

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 5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750180

研究課題名（和文） 架橋性核酸を用いた標的遺伝子の選択的活性化

研究課題名（英文） Activation of target genes with crosslink-forming oligonucleotide

研究代表者

萩原 伸也（HAGIHARA SHINYA）

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：80373348

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、申請者らの開発した反応性核酸の利点である『共有結合による強固な結合性』を最大限に活用し、『標的 mRNA に作用する miRNA を選択的に阻害する』という新しいアプローチで遺伝子の活性化を図った。標的遺伝子を選択的に活性化させる我々の手法は、ウイルス等により遺伝子を導入する従来法と比較して安全面・倫理面での問題点が少なく、医療・生命科学における画期的な遺伝子発現調節ツールになると期待される。

研究成果の概要（英文）：Crosslink forming oligonucleotide (CFO) was used for target gene specific Inhibition of microRNA (miRNA) functions. The method can interfere with specific miRNA-mRNA interactions by recognizing the sequences unique to the 3'-UTR that are inherent in each mRNAs.

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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸関連化学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子治療、iPS 細胞の樹立、様々な細胞への分化誘導など、次世代医療として早期の実用化が期待されている技術には、「目的の遺伝子を細胞内で如何にして活性化させるか」という根本的な課題が残されている。これまで、目的の遺伝子を活性化するには、その遺伝子をウイルスなどのベクターを用いて細胞内へ導入し、過剰発現させる方法が用いられてきた。しかし、この方法はウイルスによる遺伝子の挿入を伴うため、癌化や変異の導入といった安全面・倫理面での問題が指摘されている。実際に効果がみられた遺伝子治療法が、白血病という重篤な副作用のために中止になった例もある。また、iPS 細胞の作製においても、遺伝子導入に伴う癌化をどのよ

うに防ぐかが課題となっている。

一方、申請者の研究グループでは、標的の RNA と二本鎖を形成することにより架橋反応を起こす機能性核酸の開発を行ってきた。RNA の 2'位水酸基に Me 基を導入した 2'-OMe RNA は、相補的な RNA に対する結合性とヌクレアーゼ耐性を併せ持っており、mRNA に結合して翻訳を阻害するアンチセンス核酸としてよく用いられている。この 2'-OMe RNA に申請者らの開発した反応性核酸塩基 2-amino-6-vinylpurine (AVP) を組み込んだオリゴ核酸は、相補的な RNA 上の uracil (U) と図 1 の架橋反応を起こす。この反応は酸性条件下でしか進まないと考えられていたが、申請者は、AVP の前後の塩基配列を調節することで、RNA との架橋反応を中性条件

において高効率で進行させることに成功した。さらに、この架橋形成が細胞内での遺伝子発現を強力に抑制することが明らかになっている。

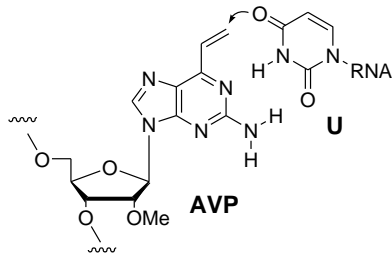


図1. 2-amino-6-vinylpurine (AVP)と標的RNA上のUracil (U)との架橋反応

2. 研究の目的

本研究課題では、『目的の遺伝子を抑制する』のに有効な AVP 導入 2'-OMe RNA を、『目的の遺伝子を活性化する』ツールへと展開することを試みた。mRNA は、タンパク質をコードした翻訳領域と、その上流および下流の非翻訳領域からなっている。これまでの研究では、AVP 導入 2'-OMe RNA を標的 mRNA の翻訳領域に結合させ、リボソームによる翻訳を阻害させてきた。一方、本課題では、標的 mRNA の 3'非翻訳領域に存在する microRNA (miRNA) 結合サイト (MBS) へ AVP 導入 2'-OMe RNA を架橋させた (MBS マスキング、図 2)。これにより、翻訳を抑制する miRNA の接近が阻害され、結果として標的遺伝子が選択的に活性化されると考えられる。この様に低分子量の機能性核酸を用いて標的遺伝子を選択的に活性化する手法は他に例が無

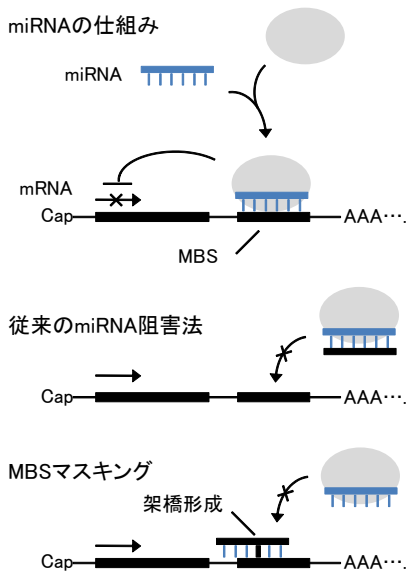


図2. miRNAの仕組みと阻害方法

い。遺伝子の抑制と活性化の両方を人工的に制御できる我々の AVP 導入 2'-OMe RNA は、医療・生命科学における究極の遺伝子発現調

節ツールとして期待される。

本課題達成に向けた具体的な期間内目標は、以下の2点とした。

(1) MBS マスキングの翻訳に対する影響性
本申請に示した MBS マスキングによる遺伝子活性化は、これまでに類似の研究が報告されていない。まずは、確実に架橋を形成した mRNA を細胞外で調製し、これを細胞内へ導入して翻訳させる。その発現効率を非架橋の mRNA と比較することで、我々のコンセプトが実際に機能することを明らかにする。

(2) 細胞内架橋形成による標的遺伝子活性化
AVP 導入 2'-OMe RNA と標的 mRNA との架橋反応が細胞内で進行することを明らかにするとともに、細胞内架橋反応による遺伝子発現量の変化を解析し、本手法が細胞内で機能することを実証する。

3. 研究の方法

本研究は、以下の4項目に分けて進めた。

- (1) 反応性核酸の合成 AVP: モノマーユニットの合成とオリゴ核酸への導入
- (2) 評価系の構築: 細胞系での評価に用いる発現体の構築
- (3) 細胞外架橋実験: 本研究の基盤となるコンセプトの実証
- (4) 細胞内架橋形成による翻訳活性化: 将来の実用化に向けた検討

研究初期段階は、研究協力者1名(修士学生)が(1)、申請者が(2)の項目にそれぞれ専念した。初年度後半から(3)の評価へ移行し、この項目を最も重点的に検討した。これと並行して、次年度前半頃から(4)を開始し、研究目的に示した2つの期間内目標の達成をめざした。

4. 研究成果

(1) 反応性核酸の合成

2-amino-6-vinylpurine (AVP) 導入 2'-OMe RNA は、ビニル基を SMe 基で保護した AVP および他の4種類の核酸塩基のモノマーユニットを用いて、ホスホロアミダイト法により合成した。これまで、AVP モノマーを合成する際には、guanosine を出発原料として初期段階で2'位に Me 基を導入するルートを取っていた。本研究では、細胞膜透過性・酵素耐性・標的 RNA との結合性の向上を期待し、2'-OMe 基の代わりに種々の官能基を導入することを計画した。このことを考慮し、本研究では Me 基の導入を終盤で行う新規合成ルートを開拓した。

AVP 導入 2'-OMe RNA は、AVP の前後の塩基配列によって架橋形成の効率が大きく異なる。従って、合成した 2'-OMe RNA は、まず短いモデル RNA に対する反応性をゲル電気泳動により評価した。その結果、標的 mRNA に対して高効率、高選択的に反応する架橋性核酸が得られた。

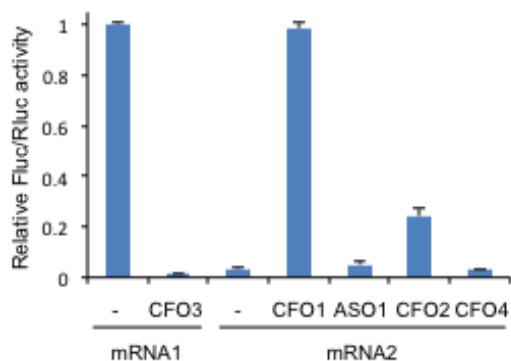
(2) 評価系の構築

標的遺伝子の発現量変化の解析には、ホタル由来ルシフェラーゼをレポーターとして用いた。細胞内解析用ベクターとして、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3'側非翻訳領域に miRNA の標的配列を挿入した真核生物発現用ベクターを構築した。このベクターは、ウミシイタケ由来のルシフェラーゼも同時に発現するため、2 種類のルシフェラーゼの発現量を比較することにより、細胞内での発現量変化を定量的に解析できる。

次いで、細胞内解析用ベクターから PCR により *in vitro* 発現用のルシフェラーゼ cDNA を調製した。この際、T7 プロモーター配列を有するプライマーを用いることで、cDNA に T7 プロモーターを導入した。この cDNA に対して、キャップ化試薬の存在下で T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写反応を行った後、酵素により poly A の付加を行い、細胞外架橋実験用の mRNA を合成した。

(3) 細胞外架橋実験

本研究の基本コンセプトである「miRNA 結合サイトのマスキングによる翻訳活性化」が実際に機能することを検証するため、(2)で調製した mRNA を細胞外で反応性核酸と架橋形成させた後、細胞へトランスフェクションした。細胞内で発現したルシフェラーゼの活性を非架橋のものと比較することで、MBS マスキングの効果を見積もった。

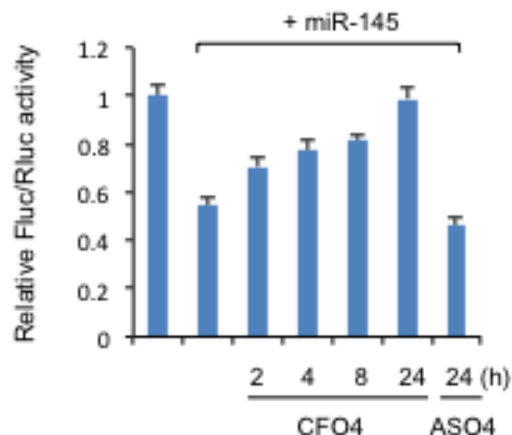


miRNA 結合サイト(MBS)を mRNA に導入することにより、ルシフェラーゼの発現量は大幅に低下した(mRNA1→mRNA2)。これに対し、予め架橋性核酸(CFO3)を MBS に結合させておく事により、miRNA の効果は殆ど抑制され

た。一方、架橋性を持たない ASO1 ではこの効果が見られなかった。これらの結果から、架橋性核酸による MBS マスキング効果の有効性が実証された。

(4) 細胞内架橋形成による翻訳活性化

細胞内評価用ベクターと反応性核酸を細胞へ同時にトランスフェクションし、細胞内で発現される mRNA に対する架橋形成で起こる「miRNA 結合サイトのマスキングによる翻訳活性化」を評価した。



その結果、架橋反応時間に応じて miRNA 効果の抑制が観察された。このことから、細胞内架橋形成を介した MBS マスキングの効果を実証することができた。

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 1 件)

① Shinya Hagihara, Shuhei Kusano, Wei-Chen Lin, Xiao-guang Chao, Tsuneaki Hori, Shuhei Imoto, Fumi Nagatsugi, "Production of truncated protein by the crosslink formation of mRNA with 2'-OMe oligoribonucleotide containing 2-amino-6-vinylpurine" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 22, 3870-3872, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.123

[学会発表] (計 4 件)

① 萩原伸也、草野修平、井田裕太、岩本直生、永次史「架橋性オリゴ核酸を用いた細胞内遺伝子発現制御」日本化学会第93春季年会, 2013年03月25日, 立命館大学

② 井田裕太、草野修平、岩本直生、萩原伸也、永次史「立体配座を固定化した新規架橋性分子の開発」日本化学会第93春季年会, 2013年03月25日, 立命館大学

③ 萩原伸也、草野修平、鈔暁光、岩本直生、永次史「機能性オリゴ核酸のRNAへの架橋形

成による遺伝子発現制御」第92日本化学会春季年会, 2012年3月26日, 神奈川

④萩原伸也、井本修平、鈔暁光、堀恒晃、草野修平、永次史 ”2'-OMe RNA containing 2-amino-6-vinylpurine as a potent gene regulator” 第38回国際核酸化学シンポジウム, 2011年11月9日, 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 伸也 (HAGIHARA SHINYA)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：80373348

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：