

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350079

研究課題名(和文) フォトサーマル効果を利用した光化学的RNA情報編集システムの開発

研究課題名(英文) Development of Photochemical RNA Editing induced by Photothermal Effect

研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO, KENZO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：90293894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：シトシンからウラシルへの点変異の際の鍵反応と考えられる脱アミノ化をより緩和な生理的条件下で進行させるため、生理的条件下で、全て光操作のみで細胞内RNA上のシトシンからウラシルへのピンポイント変異を制御する今までにない分子システムの開発を目指している。超高速光架橋剤であるシアノビニルカルバゾールを含む人工核酸の可逆的なmRNAへの光架橋反応を利用する際に、細胞内にも存在する化学物質である各種ジアミン類を添加させることで、生理的条件下でも脱アミノ化が進行することを見出した。本成果を発展させることで、化学的な手法による細胞内での正確な分子操作がさらに期待される。

研究成果の概要(英文)：To improve the deamination reaction of cytosine in the photocrosslinked DNA double strand, the effect of additives on the deamination reaction was evaluated. The results indicated that diamine derivatives can accelerate the reaction in a concentration dependent manner. diamine derivatives having more than four carbons distance between two amine groups clearly accelerate the photochemical C-U transition reaction. For spermidine, the acceleration effect was caused by the interaction between spermidine and DNA double strand, although the increase of pH scarcely contributed to the acceleration effect. As the mammalian cells contain millimolars of spermidine and spermine, the acceleration of photochemical C-U transition, that was demonstrated in this study, might occur in mammalian cells. This provides a new design of artificial oligonucleotide having higher photo-editing activity.

研究分野：核酸化学、生物有機化学、化学生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：光架橋 RNA編集

1. 研究開始当初の背景

高等生物は RNA エディティングと呼ばれる、転写された RNA を塩基配列選択的に脱アミノ化する事で遺伝コードを変換する機構を有する。アデニンの 6 位を脱アミノ化するとイノシン(I)となり、シトシンの 4 位を脱アミノ化するとウラシル(U)となる。従って、この反応を使用し、T>C 変異した変異ヌクレオチドを脱アミノ化することができれば、遺伝コードを野生型に戻すことが可能となる。近年、我々は光化学的なライゲーション反応を用いた DNA エディティング(K. Fujimoto et al., *JACS* 2009, *OBC* 2007, *ChemComm* 2006)、光化学的なクロスリンク反応を用いた RNA エディティング技術(を開発し、部位特異的なシトシンの脱アミノ化に成功している(K. Fujimoto et al., *OL* 2009, *BOMCL* 2005 *ChemComm* 2010)。いずれの反応においても、光応答性塩基上(カルボキシビニルウラシル: ^{CVU}、シアノビニルカルバゾール: ^{CNVK})に導入されているビニル基と操作対象シトシン塩基が 2+2 光環化することで、架橋シトシン上 4 位のアミノ基が加熱過程(90 °C 3h)によりウラシル誘導体へと選択的に脱アミノ化され、光開裂反応を経由してウラシルへと変換されると考えられている。可逆的な光操作のみで DNA ならびに RNA を編集する方法は我々の方法以外には殆ど報告例がなく、独自性の高い方法と考えられている。しかし、90 度で 2 時間以上の加熱が必要であること、可逆的な光操作に用いる照射波長(366 nm, 312 nm)が紫外領域であることから、これらが細胞内応用を妨げるボトルネックとなっていた。

2. 研究の目的

我々は定量的な脱アミノ化に 90 度で 2 時間以上の加熱が必要であるものの、既に申請者達は Leigh 症候群を対象とした遺伝子修復を生理的条件下で一連の光操作を行ったところ低収率(10%前後)ながら RNA の光編集が可能であるという予備的な知見を得ていた。このことは試験管内での反応が実際の細胞レベルで確認できた画期的な知見と考えられ、細胞内の遺伝子操作が原理的に可能であることが示されていた。そこで、この脱アミノ化をより緩和な生理的条件下で進行させるため、1) 金属ナノ粒子を用いることによるフォトサーマル効果を利用する、2) デアミナーゼ酵素内の反応機構を化学的に組み込ませる、これら 2 点を組み込んだ新しい分子システム系を設計・創製しようと考えた。生理的条件下で、全て光操作のみで細胞内 RNA 上のシトシンからウラシルへのピンポイント変異を制御する今までにない分子システムの開発が本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) 光二量体の構造決定

これまでの研究から、光ライゲーションに用いるカルボキシビニルウラシル(^{CVU})については[2+2]光環化反応により光ライゲーション反応が進行する事が明らかとなっている。しかし、光クロスリンクに用いるシアノビニルカルバゾール(^{CNVK})についてはその架橋構造は明らかとなっていない(*Org. Lett.*, 10, 3227, (2008))。そこで ^{CNVK} 架橋構造の NMR 構造解析を行い、構造的知見を得るとともに、これを基にした分子モデリングによる安定構造計算から、シトシン 4 位のアミノ基周辺の立体構造に関する知見を得る。

(2) 新規光反応性人工 DNA の開発

既に研究代表者は光クロスリンクされた DNA 誘導体をアデノシンデアミナーゼ活性が共存するヌクレアーゼで分解した際に、生理的条件下で光架橋されたシトシンがウラシルへと変換されていることを見いだしている。このことはアデノシンデアミナーゼの脱アミノ化機構を組み込むことができれば、フォトサーマル効果と組み合わせることで、より緩和な条件下で脱アミノ化を進められるのではと考えられる。X 線結晶構造解析(H. Ford et al., *Biochemistry.*, 2000, 2581)によって報告されているアデノシンデアミナーゼの活性部位に配置されている Asp295, His238, Asp296 といった鍵となるアミノ酸を参考にし、上述のクロスリンク体の NMR 構造解析をもとに様々な光応答性修飾カルバゾールを設計・合成する。その際には共通の中間体ヨードカルバゾールと各種ビニル誘導体のクロスカップリングを行うことで、効率的な合成を行う。

(3) 細胞内への導入ならびに細胞内光操作に関する研究開発

Cy3 蛍光修飾 ^{CNVK}-ODN あるいは AuNP-^{CNVK}-ODN を種々の細胞導入試薬(LipofectAmine2000 など)と混合し、HEK293 (ヒト胎児由来腎細胞)培養液に添加、蛍光顕微鏡観察により胞内導入条件を最適化する。必要に応じて、脂質修飾(コレステロールなど)やペプチド修飾(R8, RGD など)を行い、最適条件を検討する。また細胞内光クロスリンク反応に関して配列選択性ならびに光操作のための各種パラメータ(波長、照射エネルギー、光源、照射タイミング)に関する条件検討を行う。最終的には青色蛍光タンパク質(BFP)遺伝子に 1 塩基変異(199C>T)を導入すると、緑色蛍光タンパク質(GFP)に変換されることが知られているので、BFP を恒常発現する HEK293 細胞(BFP-HEK)を作成し、^{CNVK}-ODN あるいは AuNP-^{CNVK}-ODN を最適条件で細胞内に導入し RNA 編集に関する知見を得る。その際、同時に mRNA を抽出し、RT-PCR 後、配列解析を行うことで mRNA への光編集を明らかにする。Leigh 脳症の原因の一つとされるミトコンドリア ATPase6 遺伝子の変異(mt.8993T>C)を標的とする光 RNA 編集に挑

戦する。

4. 研究成果

(1) 光二量体の構造決定

光架橋後のオリゴ DNA を単離、精製後、酵素分解によりモノヌクレオチドまで分解後、架橋ユニットと考えられるチミンと ^{cnvk} の光架橋橋体を再度精製し、架橋構造の NMR 構造解析を行った。その結果、シアノビニル基のビニル基とチミンの C5, C6 2 重結合部分において cis-syn 型で [2+2] 光環化していることを明らかにした。またビニル基に関してシストランスの異性化が高速で進行していることや、2 重鎖構造の中ではトランス構造が優先することなど架橋反応機構についても基礎的な知見が得られた (図 1 参照)。この構造をもとに光架橋された DNA 全体の構造をシミュレーションしたところ架橋した部位を中心として DNA 2 重螺旋の軸が 15 度前後ずれることが判明した。

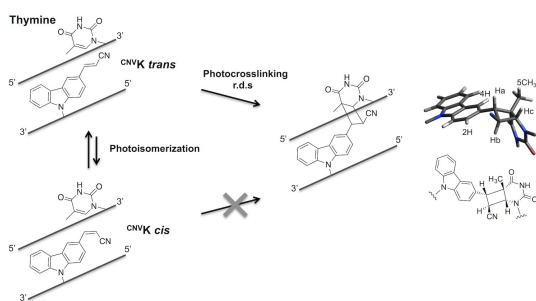


図 1. 光架橋反応ならびに構造解析

(2) シトシンからウラシルへの点変異反応の高速化

シトシンからウラシルへの点変異の際の鍵反応と考えられる脱アミノ化をより緩和な生理的条件下で進行させるため、生理的条件下で、全て光操作のみで細胞内 RNA 上のシトシンからウラシルへのピンポイント変異を制御する今までにない分子システムの開発を目指している。そこで、DNA 構造の B-Z 型遷移の際に用いられるアミンである spermidine を添加することで脱アミノ化がより緩和な条件で進行するのではと考えた。Spermidine 存在下、^{cnvk} 含有オリゴ DNA と相補鎖 DNA の光架橋体を 37 条件下、核酸塩基変換反応を解析したところ脱アミノ化の加速が観察された。そこで、同様の実験を様々なアミンを用いて行ったところ 1,8-diaminooctane、1,4-diaminobutane、spermine において spermidine 以上の脱アミノ化反応の加速を確認した。いずれの場合もアミン添加による脱アミノ化速度は非添加時と比較し約 20 倍加速していた (図 2 参照)。以上より、アミン添加による脱アミノ化の促進が生理条件下で可能であることを見出した。

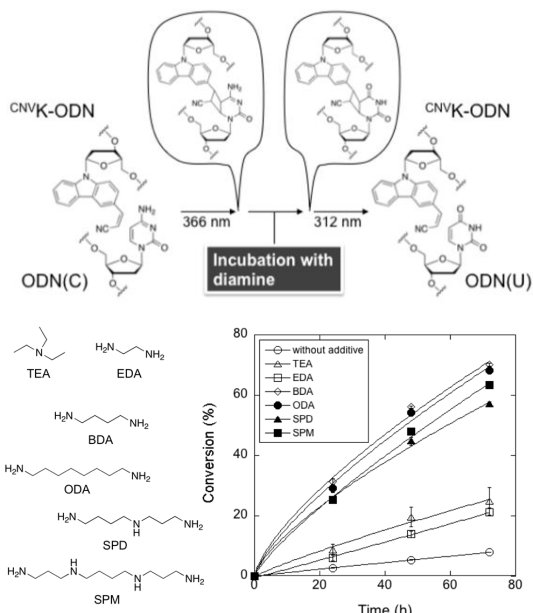


図 2. アミン類の添加による脱アミノ化反応の促進

さらに簡便かつ実用的な操作法の開発を行うこととし、標的核酸塩基である C と塩基対を形成する塩基を、通常のグアニンからイノシンに変更した。これによる光架橋反応効率およびイノシン-シトシン水素結合下における塩基変換反応効率を定量評価した。標的核酸塩基シトシンと塩基対形成する塩基がグアニンの場合とイノシンの場合で、光架橋反応効率を比較した結果、約 3 倍の反応の加速が見られた。また、イノシン-シトシン水素結合下におけるシトシンからウラシルへの変換反応を解析・比較した結果、グアニンの場合では全く進行しなかったシトシンからウラシルへの変換反応が、イノシンに変更することで大幅に加速された (変換速度: 20%/日)。本結果は光熱効果を使わずとも細胞内でピンポイント操作できることを示しており、当初の計画以上の新手法の開発に成功したと考えられる。

(3) 細胞内への導入ならびに細胞内光操作に関する研究

秒単位の光照射によりピリミジン塩基と選択的に光架橋可能な人工核酸である 3-cyanovinylcarbazole (^{cnvk}) をアンチセンス核酸と組み合わせることで、細胞外の系において点変異型 K-ras mRNA (コドン 12. GGU>GUU) の機能を光照射によって制御することに成功した。本手法を用いることで、1 秒間の光照射により ^{cnvk} を用いたアンチセンス核酸は、標的の変異型 mRNA に対して塩基配列選択的に光架橋し、その逆転写反応を約 97% という高効率で阻害可能であることを見出した。1 秒という短時間の光照射で mRNA に対して操作を行うことにより、遺伝子発現が制御できるということは、脱アミノ化対象の mRNA 上のシトシンを実際にピンポイントで制御可能であることを示唆していると考えられる。

そこで次に、実際に細胞内に導入し、内在性 GFP 遺伝子の発現を秒単位の光照射によって細胞内で抑制できるか検証を行うことで細胞内への導入ならびに細胞内光操作に関する条件検討を行った。^{CNVK} を含むアンチセンス核酸を用いることで、10 秒の光照射で細胞系において遺伝子発現制御が可能であること即ち mRNA が混在する中で正確に目的の mRNA に対して光架橋していることを見出した。また、既存のアンチセンス核酸の多くは、IC₅₀ が μM オーダーであるのに対して、^{CNVK} を用いたアンチセンス核酸は、低濃度（約 80 nM）でも遺伝子発現が制御可能であることを見出した。異なる自己構造を持つと予測される GFP mRNA 中の 4 つの標的配列に対して、それぞれ対応する ^{CNVK} を含むアンチセンス核酸を用いて評価した実験において、全ての系において光による遺伝子発現制御が可能であることを見出した。^{CNVK} が、光架橋反応によって非平衡反応系で標的配列と光架橋するため、遺伝子発現制御が標的 mRNA の自己構造に依存しなかったのではと考えられる。また、光照射のタイミングによっても内在性遺伝子発現の制御が可能であることも実証した。以上のことから実際に細胞内の mRNA をターゲットとして配列選択的に光操作可能であることを実証した（図 3 参照）。

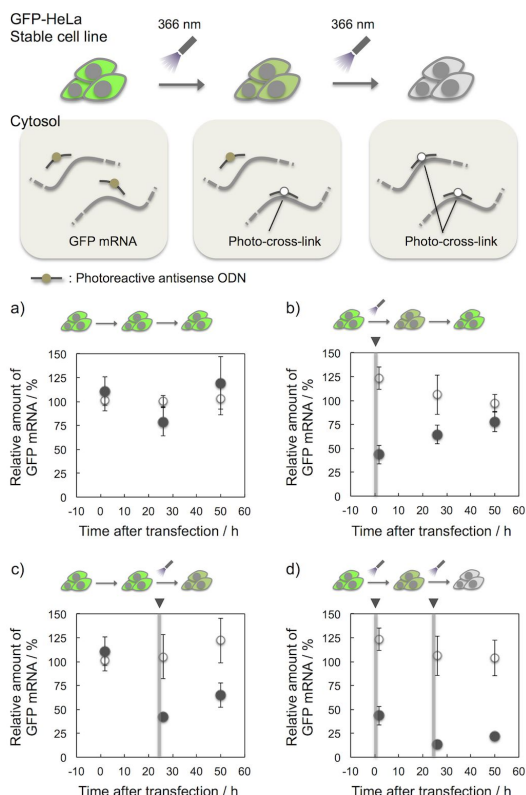


図 3. 細胞内 mRNA への光架橋反応

最後に、本基盤研究においてピンポイント RNA 編集の際に最も重要と考えられる脱アミノ化反応を小分子（ジアミン類）で 20 倍以上加速可能であること、高熱効果に頼らずにイノシンをターゲットシトシンの相補鎖側に組み込むことにより生理的条件下で脱ア

ミノ化が進行することを見出したこと、ならびに実際に細胞系で配列選択的に mRNA に対して光架橋できたこと、これらの成果は当初の予想を超えるものと考えており、今後、本成果を発展させることで、化学的手法による細胞内での正確な分子操作がさらに期待される。

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 15 件）

Kenzo Fujimoto, Asuka Yamada, Yoshinaga Yoshimura, Tadashi Tsukaguchi and Takashi Sakamoto, Details of the ultra-fast DNA photocrosslinking reaction of 3-cyanovinylcarbazole nucleoside; Cis-trans isomeric effect and the application for SNP based genotyping, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、135 巻, 2013, 16161 - 16167, DOI: 10.1021/ja406965f

Kenzo Fujimoto, Satomi Kishi and Takashi Sakamoto, Geometric Effect on the Photocrosslinking Reaction between 3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside and Pyrimidine Base in DNA/RNA Heteroduplex, *Photochemistry and Photobiology*, 査読有、89 巻, 2013, 1095-1099, DOI: 10.1111/php.12118

Kenzo Fujimoto, Hiroki Yoshinaga, Yasumasa Yoshio and Takashi Sakamoto, Quick and Reversible Photocrosslinking Reaction of 3-Cyanovinylcarbazole Nucleoside in DNA Triplex, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有、11 巻, 2013, 5065-5068 DOI: 10.1039/C3OB40915E

Kenzo Fujimoto, Daiki Futamura and Takashi Sakamoto, Diamine Derivatives Accelerate Photochemical C U Transition in DNA Double Strand, *Chem. Lett.*, 査読有、42 巻, 2013, 289-291 DOI:10.1246/cl.2013.289

Atsuo Shigeno, Takashi Sakamoto, Yoshinaga Yoshimura and Kenzo Fujimoto, Quick Regulation of mRNA Functions by a Few Seconds of Photoirradiation, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有、10 巻, 2012, 7820-7825. DOI: 10.1039/C2OB25883H

Kenzo Fujimoto, Kaoru Hiratsuka-Konishi, Takashi Sakamoto, Tomoko Ohtake, Ken-ichi Shinohara and Yoshinaga Yoshimura, Specific and reversible photochemical labeling of plasmid DNA using photoresponsive oligonucleotides containing 3-cyanovinylcarbazole, *Molecular BioSystems*, 査読有、8 巻, 2012, 491-494 DOI: 10.1039/C2MB05422A

Takashi Sakamoto, Takehiro Ami, and

Kenzo Fujimoto、5-Methylcytosine Selective Photoligation Using Photoresponsive Oligonucleotides Containing Various 5-Vinyl-2'-deoxyuridines Having an Aromatic Group *Chem. Lett.*, 査読有、41 巻、2012、47-49、DOI:10.1246/cl.2012.47

Takashi Sakamoto, Yu-ki Shimizu, Jun Sasaki, Hikaru Hayakawa and Kenzo Fujimoto、Signal turn-on probe for nucleic acid detection based on 19F nuclear magnetic resonance、*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、21 巻、2011、303-306、DOI:10.1016/j.bmcl.2010.11.013

Toshifumi Tsukahara, Yu Ooka, Shafiul Alam, Hitoshi Suzuki, Kenzo Fujimoto、Possibility of genetic restoration for a disease treatment、*IEEE ICMSAO*、査読有、2011、1-4、DOI:10.1109/ICMSAO.2011.5775517

[学会発表](計 7 件)

Takashi Sakamoto, Asuka Yamada, Yoshinaga Yoshimura, Kenzo Fujimoto、Details of the ultra-fast DNA photocrosslinking reaction of 3-cyanovinylcarbazole nucleoside、Internal Symposium of Nucleic Acids Chemistry 2013, November 12-15, 2013、Kanagawa Univ. (神奈川県)

Toshifumi Tsukahara, Vu Thi Luyen, Hitoshi Suzuki, and Kenzo Fujimoto、Possibility of Genetic Code Restoration by Chemical RNA Editing、BIT's Biopharmaceutical Summit 2013、August 7-8, 2013、Boston, USA

Atsuo Shigeno, Takashi Sakamoto, Kenzo Fujimoto、Development of cyanovinylcarbazole mediated photocrosslinking reaction toward for regulation of RNA、40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 21-25, 2013、Hawaii, USA

藤本健造、超高速光 DNA・RNA 操作法の開発、バイオアカデミックフォーラム 2013、2013 年 5 月 7-9 日、東京ビッグサイト (東京)

Hiroki Yoshinaga, Yasumasa Yoshio, Takashi Sakamoto, Kenzo Fujimoto、Ultrafast reversible DNA photocrosslinking in triplex DNA、Internal Symposium of Nucleic Acids Chemistry 2012, November 14-16, 2012、Nagoya Univ. (愛知県)

Kenzo Fujimoto、Development of Photochemical DNA and RNA Manipulation、International Symposium on SYNTHESIZING LIFE AND BIOLOGICAL SYSTEMS, October 26-28、2012、SENRI LifeScience Center

(大阪)

Kenzo Fujimoto、Development about Photochemical RNA Manipulation、14th RNA Meeting、July 18-20、2012、Tohoku Univ. (宮城県)

Shigetaka Nakamura, Kenzo Fujimoto、Template directed DNA photochemical ligation toward for construction of DNA architecture、13th Tetrahedron Symposium、June 23-26、2012、Amsterdam、Nederland

[図書](計 1 件)

藤本健造、光で操る DNA、*パリティ 特集「DNA の物理」*、丸善出版株式会社 26(9)、pp. 132-139 (2011)

[産業財産権]

出願状況 (計 7 件)

名称：光架橋形成抑制方法、及び自己架橋体形成抑制型光応答性核酸

発明者：藤本健造 中村重孝

権利者：北陸先端科学技術大学院大学

種類：特許

番号：特許願 2013-225799

出願年月日：平成 25 年 10 月 30 日

国内外の別：国内

名称：鎖交換された二重鎖オリゴヌクレオチドの製造方法

発明者：藤本健造、中村重孝、橋本浩寿、小林聡

権利者：北陸先端科学技術大学院大学、電気通信大学

種類：特許

番号：特許願 2013-133163

出願年月日：平成 25 年 6 月 25 日

国内外の別：国内

名称：光クロスリンク能を有する光応答性ヌクレオチドアナログ

発明者：藤本健造、坂本隆、田中佑弥

権利者：北陸先端科学技術大学院大学

種類：特許

番号：特許願 2013-70381

出願年月日：平成 25 年 3 月 28 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 3 件)

名称：光クロスリンク能を有する光応答性人工ヌクレオチド

発明者：藤本健造、吉村嘉永

権利者：北陸先端科学技術大学院大学

種類：特許

番号：特許第 8,481,714 号 (米国)

取得年月日：平成 25 年 5 月 9 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO Kenzo)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル
サイエンス研究科・教授
研究者番号：90293894

(2)研究分担者

塚原 俊文 (TSUKAHARA Toshifumi)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル
サイエンス研究科・教授
研究者番号：60207339

坂本 隆 (Sakamoto Takashi)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアル
サイエンス研究科・助教
研究者番号：80423078