

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710176
 研究課題名（和文）人工塩基対システムによる機能性RNAの培養細胞への導入とその効果の解析
 研究課題名（英文）Activities of functional RNA molecules containing unnatural bases in cultured cells
 研究代表者
 木本 路子 (Kimoto Michiko)
 独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学研究チーム・研究員
 研究者番号：20415144

研究成果の概要（和文）：申請者のグループで開発された人工塩基対システムを利用して、転写により種々の人工塩基を特定部位に組み込んだ機能性 RNA の一種、shRNA、を培養細胞に導入し、その効果と機能を解析することで、人工塩基が細胞内でどのように認識されるかを調べた。その結果、天然型のミスマッチの変異が許容されて shRNA の活性が保持された特定の領域では、天然型塩基の大きさに近い人工塩基であれば、shRNA の活性は損なわれないことがわかった。

研究成果の概要（英文）:By using in vitro transcription with our unnatural base pair systems, we prepared shRNA molecules containing a series of unnatural bases at a specific position and evaluated their RNAi activities in cultured cells. We found that the activity was retained by replacement with unnatural bases in some specific positions within the passenger and guide strands of the shRNA molecules, and that the tolerance by unnatural-base replacements depended on the size of the unnatural base.

交付決定額：

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：生体分子、核酸、バイオテクノロジー、人工塩基対、転写、RNA 干渉、培養細胞

1. 研究開始当初の背景

研究開発当初の背景として、生体内で DNA から転写される non-coding RNA は、small interfering RNA (siRNA) 等の形で遺伝子発現制御に幅広く関与していることが見出されるようになった。また一方で、排他的なワト

ソン・クリック (A-T/U、G-C) 塩基対に加えて新たな人工塩基対の創製を目指した研究が、近年注目されるようになってきた。RNA の様々な機能は、その構成単位であるヌクレオチドの中でも、「遺伝情報・機能分子」としての核酸分子の特性を担う“塩基”の役割は大きい。人工塩基対は、天然の核酸には 4 種類の塩基 (2 種類の塩基対) しか

いという核酸分子の化学的・物理的多様性の限界を超えて、核酸分子に遺伝暗号拡張などの新たな機能を付与することができる。したがって、RNA 研究に人工塩基対を応用することで、天然型塩基のみからなる RNA の研究だけではわからなかった生体内における RNA 分子のメカニズムに関する新たな知見が得られると期待できる。

申請者のグループは、人工塩基対を DNA 中に組み込むことで遺伝情報を拡張する技術の開発に取り組んできており、これまでに転写で機能する種々の人工塩基対を開発し、人工塩基を含む鋳型 DNA と T7 RNA ポリメラーゼを用いることにより、その相補人工塩基を RNA 中の特定部位に導入することに成功していた。この技術を使えば、相補人工塩基に蛍光色素やビオチン等の機能性コンポーネントの置換基を結合した修飾基質も RNA 中の特定部位に取り込ませることもできる研究段階にあり、人工塩基対技術の実用化に向けて、様々な応用例を提示していく必要があった。

2. 研究の目的

本研究課題申請時における当初の研究目的は、この人工塩基対の転写システムを利用して、種々の塩基類似体や機能性置換基を結合した人工塩基を特定部位に組み込んだ siRNA などの機能性 RNA を培養細胞に導入し、細胞内でのそれらの RNA の機能を解析することにより、人工塩基が細胞内でどのように認識されるかを調べることであり、その実験系を確立することにより、新規機能性 RNA の創出を目指した。

3. 研究の方法

本研究課題の機能性 RNA には、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とした shRNA (52-mer) を選定して使用した。shRNA の調製は、化学合成により調製した人工塩基 Pa (ピロール-2-カルバルアルデヒド) を含む鋳型 DNA (69-mer) と、それに相補する種々の人工塩基基質存在下で T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写を行い、ゲル電気泳動による精製を行った。T7 転写では、RNA 中に組み込む人工塩基に応じてその転写用基質を変えることにより、一種類の人工塩基を含む鋳型 DNA を用いて様々な相補人工塩基修飾体を RNA 中に導入できるという利点をいかした。人工塩基の基質に用いた、Pa の相補的人工塩基は、s (6-(2'-チエニル)-2-アミノプリン)、Dss (7-(2,2'-ピチエニル)イミダゾ[4,5-b]ピリジン)、ss (6-(2,2'-ピチエニル)-2-アミノプリン)である。Dss と ss は、転写で機能する人工塩基対として既に開発されていた Ds-Pa 塩基対 (Ds: 7-(2'-チエニル)イミダゾ[4,5-b]ピリジン) と s-Pa 塩基対がその基盤となっ

おり、人工塩基 Ds や s のチオフェンをピチオフェンに置換したプリン塩基類似体で、申請者の所属するグループの合成チームで新たに開発された (図 1)。また、s、Dss、ss は、UV の照射により青色の発光を示す、蛍光性の人工塩基でもある。

調製した種々の shRNA は、そのターゲットとなるレポーター遺伝子 (ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼ) を含むプラスミドとともにリポフェクション法により HeLa 細胞に導入し、ルシフェラーゼの発光から、その遺伝子発現が抑制されているかを調べた (図 2)。

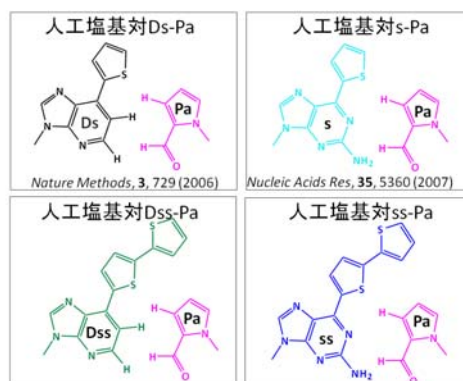


図 1. 申請者のグループで開発された転写で機能する人工塩基対

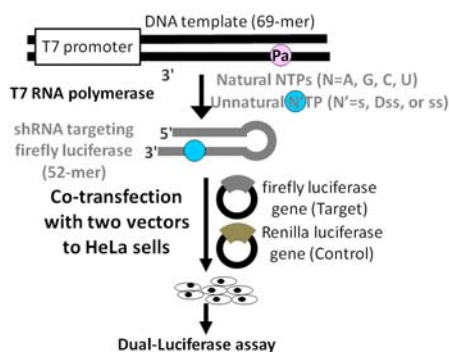


図 2. 人工塩基を組み込んだ shRNA の調製とその活性解析のスキーム

4. 研究成果

(1) T7 転写による人工塩基 s、Dss、ss を組み込んだ shRNA の調製

人工塩基対 s-Pa、Dss-Pa、ss-Pa を利用した T7 転写により、種々の蛍光性人工塩基 (s、Dss、ss) を passenger 鎖もしくは、guide 鎖中に含む 52-mer の shRNA を調製した。目的とする全長からなる人工塩基を含む shRNA 産物は、電気泳動されたゲルにおいて、蛍光性人工塩基がとりこまれていない産物由来のバンドと比べて移動度が異なること、UV (波長 365 nm) 照射により人工塩基由来の蛍光をそのバンドで観察できること、を利用して確認できた。調製した shRNA の二次構造模式図を図 3 に示す。

(2) 培養細胞への shRNA 各種変異体の導入とレポーター遺伝子発現抑制効果の解析

shRNA 中の人工塩基が細胞内でどのように認識されているか、また、shRNA 中のどの位置に人工塩基を組み込むことが可能かを解析するために、その指標として、人工塩基のかわりに天然型塩基による変異を導入した shRNA のバリエーションも作成し (図 3)、その抑制効果も調べることで、その抑制効果の違いが人工塩基の変異に依存するかを検証した。天然型塩基による変異の導入では、もとの塩基が A の場合には G へ、もとの塩基が G、C、U の場合には A に変えている。

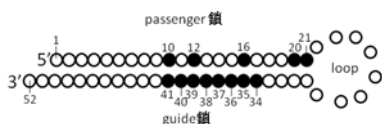


図3. 実験に用いたshRNA(52-mer)の二次構造模式図
人工塩基や天然型塩基の変異を組み込んだ箇所を、黒丸で示す。

人工塩基を含まない野生型 shRNA と各種 shRNA の活性を比較した結果、shRNA の passenger 鎖中の塩基 10 番目、12 番目、16 番目、20 番目、21 番目を蛍光性人工塩基に置換した場合は、天然型塩基置換の場合と同様、shRNA 変異体の活性にはほとんど影響がみられなかった。また、guide 鎖中の塩基 34-41 番目を蛍光性人工塩基に置換した場合は、35 番目、36 番目、37 番目塩基の置換であれば、shRNA 活性を損なわずに、蛍光性人工塩基を導入可能であることがわかった。そして、これらの位置は天然型塩基による置換の場合でも、shRNA 活性がほとんど保持されていた。以上の結果から、passenger 鎖だけではなく guide 鎖中においても、人工塩基 Dss、ss、s の変異を導入しても shRNA の活性には影響を及ぼさない箇所が存在することがわかった。

さらに、shRNA 中の特定部位(36 番目)に形の異なる種々の人工塩基 (s、ss、Dss、Pa、Pa 誘導体) を導入した場合での遺伝子発現効果をさらに詳細に調べた。人工塩基 Pa もしくは Pa 誘導体を組み込んだ shRNA は、人工塩基 Ds を含む鋳型 DNA と Ds に相補する人工塩基 Pa もしくは Pa 誘導体の基質存在下で T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写を行って調製した。各種 shRNA の活性を比較した結果、天然型のミスマッチの変異が許容されて shRNA の活性が保持されていた guide 鎖の特定の領域では、人工塩基 Pa に結合した置換基部分が大きくなるほど shRNA の活性が弱くなることが示唆された。具体的には、蛍光標識で多用されるフルオレセイン基がリンカーを介して結合した Pa 誘導体では shRNA の活性はなくなってしまいが、フルオレセイン部分がピオチン、アミノ基といった小さな置換基となるほど shRNA としての活性は回復し、ピチオフェンが結合した蛍光性人工塩基 (Dss や ss) では shRNA の活性は損なわれなかった。

また、Dss を位置選択的に含む shRNA が導

入された細胞では、人工塩基由来の蛍光を顕微鏡で観察することができた。

(3) PCR と転写を組み合わせた人工塩基対システムの確立

これまで、転写用の人工塩基を含む鋳型 DNA は化学合成により調製していたが、PCR でも調製可能となれば、さまざまな機能性 RNA の調製にも人工塩基対システムの応用が可能となる。そこで、人工塩基 Pa を改変した新たな人工塩基 2-ニトロ-4-プロピニルピロール誘導体(Px)をデザインし、高効率・高選択で PCR 増幅可能な人工塩基対 Ds-Px を開発した。さらには、二つの疎水性人工塩基対 Ds-Px と Ds-Pa を組み合わせた PCR・転写の人工塩基対システムを利用することにより、人工塩基を特定部位に組み込んだ RNA の調製法を確立した。具体的には、疎水性の人工塩基対 Ds-Px を用いた 30 サイクルの PCR で増幅された Ds を含む DNA 断片を調製し、これを鋳型とした転写により、Pa 誘導体を RNA 中の特定部位に導入が可能であることを示した。

(4) 得られた成果の国内外におけるインパクトと今後の展望

人工塩基対の精度が実用化レベルまで達していることを示した本研究成果は、国内外の学会の発表でも注目を集めた。また、本課題で得られた結果をもとに、人工塩基に結合させる新たな機能性コンポーネントのデザインや開発、またそうした人工塩基を組み込んだ新規機能性 RNA の調製、さらには、培養細胞中での新規機能性発現制御などへと発展させていきたいと考えている。

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 6 件)

- ① Site-specific fluorescent probing of RNA molecules by unnatural base-pair transcription for local structural conformation analysis. Y.Hikida, M.Kimoto, S.Yokoyama, and I.Hirao, Nature Protocols, 2010, in press. [査読有]
- ② A unique fluorescent base analogue for the expansion of the genetic alphabet. M.Kimoto, T.Mitsui, S.Yokoyama, and I.Hirao, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 4988-4989. [査読有]
- ③ An unnatural base pair system for efficient PCR amplification and functionalization of DNA molecules. M.Kimoto, R.Kawai, T.Mitsui, S.Yokoyama, and I.Hirao. Nucleic Acids Res., 2009, 37, e14. [査読有]
- ④ Site-specific incorporation of functional components into RNA by transcription using unnatural base pair systems. M.Kimoto, A.Sato, R.Kawai, S.Yokoyama, I.Hirao, Nucleic Acids

Symp. Ser., 2009, 53, 73-74. [査読無]

⑤ Efficient PCR amplification by an unnatural base pair system. M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, Nucleic Acids Symp. Ser., 2008, 52, 469-470. [査読無]

⑥ Sequences around the unnatural base pair in DNA templates for efficient replication. M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, Nucleic Acids Symp. Ser., 2008, 52, 457-458. [査読無]

[学会発表] (計 10 件)

① M. Kimoto、PCR amplification and transcription by a hydrophobic unnatural base pair system for site-specific RNA labeling, 2010 年 5 月 10 日、EVOLVING DNA POLYMERASES: CHEMISTRY MEETS BIOLOGY、スイス モンテペリタ

② S. Liu、Site-specific fluorescent labling of shRNA by an unnatural base pair system、第 19 回アンチセンスー第 5 回 OTS(Oligonucleotide Therapeutics Society)年会合同国際学会、2009 年 11 月 4 日、福岡

③ M. Kimoto、Site-specific incorporation of functional components into RNA by transcription using unnatural base pair systems、2009 年 10 月 1 日、岐阜県高山市

④ 木本路子、PCRと転写で機能する人工塩基対による機能性コンポーネントのRNA中への位置選択的取り込み、第 11 回RNAミーティング、2009 年 7 月 29 日、新潟

⑤ M. Kimoto、Efficient PCR amplification functionalization by an unnatural base pair system、ACS 237th National Meeting、2009 年 3 月 23 日、米国ユタ

⑥ 木本路子、高効率でPCR増幅可能な人工塩基対システムの構築、分子生物学会、2008 年 12 月 10 日、神戸

⑦ I. Hirao、Efficient PCR amplification by an unnatural base pair system、Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC)、2008 年 9 月 9 日、京都

⑧ M. Kimoto、Sequences around the unnatural base pair in DNA templates for efficient replication、Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC)、2008 年 9 月 9 日、京都

⑨ M. Kimoto、Site-specific fluorescent labeling of RNA fragments by transcription using an unnatural base pair system、ACS

236th National Meeting、2008 年 8 月 20 日、米国フィラデルフィア

⑩ M. Kimoto、Site-specific incorporation of fluorescent 2-amino-6-(2-thienyl)purine into RNA by transcription using an unnatural base pair system、XIVth symposium on chemistry of nucleic acid components、2008 年 6 月 10 日、チェコ チェスキークルムロフ

[図書] (計 2 件)

① M. Kimoto and I. Hirao, Site-Specific Incorporation of Extra Components into RNA by Transcription Using Unnatural Base Pair Systems. In Methods in Molecular Biology (The Humana Press Inc., NJ, USA), 2010, in press.

② I. Hirao and M. Kimoto, Expansion of the Genetic Alphabet in Nucleic Acids by Creating New Base Pairs. In The Chemical Biology of Nucleic Acids (John Wiley & Sons), 2010, in press.

[産業財産権]

出願状況 (計 5 件)

①名称: 消光性ならびに蛍光性の核酸塩基類似体とその応用

発明者: 平尾一郎、平尾路子、横山茂之、三井雅雄、山重りえ

権利者: 理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2010-98319

出願年月日: 2010 年 4 月 21 日

②名称: 機能性核酸分子の安定化法

発明者: 平尾一郎、平尾路子、劉爽、野澤巖

権利者: 理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2010-965201

出願年月日: 2010 年 4 月 19 日

③名称: 高選択性・高効率で PCR 増幅が可能な DNA

発明者: 平尾一郎、平尾路子、横山茂之

権利者: 理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2008-94255

出願年月日: 2008 年 3 月 27 日

国内外の別: 国内

④名称: 新規蛍光人工塩基対

発明者: 平尾一郎、平尾路子、横山茂之、三井雅雄

権利者: 理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2009-232776

出願年月日: 2009 年 10 月 6 日

国内外の別: 国内

⑤名称: 特異な塩基対を形成する人工塩基対

発明者: 平尾一郎、平尾路子、横山茂之

権利者: 理化学研究所、タグシクス・バイオ株式

会社種類：特許
番号：特願 2009-232851
出願年月日：2009 年 10 月 6 日
国内外の別：国内

〔その他〕

研究室ホームページ URL：
<http://protein.gsc.riken.jp/hirao/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木本 路子 (Kimoto Michiko)
独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学
研究チーム・研究員
研究者番号：20415144