

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5月30日現在

機関番号：14303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750153

研究課題名（和文）病原タンパク質の細胞内分解を誘導する新規機能性核酸の開発

研究課題名（英文）Development of novel functional peptides that induce ubiquitin-dependent proteolysis of virulence protein

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）：細胞内では、ミスフォールドタンパク質や、不要になったタンパク質を細胞から除去する品質管理機構が働いており、ユビキチンは不要なタンパク質の目印となる『分解タグ』として重要な役割を担っている。本研究課題では、このようなタンパク質の品質管理機構を利用し、病因タンパク質を細胞内で分解するシステムの開発を目的とした。標的タンパク質として、転移性乳ガンで高発現しているクロマチンリモデリング因子である SATB1 を選択し、SATB1 にユビキチン付加を誘導する機能性分子を設計することで、病原タンパク質のユビキチン化を誘導する新規機能性分子の設計と乳ガン細胞に対する増殖抑制効果を評価した。

研究成果の概要（英文）：The mechanism to ensure the quality of intracellular proteins is the selective destruction of misfolded or damaged polypeptides. In eukaryotic cells, 26S proteasome performs the selective degradation of ubiquitylated proteins. We designed and evaluated new functional-decoy, "Degron-decoy", which is expected to recruit ubiquitin ligase and induce ubiquitin-dependent of target proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：核酸化学・機能性分子開発

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ユビキチン、核酸、ペプチド、分子標的薬、ガン

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質は絶えず分解され、アミノ酸に帰し、再び新たなタンパク質として合成される。しかし、タンパク質の分解は無秩序に起こっているのではなく、高い選択性と厳密な制御のもとに行われている。真核生物では、大半のタンパク質がユビキチンを分解の目印として付加された後、プロテアソーム

と呼ばれる巨大な分解酵素複合体により短いペプチド断片にまで消化される。つまり、ユビキチンはタンパク質を分解に導く目印であり、プロテアソームはユビキチンで修飾されたタンパク質を選択的に分解する細胞内装置であるといえる。このタンパク質の分解機構は、ミスフォールドタンパク質や、不要になったタンパク質を細胞から除去する

『品質管理機構』として細胞内で常に働いており、細胞の恒常性維持に不可欠となっている。

2. 研究の目的

本研究課題では、この細胞が本来持っているタンパク質の品質管理機構を利用した、病原タンパク質の機能抑制を達成する新しいサイレンシング手法の有用性を評価することを目的とした。

標的タンパク質として、転移性乳ガンで高発現しているクロマチンリモデリング因子、SATB1 (Special AT-rich sequence-binding protein) を選択した。SATB1 は、正常乳腺細胞には発現しておらず、転移性乳ガン細胞のみで高発現しており、腫瘍発生や転移の促進に関わる1千以上もの遺伝子の発現を制御していることが報告されている (Han et al., Nature, 2008, 452, 187-195)。SATB1 が DNA 結合性タンパク質であることを利用し、SATB1 をトラップする足場として、おとり型核酸 (デコイ DNA) を採用した。SATB1 の認識配列を有する二重鎖 DNA に、『分解タグ』であるユビキチンをリクルートするシグナルペプチド (degron) をコンジュゲートし、トラップした SATB1 にユビキチン (タンパク質分解タグ) を付加させることによって、プロテアソームによる分解を促進させる、新しい核酸医薬の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究課題では、悪性乳ガン細胞の増殖に関わるクロマチンリモデリング因子 SATB1 の機能を特異的に制御する新規核酸医薬の開発を目指し、以下の2点について重点的に検討を行った。

I. ユビキチンリガーゼ認識配列をコンジュゲートしたデコイ DNA (degron-Decoy) の合成と乳ガン細胞における機能評価

Sequences and T_m values of Decoy DNAs			
Decoy DNAs		Sequences	T_m (°C)
SATB1 Decoy	sense	5'-cgg cta tta gta ata a-3'	48.9 (± 0.1)
	antisense	3'-gcc gat aat cat tat t-5'	
Control Decoy	sense	5'-tat tag cgg cta ata a-3'	52.5 (± 0.4)
	antisense	3'-ata atc gcc gat tat t-5'	

基本骨格に SATB1 認識配列を有する 16 量体の二重鎖 DNA (Decoy DNA) を設計した。Decoy DNA の片方の鎖の 5' 末端に、ユビキチンリガーゼである XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) をリクルートするシグナルペプチド (NAVPIAAKSEC) を固相上でコンジュゲートし、切り出し、脱保護の後、逆相 HPLC により精製した (Degron-Decoy DNA)。遺伝子導入試薬 SugarFect (MedGEL) を用い、SATB1

高発現細胞である MDA-MB-231 乳癌細胞株に対する Degron-Decoy の細胞増殖抑制効果及び遺伝子発現抑制効果の評価を行った。

II. degron-Decoy の核内送達効率の評価ならびに NLS 配列を付与した新たな degron-Decoy の設計と合成

MDA-MB-231 細胞はオリゴ核酸の核内送達効率が非常に低い細胞株である。このため、遺伝子導入試薬の検討ならびに、NLS 配列を有する degron-Decoy の設計と合成を行った。NLS 配列として、SV40 および SATB1 の NLS 領域を選択し、Fmoc 固相合成法により各々の NLS-peptide を合成した。NLS-peptide のシステイン残基の SH 基と、5' 末端にマレイミド基を持つオリゴ DNA を作用させ、コンジュゲート体を得た後、HPLC により精製を行った。

4. 研究成果

I. ユビキチンリガーゼ認識配列をコンジュゲートしたデコイ DNA (degron-Decoy) の合成と乳ガン細胞における機能評価

まず、Degron ペプチドを導入していない Decoy DNA 単独の細胞増殖抑制効果を評価した。Decoy DNA を MDA-MB-231 細胞に導入し、WST-1 assay により増殖抑制効果を定量した結果、460nM で 20%、860nM で 60% の細胞増殖抑制効果が認められた。また、Decoy DNA 処理した MDA-MB-231 細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、SATB1 下流遺伝子 (S100A4, CTGF, ERBB2, VEGFB) の発現が抑制されていることを確認することが出来た。さらに、Migration Assay により細胞の遊走能評価を行ったところ、Decoy DNA 処理した MDA-MB-231 細胞の遊走能が顕著に抑制されることが明らかとなった。以上の様な効果は、コントロール配列を有する Decoy DNA の場合には認められなかった。これより、我々の設計した Decoy DNA は、SATB1 の機能を制御する上で有効な分子骨格となることが示された。

II. degron-Decoy DNA の核内送達効率の評価ならびに NLS 配列を付与した新たな degron-Decoy の設計と合成

ユビキチンリガーゼである XIAP をリクルートするシグナルペプチドをコンジュゲートしたデコイ DNA の合成を行った (degron-Decoy)。合成した degron-Decoy を MDA-MB-231 乳癌細胞株に導入し、細胞増殖抑制効果を評価しようと試みた。しかし、SATB1 が局在する細胞核内に degron-Decoy を送達することが極めて困難であることが明らかとなった。種々の核酸導入試薬を用いてもこの問題点を解決することが出来なかったため、degron-Decoy に核移行シグナルペプチド

(NLS)を導入してさらなる高機能化を図った。NLSとして、既報でその有効性が確認されているSV40のNLS配列に加え、SATB1のNLS配列を選択し、degron-Decoyに導入した(degron-NLS-Decoy)。SATB1のNLS配列を介してdegron-NLS-Decoyが細胞核内に送達されることで、SATB1自身の核移行が阻害され、さらなる効果が期待される。また、SATB1陽性でMDA-MB-231細胞より核酸の細胞内導入効率の良い細胞を、HCT-15細胞を用いて作成した。今後、作成したSATB1陽性細胞ならびにdegron-NLS-Decoyを用い、degron-NLS-Decoyの核酸医薬としての有効性評価を行っていききたい。

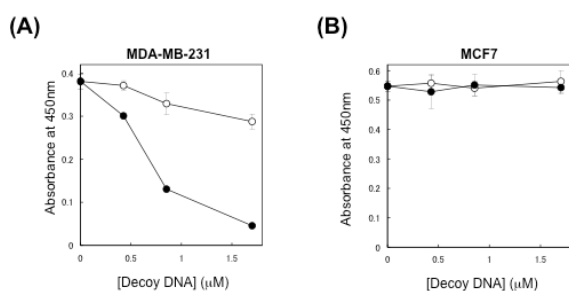


図1 Decoy DNAの細胞増殖抑制効果

(A) MDA-MB-231 (SATB1-positive)

(B) MCF7 (SATB1-negative)

● : SATB1 Decoy, ○ : Control Decoy

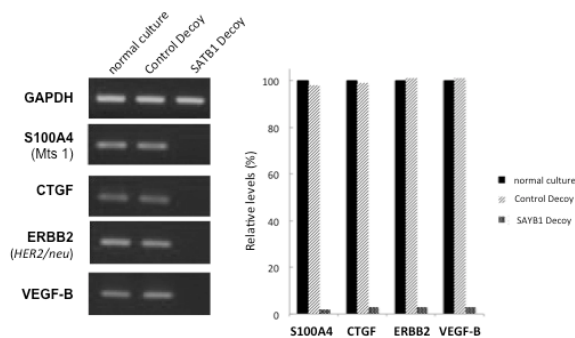


図2 RT-PCRによるSATB1下流遺伝子の発現量評価

[Decoy DNA] = 460nM

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. R. Moriyama, J. Mochida, A.

Yamayoshi, N. Shimada, A. Kano and A. Maruyama. "Preparation of Cationic Comb-Type Copolymer Having Tetra-Alkylammonium Groups and its Interaction with DNA" *Current Nanoscience*, in press. 査読有

2. R. Waki, A. Yamayoshi, A. Kobori, A. Murakami. "Real-time Imaging of RNA Expression in Living Cells Using Bispyrene-modified RNA Probes" *Chem. Lett.*, **40**, 1247-1248 (2011). 査読有
3. A. Yamayoshi*, M. Yasuhara, G. Sanjeev, A. Kobori, A. Murakami. "Decoy-DNA against SATB1 inhibits the growth and invasive ability of human breast cancer" *Oligonucleotides*, **21**, 115-21, 2011. 査読有
4. R. Waki, A. Yamayoshi, A. Kobori, A. Murakami. "Development of a system to sensitively and specifically visualize c-fos mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes." *Chem. Comm.*, **47**, 4204-4206 (2011). 査読有

[学会発表] (計74件)

1. 山吉麻子、向井貴俊、小堀哲生、村上章 リンカー導入型遺伝子制御素子を用いたRISCの機能制御：日本化学会第92春季年会，3D7-51，2012（2012年3月27日、慶応大学、神奈川県）
2. 山吉麻子、向井貴俊、山田有希子、小堀哲生、村上章：リンカー導入型遺伝子制御素子を用いたRISCの機能制御：第34回日本分子生物学会年会，4P-0146，2011（2011年12月16日、パシフィコ横浜、神奈川県）
3. 山吉麻子、向井貴俊、山田有希子、小堀哲生、村上章：Allosteric regulation of RISC function by oligonucleotides containing a linker moiety：38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry：ISNAC 2011. 58，2011（2011年11月9日、北海道大学、北海道）
4. 山吉麻子、吉川幹剛、安原万里子、Galante, S.、小堀哲生、村上章：病原タンパク質の細胞内分解を誘導するナノ複合化ペプチド医薬の開発：第60回高分子討論会，1W15，2011（2011年9月28日、岡山大学、岡山県）
5. 山吉麻子、林里依、駒野淳、小柳義夫、小堀哲生、村上章：non-coding RNA (7SK)の機能を模倣する人工核酸の創製とHIV複製阻害剤としての機能評価：第5回バイオ関連化学シンポジウム，

- 1P-084, 2011 (2011年9月13日、つくば国際会議場、茨城県)
6. 山吉麻子、松山洋平、小堀哲生、村上章 : Development of novel peptide-oligonucleotide conjugates for regulation of small RNA function : Sixth Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, Poster Abst. 101, 2011 (2011年9月5日、ケンブリッジ大学、イギリス)
 7. 山吉麻子、林里依、小堀哲生、駒野淳、小柳義夫、村上章 : 7SK snRNA と HEXIM1 タンパク質との相互作用に着目した転写スイッチングシステムの開発 ~HIV に対する新規転写阻害剤の開発を目指して~ : アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011, 113, 2011 (2011年9月1日、大阪大学、大阪府)
 8. 山吉麻子、向井貴俊、山田有希子、小堀哲生、村上章 : mature-microRNA を標的とした機能性分子の設計指針 (II) RISC の構造と機能に着目したリンカー導入型遺伝子制御素子の開発 : アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011, 81, 2011 (2011年9月1日、大阪大学、大阪府)
 9. 山吉麻子、吉川幹剛、安原万里子、小堀哲生、村上章 : ユビキチンリガーゼ活性を利用した病因タンパク質の新規細胞内分解システムの開発 : 第40回医用高分子シンポジウム, 121-122, 2011 (2011年7月25日、関西大学、大阪府)
 10. 山吉麻子、林里依、駒野淳、小柳義夫、小堀哲生、村上章 : Non-coding RNA (7SK) の機能を模倣する人工核酸の創製と HIV 複製阻害剤としての機能評価 : 第21回バイオ・高分子シンポジウム, 73-74, 2011 (2011年7月25日、関西大学、大阪府)
 11. 山吉麻子、榎田幹彦、曾和義広、田村裕、小堀哲生、村上章 : メチル化 DNA 結合性タンパク質の機能阻害を目指した3重鎖形成核酸の設計 : 第57回高分子研究発表会(神戸), 215, 2011 (2011年7月15日、兵庫県民会館、兵庫県)
 12. 山吉麻子、吉川幹剛、安原万里子、Galanda, S.、小堀哲生、村上章 : 病因タンパク質の細胞内分解を誘導する新規核酸ドラッグの開発 : 第57回高分子研究発表会(神戸), 214, 2011 (2011年7月15日、兵庫県民会館、兵庫県)
 13. 山吉麻子、向井貴俊、山田有希子、小堀哲生、村上章 : リンカー導入型遺伝子制御素子を用いた細胞内低分子 RNA の機能制御 : 第57回高分子研究発表会(神戸), 38, 2011 (2011年7月15日、兵庫県民会館、兵庫県)
 14. 山吉麻子、松山洋平、小堀哲生、村上章 : Development of novel nucleic acid analogs for functional regulation of RISC : 第16回 RNA Society Meeting "RNA 2011 Kyoto", 172, 2011 (2011年6月15日、京都国際会館、京都府)
 15. 山吉麻子、吉川幹剛、安原万里子、GALANDE, S.、小堀哲生、村上章 : 病原タンパク質の細胞内分解を誘導する新規機能性核酸の開発 : 日本化学会第91春季年会, 4B7-17, 2011 (2011年3月29日、神奈川大学、神奈川県)
 16. 山吉麻子、林里依、小堀哲生、駒野淳、小柳義夫、村上章 : Non-coding RNA (7SK) の機能を模倣する新規核酸素子の創成 (II) 7SK mimic の HIV 複製阻害剤としての機能評価 : 日本化学会第91春季年会, 1B7-54, 2011 (2011年3月26日、神奈川大学、神奈川県)
 17. 山吉麻子、松山洋平、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、村上章 : Development of novel nucleic acid drugs for functional regulation of RISC : Pacificchem 2010, 120, 2010 (2010年12月17日、ハワイコンベンションセンター、アメリカ合衆国)
 18. 山吉麻子、安原万里子、吉川幹剛、Galanda S.、小堀哲生、村上章 : ユビキチンリガーゼ活性を利用した病因タンパク質の新規細胞内分解システムの開発 : BMB 2010, 4P-0558, 2010 (2010年12月10日、神戸ポートアイランド、兵庫県)
 19. 山吉麻子、林里依、福本裕之、小柳義夫、駒野淳、小堀哲生、村上章 : Non-coding RNA (7SK) の機能解析と機能性人工核酸としての応用 : BMB 2010, 2P-0556 (2010年12月10日、神戸ポートアイランド、兵庫県)
 20. 山吉麻子、林里依、福本裕之、駒野淳、小柳義夫、小堀哲生、村上章 : Non-coding RNA (7SK snRNA) の機能を模倣する新規人工核酸の創成と HIV 複製阻害剤としての応用 : 第20回アンチセンスシンポジウム, 69, 2010 (2010年12月3日、甲南大学、兵庫県)
 21. 山吉麻子、松山洋平、小堀哲生、村上章 : 光架橋性アンチセンス核酸を用いた RISC 機能制御法の開発 : 第20回アンチセンスシンポジウム, 64, 2010 (2010年12月3日、甲南大学、兵庫県)
 22. 山吉麻子、松山洋平、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、村上章 : mature-microRNA を標的とした機能性分子の設計指針 : 第20回アンチセンスシンポジウム, 33, 2010 (2010年12月3

- 日、甲南大学、兵庫県)
23. 山吉麻子、松山洋平、小堀哲生、村上 章
Regulation of RISC function by photoreactive oligo -nucleotides containing psoralen-conjugated adenosine : 37th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry: ISNAC 2010, 290-291, 2010 (2010年10月10日、はまぎんホール、神奈川県)
 24. 山吉麻子、福本裕之、林 里依、小堀 哲生、駒野 淳、小柳義夫、村上 章
Development of novel nucleic acid analogs that mimic functions of non-coding RNA(7SK) : 37th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry: ISNAC 2010, 58-59, 2010 (2010年10月10日、はまぎんホール、神奈川県)
 25. 山吉麻子、松山洋平、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、村上 章:人工核酸による non-coding RNA の機能制御 mature-micro RNA を標的とした機能性分子の設計指針:第4回バイオ関連化学シンポジウム, 34, 2010 (2010年9月25日、大阪大学、大阪府)
 26. 山吉麻子、松山洋平、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、村上 章: microRNA を標的とした新規遺伝子制御分子の開発-RISC 構造のフォールディングを乱す機能性分子の設計: 第59回高分子討論会, 4949, 2010 (2010年9月17日、北海道大学、北海道)
 27. 山吉麻子、福本裕之、林 里依、小堀哲生、駒野 淳、小柳義夫、村上 章:Development of novel nucleic acid analogs that mimic functions of non-coding RNA (7SK):XVIII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.138-139, 2010(2010年9月1日、リヨン大学、フランス)
 28. 山吉麻子、松山洋平、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、村上 章:人工核酸による non-coding RNA の機能制御 (II) RISC 機能の抑制を目指した機能性分子の開発:第20回バイオ・高分子シンポジウム, 105-106, 2010 (2010年7月29日、東京大学、東京都)
 29. 山吉麻子、松山洋平、小堀哲生、村上 章
RISC 機能制御を目指した機能性核酸素子の開発(1)光応答性分子ソラレンを有する核酸素子の機能評価:高分子研究発表会(神戸) P185, 2010 (2010年7月16日、兵庫県民会館、兵庫県)
 30. 山吉麻子、林 里依、福本裕之、小柳義

夫、駒野 淳、小堀哲生 村上 章:Non - coding RNA (7SK) の機能解析と機能性人工核酸としての応用:高分子研究発表会(神戸) P184, 2010 (2010年7月16日、兵庫県民会館、兵庫県)

31. 山吉麻子、桃川大毅、山田有希子、小堀哲生、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:遺伝子・デリバリー研究会 第10回シンポジウム, 2C-04, 2010 (2010年6月2日、北海道大学、北海道)
32. 山吉麻子、桃川大毅、小堀哲生、村上 章
Development of a Novel Peptide-Oligonucleotide Conjugate for Regulation of Small RNA Function : The 19th meeting RNA Sciences in Cell and Developmental Biology, P33, 2010(2010年5月10日、理化学研究所、兵庫県)

他 42 件

[図書] (計1件)

1. 山吉麻子、ES 細胞で発見された新しい DNA 塩基、 \sim 5-formyl シトシンと 5-carboxyl シトシン \sim
化学 (化学同人), 67, 82-83, 2012.

[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: