

**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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620132

研究課題名(和文) RNAならびにRNA-タンパク質複合体を対象とするRNA診断法の開発

研究課題名(英文) Development of RNA-diagnosis system for the analysis of RNA and RNA-protein complexes

研究代表者

村上 章 (Murakami, Akira)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・教授

研究者番号：60210001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノムプロジェクトは遺伝子発現機構が、従来の認識を遙かに超え複雑であることを明らかにした。特に、種々の難治性疾患の原因としてRNAに着目する必然性が浮上した。本研究では、RNAの機能と疾患との関係を明らかにする上で必須である、RNAの選択的高感度検出法(RNA診断法)の開発を行った。その結果、(1)特定の配列を持つRNAを無細胞系、生細胞系で高感度に検出する蛍光分析法を確立し、例として筋ジストロフィ症発症に関わるRNA異常の新規診断法を提案した。(2)RNAとタンパク質との複合体の遺伝子制御機能に着目し、生細胞中での検出法を開発した。これらの結果は、難病治療法開発に大きく寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：Human genome project has revealed that the mechanism of gene expression is much more complicated than that we have believed to date. This project focused on the novel RNA-diagnosis system for understanding the detailed mechanism of gene expression where RNAs play crucial roles. As results, we innovated the following systems: (1)Fluorescent-RNA-detection system to detect specific RNA in homogeneous physiological condition. The system was successfully applied to detect unusual splicing products of the muscular dystrophy. (2)Fluorescent-RNA-detection system to detect RNA-protein complexes such as telomerases and RNA-induced silencing complex (RISC). The system successfully detected telomerase in fixed cells and RISC in living cells. The system can be applied to the development of the novel curing methods of various diseases such as cancers.

研究分野：核酸化学、RNA診断、遺伝子制御法開発

キーワード：RNA診断 非コードRNA miRNA RISC ピレンプローブ 均一系蛍光検出

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトは、RNA がヒトの生命現象を中心的に司る存在であることを明らかにした。特にヒトの疾患に関わるという点で、ncRNA/RISC 研究は 21 世紀の医療発展には不可欠であると考えられている。特に microRNA(miRNA)は特異的タンパク質と共に遺伝子発現の 7 割を制御しているといわれているが、miRNA が構成する RNA-タンパク質複合体(miRISC)の機能は、細胞内局在、存在量、寿命、体内分布等基礎的な知見は未だ解明されていない。有効な miRISC 制御分子として報告されている「Antagomir」( Krutzfeldt *et al.*, *Nature*, 2005 )でさえもその作用機構の分子論的詳細は明らかでない。申請者は RNA 選択的蛍光核酸プローブの開発に携わっており、これまでに、このプローブを用いて生細胞内での mRNA ライブイメージングに成功した ( Waki *et al.*, *Chem. Commun.*, 2011; *Chem. Lett.* 2011. )。このプローブを用いることで RNA のみならず RISC の存在の有無、細胞内の局在、機能発現の態様を明らかにできる可能性がある。いわゆる「RNA 診断」法開発が熾烈な競争下にある現状において、本研究は極めて重要である。

## 2. 研究の目的

RNA の発現は種々の外部刺激によって誘発され、その発現態様は刺激の種類によって、(1)種類、(2)発現量、(3)細胞内局在、(4)機能、(5)機能発揮後の運命、等が異なる。本申請は 2 年であるため、ncRNA/RISC の選択的検出用プローブ(FRET プローブに基づくマルチカラー検出を含む)並びに検出システムの構築、ウイルスゲノム RNA を対象とする RNA 診断、外部刺激に応答するトランスクリプトーム解析 (HeLa 細胞)、RISC の蛍光検出、エキソソームにより輸送される RNA/RISC の解析、金粒子担持蛍光核酸プローブの細胞内局在の電顕顕微鏡解析、に焦点を絞り、これらを通して「RNA 診断」法の可能性を実証することを目的とした。しかしながら、上述のように、「RNA 診断」の重要性が認知されるにつれ、国内外の競争が激化し、例えば我が国の研究者が先鞭を付けたスプライシング異常に基づく疾患治療/診断法開発が欧米に先を越される事態になった。このことを憂慮し、開発者との共同研究を開始し、本申請の目的を一部変更した。具体的には、対象 RNA をスプライシング異常に原因を持つデュシェンヌ型筋ジストロフィの疾患 RNA に変更し、臨床試験における異常 RNA 診断を早期に実施するための「RNA 診断システム」構築を優先させた。

従って、目的並びにについては、予備検討にとどめた。

## 3. 研究の方法

2. で記載したように、研究目的の重点化に伴い、当初方法の若干の修正を実施し、以下に示す検討を行った。

(1) RNA 診断に用いるピレン修飾蛍光核酸プローブの作製：ピリミジン環のリボース環 2' 位にピレニルメチル基を導入した蛍光性ヌクレオシドのデザインならびに合成法の確立を試みた。

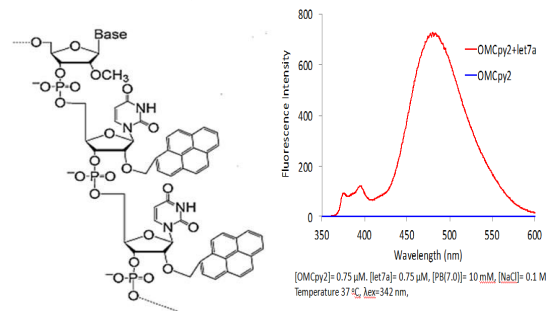


図 1 ピレンプローブの基本構造と相補的 RNA ハイブリッドの蛍光スペクトル

(2) 高機能化プローブの分子設計：ピレンプローブの蛍光発光性能を高めるべく分子設計を行った。従来リボース環に小比賀らが開発したリボース環架橋型ヌクレオシドを含むピレン修飾オリゴヌクレオチドを合成した (図 2)。このプローブは RNA とハイブリッド形成した場合、従来法に比べより

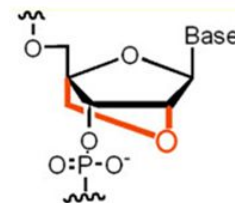


図 2 2',4'-BNA の基本構造

安定な A 型ハイブリッドを形成し、結果として蛍光強度の増大が期待される。様々な RNA 並びに後述する RNA-タンパク質複合体を対象にして高感度な RNA 特異的 RNA 検出 RNA プローブの開発を試みた。蛍光検出には、蛍光分光光度計及び蛍光顕微鏡システム (顕微分光装置具備) を採用した。本研究を通し、蛍光測定は PBS 系 (NaCl は適宜使用した) により行った。

(3) 蛍光発光の効率化、多様化：相補的 RNA とのハイブリッド形成による蛍光発光の効率化と、FRET 法による蛍光の長波長シフト化 (ストークスシフトの増加) を試みた。ピレン並びにピレンエキシマ由来の蛍光を種々の蛍光色素により、ストークスシフトを観測した。

(4) デュシェンヌ型筋ジストロフィ関連

**RNA の蛍光検出：**同疾患に関わる RNA はスプライシング異常に起因するキメラ型 RNA である。ピレンプロープを用い、キメラ RNA の接合部位を対象とし正常 RNA / 異常 RNA の識別を新たなプローブの開発を行った。図 3 に Exon18 ~ Exon21 で見られるスプライシング異常に伴ってできる mRNA 配列と、スプライシング態様検出プローブの基本的配列を示した。

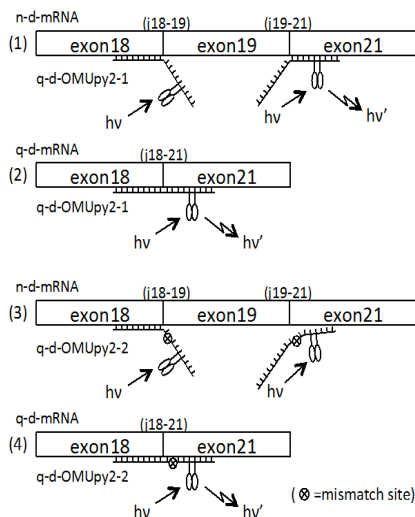


図 3 デュシェンヌ型筋ジストロフィーで見出される mRNA と検出用ピレンプロープの配置。

#### (5) 生細胞中の miRNA-RISC の蛍光検出：

miRNA はそのもの単独で機能することはな、複数のタンパク質と副体を形成することが近年報告された (miRISC)。そこでピレンプロープの検出対象を miRISC とし、ピレンプロープの配列の最適化を行った後、対象 RNA の検出を蛍光発光強度から、細胞内局在を蛍光顕微鏡によりリアルタイムに検出することを試みた。

#### (6) 疾患関連エクソソームの単離：

培養がん細胞 (HeLa) からエクソソーム抽出キットを用いてエクソソームの抽出を試み、得られた沈殿物の TEM 像を得た。

### 4. 研究成果

#### (1) ピレンプロープの作製：

山名等及び小比賀等の開発した修飾ヌクレオシドを用い、モノ及びビスピレン型蛍光プローブを作製した。これまでの研究の結果、ピレン修飾プリンヌクレオシドを含むプローブは無蛍光性であること、また、ピレン修飾ピリミジンヌクレオシドを用いても、隣接ヌクレオチドがプリン型 (特にグアニン) の場合、RNA とハイブリッドを形成しても蛍光発光は著しく小さく、実用に供することは出来なかった。従って、本研究では、UU、UC、CU、CC のコア配列を持ち、それらの 5' 側に G を含まないプローブの設計を行い、RNA 検出能を評価した結果、極めて選択的かつ高感度 (10nM) に RNA を検出することが出来た。

**(2) 高機能化ピレンプロープの作製：**架橋型ヌクレオシドを有するピレンプロープは対象 RNA と安定な A 型ハイブリッドを形成し、同配列の非架橋型ヌクレオシドを用いた場合に比べ、 $T_m$  が 10~20 上昇した。本研究の場合、1,2 塩基のミスマッチを認識することが求められる場合があるが、高い  $T_m$  の場合、ミスマッチ配列を有する RNA と結合し、ミスマッチを認識できない可能性があり、注意が必要であることがわかった。

**(3) 蛍光発光の効率化、多様化：**ピレンプロープが対象 RNA と安定な A 型ハイブリッドを形成した場合、モノピレンプロープは 385nm に極大を持つ蛍光を発し、ビスピレンプロープは 480nm に極大を持つ蛍光を発した。そこで、385nm 付近並びに 480nm 付近の光で励起される蛍光剤をピレンプロープの 5' 位に導入し、蛍光発光極大波長を長波長側にシフトさせる、すなわち FRET の適用も可能であることを明らかにした。現在のシステムでは、FRET 後の発光強度は弱く、今後更なる分子設計が求められる。

#### (4) デュシェンヌ型筋ジストロフィー関連

**RNA の蛍光検出：**デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいては、複数箇所スプライシング異常が生じ、フレームシフトのために生成したジストロフィンの機能が失われる。近年、エキソスキッピング法が松尾らにより提案され、フレームシフトの修正を狙った筋ジストロフィー治療の臨床試験が軌道に乗りつつある。この際、疾患が疑われる患者の診断、エキソスキッピングに基づく治療とその予後においては、正確かつ迅速な RNA 診断が求められる。本研究では図 4 に示したようなスプライシング異常によって生じる数種の RNA を、ピレンプロープを用いた均一溶液解析系で検出し、診断並びに治療効果の早期判定に供すべく、モデル系を用いて本研究の妥当性を検証した。その結果、極めて正確にかつ迅速に変異 RNA を識別できた。プローブの設計・作製、検体の調製、蛍光解析という簡便な系で診断が可能であることを明らかにした。現在、プラスミドに図 4 の系を組み込んだモデル系を構築して、臨床試験への展開を図っている。

#### (5) 生細胞中の miRNA-RISC の蛍光検出：

生細胞を用いた RNA 診断：本ピレンプロープは主骨格をホスホロチオエート型に変更するのみで、生細胞に効率よく取り込まれる。既にホスホロチオエート型ピレンプロープを用い mRNA の生細胞中での検出は報告しているが、本研究では miRISC の検出を試みた。mRNA とは異なり miRISC は単独では存在しにくいことから、miRISC の検出を試みた。その結果、図 5 に示す様に、著明なピレン由来蛍光が生細胞において観測された。本研究で用いたピレンプロープと類似配列を有するア



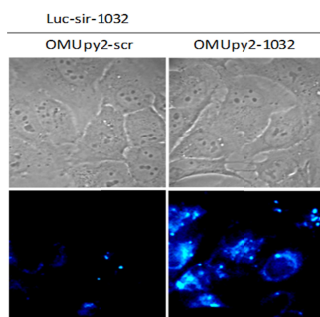


図5 抗ルシフェラーゼmiRISCのピレンプローブによる検出。

ンチセンス核酸がmiRNAと配列特異的に結合することは、既に明らかにされており、本ピレンプローブがmiRNAが関与する生細胞内イベントの解析プローブとして有効であることが明らかになった。

**(6) 疾患関連エクソソームの単離**：市販のキットを用いて得られたエクソソームを含むと想定される沈殿物(視認できず)を定法により透過型電子顕微鏡像を得た。2層状のドーナツ型パーティクル(約50nm)が確認できたが、エクソソームである証明は出来なかった。手法は有効であると思われるが、同定法に問題がある。

## 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4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). (査読有り)
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). (査読有り)
3. Kobori A, Nagae Y, Sugihara Y, Yamayoshi A, Murakami A.  
Rate-adjusted cross-linking reaction by photoresponsive  $\alpha$ -bromoaldehyde (PBA)-conjugated ODN.  
*Bioorg Med Chem Lett.* 23, 5825-5828 (2013). (査読有り)
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, 1117-1119 (2013). (査読有り)

[学会発表](計8件)

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

(RISC機能の制御を目指した遺伝子発現制御素子の開発(II) RISCからのmicroRNA解離効果にアンチセンス核酸の化学構造が及ぼす影響)

日本化学会第95春季年会 講演予稿集 2PB-028. 2015年3月26日~29日 日本大学 理工学部船橋キャンパス(千葉県舟橋市習志野台7丁目24-1)/薬学部(千葉県舟橋市習志野台7丁目7-1)

2. 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ペプチドコンジュゲート核酸の開発

第37回日本分子生物学会年会 1P-0278. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区みなとみらい1-1-1)

3. 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人工機能性核酸の開発

第37回日本分子生物学会年会 3P-0277. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区みなとみらい1-1-1)

4. 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 1P-0278. 2014年11月25~27日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市西区みなとみらい1-1-1)

5. 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 (均一系蛍光分析による選択的スプライシングのRNA診断)

The 41<sup>st</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2014 Program &

Abstracts P031, 194. 2014年11月5~7日.  
北九州国際会議場(福岡県北九州市小倉北区  
浅野三丁目8-1)

6. 村上 章、中嶋康介、川合雅幸、古山紘太、  
山吉 麻子、小堀 哲生  
Homogeneous Fluorescence Assay による選  
択的スプライシングの解析  
第61回 日本生化学会近畿支部例会 要旨  
集 C-4 65. 2014年5月17日 京都産業大  
学 神山ホール(京都府京都市北区上山本山)

7. 川合雅幸、中嶋康介、上田貴子、山吉麻  
子、小堀哲生、村上 章  
RNAの一塩基変異を識別する FRET システ  
ムの開発  
日本化学会第94春季年会 講演予稿集  
2G1-02. 2014年3月27~30日 名古屋大学  
東山キャンパス(愛知県名古屋市千種区不  
老町)

8. 村上 章、中嶋康介、川合雅幸、古山紘太、  
山吉麻子、小堀哲生  
Homogeneous Fluorescence Assay による選  
択的スプライシングの解析  
日本化学会第94春季年会 講演予稿集  
1PB-058. 2014年3月27~30日 名古屋大  
学東山キャンパス(愛知県名古屋市千種区  
不老町)

〔図書〕(計2件)

1. Yamayoshi A, Kobori A, Murakami A.  
Photo-dynamic antisense regulation by photo-  
cross-linkable antisense oligonucleotides.  
*Phoregulation of DNA/RNA functions*,  
Asanuma *et al*, eds, Pan Stanford Publishing  
Pte. Ltd.,(2015; in press).

2. Kobori A, Yamayoshi A, Murakami A.  
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 Interscience, 2014, 58, pp.5.15.  
1-5.15.15.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: RNA分析チップ及び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22日  
国内外の別: 国際特許

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
村上 章(MURAKAMI, Akira)  
京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究  
科・教授  
研究者番号: 60210001

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )  
研究者番号: