

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550186

研究課題名(和文) microRNAのターゲット捕捉機構を狙い撃つ新規核酸素子の開発

研究課題名(英文) Development of novel inhibitors targeting microRNAs

研究代表者

山吉 麻子 (Yamayoshi, Asako)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・助教

研究者番号：70380532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：昨今、microRNAの発現異常が、ガンなどの重篤な疾患を引き起こす原因となることが明らかとなり、microRNAの機能を特異的に制御する機能性分子の開発が希求されている。microRNAは、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるリボヌクレオプロテインとなった後、遺伝子発現を制御する。RISCは、RISC中のmicroRNAと相補的なmRNAへ結合するため、microRNAはRISCのターゲット捕捉機構の要となっている。本申請課題では、RISCの標的鎖認識過程に焦点を絞り、その機能を特異的に制御する新規核酸素子の開発を目的とした。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs are non-coding RNAs that induce post-transcriptional gene silencing of the target genes and regulate a wide range of biological processes including cancers. Therefore microRNAs are considered as attractive therapeutic targets for cancer therapy. MicroRNAs do not act alone, but exhibit the functions by forming RNA-induced silencing complex (RISC). Among the proteins of RISC components, Argonaute protein family has a highly conserved motif called PIWI-box that interacts with 5'-end of microRNAs. The interaction between PIWI-box and 5'-end of miRNA is an essential factor for holding microRNA in Argonaute. We designed peptides as an antagonist against PIWI-box, and then introduced these peptides to oligonucleotides targeting microRNAs. In this study, we evaluate the regulatory effects of peptide-conjugated oligonucleotides on RISC activity.

研究分野：核酸化学

キーワード：microRNA アンチセンス核酸 ペプチド RISC

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの約 9 割が RNA として転写されているという衝撃的な報告がなされてから、RNA に関する研究は急速な発展を遂げた。最近では、RNA の 98% が、タンパク質をコードしない『non-coding RNA』であり、その多彩な機能が数多く報告されている。non-coding RNA の中でも、とりわけ、microRNA と呼ばれる小さな RNA に高い関心が寄せられている。microRNA は、ヒトの全遺伝子の 1/3 以上もの発現を制御しており、細胞の分化や増殖、さらには発生段階における遺伝子発現の時間的制御といった極めて重要なプロセスに関与していることが明らかとなった。また、microRNA の発現異常が、ガンなどの重篤な疾患の原因にもなっていることから、microRNA の機能の特異的に制御する分子は、疾患治療や microRNA の未知の機能を解明するツールの創製に繋がると期待される。

2. 研究の目的

microRNA はそれ自身が単独で働くのではなく、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる『RNA とタンパク質との複合体』となって、初めてその機能を発現する。RISC は標的 mRNA と結合した後、mRNA を切断あるいは翻訳過程を阻害することで、遺伝子発現を制御する。RISC は、RISC 中の microRNA と相補的な mRNA へ結合するため、microRNA は RISC のターゲット捕捉機構の要となっている。このため RISC 中から microRNA を解離させることで RISC の機能は失活すると期待される

microRNA は RISC の中核タンパク質である Argonaute(AGO)の PIWI-box と呼ばれる領域と結合しており、PIWI-Box 中の Lys 残基 (K532,K565)と microRNA 5'末端のリン酸基との静電的相互作用が、microRNA が AGO 中に保持される為に必須であることが報告されている。そこで我々は、この相互作用を阻害することで、RISC から microRNA を解離出来るのではないかと考えた。本研究では、PIWI-box と microRNA の 5'末端との相互作用を阻害するペプチド (RINDA: RISC-inhibitor disturbing active site of RISC) をオリゴ核酸にコンジュゲートした新規遺伝子制御素子 (RINDA-as) を開発し、その RISC 機能阻害効果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、microRNA の機能の特異的かつ強力に阻害する分子の開発を目指し、以下の 2 点について重点的に検討を行った。

I. RINDA-as の合成と microRNA 解離効果の検証

PIWI-Box 中の Lys 基と microRNA 5'末端の

リン酸基との静電的相互作用を阻害する為に、酸性もしくは塩基性のペプチドアンタゴニスト (RINDA:RISC-inhibitor disturbing RISC active-site) を複数種類設計した。RINDA と microRNA と相補的なオリゴ核酸の 3'末端とを架橋したペプチドコンジュゲート核酸 (RINDA-as) は、OH 基と NH₂ 基が担持された固相を用いて Fmoc 固相合成法によりアミノ酸配列を縮合した後、microRNA と相補的な配列を持つアンチセンス核酸をホスホロアミダイト法により伸長することによって合成した (Table 1, Fig.1)。

Table 1 Sequences of oligonucleotides

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Tm (°C)	
siRNA Guide strand	5'	a	u	u	e	a	u	c	u	u	a	u	a	e	u	c	u	u	e	c	a	-3'	
Antisense	3'	A	A	C	U	U	A	G	A	U	A	U	C	A	G	A	A	C	G	U	-5'	66 ± 0.8	
RINDA(KKK)-as	3'	A	A	C	U	U	A	G	A	U	A	U	C	A	G	A	A	C	G	U	-5'	69 ± 0.6	
RINDA(EEE)-as	3'	A	A	C	U	U	A	G	A	U	A	U	C	A	G	A	A	C	G	U	-5'	70 ± 0.4	
Antisense : ENA	3'	A	A	C	U	U	A	G	A	U	A	U	C	A	G	A	A	C	G	U	-5'	76 ± 0.5	
RINDA(KKK)-as : ENA	3'	A	A	C	U	U	A	G	A	U	A	U	C	A	G	A	A	C	G	U	-5'	76 ± 0.4	
RINDA(EEE)-as : ENA	3'	A	A	C	U	U	A	G	A	U	A	U	C	A	G	A	A	C	G	U	-5'	75 ± 0.5	
Control Antisense	3'	U	A	U	G	G	A	G	U	C	A	A	U	G	U	U	A	A	U	-5'	-		

aug:RNA, AUGC; 2'-O-Me RNA, G; ENA
Tm : [Guide strand]=[Antisense]=[RINDA-as]- 2 μM in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl

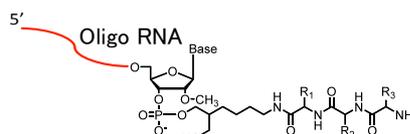


Fig. 1 Chemical Structure of RINDA-as

RINDA-as の microRNA 鎖解離効果を *in vitro* Unloading Assay により評価した。human Argonaute タンパク質 (hAGO2) を強発現させた細胞溶解液中に ³²P 標識した microRNA を添加し、RISC を形成させた後、anti-hAGO2 抗体と protein-G 固定化 beads を用いて RISC を固相上に固定した。この RISC 担持ビーズに種々のアンチセンス核酸を添加し、溶相と固相に分画して各々の放射活性を測定することで microRNA 解離効果を評価した。

II. 生細胞中における RINDA-as の RISC 機能阻害効果の評価

HeLa 細胞にルシフェラーゼ mRNA を標的とする microRNA (mir-Luc) をトランスフェクションし、24 時間培養した後、ルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL4.13) と RINDA-as をコトランスフェクションした。さらに 24 時間培養後、ルシフェラーゼアッセイを行うことで RISC 機能阻害効果を評価した。

4. 研究成果

I. RINDA-as の合成と microRNA 解離効果の検証

RINDA-as のガイド鎖解離効果を *in vitro* Unloading Assay 2) で評価した結果、RINDA を導入していないアンチセンス核酸 (ASO) を用

いた場合にも、RISC から microRNA が時間依存的に解離することが明らかとなった。酸性ペプチド (Glu) をコンジュゲートした RINDA(E3)-as は、ASO と比較して microRNA 解離効果が 10~15% 向上した (Fig.3)。塩基性ペプチド (Lys) をコンジュゲートした RINDA(K3)-as の場合には、ASO よりも microRNA 解離効果が最大で約 10% 低下することが明らかとなった。また、Glu 残基の数を検討した結果、Glu を 3 つコンジュゲートした RINDA(E3)-as の microRNA 解離効果が最も高いことが示唆された (Fig.4)。AGO の X 線結晶構造解析結果より、RINDA(E3)-as に見られた microRNA 解離促進効果は、PIWI-box 中の Lys 残基と RINDA(E3)-as の Glu 残基との静電的相互作用によって誘起されたと考えている。また、RINDA(E3)-as の microRNA 解離効果が最も高かった原因としては、RINDA(E3)-as の Glu 残基数 (3 残基) が最も PIWI-box のポケットに到達しやすい長さなのではないかと考察している。

II. 生細胞中における RINDA-as の RISC 機能阻害効果の評価

RINDA-as の生細胞系における RISC 機能阻害効果を検討した (Fig.4)。ルシフェラーゼ発現細胞に mir-Luc を導入すると、ルシフェラーゼ活性は mir-Luc 導入前と比較して 10% まで減少した。この細胞に酸性のアミノ酸残基を有する RINDA-as (RINDA(E3)-as) を導入すると、ルシフェラーゼ活性は mir-Luc 導入前と比較して 84% まで回復した。一方、RINDA を持たないアンチセンス核酸の場合には、ルシフェラーゼ活性の回復は 62% に止まった。また、カチオン性のアミノ酸残基を有する RINDA-as (RINDA(K3)-as) を用いた場合には、ルシフェラーゼ活性はほとんど回復しなかった。以上の結果より、酸性のアミノ酸残基をオリゴヌクレオチドに導入することで、RISC 機能阻害効果が向上されることが示された。以上の結果より、microRNA の 5' 末端のリン酸基と、PIWI-box 中の Lys 残基との相互作用を阻害することが、RISC 機能を抑制する上で極めて重要であることが示唆された。

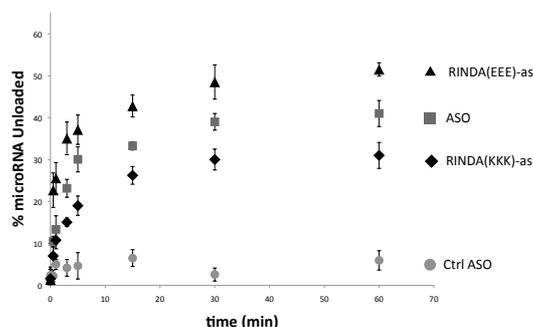


Fig.3 Percent microRNA released from RISC by antisense oligonucleotide. RISC on beads = 10 fmol. [RINDA-as]=[ASO]=[Control ASO]= 1 μ M.

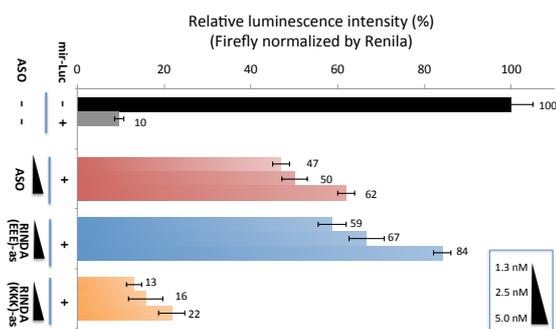


Fig.4 RINDA-as inhibits luciferase-targeting RISC in luciferase-expressing HeLa cells.

[mir-Luc] = 20 nM, transfection time : 24h

[ASO] = 1.3~5 nM, transfection time : 6h

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 8 件)

1. Yamayoshi, A. *, Matsuyama, Y., Kushida, M., Kobori, A., Murakami, A. "Novel photodynamic effect of psoralen-conjugated oligonucleotides for discrimination of methylation of cytosine in DNA", *Photochemistry and Photobiology*, 90, 716-722 (2014).
2. Matsuyama, Y., Yamayoshi, A. *, Kobori, A., Murakami, A. "Functional regulation of RNA-induced silencing complex by photoreactive oligonucleotides" *Bioorg Med Chem*, 22, 1003-1007 (2014).
3. Kobori, A., Nagae, Y., Sugihara, Y., Yamayoshi, A., Murakami, A. "Rate-adjusted cross-linking reaction by photoresponsive α -bromoaldehyde (PBA)-conjugated ODN" *Bioorg Med Chem Lett.* 23, 5825-5828 (2013).
4. Kobori, A., Ueda, T., Sanada, Y., Yamayoshi, A., Murakami, A. "Dual-fluorescent RNA probes with extremely large Stokes shifts" *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 77, 121018-1-3 (2013).
5. Yamayoshi, A. *, Yamada, Y., Kobori, A., Murakami, A. "Structural insights for design of inhibitors against RISC function" *Chem. Lett.*, 41, 1684-5 (2012).
6. Ueda, T., Kobori, A., Yamayoshi, A.,

- Yoshida, A., Yamaguchi, M., Murakami, A. "RNA-based diagnosis in a multicellular specimen by whole mount in situ hybridization using an RNA-specific probe" *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 6034-9 (2012)
7. Kobori, A., Tomita, K., Nagae, Y., Yamayoshi, A., Murakami, A. "Synthesis and cross-linking activity of 4-N-(4,5',8-trimethylpsoralen-4-ylmethyl)-2'-deoxycytidine-containing oligodeoxyribonucleotides" *Chem. Lett.*, 41, 804-5 (2012).
8. Kobori, A., Yamauchi, T., Nagae, Y., Yamayoshi, A., Murakami, A. "Novel photoresponsive cross-linking oligodeoxyribonucleotides having a caged "alpha"-chloroaldehyde" *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 5071-6 (2012).
- [学会発表] (計 63 件)
1. 2015年3月26日~29日 日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部 (〒274-0063 千葉県船橋市習志野台7-24-1) 山吉 麻子、○吉本 航大、岸本 恭介、小堀 哲生、村上 章 Discovery of transcriptional regulator RNA motifs with specific binding ability to HEXIM1、日本化学会第95春季年会
 2. 2015年3月26日~29日 日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部 (〒274-0063 千葉県船橋市習志野台7-24-1) 有吉 純平、栄森 奈緒、中村 裕未、小堀 哲生、村上 章、山吉 麻子、Development of novel functional oligonucleotides for regulation of RISC function (II) The effects of chemical modification of oligonucleotides on releasing of microRNA from RISC、日本化学会第95春季年会
 3. 2015年3月26日~29日 日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部 (〒274-0063 千葉県船橋市習志野台7-24-1) 山吉 麻子、○栄森 奈緒、有吉 純平、小堀 哲生、村上 章 Development of novel functional oligonucleotides for regulation of RISC function (II) Design of peptid-conjugated oligonucleotides for inhibition against RISC functi
 4. on、日本化学会第95春季年会
 5. 2015年3月9日東京理科大学 森戸記念館(〒162-8601 東京都新宿区神楽坂1-3) 山吉 麻子 『生命現象を支配する『小さなRNA』を狙い撃つ機能性分子の開発とは?』 第65回医用高分子研究会
 6. 2014年11月5~7日 北九州国際会議場 (〒802-0001 福岡県北九州市小倉北区浅野3丁目9-30) 村上 章・○中嶋 康介・西村 茜・小堀 哲生・山吉 麻子・松尾 雅文 RNA-diagnosis of alternative splicing by homogeneous fluorescence assay、The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2014
 7. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜 (〒220-0012 横浜市西区みなとみらい1-1-1)○有吉 純平、山吉 麻子、栄森 奈緒、小堀 哲生、村上 章 RISCの機能制御を目指した人工機能性核酸の開発 (I) RISCのmicroRNA保持機構の阻害を狙ったヘプチトコンシユケート核酸の開発、第37回日本分子生物学会年会
 8. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜 (〒220-0012 横浜市西区みなとみらい1-1-1) 山吉 麻子、○栄森 奈緒、有吉 純平、小堀 哲生、村上 章、RISCの機能制御を目指した人工機能性核酸の開発 (II) microRNAを標的とした阻害剤の分子設計指針、第37回日本分子生物学会年会
 9. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜 (〒220-0012 横浜市西区みなとみらい1-1-1) 山吉 麻子、○岸本 祐典、田村 理恵、村松 千愛、小堀 哲生、芦原 英司、村上 章、フラグメント化抗体結合型核酸の機能評価、第37回日本分子生物学会年会
 10. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜 (〒220-0012 横浜市西区みなとみらい1-1-1) ○中村 裕未、松山 洋平、小西 諒、小堀 哲生、村上 章、山吉 麻子、RISCと化学修飾核酸の結合親和性の評価 第37回日本分子生物学会年会
 11. 2014年11月5~7日 北九州国際会議場 (〒802-0001 福岡県北九州市小倉北区浅野3丁目9-30) ○有吉 純平・山吉 麻子・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章、Development of novel RISC inhibitors for promoting release of microRNA from RISC、The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2014
 12. 2014年11月4日 Kitakyushu

- International Conference Center (〒802-0001 福岡県北九州市小倉北区浅野3丁目9-30) Asako Yamayoshi "Development of novel RISC inhibitors for promoting release of microRNA from RISC"、The First International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference
13. 2014年9月11日～13日 岡山大学 津島キャンパス 一般教育棟(〒700-8530 岡山市北区津島中2丁目1番1号) ○有吉 純平・山吉 麻子・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章、RISC 機能の制御を目指した機能性分子の開発(I)RISCからのmicroRNA解離効果がRISC機能阻害効果に及ぼす影響、第8回バイオ関連化学シンポジウム
 14. 2014年9月24～26日 長崎大学 文教キャンパス 教養教育棟 3F (〒852-8521 長崎市文教町1-14) ○有吉 純平・山吉 麻子・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章 RISC サブユニットの解離を目指した機能性ナノ核酸素子の開発、第63回(2014)高分子討論会
 15. 2014年9月19日 京都薬科大学 愛学館 愛学ホール(〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5) 山吉麻子 『生命現象を支配する『小さなRNA』を狙い撃つ機能性分子の開発』 第14回NMMSセミナー
 16. 2014年9月11日～13日 岡山大学 津島キャンパス 一般教育棟(〒700-8530 岡山市北区津島中2丁目1番1号) ○山吉 麻子・有吉 純平・松山 洋平・小堀 哲生・村上 章、RISCのmicroRNA保持機構に着目した遺伝子制御素子の開発、第8回バイオ関連化学シンポジウム
 17. 2014年9月7日～8日 東京医科歯科大学 M&Dタワー(〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45) ○山吉 麻子・有吉 純平・松山 洋平・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章、Mature-microRNA を標的とした機能性分子の設計指針 アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム2014
 18. 2014年9月7日～8日 東京医科歯科大学 M&Dタワー(〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45) 山吉 麻子・○吉本航大・岸本 恭介・小堀 哲生・村上 章、HEXIM1 タンパク質に対して特異的結合能を有する機能性核酸を用いた新規転写阻害剤の開発、アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム
 19. 2014年9月7日～8日 東京医科歯科大学 M&Dタワー(〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45)○有吉 純平・山吉 麻子・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章、RISC 活性の制御を目指した機能性核酸の開発(I)RISCのmicroRNA保持機構の阻害を狙ったペプチドコンジュゲート核酸の開発、アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム2014
 20. 2014年9月7日～8日東京医科歯科大学 M&Dタワー(〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45)山吉 麻子・○岸本 祐典・田村 理恵・村松 千愛・小堀 哲生・芦原 英司・村上 章、フラグメント化抗体結合型核酸ドラッグの開発と機能評価、アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム2014
 21. 2014年7月24日～25日 東京工業大学大岡山キャンパス 西9号館デジタル多目的ホール(〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1)○山吉 麻子・有吉 純平・松山 洋平・小堀 哲生・村上 章、人工核酸によるnon-coding RNAの機能制御(III) microRNAの機能を阻害する分子の設計指針、第24回 バイオ・高分子シンポジウム
 22. 2014年7月24日～25日 ポスター発表 東京工業大学大岡山キャンパス 西9号館デジタル多目的ホール(〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1) ○有吉 純平・山吉 麻子・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章、人工核酸によるnon-coding RNAの機能制御(IV)RISCのmicroRNA保持機構に着目した機能性分子の設計、第24回 バイオ・高分子シンポジウム
 23. 2014年5月27日～29日 名古屋国際会議場 (〒456-0036 名古屋市熱田区熱田西町1番1号) ○有吉 純平・山吉 麻子・栄森 奈緒・小堀 哲生・村上 章、RISC から機能性コア分子であるmicroRNAを解離させる新規核酸素子の設計指針、第63回高分子学会年次大会 高分子学会予稿集
 24. 2014年5月27日～29日 名古屋国際会議場 (〒456-0036 名古屋市熱田区熱田西町1番1号) ○山吉 麻子・松山 洋平・有吉 純平・村上 章・和田 健彦・嶋田 直彦・丸山 厚、カチオン性くし型共重合体の主鎖の化学構造が核酸シャペロン活性に与える影響、第63回高分子学会年次大会
 25. 2014年5月27日～29日 名古屋国際会議場 (〒456-0036 名古屋市熱田区熱田西町1番1号) 山吉 麻子・○吉本航

大・岸本 恭介・小堀 哲生・村上 章、
HEXIM1 タンパク質に対して特異的結合
能を示す RNA モチーフの探索と新規転
写阻害剤としての応用、第 63 回高分子
学会年次大会

26. 2014 年 5 月 17 日 京都産業大学 神山
ホール(〒603-8047 京都府京都市北区
上賀茂本山)山吉 麻子・○吉本 航大・
岸本 恭介・小堀 哲生・村上 章、HEXIM1
タンパク質に対して特異的結合能を有
する RNA モチーフの探索と新規転写阻
害剤への応用、第 61 回 日本生化学会
近畿支部例会
27. 2014 年 5 月 17 日 京都産業大学 神山
ホール(〒603-8047 京都府京都市北区
上賀茂本山) 山吉 麻子・○岸本祐典・
田村 理恵・村松 千愛・小堀 哲生・芦
原 英司・村上 章、抗体結合型核酸ドラ
ッグの開発と機能評価、第 61 回 日本
生化学会近畿支部例会
28. 2014 年 5 月 17 日 京都産業大学 神山
ホール(〒603-8047 京都府京都市北区
上賀茂本山)山吉 麻子・○栄森 奈緒・
有吉 純平・小堀 哲生・村上 章、RISC 機
能の制御を目指したペプチドコンジュ
ゲート核酸の開発、第 61 回 日本生化学
会近畿支部例会

他 35 件

[図書] (計 2 件)

1. Kobori, A. Yamayoshi, A. Murakami,
Synthesis of oligonucleotides
containing 4,5',8-trimethylpsoralen at
the 2'-O position and their
cross-linking properties with RNAs,
Current Protocols in Nucleic Acid
Chemistry, Wiley 58:5.15.1-5.15.15.
2. Yamayoshi, A. Kobori, A. Murakami,
Photo-dynamic antisense regulation by
photo-cross-linkable antisense
oligonucleotides. Phoregulation of
DNA/RNA functions, Asanuma et al, eds,
Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., in
press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：RNA 分析チップおよび RNA 分析方法
発明者：村上章、小堀哲生、山吉麻子、野田
雄一郎、近藤正幸
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-10639
出願年月日：平成 27 年 1 月 27 日

国内外の別：国際

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科
生体分子工学部門 生体高分子情報研究室
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

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

該当なし