

平成21年6月5日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19550164
 研究課題名(和文) 蛍光プローブによる機能性RNAの細胞内リアルタイム検出ならびに制御法の開発
 研究課題名(英文) Developments of *in situ* real-time monitoring system by fluorescent-probe and regulation protocols of functional RNAs
 研究代表者
 村上 章 (MURAKAMI AKIRA)
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
 研究者番号：60210001

研究成果の概要：

ヒトゲノムプロジェクトが明らかにした「RNA World」は、機能未知のRNAの存在を浮かび上がらせた。これらRNAの機能の解明は21世紀の生命科学の重要な課題である。本研究では独自開発した核酸分子素子を用い、機能性RNAを生細胞内で検出する手法開発ならびに特定のRNAの機能を選択的に制御する手法の開発を行った。その結果、生細胞内で特定のRNAの*in situ*検出に成功すると共に、1塩基変異を持つRNAの選択的機能制御に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：(1) バイオテクノロジー (2) 遺伝子 (3) 核酸 (4) 細胞・組織
 (5) RNAプローブ

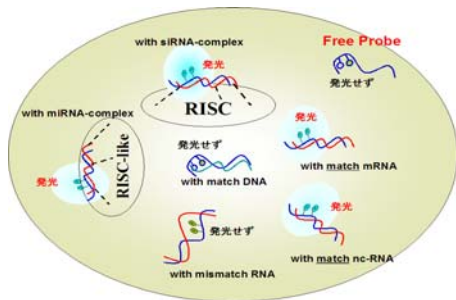
1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトが明らかにした「RNA World」は、機能未知のRNAの存在を浮かび上がらせた。これらRNAの機能の解明は21世紀の生命科学の重要な課題である。RNAの機能解析はcDNA作製とそれに引き続くDNAチップ解析により大巾に進展した。しかし、生細胞内での機能解析の手法開発は、RNAを特異的に検出するプローブの開発が遅れていることから進んでいない。一方、mRNAの翻訳機能制御に基づく病気治療法(アンチセンス法)開発は着実に進展しており、既に数

十例を超す臨床試験が主に米国で進んでいる。また、タンパク質をコードしない数多くのRNA(non-code RNA:ncRNA)の存在も明らかになりそれらRNAもアンチセンス法の対象となり、その生理的意味の重要性が指摘されている。従って生体におけるncRNAの機能の全体像は今後の最重要課題である。しかし、生細胞中で特定のRNAをリアルタイムに検出し、その機能を解明し、必要とあれば制御するような研究の展開を行う手法は未だに確立されていない。

2. 研究の目的

細胞内で DNA から転写される RNA は mRNA、tRNA、rRNA の他に、相当量の non-codingRNA (ncRNA) が存在することが明らかにされた。ncRNA は発生や細胞の分化に重要な役割を果たすなど、生命の根幹にかかわる物質として今後の生命関連科学研究の重要なターゲットである。ncRNA としては siRNA、miRNA などが代表例であり、特に shRNA はマウス遺伝子のノックアウトに効果的であるのと同時に、miRNA の急激な減少を引き起こすことによる致死性も報告されている。従って、細胞内の特定の RNA を検出し、その生体における機能を解析し、最終的にはその機能の抑制や促進を行うことは、がんや原因が特定できていない疾患の発症機構解明や治療、さらには再生医療につながる重要な課題である。本研究は生細胞内 RNA のリアルタイム検出とその情報に基づく RNA 機能制御原理の確立を目的とした (図 1)。



細胞内 RNA のリアルタイムイメージングの概略図

3. 研究の方法

(1) ピレン誘導体導入ヌクレオシドの開発

本申請研究で用いる RNA プロブの蛍光性物質はピレン誘導体であり、ヌクレオシドリボースの 2'-水酸基にメチレン基を介して導入した。導入するヌクレオシドにはウリジンとシチジンをを用いている。このピレン修飾ウリジン並びにシチジンをオリゴヌクレオチド中に 1 分子あるいは複数分子組み込んで RNA プロブとした。プロブの発光極大はそれぞれ 384nm あるいは 480nm 付近であり、目的に応じて使い分けた。前者は無細胞系で感度を重視する場合に用い、生細胞内の対象 RNA 検出には可視蛍光が必須であるため、後者の発光極大を有するピレン 2 分子導入型プロブを用いた。これらの結果より、新たなピレン導入ヌクレオシドの分子設計を行い、プロブの性能向上 (蛍光発光効率、RNA 認識能等) を図った。

(2) RNA プロブの配列決定

細胞の内外にかかわらず RNA は一般的に複雑な高次構造を有するため、設計したプロブが高次構造に阻害され、RNA に結合できない可能性がある。そこで本研究では、申請者が開発した、「RNA の配列のうち一本鎖領域にある確率を、RNA の高次構造予測結果と熱力学的パラメーターを併用して求めるアルゴリズム」を用いて算出した。

(3) プロブの基本骨格の最適化

RNA プロブは目的・経路に応じてその骨格を改変する必要があるため、以下の骨格構造改変を実施し、RNA プロブの最適化を図った。この際、RNA プロブと対象 RNA とのハイブリッドが RNase H の基質とならないように留意した。その他以下の項目にも留意した。

- RNA とのハイブリッド安定性向上
- 細胞内安定性の向上
- 細胞膜透過性の向上

これらの条件を満たすために、RNA プロブの 3' 末端、5' 末端に数個のホスホロチオエート結合型オリゴヌクレオチドの導入、さらには架橋型ヌクレオチド (ENA) の導入を行った。

(4) 微量試料を用いた RNA の選択的検出

微量細胞からの RNA を含む微量の溶液を用い、マイクロ流路 (50 μ m \times 50 μ m \times 20mm) カラムでの RNA 検出能を蛍光顕微鏡下で実施した。

(5) 生細胞を用いた mRNA のデリバリー原理の確立

RNA プロブの細胞内移行性を下記の観点から蛍光顕微鏡により評価した。

- RNA プロブは細胞膜親和性に大きく影響するホスホロチオエート型結合を有するオリゴヌクレオチドを採用した。
- 天然型リン酸ジエステル結合を持つ RNA プロブを用いて、既存のドラッグデリバリー試薬 (カチオン性リポソーム型) の有効性を検証した。
- RNA プロブの細胞内導入態様の考察とプロブの RNA 検出能の評価を行った。

(6) がん細胞内在性 mRNA の検出

子宮頸がん細胞から全 RNA を抽出し、生化学的手法により mRNA の検出を試みた。RNA プロブの配列は既報配列に基づいて決定した。無細胞系、細胞固定系では高次構造が破壊されていることからどの配列でも RNA プロブは結合可能である。細胞系では、mRNA のループ部位に対する配列を選択した。ループ部位に対する本 RNA プロブの RNA との結合に伴う蛍光を観測し、また、一塩基ミスマッチ RNA を対象とした系でも検証した。

(7) 光アンチセンス法による mRNA の機能制御の試行

mRNA の配列を 1 塩基の違いまで認識できるアンチセンス核酸 (光架橋性オリゴヌクレオ

チド)を開発し、それを用いて mRNA の1塩基変異を識別して細胞増殖制御が可能か否かを検証した。

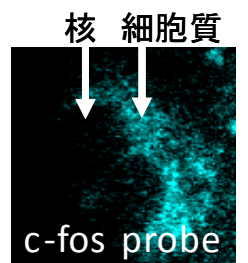
4. 研究成果

3. での研究目的のため、以下の項目の研究を実施した。成果を以下に示す。

【1】RNA特異的RNAプローブの分子設計：本研究では、2'位にピレンを有するヌクレオチドと市販の架橋型ヌクレオシド(ENA)とを構成成分とする蛍光RNAプローブ(プローブI)、ならびに2'位にピレンを有するヌクレオチドとホスホロチオエート型ヌクレオチドを含むキメラ型蛍光RNAプローブ(プローブII)を開発した。対象RNAの配列情報から、代表者らが開発したRNA 2次構造予測アルゴリズムを用いて対象RNA中の1本鎖領域を予測し、RNAプローブの配列を決定した。

【2】蛍光RNAプローブの蛍光特性評価：プローブIを用い、均一水溶液中で特定のmRNA検出を試み、高感度、高精度で対象RNAの検出に成功した。この際、類似配列を持ちながら1塩基のみ変異したRNAを高感度かつ定量的に他と識別して検出することが出来た。将来の医療応用(SNP検出、DNA判定)に展望を見いだした。

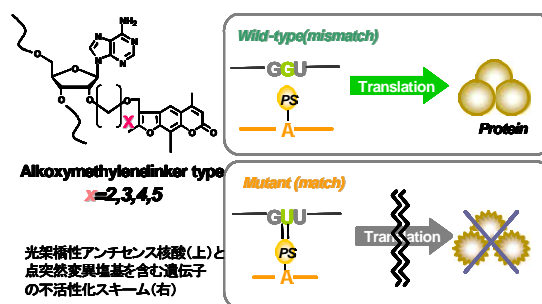
【3】細胞内在性RNAの検出：培養ガン細胞をモデルとし、外部刺激に応答する遺伝子群(*c-fos*, *c-jun*) mRNAをプローブIIにより検出することを試みた。その結果、外部刺激に応答する形で産生されるRNAの検出に成功した(下図)。



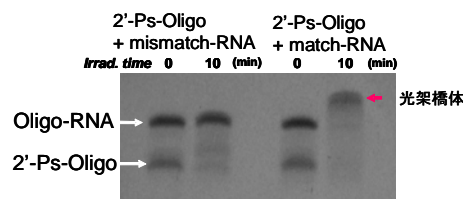
ピレン法によるガン細胞中の*c-fos*-mRNAのリアルタイムイメージング例(疑似カラー)

【4】光増感型アンチセンス核酸の効果：2'位にソラレン誘導体を含むアンチセンス核酸を設計し(右上図)、*ras*遺伝子に一塩基異常のあるガン細胞の光増感型増殖制御を試みた。その結果、異常塩基を含むオリゴヌクレオチドと選択的に架橋したこと(右下図)、またその変異遺伝子を含む細胞の増殖のみを選択的に制御することに成功した。

以上の結果は代表者らが開発した蛍光性RNAプローブが塩基配列を厳密に認識して検出出来ること、ならびに細胞内在性RNAを *in*



光架橋性(光増感型)アンチセンス核酸の構造と作用原理図



光架橋性アンチセンス核酸の選択的架橋反応

*situ*リアルタイムにモニターすることができると、言い換えればトランスクリプトーム解析が可能であることを示唆している。さらに、一塩基異常に関する情報に基づき、それら遺伝子を含むがん細胞の効果的増殖制御法の開発に道筋が付けられたと言える。

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10件)

(1) Kobori A., Takaya T., Higuchi M., Yamayoshi A., Murakami A., Synthesis and Photo-induced Cross-linking Reactions of 4,5',8-Trimethyl-psoralen-incorporated Oligodeoxyribonucleotide. *Chemistry Lett.*, 38, 272-273, 2009 (査読有り)

(2) Higuchi M., Kobori A., Yamayoshi A., Murakami A. Synthesis of antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralenyl-methoxyalkyl adenosine for photodynamic regulation of point mutations in RNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 475-483, 2009. (査読有り)

(3) Sakamoto T., Kobori A., Murakami A. Microarray-based label-free detection of RNA using bispyrene-modified 2'-O- methyloligoribonucleotide as capture and detection probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 2590-2593, 2008. (査読有り)

(4) Kobori A., Mori T., Ubayashi M., Murakami A. Naphthyridine-tethered Oligodeoxyribonucleotides: Dye/DNA conjugates for Homogeneous SNPs Assays. *Chem. Lett.*, 37,

354-355, 2008. (査読有り)

(5) Yokokawa R., Tamaoki S., Sakamoto T., Murakami A., Sugiyama S. Transcriptome analysis device based on a liquid phase detection by fluorescently labeled nucleic acid probes. *Biomedical Microdevices*, 9, 869-875, 2007. (査読有り)

(6) Sakamoto T., Kobori A., Shigesawa M., Amitani Y., Higuchi M., Murakami A. Homogeneous fluorescence assays for RNA-diagnosis by pyrene-conjugated 2'-O-methyloligoribonucleotides. *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids*, 26, 1659-1664, 2007. (査読有り)

(7) Yamada M., Hashimoto T., Hayashi H., Higuchi M., Murakami A., Nakashima T., Maekawa S., Miyata S. Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization. *Brain Research*, 1165, 5-14, 2007 (査読有り)

(8) Yamayoshi A., Kato K, Suga S., Ichinoe A., Arima T., Matsuda T., Kato H., Murakami A., Wake N. Specific apoptosis induction in human papillomavirus-positive cervical carcinoma cells by photodynamic antisense regulation. *Oligonucleotides*, 17, 66-79, 2007. (査読有り)

(9) Higuchi M., Yamayoshi A., Yamaguchi T., Iwase T., Yamaoka T., Murakami A., Selective photo- cross-linked of 2'-O-psoralen-conjugated oligo- nucleotide with RNAs having point mutations. *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids*, 26, 277-290, 2007 (査読有り)

(10) Munaka T., Abe H., Kanai M., Sakamoto T., Nakanishi H., Shoji S., Kimura S., Maekawa T., Murakami A., Real-time monitoring of antibody secretion from B-cells on a microchip stimulated with a minute amount of mitogen, *The Analyst*, 132, 512-514, 2007 (査読有り)

[学会発表] (計39件)

(1) 高屋和孝、樋口麻衣子、小堀哲生、山吉麻子、村上 章：光架橋性塩基を有する人工核酸の合成とその機能評価：日本化学会第89春季年会：2009年3月27日：船橋市

(2) 上田貴子、脇玲子、山吉麻子、小堀哲生、山口政光、村上 章：RNA 特異的検出プローブによるショウジョウバエ初期胚発現mRNA の検出：日本化学会第89春季年会：2009年3月27日：船橋市

(3) 脇玲子、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：蛍光修飾RNAプローブを用いた初期応答遺伝子のリアルタイムイメージング(II)：日本化学会第89春季年会：2009年3月27日：船橋市

(4) 脇玲子、小堀哲生、山吉麻子、村上 章：蛍光修飾RNAプローブによる初期応答遺伝子のリアルタイムモニタリング：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：2008年12月9日：神戸市

(5) 上田貴子、村上 章、山口政光、小堀哲生、山吉麻子：蛍光核酸プローブによるショウジョウバエ初期胚発現遺伝子の検出：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：2008年12月9日：神戸市

(6) 上田貴子、脇玲子、山吉麻子、小堀哲生、山口政光、村上 章：蛍光核酸プローブによるショウジョウバエの発生過程におけるmRNA の検出：第18回アンチセンスシンポジウム：2008年11月17日：岐阜市

(7) 樋口麻衣子、山吉麻子、小堀哲生、加藤聖子、和氣徳夫、村上 章：点突然変異陽性細胞における光架橋性アンチセンス核酸の細胞増殖抑制効果：第18回アンチセンスシンポジウム 2008年11月17日：岐阜市

(8) 高屋和孝、樋口麻衣子、小堀哲生、山吉麻子、村上 章：光架橋型塩基を有するオリゴヌクレオチドの合成とその架橋特性：第18回アンチセンスシンポジウム：2008年11月17日：岐阜市

(9) 渡邊篤、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：Excimer 発光を利用した蛍光プローブによる疾患関連SNP検出：第18回アンチセンスシンポジウム：2008年11月17日：岐阜市

(10) PIWI-Antagonistic Peptideを結合させたアンチセンス核酸の設計と機能評価：山吉麻子、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、村上 章：第18回アンチセンスシンポジウム：2008年11月17日：岐阜市

(11) 脇玲子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：ピレン修飾型RNAプローブを用いた標的RNAのタイムラプスイメージング：第18回バイオ・高分子シンポジウム：2008年7月25日：東京都

(12) 樋口麻衣子、高屋和孝、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：光応答性塩基を有する人工核酸の開発：第 54 回高分子研究発表会：2008 年 7 月 18 日：神戸市

(13) 山吉麻子、加藤聖子、和氣徳夫：村上 章：エストロゲンレセプターを標的としたデコイ核酸によるヒト乳癌細胞増殖制御：第 12 回がん分子標的治療研究会：2008 年 6 月 24 日：東京都

(14) 山吉麻子、上田貴子、小堀哲生、山口政光、村上 章：蛍光核酸プローブによるショウジョウバエ初期胚での mRNA の検出：第 55 回日本生化学会近畿支部例会：2008 年 5 月 24 日：大阪市

(15) 脇 玲子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：RNA プローブを用いた初期応答遺伝子のリアルタイムイメージング (2)：第 55 回日本生化学会近畿支部例会：2008 年 5 月 24 日：大阪市

(16) 村上 章、渡邊 篤、山吉麻子、小堀哲生、岸田綱朗、松田 修：RUNX1 遺伝子 SNP の ENA 導入型ピレン修飾 RNA プローブによる SNP 検出：第 88 回日本化学会春季年会：2008 年 3 月 26 日：東京都

(17) 小堀哲生、森 隆、山吉麻子、村上 章：ナフチリジン修飾蛍光核酸プローブによる SNP 検出：第 88 回日本化学会春季年会：2008 年 3 月 26 日：東京都

(18) 山吉麻子、島津典子、樋口麻衣子、小堀哲生、村上 章：デコイ核酸によるヒト乳癌細胞の増殖抑制機構：第 88 回日本化学会春季年会：2008 年 3 月 26 日：東京都

(19) 樋口麻衣子、山吉麻子、小堀哲生、加藤聖子、和氣徳夫、村上 章：光架橋性アンチセンス核酸による分子標的治療へのアプローチ (III)：第 88 回日本化学会春季年会：2008 年 3 月 26 日：東京都

(20) 樋口麻衣子、高屋和孝、山吉麻子、小堀哲生、加藤聖子、和氣徳夫、村上 章：光架橋型アンチセンス核酸による変異型 K-ras 遺伝子の発現制御：第 17 回アンチセンスシンポジウム：2007 年 12 月 3 日：金沢市

(21) 村上 章、渡邊 篤、坂本 隆、山吉麻子、小堀哲生、岸田綱朗、松田 修：ピレン修飾 RNA プローブによる RUNX1 遺伝子中の SNP 検出：第 17 回アンチセンスシンポジウム：金沢市：2007 年 12 月 4 日

(22) 山吉麻子、島津典子、樋口麻衣子、小堀哲生、村上 章：架橋型デコイ核酸によるヒト乳癌細胞増殖制御：第 17 回アンチセンスシンポジウム：2007 年 12 月 3 日：金沢市

(23) Kobori A., Mori T., Yamayoshi A., Murakami A.: Synthesis of naphthyridine-conjugated DNA probes and their application to SNPs typing. : 第 34 回核酸化学シンポジウム (Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) : 2007 年 11 月 20 日 : 東京都

(24) Higuchi M., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.: Selective regulation of mutant K-ras mRNA expression by photo-cross-linking antisense oligonucleotide. 第 34 回核酸化学シンポジウム (Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) : 2007 年 11 月 20 日 : 東京都

(25) Yamayoshi A., Shimadzu N., Higuchi M., Kobori A., Murakami A.: Gene expression by decoy approach (II): Development of photo-cross-linked oligonucleotides duplex as a decoy DNA for estrogen receptor : 第 34 回核酸化学シンポジウム (Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry) : 2007 年 11 月 20 日 : 東京都

(26) 樋口麻衣子、高屋和孝、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：点突然変異遺伝子の発現制御を目指したアンチセンス核酸の分子設計：第 56 回高分子討論会：2007 年 9 月 19 日：名古屋市

(27) Kobori A., Mori T., Yamayoshi A., Murakami A., Synthesis and fluorescence properties of DANP-conjugated DNA probes for SNPs detection. American Chemical Society 23th National Meeting:2007 年 8 月 19 日:Boston, USA

(28) M.Higuchi, A.Yamayoshi, A.Kobori, A.Murakami: Novel psoralen-conjugated antisense oligonucleotides having high photocross-linking efficiency. American Chemical Society 23th National Meeting:2007 年 8 月 19 日:Boston, USA

(29) 樋口麻衣子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：光架橋型アンチセンス核酸のデザインと機能評価：第 17 回バイオ・高分子シンポジウム：2007 年 7 月 30 日：東京都

(30) 村上 章、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、坂本 隆：ショウジョウバエの mRNA を

標的とした蛍光プローブの設計とその評価：第 53 回高分子研究発表会（神戸）：2007 年 7 月 20 日：神戸市

(31) 樋口麻衣子、高屋和孝、山吉麻子、小堀哲生、村上 章：ソラレンを修飾した光架橋性アンチセンス核酸の開発：第 53 回高分子研究発表会（神戸）：2007 年 7 月 20 日：神戸市

(32) 村上 章、脇 玲子、坂本 隆、山吉麻子、小堀哲生：ピレン修飾 RNA プローブによる mRNA の in situ 検出：第 53 回高分子研究発表会（神戸）：2007 年 7 月 20 日：神戸市

(33) 山吉麻子、島津典子、小堀哲生、村上 章：架橋型デコイ核酸の遺伝子発現制御の評価：第 53 回高分子研究発表会（神戸）：2007 年 7 月 20 日：神戸市

(34) 村上 章、渡邊 篤、岸田網朗、山吉麻子、小堀哲生、松田 修：ENA 導入型ピレン修飾 RNA プローブを用いた SNP タイピング：第 53 回高分子研究発表会（神戸）：2007 年 7 月 20 日：神戸市

(35) 樋口麻衣子、小堀哲生、山吉麻子、村上 章：ソラレン誘導体を修飾した光架橋性アンチセンス核酸の開発：第 54 回日本生化学会近畿支部例会：2007 年 5 月 19 日：京都市

(36) 村上 章、渡邊 篤、坂本 隆、岸田網朗、松田 修、小堀哲生：ENA 導入型ピレン修飾 RNA プローブを用いた SNP 検出法の開発：第 54 回日本生化学会近畿支部例会：2007 年 5 月 19 日：京都市

(37) 山吉麻子、島津典子、樋口麻衣子、小堀哲生、村上 章：エストロゲンレセプターを標的とした架橋型デコイ核酸による細胞増殖制御：第 54 回日本生化学会近畿支部例会：2007 年 5 月 19 日：京都市

(38) 村上 章、○脇 玲子、坂本 隆、山吉麻子、小堀哲生：RNA プローブによる初期応答遺伝子の発現プロファイリング：第 54 回日本生化学会近畿支部例会：2007 年 5 月 19 日：京都市

(39) 小堀哲生、森 隆、山吉麻子、村上 章：ジアミノナフチリジンを導入した蛍光核酸プローブによる標的核酸の検出：第 2 回日本ケミカルバイオロジー研究会：2007 年 5 月 9 日：京都市

〔図書〕（計 1 件）

(1) 山吉麻子、村上 章、シーエムシー出版、核酸医薬の最前線（監修：和田猛）2009（総ページ数：254（124-136））

〔産業財産権〕

○ 取得状況（計 1 件）

- ・ 名称：ピレン修飾 RNA、および RNA の分析方法
- ・ 発明者：山名一成、雑古博文、中野英彦、岩瀬礼子、村上 章
- ・ 権利者：株式会社島津製作所
- ・ 種類：特許権
- ・ 番号：特許第 4238381 号
- ・ 取得年月日：2009 年 1 月 9 日
- ・ 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.cis.kit.ac.jp/~antisen/seijo.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 章 (MURAKAMI AKIRA)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：60210001

(2) 研究分担者

小堀 哲生 (KOBORI AKIO)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
研究者番号：00397605

山吉 麻子 (YAMAYOSHI ASAKO)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号：70380532

(3) 連携研究者