

平成22年 6月 7日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750136
 研究課題名（和文） non-coding RNAの機能を制御あるいは模倣する新規人工核酸素子の開発
 研究課題名（英文） Development of novel nucleic acid analogs that regulate functions of non-coding RNAs
 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

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、疾患に関与する non-coding RNA（タンパク質をコードしない RNA）の機能に着目し、新しい医薬品創薬を目指した。標的 non-coding RNA として、（1）microRNA と（2）7SK を選択した。それらがいずれも『タンパク質との複合体』となって機能を発現することに焦点を絞り、その機能の要となる『RNA とタンパク質との結合サイト』を（1）阻害、あるいは（2）模倣することで、癌や AIDS の治療に繋がる新規機能性核酸の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Non-coding RNAs are functional molecules associated with various disease, such as cancers and AIDS, development. We focused on functions of (1) microRNA and (2) 7SK non-coding RNAs. These non-coding RNAs exhibited their function as “RNA-Protein complexes”. We developed novel nucleic acid analogs, which inhibit or mimic RNA-Protein interfaces, for the treatment of cancers or AIDS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：核酸化学・生化学・遺伝子工学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：(1) non-coding RNA (2) 核酸 (3) アンチセンス (4) microRNA
 (5) 7SK

1. 研究開始当初の背景

従来、ゲノムの大部分はジャンク DNA であると考えられていた。しかし、最近の研究によりゲノムの少なくとも約7割もの部分が RNA として転写されていることが明らかとなっている (Mattick, JS: Nat Rev Genet, 5,

316-323, 2004)。さらに、それら転写産物の半数以上はタンパク質をコードしない『non-coding RNA』であり、細胞の分化や増殖、プログラム細胞死、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

判明している (Katayama: Nature 309, 1546-1566, 2005)。近年、non-coding RNA が細胞の分化や増殖、プログラム細胞死など、生体において極めて重要なプロセスに関与していることが判明してきた。non-coding RNA の異常は、ガンや AIDS などの重篤な疾患に深く関わっていることが報告されている (A, FExpert, Rev Mol Diagn., 7 :569-603, 2007)。よって、non-coding RNA の機能を特異的に制御する手法の開発は、疾患治療や、未知の non-coding RNA の機能解析において非常に重要となっている。

2. 研究の目的

上記の様に、non-coding RNA の制御機構の異常が、重篤な疾患発生過程において深く関与していることが明らかとなった。この様な多種多様な non-coding RNA の機能を解析するためには、その機能を特異的に制御する手法の開発が求められている。本研究課題では、近年高い関心を集めている non-coding RNA の機能を制御、あるいは模倣する新規核酸素子の開発を目的とした。

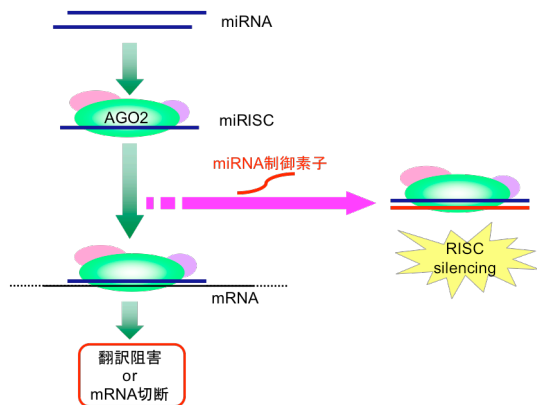


図 1 新規遺伝子制御素子を用い、non-coding RNA の1つである microRNA (miRNA) の機能を特異的に制御する

3. 研究の方法

多種多様な機能性 non-coding RNA が存在し、それらが仲介するさまざまな遺伝子発現制御機構が明らかになっている。本研究課題では、下記の2点に重点を置き、新規核酸医薬開発を推進した。

(1) miRNA 機能制御素子の開発

microRNA (miRNA) は、Argonaute タンパク質 (AGO) を中核とした複合体 (RISC) を形成し、遺伝子発現を制御している。AGO は PiWi ドメインという特徴的なドメインを持つタ

ンパク質であり、RNaseH に酷似した活性をもつ。RISC が標的遺伝子と結合した後、PiWi ドメインが 5' 末端から 10 塩基目を切断することが報告されている (J.-B. Ma, et al: Nature, 434, 666-670, 2005)。PiWi ドメインは、そのアミノ酸残基と RNA の二重鎖構造を厳密に認識することによって標的遺伝子を切断することから、この二重鎖構造にひずみを持たせることで、RISC の活性を制御出来るのではないかと考えた。

そこで、miRNA と結合した際、その二重鎖構造を変化させる核酸素子を用いて、RISC 活性に及ぼす影響を評価した。天然に存在する核酸のピッチ (炭素 3 原子) より 1 原子多いブチレンリンカー、あるいは、1 原子少ないエチレンリンカーでヌクレオチド間を連結させた核酸素子 (TSO) を合成し、RISC 活性に及ぼす影響を評価した。

(2) small 7SK ミミック核酸素子の設計と機能評価

7SK RNA は細胞内に大量 (2×10^5 コピー/細胞) に発現している低分子 RNA である。331nt から成り、進化的に非常によく保存されていることから重要な働きをしていることが予測されてきた。近年、7SK が HEXIM1 というタンパク質と複合体を形成することで、転写を抑制する機能が見出され、また、7SK を knock down すると HIV プロモーター特異的な転写活性が促進されることが明らかとなった (Yang, Z, et al: Nature, 414, 317-322, 2001)。これより、7SK は細胞内に存在する『ウイルス遺伝子発現抑制分子』であると考えられる。

そこで、HIV 複製阻害剤としての応用を目指し、7SK の転写抑制能を模倣する短鎖の機能性人工核酸 (7SK mimic) を開発し、HIV-LTR プロモーターに対する遺伝子発現抑制効果を評価した。

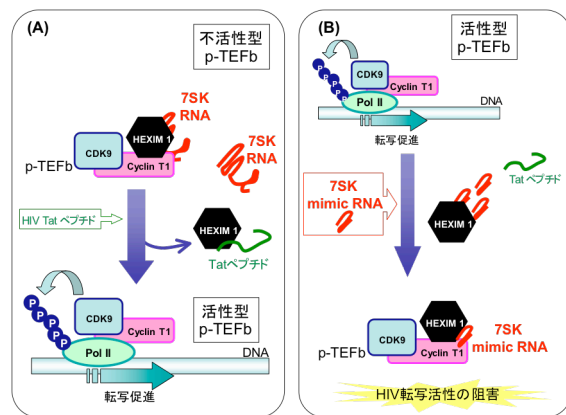


図 2 (A) HIV 感染細胞における 7SK RNA

の機能抑制機構 (B) 7SK ミミック核酸素子による 7SK 機能の回復

4. 研究成果

(1) miRNA 機能制御素子の開発

1,4-ethanediol および 1,6-butanediol の各々の水酸基を DMTr 化、amidite 化し、アルキルリンカーアミダイトユニットを合成した。これらのアミダイトユニットを用いて、固相ホスホアミダイト法により、アルキルリンカー導入型 TSO を合成し、逆相 HPLC により精製を行い、ESI-TOF-MASS により目的物の同定を行った。TSO の核酸骨格としては、2'-O-methyl 型 RNA を採用した。

RISC 抑制能評価のモデル実験系として、GFP をノックダウンする siRNA を選択し、そのガイド鎖に相補的なオリゴヌクレオチド (anti-si) と、アルキルリンカーの導入位置を様々に変化させた TSO を合成した。合成した TSO の RISC 機能抑制能を評価した結果、RISC の切断部位の 2 塩基分をブチレンリンカーに置き換えた TSO が最も RISC 活性を抑制した。この領域は、AGO の PIWI ドメインと相互作用する領域であり、RISC 活性に必須な GW182 タンパク質と AGO との結合部位でもある。これより、AGO と GW182 タンパク質との結合領域の構造を大きく変化させることが RISC 活性を抑制する上で重要ではないかと考察された。

(2) small 7SK ミミック核酸素子の設計と機能評価

7SK のうち、転写の抑制において重要な役割を担っている領域を絞り込むために、アンチセンス法を採用した。その際、7SK の hairpin 構造が、タンパク質との複合体形成において重要なのではないかと考え、hairpin 構造の領域をターゲットとした 5 種の 2'-O-methyl 型アンチセンス核酸を設計・合成した。HIV-LTR プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミドとアンチセンス核酸を、HeLa 細胞に導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりアンチセンス核酸の効果を評価した。その結果、設計した 5 種のうち 2 種のアンチセンス核酸を用いた場合にルシフェラーゼの発光強度が増加する結果が得られた。この 2 種のアンチセンス核酸は、7SK の配列中に 4 箇所ある hairpin 構造のうち、2 箇所を標的としたものであり、アンチセンス核酸が 7SK の標的領域と結合することで、その構造が崩れ、7SK の転写抑制能が低下したものと考えられる。

アンチセンス法の効果が顕著に現れた領域を骨格とし、7SK の転写抑制能を模倣する短鎖の人工核酸 (7SK mimic) を設計・合成した。合成した 7SK mimic の、HIV-1 プロモーター特異的な転写反応に対する抑制能を、アンチセンス実験と同様にルシフェラーゼ

アッセイにより評価したところ、7SK mimic は、HIV-1 プロモーターからの転写活性を顕著に抑制した。これより、7SK mimic の HIV 複製阻害剤としての有効性が示唆された。

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 8 件)

1. M. Higuchi*, A. Yamayoshi*, A. Kobori, A. Murakami. "Specific regulation of point-mutated K-ras-immortalized cell proliferation by a photo-dynamic antisense strategy." *Oligonucleotides*. 20: 37-44 (2010). (* These authors are equally contributed) 査読有
2. A Yamayoshi, D Momokawa, A Kobori, A Murakami. "Development of peptide-oligonucleotide conjugates for regulation of small RNA function", *Nucleic Acids Symp. Series*, 53, 53-54 (2009). 査読無
3. A. Kobori, J. Morita, M. Ikeda, A. Yamayoshi, A. Murakami "Sequence selective formation of 1,N6-ethenoadenine in DNA by furan-conjugated probe", *Bioorg Med Chem Lett*, 19: 3657-60, (2009). 査読有
4. A. Kobori, K. Takaya, M. Higuchi, A. Yamayoshi, A. Murakami "Synthesis and photo-induced cross-linking reactions of 4,5',8-trimethyl-psoralen-incorporated oligodeoxyribonucleotide", *Chem. Lett.* 38(3): 272-273 (2009). 査読有
5. M. Higuchi, A. Kobori, A. Yamayoshi, A. Murakami. "Synthesis of antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralenylmethoxyalkyl adenosine for photodynamic regulation of point mutations in RNA" *Bioorg Med Chem.* 17(2): 475-83 (2009). 査読有

他 3 件

[学会発表] (計 21 件)

1. 山吉麻子・山田有希子・小堀哲夫・村上章: RISC の構造変化を誘起する新規核酸素子の開発 (II) RISC のスライサー活性の制御: 日本化学会第 90 春季年会 2010 年 3 月 29 日: 近畿大学

2. 山吉麻子・福本裕之・林里依・小柳義夫・小堀哲夫・村上章: Non-coding RNA (7SK) の機能を模倣する新規核酸素子の開発: 日本化学会第90春季年会2010年3月29日: 近畿大学
3. 山吉麻子・桃川大毅・小堀哲夫・村上章: RISC を標的とする機能性核酸の新しい設計指針の提案: 日本化学会第90春季年会2010年3月29日: 近畿大学
4. 山吉麻子・安原万里子・Sanjeev Galande・小堀哲夫・村上章: SATB1 を標的とする Decoy DNA の機能評価と新規分子標的医薬としての分子設計: 日本化学会第90春季年会2010年3月29日: 近畿大学
5. 山吉麻子・福本裕之・小柳義夫・小堀哲夫・村上章: Development of novel nucleic acid analogs that mimic functions of non-coding RNA 第32回日本分子生物学会年会2009年12月10日: パシフィコ横浜
6. Asako Yamayoshi, Daiki Momokawa, Akio Kobori and Akira Murakami : DEVELOPMENT OF A NOVEL PEPTIDE-OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATE FOR REGULATION OF SMALL RNA FUNCTION: 国際核酸医薬シンポジウム第5回OTS年会-第19回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム: 2009年11月3日: 九州大学百年講堂
7. Asako Yamayoshi, Yukiko Yamada, Akio Kobori, Akira Murakami : DEVELOPMENT OF NOVEL NUCLEIC ACID ANALOGS FOR THE FUNCTIONAL REGULATION BY INDUCTION OF STRUCTURAL ALTERNATION OF RISC : 国際核酸医薬シンポジウム第5回OTS年会-第19回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム: 2009年11月3日: 九州大学百年講堂
8. Asako Yamayoshi, Mariko Yasuhara, Sanjeev Galande, Akio Kobori, Akira Murakami : DEVELOPMENT OF A NOVEL DECOY MOLECULE FOR BREAST CANCER THERAPY : 国際核酸医薬シンポジウム第5回OTS年会-第19回アンチセンスシンポジウム合同シンポジウム: 2009年11月3日: 九州大学百年講堂
9. 山吉麻子・樋口麻衣子・小堀哲夫・村上章: 機能性核酸による点変異遺伝子の特異的機能制御法の開発: 第82回日本生化学会大会: 2009年10月24日: 神戸ポートアイランド
10. 山吉麻子・山田有希子・小堀哲夫・村上章: RISC 活性部位の構造変異を誘起する新規遺伝子制御素子の開発: 第82回日本生化学会大会: 2009年10月23日: 神戸ポートアイランド
11. 山吉麻子・桃川大輝・小堀哲夫・村上章: PIWI-antagonistic peptide を結合させた遺伝子制御素子の設計と RISC 機能制御: 第82回日本生化学会大会: 2009年10月23日: 神戸ポートアイランド
12. 山吉麻子・安原万里子・小堀哲夫・村上章: SATB1 の機能を制御する機能性核酸の開発: 第82回日本生化学会大会: 2009年10月23日: 神戸ポートアイランド
13. Aasako Yamayoshi・ Daiki Momokawa・ Akio Kobori・ Akira Murakami : Development of peptide-oligonucleotide conjugates for regulation of small RNA function : The 6th International Symposium on Nucleic acids chemistry : 2009年9月29日: 岐阜大学
14. 山吉麻子・桃川大毅・小堀哲夫・村上章: PIWI-antagonistic peptide を結合させた遺伝子制御素子の設計と RISC 機能制御: 第24回生体機能関連化学シンポジウム: 2009年9月15日: 九州大学
15. 山吉麻子・桃川大毅・小堀哲夫・村上章: 人工核酸による non-coding RNA の機能制御 mature-microRNA を標的とした機能性分子の設計指針: 第19回バイオ・高分子シンポジウム: 2009年7月29日: 東京大学
16. 山吉麻子・桃川大毅・小堀哲夫・村上章: PIWI-antagonistic peptide を結合させた遺伝子制御素子の設計と RISC 機能制御: 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム: 2009年7月9日: 大阪大学
17. 山吉麻子・山田有希子・小堀哲夫・村上章: RISC の構造変化を誘起する新規核酸素子の開発: 日本化学会第89春季年会2009年3月29日: 日本大学理工学部船橋キャンパス
18. 山吉麻子・桃川大毅・小堀哲夫・村上章: PIWI-antagonistic peptide を結合させた核酸素子の設計と RISC 機能制御: 日本化学会第89春季年会2009年3月27日: 日本大学理工学部船橋キャンパス
19. 山吉麻子・桃川大毅・山田有希子・小堀哲夫・村上章: PIWI-antagonistic peptide を結合させたアンチセンス核酸の設計と機能評価: 第18回アンチセンスシンポジウム2008年11月17日: 岐阜大学医学部記念館

他2件

〔図書〕（計1件）

1. 山吉麻子、村上 章、アンチセンス核酸法、核酸医薬の最前線（和田猛監修、ジーエムシー出版）、124-136, 2009.

〔その他〕

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：