

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究（A）
研究期間：2009～2011
課題番号：21686078
研究課題名（和文） CLIP-RNAi法の開発と応用

研究課題名（英文） Development of CLIP-RNAi method

研究代表者

大槻 高史 (OHTSUKI TAKASHI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：80321735

研究成果の概要（和文）：

最近、筆者ら培養プレート上の動物細胞に対して光照射領域特異的にRNAi（RNA配列特異的な遺伝子発現抑制）を誘導する技術（CLIP-RNAi法）を開発した。本課題では、CLIP-RNAi法で用いるキャリア蛋白質の改良により本技術を改良し、多様な波長の光に対応するように本技術を拡張した。また、CLIP-RNAi法を光照射領域特異的な細胞の分化誘導や、In vivoでのRNAiなどに応用することに取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：

RNAi is currently an important experimental tool for basic research into gene function. RNAi also has many potential uses in various biotechnological and therapeutic applications. We recently developed photoinducible RNAi method, termed CLIP-RNAi. In this study, we improved the photoresponsive RNA carrier for CLIP-RNAi. We demonstrate the use of CLIP-RNAi with several fluorescent dyes that can be excited at different wavelengths. We used CLIP-RNAi method in in vitro and in vivo applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
総計	20,700,000	6,210,000	26,910,000

研究分野：生物機能工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：RNAi、光誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) はじめに

近年、siRNAやshRNAなどの小さな2本鎖RNAにより配列依存的に遺伝子発現抑制が起こる現象（RNAi）が注目され、遺伝子機能研究や

創薬研究に幅広く利用されている。筆者らは最近、培養プレート上の動物細胞に対して光照射領域特異的にRNAiを誘導する技術を開発した（Bioconjug. Chem. 2008）。光で切り取る（= clip）ように遺伝子発現を抑える方法なので、この方法をCLIP-RNAi（CPP-linked

RBP-mediated RNA internalization and photoinduced RNAi) と呼ぶことにした.

(2) CLIP-RNAi法の概略

筆者らは細胞膜透過性ペプチド(CPP)とRNA結合蛋白質(RBP)の融合蛋白質CPP-RBPをキャリアとして特定配列のRNAを細胞内に導入する方法を見出した(特開2006-166709)が、導入したRNAがエンドソーム内に閉じ込められていることも分かった。そのため、エンドソームから細胞質へのRNA放出を制御することでRNAi効果を制御することが可能と考えた。そこで、CPP-RBPにAlexa Fluor 546(これは蛍光色素だが、ここではエンドソーム破壊のための光増感剤として用いた)を結合させ、光を当ててCPP-RBP-alexaとshRNAとの複合体を細胞質に放出させる方法を開発した。

(3) CLIP-RNAi法で用いるキャリアおよびRNAについて

研究開始時点で用いていたキャリア蛋白質(CPP-RBP)はTatU1Aである。RBP部分には、分子量が小さくRNA結合能の高いヒトU1A蛋白質N末領域(1-98)を用い、Tatペプチドという11アミノ酸のCPPを融合させた。今までに、CPP-RBPのCPP部分をTatに固定した上で、RBP部分にU1A以外にもハエsex-lethal蛋白質やHIV Revペプチド、Bacteriophage λ N蛋白質などを試した経緯がある。それらの中でTatU1Aが最も良いRNAキャリアであることが示された。TatU1AのC末端のCysには、マレイミド基の付いた光増感剤を結合させた。TatU1Aにより細胞内導入するRNAとしては、12塩基のU1A結合RNA配列(U1A)をループ部分に含むshRNA(shRNAU1A)を用いている。結果として、CLIP-RNAiが可能で、および、汎用的な市販の合成高分子キャリアを用いた場合と比べて非常に細胞毒性が低いことを確認した。この性質は治療薬として発展させる上で大変都合がよく、一般的なRNAi実験にも都合がよいため、本技術を発展させる価値は十分高いと思われる。

2. 研究の目的

本課題では、上記背景をふまえ、CLIP-RNAi法を最適化すると共に、応用展開することを目的とする。具体的には、(1) CPP-RBP型キャリアの最適化、(2) 多様な光増感剤の適用、(3) レーザー光を用いたRNAiのパターニングと一細胞RNAi、に取り組んで技術の発展を目指すとともに、CLIP-RNAi法を(4) 細胞分化の制御、および(5) In vivoでのRNAi、に

適用して、応用展開をはかる。

3. 研究の方法

本研究では、以上の(1)~(5)の研究項目を通じてCLIP-RNAi法の効率を最大限に高め、適応光波長を増やして、遺伝子サイレンシングに基づく研究ツール・治療薬としての発展を目指す。

(1) TatU1Aを軸としたCPP-RBP型キャリアの最適化

今までに、CPP-RBPのCPP部分をTatに固定した上で、RBP部分について数種類ためしてTatU1Aを選んだ経緯はあるが、CPP部分については今までTatしか試していない。そのため、本研究では幾つかの有望なCPPの適用を試みた。CPPとして①Tatと異なる細胞導入ルートをたどると報告されているEB1ペプチド、②Tatを元に改良されたCTP512ペプチド、③蛋白質と融合させた時に導入効率が高いといわれているFHVペプチド、④Tatペプチド2連結型などをU1Aと融合させ、それによるCLIP-RNAi効果をTatU1Aの場合と比較した。さらに、⑤TatU1AのC末に分解タグ(細胞質内に入ったら即時に分解を誘導する配列)を融合させて、RNAi効果に対する影響を調べた。なぜ⑤を調べるかという点、shRNAの細胞内導入後、一部のTatU1Aが外れずにRNAの働きを阻害している可能性が考えられるためである。

(2) 多様な光増感剤の適用

この方法の汎用性を高めるためには、様々な波長の光照射でRNAiを可能にする必要がある。そこで、光増感剤として350-680nmで励起できる色素により標識したTatU1Aを用い、350-680nm付近の光照射を行うことでRNAiの誘導が可能であるかを調べた。さらに、生体透過性の高い近赤外光(特に700-1000nm)の光が利用可能になれば、生体の表面だけでなく深部の照射も可能になる。そこで近赤外光に反応する色素についてもTatU1Aに結合させて、それによるCLIP-RNAiが可能かを調べた。

光照射によるTatU1A-alexa/RNAのエンドソーム外放出が起こる理由は不明であるが、「励起された光増感剤から一重項酸素が生じてエンドソーム破壊に働いた」という可能性が考えられる。一重項酸素を検出する蛍光色素の利用により、各光増感剤について励起後に一重項酸素の放出が起こるかどうかを調べることができるので、その結果と、各光増感剤によるCLIP-RNAiの結果との比較も行った。

(3) レーザー光を用いた RNAi のパターンニングと一細胞 RNAi

これまで主として水銀ランプによる照射を行ってきたが、レーザー光を使うと、さらに精密に照射位置を限定できるはずである。共焦点レーザー顕微鏡のレーザー光を用いて、 $5 \times 5 \sim 200 \times 200 \mu\text{m}$ 程度の領域における CLIP-RNAi や、単一細胞 ($10 \sim 20 \mu\text{m}$) を狙った CLIP-RNAi を試した。複数個所の照射後にインキュベーターに移したのち顕微鏡下で観察するため、照射位置やスキャン数を記録しておく必要がある。そこで、照射パターンを予めデザインして、照射位置を□や○で囲んだチップを入手した。本実験は、初めに CHO 細胞における EGFP の抑制を指標に行った。

(4) CLIP-RNAi 法をより効果的に利用するために、RNA/キャリア複合体で細胞を処理する時間、および、その後に光照射を行うまでの時間を検討した。また、これらの各段階における RNA およびキャリアの細胞内外での安定性を調べた。

(5) 細胞分化の制御

培養シャーレ上で光照射領域特異的に shRNA あるいは miRNA の細胞質内導入を行うことにより領域特異的な細胞の分化誘導を試みた。例として、マウス筋芽細胞株 C2C12 からの筋細胞への分化を試みた。C2C12 細胞は TRB3 遺伝子の発現抑制をすることにより筋細胞への分化促進が起こることが知られている。anti-TRB3 配列の shRNA を用いた CLIP-RNAi により、照射領域特異的な分化誘導を試みた。また、miRNA の miR-133b により筋細胞への分化マーカーが発現することも知られているため、CPP-RBP-光増感剤による miR-133b の導入も並行して試みる。

(6) In vivo での RNAi 効果の検証

治療薬としての応用展開を目指し、生体内において CLIP-RNAi 法による局所的な RNAi 効果が見られるかどうかを検証する。ここでは、ヌードマウス背中皮下の Luciferase 発現腫瘍細胞を植え付け、その細胞に対して CLIP-RNAi を行った。

4. 研究成果

本課題では、CLIP-RNAi 法を最適化すると共に応用展開することを目的として研究を行い、以下の結果を得た。

(1) CLIP-RNAi 法で用いる RNA キャリアの最適化を目指し、元となるキャリア蛋白質 (TatU1A) の改良を行った。キャリア蛋白質の

N 末や C 末のアミノ酸配列を工夫した結果、特に C 末に分解タグを融合させたときに、RNAi 効果が高まることが分かってきた (Matsushita-Ishiodori, et al., Bioconjug. Chem., 2011)。

(2) 本方法の汎用性を高めるため、様々な波長の光照射で RNAi を可能にする必要がある。そこで、光増感剤として Alexa-Fluor 546 以外にも、Alexa-Fluor シリーズおよび Cy-dye シリーズで標識した TatU1A を用い、 $350 \sim 680 \text{nm}$ 付近の光照射を行うことで RNAi の誘導が可能であるかを調べた。結果として、赤色光および近赤外光に応答する光増感剤の中から CLIP-RNAi 法に使えるものが見つかった (特願 2011-063953)。また、光照射後の一重項酸素測定の結果、CLIP-RNAi に使える光増感剤は、定性的には全般的に一重項酸素生成能が高いことが分かった。

(3) CLIP-RNAi 実験について、レーザー光を使うことで、さらに精密に照射位置を限定できることを示すことができた。共焦点レーザー顕微鏡のレーザー光を用いて、 $5 \times 5 \sim 200 \times 200 \mu\text{m}$ 程度の領域における CLIP-RNAi や、単一細胞 ($10 \sim 20 \mu\text{m}$) を狙った CLIP-RNAi を試し、実際にこれらの微細領域における RNAi を引き起こせることを確認した。

(4) CLIP-RNAi 法をより効果的に利用するための、RNA/キャリア複合体で細胞を処理する時間、および、その後に光照射を行うまでの時間について、最適な時間範囲を決めることができた。

(5) 光照射領域特異的な細胞の分化誘導

マウス筋芽細胞株を入手し、筋細胞への分化促進を誘導すると報告されている shRNA [anti-TRB] および、筋細胞への分化マーカー発現を誘導すると報告されている miR-133b を CLIP-RNAi 用のキャリア分子と結合する形で設計した。現在、培養シャーレ上で光照射領域特異的に RNA の細胞質内導入を行うことで、領域特異的な細胞の分化誘導を試みている。

(6) In vivo での RNAi 効果の検証：治療薬としての応用展開を目指し、生体内において CLIP-RNAi 法による局所的な RNAi 効果が見られるかどうかを調べた。ここでは、ヌードマウスの背中皮下に Luciferase 発現細胞を植え付け、その細胞に対して CLIP-RNAi を行った。まだ再現性の確認が必要ではあるが、この実験において照射部位のみで RNAi 効果が見られるという結果を得た。

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 7 件)

- ① Matsushita-Ishiodori, Y., Ohtsuki, T. Photoinduced RNA Interference. Accounts of Chemical Research, 査読有, 2012, in press.
- ② Matsushita-Ishiodori, Y., Kuwabara, R., Sakakoshi, H., Endoh, T., Ohtsuki, T., Photosensitizing carrier proteins for photoinducible RNA interference Bioconjugate Chemistry, Vol. 22, 査読有, 2011, pp. 2222-2226
- ③ Endoh, T. and Ohtsuki, T., Cellular siRNA delivery using TatU1A and photo-induced RNA interference. Methods in Molecular Biology, Vol. 623, 査読有, 2010, pp. 271-281
- ④ Kuwabara, R., Endoh, T., Sisido, M. and Ohtsuki, T. Improvement of CPP-RBD for siRNA delivery, Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, Vol. 16, 査読無, 2010, pp. 191-196
- ⑤ Kitamatsu, M., Kubo, T., Matsuzaki, R., Endoh, T., Ohtsuki, T. and Sisido, M., Carrier PNA for shRNA delivery into cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 19, 査読有, 2009, pp. 3410-3413
- ⑥ Endoh, T. and Ohtsuki, T., Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 61, 査読有, 2009, pp. 704-709
- ⑦ Endoh, T., Sisido M. and Ohtsuki, T., Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi. Journal of Controlled Release, Vol. 137, 査読有, 2009, pp. 241-245

[学会発表] (計 15 件)

- ① Matsushita-Ishiodori Y, Kuwabara R, Sakakoshi H, Endoh T and Ohtsuki T., Design of RNA carrier molecules for photoinduced RNA interference. 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2011. 11. 9~11. 11, Sapporo.
- ② 大槻高史, 光により物質を細胞質内に送達するためのキャリア分子、BioJapan2011、2011. 10. 5-7、横浜
- ③ 石躍由佳, 森長美香, 大槻高史、近赤外光による照射領域特異的 RNAi 誘導法の開発、第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 21-24、京都

- ④ 大槻高史, 松本 祥, 遠藤 玉樹, 石躍 由佳、光応答性キャリア蛋白質を用いた RNA デリバリー、アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム、2011. 9. 1-2、大阪
- ⑤ 大槻高史, 米澤政樹, 松本祥, 遠藤玉樹, 石躍由佳、CLIP-RNAi 法による RNAi の光誘導、第 33 回日本光医学・光生物学会、2011. 7. 22-23、大阪
- ⑥ 石躍由佳、桑原里奈、遠藤玉樹、大槻高史、CLIP-RNAi 法における新規 RNA キャリアタンパク質の開発、第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会、2011. 5. 13、広島
- ⑦ 石躍由佳、桑原里奈、米澤政樹、遠藤玉樹、大槻高史、光照射領域特異的 RNAi 誘導技術の開発、第 20 回アンチセンスシンポジウム、2010. 12. 2-3、神戸
- ⑧ 大槻高史、石躍由佳、遠藤玉樹、宍戸昌彦、CLIP-RNAi 法による遺伝子発現抑制の光誘導、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010. 9. 24-26、大阪
- ⑨ Ohtsuki, T., Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi., 第 4 回 国立台湾大学と岡山大学の大学間交流シンポジウム、2010. 9. 9、岡山
- ⑩ 大槻高史、石躍由佳、遠藤玉樹、宍戸昌彦、細胞質内 RNA 導入の光誘導と CLIP-RNAi、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010. 7. 27-29、東京
- ⑪ 桑原里奈、遠藤玉樹、宍戸昌彦、大槻高史、siRNA デリバリーのための CPP-RBP 型 RNA キャリアの開発、第 32 回分子生物学会年会、2009. 12. 12、横浜
- ⑫ 新谷諒、宍戸昌彦、大槻高史、乳酸菌をキャリアとする核酸デリバリーシステムの開発、第 32 回分子生物学会年会、2009. 12. 12、横浜
- ⑬ 大槻高史、遠藤玉樹、宍戸昌彦、CLIP-RNAi 法による光照射領域特異的な遺伝子発現抑制、第 82 回日本生化学会大会、2009. 10. 23、神戸
- ⑭ Ohtsuki, T., Kitamatsu, M., Endoh, T., Sisido, M., Applications of peptide nucleic acids for RNA purification, RNA detection, and intracellular RNA delivery, The 6' th International Forum On Post-Genome Technologies, 2009. 9. 17、北京
- ⑮ 大槻高史、遠藤玉樹、宍戸昌彦、CLIP-RNAi 法による 1 細胞 RNAi の経時的観察、第 18 回日本バイオイメージング学会、2009. 9. 4、岡山

[図書] (計 1 件)

- ① 石躍由佳, 遠藤玉樹, 大槻高史, 「クローズアップ実験法」可視光照射による RNAi の

時空間的制御法 (CLIP-RNAi 法), 実験医学 5 月号 (羊土社) pp.1297-1302 (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 近赤外光により RNA を細胞質内に送達するための新規なキャリア分子ならびに方法

発明者: 大槻高史、石躍由佳

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-063953

出願年月日: 2011 年 3 月 23 日

国内外の別: 国内

名称: 近赤外光により RNA を細胞質内に送達するための新規なキャリア分子ならびに方法

発明者: 大槻高史、石躍由佳

権利者: 岡山大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/077075

出願年月日: 2011 年 11 月 24 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: 細胞内へ核酸を導入する為の新規な分子並びに細胞内へ導入する核酸および細胞内へ核酸を導入する為の新規な方法

発明者: 川井淳、川上文清、大槻高史、宍戸昌彦

権利者: 東洋紡績株式会社、岡山大学

種類: 特許

番号: 特許第 4709971 号

取得年月日: 2011 年 4 月 1 日

国内外の別: 国内

[その他]

日経産業新聞に記事掲載、「「RNA 干渉」細胞傷めず” H22 年 1 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 高史 (OTSUKI TAKASHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 80321735