開発領域等の調整組織の設置
- ・研究開発税制の充実・強化
- ・先端医療開発特区における研究資金の統合的・効率的な運用の方策の検討
- ・先端医療開発特区に関連する研究資金の重点化・集中配分等

②ベンチャー企業育成等

- ・研究資金の拡充
- ・施設や機器の共用化等
- ・企業化支援体制の整備、OB人材の活用、相談窓口の充実等
- ・エンジェル税制の活用等に関する支援施策の拡充
- ・バイオベンチャーの国際展開支援の実施
- ・国民経済上重要な新技術の企業化開発の推進
- ・審査手数料の支援検討
- ・医療機器の部材提供を活性化する方策の検討

③臨床研究・治験環境の整備

- ・国際共同治験の推進
- ・国立高度専門医療センターを中心に産官学が密接に連携して臨床研究を進める「医療クラスター」の整備
- ・橋渡し研究拠点、再生医療拠点、臨床研究体制の整備
- ・医療クラスターを中心とした治験の拠点化・ネットワーク化・IT化
- ・医師や臨床試験を支援する人材の育成・確保
- ・医師等の臨床業績評価を向上させるための取組
- ・臨床研究の規制の適正化の推進
- ・中央IRB機能等を有し、高度な国際共同研究が実施可能なグローバルな臨床研究拠点の整備
- ・先端医療開発特区における研究開発側と規制担当との開発段階からの並行協議の場の設置

④アジアとの連携

- ・重要な疾病について共同研究推進
- ・東アジアで収集されたデータの活用方法の共同研究

⑤審査の迅速化・質の向上

- ・新薬の上市までの期間を2.5年間短縮(ドラッグ・ラグの解消)
- ・審査人員を倍増・質の向上(3年間で236人増員)
- ・承認審査の在り方や基準の明確化、GCPの運用改善
- ・全ての治験相談にタイムリーに対応できる体制の整備
- ・日米欧審査当局との間での共同治験相談の導入の協議
- ・新医療機器の承認までの期間を19ヶ月短縮(デバイス・ラグの解消)
- ・医療機器審査人員の増員・質の向上(5年間で69人増員)
- ・新医療機器・改良医療機器・後発医療機器の3トラック審査体制を導入し承認審査の合理化を促進
- ・医療機器の相談業務の質・量の向上
- ・医療機器GCPの運用改善

⑥イノベーションの適切な評価

薬価制度等における革新的な製品のより適切な評価等

⑦官民対話

関係省・研究機関・産業界の連携強化

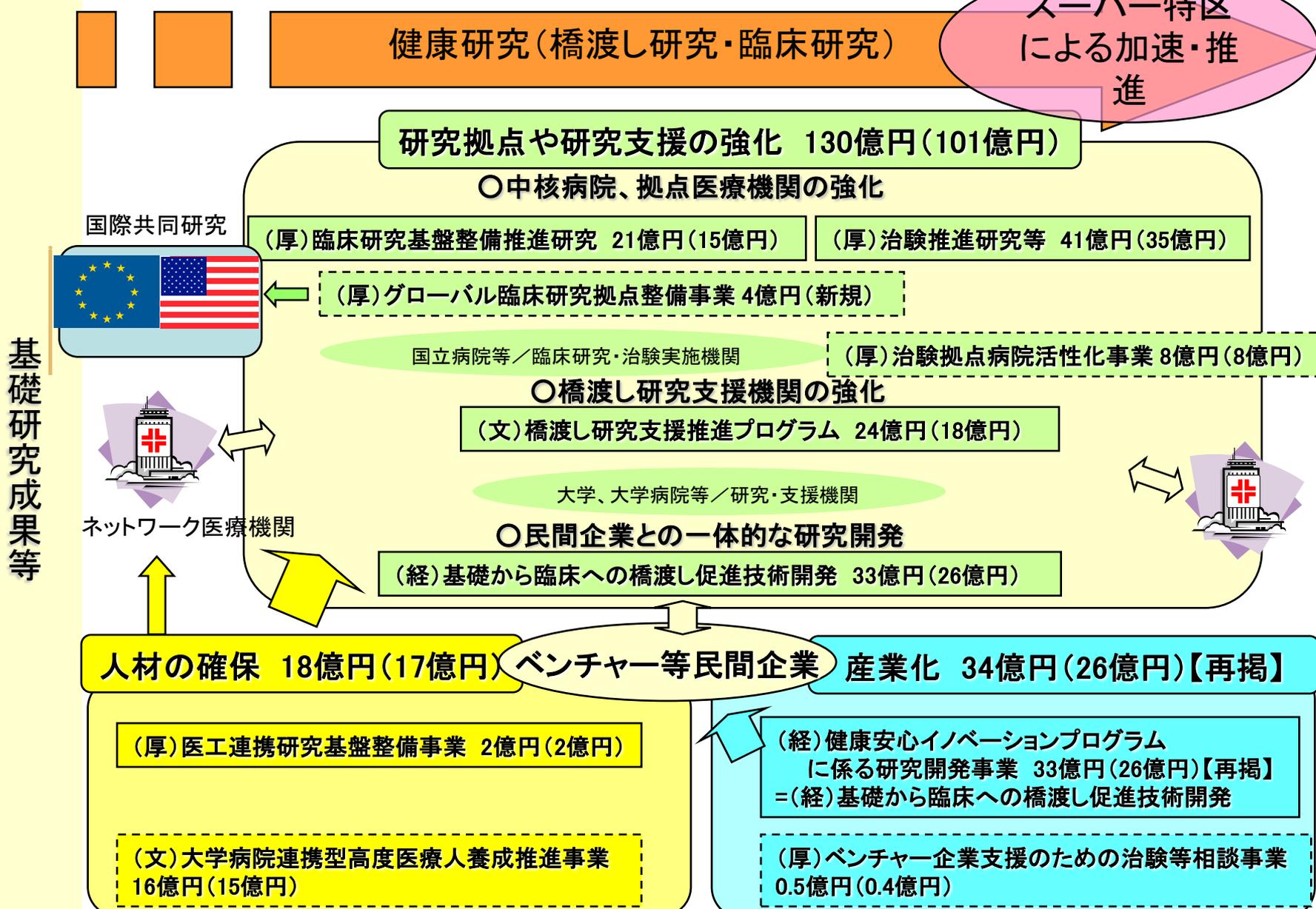
定期的な官民対話の実施

平成21年度健康研究関係施策 148億円 (118億円)

<参考資料2-2>

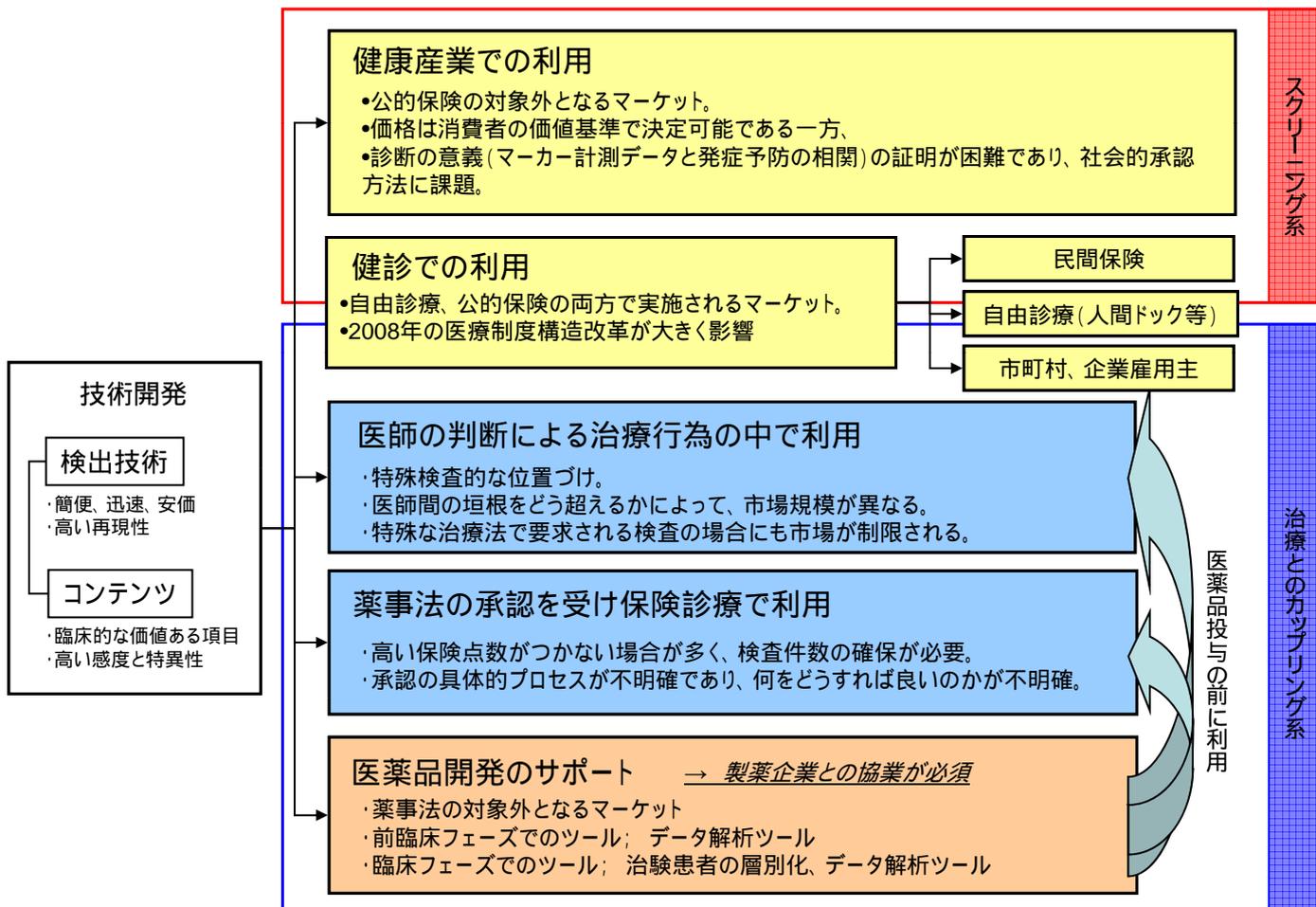
国民への画期的治療薬・医療機器・医療技術の迅速な提供

平成21年度各省予算のうち、健康研究推進研究にかかるものの額

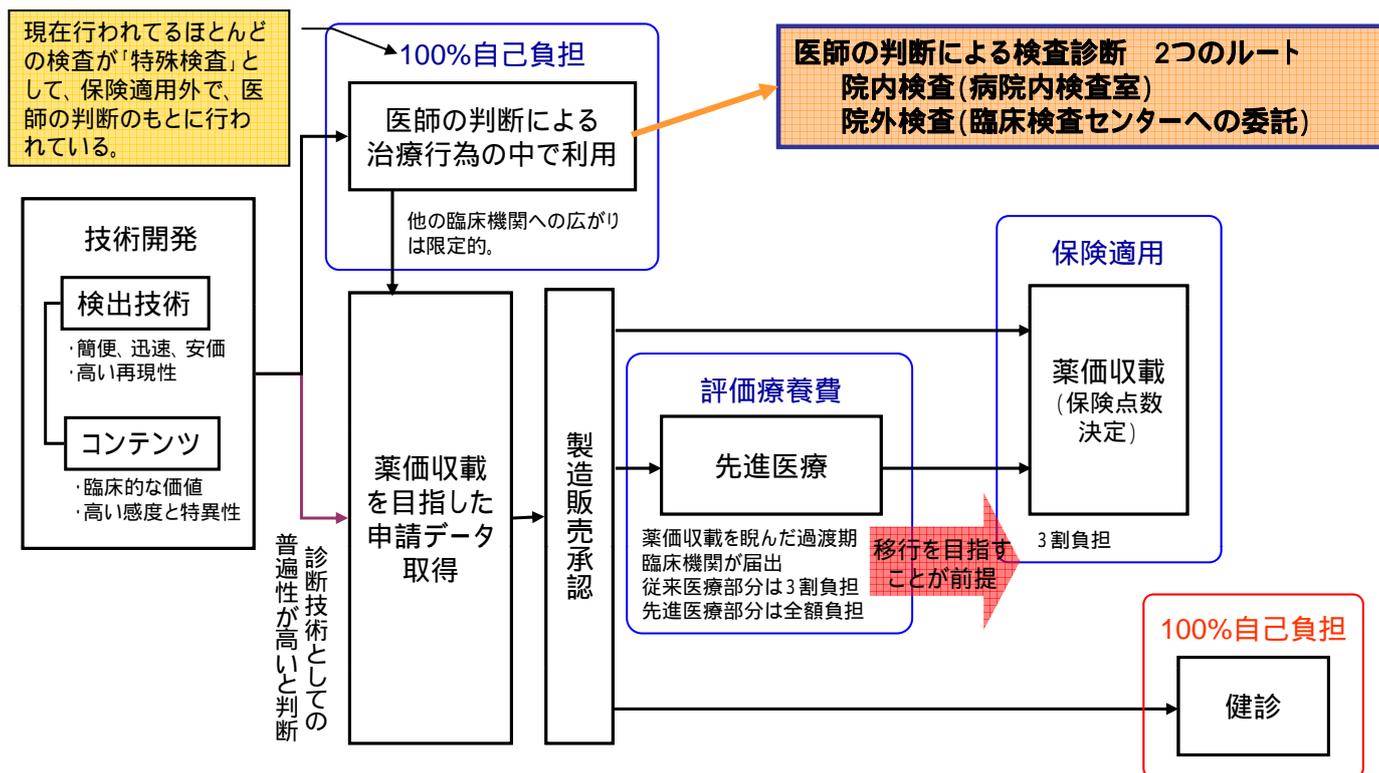


※平成21年度健康研究概算要求方針に基づく施策のうち、□:科学技術振興費 □:科学技術振興費以外。()内は、昨年度予算額。

検査診断技術のビジネスエリア



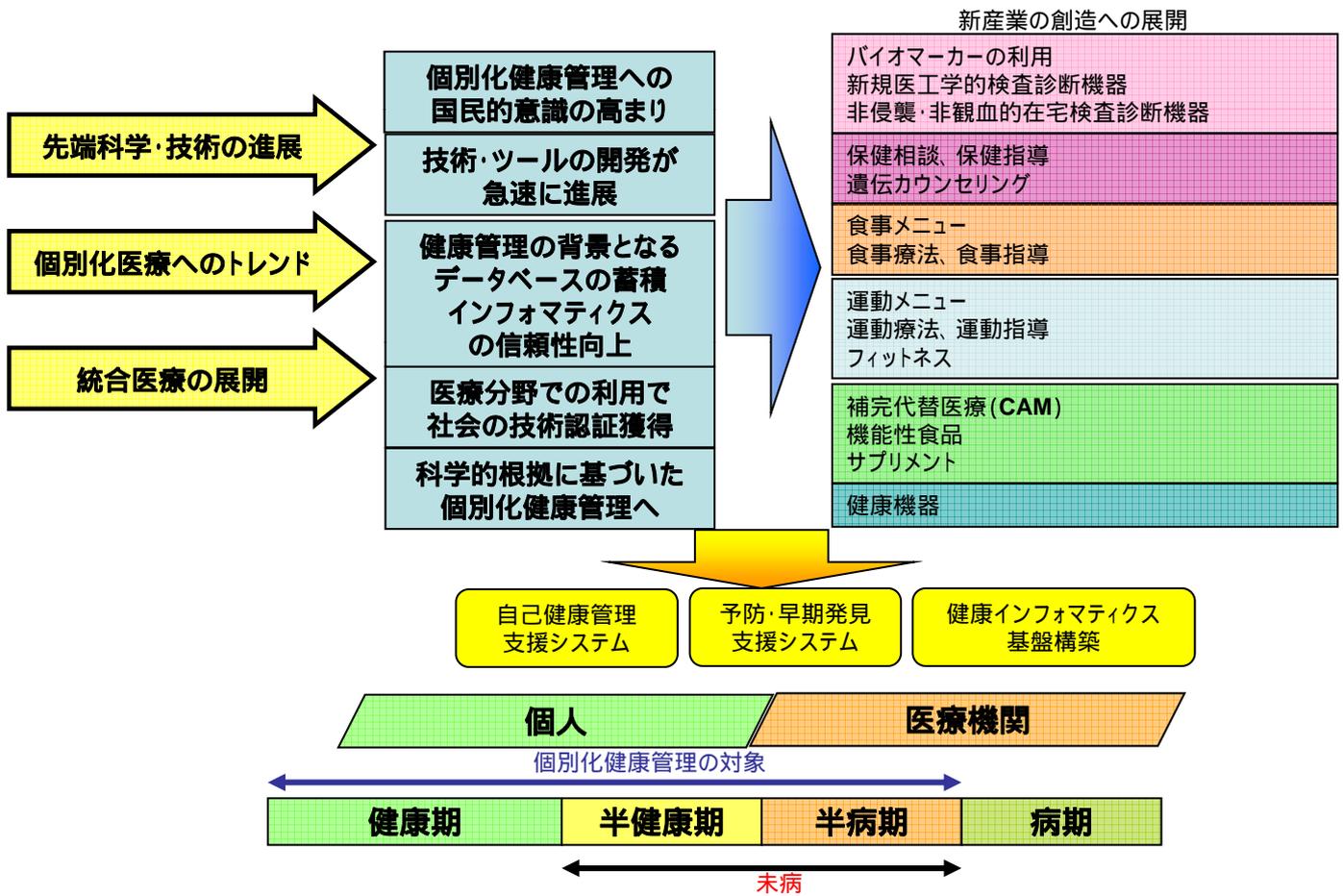
医師による臨床現場での利用



市場化までの時間



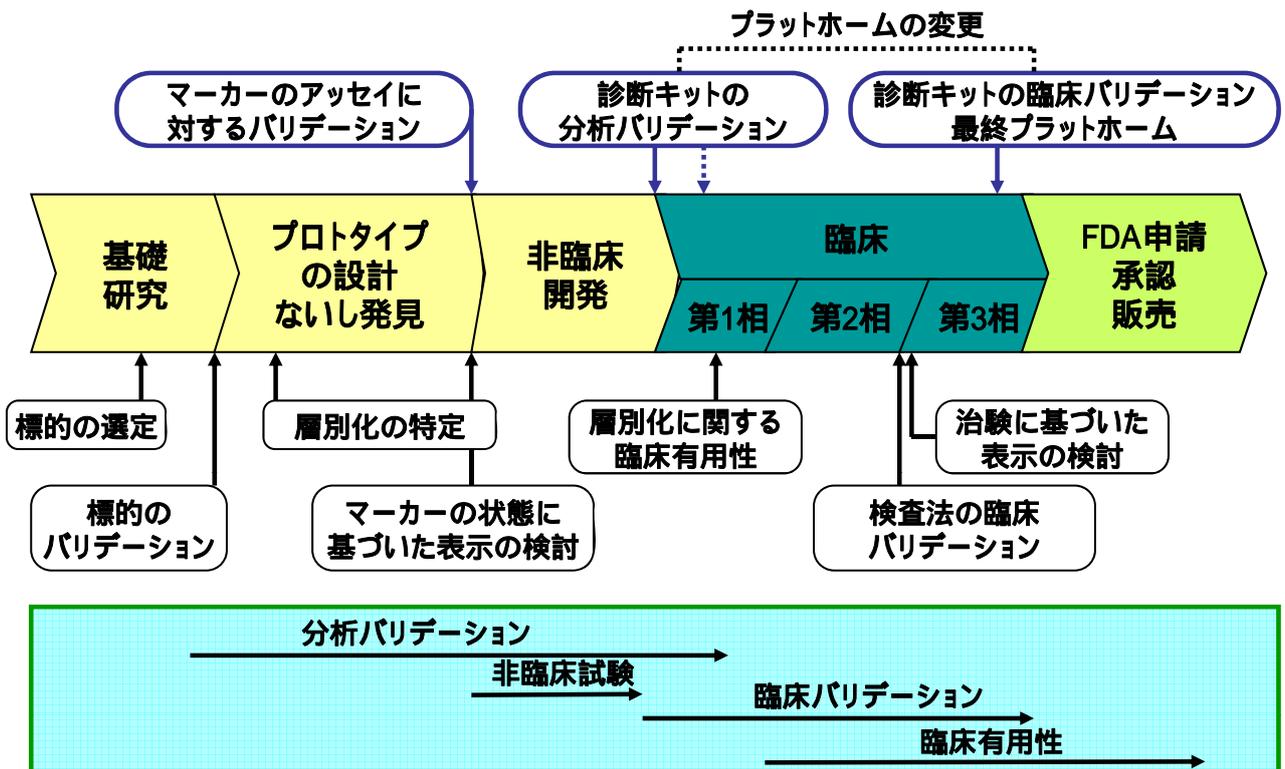
健康産業での利用



医薬品開発のサポート

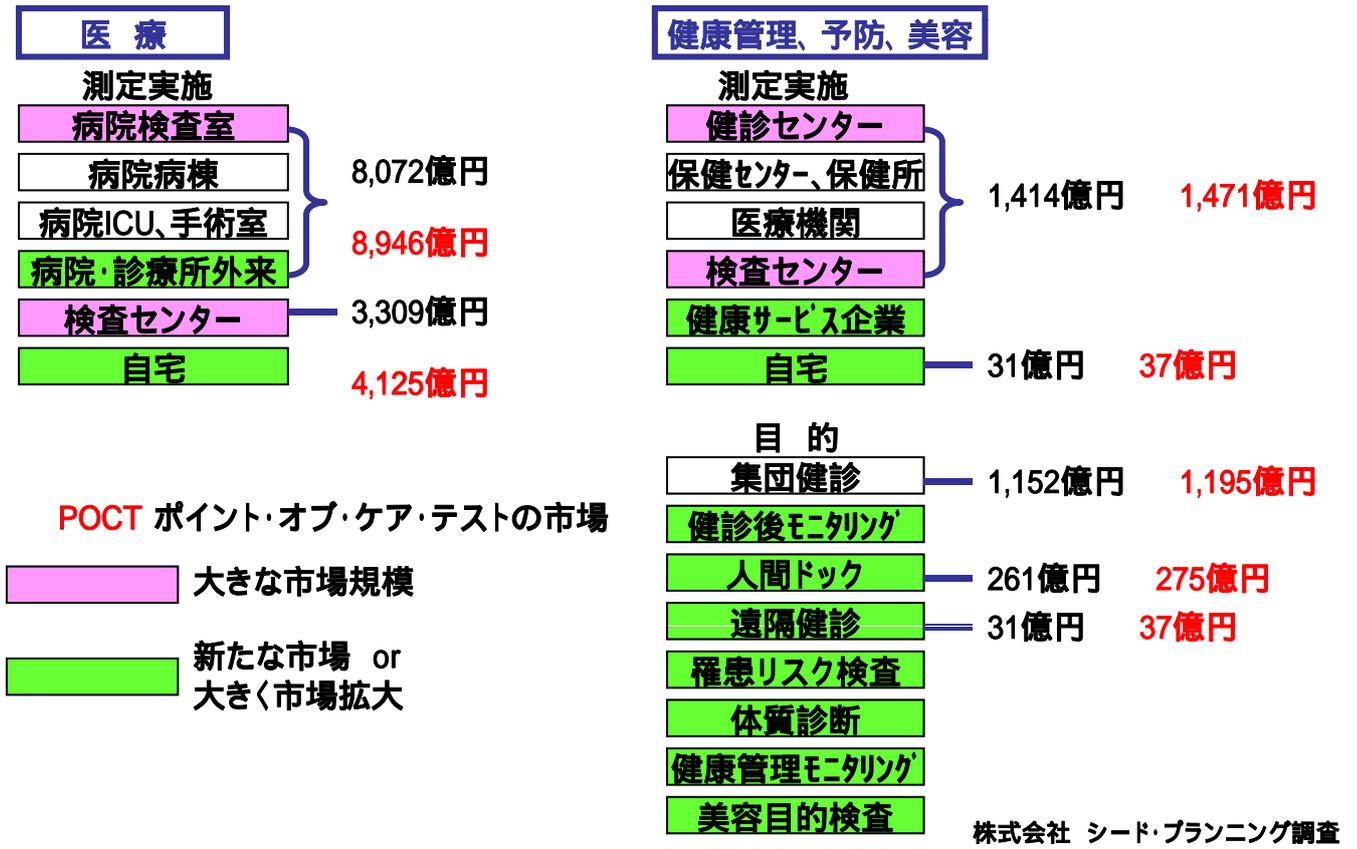
製薬企業との協業が基本

米国FDAが2005年4月のConcept Paperで提案している「医薬品と診断法の一体化開発」の考え方



検査診断市場の動向予測

(現在 10年後)



診断技術の利用場面

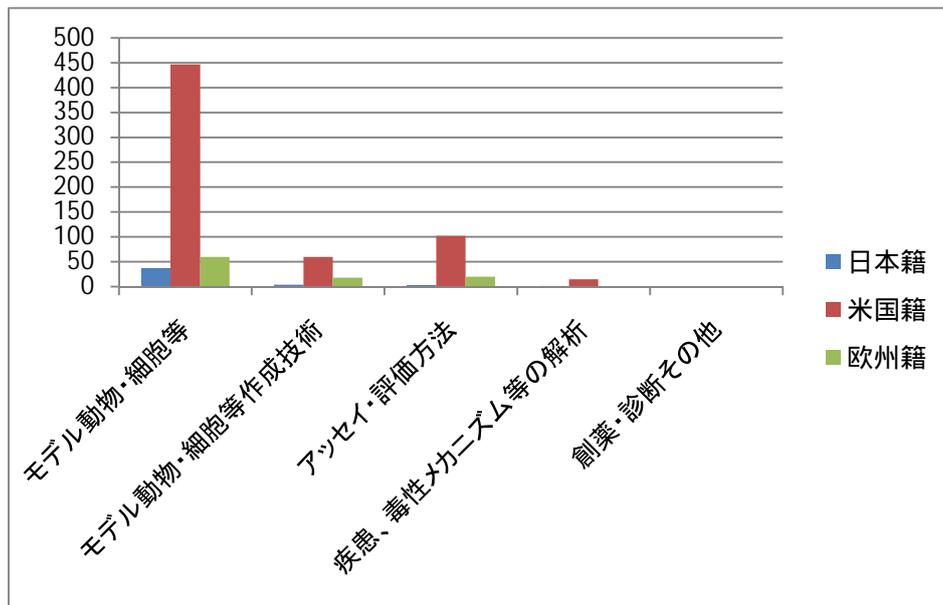
		診断の種類	試料及び測定対象	効果	診断技術	
家庭		罹患リスク診断	口内粘膜、血液など	多型	ゲノム塩基配列情報の多型による個人の体質を把握。ゲノムの多型情報及び疾患情報の相関を解明することが必要。	ゲノムシーケンス、インベーターアッセイ、DNAチップなど
		健康管理診断	汗、尿、唾液、呼気、血液など	タンパク質、二次代謝産物など	罹患リスクに基づき個人毎のリスクに応じた健康管理をサポート。	イムノアッセイ、タンパク質チップなど
医療機関での検診		健康診断 (早期発見)	血液、尿、呼気など	mRNA タンパク質、糖鎖、プロファイリングデータ	日々の健康管理や、健康診断などの定期検診に、年齢に応じた診断項目が追加され、疾患の早期発見に向けたファーストスクリーニングをサポート。	DNAチップ、イムノアッセイ、RT-PCR、質量分析装置など
		確定診断 (治療方針決定のサポート)	血液、疾患組織	mRNA、タンパク質、糖鎖、ゲノム構造など	疾患関連遺伝子の発現プロファイル解析や、疾患特異的なタンパク質などの生体分子の検出、画像情報を用いて疾患の種別や性質を特定。臨床情報との連携で最適な治療方針の決定サポート。	PET、CT、MRIなどのモダリティ 組織染色、RT-PCR、質量分析技術、DNAチップ、タンパク質チップなど
医療機関での臨床用途	薬物投与前診断	投与量	口内粘膜、血液など	多型	肝臓の薬物代謝酵素の多型等に応じた用量決定による副作用回避。	ゲノムシーケンス、イムノアッセイ、DNAチップなど
		奏功性	疾患組織	タンパク質など	薬剤の送達や取り込み能力などのトランスポーターの多型による用量決定で副作用回避。	
	予後診断	疾患組織	血液	ターゲット分子、プロファイルデータ	薬が効くか効かないかを個人毎の病状や体質に応じて選択し、投与。	イムノアッセイ、組織染色、タンパク質チップなど
			タンパク質、二次代謝産物など	治療効果や快復状態を診断し、適切な予後管理をサポート。	DNAチップ、イムノアッセイ、RT-PCR、質量分析装置など	
医薬品開発から得られた知見を活用し、診断目的にマッチしたバイオマーカーを選択						
	医薬品の開発過程	血液、疾患組織	mRNA、タンパク質、プロファイリングデータ	開発中の新薬の薬理メカニズムに基づき、薬が効く患者を選択し、臨床試験を行う。	DNAチップ、質量分析装置、タンパク質チップなど	

創薬・診断分野の国際競争ポジション

～平成 19 年度特許出願動向調査報 幹細胞関連技術～

近年 iPS 細胞で話題になっている幹細胞関連技術について、米国への産業応用特許出願を国籍別にみると、創薬・診断分野では米国籍、欧州国籍の出願が圧倒的に多いことがわかる。我が国では今後、iPS 細胞を活用した創薬ビジネス・再生医療ビジネスの創出が期待されているが、産業化へのハードルは高く出遅れた形となっている。

図 幹細胞関連技術の創薬・診断分野における国籍別出願数（米国への出願）



1980 年～2005 年（優先権主張年）のデータをもとに作成

出典：平成 19 年度特許出願動向調査報告書 幹細胞関連技術

事前評価書

	作成日	平成 16 年 6 月 4 日 平成 16 年 10 月 25 日改訂
1. 事業名称 (コード番号)	機能性 RNA プロジェクト	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>1) 概要：近年の研究成果により、タンパク質の合成に関与するメッセンジャー RNA やトランスファー RNA 等既知の RNA とは異なり、発生分化等の過程において重要な役割を果たしている RNA、すなわち機能性 RNA の存在が明らかになってきている。また、これまでのポストゲノム研究においては、ゲノム配列の数%に相当するタンパク質に関する研究が主流であったが、これまで未開拓であった残りの配列中に、ncRNA(非コード RNA: タンパク質が作られるメッセンジャー RNA 以外の RNA の総称)として細胞内で重要な役割を担う機能性 RNA の存在が示唆されており、急速な研究の展開が見込まれている。今後、再生医療や RNA 医薬等への応用につながることを期待されることから、機能性 RNA 解析のための新規ツールを開発し、機能解析を行う。</p> <p>(2) 事業規模(平成 17 年度): 6.4 億円</p> <p>(3) 事業期間: 平成 17 年度~21 年度(5 年間)</p>	
4. 評価の検討状況	<p style="text-align: center;">(1) 事業の位置付け・必要性</p> <p>機能性 RNA に関する研究は、今後、急速に進展することが期待されているが、世界的にも、これまで機能性 RNA に関する主だった国家プロジェクトは開始されていない。本プロジェクトを開始することにより、世界に先駆けて機能性 RNA の機能解明を行い、再生医療や RNA 医薬等への応用につなげていくことが必要である。また、機能性 RNA の探索や解析のための支援ツールの開発を行うことで、実用化に向けた機能性 RNA の研究開発を加速化し、我が国の国際的優位性を確保していくことが必要である。</p> <p>本プロジェクトは健康安心プログラムとして実施される。本プログラムでは、健康で安心して暮らせる社会を実現するため、疾患関連遺伝子やタンパク質等の生体分子の構造・機能の解明に基づくオーダーメイド医療・予防医療・再生医療の実現を目的としている。従来のタンパク質をコードする遺伝子の研究の発想から、タンパク質の形成に直接機能しないが細胞中で重要な機能をもつと考えられる機能性 RNA の機能解明を行う本プロジェクトは、プログラムの目的を達成するために重要かつ新たなアプローチと位置づけられる。</p>	

(2) 研究開発目標の妥当性

本プロジェクトは、再生医療や RNA 医薬等へ利用できる可能性がある機能性 RNA について、ゲノムから探索し、解析する手法及びツールを開発し、機能解析を行うものである。具体的には、機能性 RNA をゲノムから探索するバイオインフォマティクス技術の開発、機能性 RNA 解析のための支援機器・ツールの開発、機能性 RNA の機能解析、を行う。

機能解析により同定された機能性 RNA の数、機能性 RNA 解析のための支援機器・ツールの性能等について今後可能な限り具体的な目標を設定する。

(3) 研究開発マネジメント

PL を選定し、PL と協議して研究管理を行う。また、研究開発委員会を年 2~3 回開催し、研究テーマ間の連携の強化、進捗状況を踏まえた予算配分・事業計画の策定を行う。

(4) 研究開発成果

バイオ分野の研究開発は、多大なコストを要する一方、その成果を得た場合には、大きな効果を生み出す。本プロジェクトにおいては、機能性 RNA の機能を解析し、その遺伝子発現調節機構を明らかにすることにより、細胞分化誘導因子、遺伝子発現制御因子、タンパク質翻訳調節因子等の機能を持った RNA が同定され、再生医療、RNA 医薬、遺伝子治療、疾患治療等に関連して、産業応用の促進、新産業の創出が期待される。また同時に、機能性 RNA をゲノムから探し出すインフォマティクス技術、機能性 RNA を解析するための手法及びツールの開発により、機能性 RNA 解析研究が飛躍的に進むと期待される。

(5) 実用化・事業化の見通し

機能性 RNA の研究は世界的にも始まったばかりであり、実用化・事業化の見通しを評価することは困難であるが、機能性 RNA が疾病原因であることが判明した事例(軟骨毛髪形成不全)もでてきていることから、プロジェクトが成功した場合には、創薬、再生医療等において大きな効果が期待できる。

(6) その他特記事項

5. 総合評価

機能性 RNA の研究はバイオテクノロジーにおいて、まったく新しい重要な分野であり、その成果が再生医療、RNA 医薬、遺伝子治療、疾患治療等の進展につながる可能性は大きい。

本研究分野は世界的に始まったばかりであり、本プロジェクトの成果をあげるためには、基本計画の策定において、研究目標、研究内容、実施体制を十分に検討して、本プロジェクトを開始することが特に重要と認識している。

添付資料5

成果発表・論文・特許出願リスト

論文、特許、報道、講演

年度別論文、特許、報道、講演の件数一覧

年度	論文	総説、解説、著書	特許	報道	講演
平成17年度	19	17	1	0	42
平成18年度	28	26	10	6	74
平成19年度	28	6	13	10	104
平成20年度	26	31	20	9	163
平成21年度	60	21	12	5	266
計	160	101	56	29	647

1. 論文

(1) 査読のある原著論文

研究開発項目①

機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

<平成17年度>

1. Kengo Sato and Yasubumi Sakakibara
RNA secondary structural alignment with conditional random fields.
Bioinformatics, **21**, ii237-ii242 (2005)
2. Hiroshi Matsui, Kengo Sato, and Yasubumi Sakakibara
Pair stochastic tree adjoining grammars for aligning and predicting
pseudoknot RNA structures.
Bioinformatics, **21**, 2611-2617 (2005)

<平成18年度>

1. Michiaki Hamada, Koji Tsuda, Taku Kudo, Taishin Kin and Kiyoshi Asai
Mining frequent stem patterns from unaligned RNA sequences.
Bioinformatics, **22**, 2480-2487 (2006)
2. Yasuo Tabei, Koji Tsuda, Taishin Kin, and Kiyoshi Asai
SCARNA: fast and accurate structural alignment of RNA sequences by
matching fixed-length stem fragments.
Bioinformatics, **22**, 1723-1729 (2006)

3. Taishin Kin, Kouichirou Yamada, Goro Terai, Hiroaki Okida, Yasuhiko Yoshinari, Yukiteru Ono, Aya Kojima, Yuki Kimura, Takashi Komori and Kiyoshi Asai
fRNAdb: a platform for mining/annotating functional RNA candidates from non-coding RNA sequences.
Nucleic. Acids Research, **35**, Database Issue, D145-D148 (2007)
4. Hisanori Kiryu, Taishin Kin, and Kiyoshi Asai
Robust prediction of consensus secondary structures using averaged base pairing probability matrices.
Bioinformatics, **23**, 434-441 (2007)
5. Sakakibara Yasubumi , Kiyoshi Asai and Kengo Sato
Stem kernels for RNA sequence analyses.
Proc. of the 1st International Conference on Bioinformatics Research and Development (BIRD 2007), Lecture Notes in Bioinformatics (LNBI) 4414, p.278-291 (2007)

<平成19年度>

1. Hisanori Kiryu, Yasuo Tabei, Taishin Kin and Kiyoshi Asai
Murlet: A practical multiple alignment tool for structural RNA sequences.
Bioinformatics, **23**, 1588-1598 (2007)
2. Yasubumi Sakakibara, Kris Popendorf, Nana Ogawa, Kiyoshi Asai and Kengo Sato
Stem Kernels for RNA Sequence Analyses .
Journal of Bioinformatics and Computational Biology, **5** (5), 1103-22 (2007)
3. Taishin Kin and Yukiteru Ono
Idiographica: a general-purpose web application to build ideograms on demand for human, mouse and rat.
Bioinformatics, **23** (21), 2945-2946 (2007)
4. Goro Terai, Takashi Komori, Kiyoshi Asai and Taishin Kin
miRRim: A novel system to find conserved miRNAs with high sensitivity and specificity.
RNA, **13** (12), 2081-2090 (2007)

5. Hisanori Kiryu, Taishin Kin, and Kiyoshi Asai
Rfold: An exact algorithm for computing local base pairing probabilities.
Bioinformatics, **24** (3), 367-73 (2007)
6. Yasuo Tabei, Hisanori Kiryu, Taishin Kin and Kiyoshi Asai
A fast structural multiple alignment method for long RNA sequences.
BMC Bioinformatics, **9**, 33 doi:10.1186/1471-2105-9-33 (2008)
7. K. Sato, K. Morita and Y. Sakakibara
PSSMTS: position specific scoring matrices on tree structures.
Journal of Mathematical Biology, **56**, 201-214 (2008)

<平成20年度>

1. Kiyoshi Asai, Hisanori Kiryu, Michiaki Hamada, Yasuo Tabei, Kengo Sato, Hiroshi Matsui, Yasubumi Sakakibara, Goro Terai and Toutai Mituyama
Software.ncrna.org: web servers for analyses of RNA sequences.
Nucleic Acids Res., **36** (suppl 2), W75-W78 (2008)
2. Michiaki Hamada, Hisanori Kiryu, Kengo Sato, Toutai Mituyama and Kiyoshi Asai
Predictions of RNA secondary structure using generalized centroid estimators.
Bioinformatics, **25** (4), 465-473 (2009)
3. Michiaki Hamada, Mituyama Toutai and Kiyoshi Asai,
Large Scale Similarity Search for Locally Stable Secondary Structures among RNA Sequences.
IPSJ transaction on Bioinformatics, **2**, 36-46 (2008)
4. M. Morita, Y. Saito, K. Sato, K. Oka, K. Hotta, and Y. Sakakibara
Genome-wide searching with base-pairing kernel functions for non-coding RNAs: computational and expression analysis of snoRNA families in *Caenorhabditis elegans*.
Nucleic Acids Res., **37** (3), 999-1009 (2009)
5. K. Sato, T. Mituyama, K Asai, and Y. Sakakibara
Directed acyclic graph kernels for structural RNA analysis.
BMC Bioinformatics, **9**, 318 (2008)

6. Mituyama, T., Yamada, K., Hattori, E., Okida, H., Ono, Y., Terai, G., Yoshizawa, A., Komori, T. and Asai, K.
The Functional RNA Database 3.0: databases to support mining and annotation of functional RNAs.
Nucleic Acids Res, **39** (Database Issue), D89-92 (2009)

<平成21年度>

1. Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and Kiyoshi Asai
CentroidAlign: Fast and Accurate Aligner for Structured RNAs by Maximizing Expected Sum-of-Pairs Score.
Bioinformatics, **25**, 3236-3243 (2009)
2. Kengo Sato, Michiaki Hamada, Kiyoshi Asai and Toutai Mituyama
CentroidFold: a web application for RNA secondary structure prediction.
Nucleic Acids Res., **37** (suppl 2), W277-280 (2009)
3. Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and Kiyoshi Asai
Predictions of RNA secondary structure by combining homologous sequence information,
Bioinformatics, **25** (12), i330-i338 (2009)
4. Goro Terai, Aya Yoshizawa, Hiroaki Okida, Kiyoshi Asai and Toutai Mituyama
Discovery of short pseudogenes derived from messenger RNAs.
Nucleic Acids Res., **38** (4), 1163-1171 (2010)
5. Okada, Y., Sato, K., and Sakakibara, Y.
Improvement of structure conservation index with centroid estimators.
Proceedings of Pacific Symposium on Biocomputing 2010, **15**, 88-97 (2010)
6. Sato, K., Hamada, M., Mituyama, T., Asai, K., Sakakibara, Y.
A non-parametric Bayesian approach for predicting RNA secondary structures.
Proceedings of 9th Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI 2009), Philadelphia, USA, 2009
7. Sato, K., Saito, Y. and Sakakibara, Y.
Gradient-based optimization of hyperparameters for base-pairing profile local

alignment kernels.

Genome Inform., **23**, 128-138 (2009)

8. Yasuo Tabei and Kiyoshi Asai

A local multiple alignment method for detection of non-coding RNA sequences.

Bioinformatics, **25** (12), 1498-1505 (2009)

9. Kuniaki Saito, Sachi Inagaki, Toutai Mituyama, Yoshinori Kawamura,
Yukiteru Ono, Eri Sakota, Hazuki Kotani, Kiyoshi Asai, Haruhiko Siomi and
Mikiko C Siomi

A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in Drosophila.

Nature, **461** (7268), 1296-1299 (2009)

研究開発項目②

機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

<平成17年度>

1. Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T. and Ueda, T.
Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase.
J. Biol. Chem., **280**, 19721-19727 (2005)
2. Sakurai, M., Ohtsuki, T., Suzuki, T. and Watanabe, K.
Unusual usage of wobble modification in mitochondrial tRNAs of the nematode *Ascaris suum*.
FEBS Lett., **579**, 2767-2772 (2005)
3. Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Holt, I.J., Jacobs, H.T., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T. and Watanabe, K.
Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases.
FEBS Lett., **579**, 2948-2952 (2005)
4. Kirino, Y., Goto, Y., Campos, Y., Arenas, J. and Suzuki, T.
Specific correlation between tRNA taurine-modification deficiency and clinical features of human mitochondrial disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **102**, 7127-7132 (2005)
5. Nakanishi, K., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Soma, A., Sekine, Y., Suzuki, T. and Nureki, O.
Structural basis for lysidine formation by ATP pyrophosphatase accompanied with a lysine-specific loop and a tRNA-recognition domain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **102**, 7487-7492 (2005)
6. Zhang, L., Ching Ging, N., Komoda, T., Hanada, T., Suzuki, T. and Watanabe, K.
Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation.
FEBS Lett., **579**, 6423-6427 (2005)
7. Chimnaronk, S., Jeppesen, M.G., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K.
Dual Mode Recognition of noncanonical tRNAs^{Ser} by seryl-tRNA synthetase in

- mammalian mitochondria.
EMBO J., **24**, 3369–3379 (2005)
8. Ote, T., Hashimoto, M., Ikeuchi, Y., Suetsugu, M., Suzuki, T., Katayama, T. and Kato, J.
Involvement of the Escherichia coli folate-binding protein YgfZ in RNA modification and regulation of chromosomal replication initiation.
Mol. Microbiol., **59**, 265-275 (2005)
 9. Ikeuchi, Y., Soma, A., Ote, T., Kato, J., Sekine, Y. and Suzuki, T.
Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition.
Mol. Cell., **19**, 235-246 (2005)
 10. Numata, T., Fukai, S., Ikeuchi, Y., Suzuki, T. and Nureki, O.
Structural basis for sulfur relay to RNA mediated by heterohexameric TusBCD complex.
Structure, **14**, 357-366 (2006)
 11. Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A. and Suzuki, T.
Mechanistic insights into sulfur-relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions.
Mol. Cell., **21**, 97-108 (2006)
 12. Shigi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. and Watanabe, K.
Identification of two tRNA-thiolation genes required for cell growth at extremely high temperatures.
J. Biol. Chem., **281**, 14296-14306 (2006)
 13. Kirino, Y., Yasukawa, T., Marjavaara, S.K., Jacobs, H.T., Holt, I.J., Watanabe, K. and Suzuki, T.
Acquisition of the wobble modification in mitochondrial tRNA^{Leu}(CUN) bearing the G12300A mutation suppresses the MELAS molecular defect.
Hum. Mol. Genet., **15**, 897-904 (2006)
 14. Takano, Y., Takayanagi, N., Hori, H., Ikeuchi, Y., Suzuki, T., Kimura, A. and Okuno, T.
A gene involved in modifying transfer RNA is required for fungal pathogenicity

and stress tolerance of *Colletotrichum lagenarium*.

Mol. Microbiol., **60**, 81-92 (2006)

15. Shigi, N., Suzuki, T., Terada, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S. and Watanabe, K.
Temperature-dependent biosynthesis of 2-thioribothymidine of *Thermus thermophilus* tRNA.
J. Biol. Chem., **281**, 2104-2113 (2006)

<平成18年度>

1. Noma, A., Kirino, Y., Ikeuchi, Y. and Suzuki, T.
Biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA.
EMBO J., **25**, 2142-2154 (2006)
2. Takeda, H., Toyooka, T., Ikeuchi, Y., Yokobori, S., Okadome, K., Takano, F., Oshima, T., Suzuki, T., Endo, Y. and Hori, H.
The substrate specificity of tRNA (m1G37) methyltransferase (TrmD) from *Aquifex aeolicus*.
Genes Cells, **11**, 1353-1365 (2006)
3. Komoda, T., Sato, N.S., Phelps, S.S., Namba, N., Joseph, S. and Suzuki, T.
The A-site finger in 23S rRNA acts as a functional attenuator for translocation.
J. Biol. Chem., **281**, 32303-32309 (2006)
4. Sato, A., Watanabe, Y., Suzuki, T., Komiyama, M., Watanabe, K. and Ohtsuki, T.
Identification of the residues involved in the unique serine specificity of *Caenorhabditis elegans* mitochondrial EF-Tu2.
Biochemistry, **45**, 10920-10927 (2006)
5. Sato, N.S., Hirabayashi, N., Agmon, I., Yonath, A. and Suzuki, T.
Comprehensive genetic selection revealed essential bases in the peptidyl-transferase center.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **103**, 15386-15391 (2006)
6. Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Suzuki, T. and Nureki, O.
Snapshots of tRNA sulfuration via an adenylated intermediate
Nature, **442**, 419-424 (2006)

7. Guan, M.X., Yan, Q., Li, X., Bykhovskaya, Y., Gallo-Teran, J., Hajek, P., Umeda, N., Zhao, H., Garrido, G., Mengesha, E., Suzuki, T., del Castillo, I., Peters, J. L., Li, R., Qian, Y., Wang, X., Shohat, M., Estivill, X., Watanabe, K. and Fischel-Ghodsian, N.
Mutation in TRMU related to mitochondrial tRNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutations.
Am. J. Hum. Genet., **79**, 291-302 (2006)
8. Hirabayashi, N., Sato, N.S. and Suzuki, T.
Conserved loop sequence of helix 69 in *Escherichia coli* 23S rRNA is involved in A-site tRNA binding and translational fidelity.
J. Biol. Chem., **281**, 17203-17211 (2006)
9. Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Suzuki, T. and Nureki, O.
Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tRNA thiolation enzyme MnmA from *Escherichia coli* complexed with tRNA(Glu).
Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., **62** (Pt 4), 368-371 (2006)
10. Noma, A. and Suzuki, T.
Ribonucleome analysis identified enzyme genes responsible for wybutosine synthesis.
Nucleic Acids Symp. Ser., **50**, 65-66 (2006)
11. Kitahara, K., Sato, N. S., Namba, N., Yokota, T., Tsujimura, T. and Suzuki, T.
Systematic deletion of rRNAs for investigating ribosome architecture and function.
Nucleic Acids Symp. Ser., **50**, 287-288 (2006)
12. Miyauchi, K., Tomoya, O. and Suzuki, T.
Automated parallel isolation of multiple species of non-coding RNAs by the reciprocal circulating chromatography method.
Nucleic Acids Res., **35**, e24 (2007)
13. Katoh, T. and Suzuki, T.

Specific residues at every third position of siRNA shape its efficient RNAi activity.

Nucleic Acids Res., **35**, e27 (2007)

14. Yoshimura, Y., Noguchi, Y., Sato, H. and Fujimoto, K.
Template-Directed DNA Photoligation in Rapid and Selective Detection of RNA Point Mutations.
ChemBioChem , **7**, 598 – 601 (2006)
15. Yoshimura, Y., Noguchi, Y. and Fujimoto, K.
Highly sequence specific RNA terminal labeling by DNA photoligation.
Org. Biomol. Chem., **5**, 139 (2007)
16. Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo
Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy.
Anal. Biochemistry, **350**, 196-201 (2006)
17. Yasutomo Nomura, Hirobumi Fuchigami, Hiroaki Kii, Zhonggang Feng, Takao Nakamura and Masataka Kinjo
Quantification of size distribution of restriction fragments in mitochondrial genome using fluorescence correlation spectroscopy.
Experimental Mol. Pathology, **80**, 275-278 (2006)

<平成19年度>

1. Ohara, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ueda, H., Miyauchi, K. and Suzuki, T.
The 3'-termini of mouse piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated.
Nature Struct. Mol. Biol., **14**, 349-350 (2007)
2. Kitahara, K., Kajiura, A., Sato, N.S. and Suzuki, T.
Functional genetic selection of Helix 66 in Escherichia coli 23S rRNA identified the eukaryotic class of binding sequences for ribosomal protein L2.
Nucleic Acids Res., **35**, 4018-4029 (2007)
3. Suzuki, T., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T.
Mass spectrometric analysis of 3'-terminal nucleosides in non-coding RNAs

4. Dunham, C.M., Selmer, M., Phelps, S.S., Suzuki, T., Joseph, S. and Ramakrishnan, V.
Structures of tRNAs with an expanded anticodon loop in the decoding center of the 30S Ribosomal Subunit.
RNA, **13**, 817-823 (2007)
5. Nakai, Y., Nakai, M., Lill, R., Suzuki, T. and Hayashi, H.
Thio modification of yeast cytosolic tRNA is an iron-sulfur protein-dependent pathway.
Mol. Cell. Biol., **27**, 2841-2847 (2007)
6. Shiba, Y., Masuda, H., Watanabe, N., Ego, T., Takagaki, K., Ishiyama, K., Ohgi, T. and Yano, J.
Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate.
Nucleic Acids Res., **35**, 3287-3296 (2007)
7. Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T. and Hoshino, S.
Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases.
Genes Dev., **21**, 3135-3148 (2007)
8. Tsutsumi, S., Sugiura, R., Ma, Y., Tokuoka, H., Ohta, K., Ohte, R., Noma, A., Suzuki, T. And Kuno, T.
Wobble inosine tRNA modification is essential for cell cycle progression in G1/S and G2/M transitions in fission yeast.
J. Biol. Chem., **282**, 33459-33465 (2007)
9. Suzuki, Y., Noma, A., Suzuki, T., Senda, M., Senda, T., Ishitani, R. and Nureki, O
Crystal structure of the radical SAM enzyme catalyzing tricyclic modified base formation in tRNA.
J. Mol. Biol., **372**, 1204-1214 (2007)

10. Yokoyama, T. and Suzuki, T.
Ligand-induced translation by the allosteric ribosome bearing an aptamer-fused rRNA
Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf), **51**, 383-384 (2007)
11. Nagao, A., Suzuki, T. and Suzuki, T.
Aminoacyl-tRNA surveillance by EF-Tu in mammalian mitochondria.
Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf), **51**, 41-42 (2007)
12. Tomita, K., Numata, T. Fukai, T., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O.
Animated Crystallography of Genetic Code Translation.
Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf), **51**, 101-102. (2007)
13. Shiba, Y., Masuda, H., Watanabe, N., Ego, T., Takagaki, K., Ishiyama, K., Ohgi, T. and Yano, J.
Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate.
Nucleic Acids Res., **35**, 3287-3296 (2007)
14. Hiroaki Kii, Takuya Takagi, Akira Sasaki, Takaharu Okajima and Masataka Kinjo.
DNA Microstructure Based on Self-Assembly of 4-Sticky-End Holiday Junctions in Aqueous Solution.
J. Nanoscience Nanotechnology, **7**, 726-729 (2007)
15. Masafumi Shimizu, Satoshi Sasaki and Masataka Kinjo
Triplet Fraction Buildup Effect of the DNA-YOYO Complex Studied with Fluorescence Correlation Spectroscopy.
Anal. Biochem., **336** (1), 87-92 (2007)

<平成20年度>

1. Yoshimura, Y. and Fujimoto, K.
Ultrafast Reversible Photocrosslinking Reaction: Toward in Situ DNA Manipulation.
Org. Lett., **10** (15), 3227-3232 (2008)

2. Yoshimura, Y. Ozaki, G. and Fujimoto, K.
Development of template-directed reversible photocrosslinking reaction.
Nucleic Acids Symp. Ser., **52**, 423-424 (2008)
3. S. Nagata, Y. Enya, Y. Masutomi, H. Kitagawa, K. Takagaki, N. Oka, T. Wada,
T. Ohgi and J. Yano
Chemical synthesis of diastereomeric diadenosine boranophosphates (ApbA)
from 2'-O-(2-cyanoethoxymethyl) adenosine by the boranophosphotriester
method.
Bioorganic Medicinal Chemistry, **16** (20), 9154-9160 (2008)
4. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T.
and Suzuki, T.
Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3'-adenylation mediated
by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2.
Genes Dev., **23**, 433-438 (2009)
5. Ogata, T., Shimazaki, T., Umemoto, T., Kurata, S., Ohtsuki, T., Suzuki, T. and
Wada, T.
Chemical synthesis and properties of 5-aurinomethyluridine and
5-aurinomethyl-2-thiouridine.
J. Org. Chem., **74**, 2585-2588 (2009)
6. Noma, A., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T.
Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic
2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions.
Nucleic Acids Res., **37**, 1335-1352 (2009)
7. Shigi, N., Sakaguchi, Y., Asai, S., Suzuki, T. and Watanabe, K.
Common Sulfur Transfer System for the Biosyntheses of Sulfur-containing
tRNA and Cofactors.
EMBO J., **27**, 3267-3278 (2008)
8. Ikeuchi, Y., Kitahara, K. and Suzuki, T.
The RNA acetyltransferase driven by ATP hydrolysis synthesizes
N4-acetylcytidine of tRNA anticodon.
EMBO J., **27**, 2194-2203 (2008)

9. Yokoyama, T. and Suzuki, T.
Ribosomal RNAs are tolerant toward genetic insertions: Evolutionary origin of the expansion segments.
Nucleic Acids Res., **36**, 3539-3551 (2008)
10. Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Shimazaki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K. Ramakrishnan, V. and Suzuki, T.
Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U.G wobble pairing during decoding.
J. Biol. Chem., **283**, 18801-18811 (2008)
11. Nagaike, T., Suzuki, T. and Ueda, T.
Polyadenylation in mammalian mitochondria: Insights from recent studies.
Biochim. Biophys. Acta, **1779**, 266-269 (2008)
12. Iwamoto, N., Oka, N., and Wada, T.
Stereocontrolled synthesis of backbone-modified oligonucleotides via diastereopure H-phosphonate intermediates.
Nucleic Acids Symp. Ser., **52**, 333-334 (2008)
13. Oka, N., Yamamoto, M., Sato, T., and Wada, T.
Stereocontrolled synthesis of oligonucleoside phosphorothioates and PO/PS-chimeric oligonucleotides by using oxazaphospholidine derivatives.
Nucleic Acids Symp. Ser., **52**, 335-336 (2008)

<平成21年度>

1. Iwamoto, N., Oka, N., Sato, T., Wada, T.
Stereocontrolled Solid-phase Synthesis of Oligonucleoside H-phosphonates by an Oxazaphospholidine Approach.
Angew. Chem. Int. Ed., **48**, 496-499, 2009
2. Oka, N., Kondo, T., Fujiwara, S., Maizuru, Y., and Wada, T.
Stereocontrolled Synthesis of Oligoribonucleoside Phosphorothioates by an Oxazaphospholidine Approach.
Org. Lett., **11**, 967-970 (2009)
3. Higashida, R., Oka, N., Kawanaka, T., and Wada, T.
Nucleoside H-Boranophosphonates: a New Class of Boron-Containing Nucleotide Analogues.

- Chem. Commun., **14** (18), 2466-2468 (2009)
4. Oka, N., Nakamura, M., Soeda, N., and Wada, T.
Stereocontrolled synthesis of tertiary silanes via optically pure 1,3,2-oxazasilolidine derivatives.
J. Organomet. Chem., **694**, 2171-2178 (2009)
 5. Oka, N., Higashida, R., Takayama, Y., Ando, K., and Wada, T.
Chemical synthesis of nucleoside H-boranophosphonates and their application as precursors of P-modified nucleotide analogues.
Nucleic Acids Symp. Ser., **53**, 111-112 (2009)
 6. Ikeuchi Y, Kimura S, Numata T, Nakamura D, Yokogawa T, Ogata T, Wada T, Suzuki T, and Suzuki T.
Agmatine-conjugated cytidine in a tRNA anticodon is essential for AUA decoding in archaea.
Nat. Chem. Biol., in press, 2010
 7. Akira Sasaki and Masataka Kinjo
Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties.
J. Controlled Release, **143**, 104–111 (2010)
 8. Yoshinaga Yoshimura, Tomoko Ohtake, Hajime Okada and Kenzo Fujimoto
A new approach for reversible RNA photocrosslinking reaction: application to sequence-specific RNA selection.
Chem. Bio. Chem., **10**, 1473 (2009)
 9. Masayuki Ogino, Yuuta Taya and Kenzo Fujimoto
Detection of methylcytosine by DNA photoligation via hydrophobic interaction of the alkyl group.
Org. Biomol. Chem., **7**, 3163 (2009)
 10. Yoshinaga Yoshimura, Hajime Okada and Kenzo Fujimoto
Photoreversible DNA end capping for the formation of hairpin structures.
Org. Biomol. Chem., **8**, 1523 (2010)

11. Ikeuchi, Y., Kimura, S., Numata, T., Nakamura, D., Yokogawa, T., Ogata, T., Wada, T., Suzuki, T. and Suzuki, T.
Agmatine-conjugated cytidine in tRNA anticodon essential for AUA decoding in archaea.
Nat. Chem. Biol., **6**, 277-282 (2010)
12. Suzuki, T. and Miyauchi, K.
Discovery and characterization of tRNA^{Leu} lysidine synthetase (TilS).
FEBS Lett., **584**, 272-277 (2010)
13. Kimura, S. and Suzuki, T.
Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA.
Nucleic Acids Res., **38**, 1341-1352 (2010)
14. Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., and Nakatsuji, N. and Chuma, S.
The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline Germline.
Dev. Cell, **17**, 775-787 (2009)
15. Nakanishi, K., Bonnefond, L., Kimura, S., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O.
Structural basis for translational fidelity ensured by tRNA lysidine synthetase.
Nature, **461**, 1144-1148 (2009)
16. Messmer, M., Pütz, J., Suzuki, T., Suzuki, T., Sauter, C., Sissler, M. and Florentz, C.
3D-structure of mammalian mitochondrial tRNA^{Asp} revealed by solution probing and phylogeny.
Nucleic Acids Res., **37**, 6881-6895 (2009)
17. Umitsu, M., Nishimasu, H., Noma, A., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O.
Structural basis of AdoMet-dependent aminocarboxypropyl transfer reaction catalyzed by tRNA-wybutosine synthesizing enzyme, TYW2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **106**, 15616-15621 (2009)

18. Nagao, A., Suzuki, T., Katoh, T., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T.
Biogenesis of glutaminyl-tRNAGln in human mitochondria.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **106**, 16209-16214 (2009)
19. Valente, L., Shigi, N., Suzuki, T. and Zeviani, M.
The R336Q mutation in human mitochondrial EFTu prevents the formation of
an active mt-EFTu•GTP•aa-tRNA ternary complex.
Biochim Biophys Acta., **1792**, 791-795 (2009)
20. Awai, T., Kimura, S., Tomikawa, C., Ochi, A., Ihsanawati, Bessho, Y.,
Yokoyama, S., Ohno, S., Nishikawa, K., Yokogawa, T., Suzuki, T. and Hori, H.
Aquifex aeolicus tRNA (N2, N2-guanine)-dimethyltransferase (Trm1) catalyzes
transfer of methyl groups not only to guanine 26 but also to guanine 27 in
tRNA.
J. Biol. Chem., **284**, 20467-20478 (2009)
21. Kitahara, K. and Suzuki, T.
The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome
biogenesis.
Mol. Cell., **34**, 760-766 (2009)
22. Suzuki, Y., Noma, A., Suzuki, T., Ishitani, R. and Nureki, O.
Structural basis of tRNA modification with CO₂ fixation and methylation by
wybutosine synthesizing enzyme TYW4.
Nucleic Acids Res., **37**, 2910-2925 (2009)
23. Chimnarong, S., Suzuki, T., Manita, T., Ikeuchi, Y., Yao, M., Suzuki, T. and
Tanaka, I.
RNA helicase module in an acetyltransferase that modifies a specific tRNA
anticodon.
EMBO J., **28**, 1362-1373 (2009)

研究開発項目③
機能性RNAの機能解析

<平成17年度>

1. Hokii, Y., Kubo, A., Ogasawara, T., Nogi, Y., Taneda, A., Arai, R., Muto, A. and Ushida, C. Twelve novel *C. elegans* RNA candidates isolated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
Gene, **365**, 83-87 (2006)
2. Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, and Siomi MC.
Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation.
Genes Dev., **19**, 2837-2848 (2005)

<平成18年度>

1. Hirose, T., Ideue, T., Nagai, M., Hagiwara, M., Shu, MD. and Steitz, JA.
A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing.
Molecular Cell, **23**, 673-684 (2006)
2. Sasaki, Y.T.F., Sano, M., Kin, T., Asai, K. and Hirose, T.
Coordinated expression of ncRNAs and HOX mRNAs in the human HOXA locus.
Biochem. Biophys. Res. Comm., **357**, 724-730 (2007)
3. Ideue, T., Sasaki, Y., Hagiwara, M. and Hirose, T.
Introns play an essential role in splicing-dependent formation of the exon junction complex
Genes Dev., **21**, 1993-1998 (2007)
4. Nojima, T., Hirose, T., Kimura, H. and Hagiwara, M.
The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export.
J. Biol. Chem., **282**, 15645-51 (2007)
5. Fukumura, K., Kato, A., Jin, Y., Ideue, T., Hirose, T., Kataoka, N., Fujiwara, T., Sakamoto, H. and Inoue, K.
Tissue-specific splicing regulator Fox-1 induces exon skipping by interfering E

- complex formation on the downstream intron of human F1 gene.
Nucleic Acids Res., **35**, 5303-5311 (2007)
4. Saito, K., Nishida, KM., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H. And Siomi, MC..
Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome.
Genes Dev., **20**, 2214-2222 (2006)
 5. Gunawardane, LS., Saito, K., Nishida, KM., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H. and Siomi, MC.
A Slicer-mediated mechanism for rasiRNA 5' end formation in Drosophila.
Science, **16**, 1587-1590 (2007)
 6. Numata, K., Okada, Y., Saito, R., Kiyosawa, H., Kanai, A. And Tomita, M.
Comparative analysis of cis-encoded antisense RNAs in eukaryotes.
Gene, **392** (1-2), 134-141 (2007)

<平成19年度>

1. Sasaki, Y.T.F., Sano, M., Ideue, T., Kin, T., Asai, K. and Hirose, T.
Identification and characterization of human non-coding RNAs with tissue-specific expression.
Biochem. Biophys. Res. Comm., **357**, 991-996 (2007)
2. Siomi, H. and Siomi, MC.
Expanding RNA physiology: microRNAs in a unicellular organism.
Genes Dev., **21**, 1153-1156 (2007)
3. Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H. and Siomi, MC.
Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends.
Genes Dev., **21**, 1603-1608 (2007)
4. Nishida, KM., Saito, K., Mori, T., Kawamura, Y., Nagami-Okada, T., Inagaki, S., Siomi, H. and Siomi, MC.
Gene silencing mechanisms mediated by Aubergine-piRNA complexes in Drosophila male gonad.
RNA, **13**, 1911-1922 (2007)

5. Masato Nakagawa, Michiyo Koyanagi, Koji Tanabe, Kazutoshi Takahashi, Tomoko Ichisaka, Takashi Aoi, Keisuke Okita, Yuji Mochiduki, Nanako Takizawa and Shinya Yamanaka.
Generaion of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.
Nature Biotechnology, **26**, 101-106 (2008)

<平成20年度>

1. Sasaki, Y.T., Ideue, T., Sano, M., Mituyama, T. And Hirose, T.
MENε/β noncoding RNAs are structural integrator of the nuclear body, paraspeckle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **106**, 2525-2530 (2009)
2. Sasano, Y., Hokii, Y., Inoue, K., Sakamoto, H., Ushida, C. And Fujiwara, T.
Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*.
Biochimie, **90**, 898-907 (2008)
3. Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada TN., Siomi, MC. and Siomi, H.
Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells.
Nature, **453**, 793-797. 2008
4. Azuma AM, Oguri H, Kin T, Qian ZR, Asai K, Siomi H and Siomi MC.
Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **105**, 7964-7969 (2008)
5. Okada, Y., Tashiro, C., Numata K., Watanabe, K., Nakaoka, H., Yamamoto, N., Okubo, K., Ikeda, R., Saito, R., Kanai, A., Abe, K., Tomita, M. and Kiyosawa, H.
Comparative expression analysis uncovers novel features of endogenous antisense transcription.
Hum. Mol. Gen., **17**, 1631-1640 (2008)
6. Chiba, M., Miura, T, Satou, T., Resian, A., Kiyosawa, H., Ohkohchi, N. and Yasue, H.
Localization of sense and antisense transcripts of Prdx2 gene in mouse tissues.
Cytogenet. Genome Res., **121**, 222-231 (2008)

7. Ruike Y., Ichimura A., Tsuchiya S., Shimizu K., Kunimoto R., Okuno Y. and Tsujimoto G.
Global correlation analysis for micro-RNA and mRNA expression profiles in human cell lines.
J. Hum. Genet., **53**, 515-523 (2008)

<平成21年度>

1. Sato F., Tsuchiya S., Terasawa K., and Tsujimoto G.
Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology.
PLoS One, **4** (5), e5540 (2009)
2. Tsuchiya S., Oku M., Imanaka Y., Kunimoto R., Okuno Y., Terasawa K., Sato F., Tsujimoto G. and Shimizu K.
MicroRNA-338-3p and microRNA-451 contribute to the formation of basolateral polarity in epithelial cells.
Nucleic Acids Res., **37**, 3821-3827 (2009)
3. Terasawa K., Ichimura A., Sato F., Shimizu K. and Tsujimoto G.
Sustained activation of ERK1/2 by NGF induces microRNA-221 and 222 in PC12 cells.
FEBS J., **276**, 3269-3276 (2009)
4. Ichimura A., Ruike Y., Terasawa K., Shimizu K. and Tsujimoto G.
miR-34a inhibits cell proliferation by repressing MEK1 during megakaryocytic differentiation of K562.
Mol. Pharmacol., in press, 2010
5. Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., and Yamanaka, S.
Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines.
Nature Biotechnol., **27**, 743-745 (2009)
6. Okita, K., Hong, H., Takahashi, K. and Yamanaka, S.
Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors.
Nature Protocols, **5**, 418-428 (2010)

7. Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Higaki, K., Nakagawa, M., Takahashi, K., Yamanaka, S. and Oshimura, M.
Complete genetic correction of iPS cells from duchenne muscular dystrophy.
Molecular Therapy, **18**, 386-393 (2010)

8. Takahashi, K., Narita, M., Yokura, M., Ichisaka, T. and Yamanaka, S.
Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders.
PLoS ONE, **4**, e8067 (2009)

9. Nagata, S., Toyoda, M., Yamaguchi, S., Hirano, K., Makino, H., Nishino, K., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Akutsu, H., Umezawa, A. and Tada, T.
Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells.
Genes Cells, **14**,1395-1404 (2009)

10. Tanaka, Y., Ikeda, T., Kishi, Y., Masuda, S., Shibata, H., Takeuchi, K., Komura, M., Iwanaka, T., Muramatsu, S., Kondo, Y., Takahashi, K., Yamanaka, S. and Hanazono, Y.
ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis.
Cell Transplant., **18**, 381-389 (2009)

11. Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S. and Kohno, K.
Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **106**, 16657-16662 (2009)

12. Nishimura, K., Nakagawa, T., Ono, K., Ogita, H., Sakamoto, T., Yamamoto, N., Okita, K., Yamanaka, S. and Ito, J.
Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea.
Neuroreport, **20**, 1250-1254 (2009)

13. Silva, J., Nichols, J., Theunissen, TW., Guo, G., van Oosten, AL., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I. and Smith, A.
Nanog is the gateway to the pluripotent ground state.

Cell, **138**, 722-737 (2009)

14. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S.
Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells.
Cell Stem Cell, **5**, 237-241 (2009)
15. Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M.,
Okita, K. and Yamanaka, S.
Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21
pathway.
Nature, **460**, 1132-1135 (2009)
16. Yokoo, N., Baba, S., Kaichi, S., Niwa, A., Mima, T., Doi, H., Yamanaka, S.,
Nakahata, T. and Heike, T.
The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human
induced pluripotent stem cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **387**, 482-488 (2009)
17. Niwa, A., Umeda, K., Chang, H., Saito, M., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa,
M., Yamanaka, S., Nakahata, T. and Heike, T.
Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via
Flk-1+ hemoangiogenic progenitors.
J. Cellular Physiology, **221**, 367-377 (2009)
18. Tanaka, T., Tohyama, S., Murata, M., Nomura, F., Kaneko, T., Chen, H.,
Hattori, F., Egashira, T., Seki, T., Ohno, Y., Koshimizu, U., Yuasa, S., Ogawa,
S., Yamanaka, S., Yasuda, K. and Fukuda, K.
In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem
cell-derived cardiomyocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **385**, 497-502 (2009)
19. Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H.,
Yoshimura, N. and Takahashi, M.
Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem
cells.
Neuroscience Letters, **458**, 126-131 (2009)

20. Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M. and Yamanaka, S.
Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts.
Genes Cells, **14**, 683-694 (2009)
21. Nakano, H., Miyazawa, T., Kinoshita, K., Yamada, Y. and Yoshida, T.
Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells.
Int. J. Cancer, 2009 Dec 28. [Epub ahead of print] DOI 10.1002/ijc.25143
22. Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J., Siomi, H. and Siomi, MC.
Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*.
RNA, **16**, 506-515 (2010)
23. Miyoshi, K., Okada, TN., Siomi, H. and Siomi, MC.
Characterization of miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in *Drosophila* miRNA pathway.
RNA, **15**, 1282-1291 (2009)
24. Yusuke Hokii, Yumi Sasano, Mayu Sato, Hiroshi Sakamoto, Kazumi Sakata, Ryuzo Shingai, Akito Taneda, Shigenori Oka, Hyouta Himeno, Akira Muto, Toshinobu Fujiwara, and Chisato Ushida
A small nucleolar RNA functions in rRNA processing in *C.elegans*.
Nucleic Acids Res., in press, 2010
25. Kunio Kikuchi, Makiha Fukuda, Tomoya Ito, Mitsuko Inoue, Takahide Yokoi, Suenori Chiku, Toutai Mitsuyama, Kiyoshi Asai, Tetsuro Hirose and Yasunori Aizawa
Transcripts of unknown function in multiple-signaling pathways involved in human stem cell differentiation.
Nucleic Acids Res., **37** (15), 4987-5000 (2009)
26. Numata, K., Osada, Y., Okada, Y., Saito, R., Hiraiwa, N., Nakaoka, H., Yamamoto, N., Watanabe, K., Okubo, K., Kohama, C., Kanai, A., Abe, K. and Kiyosawa, H.
Identification of novel endogenous antisense transcripts by DNA microarray

analysis targeting complementary strand of annotated genes.
BMC Genomics, **10**, 392 (2009)

27. Chiba, M., Kiyosawa, H., Hiraiwa, N., Ohkohchi, N., and Yasue, H.
Existence of Pink1 antisense RNAs in mouse and their localization.
Cytogenet. Genome Res., **126**, 259-270 (2009)
28. Ideue, T., Hino, K., Kitao, S., Yokoi, T., and Hirose, T.
Efficient oligonucleotide-mediated degradation of nuclear noncoding RNAs in
mammalian cultured cells.
RNA, **15**, 1578-1587 (2009)
29. Sasaki, YT. and Hirose, T.
How to build paraspeckles?
Genome Biol., **10**, 227.1-227.5 (2009)

(2) 総説、解説、著書

研究開発項目①

機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

<平成18年度>

1. 斎藤輪太郎
バイオインフォマティクスを用いた non-coding RNA 予測のさまざまな試み
機能性 non-coding RNA, クバプロ, p.171-187 (2006)
2. 榊原康文, 佐藤健吾
機能性 RNA の配列解析と構造解析
人工知能学会誌, **22** (1), 54-62 (2007)

<平成20年度>

1. 佐藤健吾, 榊原康文
二次構造に基づく機能性 RNA の配列解析
実験医学, **26** (7), 121-126 (2008)
2. 光山統泰
ゲノムブラウザーを用いた small RNA のテーション
実験医学, **26**, 3071-3078 (2008)
3. 金 大真, 浅井 潔
機能性 RNA データベース
実験医学 増刊号「バイオデータベースとソフトウェア最前線」, **26** (7), 1078-1086 (2008)

<平成 21 年度>

1. Sakakibara, Y. and Sato, K.
Sequence and structural analyses for functional non-coding RNAs.
Algorithmic Bioprocesses, (edited by A. Condon et al.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.63-79, 2009

研究開発項目②

機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

<平成17年度>

1. 鈴木 勉
RNA 修飾の世界一見過ごされている RNA の質的な情報.
生化学会誌, **77**, 1481-1496 (2005)
2. 北原 圭、鈴木 勉
リボソームの立体構造と抗生物質の作用機序.
RNA 工学の最前線(監修 中村義一)シーエムシー出版, p225-237 (2005)
3. 鈴木 勉、廣瀬哲郎
機能性 RNA 研究における RNA プロセシングの重要性.
実験医学, **23**, 1864-1868 (2005)
4. 鈴木 勉
RNA 修飾の生合成と機能.
実験医学, **23**, 1881-1889 (2005)
5. 嶋 成実、鈴木 勉
哺乳動物ミトコンドリアの翻訳系—ミトコンドリアゲノムの縮小によってもたらされたユニークなシステム.
蛋白質核酸酵素 (11 月増刊号)「二層膜オルガネラの遺伝学」, **50**, 1732-1736 (2005)
6. Suzuki,T.
Biosynthesis and function of tRNA wobble modifications. In Fine-tuning of RNA functions by modification and editing.
Topics in Curr Genetics, vol.12, Springer-Verlag, NY p.24-69 (2005)

<平成18年度>

1. 鈴木 勉、鈴木健夫、上田宏生、宮内健常、坂口裕理子
マスペクトロメトリーによる ncRNA の解析.
蛋白質核酸酵素(2 月号増刊:RNA と生命), **51**, 2431-2435 (2006)
2. 野間章子、鈴木 勉 細胞核の世界
RNA 修飾酵素の細胞内局在と RNA 成熟化機構.
蛋白質核酸酵素(11 月号増刊), **51**, 2226-2231 (2006)
3. 鈴木 勉、鈴木健男、坂口裕理子
RNA マスペクトロメトリー.
ゲノム医学, **6**, 89-96 (2006)

4. 池内与志穂, 鈴木 勉

RNA 修飾に関わる硫黄リレータンパク質群の同定.
細胞工学(4月号), **25**, 400-401 (2006)

5. 村田成範、堀邦夫

機能性 RNA のプロファイリング技術-マイクロアレイ技術を中心に-.
ゲノム医学, **6** (3), 65-68 (2006)

<平成19年度>

1. Suzuki, T. and Suzuki, T.

Chaplet column chromatography: isolation of a large set of individual RNAs in a single step.

Methods in Enzymol., **425**, 213-220 (2007)

2. Suzuki, T., Ikeuchi, Y., Noma, A., Suzuki, T. and Sakaguchi, Y.

Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes.

Methods in Enzymol., **425**, 195-211 (2007)

<平成20年度>

1. T. Ohgi, H. Kitagawa, and J. Yano

Chemical synthesis of Oligonucleotides with
2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)-Protected phosphoramidites.

Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Chapter 2, Unit 2.15, 1-19 (2008)

2. 増田博文、矢野純一

RNA合成と創薬
実験医学, **26** (10), 1668-1673 (2008)

3. 櫻井雅之、鈴木 勉

転写後修飾による RNA 機能制御
細胞工学, **28** (2), 149-155 (2009)

4. Nagao, A., Shigi-Hino, N. and Suzuki, T.

Measuring mRNA decay in human mitochondria.

Methods in Enzymol., **447**, 489-499 (2008)

5. Noma, A., Shigi, N. and Suzuki, T.

Biogenesis and functions of thio-compounds in transfer RNA: comparison of bacterial and eukaryotic thiolation machineries

DNA and RNA modification enzymes (Book LANDES), ed Grosjean, H., 2009

<平成21年度>

1. 矢野純一

RNA 医薬品の開発 Development of RNA medicines.

Medical Science Digest, **35** (14), 2009

2. 高垣和史、園家暁、矢野純一

核酸医薬品の開発と品質・有効性・安全性評価.

シーエムシー出版, 4月発行予定, 201.

3. Sakurai, M. and Suzuki, T.

A biochemical identification of A-to-I RNA editing sites by the Inosine Chemical Erasing (ICE) method.

Methods in Mol. Biol., in press

研究開発項目③

機能性RNAの機能解析

<平成17年度>

1. 吉田 哲郎
miRNA と疾患との関連
BioClinica, **20**, 1071-1076 (2005)
2. 蓮輪英毅、岡部 勝
RNAi による哺乳動物個体レベルでのノックダウン
「RNA 工学の最前線 Frontier of RNA Engineering」シーエムシー出版 p.67-76
(全 p.268 監修:中村義一、大内将司) (2005)
3. 廣瀬哲郎
新規ポリ A 付加装置による核内 RNA 品質管理機構
実験医学, **23** (12)、2153 (2005)
4. 廣瀬哲郎、塩見美喜子
RNA とゲノム(最近の話題):機能性 RNA の基本的な特徴と機能
ゲノム医学, **6**, 97-101 (2006)
5. 九十九裕子、Lalith S. Gunawardane、塩見美喜子
RNAi の分子メカニズム
遺伝子医学 MOOK 4 号「RNA と創薬」, p.78-83 (2005)
6. 三好啓太、塩見美喜子
第一章 RNA interference (RNAi)と micro RNA (miRNA): 概論
RNA 工学の最前線, p.30-40 (2005)
7. 春原隆史、塩見美喜子
Small RNA による遺伝子発現制御機構
化学と生物, **43** (11), 746-752 (2005)
8. 三好啓太、塩見美喜子
microRNA の作用機序:RNA の切断と翻訳抑制
Bio Clinica, **20** (12), 24-30 (2005)

9. 齋藤都暁、塩見美喜子
microRNA の生理機能解明への新しいアプローチ
実験医学, **23** (12)、2151 (2005)
10. 清澤秀孔、土井貴裕
新規機能性 RNA 分子による遺伝子発現プロファイリング - マイクロ RNA とナチュラル・アンチセンス RNA
医学のあゆみ - 消化器疾患 state of arts, ver.3, p.245-251 (2006)
11. Nelson D. and Siomi MC
Chapter 56; Fragile X Syndrome. Pediatric Nutrition in Chronic Diseases and Developmental Disorders -Prevention, Assessment, and Treatment- 2nd Edition. (ed., Shirley Walberg Ekvall and Valli K. Ekvall) ISBN: 0195165640. Oxford University Press, New York. (2005)

<平成18年度>

1. 佐々木保典、廣瀬哲郎
snoRNA の生合成と機能に関する新知見
蛋白質核酸酵素 別冊「RNA と生命」, **51**, 2437-2442 (2006)
2. 井手上賢、廣瀬哲郎
RNA プロセッシングを監視する核内 RNA 品質管理機構、
蛋白質核酸酵素 別冊「細胞核の世界」, **51**, 2205-2209 (2006)
3. 牛田千里
線虫にみる RNA 機能の多様性 (金井昭夫・河合剛太編)
機能性 non-coding RNA, クバプロ, (2006)
4. 西田知訓、塩見美喜子
siRNA, miRNA, そして新規低分子 RNA による RNA サイレンシングの分子機構
蛋白質核酸酵素 12月号 増刊, **51** (16), 2450-2455 (2006)
5. 塩見春彦、塩見美喜子
2006年ノーベル医学生理学賞 RNAi, Fire と Mello
蛋白質核酸酵素 12月号, **51** (15), (2006)
6. 塩見春彦、塩見美喜子
2006年ノーベル生理学・医学賞 RNA 干渉の二面性
現代化学, **429**, 66-68 (2006)

7. 石塚明、塩見春彦、塩見美喜子
1 章 RNAi 基本メカニズムに関する Q&A
RNAi 実験 なるほど Q&A, 16-53, 58-59 (2006)
8. 春原隆史、塩見美喜子、塩見春彦
小分子 RNA によるゲノム進化
科学, **76** (5), 532-536 (2006)
9. 渡辺雄一郎、塩見美喜子、塩見春彦
RNA サイレンシングの生物学-小さな RNA が果たす大きな役割-
現代化学, **421**, 56-60 (2006)
10. 齋藤都暁、塩見美喜子
生殖細胞形成必須因子 Piwi と rasiRNA による新規 RNA サイレンシング
蛋白質核酸酵素, **52**, 221-226 (2007)
11. 三好啓太、塩見美喜子
miRNA による翻訳抑制機構の分子メカニズム
細胞工学, **26**, 560-654 (2007)
12. 齋藤都暁、西田知訓、塩見美喜子
ショウジョウバエ生殖細胞において特異的に起こる RNA サイレンシング
実験医学, **25**, 811-817 (2007)
13. 塩見美喜子
概論-小分子 RNA はゲノム情報発現をどのように制御するか
実験医学, **25**, 794-799 (2007)
14. 清澤秀孔
マウスにおける内在性アンチセンス転写産物の解析
機能性 non-coding RNA, クバプロ, p.99-114 (2006)
15. 清澤秀孔
mRNA 型非翻訳性 RNA
医学のあゆみ, **220**, 196-198 (2007)
16. 清澤秀孔
マウス・ナチュラルアンチセンス RNA

蛋白質核酸酵素, **52**, 441-448 (2007)

17. Tsuchiya, S., Okuno, Y. and Tsujimoto, G.

MicroRNA: biogenetic and Functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer.

J. Pharmacol. Sci., **101**, 267-270 (2006)

18. Ishizuka A, Saito K, Siomi MC, Siomi H.

In vitro precursor microRNA processing assays using Drosophila Schneider-2 cell lysate.

Methods in Molecular Biology, **342**, MicroRNA Protocols, 277-286 (2006)

19. 三好啓太

カレント トピックス:Argonaute の Slicer 活性と RISC 形成への関与
実験医学, **24** (4), 502-505 (2006)

<平成19年度>

1. 廣瀬哲郎

ncRNA の機能解析とヒトの疾患へのアプローチ
Medical Bio, **4** (4), 41-44 (2007)

2. Hasegawa Y and Kiyosawa H

Chapter V - Natural antisense RNA in mammals: Novel characteristics revealed by genome-wide expression analysis, in "Antisense Elements (Genetics) Research Focus," Nova Science Publishers, Inc., New York, p.109-140 (2007)

3. Miyoshi K, Uejima H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC.

Methods in Molecular Biology.

In vitro RNA cleavage assay for Argonaute-family proteins.

in press

4. 相澤康則、辻本豪三、寺澤和哉

高次生命現象を支える機能性RNA—短いRNAと長いRNA—
ゲノム医学, **7** (1), 67-71 (2007)

<平成20年度>

1. 山田陽史、吉田哲郎
RT-PCRによる小分子 RNA の検出
RNA 実験ノート, 2008/3/15
2. 蓮輪英毅、伊川正人、岡部 勝
マウスにおける RNAi の誘導とその評価法
RNA 実験ノート, 2008/3/15
3. 土屋創健、奥野恭史、辻本豪三
MicroRNAs and Discovery of New Targets.
Pharmacogenomics, Anticancer Drug Discovery and Response, 47-56, 2009
4. 小柳三千代、山中伸弥
マウス繊維芽細胞培養から誘導される多能性幹細胞
進み続ける細胞移植治療の実際, 上巻, p.124-127, 2008
5. 小柳三千代、中川誠人、山中伸弥
がん遺伝子 Myc を用いない人工多能性幹細胞の作成
BIO INDUSTRY, 4, 89-95 (2008)
6. 日野公洋、廣瀬哲郎
snoRNA 異常疾患
遺伝子医学 MOOK 15 号「最新 RNA と疾患研究 2009」, p.85-91, 2009
7. 佐々木保典、廣瀬哲郎
ncRNA を特徴付ける細胞内挙動と機能
細胞工学, 28, 138-141 (2009)
8. 廣瀬哲郎
基礎の基礎
細胞工学, 28, 110-115 (2009)
9. 廣瀬哲郎
ノンコーディング RNA 機能へのアプローチ法
蛋白質核酸酵素, 53, 1940-1949 (2008)

10. 青木一真、廣瀬哲郎
RI と non-RI での in vitro 転写とラベリング
RNA 実験ノート上, p.54-60, 2008
11. 井手上賢、廣瀬哲郎
試験管内スプライシング反応
RNA 実験ノート上, p.148-153, 2008
12. 佐々木保典、廣瀬哲郎
RACE による鋳型鎖の上流・下流配列の決定
RNA 実験ノート上, p.114-120, 2008
13. 廣瀬哲郎
RNA 結合タンパク質の標的 mRNA の分離同定
RNA 実験ノート上, p.96-101, 2008
14. 廣瀬哲郎
ncRNA (noncoding RNA).
生体の科学, **59**, 376-378 (2008)
15. Chisato Ushida and Yusuke Hokii
Isolation and characterization of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*.
Edited by John Rossi and Rajesh K. Gaur.
Regulation of Gene Expression by Small RNAs, CRC Press, Florida, U. S. A.,
2009
16. Siomi, MC., Saito, K. and Siomi H.
How selfish retrotransposons are silenced in *Drosophila* germline and somatic
cells.
FEBS Lett., **582**, 2473-2478 (2008)
17. Siomi, MC., Nishida, KM. and Siomi, H.
How to defining RNAi targets.
Methods in Enzymology, **449** (2008)
18. Siomi, H. and Siomi, MC.
On the road to reading the RNA interference code.
Nature, **457** (7228), 396-404 (2009)

19. Kim, NV., Han, J. and Siomi, MC.
Biogenesis of small RNAs in animals.
Nature Reviews Molecular Cell Biology, in press
20. 萬年太郎、塩見美喜子
siRNAによる遺伝子発現抑制の基礎とそれに関する最新の知見.
炎症と免疫, **16** (6), 2-11 (2008)
21. 塩見美喜子
動物の内在性小分子 RNA:piRNA を焦点として.
RNA 実験ノート 下, 小分子 RNA の解析から RNAi への応用まで, p.18-21, 2008
22. 塩見美喜子、岡田知子
Argonaute ファミリーメンバーの Slicer 活性の解析.
RNA 実験ノート 下, 小分子 RNA の解析から RNAi への応用まで, p.84-91, 2008
23. Okada, Y., Numata, K., Saito, R., Tomita, M., and Kiyosawa, H.
Novel natures of endogenous antisense transcripts in mammals.
Curr. Topics Genet., **3**, 9-25 (2008)

<平成21年度>

1. 小柳三千代、山中伸弥
多能性幹細胞と microRNA
最新 RNA と疾患研究 遺伝子医学 MOOK, **5**, 86-191 (2009)
2. 山田 陽史
幹細胞の分化と miRNA
分子細胞治療, **8** (5), 331-336 (2009)
3. 三好啓太、塩見美喜子
第 4 章 遺伝子機能解析:RNAi WELCOME TO ゲノムワールド
ゲノム創薬科学最前線, p.163-183, 2009
4. Siomi, MC.
JOURNAL CLUB: A biologist praises a mouse model of autism inheritance.
Nature, **461**, 451 (2009)

5. Siomi, MC.
piRNAs (PIWI-interacting RNA)□
McGraw Hill 2010 Yearbook of Science & Technology. in press
6. Siomi, H. and Siomi, MC.
Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis
Mol. Cell revised
7. Siomi, MC., Miyoshi, T. and Siomi, H.
piRNA-mediated silencing in Drosophila germlines.
Seminars in Cell and Developmental Biology 2010. Jan 18[Epub ahead of print]
8. Siomi, H. and Siomi, MC.
RISC hitches onto endosome trafficking.
Nat. Cell Biol., **11**, 1049-1051 (2009)
9. Siomi, MC.
Short interfering RNA-mediated gene silencing; towards successful application in human patients.
Adv. Drug Deliv. Rev., **61**, 668-671 (2009)
10. 牛田千里
RNA interference.
分子精神医学 (印刷中), 2010
11. Hirose, T.
Emerging roles of noncoding RNAs in subcellular architecture and gene expression.
RNA technologies & Their applicatios, Springer (2009), in press
12. 井手上賢、廣瀬哲郎
核内局在 RNA の簡便で効率の良いノックダウン法.
実験医学, **28**, 97-101 (2009)
13. 北尾紗織、廣瀬哲郎
核内の RNA 顆粒構造とその生理機能.
蛋白質核酸酵素, **54**, 2127-2132 (2009)

14. 日野公洋、廣瀬哲郎
機能不明の細胞核内 RNA を個別に分解する方法を開発.
産総研 TODAY, **9**, 12 (2009)

15. 日野公洋、廣瀬哲郎
snoRNA 異常疾患
遺伝子医学 MOOK15 号「最新 RNA と疾患研究」, p.85-90 (2009)

16. 日野公洋、廣瀬哲郎
snoRNA の機能異常による疾患.
Bio Clinica, **24**, 46-51 (2009)

17. 佐々木保典、廣瀬哲郎
「かたち」を生み出す RNA:機能構築 RNA の研究から創薬へ.
JITA ニュースレター, **21**, 2-3 (2009)

2. 特許

<平成17年度>

(1)発明者:津田宏治(産総研)、金大真(産総研)、浜田道昭(みずほ)、浅井潔(東大)

発明などの名称:RNA 配列情報処理装置

出願日:平成 18 年 2 月 27 日

出願番号:特願 2006-49694

出願人:(独)産業技術総合研究所、みずほ情報総研㈱、東京大学

<平成18年度>

(1)発明者:寺井悟朗(インテック W&G)、金大真(産総研)

発明などの名称:マイクロ RNA 検出装置、方法およびプログラム

出願日:平成 18 年 12 月 13 日

出願番号:特願 2006-335470

出願人:インテック W&G㈱、(独)産業技術総合研究所

(2)発明者:津田宏治(産総研)、金大真(産総研)、浜田道昭(みずほ)、浅井潔(東大)

発明などの名称:RNA 配列情報処理装置(PCT 出願)

出願日:平成 19 年 2 月 9 日

出願番号:PCT/JP2007/052369

出願人:(独)産業技術総合研究所、みずほ情報総研㈱、東京大学

(3)発明者:鈴木勉(東大)、宮内健常(東大)、上田宏生(東大)、鈴木健夫(東大)、坂口裕理子(東大)

発明などの名称:質量分析によるゲノム上で RNA 配列を同定するシステム

出願日:平成 18 年 7 月 14 日

出願番号:特願 2006-194780

出願人:東京大学

(4)発明者:鈴木勉(東大)、宮内健常(東大)

発明などの名称:往復循環クロマトグラフィーを用いた生体高分子の単離方法

出願日:平成 18 年 8 月 2 日

国際出願番号:PCT/JP2006/315271

出願人:東京大学

(5)発明者:北川英俊(日本新薬)、植竹弘一(日本新薬)

発明などの名称:核酸保護基の導入方法

出願日:平成 18 年 8 月 2 日

出願番号:特願 2006-210439

出願人:日本新薬(株)

(6)発明者:北川英俊(日本新薬)、植竹弘一(日本新薬)、山田浩平(ヤマサ醤油)

発明などの名称:リボ核酸化合物の製造方法

出願日:平成 19 年 1 月 22 日

出願番号:特願 2007-011813

出願人:日本新薬(株)、ヤマサ醤油(株)

(7)発明者:山田陽史(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称:新規核酸

出願日:平成 18 年 9 月 4 日

出願番号:特願 2006-238459

出願人:協和醸酵工業(株)

(8)発明者:山田陽史(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称:間葉系幹細胞の増殖および/または分化制御剤

出願日:平成 18 年 10 月 31 日

出願番号:特願 2006-295113

出願人:協和醸酵工業(株)

(9)発明者:山田陽史(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称:新規核酸

出願日:平成 18 年 12 月 18 日

出願番号:特願 2006-339997

出願人:協和醸酵工業(株)

(10)発明者:妙本 陽(東レ)、秋山英雄(東レ)、奥野恭史(京大)、辻本豪三(京大)、国本 亮
(京大)、土屋創健(京大)

発明などの名称:マイクロ RNA 標的遺伝子予測装置

出願日:平成 19 年 3 月 2 日

出願番号:特願 2007-53322

出願人:東レ(株)

<平成19年度>

(1)発明者:鈴木 勉(東大)、山崎雄三(島津)、瀬口武史(島津)

発明などの名称:質量分析サンプルの調製方法、リボ核酸のイオン化方法、リボ核酸の
質量分析方法、及び細胞由来の低分子リボ核酸の質量分析方法

出願日:平成19年5月28日

出願番号:特願2007-140998

出願人:㈱島津製作所、東京大学

(2)発明者:清澤秀孔(理研)

発明などの名称:内在性アンチセンスRNAの発現解析システム

出願日:平成19年5月31日

出願番号:特願2007-146341

出願人:(独)理化学研究所

(3)発明者:鈴木 勉(東大)、上田宏生(JBIC)

発明などの名称:核酸の塩基配列及び配列修飾を解析する装置、方法及びプログラム

出願日:平成19年7月27日

出願番号:特願2007-195555

出願人:東京大学、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

(4)発明者:山田浩平(ヤマサ醤油)、早川弘之(ヤマサ醤油)、和田 猛(東大)

発明などの名称:2'位にアルキル型保護基を有するリボ核酸の製造法

出願日:平成20年3月26日

出願番号:特願2008-79796

出願人:東京大学、ヤマサ醤油㈱

(5)発明者:鈴木 勉(東大)、宮内健常(東大)、上田宏生(東大)、鈴木健夫(東大)、坂口裕理
子(東大)

発明などの名称:質量分析によるゲノム上でRNA配列を同定するシステム

出願日:平成19年7月10日

出願番号:PCT/JP2007/63723

出願人:東京大学

(6)発明者:北川英俊(日本新薬)、植竹弘一(日本新薬)

発明などの名称:核酸保護基の導入方法

出願日:平成19年8月1日

出願番号:PCT/JP2007/65070

出願人:日本新薬(株)

(7)発明者:山田浩平(ヤマサ醤油)、北川英俊(日本新薬)、植竹弘一(日本新薬)

発明などの名称:リボ核酸化合物の製造方法

出願日:平成20年1月21日

出願番号:PCT/JP2008/50760

出願人:日本新薬(株)

(8)発明者:清澤秀孔(理研)

発明などの名称:内在性アンチセンスRNAの発現解析システム

出願日:平成19年5月31日

出願番号:特願2007-146341

出願人:(独)理化学研究所

(9)発明者:中野春男(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、山田陽史(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称:細胞の増殖を制御する核酸

出願日:平成19年4月9日

出願番号:特願2007-260393

出願人:協和発酵工業(株)

(10)発明者:横井崇秀(日立ソフト)、廣瀬哲郎(産総研)、井手上賢(JBIC)

発明などの名称:核内ノンコーディングRNAの機能解析方法

出願日:平成20年1月24日

出願番号:特願2008-014036

出願人:日立ソフトウェアシステムエンジニアリング(株)、(独)産業技術総合研究所、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

(11)発明者:山田陽史(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称:新規核酸

出願日:平成19年9月4日

出願番号:PCT/JP2007/67187

出願人:協和発酵工業(株)

(12)発明者:()山田陽史(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称:間葉系幹細胞の増殖および/または分化制御剤

出願日:平成19年10月31日

出願番号:PCT/JP2007/71177

出願人:協和発酵工業(株)

- (13) 発明者: 山田陽史(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)、中野春男(協和発酵)、小坂恭子(協和発酵)

発明などの名称: 新規核酸

出願日: 平成 19 年 12 月 18 日

出願番号: PCT/IB2007/004005

出願人: 協和発酵工業(株)

<平成20年度>

- (1) 発明者: 寺井悟朗(インテックシステム研)、光山統泰(産総研)

発明などの名称: MICRORNA DETECTING APPARATUS, METHOD, AND PROGRAM

出願日: 平成 20 年 10 月 20 日

出願番号: US12/254,637

出願人: (株)インテックシステム研究所、(独)産業技術総合研究所

- (2) 発明者: 鈴木 勉(東大)、加藤敬行(JBIC)

発明などの名称: 高活性 shRNA 及びその製造方法

出願日: 平成 20 年 7 月 18 日

出願番号: 特願 2008-186775

出願人: 東京大学、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

- (3) 発明者: 鈴木 勉(東大)、上田宏生(JBIC)

発明などの名称: 核酸の塩基配列及び配列修飾を解析する装置、方法及びプログラム

出願日: 平成 20 年 7 月 24 日

出願番号: PCT/JP2008/63277

出願人: 東京大学、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

- (4) 発明者: 堀邦夫(オリンパス)

発明などの名称: 標的核酸分子の定量方法および標的核酸分子定量キット

出願日: 平成 21 年 2 月 9 日

出願番号: 特願 2009-27287

出願人: オリンパス(株)

- (5) 発明者: 山田浩平(ヤマサ醤油)、早川弘之(ヤマサ醤油)、和田 猛(東大)

発明などの名称: 2'位にアルキル型保護基を有するリボ核酸の製造法

出願日: 平成 21 年 3 月 19 日

出願番号: 特願 2009-067468

出願人: 東京大学、ヤマサ醤油(株)

(6) 発明者: 小坂恭子(協和発酵)、山田陽史(協和発酵)、三浦和美(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称: 肥満細胞の脱顆粒を制御する核酸

出願日: 平成 20 年 6 月 4 日

出願番号: 特願 2008-146431

出願人: 協和発酵工業(株)

(7) 発明者: 山田陽史(協和発酵)、吉田哲郎(協和発酵)

発明などの名称: 肥満細胞の脱顆粒抑制剤

出願日: 平成20年7月7日

出願番号: 特願 2008-177109

出願人: 協和発酵工業(株)

(8) 発明者: 相澤康則(東工大)、福田牧葉(東工大)、井上允子(東工大)、田中邦彦(東工大)

発明などの名称: 細胞分化及びガン化に關与する新規タンパク質

出願日: 平成 20 年 7 月 18 日

出願番号: 特願 2008-186629

出願人: 東京工業大学

(9) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称: 効率的な核初期化方法

出願日: 平成 20 年 12 月 8 日

出願番号: 特願 2008-312745

出願人: 京都大学

(10) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称: 効率的な核初期化方法

出願日: 平成 20 年 12 月 26 日

出願番号: 特願 2008-335129

出願人: 京都大学

(11) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称: 効率的な核初期化方法

出願日: 平成 21 年 3 月 5 日

出願番号: 特願 2009-510625

出願人: 京都大学

(12) 発明者: 清澤秀孔(理研)

発明などの名称: 内在性アンチセンス RNA の発現解析システム

出願日:平成 20 年 5 月 30 日

出願番号:US12/129,905

出願人:(独)理化学研究所

- (13) 発明者:中野春男(協和発酵)、宮澤達也(協和発酵)、山田陽史(協和発酵)、吉田哲郎
(協和発酵)

発明などの名称:細胞の増殖を制御する核酸

出願日:平成 20 年 10 月 3 日

出願番号:PCT/JP2008/68109

出願人:協和発酵工業(株)

- (14) 発明者:山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称:効率的な核初期化方法(Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日:平成 20 年 11 月 25 日

出願番号:12/1292,717 (米国)

出願人:京都大学

- (15) 発明者:山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称:効率的な核初期化方法(Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日:平成 20 年 5 月 23 日

出願番号:PCT/JP2008/059586

出願人:京都大学

- (16) 発明者:山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称:効率的な核初期化方法(Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日:平成21年2月25日

出願番号:12/379,564 (米国)

出願人:京都大学

- (17) 発明者:山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称:効率的な核初期化方法(Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日:平成 21 年 2 月 23 日

出願番号:2008286249 (豪州)

出願人:京都大学

- (18) 発明者:山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称:効率的な核初期化方法(Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日:平成 21 年 3 月 6 日

出願番号:2,658,463 (カナダ)

出願人:京都大学

(19) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大))

発明などの名称: 効率的な核初期化方法 (Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日: 平成 21 年 3 月 12 日

出願番号: 10-2009-7005179 (大韓民国)

出願人: 京都大学

(20) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)

発明などの名称: 効率的な核初期化方法 (Efficient Method for Nuclear Reprogramming)

出願日: 平成 21 年 3 月 16 日

出願番号: 1485/CHENP/2009 (インド)

出願人: 京都大学

<平成21年度>

(1) 発明者: 堀邦夫(オリンパス)、中田秀孝(オリンパス)、小林佐代子(オリンパス)

発明などの名称: 標的核酸分子の定量方法および標的核酸分子定量キット

出願日: 平成21年8月7日

出願番号: 特願 2009-184523

出願人: オリンパス(株)

(2) 発明者: 上田稔浩(日本新薬) 永田征吾(日本新薬)

発明などの名称: ホスホロアミダイト化合物の製造法

出願日: 平成 21 年 12 月 9 日

出願番号: 特願 2009-279488

出願人: 日本新薬(株)

(3) 発明者: 和田猛(東大)、永田征吾(日本新薬)、植竹弘一(日本新薬)

発明などの名称: リン酸化試薬

出願日: 平成 22 年 1 月 20 日

出願番号: 特願 2010-010260

出願人: 東京大学、日本新薬(株)

(4) 発明者: 寺井悟朗(インテックシステム研)、光山統泰(産総研)、迫田絵理(JBIC)

発明などの名称: 肺癌または子宮頸癌の診断マーカー

出願日: 平成 22 年 3 月 11 日

出願番号: 特願 2010-054924

出願人: (株)インテックシステム研究所、(独)産業技術総合研究所、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

- (5) 発明者: 木下圭太(協和発酵キリン)、山田陽史(協和発酵キリン)、吉田哲郎(協和発酵キリン)
発明などの名称: 細胞周期を制御する核酸
出願日: 平成 22 年 3 月 9 日
出願番号: 特願 2010-052417
出願人: 協和発酵キリン(株)
- (6) 発明者: 山田陽史(協和発酵キリン)、吉田哲郎(協和発酵キリン)
発明などの名称: 肥満細胞の脱顆粒抑制剤
出願日: 平成 21 年 6 月 4 日
出願番号: PCT/JP2009/060220
出願人: 協和発酵キリン(株)
- (7) 発明者: 小坂恭子(協和発酵キリン)、山田陽史(協和発酵キリン)、三浦和美(協和発酵キリン)、宮澤達也(協和発酵キリン)、吉田哲郎(協和発酵キリン)
発明などの名称: 肥満細胞の脱顆粒を制御
出願日: 平成 21 年 6 月 4 日
出願番号: PCT/JP2009/060288
出願人: 協和発酵キリン(株)
- (8) 発明者: 鈴木 勉(東大)、加藤敬行(JBIC)
発明などの名称: 高活性 shRNA 及びその製造方法
出願日: 平成 21 年 7 月 17 日
出願番号: PCT/JP2009/003375
出願人: 東京大学、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム
- (9) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)
発明などの名称: 効率的な核初期化方法 (Efficient Method for Nuclear Reprogramming)
出願日: 平成 21 年 12 月 8 日
出願番号: 09252749.8 (欧州)
出願人: 京都大学
- (10) 発明者: 山中伸弥(京大)、小柳三千代(京大)
発明などの名称: 人工多能性幹細胞の選別方法 (Method for Screening Induced Pluripotent Stem Cells)
出願日: 平成 22 年 1 月 15 日
出願番号: 61/282,295 (米国)
出願人: 京都大学

(11) 発明者: 鈴木 勉(東大)、上田宏生(JBIC)

発明などの名称: Apparatus, process and program for analyzing nucleic acid base sequence and base modification

出願日: 平成 22 年 2 月 5 日

出願番号: 08791529.4 欧州

出願人: 東京大学、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

(12) 発明者: 鈴木 勉(東大)、上田宏生(JBIC)

発明などの名称: Apparatus, process and program for analyzing nucleic acid base sequence and base modification

出願日: 平成 22 年 月 日

出願番号: 12/452,859 (米国)

出願人: 東京大学、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム

3. 報道

<平成18年度>

- 2006年11月：BTJジャーナル11月号（日経バイオ） p.2-5 リーダーインタビュー
（東京大学）
「RNAをMSで測定 質量情報をあぶり出す」
- 2006年11月：日経バイオテク(オンライン)：2006.11.20(冊子体)(協和発酵)
「協和発酵、間葉系幹細胞から新規 miRNA を 29 個同定、
骨芽細胞分化を抑制する miRNA も発見」
- 2006年10月4日 日刊工業新聞（日本新薬）
「RNA 干渉」創薬支援・日本新薬 来年度にも事業化・薬物送達と合成技術を外販
- 2006年10月13日 日本経済新聞（日本新薬）
ノーベル賞技術の「RNA 干渉」・抗がん剤開発で成果・
ジーンケア 血中での滞在長く・日本新薬 薬剤合成を効率化
- 2006年11月30日 化学工業日報、日刊薬業、京都新聞（日本新薬）
RNA 干渉用原料アミダイト・海外市場開拓へ・
日本新薬まず独「EuroTIDES 2006 展」出展
- 2006年12月19日 日経産業新聞（日本新薬）
核酸医薬品はいまー最前線を探る がん・血管新生に挑む 国内勢に独自色

<平成19年度>

- 2007年5月11日 日本経済新聞（東京大学）
「数分で解析、病気診断 -島津と東大 ノーベル賞技術もとに- 」
- 2007年8月23日 日本経済新聞（東京大学）
「マイクロ RNA 10万倍の感度で検出 」
- 2007年9月18日 日本経済新聞（東京大学）
「多様な RNA を自動精製 -東大など装置試作- 」
- 2007年11月：化学工業日報（DNAチップ研究所）
「miRNA を高感度検出、アトモルレベル実現の新ツール」

2007年6月19日 京都新聞（日本新薬）

「独自技術で合成 RNA 来月販売」

2007年6月20日 化学工業日報（日本新薬）

「RNA 試薬を7月発売 日本新薬 CEM ベースに製造」

2007年6月20日 日刊薬業（日本新薬）

「研究用試薬 RNA を7月発売」

2007年8月23日 日経産業新聞（日本新薬）

「診断・治療の主役に 抗がん剤開発の手がかり」

2007年10月9日 日経バイオテク(オンライン)

2007年10月22日 日経バイオテク(冊子体)

(協和発酵)

「日本癌学会、協和発酵、miRNA 創薬で報告、アポトーシス阻害遺伝子を抑制する miRNA を同定」

2007年11月7日 化学工業日報（武庫川女子大）

「miRNA を高感度検出、アトモレベル実現の新ツール」

<平成20年度>

2008年12月18日 日経産業新聞、化学工業新聞

(産業技術総合研究所、みずほ情報総研)

「RNA 二次構造を予測する最高精度のソフトウェアを開発」

2008年6月3日 日刊薬業新聞（日本新薬）

RNA 医薬「2年以内にパイプライン入り」

2008年11月27日 日経産業新聞（東京大学）

「RNA 干渉薬分解しにくく 東大が基礎技術 患部への到達可能に」

2008年6月27日 北國新聞(29面)（北陸先端大学）

「世界初 RNA を光で操作 遺伝子診断精度増す」

2009年1月26日 化学工業日報(朝刊9面)（産業技術総合研究所）

「核内 RNA に新機能 -遺伝子発現調節に重要-」

(産総研ホームページ(主な研究成果)掲載 H21.1.22)

2009年2月4日 日経産業新聞（日本新薬）
新生命医療 薬の副作用ゼロ 挑戦 万人適合リスク判別
核酸医薬、がんに期待

2009年3月9日 日経産業新聞（日本新薬）
日本新薬 伝令RNA 量産技術 試薬で化学合成効率化
ワクチンなど新薬に道

2009年2月2日 日経産業新聞（東京大学）
東京大学 核酸医薬一ホウ素使い精製

<平成21年度>

2009年5月25日 日経バイオテク
“mi”は“si”を超えられるか？ がん、感染症で研究進展
miRNAを標的とした創薬研究

2009年9月30日 日経産業新聞（協和発酵キリン株）
核酸医薬（下）「壊さず運ぶ」創薬にカギ（2030年への挑戦次世代産業技術）

2009年1月26日 化学工業日報（朝刊）（産業技術総合研究所）
細胞核内にある機能不明のRNAを個別に分解する方法を開発 — RNA機能の
解明に道が開け、疾病の原因解明と創薬へ — 産総研ホームページ（主な研究成
果）2009年6月19日

2009年8月19日 日経バイオテク（東京大学）
「東大鈴木勉教授らとJBIC, AIST, 遺伝研、RNAのイノシン化部位を同定するICE法と
次世代シーケンサーでゲノムワイド」

2009年8月19日 日経バイオテク（東京大学）
「東大鈴木勉教授ら、質量分析でmiRNAを直接プロファイリング、DB未登録のプロセッ
シング・バリエントを大量に発見」

4. 講演・学会発表

研究開発項目①

機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

<平成17年度>

1. 第7回日本 RNA 学会年会
Support vector machine を用いた機能性 RNA ファミリーの分類.
浜田道昭、加藤毅、津田宏治、金大真、浅井潔
2005/8/9
2. RNA/RNP を見つける会
サポートベクトルマシンを用いた機能性 RNA ファミリーの分類.
浜田道昭、加藤毅、津田宏治、金大真、浅井潔
2005/9/10
3. The 14th International Conference on Genome Informatics
An Alignment Algorithm by Matching Fixed-Length Stem Fragments for Comparing RNA Sequences.
田部井靖生、津田宏治、金大真、浅井潔]
2005/12/19
4. Pacific Symposium on Biocomputing 2006
Searching non-coding RNAs from genome using fixed-length stem fragments.
田部井靖生、金大真、津田宏治、浅井潔
2006/1/5
5. 第7回日本 RNA 学会
Support Vector Machine を用いた機能性 RNA ファミリーの分類.
浜田道昭、加藤毅、金大真、浅井潔
2005/08/08.

<平成18年度>

1. 新しい RNA/RNP を見つける会
RNA 配列群からの頻出ステムパターンの抽出.
浜田道昭、津田宏治、工藤拓、金大真、浅井潔
2006/9/2
2. 第9回情報論的学習理論ワークショップ(IBIS 2006)
非整列 RNA 配列群からの頻出ステムパターンのマイニング.

浜田道昭, 津田宏治, 工藤拓, 金大真, 浅井潔

2006/11/1

3. 東北大学理学部数学科 情報学セミナー

非整列 RNA 配列群からの頻出ステムパターンのマイニング.

浜田道昭, 津田宏治, 工藤拓, 金大真, 浅井潔

2006/12/1

4. The 17th International Conference on Genome Informatics (GIW2006)

RNAmine: Frequent Stem Pattern Miner from RNAs.

Michiaki Hamada, Koji Tsuda, Taku Kudo, Taishin Kin and Kiyoshi Asai

2006/12/18-20

5. The 17th International Conference on Genome Informatics(GIW2006)

fRNAdb: A Platform for Mining/Annotating Functional RNA Candidates from Non-Coding RNA Sequences.

Taishin Kin, Kouichirou Yamada, Goro Terai, Hiroaki Okida, Yasuhiko

Yoshinari, Yukiteru Ono, Aya Kojima, Takashi Komori, Kiyoshi Asai

2006/12/21

6. 1st International Conference on Bioinformatics Research and Development

Stem Kernels for RNA Sequence Analyses.

榊原康文, 佐藤健吾

2007/3/12

7. 新しい RNA/RNP を見つける会 in お台場

RNA 配列群からの頻出ステムパターンの抽出.

浜田道昭

2006

<平成19年度>

1. 15th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) & 6th European Conference on Computational Biology (ECCB)
Mining Local Secondary Structure Motifs from Unaligned RNA Sequences Using Graph Mining Techniques.

M.Hamada, K.Tsuda, T.Kudo, T.Kin, and K. Asai

2007/7/23

2. 15th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) & 6th European Conference on Computational Biology (ECCB)
Profile-Profile Stem Kernels for Structural RNA Analysis.

K. Sato, K. Asai, and Y. Sakakibara
2007/7/22-25

3. 15th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) & 6th European Conference on Computational Biology (ECCB)
fRNAdb: a platform for mining/annotating functional RNA candidates from non-coding RNA sequences.
T. Kin, K. Yamada, G.Terai, H.Okida, Y.Yoshinari, Y. Ono, A.Kojima, T.Komori, and K. Asai
2007/7/22
4. 第6回新しいRNA/RNPを見つける会
RNA配列群に現れる局所安定2次構造の大規模類似性探索.
浜田道昭、金大真、浅井潔
2007/9/6
5. 第6回新しいRNA/RNPを見つける会
比較ゲノム解析システムMurasaki の開発と機能性RNA 探索への応用.
榊原康文
2007/9/6
6. 第6回新しいRNA/RNPを見つける会
HMMを用いたmiRNA予測手法の開発.
寺井悟朗、小森隆、小嶋亜矢、浅井潔、金大真
2007/9/5-6
7. The 2007 Annual Conference of Japanese Society for Bioinformatics (JSBi2007)
Large-Scale Similarity Search for Locally Stable Secondary Structures among RNA Sequences.
M.Hamada, T. Kin, and K. Asai
2007/12/17
8. The 2007 Annual Conference of Japanese Society for Bioinformatics (JSBi2007)
A pipeline for detecting human structured ncRNAs based on intra-genomic comparison.
G.Terai, A.Kojima, K. Asai, and T. Kin
2007/12/17-19
9. The 2007 Annual Conference of Japanese Society for Bioinformatics (JSBi 2007)
Profile-Profile Stem Kernels for Structural RNA Analysis.
K. Sato, K. Asai, and Y. Sakakibara
2007/12/17-19
10. The Annual Meeting of Computational Biology Research Center (CBRC2007)
RNA配列群に現れる局所安定2次構造の大規模類似性探索.
浜田道昭、金大真、浅井潔
2007/12/19
11. The Annual Meeting of Computational Biology Research Center (CBRC2007)
機能性RNAデータベース.
金大真、寺井悟朗、沖田弘明、小嶋亜耶、小森隆、吉成泰彦、小野幸輝、山田浩一郎、服部恵美、浅井潔

2007/12/19-20

12. The Annual Meeting of Computational Biology Research Center (CBRC2007)
A pipeline for detecting human structured ncRNAs based on intra-genomic comparison.

寺井悟朗、小嶋亜矢、浅井潔、金大真
2007/12/19-20

13. 第57回 生命情報科学研究セミナー(CBRC)

隠れマルコフモデルを用いた高精度microRNA発見システム(miRRim)の開発
寺井 悟朗
2007/11/15

<平成20年度>

1. 東北大学理学キャリアパス講座

正確な塩基対推定のための RNA2 次構造予測
浜田道昭
2009/2

2. 第 31 回日本分子生物学会(BMB2008)

期待精度を最大化する RNA 情報解析手法の開発
浜田道昭、木立尚孝、佐藤健吾、光山統泰、浅井潔
2008/12/10

3. CBRC2008

期待精度を最大化する RNA の 2 次構造予測手法
浜田道昭、木立尚孝、佐藤健吾、光山統泰、浅井潔
2008/11/7

4. 第 26 回生命情報科学研究セミナー(CBRC)

バイオインフォマティクスにおける優れた推定量の設計方法
浜田道昭
2008/9/26

5. 第38回 生命情報科学研究セミナー(CBRC)

Finding non-protein-coding transcripts based on 5'-inversion event.
寺井 悟朗
2008/10/24

6. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会

ヒトゲノムの二次構造的 アクセシビリティについて.
木立尚孝、光山統泰、浅井 潔
2008/9/8-9

7. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
RNAのアクセシビリティ計算ツールRaccess を用いた、microRNAターゲット領域の配列解析.
木立尚孝、光山統泰、浅井 潔
2008/12/9-12
8. 第31回日本分子生物学会, 第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
期待精度を最大化するRNA情報解析手法の開発.
浜田道昭、木立尚孝、佐藤健吾、光山統泰、浅井 潔
2008/12/10
9. 第26回生命情報科学研究セミナー (CBRC)
期待精度を最大化するRNAの2次構造予測手法.
浜田道昭、木立尚孝、佐藤健吾、光山統泰、浅井 潔
2008/11/7
10. 第26回生命情報科学研究セミナー (CBRC)
バイオインフォマティクスにおける優れた推定量の設計方法
浜田道昭
2008/9/26
11. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
期待精度を最大化するRNA情報解析手法の開発.
浜田道昭、木立尚孝、佐藤健吾、光山統泰、浅井 潔
2008/9/6
12. 16th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 2008)
A non-Parametric Bayesian Approach for Predicting RNA Secondary Structures.
K. Sato, M. Hamada, T. Mituyama, K. Asai, and Y. Sakakibara
2008/7/19-23
13. The 2008 Annual Conference of Japanese Society for Bioinformatics (JSBi 2008)
Detection of Secondary-Structure Conserved Regions by Genome Comparison.
Y. Saito, K. Sato, and Y. Sakakibara
2008/12/15-16
14. The 2008 Annual Conference of Japanese Society for Bioinformatics (JSBi 2008)
A Non-Parametric Bayesian Approach for Predicting RNA Secondary Structures.
K. Sato, M. Hamada, T. Mituyama, K. Asai, and Y. Sakakibara
2008/12/15-16
15. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
比較ゲノムによる機能性RNAコード領域の発見手法の開発.
斎藤 裕、佐藤健吾、榊原康文
2008/9/8
16. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
哺乳類ゲノムのsnoRNAコード領域の網羅的探索
八谷剛史、剣持直哉、榊原康文
2008/9/8

17. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
カーネル法による機能性RNA遺伝子の探索.
佐藤健吾
2008/9/8
18. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
Genome-wide searching with base-pairing kernel functions for non-coding RNAs:
computational and expression analysis of snoRNA families in *Caenorhabditis elegans*.
森田研介、佐藤健吾、齋藤 裕、岡浩太郎、堀田耕司、榊原康文
2008/12/9-12
19. 第26回生命情報科学研究セミナー (CBRC)
L1-レトロポゾン検出手法の開発.
寺井悟朗、吉澤亜耶、浅井 潔、光山統泰
2008/11/6-7
20. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
偽遺伝子の特徴を利用したncRNA発見.
寺井悟朗、吉澤亜耶、浅井 潔、光山統泰
2008/9/8-9
21. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
新規RNA遺伝子発見を支援する機能性RNAデータベース.
光山統泰、山田浩一郎、服部恵美、沖田弘明、小野幸輝、寺井悟朗、小嶋亜耶、浅井 潔
2008/12/10
22. 2008年度 生命情報工学研究センター シンポジウム (CBRC2008)
新規RNA遺伝子発見を支援する機能性RNAデータベース.
光山統泰、山田浩一郎、服部恵美、沖田弘明、小野幸輝、寺井悟朗、小嶋亜耶、浅井 潔
2008/11/7
23. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
新規ncRNA発見を支援する機能性RNAデータベースの利用法.
光山統泰
2008/9/8
24. 第10回日本RNA学会年会・RNA2008
新規RNA遺伝子発見を支援する機能性RNAデータベース.
光山統泰、山田浩一郎、服部恵美、沖田弘明、小野幸輝、寺井悟朗、小嶋亜耶、浅井 潔
2008/7/23-25
25. 第7回国際バイオEXPO バイオアカデミックフォーラム
機能性RNAデータベースを活用したsmall RNAアノテーション技法.
光山統泰
2008/7/3

<平成21年度>

1. 第 32 回日本分子生物学会

CentroidFold: Predictions of RNA Secondary Structure for Estimating Accurate Base-pairs.

Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and Kiyoshi Asai 2009/12/9

2. 第 32 回日本分子生物学会

CentroidHomfold: Prediction of RNA secondary structure by combining homologous sequence information.

Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and Kiyoshi Asai
2009/12/9

3. CBRC 2009

CentroidHomfold: 相同配列群の情報を利用した RNA の 2 次構造予測
浜田道昭
2009/12/04

4. 生命情報科学研究セミナー

CentroidHomfold: 相同配列群の情報を利用した RNA の 2 次構造予測
浜田道昭
2009/11/06

5. 第 21 回 T-PRIMAL セミナー

期待精度最大化推定とバイオインフォマティクス
浜田道昭
2009/09/30

6. 第 8 回新しい RNA/RNP を見つける会

Centroid シリーズ: RNA の 2 次構造予測 / アラインメントのためのツール群.
浜田道昭
2009/09

7. The 9th Workshop on Algorithms in Bioinformatics (WABI 2009)

CentroidFold: Predictions of RNA Secondary Structure for Estimating Accurate Base-pairs.

Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and

Kiyoshi Asai

2009

8. 第11回 RNA ミーティング

CentroidFold: RNA 二次構造予測ウェブサーバー

佐藤健吾、浜田道昭、浅井潔、光山統泰

2009/7

9. The 17th Annual International Conference on Intelligent Systems for
Molecular Biology and 7th Annual European Conference on Computational
Biology (ISMB/ECCB 2009)

Predictions of RNA secondary structure by combining homologous
sequence information.

Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and
Kiyoshi Asai

2009

10. The 17th Annual International Conference on Intelligent Systems for
Molecular Biology and 7th Annual European Conference on Computational
Biology (ISMB/ECCB 2009).

CentroidFold: Predictions of RNA Secondary Structure for Estimating
Accurate Base-pairs.

Michiaki Hamada, Kengo Sato, Hisanori Kiryu, Toutai Mituyama and
Kiyoshi Asai

2009

11. 第1回生命情報科学若手の会

正確な塩基対推定のための RNA の 2 次構造予測～"分布"を考えることの重要性～.

浜田道昭

2009/04/26

12. 5th International Tunicate Meeting

Genome-wide detections of non-coding RNAs on *Ciona intestinalis* genome:
from in silico search of snoRNA to full-length sequencing and expression
analysis.

Kawarama, J., Hase, S., Hachiya, T., Hotta, K., Sakakibara, Y.

2009/6/22

13. 第 8 回新しい RNA/RNP を見つける会
ホヤゲノムにおける機能性 RNA の探索と解析
瓦間淳子、長谷純崇、八谷剛史、堀田耕司、榊原康文
2009/9/7
14. 第 8 回新しい RNA/RNP を見つける会
ゲノムアライメントからの機能性 RNA の探索
齋藤裕、榊原康文
2009/9/7
15. 第 8 回新しい RNA/RNP を見つける会
Centroid 推定を用いた SCI の改良
岡田陽平、佐藤健吾、榊原康文
2009/9/7
16. 2009 年度 生命情報工学研究センター シンポジウム(CBRC2009)
偽遺伝子の特徴を利用した遺伝子発見.
寺井 悟朗、沖田 弘明、吉澤 亜耶、浅井 潔、光山 統泰
2009/12/3
17. 第 8 回新しい RNA/RNP を見つける会
偽遺伝子の特徴を利用した ncRNA 発見.
寺井 悟朗、沖田 弘明、吉澤 亜耶、光山 統泰、浅井 潔
2009/9/8
18. 第 38 回 生命情報科学研究セミナー(CBRC)
Discovery of short pseudogenes derived from messenger RNAs.
寺井 悟朗
2009/11/13

研究開発項目②

機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

<平成17年度>

1. 第7回日本 RNA 学会年会
往復循環クロマトグラフィー法による機能性 RNA の全自動単離精製.
宮内健常、大原智也、鈴木 勉
2005/8/9
2. 第7回日本 RNA 学会年会
A1555G mutation in the human 12S rRNA associated with the aminoglycoside induced and non-syndromic deafness causes the mitochondrial translation disorder .
Narumi Shigi, Jun-Ichi Hayashi, Takuya Ueda, Tsutomu Suzuki
2005/8/9
3. 第7回日本 RNA 学会年会
The A site finger (H38) in the 23S rRNA works as a negative regulator of translocation.
Taeko Komoda, Neuza Satomi Sato, Steven S. Phelps, Simpson Joceph, Tsutomu Suzuki
2005/8/9
4. 第7回日本 RNA 学会年会
ヒト・マウス mRNA/non-coding RNA における新規 RNA エディティング部位の網羅的探索.
櫻井雅之、矢野孝紀、鈴木 勉
2005/8/9
5. 第7回日本 RNA 学会年会
The conserved sequence of helix 69 in the E. coli 23S rRNA is involved in the subunit association, A site tRNA binding and translational fidelity.
Naomi Hirabayashi, Neuza Satomi Sato and Tsutomu Suzuki
2005/8/9
6. 第7回日本 RNA 学会年会
機能性 RNA の質量分析による同定法 (RNA マスフィンガープリント法) の開発.
川村泰龍、宮内健常、尾崎順子、鈴木 勉
2005/8/9

7. 第7回日本 RNA 学会年会
Systematic deletion of rRNAs for investigating basic principle of ribosome function and architectural evolution of ribonucleoprotein.
Kei Kitahara, Neuza S. Sato and Tsutomu Suzuki
2005/8/9
8. 第7回日本 RNA 学会年会
系統的挿入変異を用いたリボソーム RNA の分子進化と機能解析.
横山武司、北原圭、鈴木勉
2005/8/9
9. 若手研究部会
感染の成立と宿主応答の分子基盤、ライシジン合成酵素を標的とした抗生物質の開発をめざして.
鈴木 勉
2005/10/7
10. 日本生化学会
Novel approach for structural analysis of protein complexes using the isotope-tagging mass spectrometric footprinting.
Yuriko Sakaguchi, Hitoshi Aoki, Yusuke Nozaki, Tsutomu Suzuki
2005/10/22
11. 日本生化学会
「機能性 RNA の新展開」、Molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases caused by tRNA wobble modification deficiency.
Yohei Kirino, Yu-ichi Goto, Yolanda Campos, Joaquin Arenas, Robert W. Taylor and Tsutomu Suzuki
2005/10/22
12. Finland-Japan mitochondria meeting
Molecular pathogenesis of human diseases associated with tRNA wobble modification disorder.
Tsutomu Suzuki
2005/11/28
13. Helsinki University seminar
Molecular pathogenesis of human diseases associated with tRNA wobble modification disorder.

Tsutomu Suzuki

2005/11/29

14. 21st International tRNA Workshop

Identification and characterization of four new genes responsible for biosynthesis of wybutosine, a hyper-modified nucleoside in eukaryotic phenylalanine tRNA.

Akiko Noma, Yohei Kirino, Yoshiho Ikeuchi and Tsutomu Suzuki

2005/12

15. 21st International tRNA Workshop

Mechanistic insights into sulfur-relay by novel sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions.

Yoshiho Ikeuchi, Naoki Shigi, Jun-ichi Kato, Akiko Nishimura and Tsutomu Suzuki, 2005/12

16. 21st International tRNA Workshop

Molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases caused by tRNA wobble modification deficiency .

Yohei Kirino, Yu-ichi Goto, Yolanda Campos, Joaquin Arenas, Robert W. Taylor and Tsutomu Suzuki

2005/12

17. 21st International tRNA Workshop

Automatic parallel purification of tRNAs and non-coding RNAs by the reciprocal circulating chromatography method.

Kenjyo Miyauchi, Tomoya Ohara and Tsutomu Suzuki

2005/12

18. 21st International tRNA Workshop

Molecular mechanism of lysidine synthesis that determines tRNA identity and codon recognition.

Yoshiho Ikeuchi, Akiko Soma, Yasuhiko Sekine and Tsutomu Suzuki

2005/12

19. 日本分子生物学会

アミノアシル tRNA 合成酵素による tRNA の反応速度論的識別機構.

長尾翌手可、サリンチムナロン、鈴木健夫、鈴木 勉

2005/12

20. 日本分子生物学会

マスマスペクトロメトリーを用いた miRNA の解析.

折戸智美、桐野陽平、蔵田真也、加藤敬行、鈴木健夫、坂口裕理子、鈴木 勉

2005/12

21. 日本分子生物学会

往復循環クロマトグラフィーによる multi-ChIP 法の開発 Multi-ChIP method using the reciprocal circulating chromatography.

大平高之、宮内健常、鈴木 勉

2005/12

22. 京都大学 COE ケミカルバイオロジーミニシンポジウム一味違う化学と生命現象の接点を目指して

リボヌクレオーム解析を用いた RNA 修飾遺伝子の網羅的解析.

鈴木 勉

2006/3/16

<平成18年度>

1. 第 6 回日本蛋白質科学会年会

リボヌクレオーム解析を用いた酵母 RNA 修飾遺伝子の網羅的探索.

野間章子、鈴木 勉

2006/4/24-26

2. IUBMB 国際学会シンポジウム

Mechanistic Insights into Sulfur-Relay by Novel Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions.

Yoshiho Ikeuchi, Naoki Shigi, Jun-ichi Kato, Akiko Nishimura, Tsutomu Suzuki

2006/6/18-23

3. IUBMB 国際学会シンポジウム

Insight into the first tRNA cytidine acetyl-transferase, TmcA Sarin Chimnaronk.

Tetsuhiro Manita, Min Yao, Yoshiho Ikeuchi, Tsutomu Suzuki, Isao Tanaka

2006/6/18-23

4. IUBMB 国際学会シンポジウム
Structural analysis of Protein complexes using the isotope-tagging mass spectrometric footprinting.
Yuriko Sakaguchi, Yusuke Nozaki and Tsutomu Suzuki
2006/6/18-23
5. RNA 2006:11th Annual Meeting of the RNA Society
Mechanistic insights into biogenesis of RNA modifications by multiple protein components.
Yoshiho Ikeuchi, Akiko Noma, Kenjyo Miyauchi, Takeo Suzuki, Yuriko Sakaguchi and Tsutomu Suzuki
2006/6/20-25
6. RNA 2006:11th Annual Meeting of the RNA Society
Stepwise dicing: human Dicer initially cleaves the strand bearing 3'-overhang and subsequently cuts another strand.
Shinya Kurata, Takayuki Katoh, Naoki Goshima, Nobuo Nomura and Tsutomu Suzuki
2006/6/20-25
7. 第 8 回日本 RNA 学会年会
ヒト mRNA 3'UTR における A to I RNA エディティングの機能解析.
矢野孝紀、櫻井雅之、鈴木 勉
2006/7/18-20
8. 第 8 回日本 RNA 学会年会
精密質量分析計を用いた高感度 RNA 解析法の構築.
鈴木健夫、坂口裕里子、上田宏生、宮内健常、鈴木 勉
2006/7/18-20
9. 第 8 回日本 RNA 学会年会
RNA 修飾に関わる硫黄リレーシステムの発見と反応機構の解析.
池内与志穂、沼田倫征、深井周也、嶋 直樹、加藤潤一、西村昭子、濡木 理、鈴木 勉
2006/7/18-20
10. 第 3 回 21 世紀大腸菌研究会
大腸菌 tRNA ウォブル位修飾ウリジンの側鎖構造炭素源の決定.

鈴木健夫, 鈴木 勉

2006/10/3

11. AARS2006

Snapshots of tRNA sulfuration via an adenylated intermediate.

Tomoyuki Numata, Yoshiho Ikeuchi, Shuya Fukai, Tsutomu Suzuki, and
Osamu

Nureki

2006/10/1-8

12. AARS2006

Insight into the first tRNA cytidine acetyl-transferase.

Sarin Chimnaronk, Tetsuhiro Manita, Min Yao, Yoshiho Ikeuchi, Tsutomu
Suzuki, Isao Tanaka

2006/10/1-8

13. 電気泳動学会シンポジウム

RNA 修飾の世界.

鈴木 勉

2006/10/27

14. 第 17 回フォーラム・イン・ドージン「生命活動を支える RNA プログラム」

RNA 修飾の多彩な機能と生命現象.

鈴木 勉

2006/11/17

15. 第 33 回核酸化学シンポジウム

Ribonucleome analysis identified enzyme genes responsible for wybutosine
synthesis.

Akiko Noma and Tsutomu Suzuki

2006/11/20-22

16. RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery ”

Three-nucleotides periodicity in RNAi: specific residues at every third position
of siRNA shape its efficient activity.

Takayuki Katoh and Tsutomu Suzuki

2006/12/3-7

17. RNA 2006 Izu “Functional RNAs and Regulatory Machinery”
Automated parallel isolation of multiple species of non-coding RNAs by the
“Reciprocal Circulating Chromatography (RCC)” method.
Tomoya hara, Kenjyo Miyauchi, Takeo Suzuki, Yuriko Sakaguchi and
Tsutomu Suzuki
2006/12/3-7
18. 日本分子生物学会 2006 フォーラム
RNA のチオ化修飾の動的メカニズムの構造的基盤.
沼田倫征、池内与志穂、深井周也、鈴木 勉、濡木 理
2006/12/6-8
19. 東大 21COE-ソウル大 BK21 合同セミナー
Ribonucleome analysis identified enzyme genes responsible for wybutosine
synthesis.
Akiko Noma, Tsutomu Suzuki
2006/12/11-12/12
20. 武田薬品工業(株)つくば研究所セミナー
RNA マススペクトロメトリーの開発.
鈴木 勉
2006/12/22
21. Gordon Research Conference, RNA editing
Characterization and tissue specificity of A-to-I RNA editing found in 3'UTR of
human mRNAs.
Masayuki Sakurai, Takanori Yano and Tsutomu Suzuki
2007/1/14 – 1/19
22. Keystone symposia conference: MicroRNAs and siRNAs: Biological Functions
and Mechanisms
Three-nucleotides periodicity in RNAi: specific residues at every third position
of siRNA shape its efficient activity.
Takayuki Katoh, Tsutomu Suzuki
2007/1/28 – 2/2
23. 第 44 回生物物理学会年会 / 第 5 回アジア生物物理学シンポジウム合同会議
A novel method to quantify the nucleic acid by fluorescence correlation

spectroscopy coupled with template directed DNA photoligation.

長尾一生、藤本健造、金城政孝

2006/11/13

24. 33rd Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2006

A novel RNA synthetic method with a 2'-*O*-(2-cyanoethoxymethyl) protection group.

Yoshinobu Shiba, Hidetoshi Kitagawa, Yutaka Masutomi, Kouichi Ishiyama, Tadaaki Ohgi, Junichi Yano

2006/11/20

25. 第25回メディシナルケミストリーシンポジウム

2-シアノエトキシメチル保護基を用いた新規な RNA 合成法.

北川英俊、柴 佳伸、石山幸一、大木忠明、矢野純一

2006/11/30

<平成19年度>

1. 化学とバイオの架け橋(東工大セミナー)

機能性RNAのマスマスペクトロメリー～見過ごされているRNAの質的な情報と高次生命現象へのアプローチ～.

鈴木 勉

2007/4/7

2. お茶の水がん学アカデミア第34回集会

RNA修飾の多彩な機能と生命現象.

鈴木 勉

2007/4/24

3. 細胞生物学会/発生生物学会シンポジウム「Frontiers in RNA Biology」

RNA mass spectrometry reveals qualitative aspects of non-coding RNAs.

T. Suzuki

2007/5/30

4. RNA 2007: 12th Annual Meeting of the RNA Society, Madison, USA

Mass spectrometric Characterization of small non-coding RNAs; identification of 2'-*O*-methylation at the 3'-termini of mouse.

T. Suzuki, T. Ohara, T. Suzuki, H. Ueda, T. Seguchi, K.Miyauchi, and Y. Sakaguchi

2007/6/1

5. Ribosome2007: Form and Function, Cape Cod, USA

Mechanistic and architectural analysis of E.coli ribosomal RNAs using the comprehensive genetic selection.

N. S. Sato, K. Kitahara, T. Yokoyama, N. Hirabayashi, T. Komoda, S.S. Phelps, S.Joseph, R.K.Agrawal, I.Agmon, A.Yonath and T.Suzuki

2007/6/5

6. RNA分子のダイナミズムー生命現象の根幹をなす機能性RNA
RNA修飾が関与する生命現象へのアプローチ.
鈴木 勉
2007/7/28
7. 日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第5回大会
RNAマスマスペクトロメトリー.
鈴木 勉
2007/7/31
8. Yonsei Univ-Univ of Tokyo Joint Symposium (ソウル)
Mass spectrometric characterization of small non-coding RNAs.
T.Suzuki
2007/7/31
9. 22st International tRNA Workshop (Uppsala, Sweden)
Genome-wide identification of genes responsible for 2-thiolation of
5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine (mcm5s2U) at wobble position of yeast
tRNAs.
A. Noma and T. Suzuki
2007/11/2
10. 22st International tRNA Workshop (Uppsala, Sweden)
TmcA catalyzes 4-acetylcytidine formation at wobble position of bacterial
tRNAMet. Y. Ikeuchi, S. Chimnaronk, M. Yao, I. Tanaka and T. Suzuki
2007/11/3
11. 22st International tRNA Workshop (Uppsala, Sweden)
Quality control of aminoacyl-tRNAs by kinetic competition of aminoacyl-tRNA
synthetases and EF-Tu surveillance in mammalian mitochondria.
A.Nagao, T. Suzuki and T. Suzuki
2007/11/5
12. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会) シンポ
ジウム: small RNAによる生命機能の多様化戦略
Small non-coding RNAの直接解析で見えてきたもの.
鈴木 勉
2007/12/11
13. 第6回国際バイオフィォーラム
光ライゲーションを用いたDNA及びRNA操作法の開発.
藤本健造
2007/6/21
14. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)
マイクロアレイ上での酵素反応を用いたmiRNAの高感度かつ簡易検出ツールの開発.村田
成範、川島高広、松原謙一
2007/12/13
15. First International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
Chemical Synthesis of a very long RNA oligomer, a 110mer precursor-miRNA

candidate, with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group.
H. Masuda, Y. Shiba, N. Watanabe, K. Takagaki, K. Ishiyama, T. Ohgi, and J. Yano
2007/11/20

16. First International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
Chemical Synthesis and properties of stereoregulated phosphorothioate RNAs.
T. Wada, T. Kondo, S. Fujiwara, T. Sato, and N. Oka
2007/11/22
17. 第3回ナノバイオ国際シンポジウム
RNAi 医薬開発の現状と期待
矢野純一
2007/2/21
18. The 17th International Symposium on Phosphorous Chemistry
Stereocontrolled synthesis of phosphorothioate DNA and RNA by the
oxazaphospholidine approach.
Takeshi Wada
2007/4
19. 国際バイオ EXPO
RNAi医薬開発における最近の進歩.
矢野純一
2007/5/15
20. US TIDES (ラスベガス)
Delivery and Synthesis of RNA.
矢野純一
2007/5/21
21. BTJプロフェッショナルセミナー
siRNA創薬の現状と課題.
矢野純一
2007/7/4
22. 第2回アジア最先端有機化学国際会議
NEW STRATEGIES FOR THE SYNTHESIS OF BACKBONE-MODIFIED
NUCLEIC ACIDS AS INTELLIGENT NANOMATERIALS.
Takeshi Wada
2007/9
23. BioJapan 2007 バイオビジネスセッション
RNAi医薬開発:研究から医薬品へ.
矢野純一
2007/9/20
24. CNSI-CNBI Symposium on Nanobiotechnology
Stereocontrolled synthesis and properties of backbone-modified DNA and RNA.
Natsuhisa Oka and Takeshi Wada
2007/10

25. 第5回国際核酸化学シンポジウム(第34回核酸化学シンポジウム)
Chemical synthesis and properties of stereoregulated phosphorothioate RNAs.
Takeshi Wada, Tomoaki Kondo, Satoshi Fujiwara, Terutoshi Sato, and
Natsuhisa Oka
2007/11
26. 第5回国際核酸化学シンポジウム(第34回核酸化学シンポジウム)
Nucleoside H-boranophosphonates: synthesis and properties of a new class of
nucleotide analogs.
Renpei Higashida, Toshihide Kawanaka, Natsuhisa Oka and Takeshi Wada
2007/11
27. 第23回Wakoワークショップ
RNAi医薬への挑戦
矢野純一
2007/11/26
28. 第17回アンチセンスシンポジウム
P-B結合を有する核酸類縁体の化学合成と性質.
和田 猛、清水 護、川中俊秀、東田廉平、舞鶴幸裕、田村 潔、新谷哲子、岡 夏央
2007/12
29. 有機合成のニュートレンド2009
2-シアノエトシキメチル保護基を用いたRNA合成法の開発と長鎖RNA合成への応用.
上田 稔浩
2008/2/3
30. 日本化学会第88春季年会
リン原子の立体を制御したPS/POキメラオリゴヌクレオチドの固相合成
岡夏央、山本美佳、佐藤輝聰、和田猛
2008/3

<平成20年度>

1. 56th ASMS Conference on Mass Spectrometry (Denver)
RNA mass spectrometry: a platform technology for non-coding RNA research.
Yuriko Sakaguchi, Hiroki Ueda, Takeo Suzuki, Takayuki Katoh, Takeshi
Seguchi, Kenjyo Miyauchi and Tsutomu Suzuki
2008/6/1-5
2. RNAフロンティアミーティング2008(招待講演)
“自分らしい”RNA研究を追い求めてきて
鈴木 勉
2008/6/4
3. RNAフロンティアミーティング2008
マススペクトロメトリーを用いたRNP複合体中に含まれるRNAの直接解析.
中條岳志、大平高之、上田宏生、鈴木健夫、坂口裕理子、鈴木 勉
2008/6/4-6
4. RNAフロンティアミーティング2008
大腸菌RlmKLは23SrRNA中における2種類の異なるメチル化塩基の生合成を触媒する新し

いタイプのRNA修飾酵素である。

木村 聡、池内与志穂、鈴木健夫、北原 圭、坂口裕理子、鈴木 勉
2008/6/4-6

5. 第35回 BMSコンファレンス(BMS2008)
MALDI-TOF型質量分析計を用いたmiRNA発現プロファイル
瀬口武史、宮内健常、坂口裕理子、上田宏生、鈴木 勉
2008/7/6-9
6. 第10回日本RNA学会年会
ヒトRNAに含まれるイノシン化部位の網羅的探索と機能解析
上田宏生、川畑 瞳、岡田俊平、矢野孝紀、櫻井雅之、鈴木 勉
2008/7/23-25
7. 第10回日本RNA学会年会
酵母tRNAウォブル位のチオウリジン修飾はユビキチン様の反応機構を経由する。
野間章子、鈴木 勉
2008/7/23-25
8. 第10回日本RNA学会年会
往復循環クロマトグラフィー法によるnon-coding RNAの全自動単離精製。
宮内健常、坂口裕理子、鈴木健夫、鈴木 勉
2008/7/23-25
9. 第10回日本RNA学会年会
マイクロRNA前駆体に見出されたDicing部位を規定する基質モチーフとmiRNAの3'末端形成。
加藤敬行、坂口裕理子、宮内健常、鈴木健夫、鈴木 勉
2008/7/23-25
10. 第10回日本RNA学会年会
大腸菌23S rRNAの円順列変異の取得とリボソーム構築原理の新知見。
北原 圭、鈴木 勉
2008/7/23-25
11. 13th annual meeting of the RNA society (RNA2008) (Berlin)
Mass spectrometric identification of non-coding RNAs in ribonucleoprotein complexes in yeast.
Takayuki Ohira, Yuki Takeuchi, Yuriko Sakaguchi, Hiroki Ueda, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2008/7/28-8/3
12. 発生工学・疾患モデル研究会「第70回定例会」
RNAマスマススペクトロメトリー —機能性RNAの直接解析で見えてきたもの—
鈴木 勉
2008/9/10
13. 2008質量分析計 ユーザーズフォーラム(招待講演)
RNAマスマススペクトロメトリー —機能性RNAの直接解析で見えてきたもの—
鈴木 勉
2008/10/22

14. 第6回 日本分子生物学会三菱化学奨励賞 受賞講演(招待講演)
RNA修飾の生合成と機能に関する研究(Biogenesis and functions of RNA modifications).
鈴木 勉
2008/12/10
15. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)(招待講演)
RNAマスマスペクトロメリーを用いたRNP複合体の解析—RNA-タンパク質相互作用ネットワークへのアプローチ.
鈴木 勉
2008/12/12
16. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
出芽酵母におけるRNA-タンパク質複合体の探索, Mass spectrometric approach to RNA-protein interactome in *Saccharomyces cerevisiae*.
竹内祐樹、大平高之、上田宏生、坂口裕理子、鈴木 勉
2008/12/9-12
17. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
ヒトmRNA 3'非翻訳領域におけるRNA editingの機能解析.
岡田俊平、櫻井雅之、矢野孝紀、川畑 瞳、上田宏生、鈴木 勉
2008/12/9-12
18. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
ヒト転写産物におけるイノシン化部位の網羅的探索と機能解析.
櫻井雅之、上田宏生、岡田俊平、光山統泰、矢野孝紀、川畑 瞳、鈴木 勉
2008/12/9-12
19. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
ゼブラフィッシュ初期発生におけるRNA修飾因子の機能阻害とRNA修飾の役割.
中村魅加子、比嘉三代美、平野菜穂子、鈴木健夫、鈴木 勉、剣持直哉
2008/12/9-12
20. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
真正細菌*Aquifex aeolicus*由来Trim1[tRNA (m22G) methyltransferase]の構造と基質認識メカニズム.
粟井貴子、Ihsanawati Is、木村聡、富川千恵、越智杏奈、横川隆志、鈴木 勉、別所 義隆、横山茂之、堀 弘幸
2008/12/9-12
21. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
メタン生成古細菌*Methanosarcina acetivorans* tRNA^{Glu}、tRNA^{Gln}の転写後修飾はグルタミン酸受容に重要である.
小野広雅、大熊玲子、横川隆志、大野 敏、大平高之、鈴木 勉、西川一八
2008/12/9-12
22. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
tRNA(Phe)₃₇位に存在する修飾塩基ワイプトシンの合成に関わる酵素TYW4のX線結晶構造解析.
鈴木陽子、野間章子、鈴木 勉、石谷隆一郎、濡木 理
2008/12/9-12

23. Gordon Research Conference for RNA editing (Galveston)
Large scale identification of A-to-I editing sites in the human brain transcriptome by the ICE method; implication for modulatory effect of A-to-I editing on translational repression mediated by miRNAs.
Masayuki Sakurai, Takanori Yano, Shunpei Okada, Hitomi Kawabata, Totai Mitsuyama, Hiroki Ueda and Tsutomu Suzuki
2009/1/12-16
24. Univ of Todai/Yonsei Univ GCOE Joint Symposium "Chemistry Innovation"
A novel methyltransferase bearing dual active sites responsible for two species of methyl-modifications in *Escherichia coli* 23S rRNA.
Satoshi Kimura, Yoshiho Ikeuchi, Kei Kitahara, Yuriko Sakaguchi, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2009/1/19
25. Univ of Todai/Yonsei Univ GCOE Joint Symposium "Chemistry Innovation"
Exploration of novel human ribonucleoproteins using immunoprecipitation and RNA mass finger printing.
Takeshi Chujo, Takayuki Ohira, Hiroki Ueda, Takeo Suzuki, Yuriko Sakaguchi and Tsutomu Suzuki
2009/1/19
26. Univ of Todai/Yonsei Univ GCOE Joint Symposium "Chemistry Innovation"
Characterization of the RNA methyltransferase responsible for 3-methylcytidine at position 32 in tRNAs from *Saccharomyces cerevisiae*.
Sanghyun Yi, Akiko Noma and Tsutomu Suzuki
2009/1/19
27. バイオアカデミックフォーラム
光をトリガーにしたDNA及びRNA操作法.
藤本健造
2008/7/3
28. 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム
酵素を使わずに光を用いて遺伝子进行操作する手法の開発と応用.
吉村嘉永、尾崎元樹、田屋悠太、松村裕史、藤本健造
2008/5/25
29. 2008年光化学討論会
光クロスリンク反応を用いた高感度遺伝子診断法の開発.
吉村嘉永、大竹智子、松崎智也、藤本健造
2008/9/11
30. 日本化学会第88回春季年会
DNA光ライゲーションによるRNA末端ラベリング.
荻野雅之、藤本健造
2008/3/27
31. 第18回アンチセンスシンポジウム
ボラノホスフェートRNAダイマー(ApbA)の化学合成と性質.
永田征吾、塩谷由輝子、益富 豊、北川英俊、高垣和史、岡 夏央、和田 猛、大木 忠明、

- 矢野純一
2008/11/17
32. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
miRNA検出用の新規アレイツール開発と発現解析.
村田成範、増見恭子、川島高広
2008/12/11
33. 第9回日本RNA学会
MALDI-TOF型質量分析計を用いたmiRNA発現プロファイル.
瀬口武史、宮内健常、坂口裕理子、上田宏生、鈴木 勉
2007/7/28
34. 第18回アンチセンスシンポジウム
ボラノホスホネート型核酸類縁体の合成と性質.
東田廉平、川中俊秀、岡夏央、和田猛
2008/11/17
35. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会
RNA創薬の現状と課題.
矢野純一
2008/6/27
36. 薬理学テクニカルセミナー –RNAiの基礎研究および医薬開発への応用–
独自のRNA合成技術と医薬品への応用.
矢野純一
2008/3/19
37. AsiaTIDES Keynote Presentaiton
Key Technologies for RNA Drug Discovery: RNA Delivery and Synthesis.
矢野純一
2009/2/23
38. 第18回International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acidsおよび第
35回国際核酸化学シンポジウム合同シンポジウム
Stereocontrolled synthesis of oligonucleoside phosphorothioates and
PO/PS-chimeric oligonucleotides by using oxazaphospholidine derivatives.
Natsuhisa Oka, Mika Yamamoto, Terutoshi Sato and Takeshi Wada
2008/10
39. 第18回International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acidsおよび第
35回国際核酸化学シンポジウム合同シンポジウム
Stereocontrolled synthesis of backbone-modified oligonucleotides via
diastereopure H-phosphonate intermediates.
Naoki Iwamoto, Natsuhisa Oka and Takeshi Wada
2008/10
40. 日本化学会第89春季年会
ボラノホスフェートRNAの新規合成法の開発.
村山隆二・岩本直樹・岡夏央・和田猛
2009/3

<平成21年度>

1. 第11回日本RNA学会年会・RNA2009
MALDI-TOF型質量分析計を用いたmiRNA発現プロファイル.
瀬口武史、宮内健常、上田宏生、加藤敬行、鈴木健夫、坂口裕理子、鈴木 勉
2009/7/21-29
2. JBICバイオ関連基盤技術研究会・第一回テーマ「核酸医薬(技術)の課題
製薬企業から見た核酸医薬品の課題と今後:一国内発の核酸医薬品創製に向けて-」
矢野純一
2010/2/26
3. Joint Symposium of 5th Annual Meeting of Oligonucleotide Therapeutics Society
and the 19th Antisense Symposium
Recent Progress of Stereocontrolled Synthesis of Backbone-modified Nucleic
Acids.
Takeshi Wada
2009/11
4. Asia TIDES 2010
Stereocontrolled Synthesis and Properties of Backbone-Modified
Oligonucleotides.
Takeshi Wada
2010/2
5. 第32回分子生物学会
血球系細胞の分化に関するmiRNA発現解析への新規アレイツールの応用
村田成範、増見恭子、林田真梨子、川島高広
2009/12/11
6. 第36回生体分子科学討論会
microRNAの配列選択的選別法の開発.
吉村嘉永、大竹智子、岡田孟、藤本健造
2009/6/19-21
7. 第二回ナノバイオ若手ネットワークキングシンポジウム
光を用いたDNA, RNA操作法の開発と応用.
藤本健造
2009/6/23-24
8. 9th International Bio Forum
Development about photo-triggered DNA and RNA manipulation.
Kenzo Fujimoto
2009/7/2
9. 第24回生体機能関連化学シンポジウム/第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム
配列選択的光クロスリンク反応を用いたmicroRNAの選別法の開発.
吉村嘉永、岡田孟、藤本健造
2009/9/13-15

10. The Sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
Development of a rapid and reversible photocrosslinking of RNA.
Yoshinaga Yoshimura, Tomoko Ohtake, Hajime Okada, and Kenzo Fujimoto
2009/9/27-30
11. 第58回高分子討論会
光クロスリンク反応を用いたmicroRNAの選別法の開発.
吉村嘉永、岡田孟、大竹智子、藤本健造
2009/9/16-18
12. Experimental biology 2009
Circular permutants of the ribosomes in the cell.
Kei Kitahara and Tsutomu Suzuki
2009/4/18
13. 第11回日本RNA学会年会
出芽酵母tRNA前駆体の細胞質から核への逆行性の輸送が塩基修飾の形成に関わる.
大平高之、鈴木 勉
2009/7/27-29
14. 第11回日本RNA学会年会
RNAドメインの序列的な転写はリボソームの生合成に必須ではない.
北原圭、鈴木 勉
2009/7/27-29
15. 第11回日本RNA学会年会
修飾塩基ワイプトシンの合成に関わる酵素TYW4の結晶構造:炭酸固定とメチル化による
tRNA修飾の構造基盤.
鈴木陽子、野間章子、鈴木勉、石谷隆一郎、濡木理
2009/7/27-29
16. 第11回日本RNA学会年会
マルチサイト特異性tRNAメチル化酵素のtRNA認識機構.
粟井貴子、木村聡、富川千恵、越智杏奈、Ihsanawati、別所義隆、横山茂之、横川隆志、
鈴木勉、堀弘幸
2009/7/27-29
17. 第11回日本RNA学会年会
哺乳動物ミトコンドリアGln-tRNA^{Gln}生合成.
長尾翌手可、鈴木健夫、加藤敬行、坂口祐理子、鈴木 勉
2009/7/27-29
18. 第11回日本RNA学会年会
イントロン領域におけるA-to-I RNAエディティングの機能解析.
矢野孝紀、櫻井雅之、上田宏生、岡田俊平、川畑瞳、鈴木 勉
2009/7/27-29
19. 第11回日本RNA学会年会
ヒトRM44複合体構成因子の同定と機能解析.
中條岳志、大平高之、上田宏生、五島直樹、野村信夫、鈴木健夫、坂口裕理子、鈴木
勉

2009/7/27-29

20. 第11回日本RNA学会年会
大腸菌RlmKLは23S rRNA中における2種類の異なるメチル化塩基の生合成を触媒する新しいタイプのRNA修飾酵素である。
Satoshi Kimura, Yoshiho Ikeuchi, Takeo Suzuki, Kei Kitahara, Yuriko Sakaguchi and Tsutomu Suzuki
2009/7/27-29
21. 第11回日本RNA学会年会
往復循環クロマトグラフィーを用いた微量RNAの全自動単離精製と修飾解析。
宮内健常, 坂口裕理子, 鈴木健夫, 鈴木 勉
2009/7/27-29
22. 第11回日本RNA学会年会
酵母ミトコンドリアtRNAの一次構造解析と修飾中間体に見られる特徴。
鈴木健夫, 近藤真一, 野間章子, 坂口裕理子, 宮内健常, 鈴木 勉
2009/7/27-29
23. 第11回日本RNA学会年会
A-to-I RNA editingによるmiRNA依存的翻訳制御の調節。
矢野孝紀, 櫻井雅之, 上田宏生, 岡田俊平, 川畑瞳, 鈴木 勉
2009/7/27-29
24. 第11回日本RNA学会年会
ICE法と次世代シーケンサーを組み合わせたヒト成人脳由来RNA中に含まれるイノシン化部位の網羅的探索。
上田宏生, 櫻井雅之, 川畑瞳, 光山統泰, 矢野孝紀, 岡田俊平, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 鈴木 勉
2009/7/27-29
25. 第11回日本RNA学会年会
ヒト転写産物におけるRNAエディティング部位探索と機能解析。
櫻井雅之, 川畑瞳, 矢野孝紀, 岡田俊平, 光山統泰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 上田宏生, 鈴木 勉
2009/7/27-29
26. 第11回日本RNA学会年会
マスマスペクトロメトリーによるmiRNAの直接プロファイリング。
坂口裕理子, 上田宏生, 宮内健常, 鈴木健夫, 鈴木 勉
2009/7/27-29
27. 第11回日本RNA学会年会
RNA修飾酵素の機能解析:ゼブラフィッシュを用いた疾患モデルの作成。
比嘉三代美, 平野菜穂子, 中島由香里, 鈴木健夫, 鈴木 勉, 剣持直哉
2009/7/27-29
28. 第11回日本RNA学会年会
MALDI-TOF型質量分析計を用いたmiRNA発現プロファイル。
瀬口武史, 宮内健常, 上田宏生, 加藤敬行, 鈴木健夫, 坂口裕理子, 鈴木 勉
2009/7/27-29

29. 第11回日本RNA学会年会
出芽酵母におけるRNA-タンパク質複合体の探索.
竹内祐樹、大平高之、上田宏生、坂口裕理子、鈴木 勉
2009/7/27-29
30. 第11回日本RNA学会年会
酵母tRNAにおける3メチルシチジン修飾酵素の機能解析.
イサンヒョン、野間章子、鈴木健夫、鈴木 勉
2009/7/27-29
31. KASTセミナー、機能性RNAコース～機能性RNAの歴史と応用展開～
RNAの直接解析で見えてきたもの～microRNAが有する質的な情報と選択的安定化機構～
鈴木 勉
2009/9/16
32. 第82回日本生化学会年会
高感度質量分析法を用いた哺乳動物ゲノムDNA断片の直接解析と新規DNA修飾の探索.
北村哲也、鈴木健夫、上田宏生、坂口裕理子、鈴木 勉
2009/10/21-23
33. 第82回日本生化学会年会
RNAの直接解析で見えてきたもの.
鈴木 勉
2009/10/23
34. 第82回日本生化学会年会
マスペクトロメトリーによるmiRNAの直接プロファイリングとmiRNAの特異的安定化機構の
発見.
坂口裕理子、加藤敬行、上田宏生、宮内健常、柏原真一、馬場忠、姜 秉一、栗原靖之、
鈴木健夫、鈴木 勉
2009/10/21-24
35. 第82回日本生化学会年会
リボソーム生合成過程におけるRNA修飾の機能解析.
荒井大河、北原圭、木村聡、鈴木健夫、鈴木勉
2009/10/21-24
36. 国際核酸化学シンポジウム
Precise analysis of modification status at various stage of tRNA maturation in
Saccharomyces cerevisiae.
Takayuki Ohira, Kenjyo Miyauchi, Yuriko Sakaguchi, Takeo Suzuki, Tsutomu
Suzuki
2009/9/27-10/1
37. Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of OTS and The 19th Antisense
Symposium
Direct analysis of small non-coding RNAs by mass spectrometry.
Tsutomu Suzuki
2009/11/6

38. 第32回日本分子生物学会年会
Direct profiling of microRNAs by capillary LC/nano ESI mass spectrometry.
Byeong-Il Kang, Yuriko Sakaguchi, Hiroki Ueda, Kenjyo Miyauchi, Yasuyuki Kurihara, and Tsutomu Suzuki
2009/12/9-12
39. 第32回日本分子生物学会年会
マスマスペクトロメトリーにより決定された大腸菌tRNA全48種の化学構造. A landscape of tRNA modifications: complete chemical structures of total 48 species of *Escherichia coli* tRNAs determined by mass spectrometry.
Kenjyo Miyauchi, Yuriko Sakaguchi, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2009/12/9-12
40. 第32回日本分子生物学会年会
Exploratory search and functional analysis of A-to-I RNA editing in non-coding RNA.
Hideki Terajima, Masayuki Sakurai, Takanori Yano, Shumpei Okada, Hitomi Kawabata, Toutai Mitsuyama, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Hiroki Ueda and Tsutomu Suzuki
2009/12/9-12
41. 第32回日本分子生物学会年会
A novel methyltransferase bearing dual active sites responsible for two species of methyl-modifications in *Escherichia coli* 23S rRNA.
Satoshi Kimura, Yoshiho Ikeuchi, Takeo Suzuki, Kei Kitahara, Yuriko Sakaguchi and Tsutomu Suzuki
2009/12/9-12
42. 第32回日本分子生物学会年会
A landscape of A-to-I RNA editing in human transcriptome: a hidden layer of gene expression produced by qualitative information embedded in RNA molecules.
Tsutomu Suzuki, Hiroki Ueda, Takanori Yano, Shunpei Okada, Hideki Terajima, Totai Mitsuyama, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Hitomi Kawabata and Masayuki Sakurai
2009/12/9-12
43. 第32回日本分子生物学会年会
Mechanistic characterization of the selective stabilization of miR-122 mediated by 3'-terminal adenylation by GLD-2.
Hiroaki Hojo, Takayuki Katoh and Tsutomu Suzuki
2009/12/9-12
44. 第32回日本分子生物学会年会
Requirements for in vitro formation of 5-carboxymethylaminomethyluridine at the wobble position in *Escherichia coli* tRNAs.
Takeo Suzuki, Tomoyuki Numata, Takuo Osawa and Tsutomu Suzuki
2009/12/9-12
45. 第32回日本分子生物学会年会
Analysis of ribosomal RNA modification using snoRNA knockdown system.
Sayomi Higa, Takeo Suzuki, Yukari Nakajima, Naoko Hirano, Tamayo Uechi, Tsutomu Suzuki and Naoya Kenmochi

2009/12/9-12

46. 第32回日本分子生物学会年会
The acetylation of 18S rRNA is an essential modification to synthesize the small subunit of eukaryotic ribosome.
Satoshi Ito, Yu Akamatsu, Akiko Noma, Satoshi Kimura, Yoshiho Ikeuchi, Yoshikazu Tanaka, Kenjyo Miyauchi, Isao Tanaka, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2009/12/10
47. Univ of Todai/Yonsei Univ GCOE Joint Symposium "Chemistry Innovation"
Functional Analysis of A-to-I Editing in the Intronic Regions of Human mRNAs.
Takanori Yano, Masayuki Sakurai, Hiroki Ueda, Shumpei Okada, Hitomi Kawabata and Tsutomu Suzuki
2010/1/19
48. Univ of Todai/Yonsei Univ GCOE Joint Symposium "Chemistry Innovation"
Characterization of novel ribonucleoprotein complex found in human mitochondria.
Takeshi Chujo, Takayuki Ohira, Hiroki Ueda, Takeo Suzuki, Yuriko Sakaguchi and Tsutomu Suzuki
2010/1/19
49. Univ of Todai/Yonsei Univ GCOE Joint Symposium "Chemistry Innovation"
Exploration and Characterization of the Genes Responsible for Biosynthesis of Ribosomal RNA Modification.
Satoshi Kimura, Yoshiho Ikeuchi, Kei Kitahara, Yuriko Sakaguchi, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2010/1/19
50. The 23rd tRNA workshop
Biogenesis of Gln-mt tRNA^{Gln} in human mitochondria.
Asuteka Nagao, Takeo Suzuki, Takayuki Katoh, Yuriko Sakaguchi and Tsutomu Suzuki
2010/1/28-2/2
51. The 23rd tRNA workshop
Novel wobble modification in tRNA^{Ile} responsible for decoding AUA codon in archaeal species; convergent evolution of the decoding system across domains of life.
Satoshi Kimura, Yoshiho Ikeuchi, Tomoyuki Numata, Daigo Nakamura, Takashi Yokogawa, Kazuya Nishikawa, Takeshi Wada, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2010/1/28-2/2
52. The 23rd tRNA workshop
A landscape of tRNA modifications: complete chemical structures of total 48 species of *Escherichia coli* tRNAs determined by mass spectrometry.
Kenjyo Miyauchi, Yuriko Sakaguchi, Takeo Suzuki and Tsutomu Suzuki
2010/1/28-2/2
53. The 23rd tRNA workshop
Requirements for in vitro formation of 5-carboxymethylaminomethyluridine at the wobble position in *Escherichia coli* tRNAs.

Takeo Suzuki, Tomoyuki Numata, Takuo Osawa and Tsutomu Suzuki
2010/1/28-2/2

54. The 23rd tRNA workshop

Tertiary network in mammalian mitochondrial tRNA revealed by solution
probing and phylogeny.

Marie Messmer, Joern Putz, Takeo Suzuki, Tsutomu Suzuki, Claude Sauter,
Marie Sissler and Florentz Catherine

2010/1/28-2/2

55. 臨床応用を目指した最前線セミナー～microRNAを標的とした診断・治療の開発に向けて
～

RNAの直接解析で見えてきたもの～microRNAが有する質的な情報と選択的安定化機構
～

鈴木 勉

2010/2/15

研究開発項目③

機能性RNAの機能解析

<平成17年度>

1. 第24回メディシナルケミストリーシンポジウム
ゲノム科学に基づく創薬研究.
辻本豪三
2005/11/29
2. 千里ライフサイエンスシンポジウム
ゲノム機能科学に基づく創薬表的探索.
辻本豪三
2006/2/7
3. 第2回公開シンポジウム「免疫難病・感染症等の先進医療技術」
細胞脱分化の誘導－拒絶反応と倫理的問題の多い多能性幹細胞樹立を目指して.
山中伸弥
2005/12/16
4. 公開シンポジウム「RNA 情報網」
Mechanistic insights into the linkage between pre-mRNA splicing and snoRNP
biogenesis.
廣瀬哲郎
2005/8/8
5. Cold Spring Harbor Lab meeting「Eukaryotic mRNA processing」
The ATPase-like spliceosomal protein, X160, is a general intron-binding protein that
recruits factors involved in late stages of splicing and post-splicing events.
廣瀬哲郎
2005/8/26
6. 日本生化学会
機能性 RNA 研究の新展開
Mechanistic insights into determining the post-splicing fates of the removed intron and
the ligated exon.
廣瀬哲郎
2005/10/22

7. 日本分子生物学会
ポストスプライシング現象を規定する核内因子 X160 の機能.
廣瀬哲郎
2005/12/8
8. 日本分子生物学会年会
線虫低分子RNAのカタログ化.
牛田千里
2005/12/7
9. A-IMBN annual meeting
miRNA biogenesis in Drosophila.
塩見美喜子
2005/10/28
10. 日本分子生物学会年会
ショウジョウバエにおける RNA silencing.
塩見美喜子
2005/12/8
11. 日本分子生物学会年会
RNAi における Argonaute 蛋白質の Slicer としての機能.
三好啓太、塩見美喜子
2005/12/8
12. Keystone Symposia
RNAi and Related Pathways
Biochemical characterization of RNAi and miRNA pathways in Drosophila.
塩見美喜子
2006/1/28
13. 日本薬理学会年会
Biochemical characterization of RNAi and miRNA pathways in Drosophila.
塩見美喜子
2006/3/8
14. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells, Kyoto
Genome-wide expression analyses revealed universal existence of natural antisense RNA at imprinted loci in mice.

Kiyosawa, H., Mise, N., Iwase, S. and Abe, K.
2005/11

15. 第 28 回日本分子生物学会

組織特異的に変化するナチュラル・センス-アンチセンス遺伝子の発現解析.
清澤秀孔、小林理恵子、三瀬名丹、岩瀬秀、大久保和央、瀬野龍一郎、安部一俊、
阿部訓也
2005/12

<平成18年度>

1. 第 43 回今掘フォーラム

Micro RNA の機能と疾患との関連.
吉田 哲郎
2006/5/30

2. Keystone Symposia “MicroRNAs and siRNAs: Biological Functions and Mechanisms

Micro RNAs regulate osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells.
Yoji Yamada, Tatsuya Miyazawa and Tetsuo Yoshida
2007/1/31

3. A celebration of 25 years of embryonic stem cell research in Cambridge

Expression of microRNAs in ES cells and iPS cells.
小柳 三千代
2006/12/18-12/19

4. BBSRC Japan Partnering Award Meeting

Expression of microRNAs in ES cells and iPS cells.
小柳 三千代
2006/12/21

5. 11th Annual meeting of the RNA society , Seattle USA

Significant role of Intron in EJC assembly in the spliceosomal C1 complex.
Ideue, T., Nagai, M., Hagiwara, M., Hirose, T.
2006/6/23

6. 第8回日本 RNA 学会

RNA 品質管理機構の機能抑制によるヒト mRNA 型 non-coding RNA 蓄積への影響.
廣瀬哲郎、永井美智、渋谷真弓、井手上賢、横井崇秀
2006/7/19

7. 第8回日本 RNA 学会

イントロン結合タンパク質 IBP160 は EJC の会合に必要である.

井手上賢、永井美智、萩原正敏、廣瀬哲郎

2006/7/20

8. 新しい RNA/RNP を見つける会

mRNA と ncRNA の細胞内挙動の違いについて.

廣瀬哲郎

2006/9/1

9. RNA 2006 Izu

Intron-mediated assembly of exon junction complex in the spliceosomal C1 complex.

Ideue, T., Sasaki, YF, Hagiwara, M., Hirose, T.,

2006/12/5

10. 日本分子生物学会 2006 フォーラムシンポジウム

ヒトの non-coding RNA 様転写物と mRNA との細胞内挙動の違いについて.

廣瀬哲郎、佐々木保典

2006/12/8

11. RNA 特定サテライトミーティング

機能性ノンコーディング遺伝子を探す.

相澤 康則

2006/9/12

12. The LXXI Cold Spring Harbor Sympoium

Expression of *C. elegans* novel ncRNAs Regularoty RNAs.

牛田千里

2006/6/3

13. IUBMB 国際学会シンポジウム

Characterization of Cen21/CeR-2 RNA, small ncRNA localized in *Caenorhabditis elegans* Nucleoli.

保木井悠介、牛田千里

2006/6/19

14. 第8回日本 RNA 学会

C.elegans 低分子 RNA CeR-2 RNA の細胞内局在と生合成.

保木井悠介、牛田千里

2006/7/19

15. 新しい RNA/RNP を見つける会

C. elegans small RNAs.

牛田千里

2006/9/1

16. 新しい ncRNA/RNP を見つける会

ホールマウント RNA-FISH による線虫低分子 RNA の発現解析.

菅原由起、牛田千里

2006/9/1

17. RNA 特定サテライトミーティング

C. elegans 新規 H/ACA 型 RNA の発現解析.

遠藤優子、牛田千里

2006/9/12

18. East Asia Worm Meeting

Spatio temporal distribution patterns of *C. elegans* small ncRNAs.

保木井悠介、牛田千里

2006/11/17

19. RNA2006Izu

C. elegans small-RNA catalog.

牛田千里

2006/12/5

20. MBSJ

Biochemical analyses of Drosophila Piwi-subfamily protein functions in germ-line development and in RNA silencing.

Kuniaki Saito, Kazumichi M. Nishida, Tomoko Mori, Yoshinori Kawamura, Keita Miyoshi, Tomoko Nagami, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi

2006/5

21. IUBMB国際学会シンポジウム

Distinctive roles of five Drosophila Argonautes in RNA silencing.

Mikiko C. Siomi

2006/6/19

22. IUBMB 国際学会シンポジウム
Functional analysis of CG31992, a Drosophila homolog of human GW182, in miRNA-mediated RNA silencing pathway.
Keita Miyoshi, Haruhiko Siomi, Mikiko C. Siomi
2006/6/19
23. 日本 RNA 学会年会
ショウジョウバエ生殖幹細胞自己新生因子 PIWI による RNA silencing 機構.
齋藤都暁、西田知訓、森智子、河村佳紀、永海知子、三好啓太、塩見春彦、
塩見美喜子
2006/7/19
24. 第 8 回 日本 RNA 学会年会
ショウジョウバエ miRNA 機構におけるヒト GW182 ホモログ CG31992 の機能解析.
三好啓太、塩見春彦、塩見美喜子
2006/7/19
25. CAS international meeting
RNA silencing mediated by Piwi, an essential factor for germline stem cell self-renewal in Drosophila.
Kuniaki Saito, Kazumichi M. Nishida, Tomoko Mori, Yoshinori Kawamura, Keita Miyoshi, Tomoko Nagami, Haruhiko Siomi and Mikiko C. Siomi
2006/10
26. KSMCB 2006
Elucidating the connection between Fragile X Syndrome and RNA silencing using Drosophila as a model.
Mikiko C. Siomi
2006/10/12
27. RNA 2006 IZU
RNA silencing mediated by Piwi subfamily proteins and rasiRNAs in Drosophila.
Mikiko C. Siomi and Haruhiko Siomi
2006/12/4
28. 日本分子生物学会2006フォーラム
ショウジョウバエにおけるRNA silencingの分子メカニズム.
塩見美喜子
2006/12/8
29. 日本分子生物学会 2006 フォーラム
ショウジョウバエ miRNA 機構におけるヒト GW182 ホモログ CG31992 の機能解析.
三好啓太、塩見春彦、塩見美喜子
2006/12/8

30. Keystone Symposia Conference (miRNA and RNAi)
Piwi Subfamily Proteins and their Associated Small RNAs in Drosophila Germlines.
Mikiko C. Siomi
2007/1/30
31. Genome Informatics Workshop 2006
Computational Analysis of Global Expression Profiles in Mouse Natural Antisense Transcripts.
Okada Y, Numata K, Saito R, Kiyosawa H, Kanai A, Tomita M
2006/12
32. 日本薬学会年会第 127 年会
microRNA による制御遺伝子ネットワークの構築.
国本亮、奥野恭史、箕輪洋介、外村孝一郎、土屋創健、寺澤和哉、類家慶直、津田謹輔、
辻本豪三
2007/3/28-30
33. 岡山大学学内 COE「医歯薬融合による統合的疾患プロテオミクスの構築とその応用研究」
平成 18 年度報告会
網羅的プロテオーム解析による癌および疾病原因遺伝子産物の標的蛋白群の同定と発
症機構の解明.
大内田 守、神崎浩孝、伊藤佐智夫、清水憲二
2007/2/20-21
34. 岡山大学重点プロジェクト公開シンポジウム
LC/MS 解析を目的とした2次元電気泳動における分離能の改善と評価.
神崎浩孝、大内田 守、清水憲二
2007/3/20
35. 岡山大学重点プロジェクト公開シンポジウム
LC/MS を用いた microRNA の標的蛋白の解析.
大内田 守、神崎 浩孝、伊藤佐智夫、清水憲二
2007/3/20
36. 第 263 回情報計算化学生物学会(CBI)研究講演会「エピジェネティクス:疾患と創薬の視点
から」
近年のゲノム・トランスクリプトーム解析から判明した哺乳動物の内在性アンチセンス RNA

の特徴.
清澤秀孔
2006/4

37. 東京大学大学院農学生命科学研究科・応用動物科学セミナー
マウストランスクリプトーム解析で判明した内在性アンチセンス RNA の特徴.
清澤秀孔
2006/7

38. 第 8 回日本 RNA 学会
ヒトとマウスにおいて保存されるセンス・アンチセンス遺伝子の発現解析.
田代千晶、沼田興治、大久保和央、岩瀬秀、岡田祐輝、瀬野龍一郎、安部一俊、金井昭夫、斎藤輪太郎、阿部訓也、清澤秀孔
2006/7

39. RNA 2006 Izu, International Symposium <Functional RNAs and Regulatory Machinery>
Expression analysis of sense and antisense genes conserved between mice and human.
Tashiro, C., Okada, Y., Numata, K., Kobayashi, R., Saito, R., Kanai, A., Doi, T., Abe, K. and Kiyosawa, H.
2006/12

40. 日本分子生物学会 2006 フォーラム シンポジウム「ゲノム情報発現制御因子としての Noncoding RNA」
マウストランスクリプトームで同定された内在性アンチセンス/non-coding RNA の発現析.
清澤秀孔
2006/12

41. 大阪大学大学院医学研究科・生殖幹細胞セミナー
mRNA と相補性を持つ RNA を介した細胞機能制御機構の解析.
清澤秀孔
2006/12

42. The 17th International Conference on Genome Informatics
Computational analysis of global expression profiles in mouse natural antisense transcripts.
Okada, Y., Numata, K., Saito, R., Kiyosawa, H. and Tomita, M.
2006/12

<平成19年度>

1. 日本分子生物学会春季シンポジウム
Identification and characterization of human non-coding RNAs with tissue-specific expression.
佐々木保典、佐野美穂、井手上賢、金大真、浅井潔、廣瀬哲郎
2007/4/23
2. Twelfth annual meeting of the RNA society
Expression profile and intracellular localization of putative non-coding RNAs in human cells.
Sasaki, Y., Sano, M., Ideue, T., Kin, T., Asai, K., and Hirose, T.
2007/5/29-6/3
3. 日本RNA学会
多発性内分泌腫瘍(MEN)座位ノンコーディングRNAの細胞内局在
佐々木保典、井手上賢、佐野美穂、横井崇秀、廣瀬哲郎
2007/7/29
4. 日本RNA学会
ヒト培養細胞中の U7 snRNA の機能破壊が及ぼすヒストン mRNA プロセッシングへの影響
井手上賢、永井美智、横井崇秀、廣瀬哲郎
2007/7/29
5. 日本RNA学会
胸腺特異的な新規 non-coding 様 RNA Thy-nc1 の解析
青木一真、佐野美穂、原島哲、廣瀬哲郎
2007/7/29
6. 日本RNA学会
新しい RNA 解析系によるオーファン snoRNA 標的遺伝子の探索
井手上賢、永井美智、戸川昌代、廣瀬哲郎
2007/7/29
7. 第30回日本分子生物学会年会
核内構造体パラスペックルの構造維持に寄与する non-coding RNA の作用機構。
佐々木保典、井手上賢、佐野美穂、横井崇秀、廣瀬哲郎

2007/12/11

8. 第 30 回日本分子生物学会年会

U7 snRNA の機能破壊が引き起こすヒト培養細胞の細胞周期遅延の分子機構の解析.
井手上賢、青木一真、永井美智、横井崇秀、廣瀬哲郎

2007/12/11

9. 第 30 回日本分子生物学会年会

胸腺特異的ノンコーディング RNA Thy-nc1 の性状解析.
青木一真、佐野美穂、原島哲、廣瀬哲郎

2007/12/11

10. 第1回「情報と細胞機能」研究会

細胞核内ボディの形成と維持に関わる non-coding RNA の解析.
廣瀬哲郎

2008/2/16

11. 日本分子生物学会春季シンポジウム

piRNA biogenesis and modification in Drosophila.
塩見美喜子

2007/4/23-24

12. 2007FAOBMB シンポジウム

Biogenesis of repeat-associated short interfering RNA in Drosophila.
塩見美喜子

2007/5/29

13. 第 6 回新しい RNA/RNP を見つける会

新しいカーネル関数を用いた機能性 RNA 探索手法の開発と線虫ゲノム上での実験.
森田研介, 齋藤裕

2007/9/6

14. 国際哺乳類ゲノム会議

Global analysis of microRNA and gene expression in human cell lines.
類家慶直、市村敦彦、国本亮、奥野恭史、土屋創健、清水一治、辻本豪三

2007/10/29

15. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会
マウス体細胞の初期化に関わる microRNA の同定と機能解析.
小柳三千代、一阪朋子、青井貴之、沖田圭介、高橋和利、中川誠人、山中伸弥
2007/12/11-12
16. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会
慢性骨髄性白血病細胞株 K562 において TPA 刺激により誘導される miRNA および標的
遺伝子探索
市村敦彦、類家慶直、寺澤和哉、辻本豪三
2007/12/11-12
17. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会
MAP キナーゼ経路によって誘導される miRNA の同定と解析
寺澤和哉、松尾剛明、辻本豪三
2007/12/12
18. Mobile Elements in Mammalian Genomes (FASEB Conferences)
Retrotransposon adaptation into the human transcriptome.
Y. Aizawa
2007/6/2-7
19. 第9回日本RNA学会年会
コーディング及びノンコーディングRNAにおけるヒト・レトロトランスポゾン由来配列の分布
とその生物学的意義.
菊池邦生、坊農秀雅、相澤康則
2007/7/28-31
20. 第9回日本RNA学会年会
分化誘導系によるノンコーディング遺伝子の抽出と発現解析
菊池邦生、渡辺亮子、横井崇秀、渡辺公綱、相澤康則
2007/7/28-31
21. Molecular Control of Adipogenesis and Obesity (Keystone Symposia)
Noncoding "Long" RNAs in the Signalling Networks behind hMSC Differentiation.
K. Kikuchi, M. Inoue, M. Fukuda, T. Kin, K. Asai, T. Hirose, K. Watanabe, and Y.
Aizawa
2008/2/19-24

22. Molecular Control of Adipogenesis and Obesity (Keystone Symposia)
Loss-of-function studies on Anti-adipogenesis Non-coding RNA 4 and 5 in hMSC
Adipogenesis.
M.Inoue, K. Kikuchi, and Y. Aizawa
2008/2/19-24
23. Molecular Control of Adipogenesis and Obesity (Keystone Symposia)
Novel Non-coding RNAs Involved in Adipogenesis and Neurogenesis.
M.Fukuda, K.Kikuchi, and Y. Aizawa
2008/2/19-24
24. 分子生物学会第7回春季シンポジウム
線虫 *Caenorhabditis elegans* における rRNA プロセッシング機構.
笹野有未、保木井悠介、牛田千里、井上邦夫、坂本 博、藤原俊伸
2007/4/23
25. 第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会
線虫の機能 RNomics.
牛田千里、小笠原隆広、天川純一、遠藤優子、菅原由起、武藤 昱、保木井悠介
2007/5/29
26. 16th International C. elegans Meeting
C/D or H/ACA snoRNP proteins do not influence the nucleolar localization of
C.elegans CeR-2/CeN21 RNA.
Hokii, Y., Shimoyama, M., Taneda, A., Sasano, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Sakata,
K., Shingai, R., Muto, A., and Ushida, C.
2007/6/30
27. 第 9 回 RNA ミーティング
受精前後の卵における線虫 *Caenorhabditis elegans* 核小体低分子 RNA の動態.
保木井悠介、笹野有未、藤原俊伸、坂本 博、武藤 昱、牛田千里
2007/7/30
28. 第 9 回 RNA ミーティング
線虫 snoRNP タンパク質遺伝子ノックダウン株における snoRNA の局在変化.
菅原由起、保木井悠介、武藤 昱、牛田千里
2007/7/30

29. 新しい ncRNA/RNP を見つける会
Intracellular localization of *C. elegans* novel ncRNAs.
佐藤洋旭、牛田千里
2007/9/6
30. BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)
線虫新規低分子 ncRNA の局在解析.
牛田千里、保木井悠介、菅原由起、遠藤優子、佐藤洋旭、武藤 昱
2007/12/13
31. 第9回日本 RNA 学会年会
ショウジョウバエ生殖細胞における RNA silencing 機構
塩見美喜子
2007/7/28
32. EMBO WorldWorkshop「日本で開く第8回欧州減数分裂会議」
RNA silencing mechanisms in *Drosophila* germlines.
Siomi MC.
2007/9/13-18
33. 日本遺伝学会年会
RNA 干渉による遺伝子サイレンシング.
塩見美喜子
2007/9/19
34. 23rd Ernst Klenk Symposium
RNA silencing in *Drosophila* germlines.
Siomi MC.
2007/10/2
35. 日本がん学会年会
Elucidating the mechanism of RNA silencing in *Drosophila*.
Siomi MC.
2007/10/4
36. 第20回内藤コンファレンス
Molecular mechanisms of RNA silencing in *Drosophila*
Siomi MC.

2007/10/9-12

37. WAKO ワークショップ「RNA ルネッサンス」

RNA サイレンシング:分子とその機能.

塩見美喜子

2007/11/16

38. BMB 2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)

ショウジョウバエ生殖細胞で起こる RNA サイレンシング機構.

塩見美喜子

2007/12/11

39. ISAG 2007(International Symposium on Applied Genomics 2007)

Gene silencing mechanisms mediated by small RNAs and Argonates in Drosophila.

Siomi MC.

2007/12/19-20

40. JSBi 2007(Japanese Society for Bioinformatics2007)

Gene silencing mechanisms mediated by small RNAs and Argonates in Drosophila.

Siomi MC.

2007/12/18

41. 第 9 回日本 RNA 学会

ヒト-マウス間の内在性センス-アンチセンス RNA の比較発現プロファイリング

沼田興治、岡田祐輝、長田木綿子、斎藤輪太郎、金井昭夫、阿部訓也、清澤秀孔

2007/7/28

42. 清澤秀孔

哺乳動物における内在性アンチセンス/ncRNA

千葉がんセンター・集談会

2007/8

43. 第6回新しい RNA/RNP を見つける会

カスタムオリゴ DNA アレイをもちいた新規内在性アンチセンス RNA の解析.

沼田興治、長田木綿子、岡田祐輝、斎藤輪太郎、金井昭夫、阿部訓也、清澤秀孔

2007/9/5-6

44. 第6回新しいRNA/RNPを見つける会
センス-アンチセンス転写産物の網羅的解析のための情報整備
斎藤輪太郎、長田木綿子、岡田祐輝、沼田興治、村田真也、金井昭夫、富田勝、清澤秀孔
2007/9/5-6
45. 第6回新しいRNA/RNPを見つける会
ヒト-マウス間シntenニー領域に存在する内在性アンチセンス転写産物の組織別発現比較解析.
岡田祐輝、田代千晶、沼田興治、斎藤輪太郎、金井昭夫、阿部訓也、富田勝、清澤秀孔
2007/9/5-6
46. 第6回新しいRNA/RNPを見つける会
内在性アンチセンス RNA の解析方法.
清澤秀孔
2007/9/5-6
47. The 17th Lake Shirakaba Conference
Current progress in Mammalian endogenous antisense/ncRNA studies.
Kiyosawa, H.
2007/10/28-11/1
48. 日本動物遺伝育種学会・シンポジウム
哺乳動物の内在性アンチセンス/ncRNA
清澤秀孔
2007/11/25
49. BMB 2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)
哺乳動物における新規アンチセンス/ncRNA の発現解析.
清澤秀孔、沼田興治、岡田祐輝、長田木綿子、斎藤輪太郎、金井昭夫、安江博、大河内信弘、阿部訓也
2007/12/11-15
50. BMB 2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)
センス-アンチセンス転写産物の特徴解析に向けた基盤整備.
長田木綿子、岡田祐輝、沼田興治、村田真也、斎藤輪太郎、金井昭夫、富田勝、清澤秀孔
2007/12/11-15

51. BMB 2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)
ヒト-マウス間シテニー領域に存在する内在性アンチセンス転写産物の組織別発現比較解析.
岡田祐輝、田代千晶、沼田興治、金井昭夫、斎藤輪太郎、阿部訓也、富田勝、清澤秀孔
2007/12/11-15
52. BMB 2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)
ゲノムシテニー情報をもちいた新規内在性アンチセンス転写産物の予測.
沼田興治、長田木綿子、岡田祐輝、斎藤輪太郎、金井昭夫、阿部訓也、清澤秀孔
2007/12/11-15
53. 第 21 回国際哺乳類ゲノム会議
Global analysis of microRNA and gene expression in human cell lines.
類家慶直、市村敦彦、国本亮、奥野恭史、土屋創健、清水一治、辻本豪三
2007/10/29
54. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2007)
慢性骨髄性白血病細胞株 K562 において TPA 刺激により誘導される miRNA および標的遺伝子探索.
市村敦彦、類家慶直、寺澤和哉、辻本豪三
2007/12/11
55. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(BMB2007)
MAP キナーゼ経路によって誘導される miRNA の同定と解析.
寺澤和哉、松尾剛明、辻本豪三
2007/12/12
56. 第 30 回日本分子生物学会
遺伝子ノックアウト法により見えてきた miRNA が寄与する生命現象
蓮輪英毅、伊川正人、岡部勝
2007 年 12 月
57. 岡山大学学内 COE「医歯薬融合による統合的疾患プロテオミクスの構築とその応用研究」
平成 19 年度報告会
網羅的プロテオーム解析による癌および疾病原因遺伝子産物の標的蛋白群の同定と発症機構の解明
大内田 守、神崎浩孝、伊藤佐智夫、清水憲二

2008/2/14

58. 岡山大学重点プロジェクト公開シンポジウム

発がんに関わる microRNA の標的蛋白のプロテオミクス解析

大内田 守、神崎 浩孝、伊藤佐智夫 清水憲二

2008/3/14

59. 第9回RNAミーティング(第9回日本RNA学会年会)

ヒト間葉系幹細胞からの miRNA の単離と解析

吉田哲郎、山田陽史、宮澤達也

2007/7/29

60. 第66回日本癌学会 学術総会

がんと低分子機能性 RNA(シンポジウム)

マイクロ RNA による癌治療の可能性

吉田哲郎

2007/10/4

61. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(BMB2007)

癌細胞の増殖・細胞死に関与するマイクロ RNA の同定と機能解析

中野春男、宮澤達也、山田陽史、吉田哲郎

2007/12/14

<平成20年度>

1. 千里ライフサイエンスセミナー(招待公演)

iPS細胞の可能性と課題.

山中伸弥

2009/1/9

2. 第22回表皮細胞研究会

iPS細胞の可能性と課題.

山中伸弥

2008/12/7

3. 第29回日本臨床薬理学会年会(招待公演)

iPS細胞の可能性と課題.

山中伸弥

2008/12/5

4. International Symposium on Regenerative Medicine –Tenth Anniversary of Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University(招待公演)

Induction of Pluripotency by Defined Factors.

- Yamanaka, S.
2008/12/4
5. 慶応義塾大学・京都大学連携記念第1回シンポジウム(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/12/4
 6. 第38回日本免疫学会総会(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/12/3
 7. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/11/27
 8. The Massry Prize(アメリカ)(招待公演)
iPS Cells, Perspective and Challenge.
Yamanaka, S.
2008/11/22
 9. 2008 Massry Prize Mini-Symposium at UCLA(アメリカ)(招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S.
2008/11/21
 10. Massry Prize Lectures at USC(アメリカ)(招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S.
2008/11/20
 11. 2008年度武田医学賞受賞記念講演(招待公演)
多能性幹細胞の維持と誘導.
山中伸弥
2008/11/12
 12. 第23回内藤カンファレンス(招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
山中伸弥
2008/11/12
 13. 関西医科大学創立80周年記念講演会(招待公演)
iPS細胞の可能性.
山中伸弥
2008/11/1
 14. 第23回日本整形外科基礎学術集会(招待公演)
iPS細胞研究の展望と課題.
山中伸弥

2008/10/24

15. BioJapan2008
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/10/17
16. 第70回日本血液学会総会(招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
山中伸弥
2008/10/10
17. The Biology of Stem Cells in Development and in Cancer, Karolinska Institutet (スウェーデン)(招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S.
2008/9/25
18. 第13回アジア太平洋リウマチ会議 開会式特別講演(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/9/23
19. 万有製薬株式会社 第4回 Kansai Cardiovascular Consortium (招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/9/20
20. 第17回日本組織適合性学会大会 第44回日本移植学会総会 合同特別講演(招待公演)
iPS細胞の展望と課題.
山中伸弥
2008/9/19
21. 2nd International SOX Meeting Opening lecture(招待公演)
iPS, Perspective and Challenge.
Yamanaka, S.
2008/9/16
22. 北京大学 College of Life Science (招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S.
2008/9/11
23. The Shaw Prize Public Lectures(招待公演)
iPS Cell, Perspective and Challenge.
Yamanaka, S.
2008/9/10
24. Workshop on Cellular Reprogramming, Development and Stem Cells(招待公演)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S.

2008/9/8

25. European Forum Alpbach 2008 Technology Forum(オーストリア) (招待公演)
iPS cells—perspective and challenge.
Yamanaka, S.
2008/8/21
26. 清和政策研究会 夏季研究会(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/8/19
27. First Annual Stem Cell Symposium on the Bay(アメリカ) (招待公演)
iPS Cell.
Yamanaka, S.
2008/8/8
28. 中日懇話会400回記念会(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/7/8
29. 神戸大学 神戸カンファレンス(招待公演)
iPS細胞の展望と課題
山中伸弥
2008/6/27
30. 奈良県立医科大学精神医学教室同門会・三山会学術講演会 (招待公演)
iPS細胞の可能性と課題
山中伸弥
2008/6/7
31. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会(招待公演)
iPS細胞の展望と課題.
山中伸弥
2008/5/23
32. 大阪臨床整形外科医会研修会(招待公演)
人工多能性幹細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/5/17
33. 毛髪研究サテライトシンポジウム(招待公演)
Perspective of iPS cells.
山中伸弥
2008/5/13
34. 第16回近畿臍帯血幹細胞移植研究会(招待公演)
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2008/5/10

35. 大塚製薬株式会社 第26回川内カンファレンス(招待公演)
多能性幹細胞研究のインパクト—iPS細胞研究の今後.
山中伸弥
2008/5/1
36. 毎日新聞社 シンポジウム
iPS細胞の展望と課題.
山中伸弥
2008/4/15
37. The 3rd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest Under Stress
(招待公演)
Induction of pluripotency by defined factors.
Yamanaka, S.
2008/4/9
38. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008)
MicroRNA-338 and microRNA-451 regulate localization of beta1 integrin into basolateral
membrane.
土屋創健、奥 雅仁、今中由花子、奥野恭史、寺澤和哉、佐藤史顕、清水一治、辻本豪
三
2009/12/10
39. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008)
マウス・ヒト体細胞のiPS細胞化に関わるmicroRNAの探索とその機能解析.
小柳三千代、岡田亜紀、一阪朋子、熊崎 恵、田辺剛士、青井貴之、沖田圭介、高橋和
利、中川誠人、山中伸弥
2008/12/9
40. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008) iPS細
胞に由来するマウスの長期経過観察.
青井貴之、沖田圭介、一阪朋子、田邊剛士、小柳三千代、高橋和利、中川誠人、山中伸
弥
2008/12/9
41. 41st Annual SSR Meeting
Disruption of miR-200b Leads to Female Infertility.
Hidetoshi Hasuwa, Masahito Ikawa and Masaru Okabe
2008/5/27-30
42. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)
プロテオミクス解析によるmiRNA clusterの新規標的タンパク質の探索.
神崎浩孝、大内田守、伊藤佐智夫、田丸聖治、花房裕子、清水憲二
2008/12/12
43. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)
ヒト卵巣癌細胞の増殖・細胞死を制御するマイクロRNA.
中野春男、宮澤達也、木下圭太、山田陽史、吉田哲郎
2008/12/11

44. Keystone Symposia 'Therapeutic Modulation of RNA Using Oligonucleotides'
Identification of microRNAs targeting Cyclin D1 and Bcl-XL mRNAs in colorectal cancer cells.
Haruo Nakano, Tatsuya Miyazawa, Keita, Kinoshita, Yoji Yamada, and Tetsuo Yoshida
2009/2/8
45. 東京医科歯科大学セミナー(招待講演)
RNomics ゲノムとプロテオームを結ぶ新分野
廣瀬哲郎
2008/4/24
46. RNAフロンティアミーティング2008
胸腺特異的ノンコーディングRNA Thy-nc1の機能解析.
青木一真、佐野美穂、原島 哲、廣瀬哲郎
2008/6/5
47. 第10回日本RNA学会年会
U7 snRNAはS期以外でのヒストン遺伝子発現を負に制御する。
井手上賢、廣瀬哲郎
2008/7/23- 25
48. 第10回日本RNA学会年会
核内ノンコーディングRNA、MEN ϵ / β は核内構造体パラスペックル形成に必須でる。
佐々木保典、井手上賢、佐野美穂、廣瀬哲郎
2008/7/23 - 25
49. 13th annual meeting of the RNA society (RNA2008) (Berlin)
Interaction between RNA-binding proteins with MEN ϵ/β non-coding RNA establishes the integrity of the nuclear body, paraspeckle.
Sasaki, YTF., Sano, M., Ideue, T., and Hirose, T.
2008/7/28-8/3
50. 13th annual meeting of the RNA society (RNA2008) (Berlin)
Expression and intracellular localization of complicatedly spliced thymus-specific non-coding RNA, Thy-nc1.
Aoki, K, Sano, M, Harashima, A, and Hirose, T,
2008/7/28-8/3
51. The 2008 CSHL meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function
Identification of a non-coding RNA as a structural integrator of the nuclear body, Paraspeckle.
Sasaki, YTF., Ideue, T., Sano, M., Mituyama, T., and Hirose, T.
2008/9/17-21
52. BioJapan2008(招待講演)
機能性ノンコーディングRNAの機能解明へのアプローチ。
廣瀬哲郎
2008/10/16
53. 千里ライフサイエンスセミナーシリーズ「機能的non-coding RNA - 古典的なセントラルドグマへの挑戦」(招待講演)

- 哺乳類non-coding RNAの細胞内動態と機能.
廣瀬哲郎
2008/11/11
54. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
The role of noncoding RNAs in subcellular body.
Hirose, T, Sasaki, YTF., Naganuma, T., and Kawaguchi, T.
2008/12/9 - 12
55. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
U7 snRNAはS期外においてヒストン遺伝子の転写を負に制御する.
井手上賢、廣瀬哲郎
2008/12/9-12
56. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会 (BMB2008)
胸腺特異的ノンコーディングRNA Thy-nc1による遺伝子発現制御機構.
青木一真、佐野美穂、原島 哲、廣瀬哲郎
2008/12/9-12
57. 第二回「情報と細胞機能」研究会
noncoding RNAによる細胞内構造形成.
廣瀬哲郎
2009/2/14
58. 2nd International Symposium on Advanced Biological Engineering and Science (中国)
Polyadenylated Noncoding RNAs behind Human Stem Cell Differentiation.
Yasunori Aizawa
2008/4/1
59. HITS2008 Symposium (イギリス)
Dark Matter of Human Transcriptome -Noncoding RNA and Retrotransposon-
Yasunori Aizawa
2008/4/21
60. 第10回日本RNA学会年会
ヒト幹細胞分化時に発現変動する機能未知転写産物の機能解析.
相澤康則
2008/7/23-25
61. 生体関連若手シンポジウム(招待講演)
ヒトゲノムから転写される機能未知RNAの解析.
相澤康則
2008/9/17
62. DKFZ (German Cancer Research Center) Seminar (ドイツ)
Junk + RNA = peptide.
Yasunori Aizawa
2008/9/26
63. 第11回生命科学研究会(招待講演)
がらくたRNAを通して、遺伝子とヒトゲノムを考える.

相澤康則
2008/11/29

64. RNAフロンティアミーティング2008
*C. elegans*におけるsnoRNA結合タンパク質のノックダウンと核内構造体の形成.
保木井悠介、菅原由起、笹野有未、藤原俊伸、武藤 昱、牛田千里
2008/6/5
65. 第10回日本RNA学会年会
核小体局在を示す線虫新規ncRNA.
保木井悠介、佐藤洋旭、武藤 昱、牛田千里
2008/7/23-25
66. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
線虫CeR-2 RNAはC/D snoRNAである.
保木井悠介、牛田千里
2008/9/9
67. Keystone symposium (RNAi, microRNA, and non-coding RNA)
Expression and localization of *C. elegans* CeR-5 RNA.
Chisato Ushida, Yuki Sugawara, and Yusuke Hokii
2008/3/29
68. Seoul大学にて(韓国)(招待セミナー)
RNA silencing in *Drosophila* germlines.
塩見美喜子
2008/5/7
69. GCOE Program “Human Metabolomic Systems Biology” Summer School (招待発表)
RNA silencing in *Drosophila*.
塩見美喜子
2008/7/10
70. 20th International Congress of Geneticsのsymposium「RNA machine」(ドイツ)(招待講演)
Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonautes in somatic cells.
塩見美喜子
2008/7/15
71. 12th Molecular Cardiovascular Conference(招待講演)
ショウジョウバエ生殖細胞におけるRNAサイレンシング.
塩見美喜子
2008/9/5-7
72. Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry(招待発表)
Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing.
塩見美喜子
2008/9/10

73. 第16回シンポジウム創薬薬理フォーラム(招待発表)
 遺伝子発現を制御する内在性small RNAの生合成と作用機序
 塩見美喜子
 2008/9/19
74. 東京大学先端科学技術研究センター(招待講演)
 ヒトArgonauteのRNA silencingにおける機能解析.
 塩見美喜子
 2008/10/3
75. Academia SINICA(台北)(招待セミナー)
 Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing.
 塩見美喜子
 2008/10/23
76. 20th FAOBMB Taipei Conference Frontier in Life Sciences(台北)(招待発表)
 Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing.
 塩見美喜子
 2008/10/25
77. 東京大学分子生物学研究所のセミナー(招待発表)
 RNA silencing in Drosophila germline cells.
 塩見美喜子
 2008/11/6
78. 九州大学GCOEプログラム拠点(Stem Cells and Regenerative Medicine)(招待発表)
 How selfish retrotransposons are silenced in Drosophila germline and somatic cells.
 塩見美喜子
 2008/11/9
79. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)(招待発表)
 Aub/AGO3-independent piRNA biogenesis in Drosophila germline cells.
 塩見美喜子
 2008/12/10
80. 第10回日本RNA学会
 DNAマイクロアレイによる新規内在性アンチセンスRNAの検出と解析
 沼田興治、斎藤輪太郎、平岩典子、金井昭夫、阿部訓也、清澤秀孔
 2008/7/23- 25
81. 13th annual meeting of the RNA society (RNA2008)(Berlin)
 Reverse complement probes of custom-made microarray detect novel endogenous cis-antisense transcripts.
 Numata, K., Osada, Y., Okada, Y., Saito, R., Hiraiwa, N., Kanai, A., Abe, K., and Kiyosawa, H.
 2008/7/28-8/3
82. 日本遺伝学会第80回大会
 DNAのメチル化に影響を与える内在性アンチセンス転写産物のスクリーニング.

- 渡邊 豊、沼田興治、長田木綿子、村田真也、斎藤輪太郎、阿部訓也、清澤秀孔
2008/9/3-5
83. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
発現アレイをつかった内在性アンチセンスRNA／非翻訳性RNAの検出と解析.
沼田興治、清澤秀孔
2008/9/8-9
84. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
センス-アンチセンス遺伝子座で検出される50-100ntの低分子RNAの発現解析.
金子直人、沼田興治、清澤秀孔
2008/9/8-9
85. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与する内在性アンチセンスRNAの探索.
渡邊 豊、沼田興治、清澤秀孔
2008/9/8-9
86. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
ゲノム刷り込み遺伝子座における内在性アンチセンスRNA.
清澤秀孔
2008/9/8-9
87. 第7回新しいRNA/RNPを見つける会
Comprehensive Analyses of Antisense Expressions in Cancer-related Genes.
斎藤輪太郎
2008/9/8-9
88. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
センス-アンチセンス遺伝子座に頻出する低分子RNAの発現解析.
金子直人、沼田興治、阿部訓也、清澤秀孔
2008/12/9-12
89. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
CpG island周辺のDNAメチル化に影響を及ぼす内在性アンチセンス転写産物の解析.
渡邊 豊、村田真也、沼田興治、長田木綿子、斎藤輪太郎、阿部訓也、清澤秀孔
2008/12/9-12
90. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
マイクロアレイをもちいた内在性アンチセンスRNAの検出と乳がんモデルマウスへの適用.
沼田興治、斎藤輪太郎、平岩典子、渡辺一史、金井昭夫、阿部訓也、清澤秀孔
2008/12/9-12
91. 第31回日本分子生物学会
ヒトとマウスのオーソログ遺伝子における配列相同性 / 発現相同性解析
村田真也、沼田興治、清澤秀孔、斎藤輪太郎、富田勝
2008/12/9-12
92. International Symposium on “Decoding Epigenetic Code,” organized by BRAIN
(Bio-oriented Technology Research Advancement Institution)
Endogenous antisense RNA and epigenetics

- Kiyosawa H.
2008/12
93. 立命館大学R-GIROシンポジウム「アンチセンスRNAによる発現調節機構と創薬への応用」
トランスクリプトーム解析で同定された哺乳動物の内在性アンチセンス/非翻訳性RNA
清澤秀孔
2009/3
94. 第10回日本RNA学会
DNAマイクロアレイによる新規内在性アンチセンスRNAの検出と解析.
沼田興治、斎藤輪太郎、平岩典子、金井昭夫、阿部訓也、清澤秀孔
2008/7/23-25
95. 日本実験動物科学技術2008
miR-200b欠損マウスの解析
蓮輪英毅、伊川正人、岡部勝
2008/5
96. 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction
Disruption of miR-200b Leads to Female Infertility.
Hidetoshi Hasuwa, Masahito Ikawa, Masaru Okabe
2008/5
97. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会(BMB2008)
ヒトとマウスのオーソログ遺伝子における配列相同性 / 発現相同性解析
村田真也、沼田興治、清澤秀孔、斎藤輪太郎、富田勝
2008/12/9-12
98. 東工大—JSTイノベーションブリッジ(招待講演)
がらくたRNAからの機能性ペプチド候補の探索
相澤康則
2009/3/4

<平成21年度>

1. 第82回日本生化学会大会
MicroRNA-210 regulates cellular proliferation through cell cycle arrest and is down-regulated in esophageal squamous cell carcinoma.
土屋創健、佐藤史顕、藤原大、嶋田裕、辻本豪三、清水一治
2009/10/23
2. 第32回日本分子生物学会年会
miR-X Contributes to Cisplatin Resistance of Esophageal Cancer Cells.
今中由花子、土屋創健、佐藤史顕、嶋田裕、清水一治、辻本豪三
2009/12/11
3. The 24th Naito Conference
Analysis of miRNA related to female infertility.
Hidetoshi Hasuwa, Masahito Ikawa, Masaru Okabe
2009/6

4. 100th AACR Annual Meeting 2009. Denver
Identification of novel target protein for miR-17-92 cluster by proteomic analysis.
Hirotaka KANZAKI, Mamoru OUCHIDA, Sachio ITO, Seiji TAMARU, Hiroko HANAFUSA and Kenji SHIMIZU
2009/4/18-22
5. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
Identification of novel target proteins for miR-17-92 cluster in breast cancer.
Ouchida, M., Kanzaki, H., Ito, S., Tamaru, S., Hanafusa, Y., and Shimizu, K.
2009/10/1-3
6. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
Proteomic analysis of miR-17-92 cluster-overexpressing lung cancer cell line aimed to identify novel immediate target protein.
Kanzaki, H., Ouchida, M., Ito, S., Tamaru, S., Hanafusa, Y., Shimizu, K.
2009/10/1-3
7. 7th Japan Human Proteome Organization Conference 2009, Tokyo
Proteomic analysis of lung cancer cell lines aimed to identify novel target proteins for miR-17-92 cluster.
Hirotaka Kanzaki, Mamoru OUCHIDA, Sachio ITO, Seiji TAMARU, Hiroko HANAFUSA and Kenji SHIMIZU
2009/7/27-29
8. The 8th HUPO World Congress, Toronto, Canada
Proteomic analysis of lung cancer cell lines aimed to identify novel target proteins for miR-17-92.
Hirotaka Kanzaki, Mamoru OUCHIDA, Sachio ITO, Seiji TAMARU, Hiroko HANAFUSA and Kenji SHIMIZU
2009/9/26-30
9. 第32回日本分子生物学会年会
プロテオミクス解析によるmiR-17-92 cluster の新規標的遺伝子の同定
神崎浩孝、大内田守、伊藤佐智夫、田丸聖治、花房裕子、清水憲二
2009/12/9-12
10. 第32回日本分子生物学会年会
Micro RNA expression profiling in human tumors.
伊藤佐智夫、花房裕子、大内田守、清水憲二
2009/12/9-12
11. (財)神奈川科学技術アカデミー 教育講座 機能性RNAコースー機能性RNAの歴史と応用展開ー
RNA研究最前線から医療応用への展開ー核酸医薬の可能性と課題ー
吉田哲郎
2009/9/15
12. 第60回今掘フォーラム
RNA研究最前線から医療応用への展開ー核酸医薬の可能性と課題ー
吉田哲郎

2009/10/7

13. 第32回日本分子生物学会年会
ヒトマスト細胞株からのマイクロRNAの単離と発現・機能解析
小坂 恭子、山田陽史、宮澤達也、倉田和美、神垣昌世、吉田哲郎
2009/12/9-12
14. 第14回国際内分泌学会議
Induction of Pluripotency by Defined Factors
山中伸弥
2010/3/29
15. 第9回日本再生医療学会総会
iPS細胞の可能性と課題
山中伸弥
2010/3/19
16. 第9回日本再生医療医学会総会
microRNA発現プロファイリングiPS細胞評価系への応用
小柳三千代、一阪朋子、成田恵、田邊剛士、三浦恭子、青井貴之、沖田圭介、高橋和利、
中川誠人、山中伸弥
2010/3/18
17. 2010年ライフサイエンス国際シンポジウム「Future Outcome of Stem Cell Research Today」
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
山中伸弥
2010/1/18
18. Induced Pluripotent Stem Cells and the National Institutes of Health Intramural Research
Program at NIH
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S
2010/1/15
19. 第32回日本分子生物学会年会
micro RNAs are actively involved in induction of pluripotent stem cells from mouse and
human fibroblasts.
小柳三千代、一阪朋子、岡田亜紀、成田恵、田邊剛士、青井貴之、沖田圭介、高橋和利、
中川誠人、山中伸弥
2009/12/10
20. 第32回日本分子生物学会年会
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
山中伸弥
2009/12/9
21. 第71回日本血液学会学術集会
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka,S.
2009/10/24

22. 第82回日本生化学学会大会
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2009/10/23
23. JDDW2009 第51回日本消化器病学会大会
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2009/10/16
24. STS Forum 6th Annual Meeting, Plenary Session 200
Science and Technology for Global Health.
山中伸弥
2009/10/5
25. JSPS, Sweden – Japan Join Colloquium. Advances in Cellular Reprogramming and Stem
Cell Biology
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S
2009/9/5
26. EMBO Meeting 2009 at Amsterdam
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S
2009/9/1
27. IUBMB 2009 Congress/ The Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology
(CSBMB)
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S
2009/8/7
28. ISSCR 7th Annual Meeting
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S
2009/7/11
29. 7th ISSCR Annual Meeting
microRNAs are actively involved in induction of pluripotent stem cells from mouse and
human fibroblasts.
Koyanagi, M., Ichisaka, T., Okada, A., Narita, M., Tanabe, K., Aoi, T., Okita, K.,
Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S.
2009/7/9
30. 第9回国際炎症学会
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
山中伸弥
2009/7/6
31. EMBO Conference Advances in Stem Cell Research
Induction of Pluripotency by Defined Factors.

- Yamanaka, S
2009/6/17
32. JST-CIRM Workshop
Induction of Pluripotency by Defined Factors.
Yamanaka, S
2009/6/8
33. 第52回日本腎臓学会学術総会
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2009/6/5
34. 第179回生命科学フォーラム
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2009/6/4
35. 第82回日本整形外科学会学術総会
iPS細胞の可能性と課題.
山中伸弥
2009/5/15
36. Conferences Jacques Monod(フランス)(招待講演)
Molecular mechanisms of RNA silencing in Drosophila
塩見 美喜子
2009/4/6
37. UT Southwestern Medical Center seminar(アメリカ)(招待講演)
RNA silencing in Drosophila germlines
塩見 美喜子
2009/4/22
38. Keystone Symposia(カナダ)(招待講演)
piRNA biogenesis systems in Drosophila germline cells
塩見 美喜子
2009/4/28
39. 岡山医療国際シンポジウム(招待講演)
microRNAs; biogenesis and functions
塩見 美喜子
2009/5/17
40. 京都大学免疫ゲノム医学特別セミナー(招待講演)
Molecular mechanisms of RNA silencing in Drosophila
塩見 美喜子
2009/5/18
41. かずさDNA研究所セミナー(招待講演)
機能性RNAはどのように生まれ、どの様に働くか?ーショウジョウバエの知見を基に一
塩見 美喜子

2009/6/2

42. よこはまNMR構造生物学研究会第37回ワークショップ(招待講演)
Piwi-interacting RNA biogenesis pathways in Drosophila
塩見 美喜子
2009/7/24
43. 第11回RNAミーティング
ショウジョウバエLoquaciousアイソフォームのsmall RNAプロセッシングにおける機能的相違
三好 智博
2009/7/28
44. 16th International Society of Developmental Biologists Congress(スコットランド)(招待講演)
piRNA biogenesis pathways in Drosophila germline cells.
塩見 美喜子
2009/9/7
45. 神奈川科学技術アカデミー(KAST)機能性RNAコース(招待講演)
低分子ncRNAはどの様に現れ、どの様に機能するか?—ショウジョウバエの知見を基に—
塩見 美喜子
2009/9/15
46. RNAフロンティアミーティング2009
ショウジョウバエLoquaciousアイソフォームのsmall RNAプロセッシングにおける機能的相違
三好 智博
2009/9/27
47. 岐阜大学フェア2009(招待講演)
遺伝子発現は小さなRNAによってどの様に制御されるのか?
塩見 美喜子
2009/10/31
48. 第5回OTS年会-第19回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム(招待講演)
Specific requirement of Dicer2 and Loquacious-PD for endo-siRNA biogenesis in Drosophila
塩見 美喜子
2009/11/5
49. 宮崎大学院生のためのサイエンスキャリアセミナー(招待講演)
生体生命の仕組みを分子レベルで理解する意義と手法と必要因子.
塩見 美喜子
2009/12/3
50. 第39回日本分子生物学会年会(招待講演)
Tudor domain-containing proteins in the piRNA biogenesis pathways in Drosophila.
塩見 美喜子
2009/12/9

51. Keystone Symposia 2010(アメリカ) (招待講演)
piRNAs in the fly germ line.
塩見 美喜子
2010/1/18
52. Cincinnati Children's Hospital Research Foundation Seminer(アメリカ) (招待講演)
piRNAs in Drosophila germlines.
塩見 美喜子
2010/3/10
53. EMBL Symposium(ドイツ) (招待講演)
Function of Tudor protein in the Drosophila piRNA pathway.
塩見 美喜子
2010/3/19
54. UCR Symposium(アメリカ) (招待講演)
Small RNAs in animals.
塩見 美喜子
2010/3/28
55. The 10th International Conference on Systems Biology, Stanford, CA, USA
Comprehensive Expressional Analyses of Antisense Transcripts in Colon Cancer Tissues
Using Artificial Probes to Detect Potential Regulatory Antisense RNAs.
Saito, R., Kohno, K., Okada, Y., Osada, Y., Numata, K., Watanabe, K., Nakaoka, H.,
Yamamoto, N., Kanai, A., Yasue, H., Murata, S., Abe, K., Tomita, M., Ohkohchi, N.,
and Kiyosawa, H.
2009/8/30 - 2009/9/4
56. 第11回日本RNA学会
線虫LSU rRNA のプロセッシングに働く新規ncRNA
牛田千里、保木井悠介、笹野有未、藤原俊伸
2009/7/27-29
57. 第8 回新しい RNA/RNP を見つける会
線虫 CeR-2 RNA と pre-rRNA プロセッシング.
牛田千里
2009/9/7-8
58. 第32回日本分子生物学会年会
線虫新規ncRNAとrRNA前駆体のプロセッシング.
保木井悠介、笹野有未、佐藤真悠、坂本博、坂田和実、新貝りゅう蔵、種田晃人、岡茂範、
姫野俵太、武藤昱、藤原俊伸、牛田千里
2009/12/9-12
59. ソニーコンピューターサイエンス研究所セミナー
発散する遺伝子間領域にヒトと人の定性的な起源を探る.
相澤康則
2009/4/14
60. 第2回スイス-日本生命化学シンポジウム
Development of Comprehensive Detection System for Retrotransposon-Derived

structural variation in the Human Genome.
Koichi Ishiguro and Yasunori Aizawa
2009/9/11

61. 第2回スイスー日本生命化学シンポジウム
Six unannotated RNAs with distinct active structures involved in human stem cell differentiation.
Kunio Kikuchi, Makiha Fukuda, Tomoya Ito, Mitsuko Inoue, Takahide Yokoi, Suenori Chiku, Toutai Mitsuyama, Kiyoshi Asai, Tetsuro Hirose, and Yasunori Aizawa
2009/9/11
62. 第24回生体関連化学シンポジウム
ヒトゲノム遺伝子間領域にコードされる機能性ペプチド配列の探索と機能解析.
伊藤智哉、福田牧葉、井上允子、渡部暁、大西哲、木川隆則、横井崇秀、相澤康則
2009/9/13-15
63. 遺伝研セミナー
Evolutionary and functional significance of human intergenic transcripts.
Yasunori Aizawa
2009/10/20
64. 福岡大学理学部セミナー(招待講演)
遺伝子間ゲノム領域に潜む新規遺伝子を探る.
相澤康則
2009/11/24
65. 京都大学工学研究科セミナー
What are “Noncoding” RNAs of the human genome?
相澤康則
2009/11/30
66. 日本医科大学 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム「診断・治療に新たな展開をもたらす機能性RNA研究」
“Noncoding” RNAs from intergenic regions of the human genome.
Yasunori Aizawa
2009/11/7
67. 熊本大学薬学部セミナー(招待講演)
ヒトゲノムから発現される機能未知RNAの中から新規遺伝子を探す.
相澤康則
2010/1/21
68. 埼玉医科大学ゲノム科学研究センター運営委員会承認学術集会
哺乳動物におけるアンチセンス/非翻訳性RNAの発現動態ーゲノム科学的アプローチによる発現解析ー
清澤秀孔
2009/4
69. Seminar at RIKEN Research Center for Allergy and Immunology
Expression dynamics of endogenous antisense/non-coding RNA in mammals – Expression analysis by genomic science approach.

- Kiyosawa H.
2009/5
70. Seminar at National Institute of Genetics
Novel characteristics of endogenous antisense transcripts in mammals revealed by genome-wide expression analysis, and their functional implications.
Kiyosawa H.
2009/6
71. 第八回新しいRNA/RNPを見つける会
アンチセンス RNA によるゲノム刷り込み確立制御の解明を目指して
小濱千裕、清澤秀孔
2009/9
72. 第八回新しいRNA/RNPを見つける会
レビュー:哺乳動物におけるアンチセンス/ncRNA
清澤秀孔
2009/9
73. 第32回日本分子生物学会
Ube3a遺伝子の神経細胞特異的な刷り込みにおけるアンチセンスRNAの役割の解析.
小濱千裕、加藤英政、沼田興治、清澤秀孔
2009/12
74. 第32回日本分子生物学会
Genome-wide analysis of expression modes and DNA methylation status at sense-antisense transcript loci in mouse.
Watanabe, Y., Numata, K., Murata, S., Osada, Y., Saito, R., Nakaoka, H., Yamamoto, N., Watanabe, K., Kato, H., Abe, K., and Kiyosawa, H.
2009/12
75. 第32回日本分子生物学会年会
Cajal bodyに局在するRNA分子種の解析
北尾紗織、光山統泰、廣瀬哲郎
2009/12/9
76. 第32回日本分子生物学会年会
細胞の内的／外的環境変化によって発現制御されるmRNA-like noncoding RNAの解析
日野公洋、廣瀬哲郎
2009/12/9
77. 第32回日本分子生物学会年会
U7 snRNAによるヒストン遺伝子群の転写抑制機構の解析
井手上賢、廣瀬哲郎
2009/12/9
78. 第32回日本分子生物学会年会
パラスペックル構造構築のためのnoncoding RNAと新規構成タンパク質の役割
長沼孝雄、永井美智、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎
2009/12/9

79. 第32回日本分子生物学会年会
パラスペックル構造体によって制御される核内繫留mRNAの解析
谷川明恵、横井崇秀、佐々木保典、廣瀬哲郎
2009/12/9
80. 第32回日本分子生物学会年会
核内構造構築を司る長鎖noncoding RNAの選択的3'末端形成を介した機能発現機構
長沼孝雄、佐々木保典、中川真一、廣瀬哲郎
2009/12/9
81. 第82回日本生化学会大会(シンポジウム)
核内構造構築のための長鎖noncoding RNAの機能獲得機構
廣瀬哲郎、長沼孝雄、北尾紗織、佐々木保典
2009/10/22
82. RNAフロンティアミーティング2009
U7 snRNAによるヒストン遺伝子群の転写抑制機能
井手上賢、廣瀬哲郎
2009/9/27
83. RNAフロンティアミーティング2009
Social RNA(特別講演)
廣瀬哲郎
2009/9/26
84. 科学技術アカデミーコース
ゲノムの暗黒物質:ノンコーディングRNAの新たな機能について
廣瀬哲郎
2009/9/15
85. 第11回日本RNA学会年会
核局在型ノンコーディングRNAである MALAT-1の分解に関する研究
谷英典、井尻憲一、廣瀬哲郎、秋光信佳
2009/7/27
86. 第11回日本RNA学会年会
長鎖ノンコーディングRNAであるMALAT-1 が核スペックルへ局在化する機構の解析
水野利恵、宮川隆、中村陽、井尻憲一、廣瀬哲郎、秋光信佳
2009/7/27
87. 第11回日本RNA学会年会
未成熟T細胞株特異的ノンコーディングRNA Thy-ncR1の解析
青木一真、佐野美穂、原島哲、廣瀬哲郎
2009/7/27
88. 第11回日本RNA学会年会
細胞周期のG1期におけるU7 snRNAによるヒストン遺伝子群の転写抑制
井手上賢、廣瀬哲郎
2009/7/27

89. 第11回日本RNA学会年会
Cajal bodyに局在するRNA分子種の解析
北尾紗織、廣瀬哲郎
2009/7/27
90. 第11回日本RNA学会年会
パラスペックル構造体によって制御される核内留置mRNAの解析
谷川明恵、横井崇秀、佐々木保典、廣瀬哲郎
2009/7/27
91. 第11回日本RNA学会年会
MEN ϵ / β ncRNAと新規構成タンパク質によるパラスペックル構造体の構築
長沼孝雄、永井美智、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎
2009/7/27
92. よこはまNMR構造生物学研究会第37回ワークショップ(招待講演)
長鎖noncoding RNAの機能解析
廣瀬哲郎
2009/7/24
93. 「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班のワークショップ(招待講演)
長鎖ノンコーディングRNAが果たす多彩な機能と疾患との接点
廣瀬哲郎
2009/7/31

5. その他

(1)受賞実績

- ・2006年12月:(財)病態代謝研究会最優秀理事長賞、廣瀬哲郎
- ・ Michiaki Hamada, Toutai Mituyama and Kiyoshi Asai, *2008-2009 SIGBIO Best Paper Award*
- ・相澤康則 東工大挑戦的研究賞 (平成19年度)
- ・平成20年4月 山中伸弥 2008年日経BP技術賞大賞
- ・平成20年4月 山中伸弥 平成20年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰
科学技術特別賞
- ・平成20年5月 山中伸弥 第61回(平成20年)中日文化賞
- ・平成20年5月 山中伸弥 The 2008 TIME 100 選出
- ・平成20年7月 山中伸弥 第6回高峰記念三共賞
- ・平成20年9月 山中伸弥 京都創造者大賞2008 特別賞
- ・平成20年9月 山中伸弥 Shaw Prize in Life Science 2008
- ・平成20年9月 鈴木 勉 第6回日本分子生物学会三菱化学奨励賞
- ・平成20年11月 山中伸弥 京都新聞大賞 文化学術賞
- ・平成20年11月 山中伸弥 Meira and Shaul G. Massry Prize
- ・平成20年11月 山中伸弥 Robert Koch Prize 2008
- ・平成20年11月 山中伸弥 平成20年秋の紫綬褒章
- ・平成20年11月 山中伸弥 2008年度 武田医学賞
- ・平成20年11月 寺井悟朗 ポスター賞 (CBRC2008)
- ・平成20年12月 佐藤健吾 JSBi 2008 best poster award (JSBi 2008)
- ・平成20年12月 山中伸弥 平成20年度上原賞
- ・平成20年12月 山中伸弥 平成20年度島津賞
- ・平成21年10月 山中伸弥 2009 Albert Lasker Basic Medical Research Award
- ・平成21年10月 山中伸弥 2009 Canada Gairdner International Award
- ・平成22年3月 山中伸弥 日本学士院賞・恩賜賞
- ・平成21年度 藤本健造
科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞
「光化学的なDNA及びRNA操作システムの研究」
- ・塩見美喜子 第29回猿橋賞受賞

2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

健康安心イノベーションプログラム 「機能性RNAプロジェクト」

(研究開発期間:H17年度~H21年度 5年間)

第1回 事後評価分科会

平成22年6月3日(木)

資料6-1 プロジェクトの概要説明(公開資料)

- I. 事業の位置づけ・必要性について
- II. 研究開発マネジメントについて

発表者:NEDO

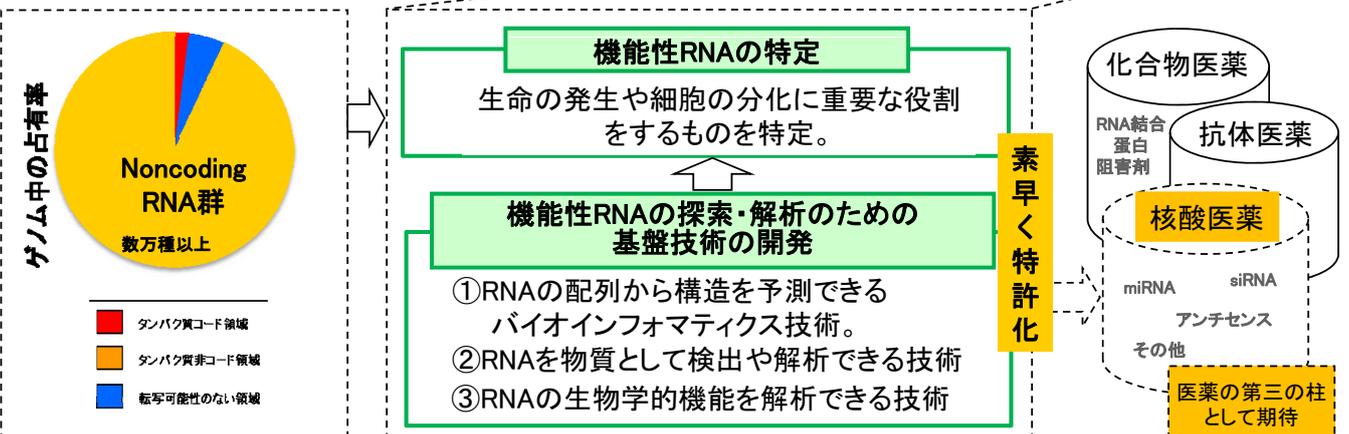
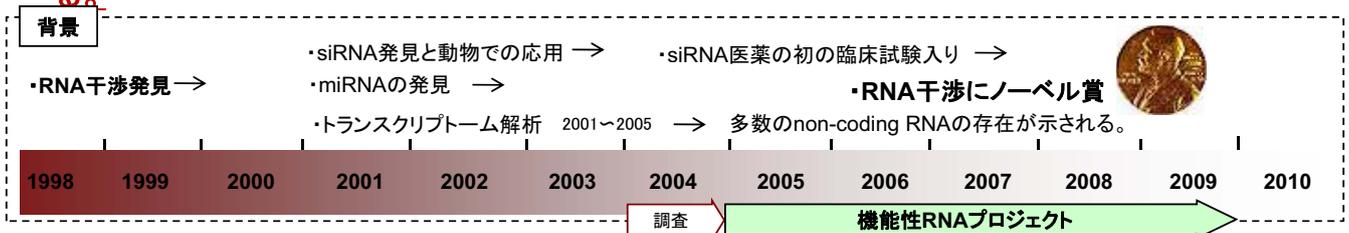
I. 事業の位置づけ・必要性

事業原簿 P1

2/10

事業の背景・目的

早い時期にRNAに着目。核酸関連医薬の創成のための基盤確立を目的とする。



Noncoding RNA群から機能を持つRNA(機能性RNA)の特定と、そのための技術が必要

NEDOの関与する意義

機能性RNAの探索・解析のための
基盤技術開発へのNEDO関与の必要性

- 新しい生命科学の知見の創出を促すような基盤技術の開発が必要であり、生物の研究者のみならず、物理、計測、情報など関連する様々な分野の研究者からなる開発体制を構築し、国が行う事業として、集中的に推進することが必要。
- また、最先端の研究開発であり、現時点においては産業化に向けた基礎的段階にあること、開発段階から産学官連携型による効率的な研究開発の推進が必要であり、開発リスクが大きく多額の資金を要するため、民間企業のみで取り組むことが困難であることから、ナショナルプロジェクトとして実施することが必要。

事業の位置づけ

健康安心イノベーションプログラム(経産省)の一環として実施。

健康安心イノベーションプログラム

目的

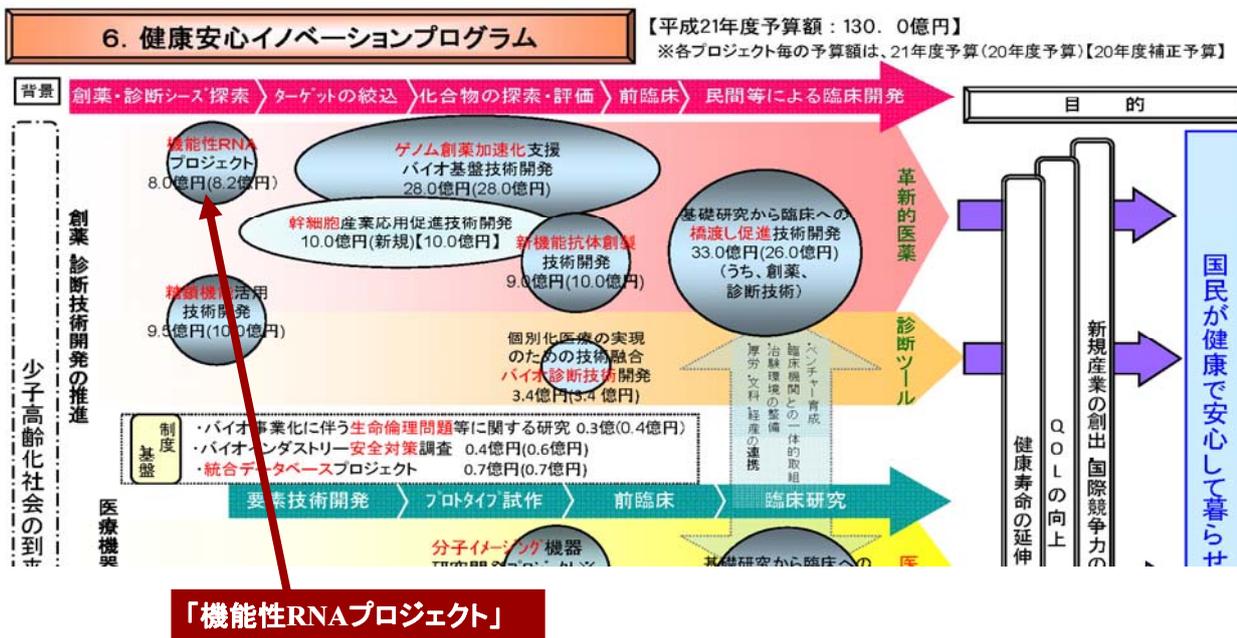
今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL (Quality of Life : 生活の質) の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

「機能性RNAプロジェクト」

事業の位置づけ

「創薬・診断技術開発の推進」における「革新的医薬品」の創出を目指すプロジェクトとして位置づけられている。



事業の目標

研究開発項目ごとの個別目標を達成し全体目標に至る。

全体の目標

機能性RNA候補をゲノム上から推測するバイオインフォマティクス技術を確立する。また、機能性RNAを高感度、定量的かつ網羅的に捉える新しい方法、手法の確立と、機能性RNAをゲノムワイドに解析するためのツールを確立する。これらのツールを活用して、機能性RNAの機能解明に取り組む。また、ヒト疾患に関連する機能性RNA及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性RNA候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

個別の目標

基本計画より

研究開発項目①機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発

バイオインフォマティクス技術を活用して新規の機能性RNA候補を網羅的に予測し、機能性RNAデータベースを構築する。

研究開発項目②機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

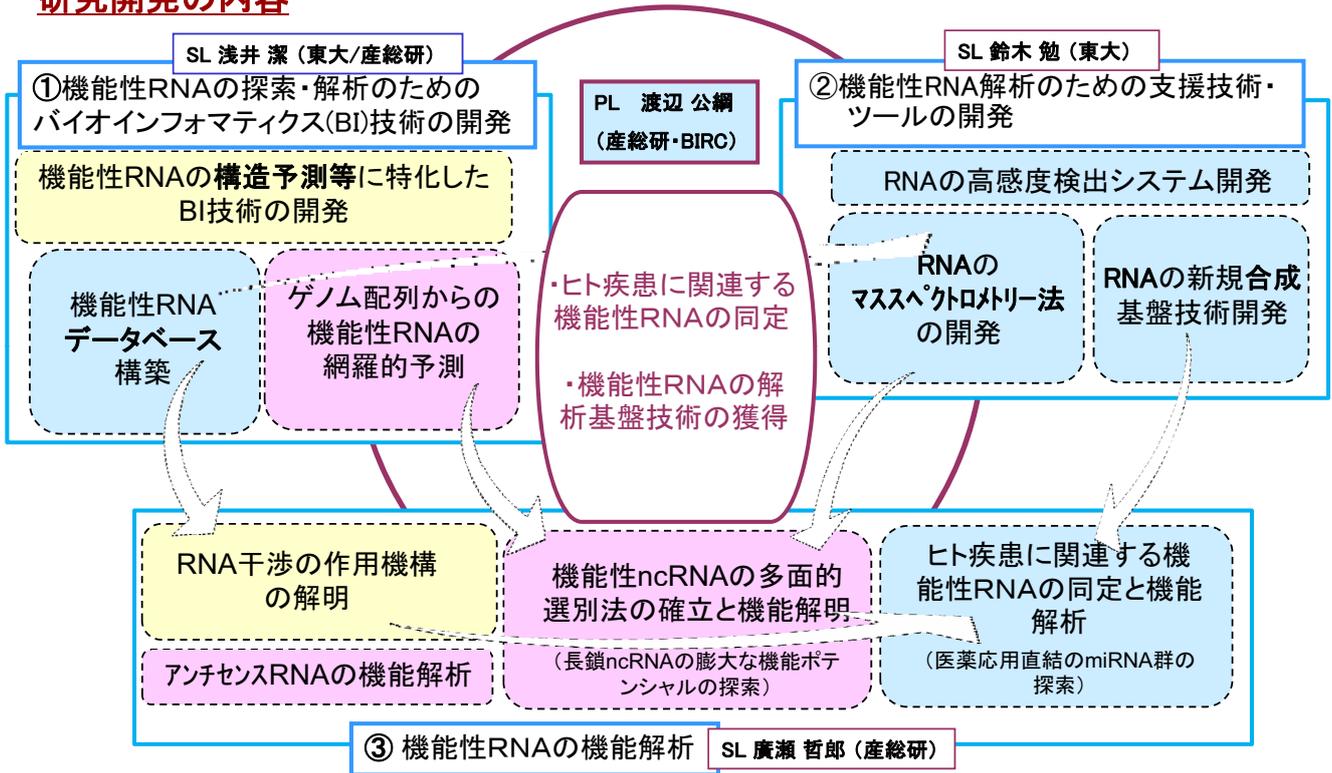
機能性RNAをハイスループット、高感度、網羅的に解析できるバイオツールを開発する。また、超微量な機能性RNAを高感度(サブフェムトモルオーダー)で直接測定することが可能な方法・手法等の開発。

研究開発項目③機能性RNAの機能の解明

ヒト疾患に関連する機能性RNA及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性RNA候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

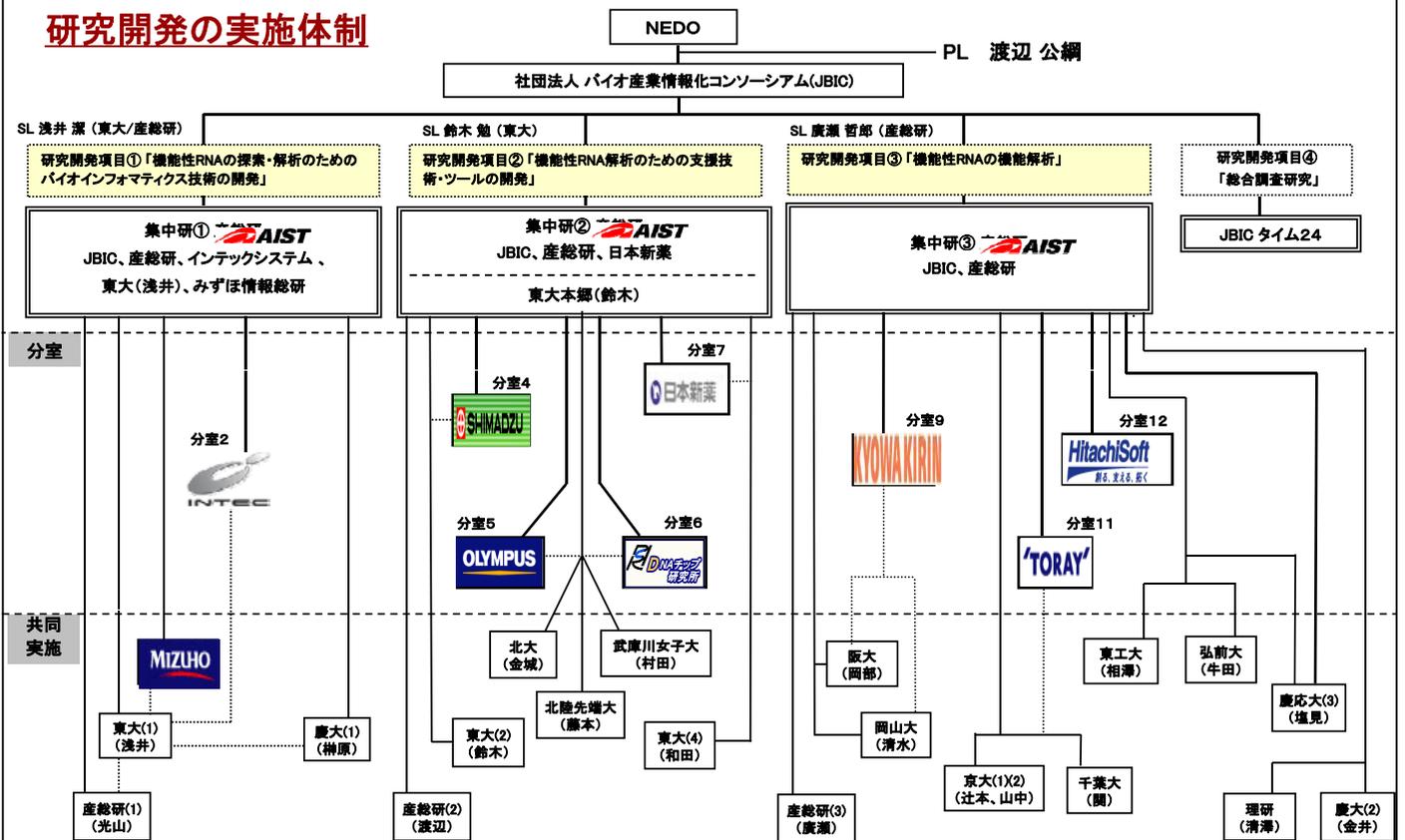
事業の計画内容

研究開発の内容

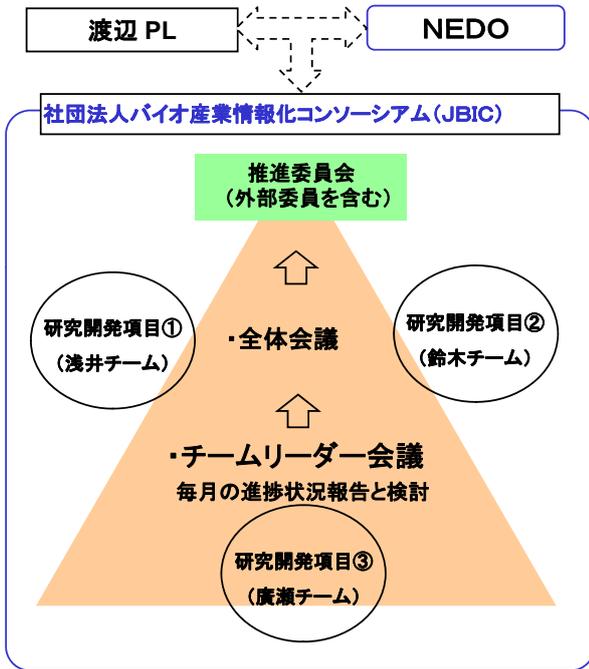


事業の計画内容

研究開発の実施体制



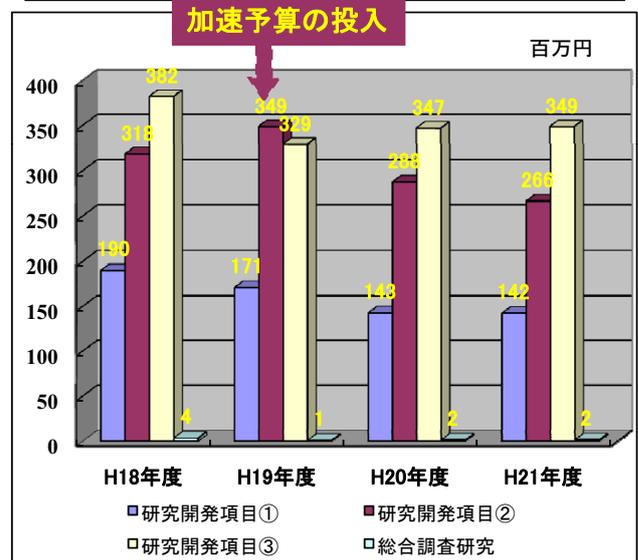
マネジメント体制



マネジメント 1: 加速予算の投入

研究開発項目③ 早期に目標をクリア

超微量な機能性RNAを高感度(サブフェムトモルオーダー)で直接測定することが可能な方法・手法を開発。



マネジメント2. 自主点検と中間評価

自主点検による2テーマの整理



中間評価

【結果抜粋】 順調に研究を進めている。興味深い結果も創出しており、後半は更なる成果が期待される。

【主な改善点と対応】

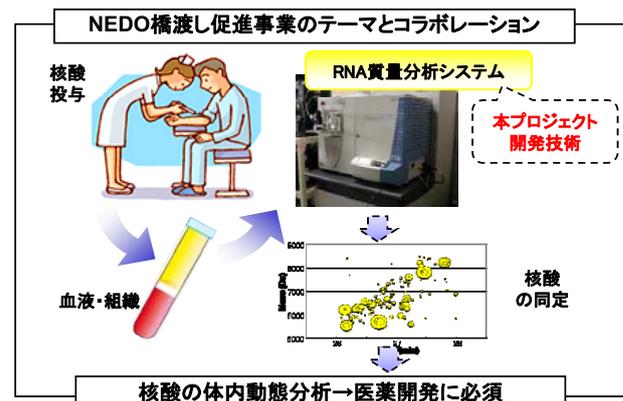
- ① バイオインフォマティクス技術については、開発した予測技術の有効性を明確にすべき。
(対応) 機能解析グループとも連携しつつ、検証実験を計画。
- ② 支援技術・ツールの開発においては、従来技術と対比した上での活用法、残された解析課題などを明確に。
(対応) 開発技術の必要性の明確化を行い、テーマを絞込み、予算を集中化。
- ③ 機能性RNAの機能解明については、良い芽を出している研究を選択し、実用化を目指した研究を行うべき。
(対応) 産業競争力に寄与する先進的な基盤技術になるテーマ、競合優位性を獲得しうるテーマに絞り込んで予算を集中化。

マネジメント3. 特許と実用化推進

○積極的な特許出願

区分年度	特許出願		主なコア技術特許
	国内	国外	
H17	1件	0件	①RNAの二次構造予測技術(アルゴリズム) ②RNAの質量分析技術 ②RNAの化学合成技術 ③RNAの生物学的ノックダウン分析技術 ③iPS細胞作成技術
H18	8件	2件	
H19	7件	6件	
H20	9件	11件	
H21	5件	7件	
小計	30	26	
計	56		

○開発技術の実用化推進



健康安心イノベーションプログラム
「機能性RNAプロジェクト」

(研究開発期間:H17年度~H21年度 5年間)

第1回 事後評価分科会

平成22年6月3日(木)

資料6-2 プロジェクトの概要説明(公開資料)

III. 研究開発成果について

IV. 実用化の見通しについて

発表者:プロジェクトリーダー

研究開発の項目

研究開発項目①

「機能性RNAの探索・解析のためのバイオインフォマティクス技術の開発」

リーダー: 浅井潔(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授)

研究開発項目②

「機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発」

リーダー: 鈴木勉(東京大学大学院 工学系研究科 教授)

研究開発項目③

「機能性RNAの機能の解明」

リーダー: 廣瀬哲郎(産業技術総合研究所 研究チーム長)

研究開発項目①

機能性RNAの探索・解析のための バイオインフォマティクス技術の開発

最終目標

バイオインフォマティクス技術を活用して新規の機能性RNA候補を網羅的に予測し、機能性RNAデータベースを構築する。



最終目標達成のための研究目標

1.機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術の開発

二次構造を考慮したRNA配列情報解析技術の確立

2.ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的予測

機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術を活用し、
ゲノム配列全体から機能性RNAを網羅的に予測する

3.機能性RNAデータベースの構築

機能性RNAの発見と機能解析を支援するデータベースを構築して公開する

事業原簿 2. 1. 1

事業原簿 P4

①ー1 機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術

集中研①、みずほ情報総研、東大1、産総研1、慶応大1

研究目標： 2次構造を考慮したRNA配列解析技術の確立

問題点

- ・ RNA配列では、2次構造を考慮しないと正確な比較・検索ができない
- ・ 2次構造予測の既存手法は精度が不十分
 - ⇒ 2次構造予測を出発点とする解析は信頼できない
- ・ 多様な潜在的2次構造を考慮したRNAの比較・検索は計算コストが膨大
- ・ 配列相補性だけでは、既知機能性RNAの正確な標的予測が不可能
 - ⇒ 2次構造的エネルギーを考慮した網羅的解析手法が必要

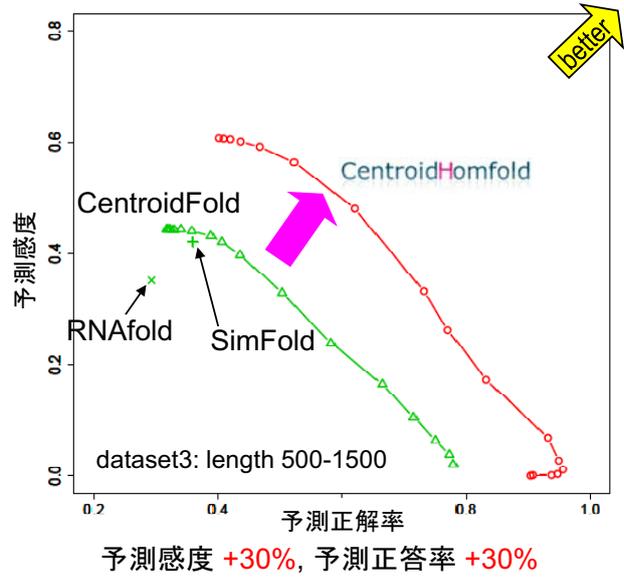
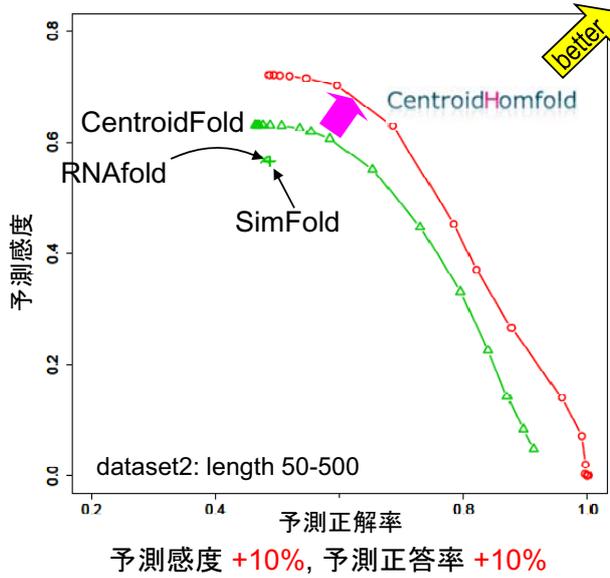
開発課題

1. 2次構造を考慮して整列・比較・検索する高速で正確な情報技術
2. RNAの構造・相互作用を網羅的に解析する情報技術

事業原簿 2. 1. 5

2次構造予測の大幅な精度向上に成功

みずほ情報総研、東大1、産総研1、集中研①

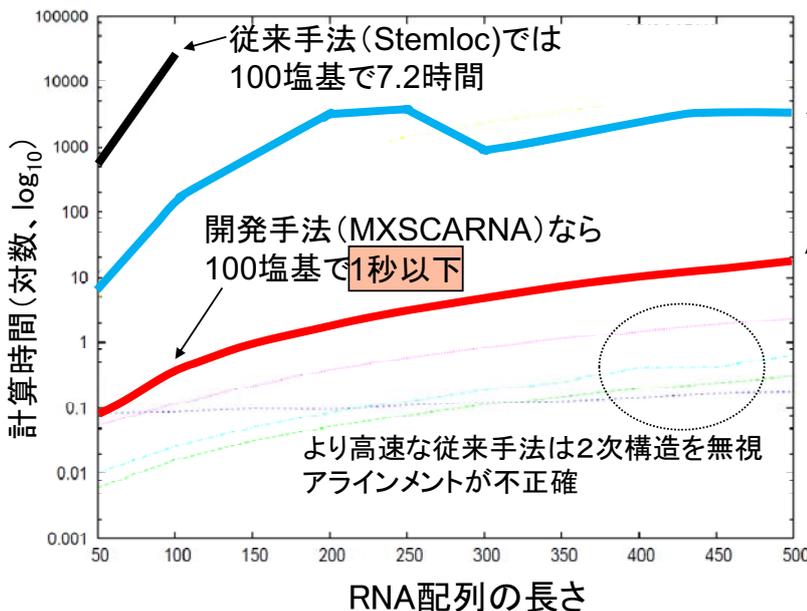


Hamada M et al., *Bioinformatics* 25(12), 2009 (ISMB 2009)

正確で超高速なRNA多重構造アラインメント手法を開発

東大1、産総研1

RNA配列5本を、アラインメントするための計算時間



500塩基のRNA

1時間 **Murlet**

Kiryu H et al., *Bioinformatics* 23(13), 2007

17秒 **MXSCARNA**

Tabei Y et al., *Bioinformatics* 22(14), 2006
Tabei Y et al., *BMC Bioinformatics* 9:33, 2008

5000塩基を超えるような、
ゲノムワイドな網羅的解析
に使用可能

当初の見込みをはるかに上回る
圧倒的な高速化に成功

転写された場合の2次構造的なアクセサビリティを ゲノム配列上で網羅的に計算する手法を開発

産総研1、東大1

機能性RNAの多くは、標的と相補鎖を組むことで機能を発揮する

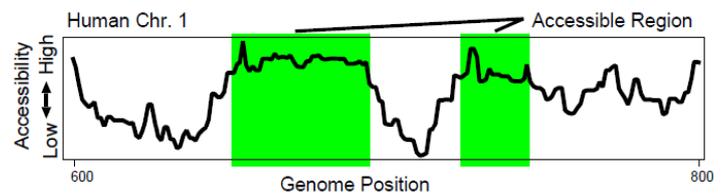
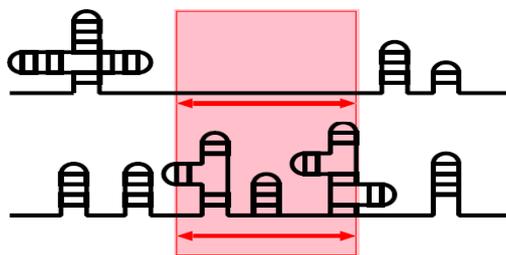
miRNA, siRNA, snoRNA...

標的部が強い自己二次構造を組むと作用できない

→アクセシビリティを計算して標的として機能するかを計算

網羅的にアクセシビリティを計算する手法を開発

機能性RNAの標的予測のための基盤技術



事業原簿 2. 1. 26

①-2 ゲノム配列からの機能性RNAの網羅的予測

集中研①、インテックシステム研究所、産総研(1)、東大(1)

研究目標: 機能性RNAに特化したバイオインフォマティクス技術を活用、
ゲノム配列全体から機能性RNAを網羅的に予測

問題点

- ・機能性RNA配列に、タンパク質遺伝子のような一般的規則性はない
⇒ 2次構造と配列両方の保存性を考慮した解析が必要
- ・tRNA以外の既知機能性RNAファミリーの新規RNA予測手法の精度は不十分
- ・機能性RNAを発見しても機能が分からなければ利用できない
⇒ 発現解析による機能性RNAの絞り込みが必要

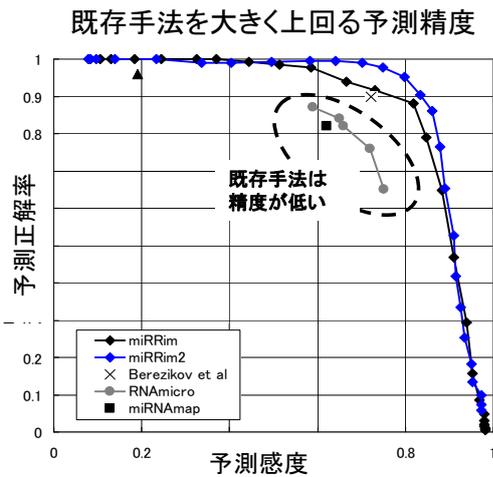
開発課題

1. 2次構造の保存性を考慮したゲノム配列の網羅的解析
2. 重要な既知RNAファミリーの新規RNA発見手法の開発
3. 発見した機能性RNA候補の発現解析

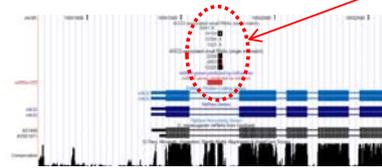
事業原簿 2. 1. 41

高精度マイクロRNA予測手法の開発に成功

インテックシステム研究所、産総研1

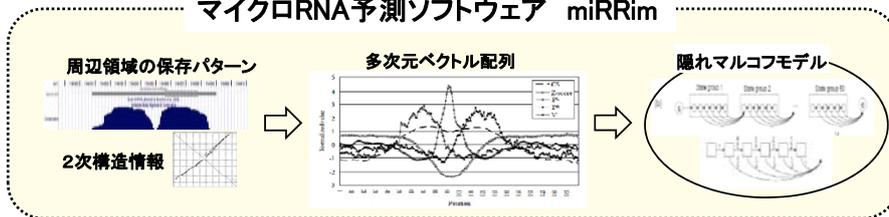


発見した新規miRNAをmirBaseに登録



- dme-mir-988
- dme-mir-995
- hsa-mir-1538

マイクロRNA予測ソフトウェア miRRim

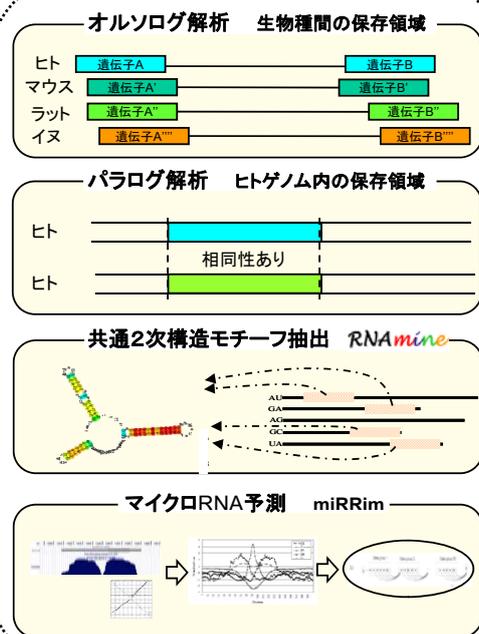


Terai G et al., *RNA* (2007) 12
特願 2006-335470

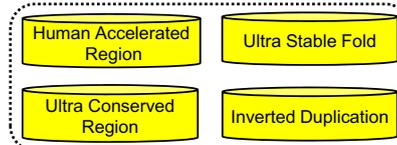
機能性RNAの網羅的予測と発現解析

インテックシステム研究所、産総研1

網羅的予測パイプライン



属性未知のゲノム因子



2,103

1433

ヒトゲノムから予測した機能性RNA候補 約10,000領域

コントロール

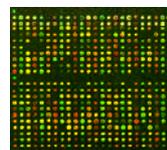


5,538

155

510

680



カスタムアレイによる発現解析で高発現RNAを1500個以上発見

①-3 機能性RNAデータベースの構築

集中研①、インテックシステム研究所、産総研(1)、東大(1)

研究目標： 機能性RNAの発見と機能解析を支援するデータベースを構築して公開する

問題点

- ・ 特定の機能性RNAファミリーに特化したデータベースが乱立
- ・ 機能性RNAの配列データベースRfamはゲノムへのマッピング情報が不十分
- ・ 既存のゲノムブラウザには機能性RNAに関するアノテーションが不足
- ・ 非公開の配列データを公共データと統合して解析できる環境が不足

開発課題

1. 機能性RNAの情報を網羅した配列データベースの開発
2. 機能性RNAの情報を取り込んだゲノムブラウザの開発
3. ユーザ認証機能による非公開データの活用

配列データベースとゲノムブラウザの開発

集中研①、インテックシステム研究所、産総研(1)、東大(1)



配列データベース



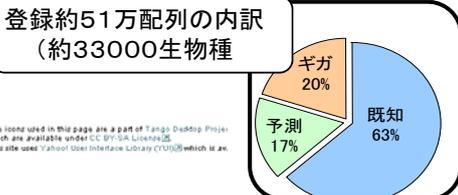
ゲノムブラウザ

Top Statistics Blast Download ncma.org Help

Home Genomes Blast Tables Gene Sorter DNA Convert Ensembl NCBI PDF/PS

SRNAdb functional interface showing search and download options. Callouts include: 配列検索 (Sequence Search), ダウンロード (Download), ヘルプ (Help), 分類一覧 (Classification List), and キーワード検索 (Keyword Search). The interface shows a search bar and a submit button.

UCSC GenomeBrowser interface showing genomic tracks and annotations. The interface includes a search bar, zoom controls, and various tracks for genomic data.



機能性RNA遺伝子	107,707
マイクロRNAと標的	2,325,800
その他のゲノム因子	182,638

Kin T et al., *Nucleic Acids Res.* 35 (DB), 2007
 Kin T et al., *Bioinformatics* 23(21), 2007
 Mituyama T et al., *Nucleic Acids Res.* 37 (DB), 2009

ユーザー認証による秘匿情報取り扱い機能

集中研①、インテックシステム研究所、産総研(1)、東大(1)

認証前

認証後

認証前は何も表示されていない

ユーザー認証機構の導入で
秘匿情報もデータベースに登録可能
インターネットからのアクセスも可能
連携に威力を発揮

認証後利用可能な情報が表示される

GIGANT: Giga-sequence Annotation system

産総研(1)

強力な情報解析能力を持たないラボでも、配列を取捨選択し、

膨大な配列情報を絞り込むことができるようになる

- ・ 転写産物の解析に特化して基本的な情報解析サービスを提供
- ・ イルミナ社GAIIとRoche FLXに対応
- ・ ヒト、マウス、ハエに対応

研究目標

1. 機能性RNAに特化した
バイオインフォマティクス技術の開発
2. ゲノム配列からの
機能性RNAの網羅的予測
3. 機能性RNAデータベースの構築

達成度

達成度

- ◎ 1. 世界トップレベルの、2次構造を考慮したRNA配列情報解析技術を確立
 - ・ 最高精度の超高速整列・比較・検索技術を開発
 - ・ 最高精度のRNA2次構造予測技術を開発
 - ・ 2次構造を考慮した網羅的動的計画法を開発
- 2. 約1万個の新規機能性RNA候補を発見
 - ・ 2次構造を考慮した機能性RNA発見パイプラインを開発
 - ・ 高精度のマイクロRNA予測技術を開発
 - ・ 機能性RNAのカスタムマイクロアレイを開発
 - ・ 1500個以上の高発現RNAを発現解析で同定
- ◎ 3. 機能性RNAの発見、機能解析に有用なデータベースとその利用技術を開発
 - ・ 配列データベースとゲノムブラウザを開発
 - ・ ユーザ認証機能を組み込み、非公開データを統合
 - ・ 次世代シーケンサー配列自動解析システムを構築



最終目標は達成された。

研究開発項目② 機能性RNA解析のための支援技術・ツールの開発

最終目標

機能性RNAをハイスループット、高感度、網羅的に解析できるバイオツールを開発する。また、超微量な機能性RNAを高感度(サブフェムトモルオーダー)で直接測定することが可能な方法・手法等の開発。



最終目標達成のための研究目標

1. 微量RNAを解析する技術の開発
目標: RNAをマスマスペクトロメトリー法によりサブフェムトモルオーダーで直接測定
2. 微量RNAを計測する技術の開発
目標: 機能性RNAをハイスループット、高感度、網羅的に解析できるバイオツール
3. 微量RNAを精製する技術の開発
目標: 多検体RNA分子を全自動で精製する装置の開発
4. RNAを化学合成する技術の開発
目標: 新規合成基盤技術開発と化学分子設計

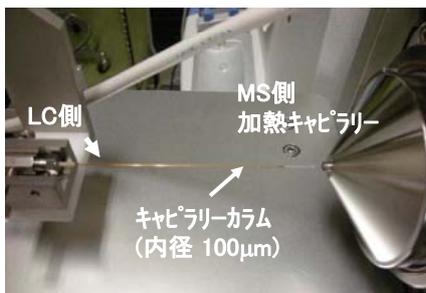
RNAマスマスペクトロメトリー (RNA-MS)とは？

- 微量RNAを直接的かつ定量的に解析する技術である
- 測定は迅速であり、診断への応用が可能
- 質量から、末端や修飾構造などの質的情報が得られる
- 質量情報から、RNA遺伝子の特定が可能(RMF法)
- 日本独自の基盤技術である



RNAサイエンスとRNAテクノロジーに貢献する

キャピラリーLC/ナノESI-MSによるRNA測定の高感度化



溶媒の検討
添加剤による脱塩
流速: 300-500nl/min

ナノフロー
HPLC

微量注液専用
オートサンプラー

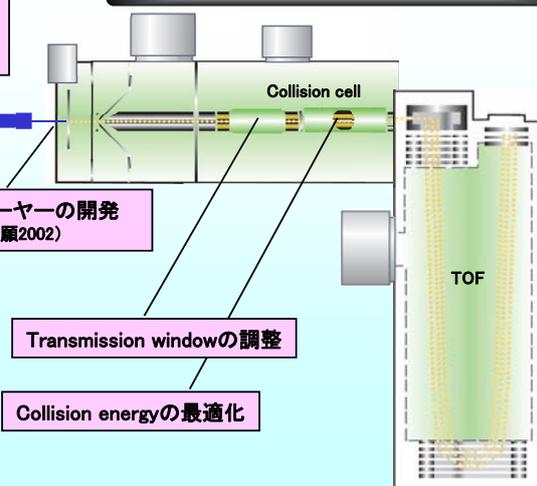
トラップカラムによる
オンライン脱塩システム

キャピラリーカラム
(内径75-150 μ m)
最適な樹脂の選択

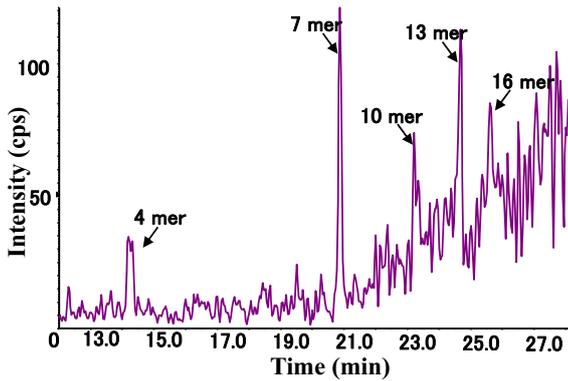
メタルスプレーヤーの開発
(特許出願2002)

タンデム四重極飛行時間型MS

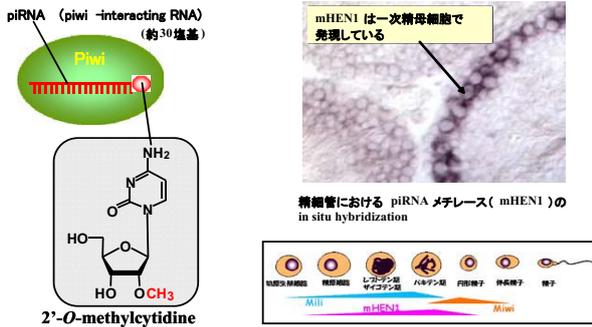
リニアイオントラップ電場型FTMS



50アトモルの世界最高感度を達成

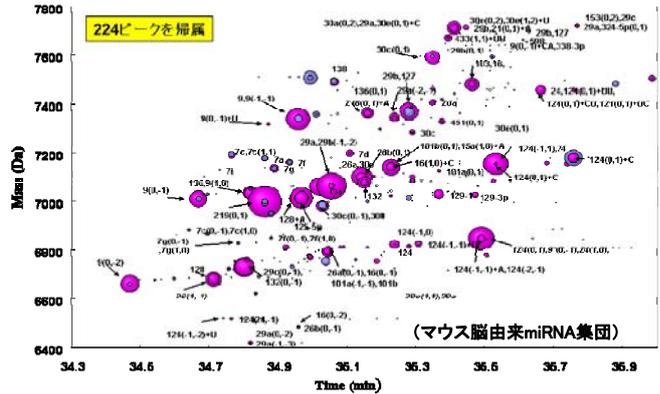


精子形成に関わるpiRNAに末端修飾を発見

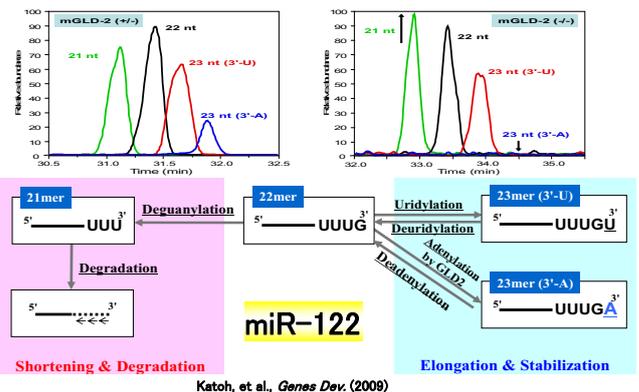


Ohara, et al., *Nat Struct Mol Biol.* (2007)

マイクロRNAのダイレクトプロファイリング



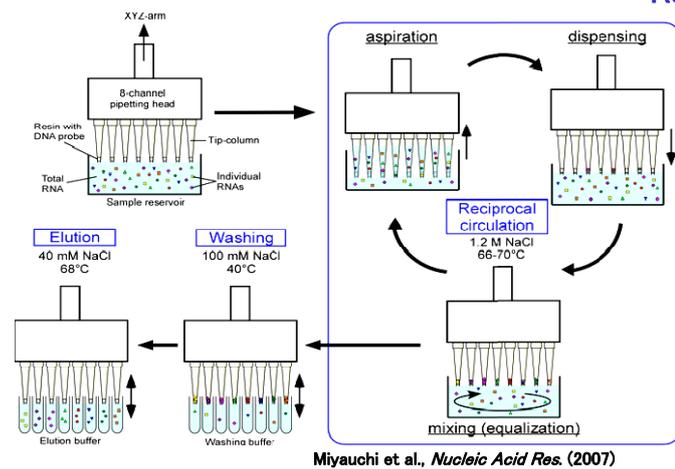
マイクロRNAの選択的安定化機構の発見



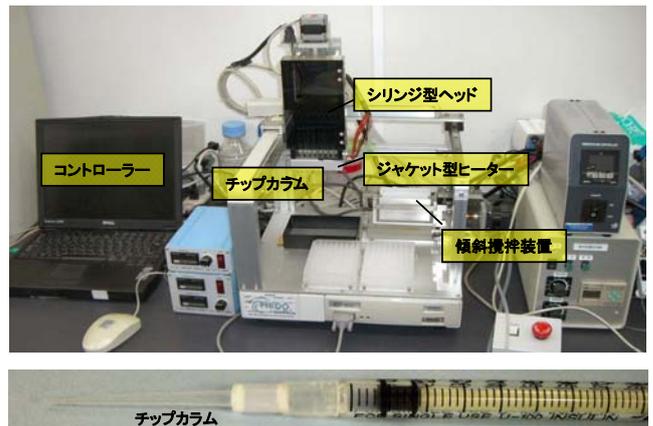
Katoh, et al., *Genes Dev.* (2009)

全自動RNA精製装置 (往復循環クロマトグラフィー)

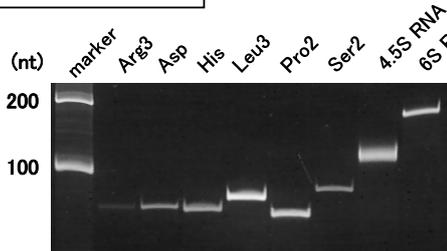
Reciprocal Circulating Chromatography (RCC)



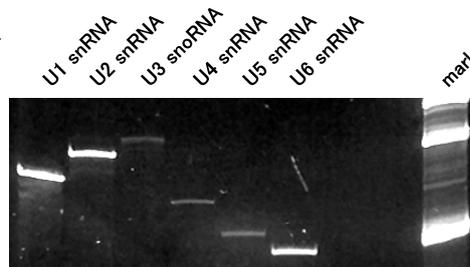
Miyauchi et al., *Nucleic Acid Res.* (2007)



事業原簿 2. 2. 9

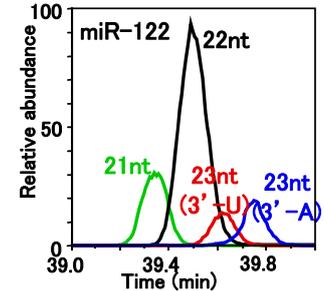


大腸菌tRNAとncRNAの精製



マウス脳由来ncRNAの精製

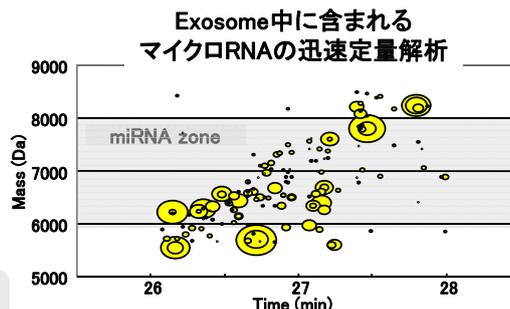
ヒトmiRNAの精製



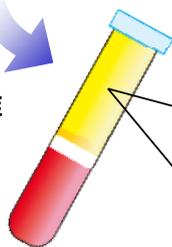
Katoh et al., *Genes Dev.* (2009)



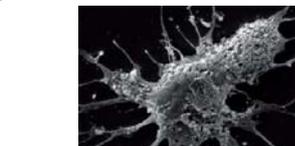
マイクロRNAの高感度質量分析システム



血漿成分の分離



がん細胞が放出する Exosome

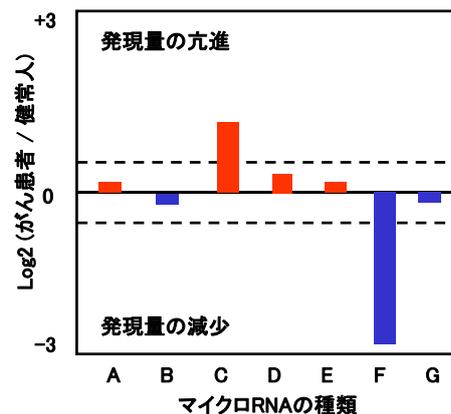


正常細胞

ガン化

ガン細胞

がん患者におけるマイクロRNAの変動



RNAの新規合成基盤技術開発と化学分子設計

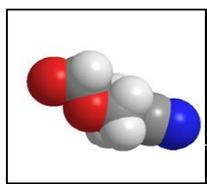
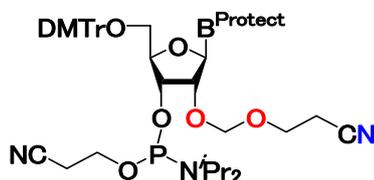


ヤマサ醤油株式会社

1. 新規RNA合成法および原料アミダイト合成法の確立

機能性RNA解析ツールとして純度の高い化学合成RNAが必要である。我々は2-cyanoethoxymethyl (CEM) 基を新規保護基とした新規RNA合成法(CEM法)を開発した。これによりRNAを高収率、高純度で合成することが可能となり、我々は、**医薬品レベルの高純度RNAの大量合成および長鎖RNA合成に高い優位性を保持することができた。**

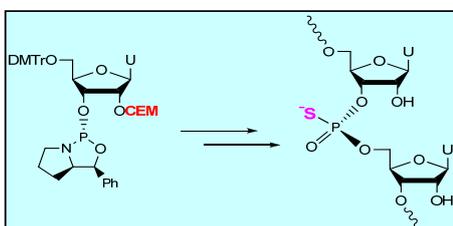
CEMアミダイト



立体障害が小さい

工業化に適したCEMアミダイト合成法を確立し、3件の特許出願を行った。現在では、キログラムスケールでのCEMアミダイト合成が可能となっている。

2. 核酸修飾による機能性RNAの化学合成



CEM法を用いてリン酸骨格部分へ修飾を導入した核酸の**合成研究**を行った。ホスホロチオエートRNAの立体選択的合成とボラノホスフェートRNAの合成研究を行い、核酸の親和性を現すTm値を測定することにより、どちらの修飾体も片方の立体異性体がRNAに対してより親和性が高いことを示した。今後、プロジェクトの成果の発展としてこれらの**修飾をオリゴマーに組み込み新規機能を保持するRNAオリゴマーの合成**を行いたいと考えている。

研究開発項目② 目標達成まとめ

研究目標

1. 微量RNAを解析する技術の開発

目標: RNAをマスマスペクトロメトリー法によりサブフェムトモルオーダーで直接測定

2. 微量RNAを計測する技術の開発

目標: 機能性RNAをハイスループット、高感度網羅的に解析できるバイオツール

3. 微量RNAを精製する技術の開発

目標: 多検体RNA分子を全自動で精製する装置の開発

4. RNAを化学合成する技術の開発

目標: 新規合成基盤技術開発と化学分子設計

達成度

達成度

- ◎ 1. RNAマスマスペクトロメトリー (RNA-MS) を開発しサブフェムトモルでの直接解析に成功。さらに、安定同位体標識を用いた絶対定量の技術を確立した。
応用 ・miRNAのハイスループットな直接プロファイリングに成功。
・ICE法を確立しイノシン化部位の網羅的同定に成功。
- 2. MPEX法を用いたmiRNAアレイの開発に成功した。
- ◎ 3. 往復循環クロマトグラフィーを考案し全自動RNA精製装置の開発に成功した。実用化レベルに達している。
- ◎ 4. CEMアミダイト法を確立し、高効率かつ高純度な長鎖RNAの化学合成を確立した。

最終目標は達成された。

研究開発項目③ 機能性RNAの機能の解明

最終目標

ヒト疾患に関連する機能性RNA及び発生・分化などをはじめ細胞機能に重要な働きを示す数十個の機能性RNA候補の機能解析を行い、医薬品開発や再生医療等に有用な基盤知見の取得や、基盤技術の構築を目指す。

最終目標達成のための研究目標

1. 数十個の機能性RNA候補の機能解析

癌、アレルギー疾患、再生医療関連モデル細胞からのmiRNAの取得と、有用な機能性miRNAの選別、機能解析を実施。

2. 基盤知見の取得

長鎖ncRNAの細胞内挙動、結合因子などの基盤情報の取得、低分子ncRNAの新規機能の解明を実施

3. 基盤技術の構築

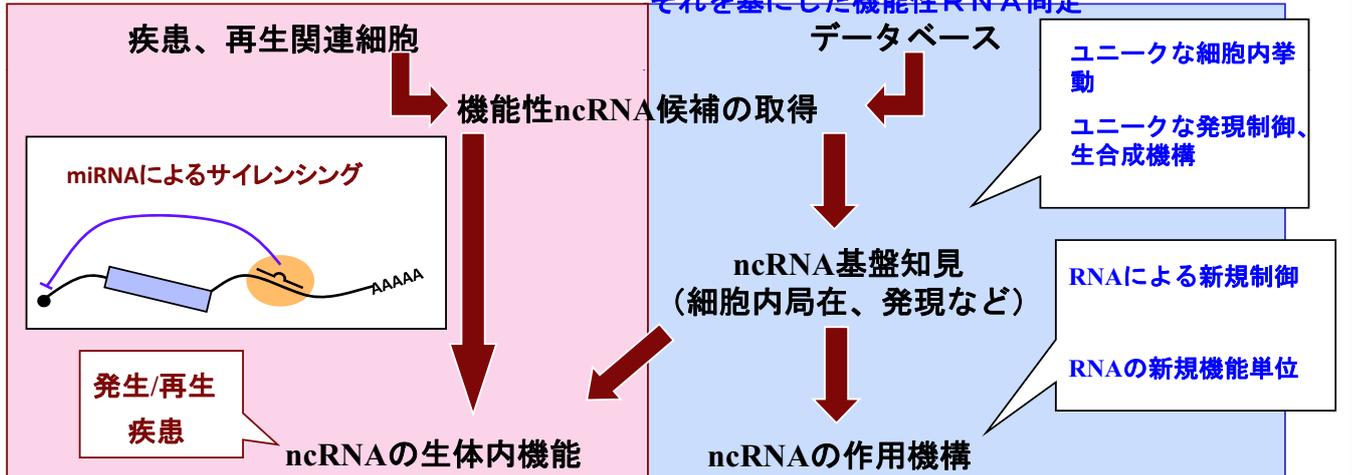
ncRNAの特質に合致したオリジナルな解析系の構築、疾患関連ncRNA、疾患関連相互作用因子の同定のための実験系の構築

機能解析グループの研究目標

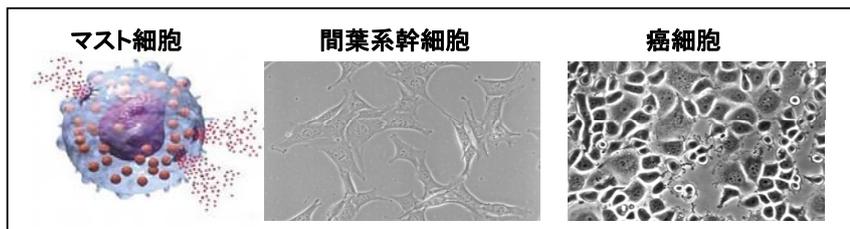


③-1. ヒト疾患に関連する機能性RNAの迅速で高効率な同定

③-2. 機能性RNAに関する基盤的知見の獲得とそれを基にした機能性RNA同定

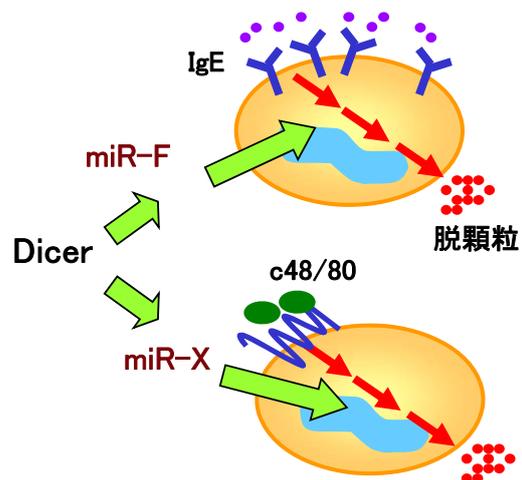
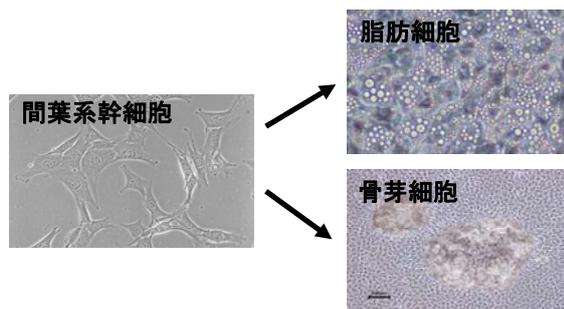


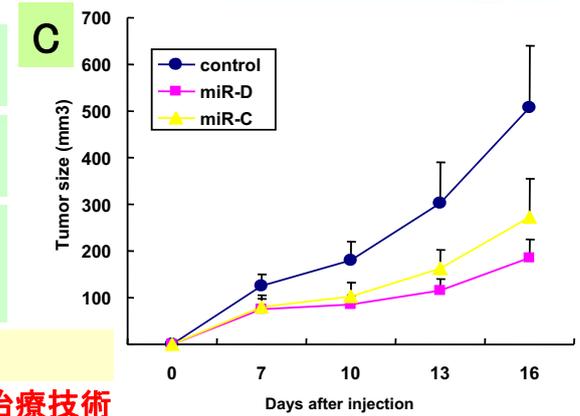
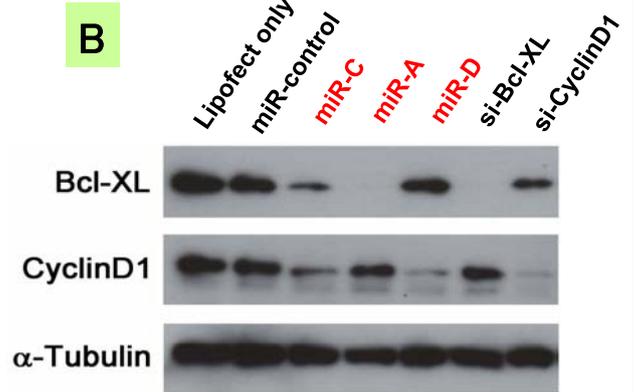
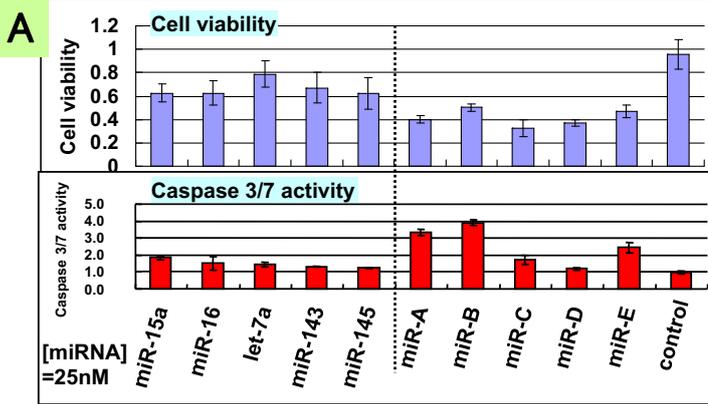
有用モデル細胞における機能性miRNAの解析 KYOWA KIRIN



➡ >1300種の新規miRNAの同定 物質特許出願(2006.12)

➡ miRNAの新規機能同定





A. 癌との関係が公知なmiRNAより抗細胞活性の強いmiRNA(協和新規含む)を多数見出した

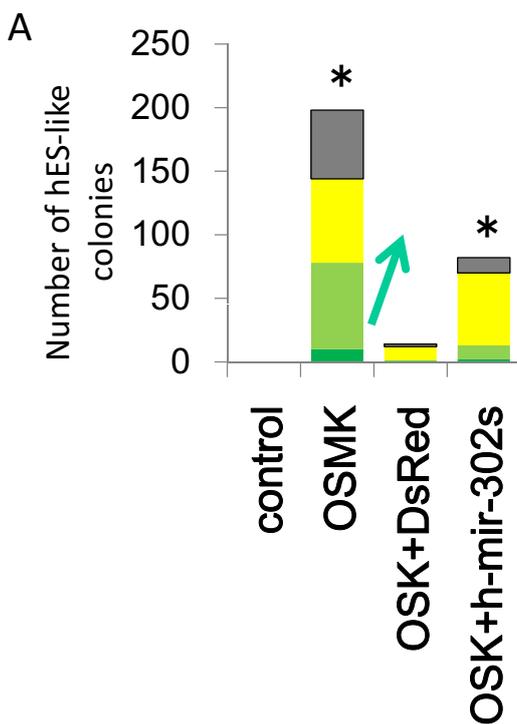
B. *In silico* 予測と実験により標的遺伝子を同定、複数の癌関連遺伝子を標的とするものあり

C. 増殖抑制 miRNAを導入したヒト大腸癌細胞をヌードマウスに移植、腫瘍増殖の抑制を確認、腫瘍部のmiRNA発現は16日まで継続を確認

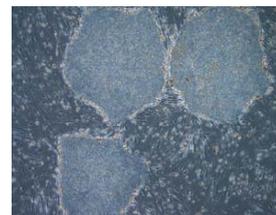
細胞の増殖を制御する核酸: WO2009/044899

miRNAによる新たな癌治療技術

ヒト線維芽細胞からのiPS細胞の樹立の効率を上昇させるmiRNAを同定した

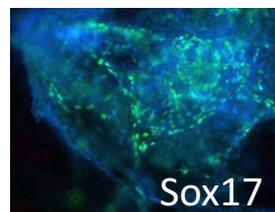
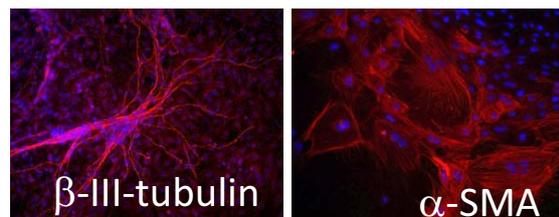


B OSK+h-mir-302s iPS



hES細胞様の形

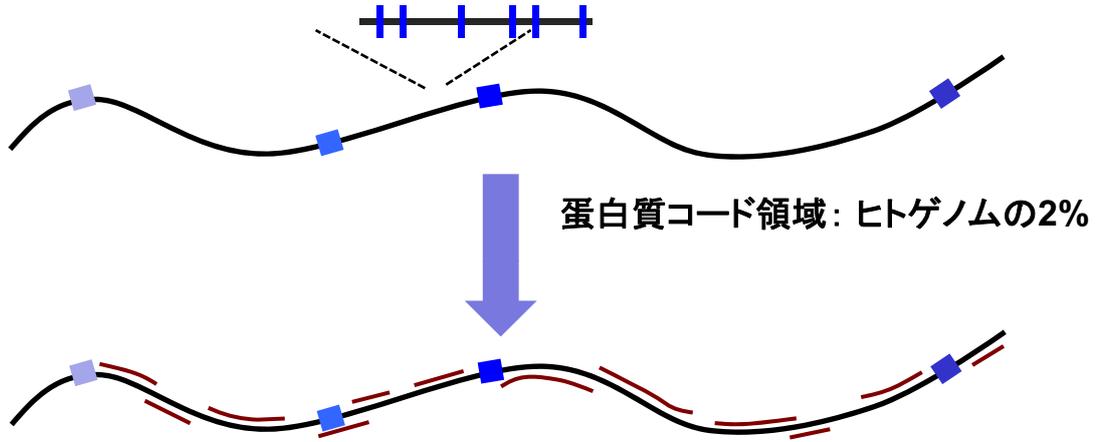
C



三胚葉系へと分化する

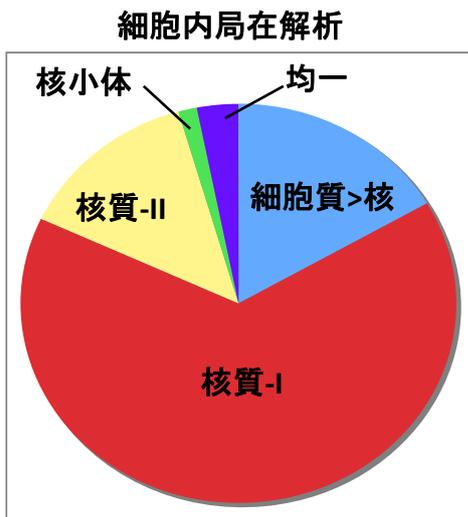
③-2. 機能性RNAに関する基盤的知見の獲得とそれを基にした機能性RNA同定

ゲノムから産生される機能不明な長鎖ncRNAに関する 基盤知見の収集



**Noncoding RNA = 機能性RNA
= dark matter**

2つの選別指標によるncRNAの基盤特性

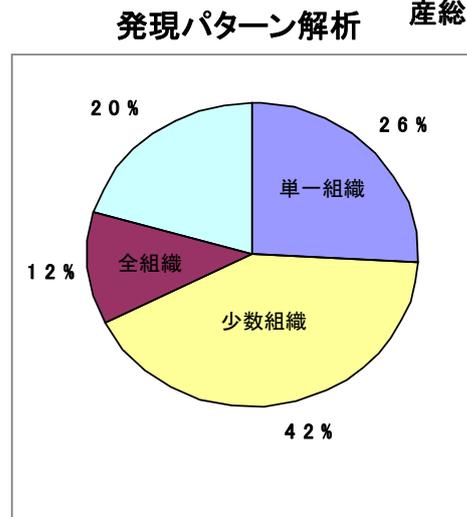


産総研グループ

>70種の核内局在ncRNA
細胞質ncRNA → NMD分解
(Ideue et al., Genes & Dev 2007)

弘前大・牛田グループ

60種の線虫のncRNA (核局在)
(Hokii et al., Gene 2006)



産総研グループ

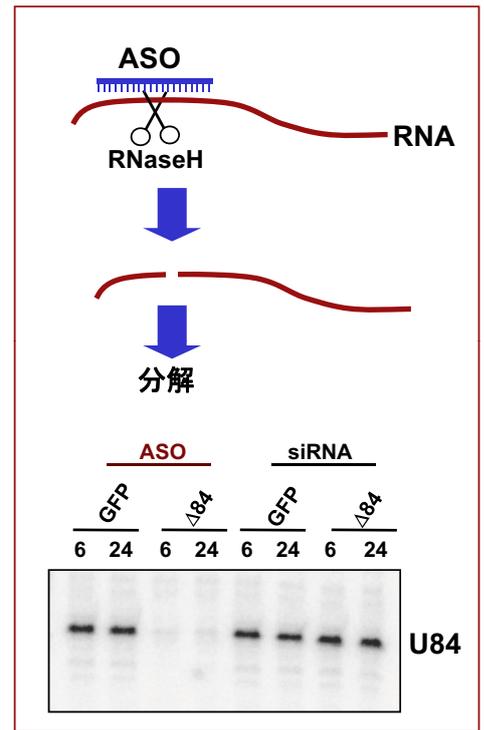
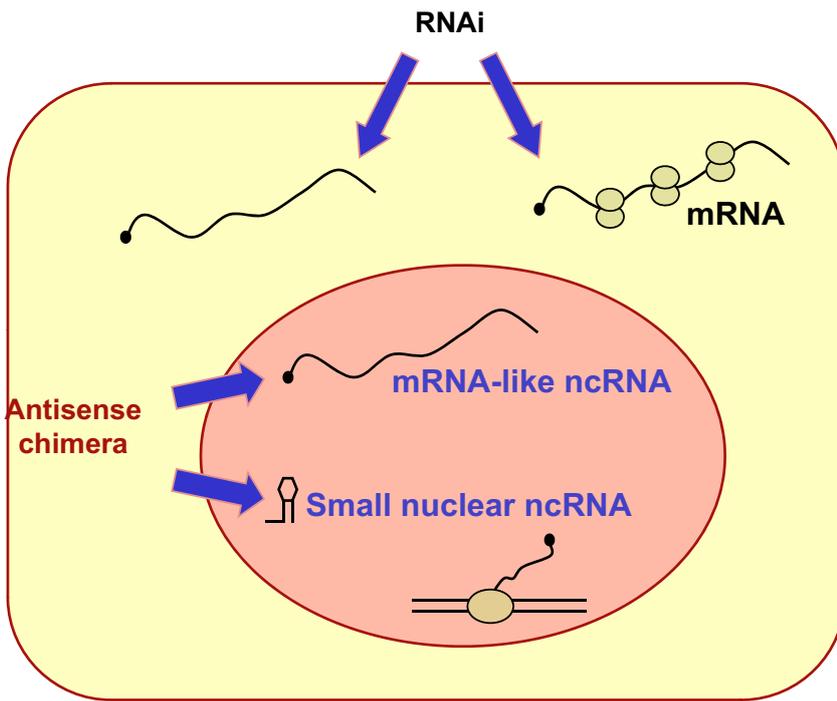
~100種の組織特異的ncRNA
(Sasaki et al., BBRC 2007a, b)

東工大・相澤グループ

>10種の間葉系幹細胞の分化誘導
に伴って発現変動するRNA

(Kikuchi et al., NAR 2009)

核内ncRNAの解析系の開発：核内RNAノックダウン法

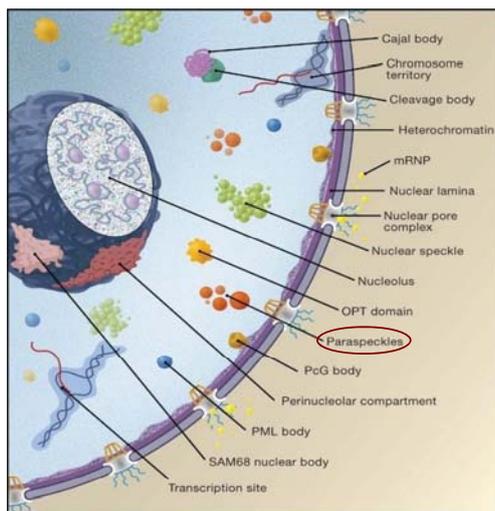


50種類以上のncRNAをノックダウン、10以上の細胞株で実施可能。

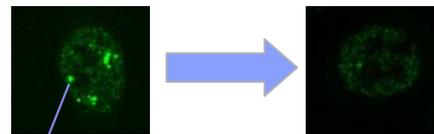
特許出願済(特開2009-171895)
Ideue et al., RNA 2009

事業原簿 2. 3. 72

細胞内の「形作り」に関わるncRNAの発見

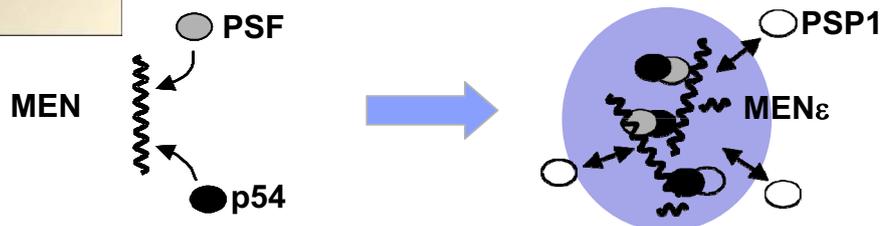


核内ノックダウン法による
MEN / ncRNAの分解



パラスペックル

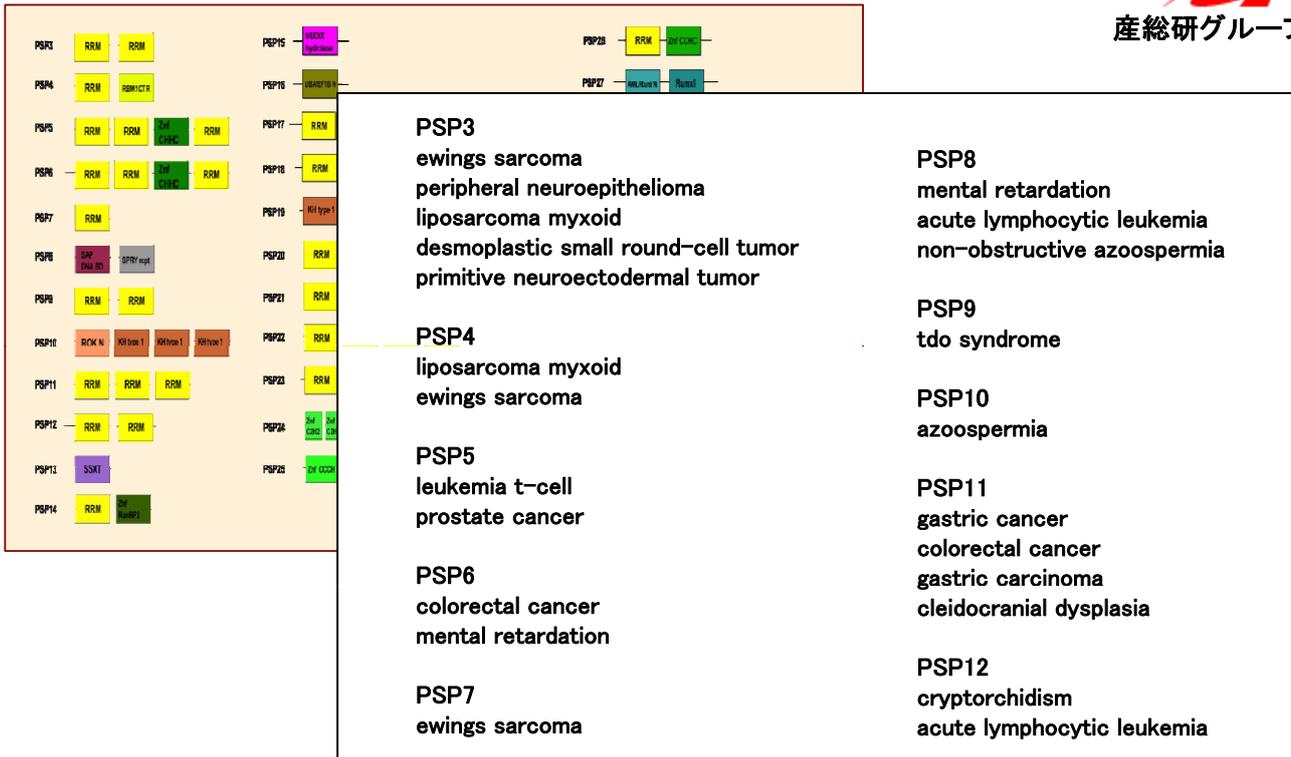
MEN / : architectural RNA



Sasaki et al., PNAS 2009

事業原簿 2. 3. 73

長鎖ncRNAと共局在する疾患関連パラスペックルタンパク質



事業原簿 2. 3. 77

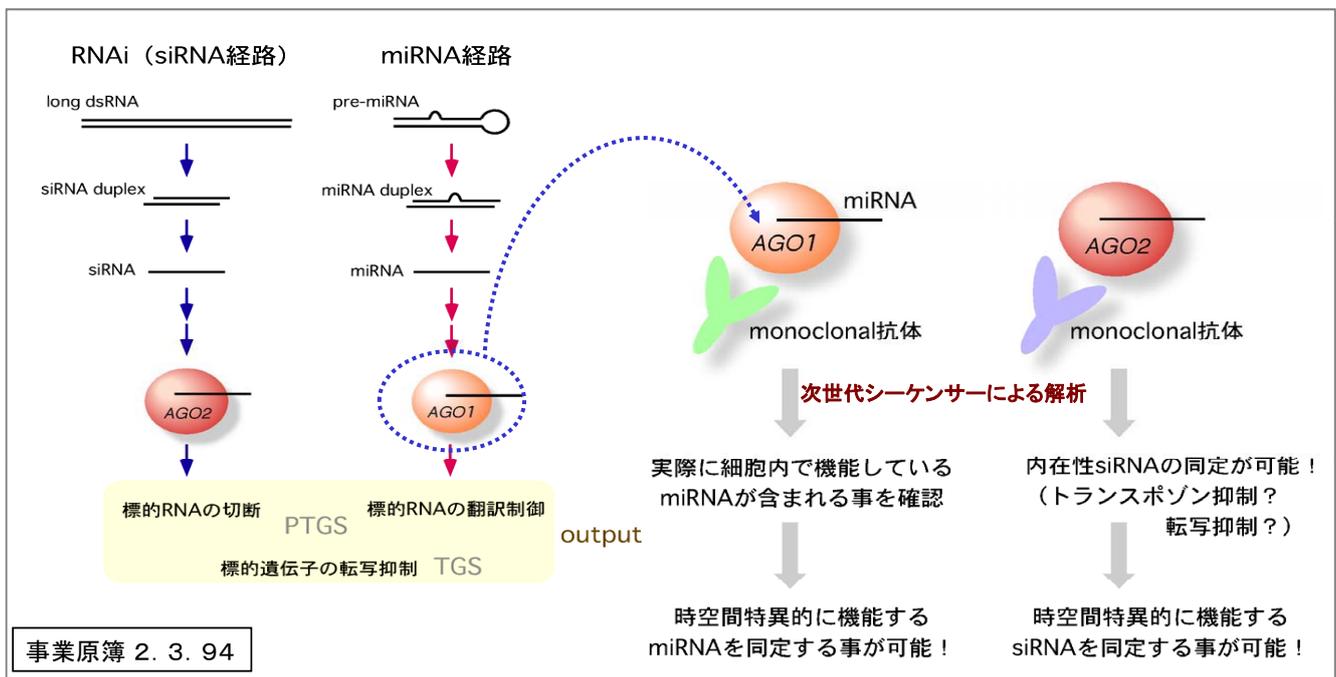
長鎖ncRNAを介した疾患タンパク質機能の制御の可能性

RNAサイレンシングにおけるArgonaute(Ago)蛋白質の役割

慶應大グループ

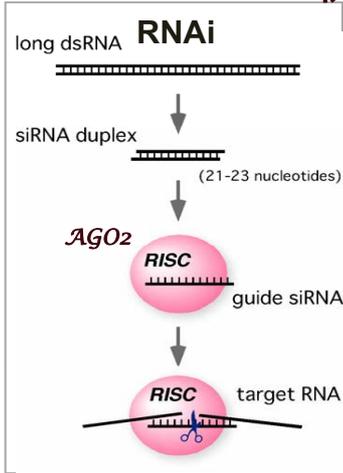


生体内に存在するmiRNA以外の低分子ncRNAの機能を解明することによって、全く新しい機能性RNAの機能基盤を確立する。

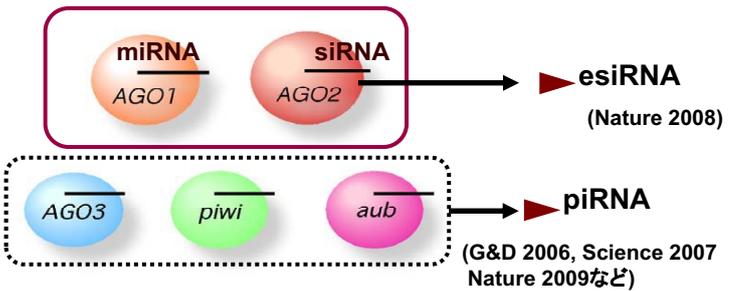


事業原簿 2. 3. 94

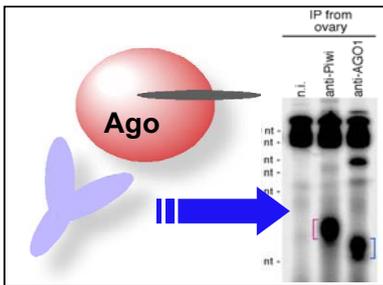
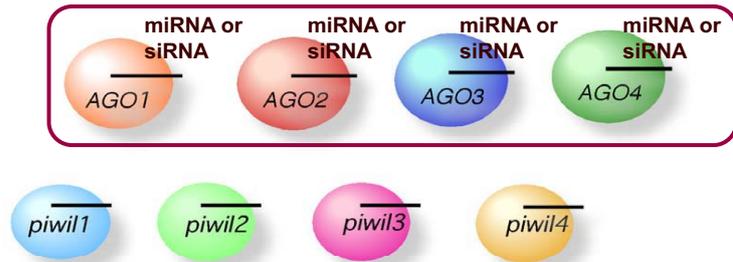
Argonaute(Ago)ファミリーと相互作用する新規低分子機能性RNAの発見



Drosophila



human



- ▶ ヒトにおけるAgo結合miRNAの解析
- ▶ RISC複合体の生合成経路の新知見

事業原簿 2. 3. 95

ゲノム安定化の維持に働く低分子ncRNAなどの基盤知見

アンチセンスRNAの機能解析

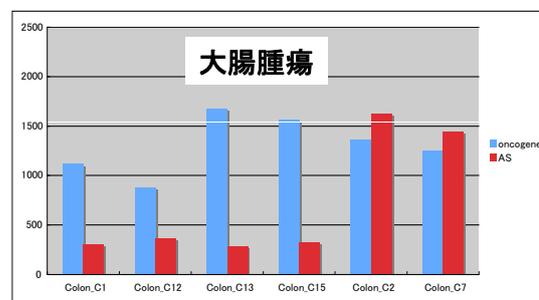
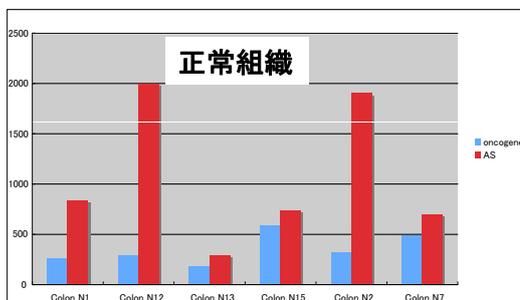


理研グループ

・通常のcDNA/ゲノム解析では認識されないアンチセンスRNAを含めたアンチセンスRNAの解析手法・マイクロアレイプラットフォーム

→ 特許出願中(特願2007-146341)、アレイ受託会社にライセンス

・上記のマイクロアレイプラットフォームを使用し、ヒト癌で特異的にセンス-アンチセンスペアの割合が変動するアンチセンスRNAを同定した。→ **新しい視点の診断マーカー**



・新規サイズ(60-100nt)の低分子RNAの発見

→ 全く新しいタイプのRNAであり、トランスクリプトーム中に普遍的に存在する。

・データのビューワー化

研究開発項目③ 目標達成まとめ

研究目標

1. 数十個の機能性RNA候補の機能解析
癌、アレルギー疾患、再生医療関連モデル細胞からのmiRNAの取得と、有用な機能性miRNAの選別、機能解析を実施
2. 基盤知見の取得
長鎖ncRNAの細胞内挙動、結合因子などの基盤情報の取得、低分子ncRNAの新規機能の解明を実施
3. 基盤技術の構築
ncRNAの特質に合致したオリジナルな解析系の構築、疾患関連ncRNA、疾患関連相互作用因子の同定のための実験系の構築

達成度

達成度

1. 間葉系幹細胞分化、マスト細胞の脱顆粒、癌細胞増殖を制御する10個以上のmiRNA(協和発酵キリン)
- ◎ 1. 脳下垂体由来のホルモン合成を制御するmiRNA(阪大)
1. iPS細胞の作出効率を上げるmiRNA、細胞分化制御miRNA(京大)
2. 核内構造体の形成を行う長鎖ncRNA(産総研)
2. 細胞周期制御に関係するncRNA(産総研)
- ◎ 2. 癌、白血病の発症と連関して機能するncRNA(産総研)
2. ncRNAと相互作用する疾患関連タンパク質(産総研)
2. 幹細胞分化を制御する小ペプチドコード転写物(東工大)
2. 生殖細胞のゲノム安定性に関する数千種類のpiRNAと新規生合成経路(慶應大)
2. 体細胞のゲノム安定性に関する数千種類のesiRNAと新規生合成経路(慶應大)
- ◎ 3. 核内ncRNA解析技術(産総研)
- ◎ 3. 低分子RNA解析のための高品質抗体(慶應大)
3. センス-アンチセンスペアの発現検出系(理研)



最終目標は達成された。

論文、著書、特許、報道、講演

添付資料5

平成17年8月～平成22年2月

論文*	総説、著書	特許	報道	講演
160	101	56	29	647

* 査読有り

主な特許出願

PTC/JP2007/052369	RNA配列情報処理装置	特願2006-210439	核酸保護基の導入方法
特願2006-335470	マイクロRNA検出装置、方法およびプログラム	特願2007-011813	リボ核酸化合物の製造方法
特願2006-194780	質量分析によるゲノム上でRNA配列を同定するシステム	特願2006-238459	新規核酸
PCT/JP2006/315271	往復循環クロマトグラフィーを用いた生体高分子の単離方法	特願2006-295113	間葉系幹細胞の増殖および/または分化制御剤
		特願2006-339997	新規核酸

IV. 実用化の見通しについて

研究開発項目①

事業原簿 P15

40/42

早期の実用化が見込まれる成果

- **2次構造を考慮したRNA配列情報解析技術**
RNA相互作用解析、miRNAとその標的予測
⇒ 核酸医薬開発の情報解析ツール [応用開始]
- **機能性RNAのカスタムマイクロアレイ** [知財化検討中]
機能性RNAの発現情報解析
⇒ 核酸医薬開発の機能解析ツール
- **機能性RNAデータベース＋次世代配列解析**
RNA配列DB、ゲノムブラウザ、次世代配列自動解析システム
⇒ 核酸医薬開発の情報基盤

早期の実用化が見込まれる成果

- ・ RNA-MSと情報解析技術 [東大TLO] (H22年度～)
⇒ 世界標準を志向した核酸医薬の薬物動態
- ・ RNAの全自動精製技術 [東大TLO] (H22年度～)
⇒ RNAの受託精製、精製したRNAの商品化
- ・ miRNA用 高感度マイクロアレイ [DNAチップ研究所]
⇒ 製品化に向けた検討
- ・ 高品質で安価なRNA化学合成法 [日本新薬]
⇒ 「研究用試薬」として販売開始 (H19年度)
将来は、RNA医薬品製造の世界標準に！

実用化が見込まれる成果

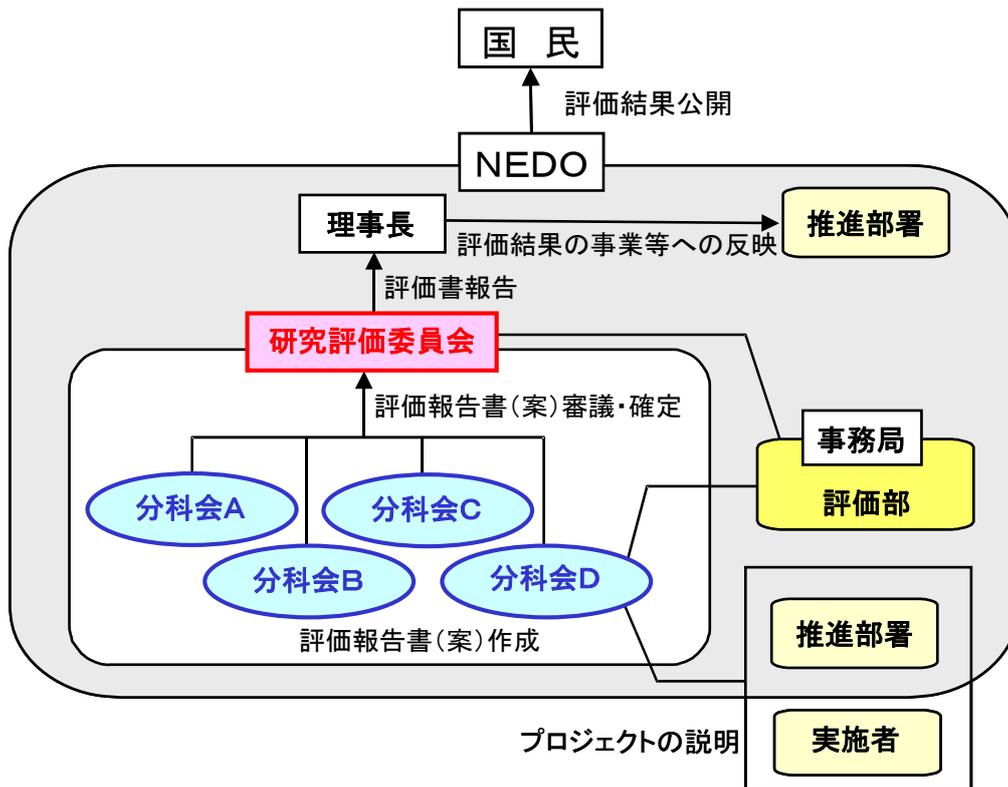
- ・ miRNA機能を利用したアレルギー疾患治療技術 [協和キリン]
- ・ miRNA機能を利用した癌治療技術 [協和キリン]
- ・ miRNA機能を利用したiPS細胞の効率良い作出技術 [京大]
- ・ 長鎖ncRNA、アンチセンスRNAの診断マーカー利用 [産総研、理研]

参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、
経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を
促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者
- ジャーナリスト

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある7名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構評価部が担当した。

3. 評価対象

平成17年度に開始された「機能性RNAプロジェクト」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プ

プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び研究実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、研究実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、研究評価委員会による『各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格、中間・事後評価の別等に応じて、各分科会において判断すべき者である。』との考え方に従い、第1回分科会において、事務局が、研究評価委員会により示された「標準的評価項目・評価基準」（参考資料 1-7 頁参照）をもとに改定案を提示し、承認されたものである。

プロジェクト全体に係わる評価においては、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義や実用化への見通し等について評価した。各個別テーマに係る評価については、主にその目標に対する達成度等について評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 国民が健康で安心して暮らせる社会の実現をめざすことを目的とする健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。

るか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得の取組及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

標準的評価項目・評価基準（事後評価）

2010. 3. 26

【事後評価 標準的評価項目・評価基準の位置付け（基本的考え方）】

標準的評価項目・評価基準は、第25回研究評価委員会（平成22年3月26日付）において以下のとおり定められている。（本文中の記載例による1・・・、2・・・、3・・・、4・・・が標準的評価項目、それぞれの項目中の(1)・・・、(2)・・・が標準的評価基準、それぞれの基準中の・・・が視点）

ただし、これらの標準的評価項目・評価基準は、研究開発プロジェクトの事後評価における標準的な評価の視点であり、各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格等に応じて、各分科会において判断すべきものである。

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）

（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）

- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓する事が期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)事業化までのシナリオ

- ・ N E D O 後継プロジェクト、N E D O 実用化助成、企業内研究等、プロジェクト終了後の事業化までの道筋は明確か。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

※基礎的・基盤的研究及び知的基盤・標準整備等の研究開発の場合は、以下の項目・基準による。

*基礎的・基盤的研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・研究管理法を經由する場合、研究管理法が真に必要な役割を担っているか。
- ・全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。

るか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5) 情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は公開性が確保されているか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 研究内容に新規性がある場合、知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S 化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注) 国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

参考資料 2 評価に係る被評価者意見

研究評価委員会（分科会）は、評価結果を確定するにあたり、あらかじめ当該実施者に対して評価結果を示し、その内容が、事実関係から正確性を欠くなどの意見がある場合に、補足説明、反論などの意見を求めた。研究評価委員会（分科会）では、意見があったものに対し、必要に応じて評価結果を修正の上、最終的な評価結果を確定した。

評価結果に対する被評価者意見は全て反映された。

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）評価部が委員会の事務局として編集しています。

平成22年11月

NEDO 評価部

部長 竹下 満

主幹 寺門 守

担当 橋山 富樹

*研究評価委員会に関する情報は NEDO のホームページに掲載しています。

(<http://www.nedo.go.jp/iinkai/kenkyuu/index.html>)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージア川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162