

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18550158  
 研究課題名（和文） 細胞質局在化コンジュゲート siRNA による遺伝子発現制御  
 研究課題名（英文） Control of genetic expression by conjugate siRNA delocalized in cytoplasm

研究代表者 藤井政幸（FUJII MASAYUKI）  
 近畿大学・産業理工学部・教授  
 研究者番号：60199297

## 研究成果の概要：

- オリゴ DNA/RNA に任意の配列, 組成を持つペプチドをコンジュゲートすることに成功した。
- オリゴ DNA に SV40 ラージ T 抗原由来の核局在化シグナルペプチドをコンジュゲートさせ, ヒト白血病細胞由来の株化細胞に対して細胞内への取り込みを共焦点走査型顕微鏡により観察したところ細胞核へ局在化していることが認められた。
- オリゴ DNA-核局在化シグナルコンジュゲートにより, ヒト白血病細胞に発現するテロメラーゼを強く阻害することに成功した。
- オリゴ DNA および siRNA に HIV-1 rev タンパク由来核外輸送シグナルペプチドをコンジュゲートさせ, ヒト白血病細胞由来の株化細胞に対して細胞内への取り込みを共焦点走査型顕微鏡により観察したところ細胞質内へ局在化していることが認められた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学

## 1. 研究開始当初の背景

オリゴ DNA/RNA を用いる遺伝子ノックダウン法 (siRNA 法, アンチセンス法, アンチジー

ン法, DNA/RNA エンザイム法) は, 特定の病原遺伝子を標的とした疾病の治療法として, また, 未知遺伝子の機能解明のためのツール

として、医学、分子生物学上大きな注目を集めている。ゲノム医療、ポストゲノム研究のための基盤技術として、細胞に効率よく導入でき、特定の遺伝子のみを持続的に強力にノックダウンする技術の開発が急務である。

## 2. 研究の目的

申請者はすでに独自に開発した固相フラグメント縮合法を用いてオリゴ DNA/RNA にシグナルペプチドなどの様々な機能を持った生体分子をコンジュゲートすることにより、オリゴ DNA/RNA を効率よく細胞内に導入し、しかも、その細胞内での局在化を制御できる手法の開発に成功している。また、この技術によりヒト白血病細胞中のテロメラーゼを1週間にわたり 99.5%以上の効率でノックダウンできることを明らかにしている。

本研究では、この技術をさらに発展させオリゴ DNA/RNA の細胞核内、細胞質、ミトコンドリアへの選択的輸送を制御し、それぞれ、遺伝子 DNA, mRNA, ミトコンドリア mRNA を標的とした高効率遺伝子ノックダウン法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 固相フラグメント縮合法の拡張とマルチコンジュゲート DNA の合成

オリゴ DNA の 5' -末端, 3' -末端, 中間など複数の位置に機能性分子を結合させたマルチコンジュゲート DNA の合成法を確立する。DNA/RNA 自動合成機により合成されたオリゴ DNA を用いてコンジュゲート体を作成する。化合物の分離は逆相 HPLC を, 同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行う。

### (2) オリゴ DNA/RNA の核内への選択的局

### 在化

HIV-1 tat タンパク, ショウジョウバエホメオボックスタンパク, インフルエンザウイルス核タンパクなどに由来する各種核局在化シグナルペプチドをオリゴ DNA の様々な位置にコンジュゲートし, 細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。最も効率の高いペプチドを探索する。

### (3) オリゴ DNA/RNA の細胞質内への選択的局在化

HIV-1 rev タンパク, PKI・タンパク, MAPKK タンパクなどに由来する各種核外輸送シグナルペプチドをオリゴ DNA の様々な位置にコンジュゲートし, 細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。最も効率の高いペプチドを探索する。

### (4) オリゴ DNA/RNA のミトコンドリアへの選択的局在化

オリゴ DNA-ミトコンドリア輸送シグナルペプチドをコンジュゲートし, 細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。最も効率の高いペプチドを探索する。

### (5) 導入効率, 細胞内での分解酵素耐性の向上

細胞導入効率向上のためにはウイルス由来の膜融合ペプチド, 人工両親媒性ペプチド, 脂質をコンジュゲートし, 細胞内分解酵素耐性の向上のためにはスペルミン, グルコサミン, ガラクトサミンなどをコンジュゲートし, 評価する。細胞導入効率は共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。分解酵素耐性は血清中での安定

性を逆相 HPLC 分析により追跡する。

(6) 細胞質内での高効率アンチセンスノックダウン法の開発  
シグナルペプチドやポリアミン、糖をコンジュゲートしたアンチセンスオリゴ DNA によりヒト白血病細胞に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたアンチセンス阻害活性を評価する。mRNA をターゲットとするアンチセンス法においてその局在化と阻害活性との相関を明らかにする。チロシンキナーゼタンパクの発現量は蛍光標識抗体法を利用し、マイクロプレートリーダーにより定量する。細胞導入効率、細胞内分解酵素を高めることにより細胞系外から導入して効率の高い DNA エンザイムを創製する。

#### 4. 研究成果

(1) 当グループが開発した固相フラグメント縮合法を応用して、センス鎖およびアンチセンス鎖の5'-末端にHIV-1 Revタンパク質由来核外輸送シグナルペプチドおよびTF3A由来核外輸送シグナルペプチドをコンジュゲートしたsiRNAを合成することに成功した。

(2) 合成したコンジュゲートsiRNAの細胞膜透過性、分解酵素耐性を従来のRNAi法と比較したところ、分解酵素耐性においては著しい向上が見られた。細胞膜透過性については細胞導入剤を用いない場合には従来法と同様に細胞膜透過性は見られなかった。

(3) 合成したコンジュゲートsiRNAを用いてヒト慢性骨髄性白血病細胞に発現するbcr/abl (P210) 遺伝子mRNAを標的としてノックダウン効果を評価したところ、従来法では60%程度の効果しか見られなかったが、本方

法では最高95%の効率で遺伝子発現を抑制することに成功した。

(4) 固相フラグメント縮合法により5'-末端にHIV-1Tatタンパク質由来核局在化シグナルペプチドをコンジュゲートしたアンチ遺伝子オリゴヌクレオチドを合成することに成功した。

(5) 合成したコンジュゲートアンチ遺伝子オリゴヌクレオチドを用いてヒト慢性骨髄性白血病細胞に発現するbcr/abl (P210) 遺伝子DNAを標的としてノックダウン効果を評価したところ、従来法と同様に顕著な遺伝子発現抑制効果は見られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Recognition of the base pair-mimic nucleosides by DNA polymerase. Shu-ichi Nakano, Yuuki Uotani, YTuichi Sato, Hirohito Oka, Kazuya Uenishi, Masayuki Fujii and Naoki Sugimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2006**, 50, 201-202. 査読なし

(2) Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotide-Peptide Conjugates by Solid Phase Fragment Condensation. Irmina Diala, Akira Osada, Shinji Maruoka, Takashi Imanisi, Satoshi Murao, Taishi Ato, Hideki Ohba and Masayuki Fujii, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17 (23), 6576-6578. 査読あり

(3) The base-pairing ability if the base pair-mimic nucleosides. Shu-ichi Nakano, Kazuya Uenishi, Masayuki Fujii and Naoki Sugimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2007**, 51,

71-72. 査読なし

(4) Functionalization of DNA by the base pair-mimic nucleosides. Hirohito Oka, Shu-ichi Nakano, Yuuki Uotani, Kazuya Uenishi Masayuki Fujii and Naoki Sugimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2007**, 51, 151-152. 査読なし

(5) Suppression of bcr-abl mRNA by Chemically Modified siRNA. Satoshi Murao, Irmina Diala, Masayuki Fujii, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2008**, 52, 499-500. 査読なし

(6) Antisense Inhibition of Human Telomerase by Phosphorothioate Oligonucleotide-Peptide Conjugates. Irmina Diala, Satoshi Murao, Masayuki Fujii, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2008**, 52, 679-680. 査読なし

[学会発表] (計 13 件)

(1) 新規多価陽イオン遺伝子導入剤. 高須奏江、土井佳子、清水政道、原口正人、明日山康生、大庭英樹、藤井政幸、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム、福岡、平成18年5月18-19日

(2) 新規芳香族性多価陽イオン遺伝子導入剤. 徳都、上園由希子、大上博子、岩本友樹、高須奏江、土井佳子、清水政道、原口正人、明日山康生、大庭英樹、藤井政幸、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム、福岡、平成18年5月18-19日

(3) 陽イオン性新規遺伝子導入剤の開発. 高須奏江、土井佳子、清水政道、原口正人、明日山康生、大庭英樹、藤井政幸、第43回化学関連支部合同九州大会、北九州、平成18年7月8日

(4) 芳香族陽イオン性新規遺伝子導入剤の

開発. 大上博子、土井佳子、清水政道、原口正人、明日山康生、大庭英樹、藤井政幸、第43回化学関連支部合同九州大会、北九州、平成18年7月8日

(5) 多価陽イオン性新規遺伝子導入剤の開発. 岩本友樹、土井佳子、清水政道、原口正人、明日山康生、大庭英樹、藤井政幸、第43回化学関連支部合同九州大会、北九州、平成18年7月8日

(6) 芳香族多価陽イオン性新規遺伝子導入剤の開発. 徳都、土井佳子、清水政道、原口正人、明日山康生、大庭英樹、藤井政幸、第43回化学関連支部合同九州大会、北九州、平成18年7月8日

(7) Specific Suppression of Bcr/abl Gene in Human Cells by synthetic DNA Enzymes. Kengo Takamori, Takanori Kubo, Hideki Ohba and Masayuki Fujii, The Fukuoka Symposium, New Horizon of Natural Product and Biological Chemistries, Fukuoka, 2006 July 30-31

(8) Synthesis, Controlled Delivery and Antisense Effects of Oligonucleotide-Peptide Conjugates. Masamichi Shimizu, Keiko Doi, Taishi Ato, Irmina Diala, Masato Haraguchi, Mari Watanabe, Yasuo Akebiyama, Takanori Kubo, Bakarova Rumiana, Zhivko Zhelev, Hideki Ohba, Masayuki Fujii, 膜透過ペプチド国際ミニシンポジウム、京都、平成18年11月10-11日

(9) Antisense Inhibition of Human Telomerase by Phosphorothioate Oligonucleotide-Peptide Conjugates. Akira Osada, Masamichi Shimizu, Irmina Diala, Keiko Doi, Masato Haraguchi, Mari Watanabe, Yasuo Akebiyama, Takanori Kubo, Bakalova Rumiana, Zhivko Zhelev, Hideki

Ohba, Masayuki Fujii, 第 16 回アンチセンスシンポジウム、京都、平成 18 年 11 月 27-28 日

(10) 細胞内精密デリバリー制御のための DNA/RNA-ペプチドコンジュゲートの合成. 阿藤高志、原口正人、渡辺真理、松木園美穂、明日山康夫、丸岡慎治、今西高司、長田聡、Diala Irmina、村尾聡、大庭英樹、藤井政幸、遺伝子・デリバリー研究会第 7 回シンポジウム、東京、平成 19 年 5 月 18 日

(11) アンチセンスペプチド-DNA コンジュゲートによるテロメラーゼ阻害. Irmina Diala, 村尾 聡, 藤井 政幸, 第 45 回化学関連支部合同九州大会、北九州、平成 20 年 7 月 5 日

(12) 鎖交換による遺伝子変異検出法. 大上博子, 岡本 小百合, 村尾 聡, 藤井 政幸, 第 45 回化学関連支部合同九州大会、北九州、平成 20 年 7 月 5 日

(13) Antisense inhibition of human telomerase by Phosphorothioate oligonucleotide-peptide conjugates. Irmina Diala, Satoshi Murao, Masayuki Fujii, XVIII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, Kyoto, 8-12, September 2008

(14) Suppression of bcr/abl mRNA by chemically modified siRNA. Satoshi Murao, Irmina Diala, Masayuki Fujii, XVIII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, Kyoto, 8-12, September 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井政幸 (MASAYUKI FUJII)  
近畿大学・産業理工学部・教授  
研究者番号：60199297

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし