

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282232

研究課題名(和文)PCDR技術による細胞機能の光制御

研究課題名(英文)Optical control of cellular functions by PCDR technology

研究代表者

大槻 高史(Ohtsuki, Takashi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：80321735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筆者らが開発した「光依存的な細胞質内RNA導入技術」(Photoinduced Cytosolic Dispersion of RNA; PCDR技術)をベースに「可視光および近赤外光による細胞機能の制御系」を開発した。近赤外光による細胞質内RNA導入法の開発、複数波長の光による複数のRNA導入のタイミング制御、3次元的な細胞集団への適用、光による細胞内翻訳や分化の制御などに取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：In this study, methods to control cellular functions by visible and infrared light were developed based on “Photoinduced Cytosolic Dispersion of RNA (PCDR) technology” for introducing RNAs into cytoplasm only within irradiated cells. Optimization of PCDR using infrared light, temporal control of introduction of two kinds of RNAs, the application to spheroid (three-dimensional multicell model), and optical control of the cell functions have been archived.

研究分野：生体分子工学

キーワード：核酸 RNA 光誘導 翻訳 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、広範な細胞機能に関わる、多様な「機能性 RNA」の働きが注目されている。たとえば、ヒトに 1000 種類以上存在する micro RNA (miRNA) は、主として翻訳制御機構を通じて細胞分化や腫瘍形成など多様な細胞機能に関わっている。このような天然の機能性 RNA の細胞内導入により細胞機能を人工制御する方法は RNA の機能解明の一手段として非常に有用である。また、RNAi を引き起こす siRNA や shRNA、触媒活性をもつリボザイム、代謝物の存在量に応じて活性の ON/OFF をするリボスイッチなど、人工的に設計された機能性 RNA は、合成生物学的視野からするとバイオシステム構築のうえで非常に役立つ。つまり、天然または人工の機能性 RNA を用いた「細胞機能の人工的制御法」は RNA 研究および合成生物学研究の手段として極めて有用である。

筆者らは最近、光をあてた細胞のみで細胞質内に RNA を導入する方法を開発した。この方法において要となるのは光応答性 RNA キャリアであり、これは TatU1A というキャリア蛋白質に光増感剤を共有結合させた分子である。このキャリア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、光刺激により、RNA はエンドソームから逃れて細胞質に拡がる。つまり、光応答性キャリアを用いると光による RNA の細胞質内導入が起こることが分かった (J. Control. Release, 2009)。この PCDR 法を用い、前段落で述べた背景を踏まえると、光照射 (= RNA の導入) により様々な細胞機能の制御が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、筆者らが開発した「光をあてた細胞のみで細胞質内に RNA を導入する技術」(Photoinduced Cytosolic Dispersion of RNA; PCDR 技術)をベースに「可視光および近赤外光による細胞機能の制御系」を開発する。開発のポイントは、近赤外光で効率よく細胞質内 RNA 導入を起こせるようにすること、複数波長の光による複数の RNA 導入のタイミングの制御を可能にすること、光で RNA 導入を誘導する方法を 3 次元的な細胞集団や動物個体に適用すること、「光による細胞機能の制御系」の例として、光による細胞内翻訳の人工制御系および光による細胞分化誘導系を構築すること、の 4 点である。

## 3. 研究の方法

### (1) 近赤外光による PCDR 法の高効率化に向

### けた光増感剤の探索

効率よく PCDR 法を起こせる波長は緑色光 (~ 546 nm) と赤色光 (~ 633 nm) であるが、この波長域はヘモグロビン等による吸収のため生体組織透過性があまり高くない。一方、生体の窓といわれる 700-900 nm 程度の近赤外光域の光は生体組織透過性が高いため、厚みのある生物試料には近赤外光の利用が好適である。しかしながら、PCDR 法で 750 nm の近赤外光を用いた場合には、現状、RNA 導入効率が、あまり高くない。そこで、ここでは、光応答性 RNA キャリアの光増感部位を変えて、RNA 導入効率の比較検討を行った。700-850 nm の範囲に吸収をもちマレイミド基をもつ色素を用いて光応答性キャリア (候補分子) を作製し、RNA 導入効率の高いものを探した。

### (2) 異なる波長の光による 2 種類の RNA の時間差導入システムの構築

1 つめの RNA の細胞質内導入の後に、2 つめの RNA 導入を行うための手法を検討した。光照射の際、光増感剤部分の励起により短寿命の一重項酸素が生成することが分かっており、この破壊力の影響を必要な場所 [エンドソーム] 以外に及ぼしたくないため、の導入時にとは異なる波長で励起される光応答性キャリアを用いた。それにより、2 回目の光照射において、1 回目の光照射で既に細胞質に拡散した光応答性キャリアをも刺激して細胞質にダメージを与えることを防ぐ。異なる波長の光 (緑色・赤色・近赤外) に応答する光応答性 RNA キャリアをどのような順序で使うといいのか、そして、どの程度の時間差の導入が可能かなどを検討した。

### (3) PCDR 法のスフェロイドおよび動物個体への適用

PCDR 法の大きな利点は、細胞集団に対して局所的に RNA の作用を及ぼすことができる点である。課題開始時点で、培養シャーレ上に平面的に存在する細胞群に対して局所的に光を当てることで、ミリメートルスケールの局所あるいは 1 細胞に対して RNA の作用を及ぼすことが可能であった。本研究では、さらに、動物個体などの立体的な細胞群に対して適用を可能にすることを目指す。

本研究では、動物細胞のスフェロイドに対して PCDR 法の適用を試みた。このとき EGFP を安定発現する CHO 細胞を用いてスフェロイドを作製し、光照射部位特異的に shRNA (anti-EGFP) を細胞内導入し、EGFP の発現抑制を指標に導入した RNA の活性を評価した。スフェロイドに対して PCDR 法の適用を可能にするために、キャリア/RNA 添加時の溶液条件および 1 細胞照射を行う際のレーザー強度を検討した。また、小さくて厚みの少

ない動物個体(線虫)に対して、PCDR法の適用を試みた。

#### (4) PCDR法による細胞機能の制御

(4)- 細胞内“amberコドン翻訳”の制御  
動物細胞内で蛋白質に部位特異的に非天然アミノ酸を導入する試みは国内外で行われており、例えば、蛍光性アミノ酸や光架橋アミノ酸、光スイッチアミノ酸などの導入は、蛋白質の細胞内挙動・機能解析の上で非常に役立つ。その一般的な方法は、非天然アミノ酸を細胞外から投与し、細胞内でアミノアシル tRNA 合成酵素変異体を用いて tRNA に結合させて蛋白質に導入するというものである。このとき非天然アミノ酸のコードのために amber コドンが用いられることが多く、この場合、非天然アミノ酸の運搬役としては amber コドンに対応する人工 tRNA が用いられる。ただし、通常 amber コドンは翻訳の終結のために使われるので、このコドンにおける非天然アミノ酸導入は終結反応と拮抗する。従って、amber コドンにおける終結を進める終結因子 eRF1 のノックダウンにより、非天然アミノ酸の導入効率は高まるはずである。そこで、細胞内での「蛋白質への部位特異的な非天然アミノ酸導入系(amber コドン翻訳系)」における eRF1 ノックダウンのタイミングおよびその効果を検討した。

#### (4)- 細胞分化の制御

単一種あるいは複数種の機能性 RNA を用いた細胞分化誘導の例を示し、特に、miRNA 導入による分化効率への影響を調べる。本研究では、まず、神経細胞分化のモデルとして PC12 および SH-SY5Y 細胞を用いて PCDR 法による神経細胞への分化誘導を試みた。このとき、まずは単一種の RNA を用いて、光の当て方を変えて細胞分化誘導に対する影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 近赤外光による PCDR 法の効率化に向けた光増感剤の探索

700-900 nm 程度の近赤外光域の光は生体組織透過性が高いため、厚みのある生物試料に利用するうえで好適である。ここでは、光応答性 RNA キャリアの光増感部位を変えて RNA 導入効率の比較検討を行い、PCDR 法に適用可能な 750nm および 780nm において励起可能な光増感剤をそれぞれ見いだした。

#### (2) 異なる波長の光による 2 種類の RNA の時間差導入システムの構築

1 つめの RNA の細胞質内導入の後に、2 つめの RNA 導入を行うための手法を検討した。赤色光と近赤外光による異なる光を用いた 2 種類の RNA の時間差導入には可能な時間差と、困難な時間差があることがわかった。2 時間

以内の時間差導入および 8 時間以上の時間差導入が可能であった。

#### (3) PCDR 法のスフェロイドおよび動物個体への適用

EGFP を安定発現する動物細胞を用いてスフェロイドを作製し、光照射部位特異的に shRNA(anti-EGFP)を細胞内導入し、EGFP の発現抑制を指標に導入した RNA の活性を評価した。局所照射の効果を明確に示すことができているが、およそ照射部位における RNAi 効果を確認できた。

また、小さくて厚みの少ない動物個体の例として線虫への PCDR 法の適用に取り組んだ。キャリアと RNA の複合体を含む溶液に線虫を浸漬する形で、この複合体の投与を行った。その結果、線虫の体内にキャリアと RNA が入り込んだことが、キャリアと RNA に付加した蛍光標識により分かった。光照射部位特異的な RNA 導入と RNAi 効果を明確に示せてはいないが、光照射部位における蛍光標識 RNA の細胞質内拡散を示すと考えられる蛍光上昇は見られた。

#### (4) PCDR 法による細胞機能の制御

(4)- 細胞内“amberコドン翻訳”の制御  
動物細胞内でタンパク質に部位特異的に非天然アミノ酸を導入する際、非天然アミノ酸をコードするために amber コドンが用いられることが多い。このとき amber コドンの非天然アミノ酸による翻訳と終結因子 eRF1 による翻訳終結は拮抗する。そこで、shRNA の一過的細胞内導入の後に amber コドン対応 tRNA の導入を行うことで、eRF1 ノックダウンによる細胞へのダメージを最小にしつつ amber コドン翻訳を最大にする方法を検討した。0~12 時間差でそれぞれの導入を行ったところ、2 時間差で導入することが最も amber コドン翻訳の効率化に結び付くことが分かった。

#### (4)- 細胞分化の制御

「光による細胞機能の制御系」については神経細胞分化をモデルとして取り扱った。神経細胞分化に関わる新規の miRNA をマイクロアレイ法により見つけるとともに、既知の miRNA を用いて PCDR 法による分化誘導を試みた。導入のタイミングによる神経分化誘導効率の違いを見いだすには、今後も更なる検討が必要となった。

### 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)

Watanabe, K., Fujiwara, H., Kitamatsu, M., Ohtsuki, T., Photoinduced apoptosis

using a peptide carrying a photosensitizer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 2016, in press, DOI:10.1016/j.bmcl.2016.04.091  
Akahoshi, A., Matuura, E., Ozeki, E., Matsui, H., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Enhanced cellular uptake of lactosomes using cell-penetrating peptides. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 査読有, 2016, in press  
Ohtsuki, T., Miki, S., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Nakata, E., Hirakawa, K., Sumita, K., Watanabe, K., Okazaki, S. The molecular mechanism of photochemical internalization of cell penetrating peptide-cargo-photosensitizer conjugates. *Scientific Reports*, 査読有, 2015, Vol.5, pp.18577, DOI: 10.1038/srep18577.  
Hakata, Y. Tsuchiya, S., Michiue, H., Ohtsuki, T., Matsui, H., Miyazawa M. and Kitamatsu, M., Intracellular delivery of a peptide cargo by a cell-penetrating peptide via leucine-zippers does not affect the function of cargo, *Chemical Communications*, 査読有, 2015, Vol.51, pp.413-416, DOI: 10.1039/c4cc07459a  
Akahoshi, A., Doi, Y., Sisido, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Photo-dependent protein biosynthesis using a caged aminoacyl-tRNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 2014, Vol.24, pp.5369-5372, DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.10.053  
Watanabe, K., Ijiri K., Ohtsuki, T., mTOR regulates the nucleoplasmic diffusion of Xrn2 under conditions of heat stress. *FEBS Letters*, 査読有, 2014, Vol.588, pp.3454-3460, DOI: 10.1016/j.febslet.2014.08.003  
Matsushita-Ishiodori, Y., Morinaga, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Near-infrared light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule. *Bioconjug. Chem.* 査読有, 2013, Vol.24, pp.1669-1673, DOI: 10.1021/bc4001195  
大槻高史, 光化学的に細胞質内に侵入するペプチド分子の設計, 月刊 化学工業, 査読無, 2015, 7月号 (66巻), pp34-39

[学会発表](計27件)

Takashi Ohtsuki, Shunya Miki, Hayato Fujiwara, Mizuki Kitamatsu, Kazutaka

Hirakawa, Shigetoshi Okazaki, Kazunori Watanabe, Photosensitizing peptides and proteins for photochemical internalization, *Pacificchem2015*, 2015年12月15-20日, Honolulu (USA)  
大槻高史, 白神かおり, 渡邊和則, 可視光および近赤外光による細胞内RNA導入の局所的誘導, *BMB2015* (分子生物学会・生化学会) 2015年12月1-4日, 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)  
山路隆平, 渡邊和則, 大槻高史, 新規神経分化関連microRNAの探索, *BMB2015* (分子生物学会・生化学会) 2015年12月1-4日, 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)  
大槻高史, 「光を用いた細胞内への物質導入」, 新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」+「超高速バイオアセンブラ」合同若手の会, 2015年10月31-11月1日, 不死王閣 (大阪, 池田)  
藤原 隼人, 畑地 祐里, 北松 瑞生, 渡邊和則, 大槻高史, 光でアポトーシスを誘導する方法の開発, 日本化学会中国四国支部大会, 2015年11月14-15日, 岡山大学 (岡山)  
藤原 隼人・畑地 祐里・北松 瑞生・渡邊和則・大槻高史, アポトーシスの光誘導法の開発, 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年9月10-12日, 熊本大学 (熊本)  
神崎 重人・赤星 彰也・渡邊和則・大槻高史, ケージドアミノアシル tRNA を用いたタンパク質合成の光制御, 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年9月10-12日, 熊本大学 (熊本)  
Takashi Ohtsuki, Hayato Fujiwara, Yuri Hatachi, Mizuki Kitamatsu, Kazunori Watanabe, "Design of photosensitizing peptide molecules for photochemical internalization" The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, 2015年1月8-9日, Taipei (Taiwan)  
三木 駿也, 澄田 憲祐, 渡邊和則, 平川和貴, 岡崎 茂俊, 大槻高史, 「PCI法におけるエンドソーム脱出機構の解明」 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日, パシフィコ横浜 (神奈川, 横浜)  
村上 真一, 渡邊和則, 大槻高史, 「CLIP-RNAi法で高効率にRNAiを起こす多環状RNAの開発」 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014年11月27日, パシフィコ横浜 (神奈川, 横浜)  
井野川翔一, 渡邊和則, 小関英一, 松浦栄次, 大槻高史 「光増感剤と高分子ミセルを用いたRNAデリバリーキャリアの設計」 第36回バイオマテリアル学会大会, 2014年11月17-18日, タワーホール船堀 (東京)

大槻 高史・藤原 隼人・畑地 祐里・北松 瑞生・渡邊 和則 「光化学的に細胞質内に侵入するペプチド分子の設計」光化学討論会、2014年10月11-13日、北海道大学(北海道、札幌)

三木 駿也・澄田 憲祐・渡邊 和則・平川 和貴・岡崎 茂俊・大槻 高史 「光による CPP 融合物質のエンドソーム脱出の機構解明」光化学討論会、2014年10月11-13日、北海道大学(北海道、札幌)

Akiya Akahoshi, Yoshio Doi, Tomoki Kiuchi, Kazunori Watanabe, Takashi Ohtsuki "Photoregulation of translation using a caged aminoacyl-tRNA" 25th tRNA Conference, 2014年9月21-25日, Killini (Greece) 村上真一・渡邊 和則・大槻 高史

「CLIP-RNAi 法における多環状 RNA の設計と開発」第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年9月11-13日、岡山大学(岡山) 三木駿也・澄田 憲祐・渡邊 和則・平川 和貴・岡崎 茂俊・大槻 高史「光増感反応によるエンドソーム脱出機構の解明」第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年9月11-13日、岡山大学(岡山)

赤星彰也・土井 芳朗・木内 智樹・渡邊 和則・大槻 高史「ケージドアミノアシル tRNA への光照射による蛋白質合成の制御」第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年9月11-13日、岡山大学(岡山)

岩崎慎也、渡邊和則、中澤浩二、大槻高史 「光誘導 RNAi 法 (CLIP-RNAi) の3次元細胞集合体への応用」第2回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、2014年9月10日、岡山大学(岡山)

村上 真一、渡邊 和則、大槻 高史 「CLIP-RNAi 法における多環状 RNA の有効性の検討」第16回日本 RNA 学会年会、2014年7月23-25日、ウインクあいち(愛知、名古屋)

大槻高史「光に応答する生体機能分子」第2回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム、2014年2月28日、岡山大学(岡山)

②①三木 駿也、澄田 憲祐、渡邊 和則、平川 和貴、岡崎 茂俊、大槻 高史、光増感による CPP 融合物質のエンドソーム脱出の分子メカニズムの解明、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫、神戸)

②②村上 真一、渡邊 和則、大槻 高史、多環状 RNA を用いた光誘導 RNAi、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫、神戸)

②③丸田 静佳、渡邊 和則、大槻 高史、細胞周期と RNA 関連イベントとの相関の観察

手法の開発、第23回アンチセンスシンポジウム、2013年11月28-29日、徳島大学(徳島)

②④羽根岡 桃子、渡邊 和則、大槻 高史、光応答性キャリアを用いた近赤外光による細胞質への RNA 導入法、第23回アンチセンスシンポジウム、2013年11月28-29日、徳島大学(徳島)

②⑤Takashi Ohtsuki, "Light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule" International Symposium on Nanomedicine Molecular Science、2013年10月8-10日、東京大学(東京)

②⑥赤星 彰也、土井 芳朗、木内 智樹、渡邊 和則、大槻 高史、ケージドアミノアシル tRNA による蛋白質合成の光制御、第7回バイオ関連化学シンポジウム、2013年9月27-29日、名古屋大学(愛知、名古屋)

②⑦村上 真一、渡邊和則、大槻高史、多環状 RNA による CLIP-RNAi、第15回日本 RNA 学会年会、2013年7月24-26日、ひめぎんホール(愛媛、松山)

[図書](計 2件)

Watanabe, K., Ohtsuki, T., Photocontrolled intracellular RNA delivery using nanoparticles or carrier-photosensitizer conjugates. Nanotechnology Tools for the Study of RNA (Yoshizawa, S. eds) in a series: Progress in Molecular Biology and Translational Science (Academic Press) Vol. 139, pp.101-119 (2016)

Watanabe K. and Ohtsuki T., Intracellular delivery of RNA via RNA-binding proteins or peptides. Fundamental Biomedical Technologies, Vol 7 (Intracellular Delivery II), Prokop, A., Iwasaki, Y., Harada, A. (Eds), pp.403-416 (2014) Springer

[産業財産権]

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/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

(2)研究分担者

渡邊 和則 (WATANABE KAZUNORI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：70602027