非コード性内因性アンチセンス RNA による遺伝子発現制御：作用機序と臨床応用の研究

木村 富紀

Non-coding Natural Antisense RNA: Mechanisms of Action in the Regulation of Target Gene Expression and Its Clinical Implications

Tominori Kimura

Laboratory of Microbiology and Cell Biology, Department of Pharmacy, College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University; 1-1-1 Noji Higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan.

(Received January 7, 2020)

Recent advances in high-throughput technologies have revealed that 75% of the human genome is transcribed to RNA, whereas only 3% of transcripts are translated into proteins. Consequently, many long non-coding RNAs (lncRNAs) have been identified, which has improved our understanding of the complexity of biological processes. lncRNAs comprise multiple classes of RNA transcripts that regulate the transcription, stability and translation of protein-coding genes in a genome. Natural antisense transcripts (NATs) form one such class, and the GENCODE v30 catalog contains 16193 lncRNA loci, of which 5611 are antisense loci. This review outlines our emerging understanding of lncRNAs, with a particular focus on how lncRNAs regulate gene expression using interferon- α 1 (IFN- α 1) mRNA and its antisense partner IFN- α 1 antisense (as) RNA as an example. We have identified and characterized the asRNA that determines post-transcriptional IFN- α 1 mRNA levels. IFN- α 1 asRNA stabilizes IFN- α 1 mRNA by cytoplasmic sense-antisense duplex formation, which may enhance the accessibility of an RNA stabilizer protein or decrease the affinity of an RNA decay factor for the RNA. IFN- α 1 asRNA can also act as competing molecules in the competing endogenous (ce) RNA network with other members of the *IFNA* multigene family mRNAs/asRNAs, and other cellular mRNA transcripts. Furthermore, antisense oligoribonucleotides representing functional domains of IFN- α 1 asRNA inhibit influenza virus proliferation in the respiratory tract of virus-infected animals. Thus, these findings support, at least in part, the rationale that dissecting the activity of NAT on gene expression regulation promises to reveal previously unanticipated biology, with potential to provide new therapeutic approaches to diseases.

Key words—regulatory RNA; long non-coding RNA; natural antisense transcript; interferon- α 1 antisense RNA; mRNA stabilization; proof-of-concept

1. はじめに

私の研究歴は、1981年4月の大学院入学に遡る。大学院時代は、British Council 給費留学生として留学した Oxford 大学 Sir William Dunn School Pathology における研究を含め、脳炎を引き起こす *Flavivirus* を用いて、宿主細胞へのウイルスの感染侵入メカニズムの解析を行った。^{1,2)} 学位取得後は、博士研究員として採用された英国 Medical Research Council の Laboratory of Molecular Biology において、ヒト免疫不全ウイルス I 型 (Human immuno-

deficiency virus 1; HIV-1) がコードするウイルス増殖調節遺伝子である *rev* の作用メカニズム解析にあたった。^{3,4)} その後の研究から、本遺伝子産物は Splicing を免れイントロンを残すウイルスゲノム RNA の核外輸送を調節する⁵⁾ことが明らかとなり、帰国後はウイルス RNA や様々な細胞由来 RNA の核外輸送機構に係わる研究を進めた。⁶⁻¹¹⁾

2007年4月に立命館大学への異動が決まった際にまず考えたことは、今後立ち上げる新研究室で行う研究主題についてであった。90年代半ばに HIV-1 *rev* 遺伝子の機能解明から花開いた RNA 核外輸送研究は、その後世界レベルで急速に研究が進み、2007年当時には概に新規な知見は出尽くした感が強かった。そこで、これまでの RNA 研究で培ってきた知見と技術を、博士研究員時代から強い

立命館大学薬学部薬学科病原微生物学研究室 (〒525-8577 滋賀県草津市野地東 1-1-1)

e-mail: kimurato@ph.ritsumeikan.ac.jp

本総説は、2018年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Most of the Human DNA Genome Does Not Code for Proteins

Recent advances in high-throughput technologies, including next generation sequencing, have provided valuable insight into the complexity of the whole transcriptome. Approximately 75% of the human genome is transcribed to RNA; however, high-throughput gene expression analyses reveal that only 3% of transcribed RNA is translated into proteins (number of protein-coding genes: 19986).

興味を抱いてきた遺伝子発現制御研究に応用することにし、ヒトゲノム研究の結果その存在が明らかにされたタンパク質をコードしない RNA (非コード性 RNA)、特に長鎖タンパク質非コード RNA [long protein non-coding RNA 又は long non-coding RNA (lncRNA)] を新規地での研究主題に据えることにした。

lncRNA に着目したのは、当時行っていた研究でその 1 つである内在性アンチセンス RNA (natural antisense transcript; NAT) による遺伝子の発現制御機構を見い出したことによる。

最初に、私と同時期に立命館大学生命科学部に異動した西澤幹雄教授との共同研究で、一酸化窒素合成酵素をコードする *iNOS* 遺伝子 mRNA の転写後性発現制御に、西澤教授が見い出した同遺伝子逆鎖から転写される NAT が関与することを報告した。¹²⁾ 引き続き、イントロンレス mRNA 核外輸送¹³⁾に係わる mRNA 上の責任領域¹⁴⁾の決定過程で、本 mRNA の安定性制御に *iNOS* 遺伝子 mRNA の場合と同様 NAT が係わることを見い出し、¹⁵⁾ 遺伝子の転写後性の発現制御機構に NAT を始めとする lncRNA の一般的な関与を考えるに至った。これには、ヒトゲノムプロジェクトの後継として開始された The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) プロジェクトが 2007 年に発表したパイロット研究 (ヒトゲノムの 1% を対象とする) の結果¹⁶⁾を大いに参考にした。本論文では、その大半が転写されることを見い出されたヒトゲノムからの転写産物の過半が non-coding RNA (ncRNA) としてタンパク質コード領域と重複することを示し、なんらかの機能的な関与を予想した。この論文を読ん

だ当時、新研究室における研究の方向性は間違っていないと勇気付けられたのを鮮明に思い出す。

2. ENCODE と制御性 RNA

22 組の常染色体と 1 組の性染色体から構成されるヒトゲノムは約 32 億の塩基対からなる¹⁷⁾が、その概要配列は 2001 年に報告され、2003 年には全塩基配列の読み取りが終了した。先に述べたように、この塩基配列にコードされる遺伝情報解析を目的とする ENCODE プロジェクトが続いて開始され、その最終結果は 2012 年 9 月 8 日号の *Nature* 誌¹⁸⁾に報告された。

その結果、ヒトゲノムにおいて遺伝子をコードする領域は全塩基配列のわずか 3% 足らずに過ぎない (Fig. 1 Left, Protein-coding genes) にもかかわらず、ゲノムの 75% に相当する領域が転写されていることが明らかになった (Fig. 1 Right, Transcripts).^{18,19)}

この転写領域から生み出される転写産物数は 208621 に及ぶが、そのうちタンパク質をコードす

木村 富紀

1980 年関西医科大学医学部卒。84 年 The British Council Scholar (Sir William Dunn School of Pathology, Oxford University に留学)。85 年関西医科大学大学院医学研究科博士過程単位修得。86 年医学博士、同大学医学部助手。88 年英国 Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Scientific Staff。92 年関西医科大学医学部講師。95 年同助教授。2007 年立命館大学理工学部教授。2008 年同大学薬学部異動、教授。2019 年同大学薬学部特任教授。専門はウイルス学、分子生物学、感染制御学。

Fig. 2. Regulatory RNAs

Genome-wide RNA sequencing studies¹⁸⁾ have revealed the unexpected complexity of RNA species encoded by DNA, with most not coding for a protein. We now understand that such non-coding RNAs exert important regulatory controls on many biological processes, which include long ncRNAs, short ncRNAs and pseudogenes. Major members of each regulatory RNA species are specified. (Color figure can be accessed in the online version.)

る転写産物 (protein-coding transcripts) は 40% の 83688 を占めるに過ぎず, ゲノム転写産物の過半はタンパク質非コード性 RNA (protein non-coding RNA 又は ncRNA) に由来する (https://www.gencodegenes.org/human/release_30.html). 近年の研究から, ncRNA の多くは生物活性を有し, 疾病の発症に密接に係わることが明らかになり,²⁰⁻²²⁾ これらを制御性 RNA (Regulatory RNA) と呼ぶようになった.²³⁾ この結果, これら制御性 RNA 分子が転写, 産生される DNA 塩基配列は RNA genes あるいは Non-coding RNA genes と呼び, タンパク質をコードする DNA 塩基配列は単に Genes と呼ぶか, あるいは RNA genes と区別して Protein-coding genes と呼ぶようになった.^{20,24,25)}

Figure 2 に示すように, Regulatory RNAs をコードする RNA genes は, lncRNA genes (16193 genes), small ncRNA (sncRNA) genes (7576 genes) 並びに pseudogenes (14706 genes) から構成される (https://www.gencodegenes.org/human/release_30.html).¹⁸⁾

Pseudogenes (偽遺伝子) は, かつてはタンパク質をコードしていたと考えられるが, その DNA 塩基配列にストップコドンが挿入されたりフレームシフト変異が生じることにより, 元のタンパク質コード機能を失ってしまった遺伝子を指す.²⁶⁻²⁸⁾ 元の正常な遺伝子が parent genes として残っている場合が多いが, 単独でそのまま偽遺伝子になったものもある. Pseudogenes は, その構造から以下の三種に大別される (Fig. 2).

1) Processed pseudogenes は, レトロトランスポゾンにより逆転写された mRNA 由来の cDNA 配列がゲノムに挿入されたものである. 元のタンパク質コード遺伝子に存在していたイントロン領域を欠失する.

2) Unprocessed (又は Duplicated) pseudogenes は, ゲノム内で元のタンパク質コード遺伝子塩基配列が重複し, その一部のコピーが突然変異の蓄積によってタンパク質コード機能を失ったものを指す. この場合, ゲノム内に正常な parent gene は保存されており, unprocessed pseudogene の出現により生物が直ちに影響を受けることはない.

3) Unitary pseudogenes は, unprocessed pseudogene の場合と同様に, タンパク質コード遺伝子に突然変異が重なった結果, コード機能を失い偽遺伝子化したものである. その意味では unprocessed pseudogene の一種とみなされるが, 遺伝子の重複は生じないため元の parent gene は保存されない. これはその遺伝子の産物が環境の変化などによって生物の生存に必要ななくなったことを意味し,²⁸⁾ 例えば, ヒトなど霊長目直鼻猿亜目において突然変異し偽遺伝子化したビタミン C 合成に係わる L-gulonolactone oxidase 遺伝子²⁹⁾が挙げられる.

lncRNA genes と sncRNA genes はコードする ncRNA の塩基長により分類され, lncRNA genes から 200 塩基長以上の ncRNA が, また sncRNA genes からは 200 塩基長以下の sncRNA が転写される. sncRNAs は, さらに 20-30 塩基長の microRNAs

Fig. 3. Subclassification of lncRNAs Based on Intersection with Protein-coding Genes

(A) lincRNA as intergenic lncRNA. (B)–(E) Genic lncRNAs. B: sense intronic lncRNA; C: sense overlapping lncRNA; D: bidirectional promoter lncRNA; and E: natural antisense transcripts (NATS). NATs are further subclassified into three types according to their transcription initiation sites.

(miRNAs) や piwi-interacting RNAs (piRNAs) などの short ncRNAs と -30–200 塩基からなる small nuclear RNAs (snRNAs) や small nucleolar RNAs (snoRNAs), tRNAs など中間長の ncRNAs に細分される (Fig. 2).

lncRNAs は, protein-coding gene との位置関係から遺伝子間 [Fig. 3(A)] に位置する long intergenic/intervening ncRNAs (lincRNAs) と遺伝子と重複する [Figs. 3(B) and (C)] genic lncRNAs に分類される. 後者には, 両者が互いのイントロン領域に位置する sense intronic lncRNAs と sense overlapping lncRNAs が存在する. このほか, protein-coding gene の転写開始点と順方向あるいは逆鎖方向に転写される bidirectional promoter lncRNAs [Fig. 3(D)] や NATs [Fig. 3(E)] が含まれる. NATs も, sense lncRNAs と同様に, overlapping (type 1), intronic (type 2), intergenic (type 3) に細分される.

3. 制御性 RNA による遺伝子発現調節

上述の制御性 RNA のうち miRNA は, small ncRNA としてもっとも研究されており,²¹⁾ 内在性の RNA サイレncing機構を担う代表的な short non-coding RNA となる. その制御作用は, mRNA

の翻訳阻害や分解を介した遺伝子の転写後発現制御ネットワークの調節^{30,31)}であり, 様々な疾患の分子病態に重要な役割を果たす.³²⁾ small ncRNA には, その他 ribosomal RNA (rRNA) の形成過程でそのプロセッシングや塩基の修飾のために必要な核小体 RNA である snoRNA や核内低分子として pre-mRNA のスプライシングに係わる snRNA 並びに mRNA 上のコドンを確認し対応するアミノ酸を合成中のポリペプチド鎖に運搬する tRNA が以前から知られる. また, レトロトランスポゾンの発現抑制に係わる piRNA や miRNA とともに RNA サイレncing機構に係わる endogenous small interfering RNA (esiRNA) など含まれる.

偽遺伝子には, 転写されるものが 973 種 (https://www.encodegenes.org/human/release_30.html) 存在し, この中には ncRNA として機能するものが存在する.²⁷⁾ 例えば, 偽遺伝子 RNA が parent gene mRNA を不安定化し, その発現を抑制する場合³³⁾ や, esiRNA として標的遺伝子 mRNA の発現を抑制する例も報告される.^{34–36)} 一方, 偽遺伝子 RNA が, parent gene mRNA と miRNA response element (MRE) 配列を共有し, MRE を標的として同 mRNA の不安定化をもたらす miRNA を自己に誘

Fig. 4. Truncation from the Bulged Stem-loop (BSL) of the Conserved Secondary Structure (CSS) Results in Failure to Detect IFN- α 1 mRNA by Fluorescence *in Situ* Hybridization

Results from a previous computational analysis of the folding potentials of the IFN- α 1 mRNA export element, as well as internal deletion-mutagenesis and constitutive export assays, are shown. The linear diagram in the left panel shows IFN- α 1 mRNA, which consists of the 5' UTR (nt 1–67), CDS (protein-coding sequence; nt 68–637) (grey box) and the 3' UTR (nt 638–876). AREs indicate the adenylate uridylate-rich element motifs present in the 3' UTR. CSS (nt 208–452) represents the secondary RNA structure of the IFN- α 1 mRNA export element, which consists of SL1 (nt 229–305) (left striped box) and SL2 (nt 308–434) (right striped box). The latter includes the BSL (nt 322–352) (solid box). The right panel shows the results from constitutive export assays of wild-type and mutant IFN- α 1 mRNAs. A: IFN- α 1 mRNA; B: SL1 deletion mutant (IFN- α 1 mRNA/ Δ SL1); C: SL2 deletion mutant (IFN- α 1 mRNA/ Δ SL2); D: BSL deletion mutant (IFN- α 1 mRNA/ Δ bulge). Bar 10 μ m. Figure and legend reproduced with modifications from *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**(8), 1451–1467, with permission.

導することで, parent gene mRNA の発現を増大させる例も知られる。³⁵⁾

lncRNA は, 1990 年代には性染色体の活性化や不活性化に係わる Xist^{37–39)} などが報告されていたが, 近年になって, ヒストン修飾や DNA メチル化によるクロマチン修飾の機能が報告される^{40–42)} など注目を集めている. lncRNA の機能には, さらにパラスペックルなど核内構造体の構築⁴³⁾ やエピジェネティックな遺伝子発現制御,⁴⁴⁾ そして, 細胞質での標的 mRNA の分解や翻訳制御まで多岐にわたることが知られる。^{45,46)}

これら制御性 ncRNA の遺伝子発現調節作用に関しては, 既に多数の原著論文や, 優れた総説論文の報告^{22,47)} があるので, 詳細はそれらに譲ることとし, 以下では私の研究室で研究してきた NAT による転写後性の遺伝子発現制御作用とその調節メカニズム並びに創薬シーズへの応用について論じたい.

3-1. 内在性アンチセンス RNA (NAT) によるインターフェロン- α 1 遺伝子 (*IFNA1*) mRNA (interferon- α 1 mRNA あるいは IFN- α 1 mRNA) の転写後性発現調節 先に述べたように, ヒトゲノムの 1% を対象とする ENCODE プロジェクトのパイロット研究の結果, トランスクリプトームの過

半は ncRNA としてタンパク質コード領域と重複し, protein-coding genes の発現に機能的に関与することが予想された.¹⁶⁾ この予想は, 2012 年に報告された同プロジェクトの最終報告^{18,20)} によって検証され, lncRNA の中でも NAT, 特に Type 1 NAT が, 重複する mRNA の発現を正に制御する可能性が新たに示された.

この仮説を検証する目的で, われわれはウイルス感染に対する宿主自然免疫応答の主たるエフェクターをコードする IFN- α 1 mRNA に着目し, この mRNA をコードする *IFNA1* 遺伝子の逆鎖から転写される IFN- α 1 antisense RNA (asRNA) が重複する mRNA の発現を転写後性に制御することを見出した.¹⁵⁾

この asRNA は, IFN- α 1 mRNA を核外輸送するための責任領域をマッピングする先行研究¹⁴⁾ を契機として見出した. IFN- α 1 mRNA を核外輸送するには, 核外輸送因子 chromosome region maintenance 1 (CRM1) が同 mRNA の二次構造中にある conserved secondary structure (CSS) (Fig. 4 Light) 領域を認識することが必要となる.¹⁴⁾ この CSS 中に CRM1 認識部位を決定する過程で, CRM1 が認識する SLII ドメイン [Fig. 4 Right

Fig. 5. Identification and Characterization of IFN- α 1 asRNA and Its Effect on Post-transcriptional Stabilization of IFN- α 1 mRNA

(A) Northern-blot analysis of IFN- α 1 asRNA (left) and IFN- α 1 mRNA (right) in SeV-infected Namalwa cells 24 h after infection. 28S and 18S show the locations of each rRNA band and were used to estimate the size of IFN- α 1 asRNA. (B) Genomic location of IFN- α 1 asRNA exons are depicted relative to *IFNA1*, which is based on the results from rapid amplification of 5'-cDNA ends analysis. Sequences downstream of the poly (A⁺) addition site were calculated from nt 876 taken as 0. Arrows depict the direction of asRNA transcription. IFN- α 1 asRNA (top) and a splice variant (bottom) are shown. Bar 100 nt. (C) IFN- α 1 asRNA silencing destabilizes IFN- α 1 mRNA. The stability of IFN- α 1 mRNA in the SeV-infected, IFN- α 1 asRNA-silenced (KD) cells over time was measured by RT (reverse transcription)-qPCR (quantitative polymerase chain reaction) relative to time 0 (i.e., 12 h post infection) after blocking new RNA synthesis with ActD. The levels of IFN- α 1 mRNA were normalized to 18S rRNA and are presented as the "relative IFN- α 1 mRNA expression" ± S.E.M. of triplicate samples, which indicates the fold change of the IFN- α 1 mRNA level relative to that at 0 h after ActD treatment in KD (-) cells. The levels of 18S rRNA are presented as "relative 18S rRNA expression" ± S.E.M. of triplicate samples, which indicates the fold change in the 18S rRNA level relative to that at 0 h after ActD treatment in KD (-) cells. KD (+)/mRNA (open circles and bold line) and KD (-)/mRNA (filled circles and dotted line) indicate the relative IFN- α 1 mRNA levels in ActD-treated KD (+) or KD (-) Namalwa cells, respectively. KD (+)/18S (open squares and bold line) and KD (-)/18S (filled squares and bold line) indicate the relative 18S rRNA expression levels in ActD-treated KD (+) or KD (-) Namalwa cells, respectively. Values from representative experiments are shown as the mean ± S.E.M. of triplicate samples. (D) Overexpressed IFN- α 1 asRNA stabilized IFN- α 1 mRNA. The change in stability over time of IFN- α 1 mRNA in IFN- α 1 asRNA overexpressed Namalwa cells (OE) was measured by real-time PCR relative to time 0 (i.e., 6 h after SeV infection) after blocking new RNA synthesis with ActD. The relative expression levels of both IFN- α 1 mRNA and 18S rRNA are presented as described in the legend to (C). OE (+)/mRNA (open circles and bold line) and OE (-)/mRNA (filled circles and dotted line) indicate the relative IFN- α 1 mRNA levels in ActD-treated OE (+) or OE (-) Namalwa cells, respectively. OE (+)/18S (open squares and bold line) and OE (-)/18S (filled squares and dotted line) indicate the relative 18S rRNA expression levels in ActD-treated OE (+) or OE (-) Namalwa cells, respectively. Values from representative experiments are shown as the mean ± S.E.M. of triplicate samples. Figure and legend reproduced with modifications from *Cell. Mol. Life Sci.*, 70 (8), 1451–1467, with permission. (Color figure can be accessed in the online version.)

Panel (C)] から bulged-stem loop (BSL) を削除すると、この変異 mRNA (IFN- α 1 mRNA/ Δ bulge) は細胞内で分解されることが明らかになった [Fig. 4 Right Panel (D)]. これは、BSL の削除により mRNA 上の標的部位が消失する結果、IFN- α 1 asRNA が IFN- α 1 mRNA を認識しなくなるためであった。¹⁵⁾

IFN- α 1 asRNA は、第 9 染色体上 *IFNA1* locus (9p22) の逆鎖から転写される約 4 kb 長の Tpe 1

NAT であり [Fig. 5(A)], IFN- α 1 mRNA の全長に重複するエクソンを有する。ほかにスプライシング変位体が存在するが、両者とも IFN- α 1 mRNA 中の CSS 領域と重複が認められる [Fig. 5(B)]. そこで、IFN- α 1 mRNA の発現に果たす IFN- α 1 asRNA の役割を検討する目的で、同 asRNA の発現を特異的に抑制する条件下に actinomycin D (ActD) により RNA の新生を制限した。その結果、IFN- α 1 asRNA の発現抑制に伴い、IFN- α 1 mRNA

の半減期は 5.1 h から 0.9 h へ短縮した [Fig. 5 (C)]. 一方, ポリ A 鎖付加部位より 242 塩基下流部位からスプライシングを受け, IFN- α 1 mRNA の全長に重複する asRNA エクソン (IFN- α 1 asRNA/exon 1.1) [Fig. 5 (B)] を強制発現した Sendai virus (SeV) 感染細胞においては, IFN- α 1 mRNA の半減期は対照細胞における 2.8 h から 8.1 h に延長した [Fig. 5 (D)].

加えて, IFN- α 1 asRNA の作用点を決定するマッピング実験の結果, Fig. 4 右パネル (D) から示唆されるように, IFN- α 1 mRNA CSS 中の BSL 領域に相補的な asRNA 領域 (IFN- α 1 asRNA/BSLR) が同 mRNA を認識する機能ドメインにあたること が示された.¹⁵⁾ また, 報告されている大多数の lncRNA²⁰⁾ とは異なり, IFN- α 1 asRNA はその制御作用を細胞質において発揮していた. 以上の結果から, IFN- α 1 asRNA は, 細胞質において IFN- α 1 mRNA が形成する RNA 二次構造中の BSL 領域を認識し, 転写後性に IFN- α 1 mRNA の安定性を調節すると考えられた.¹⁵⁾

その後の研究から, IFN- α 1 asRNA による IFN- α 1 mRNA の安定性調節には, BSL 領域の直接認識に加え, competing endogenous RNA (ceRNA) 効果が存在することが明らかになった.⁴⁸⁾ 先に偽遺伝子 RNA には, parent gene mRNA と MRE を共有することにより同 mRNA の発現を増大させる作用を示す例⁴⁹⁾があることを述べたが, ceRNA とはこの MRE を介し発現調節効果を現す制御性 RNA のことであり, pseudogene RNA に加え, MRE を共有する lncRNA や mRNA にも ceRNA 機能を示す例があることが後に報告された.⁵⁰⁾

IFN- α 1 asRNA の標的領域である BSL とその近傍領域には, miR-1270, miR-1287 並びに miR-483 の標的となる MRE がそれぞれ存在することが Bioinformatics 解析により示された [Fig. 6 (A)].¹⁵⁾ これらの MRE のうち, BSL の 'Bubble' 構造 (一本鎖 RNA 部分) に重複して存在する MRE-1270 のみが, 対応する micrRNA に対する標的として機能することが明らかとなった.^{15,48)} 一方, 同様な Bioinformatics 解析の結果, IFN- α 1 asRNA にも MRE-1270, MRE-1287, MRE-483 の存在が推定されたが, そのどれも BSL 領域の認識ドメインである asRNA/BSLR には重複していなかつ

た [MRE-1270 に関しては, Fig. 7 (A) を参照のこと]. 続いて, 対応する miRNA を過剰発現させたところ, miR-1270 と miR-483 が IFN- α 1 asRNA の発現を有意に低下させた [Fig. 6 (B)] が, miR-483 は IFN- α 1 mRNA 上に機能的な MRE を有していないため, 両 RNA 間で共有される MRE は MRE-1270 のみであることが明らかになった.

一方, miR-1270 の seed 領域配列⁵¹⁾からなる anti-miR-1270 を用いて内在性 miR-1270 の発現を抑制したところ, IFN- α 1 asRNA と mRNA の発現は増加し, その程度は asRNA により顕著であった [Fig. 6 (C)]. この結果は, miR-1270 は両 RNA を標的とするものの, その発現抑制効果は IFN- α 1 asRNA により高度に現れることを示し, asRNA が decoy RNA として miR-1270 を引きつける結果, IFN- α 1 mRNA の発現を担保する ceRNA として機能する可能性を強く示唆した. さらに, Bioinformatics 解析により, IFN- α 1 asRNA は MRE-1270 を 5 ヲ所に有するのに対し, IFN- α 1 mRNA 上には MRE-1270 は BSL 領域の 1 ヲ所にしか存在しないことが示され [Fig. 7 (A) and 9 (詳細は後述)], この結果は Fig. 6 (C) の結果とよく一致した. さらに, IFN- α 1 asRNA 上のこれら 5 ヲ所の MRE-1270 配列あるいはその変位体を挿入したルシフェラーゼレポーターを用いたアッセイより, これらの MRE-1270 は miR-1270 の標的として機能することが示された.⁴⁸⁾

以上の結果より, IFN- α 1 asRNA による IFN- α 1 mRNA の転写後性発現制御には, asRNA による mRNA-CSS 上の BSL 領域の直接認識作用に加え, 両 RNA が共有する MRE-1270 を介し IFN- α 1 asRNA が miR-1270 を吸着することによる ceRNA 作用も係わることが明らかになった.⁴⁸⁾

3-2. NAT による IFN- α 1 mRNA の転写後性発現調節の作用メカニズム: asRNA の recycling 仮説と ceRNA ネットワーク RNA は, 塩基一次配列が形成する Watson-Crick タイプの塩基対 (A:U 及び C:G) と non-Watson-Crick タイプの塩基対 (G:U) により二次構造を形成することが知られる.⁵²⁾ この二次構造は, 塩基対が形成する二本鎖部分からなる Stem 領域と塩基対を形成しない塩基部分からなる一本鎖の Loop や Bulge 領域から構成される. mRNA と asRNA あるいは mRNA 上の

Fig. 6. miR-1270 Targets both IFN- α 1 mRNA and asRNA, Which Share MRE-1270

(A) The schematic shows the predicted binding sites for miR-1270, miR-1287 and miR-483 (all in black bold lines) and their relation to the BSL region (*IFNA1* nt 322–352; red bold line) in the CSS of IFN- α 1 mRNA. (B) Validation of the effect of miR-1270 on IFN- α 1 asRNA. Effects of overexpressed miR-1270, miR-1287 and miR-483 on IFN- α 1 asRNA expression were examined in SeV-infected Namalwa cells. The cells were harvested for subsequent RT-qPCR analyses. IFN- α 1 asRNA levels were normalized to 18S rRNA as described in the legend to Fig. 5 (C) and are presented as “relative IFN- α 1 asRNA expression”, which indicates the fold change of the asRNA level relative to that of the control vector. Values are presented as described in the legend to Fig. 5 (C) (** $p < 0.01$). (C) Effects of inhibition of endogenous miR-1270 function on IFN- α 1 asRNA/mRNA expression levels. Locked nucleic acid (LNA)-modified anti-miR-1270 was transfected into Namalwa cells, which were then infected with SeV and harvested for RT-qPCR analyses of relative IFN- α 1 AS (top) and mRNA (bottom) expression, as described above. The relative expressions indicate the fold change of asRNA/mRNA levels relative to those obtained in the mismatch control-transfected, SeV-infected cells. (–) mock transfection. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Figure and legend reproduced with modifications from *Cell. Mol. Life Sci.*, 72 (14), 2749–2761, with permission. (Color figure can be accessed in the online version.)

MRE 領域と microRNA の seed 配列は相補的塩基配列を取るが, asRNA や microRNA が標的 mRNA に実際に作用する場合は, この二次構造中の一本鎖領域に限定される [Fig. 6(A) 参照].

この作用点で形成される RNA:RNA 二本鎖は A フォーム⁵³⁾をとることが知られ, 通常の二本鎖 DNA がとる B フォームやオリゴヌクレオチドと標的 RNA が形成する DNA:RNA 二本鎖が示す A/B フォームと比較し, 二本鎖構造にねじれが生じる結果 minor groove 領域が開大することが知られる (Fig. 8, RNA:RNA と DNA:DNA 又は DNA:RNA の緑色領域を比較のこと).⁵³⁾ すなわち, asRNA が mRNA を認識し, 作用点局所において A フォーム二本鎖が形成されると, minor groove 領域の開大

化を伴う局所コンフォメーションが変化し, mRNA 安定化タンパク質として知られる HuR (the embryonic lethal-abnormal visual protein)⁵⁴⁾の結合増大や, 逆に mRNA の不安定化をもたらす tristetruprolin (TTP)⁵⁵⁾や KH-type splicing regulatory protein (KSRP)⁵⁶⁾の解離が促されるものと考えられる.^{57,58)}

asRNA が認識する mRNA 上の一本鎖領域は通常 10 塩基長以下で構成されるため, 両 RNA 間で形成される二本鎖部分の melting temperature は必然的に低値となり, 結果として A フォーム形成に伴うコンフォメーションの変化は一過性となる. したがって, 一旦上記 RNA 結合タンパク質の結合や解離がもたらされ, 当該 mRNA 分子の安定化が図

Fig. 7. Characterization of MRE-1270s on IFN-α1 asRNA as Well as IFN-α asRNAs and mRNAs

(A) Location of predicted miR-1270 binding sites on IFN-α1 asRNA/exons 0.1 and 1.1. Bioinformatic analysis of miR-1270 binding sequence on IFN-α1 asRNA/exons 0.1 and 1.1 revealed the presence of five highly conserved predicted MRE-1270s (closed triangles). (B), (C) Knockdown effects of endogenous miR-1270 function on the expression levels of IFN-α asRNAs and mRNAs. The LNA-modified anti-miR-1270-transfected Namalwa cells used for the analysis in Fig. 6(C) were analyzed for expression levels of IFN-α asRNAs (B) and mRNAs (C) from the IFN-α multigenic family. The relative expressions indicate the fold change of asRNA/mRNA expression levels relative to those obtained from the LNA mismatch control-transfected cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Figure and legend reproduced with modifications from *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**(14), 2749–2761, with permission.

Fig. 8. Various Types of RNA Duplex Conformations

The classical molecular interaction potential (cMIP) isocontours (-3 kcal/mol) for interactions of an Na^+ probe with three different duplexes are shown.⁵³⁾ The sequence used is the Dickerson dodecamer, 5'-d/r (CGCGAATTCGCG)-3'. RNA:RNA and DNA:DNA duplexes show the A and B forms, respectively. RNA:RNA duplexes may form by hybridization of mRNA with asRNA or miRNA. In contrast, DNA:RNA duplexes have an A/B conformation and may form by hybridization of an oligodeoxynucleotide with RNA. The green zones (minor grooves) indicate exactly where the interaction with Na^+ ions is more favorable than 3 kcal/mol. This reflects different conformations because the Na^+ ions depend on where the negative charges of the backbone point, *i.e.*, toward the minor groove or toward the major groove. Figure reprinted in part with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(11), 3486–3496, Copyright (2008) the American Chemical Society and reproduced from *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **17**, 938–958, with permission.

Fig. 9. Model for an IFN- α Competent Endogenous RNA (ceRNA) Network against miR-1270

Following SeV infection, specific subsets of IFN- α asRNAs (α 1, α 7, α 8, α 10 and α 14) as well as IFN- α mRNAs (α 8, α 10, α 14 and α 17), which share MRE-1270s, form a ceRNA network to titrate away miR-1270 from IFN- α 1 mRNA, allowing for its expression. Several cellular mRNAs, including *CAPRIN1* mRNA, which share MRE-1270s, also participate in the network. Further, upon recognition of the IFN- α 1 mRNA/BSL region, IFN- α 1 asRNA increases the stability of the mRNA.¹⁵⁾ Figure and legend reproduced from *Cell. Mol. Life Sci.*, 72(14), 2749–2761, with permission.

られると、asRNAはこのmRNAから分離し、次に安定化するmRNA分子を求めて、新たに二本鎖を形成すると考えられる(標的mRNA分子を安定化するasRNAのrecycling仮説).²¹⁾

一方、SeV感染細胞に由来する全RNAの単位量あたりに発現するIFN- α 1 asRNAは 1558 ± 82 分子に過ぎなかった。⁴⁸⁾ この1分子あたりに5カ所のMREが分布し、miR-1270発現抑制下にその発現量は3.6倍に増加するので[Fig. 6(C)], IFN- α 1 asRNA全体に存在するMRE-1270数は最終的に28044分子となるが、それでも全RNAの単位量あたりに発現するmiR-1278数の28%に相当するのみであった。⁴⁸⁾ ceRNAがMREを介して対応するmicroRNAを吸着し、標的となるmRNAの発現を担保するためには、全ceRNA分子に存在するMRE数とmicroRNAの分子数比はほぼ1:1である必要がある。⁵⁹⁾

そこで、Fig. 6(C)の実験に用いたantimir-1270導入細胞を再度用いて、内在性miR-1270の発現抑制下に発現量の変化が認められる*IFNA* family遺伝子由来のIFN- α asRNAとmRNAを検討したところ、IFN- α 7, α 8, α 10, α 14 asRNAとIFN- α 8, α 10, α 14, α 17 mRNAの発現が有意に増大することが明らかになった[Figs. 7(B) and (C)]. 加えて、同一試料の解析から、内在性のmiR-1270発現

の抑制下に、細胞固有のmRNAである*CAPRIN1* mRNAを始めとする5種のmRNAの発現量も有意に増加することが確認された。

antimir-1270による内在性のmiR-1270の発現阻害がもたらすIFN- α asRNA/mRNA群並びに*CAPRIN1* mRNAを始めとするmRNA群の発現増大は、mismatch対照と比較し1.7倍から4.3倍に上り、上述のように3.6倍の増加を示したIFN- α 1 asRNAが有するMRE-1270はmiR-1270の28%に相当することを考え合わせ、これらMRE-1270を共有するceRNA群の分子数の合計はmiR-1270分子数に優に匹敵するとみなされた。⁴⁸⁾

以上の結果より、IFN- α 1 asRNAはIFN- α mRNAが形成するCSS二次構造中のBSLドメインを認識し、Recycling仮説に基づきRNA結合タンパク質の誘導や解離によりmRNAの安定化を図るとともに、IFN- α 7, α 8, α 10, α 14 asRNAとIFN- α 8, α 10, α 14, α 17 mRNA並びに*CAPRIN1* mRNAを始めとするmRNA群とceRNAネットワークを形成し、共有するMRE-1270を介してmiR-1270が示す陰性変力作用に拮抗し、IFN- α 1 mRNAの発現を転写後性に増大するとみなされた(Fig. 9)。

3-3. 創薬シーズとしてのIFN- α 1 asRNA機能ドメイン 続いて、IFN- α 1 asRNAのmRNA安定

Fig. 10. *In Vivo* Evaluation of asORN3 against Respiratory Influenza Virus A/Puerto Rico/8/34 (PR/8) Virus Infection

(A) Effect of nasally administered asORN3 on gp (guinea pig) IFN- α 1 asRNA and gpIFN- α 1 mRNA expression levels. PLGA-asORN3 (closed bars) or -ncasORN (open bars) was nasally administered to groups of guinea pigs (four animals per group) 6 h prior to PR/8 virus infection. Half of the guinea pigs that received PLGA-asORN3 were further administered PLGA-asORN3 (grey bars) 18 h after virus infection. The larynx and trachea tissues were collected at various time points ranging from 0 to 48 h after virus infection. The tissue samples were subsequently subjected to strand-specific RT-qPCR analyses for gpIFN- α 1 asRNA (top) and gpIFN- α 1 mRNA (bottom) expression levels. The results are presented as "Mean copy number of gpIFN- α 1 asRNA or mRNA/100 ng of total cellular RNA" $\pm$ S.E.M. of four samples. Representative values of three independent experiments are presented. Error bars cannot be seen if they are smaller than the graph symbols. (B) Effect of nasally administered asORN3 on PR/8 virus proliferation profile. PLGA-asORN3 (closed or grey bars) or PLGA-ncasORN (open bars) was nasally administered. The nasal and tracheal washes were collected at various time points as described in the legend to (A) and were subjected to PR/8 virus titration to monitor the viral proliferation profile in the upper and lower respiratory pathways. The results are presented as "Mean titers ($\times 10^5$ pfu/mL)" $\pm$ S.E.M. of four samples. Representative values of three independent experiments are presented. Figure and legend reproduced with modifications from *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 24, 798–818, with permission.

化ドメインを用いて、抗ウイルス性ヒト自然免疫応答の調節を可能にする創薬の可能性を検討した。

対象疾患には、A 型インフルエンザウイルス (influenza virus A/Puerto Rico/8/34) (PR8 ウイルスと略称) による呼吸器感染症を選択した。呼吸器、特に気道感染症を対象とした理由は、気道局所へのオリゴリボヌクレオチドの送達に使用実績がある Drug Delivery System [poly (D,L-lactide-co-glycolide); PLGA]^{60,61)} が利用可能であったからである。しかしながら、A 型インフルエンザウイルスに対する宿主自然免疫応答を定量的に解析するには、IFN 刺激応答遺伝子中でも *Mx1* 遺伝子を有する動物モデルを選択する必要がある、通常のマウス

は本遺伝子に変異を有するため、この目的の感染実験には不適當であった。⁶²⁾

そこで、*Mx1* 遺伝子をコードすることが知られるモルモット (*Carva porcellus*) を用いることにした。幸いにも、モルモットゲノムの塩基配列は解析済みであったので、ヒト、マウス、ラット *IFNA* 遺伝子との相同性解析からモルモット *IFNA* 遺伝子候補をリストアップし、その中で最も高い抗 PR8 ウイルス活性を示し、かつヒト、マウス、ラット *IFNA1* 遺伝子並びに IFN- α 1 タンパク質との相同性が最大値を示す *IFNA* 遺伝子候補をモルモット *IFNA1* (*gpIFNA1*) 遺伝子とした。⁶²⁾

続いて、型のごとく gpIFN- α 1 asRNA の発現同

定¹⁵⁾及び同 mRNA の発現を安定化する asRNA 上の機能ドメインを決定した。⁶³⁾ 機能ドメインには 2 種類あり、その塩基配列からなるアンチセンスリボオリゴヌクレオチド (asORN) を強制発現すると、gpIFN- α 1 asRNA/mRNA 双方の発現レベルを増大させる場合と、asRNA の発現には影響せず、gpIFN- α 1 mRNA の発現レベルのみを増大させる場合があることが示された。前者の効果は MRE 配列に由来し、後者は mRNA 上の標的配列の直接認識による発現制御の結果であった。⁶³⁾

このうち、MRE 配列ドメインからなる asORN (以下 asORN3 と略称) は、直接認識配列と比較し gpIFN- α 1 mRNA の発現レベルをより高値に誘導した。そこで、asORN3 を上述の PLGA ナノ粒子に包含し、⁶³⁾ PR8 ウイルス感染モルモット気道に吸入投与する proof-of-concept (POC) 実験に供した (Fig. 10)。前述のモルモット培養細胞を用いた機能ドメインをマッピングする実験結果と同様に、MRE 配列ドメインからなる asORN3 は、その投与量に比例して、PR8 ウイルス感染モルモット気道粘膜組織における gpIFN- α 1 asRNA [Fig. 10(A), top] 並びに gpIFN- α 1 mRNA [Fig. 10(A), bottom] の発現レベルを増大させた。この gpIFN- α 1 mRNA 発現の増大は感染局所における抗ウイルス応答を誘導し、asORN3 の投与量に比例してより早期にかつ有意に PR8 ウイルス力価を低下させた。AsORN3 1 回投与群は感染 36 時間後に初めて力価の低下 [Fig. 10(B), solid bar; $p < 0.05$] を示したのに対し、2 回投与群は感染 24 時間後に既に力価の低下を示し [Fig. 10(B), grey bar; $p < 0.05$]、感染 36 時間後にはより有意なウイルス力価の低下を生じた ($p < 0.01$)。

以上のモルモットモデル動物を用いたウイルス感染実験より、IFN- α 1 asRNA 上の mRNA 発現制御ドメインは感染局所において有効な抗ウイルス自然免疫応答を誘導し、対照動物と比較し、より有意な感染力価の低下をもたらすことが証明された。⁶³⁾ 以上の結果は、制御性 RNA が示す標的 mRNA の発現調節効果が、生体内において有効な生物活性の誘導を可能にすることを示し、将来の創薬シーズとして検討に値すると考えられた。

4. 結論

近年に至るまで、RNA はゲノム DNA がコード

するタンパク質情報を細胞質において発現するための blueprint と位置付けられていた。^{64,65)} しかしながら、ヒトゲノムプロジェクトに引き続く ENCODE プロジェクトの結果、ゲノムにおける遺伝子領域はわずか 3% 足らずにすぎないにもかかわらず、全ゲノム領域の 75% 相当が転写されていることが明らかにされた。^{18,19)} さらに、タンパク質情報をコードしない多くの ncRNA には、遺伝子の発現を制御する制御性 RNA としての機能が賦与されていることが明らかになり、タンパク質を発現するための blueprint とみなされていた RNA の概念を根底から崩すことになった。

これら ncRNA、中でも lncRNA が制御性 RNA として示す遺伝子発現調節作用には、エピジェネティック制御から転写制御、転写後性制御、さらには翻訳並びに翻訳後性制御に至るまで多岐にわたることが知られており、これは lncRNA がシャペロンとしてそれぞれの制御効果に係わる RNA 結合タンパク質を標的分子にもたらす結果と考えられる。^{12,66)}

本総説では、この lncRNA の中でも NAT を例にとり、標的 mRNA の転写後性発現制御効果の分子作用機序と、その機能ドメインが生体において有意な生物効果を誘導することを解説した。NAT を始めとする lncRNA が示す遺伝子発現調節効果は多岐にわたり、その発現の変調ががんの発症や心血管疾患を始め、多数の疾病に影響を及ぼすことは今や周知となっている。^{67,68)} 今後、本領域の研究が生物学、生理学のあらたな知見の創出につながり、疾病治療と予防に貢献することを切に願う。

謝辞 これまで、RNA ウイルスの宿主細胞への侵入に始まり、HIV-1 調節遺伝子、RNA の核外輸送、制御性 RNA と、その時々で主題は変えたものの、一貫して RNA に係わる研究を進めてきた。これらの研究を実施するにあたっては、無論私一人では力及ばず、その時々共同研究者の方々の協力を仰ぐとともに、立命館大学に異動してからは研究室のスタッフや学生諸君とともに汗を流した。稿を終えるにあたり、協力頂いたすべての方々に感謝します。特に、関西医科大学医学部微生物学講座の橋本岩雄博士には、長年にわたり特別な協力を得て、数々の共同研究を行うことができました。ここに、

深く感謝致します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Kimura T., Gollins S. W., Porterfield J. S., *J. Gen. Virol.*, **67**, 2423–2433 (1986).
- 2) Kimura T., Ohyama A., *J. Gen. Virol.*, **69**, 1247–1254 (1988).
- 3) Kimura T., Ohyama A., *J. Biochem.*, **115**, 945–952 (1994).
- 4) Mann D. A., Mikaélían I., Zemmell R. W., Green S. M., Lowe A. D., Kimura T., Singh M., Butler P. J., Gait M. J., Karn J., *J. Mol. Biol.*, **241**, 193–207 (1994).
- 5) Fornerod M., Ohno M., Yoshida M., Mattaj I. W., *Cell*, **90**, 1051–1060 (1997).
- 6) Kimura T., Hashimoto I., Nishikawa M., Fujisawa J. I., *Biochimie*, **78**, 1075–1080 (1996).
- 7) Kimura T., Hashimoto I., Nishikawa M., Yamada H., *Med. Mol. Morphol.*, **42**, 70–81 (2009).
- 8) Kimura T., Hashimoto I., Yamamoto A., Nishikawa M., Fujisawa J. I., *Genes Cells*, **5**, 289–307 (2000).
- 9) Nagai-Fukutaki M., Ohashi T., Hashimoto I., Kimura T., Hakata Y., Shida H., *Genes Cells*, **16**, 203–216 (2011).
- 10) Tamura S., Shiomi A., Kaneko M., Ye Y., Yoshida M., Yoshikawa M., Kimura T., Kobayashi M., Murakami N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2555–2557 (2009).
- 11) Hashimoto I., Kimura T., Nishikawa M., Fujisawa J.-I., *Acta Histochem. Cytochem.*, **30**, 617–621 (1997).
- 12) Matsui K., Nishizawa M., Ozaki T., Kimura T., Hashimoto I., Yamada M., Kaibori M., Kamiyama Y., Ito S., Okumura T., *Hepatolgy*, **47**, 686–697 (2008).
- 13) Kimura T., Hashimoto I., Nagase T., Fujisawa J., *J. Cell Sci.*, **117**, 2259–2270 (2004).
- 14) Kimura T., Hashimoto I., Nishizawa M., Ito S., Yamada H., *Med. Mol. Morphol.*, **43**, 145–157 (2010).
- 15) Kimura T., Jiang S., Nishizawa M., Yoshigai E., Hashimoto I., Nishikawa M., Okumura T., Yamada H., *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 1451–1467 (2013).
- 16) ENCODE Project Consortium, Birney E., Stamatoyannopoulos J. A., Dutta A., *et al.*, *Nature*, **447**, 799–816 (2007).
- 17) Brown T. A., “Genomes,” Wiley-Liss, Oxford, 2002.
- 18) ENCODE Project Consortium, *Nature*, **489**, 57–74 (2012).
- 19) Djebali S., Davis C. A., Merkel A., *et al.*, *Nature*, **489**, 101–108 (2012).
- 20) Derrien T., Johnson R., Bussotti G., *et al.*, *Genome Res.*, **22**, 1775–1789 (2012).
- 21) Jadhaliha M., Gholamalamdari O., Tang W., Zhang Y., Petracovici A., Hao Q., Tariq A., Kim T. G., Holton S. E., Singh D. K., Li X. L., Freier S. M., Ambs S., Bhargava R., Lal A., Prasanth S. G., Ma J., Prasanth K. V., *PLoS Genet.*, **14**, e1007802 (2018).
- 22) Kopp F., Mendell J. T., *Cell*, **172**, 393–407 (2018).
- 23) Eggleston A. K., Eccleston A., Marte B., Lupp C., *Nature*, **482**, 321 (2012).
- 24) Gerstein M. B., Bruce C., Rozowsky J. S., Zheng D., Du J., Korbel J. O., Emanuelsson O., Zhang Z. D., Weissman S., Snyder M., *Genome Res.*, **17**, 669–681 (2007).
- 25) Jia H., Osak M., Bogu G. K., Stanton L. W., Johnson R., Lipovich L., *RNA*, **16**, 1478–1487 (2010).
- 26) Mighell A. J., Smith N. R., Robinson P. A., Markham A. F., *FEBS Lett.*, **468**, 109–114 (2000).
- 27) Pei B., Sisu C., Frankish A., Howald C., Habegger L., Mu X. J., Harte R., Balasubramanian S., Tanzer A., Diekhans M., Reymond A., Hubbard T. J., Harrow J., Gerstein M. B., *Genome Biol.*, **13**, R51 (2012).
- 28) Zhang Z. D., Frankish A., Hunt T., Harrow J., Gerstein M., *Genome Biol.*, **11**, R26 (2010).
- 29) Nishikimi M., Fukuyama R., Minoshima S., Shimizu N., Yagi K., *J. Biol. Chem.*, **269**, 13685–13688 (1994).
- 30) Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V., *Cell*, **75**, 843–854 (1993).
- 31) Wightman B., Ha I., Ruvkun G., *Cell*, **75**, 855–862 (1993).
- 32) Huang Z., Shi J., Gao Y., Cui C., Zhang S., Li J., Zhou Y., Cui Q., *Nucleic Acids Res.*

- 47, D1013–D1017 (2019).
- 33) Han Y. J., Ma S. F., Yourek G., Park Y. D., Garcia J. G., *FASEB J.*, **25**, 2305–2312 (2011).
- 34) Guo X., Zhang Z., Gerstein M. B., Zheng D., *PLoS Comput. Biol.*, **5**, e1000449 (2009).
- 35) Poliseno L., Salmena L., Zhang J., Carver B., Haveman W. J., Pandolfi P. P., *Nature*, **465**, 1033–1038 (2010).
- 36) Tam O. H., Aravin A. A., Stein P., Girard A., Murchison E. P., Cheloufi S., Hodges E., Anger M., Sachidanandam R., Schultz R. M., Hannon G. J., *Nature*, **453**, 534–538 (2008).
- 37) Brown C. J., Hendrich B. D., Rupert J. L., Lafrenière R. G., Xing Y., Lawrence J., Willard H. F., *Cell*, **71**, 527–542 (1992).
- 38) Cerase A., Pintacuda G., Tattermusch A., Avner P., *Genome Biol.*, **16**, 166 (2015).
- 39) da Rocha S. T., Heard E., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 197–204 (2017).
- 40) Tsai M. C., Manor O., Wan Y., Mosammaparast N., Wang J. K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H. Y., *Science*, **329**, 689–693 (2010).
- 41) Zhao J., Sun B. K., Erwin J. A., Song J. J., Lee J. T., *Science*, **322**, 750–756 (2008).
- 42) Zhao Y., Sun H., Wang H., *Cell Biosci.*, **6**, 45 (2016).
- 43) Naganuma T., Nakagawa S., Tanigawa A., Sasaki Y. F., Goshima N., Hirose T., *EMBO J.*, **31**, 4020–4034 (2012).
- 44) Lee J. T., *Science*, **338**, 1435–1439 (2012).
- 45) Gong C., Maquat L. E., *Nature*, **470**, 284–288 (2011).
- 46) Yoon J. H., Abdelmohsen K., Srikantan S., Yang X., Martindale J. L., De S., Huarte M., Zhan M., Becker K. G., Gorospe M., *Mol. Cell*, **47**, 648–655 (2012).
- 47) Ulitsky I., Bartel D. P., *Cell*, **154**, 26–46 (2013).
- 48) Kimura T., Jiang S., Yoshida N., Sakamoto R., Nishizawa M., *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 2749–2761 (2015).
- 49) Salmena L., Carracedo A., Pandolfi P. P., *Cell*, **133**, 403–414 (2008).
- 50) Salmena L., Poliseno L., Tay Y., Kats L., Pandolfi P. P., *Cell*, **146**, 353–358 (2011).
- 51) Bartel D. P., *Cell*, **136**, 215–233 (2009).
- 52) Hendrix D. K., Brenner S. E., Holbrook S. R., *Q. Rev. Biophys.*, **38**, 221–243 (2005).
- 53) Noy A., Luque F. J., Orozco M., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3486–3496 (2008).
- 54) Brennan C. M., Steitz J. A., *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 266–277 (2001).
- 55) Fechir M., Linker K., Pautz A., Hubrich T., Förstermann U., Rodriguez-Pascual F., Kleinert H., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 2148–2161 (2005).
- 56) Linker K., Pautz A., Fechir M., Hubrich T., Greeve J., Kleinert H., *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4813–4827 (2005).
- 57) Nishizawa M., Ikeya Y., Okumura T., Kimura T., *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **20**, 1–36 (2015).
- 58) Nishizawa M., Okumura T., Ikeya Y., Kimura T., *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **17**, 938–958 (2012).
- 59) Ala U., Karreth F. A., Bosia C., Pagnani A., Taulli R., Léopold V., Tay Y., Provero P., Zecchina R., Pandolfi P. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7154–7159 (2013).
- 60) Tahara K., Sakai T., Yamamoto H., Takeuchi H., Hirashima N., Kawashima Y., *Int. J. Pharm.*, **382**, 198–204 (2009).
- 61) Yamamoto H., Kuno Y., Sugimoto S., Takeuchi H., Kawashima Y., *J. Control. Release*, **102**, 373–381 (2005).
- 62) Jiang S., Sakamoto R., Kimura T., *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **24**, 790–797 (2019).
- 63) Sakamoto R., Jiang S., Tsukada Y., Tsujimoto H., Kimura T., *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, **24**, 798–818 (2019).
- 64) Crick F., *Nature*, **227**, 561–563 (1970).
- 65) Crick F. H., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 138–163 (1958).
- 66) Akimitsu N., *Seikagaku*, **87**, 385–388 (2015).
- 67) Beermann J., Piccoli M. T., Viereck J., Thum T., *Physiol. Rev.*, **96**, 1297–1325 (2016).
- 68) Gutschner T., Diederichs S., *RNA Biol.*, **9**, 703–719 (2012).