

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651221

研究課題名（和文）

RNA が引き起こす細胞内イベントの細胞周期依存性の解析

研究課題名（英文）Analyses of cell-cycle dependency of intracellular events induced by RNAs

研究代表者

大槻 高史 (Takashi Ohtsuki)

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）：

あらかじめ細胞周期を同調させる方法、及び、生細胞において特定細胞周期を可視化しておいて瞬時に細胞内にRNAを導入する方法により、RNAi機構の細胞周期依存性の解析を行った。細胞周期によるRNAi効果の違いは見られたが、再現性の確認が必要である。また、RNA導入時期（細胞周期）との細胞分化との関連を調べることを展望して、miRNAの細胞内導入により筋細胞分化促進を起こす方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Cell cycle dependency of RNAi was analyzed by introducing RNA into cell cycle synchronized cells and by introducing RNA into cells, in which a specific cell cycle was visualized. As a result, cell cycle dependency of RNAi was shown, but reproducibility of the result should be confirmed. In addition, to examine cell cycle dependency of cell differentiation induced by RNA, we established a method to promote muscular cell differentiation promotion by introducing the RNA into cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：バイオテクノロジー、核酸、細胞分化、RNA、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

申請者らは最近、RNA を細胞内に運ぶための TatU1A というキャリア蛋白質を開発した。TatU1A で細胞内に運び込んだ RNA はエンドソームという小胞に溜まってしまいが、TatU1A の C 末に光増感剤 (photosensitizer; PS) を付けた TatU1A-PS を用いた場合、RNA は光刺激によりエンド

ソームから逃れて細胞質に拡がる (Ohtsuki et al., J.Control.Release, 2009)。驚いたことに、この方法で細胞質内に short hairpin RNA (shRNA) を導入し、フローサイトメトリ法によりその RNAi 効果を観察すると、RNAi 効果の表れた細胞群と表れなかった細胞群にはっきり二分化された。そこで疑問なのは、光を当てた場所においてはほぼ 100%

の細胞の細胞質内に RNA が導入されているにも関わらず、全く RNAi 効果が見られない細胞群が半分程度あるというのはなぜだろうかということである。その理由として2つ可能性が考えられる。(1) RNAi が起こるかどうか、細胞の状態、すなわち細胞周期に依存している可能性と (2) 導入された RNA 濃度に依存している可能性である。しかしながら(2)の可能性は考えにくい。なぜなら、別の手法で（おそらく各細胞周期をまたぐような）長時間かけて RNA を導入した場合、（やはり細胞質に入った RNA 濃度に細胞間で多少の差があったものの）RNAi 効果の表れた細胞群と表れなかった細胞群には分かれず、その中間に細胞群が1つだけ表れたからである。そのため(1)の可能性が高いと考えた。

以上の背景に加え、RNAi 機構が細胞周期とどう関係しているのかについては、それまで報告がなかった。そのため、これに関して調べようと考え、次項に述べる研究目的につながった。

2. 研究の目的

RNAi 機構が細胞周期とどう関係しているのかに関して調べることを本研究の第一目的とした。次に、その方法を確立し、RNA により誘導される他の細胞イベント（ここでは一例として細胞分化）についても応用することを第二の目的とした。本研究の特色は、独自に考案した光誘導 RNA 導入法（光刺激によって RNA を細胞質へと導入する方法）を用いて RNA の関わる細胞内イベントの研究に取り組む点である。光誘導 RNA 導入法は、細胞質内 RNA 導入のタイミングを規定でき、エレクトロポレーションやマイクロインジェクションなどと比べて細胞のダメージが非常に少ない。このような光誘導 RNA 導入法の特長に基づいて、本研究目的に関する

以下の実験に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) RNAi の細胞周期依存性の解析

光誘導 RNA 導入法を用いて RNAi の細胞周期依存性を調べた。EGFP を安定発現する CHO 細胞株を用い、EGFP 遺伝子の発現抑制を指標に RNAi 効果を評価した。このとき細胞周期を S 期や M 期に同調させたのちに、RNA の細胞内導入を行い、RNAi 効果の違いを調べた。このとき RNAi の度はフローサイトメトリー法で解析した。つづいて、生細胞において特定細胞周期を可視化しておいて、光誘導 RNA 導入法により瞬時に細胞内に RNA を導入し、異なる細胞周期における RNAi 効果の違いを調べた。

(2) RNA 切り離し型・キャリア/RNA 複合体の創製

光増感型キャリア/RNA 複合体において、shRNA の場合は細胞内で活性が表れるが、他の RNA の場合、光増感型キャリアが離れないために RNA の機能が阻害されているケースも見られる。その場合、光誘導 RNA 導入法で、RNA 関連イベントと細胞周期の関連を調べることはできない。そのため、Mg²⁺非存在下で切れずに細胞内 Mg²⁺濃度下で切れるリボザイムを含むキャリア/RNA 複合体を設計・作製した。さらには、RNaseH 存在下で切れて非存在下で切れないキャリア/RNA 複合体を設計・作製した。

(3) RNA による細胞分化の誘導

光誘導 RNA 導入法により細胞分化誘導を試み、RNA 導入のタイミングとの関連を検討することで、最適な分化誘導条件を見つけることを目的として研究を進めた。ここでは、shRNA または miRNA の導入による筋芽細胞か

ら筋細胞への分化を題材にした。マウス筋芽細胞株 C2C12 から筋細胞への分化の際に発現量が上昇することが知られている miRNA を細胞内に導入し、それによって分化を促進させることができるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) RNAi の細胞周期依存性の解析

細胞周期同調後に、RNA の細胞内導入を行い、RNAi 効果をフローサイトメトリー法で解析した結果、RNAi 効果は細胞周期とある程度の相関を持つことが示唆された。また、生細胞において特定細胞周期を可視化しておいて、瞬時に細胞内に RNA を導入する技術によって、異なる細胞周期における RNAi 効果の違いを調べた。以上の実験手法については確立することができた。細胞周期による RNAi 効果の違いは見えたが、明確な相関を見いだすためにさらに実験を繰り返す必要がある。

(2) RNA 切り離し型・キャリア/RNA 複合体の創製

Mg²⁺非存在下で切れずに細胞内 Mg²⁺濃度下で切れるリボザイムを含むキャリア/RNA 複合体を数種類設計・試作した。その中の 1 つにおいて、細胞外条件で RNA が切り離されず、細胞内条件で RNA が切り離されることを *in vitro* で確認した。また、RNaseH 存在下（細胞内条件）で切れて非存在下（細胞外条件）で切れないキャリア/RNA 複合体を作ることができた。

(3) RNA による細胞分化の誘導～RNA 導入のタイミングの検討～

筋芽細胞株 C2C12 から筋細胞への分化の際に発現量が上昇することが知られている miRNA を細胞内に導入することにより分化促進を起すことができた。さらに、RNA 導入

のタイミングの細胞分化に与える影響については、現在検討中であり、これが明らかになれば再生医療に役立つ様々な細胞分化誘導への適用に向けて展望が開けると考えている。

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 Kitamatsu, M., Kitabatake, M., Noutoshi, Y., Ohtsuki, T., Synthesis and Properties of Peptide Dendrimers Containing Fluorescent and Branched Amino Acids. *Biopolymers: Peptide Science*, 査読有, 2013, 100, pp.64-70, DOI: 10.1002/bip.22175
- ② Matsushita-Ishiodori Y, Ohtsuki T. Photoinduced RNA interference. *Acc. Chem. Res.* 査読有, 2012, 45, pp.1039-1047, DOI: 10.1021/ar200227n
- ③ Matsushita-Ishiodori, Y., Kuwabara, R., Sakakoshi, H., Endoh, T., Ohtsuki, T., Photosensitizing carrier proteins for photoinducible RNA interference *Bioconjug. Chem.* 査読有, 2011, 22, pp.2222-2226, DOI: 10.1021/bc200095a
- ④ Ohtsuka, T., Neki, S., Kanai, T., Akiyoshi, K., Nomura, S. M., Ohtsuki, T., Synthesis and *in situ* insertion of a site-specific fluorescently labeled membrane protein into cell-sized liposomes. *Anal. Biochem.* 査読有, 2011, 418, pp.97-101, DOI: 10.1016/j.ab.2011.06.026

[学会発表] (計 12 件)

- ① Takashi Ohtsuki, Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi, Taiwan-Japan Manomedicine Meeting (January 13-14, 2013, Academia Sinica, Taipei)
- ② 田村佳史, 渡邊和則, 大槻高史, 細胞内 noncoding RNA局在追跡ツールの開発、第85回日本生化学会大会、福岡
- ③ Takashi Ohtsuki, Yuka Matsushita-Ishiodori, Tamaki Endoh, Spatial regulation of specific gene expression through photoactivation of RNAi, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012年11月27-28日, Kyoto
- ④ 大槻高史, 松本祥, 遠藤玉樹, 石躍由佳, 可視光および近赤外光による細胞内RNA導入の誘導、日本バイオマテリアル学会九州ブロック第2回九州地区講演会、2012年9月14日、福岡
- ⑤ 松本 祥, 石躍 由佳, 大槻 高史, 近赤外光及び可視光を用いたCLIP-RNAi、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月6-8日、札幌
- ⑥ 松本 祥, 石躍 由佳, 大槻 高史, CLIP-RNAi法におけるキャリア・RNAの安定性の検討、第53回日本生化学会中国・四国支部例会、2012. 5. 18、岡山
- ⑦ 田村佳史, 石躍由佳, 大槻高史, 細胞内 non-coding RNA局在追跡ツールの開発、日本化学会西日本大会、2011. 11. 12-13、徳島
- ⑧ Yuka Matsushita-Ishiodori, Rina Kuwabara, Hiroyuki Sakakoshi, Tamaki Endoh and Takashi Ohtsuki, Design of RNA carrier molecules for photoinduced RNA interference. 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry,

2011. 11. 9~11. 11, Sapporo.

- ⑨ 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
- ⑩ 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
- ⑪ 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
- ⑫ 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

〔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、2011、pp. 1297-1302

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1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: 同上

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：同上

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]

ホームページ等

<http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/ohtsuki/index.htm>

6. 研究組織

(1) 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