

siRNAの機能制御によるコンディショナルRNAi

●古田 寿昭 ◆渡辺 直子

東邦大学理学部生物分子科学科

＜研究の目的と進め方＞

さまざまなモデル生物を用いた系で、遺伝子の機能を網羅的に解析するための新手法として、任意の遺伝子の機能を時期および部位特異的に阻害する方法の開発を目的とする。具体的には、RNAi法とケージド化合物の化学を組み合わせることで、特定の時期に特定の細胞で任意のmRNAの機能を阻害（または破壊）する手法を開発することを目標とする。ケージド化合物とは、生理活性分子に光分解性の保護基を付けて、その活性を一時的に失わせたものの総称である。この状態で細胞内に負荷しておく、光をあてた瞬間にあてた場所だけに、元の生理活性分子の濃度ジャンプをおこすことができる。

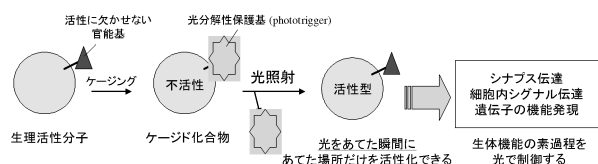


図1 ケージド化合物を用いる細胞機能の光制御

これをRNAiと組み合わせることができれば、任意の遺伝子の機能阻害の時期と場所を、光照射の時期と場所で制御することが可能になる。さらに、照射光量で、機能阻害の程度を調節することも原理的には可能である。

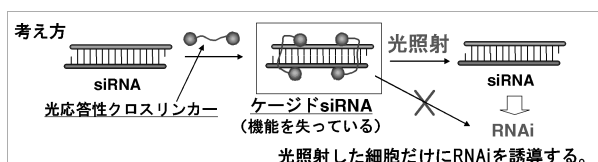


図2 ケージドRNAi法の考え方

＜研究開始時の研究計画＞

（項目1）ケージドRNAi法の確立

線虫等におけるRNAiでは、細胞内に導入された2本鎖RNA（dsRNA）は、まず20塩基程度のdsRNAに切断されてから1本鎖に解離し、ターゲット配列を持つmRNAと相補鎖を形成しこれを選択的に破壊する。最近、動物細胞においても、21塩基のsiRNAを導入することでRNAiが観測されることが報告された。この場合も、siRNAは細胞内で1本鎖に解離してからターゲットに結合する。よって、ケージドRNAiを行うのにもっとも効率のよい方法は、dsRNAの1本鎖への解離を光制御することと考えられる。そこで、光応答性のdsRNA架橋試薬を設計した。これはdsRNAと混合するだけで、リン酸部位と特異的に反応してエステルを形成し、架橋すると予想される。生成したリン酸のBhcエステルは、非常に高い反応効率で光によって脱保護されることが分かっているので、光照射によってRNAiを制御できることになる。以下に、具体

的な研究項目を列挙する。(a) 光応答性dsRNA架橋試薬を設計し合成する。(b) dsRNAの調製および光解離性架橋試薬との反応によるケージドdsRNAの合成を行う。(c) ケージドdsRNAの動物培養細胞への導入をマイクロインジェクターにて行う。(d) RNAiの光制御条件の最適化とTNF-αのプロセシングの光制御への応用を行う。

＜研究期間の成果＞

（項目1）ケージドRNAi法の確立（特許9）

RNAi法の光制御を実現するために、2つのアプローチを検討した。まず、dsRNAの1本鎖への解離を光制御するために、Bhc-diazo部位を2つ持ち、リンカー部分の長さや構造が異なる光解離性dsRNA架橋試薬を3種類設計・合成することに成功した（図3 Cross-linker 1-3）。我々のグループで開発したケージング試剤であるBhc-diazoは、mRNAのケージングにおいてもその優れた効果が実証済みである。

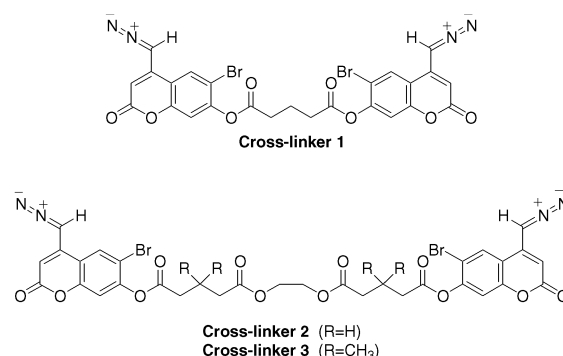


図3 光解離性dsRNA架橋試薬の構造

続いて、これらを用いて、合成siRNAの活性の光制御を試みた。合成した光解離性架橋試薬と反応させたsiRNA（EGFPをターゲットとする）を、GFPをトランスフェクションしたHeLa細胞に加えたところ、RNAi誘導能が著しく低下していた。このことは、架橋試薬と反応することでsiRNAがケージドsiRNAになっていることを示唆している。さらに、ケージドsiRNAをトランスフェクションした細胞のうちの一部にUV光を照射すると、光照射した細胞ではEGFPの発現が顕著に低下した。このとき、同時にトランスフェクトしたDsRedの発現は、ほとんど影響されていないことから、導入したケージドsiRNAの光照射によって、EGFP特異的なRNAiが誘導されたと考えられる。（図4）

次に、内因性遺伝子の機能を光制御することが出来るか確かめた。ラミンB1は核膜の裏打ちタンパク質の1つである。ラミンB1に対するsiRNA、siRNA (lamin B1)、をHeLa細胞に導入すると、アポトーシスが誘導されることが報告されている。そこで、siRNA (lamin B1)をcross-linker 3と反応させてケージドsiRNA (lamin B1)に変換し、HeLa細胞に導入した。72時間培養後観察すると、予想通り、細胞数も細胞形態も目立った変化は観察されな

かった。これに対し、同様な条件で処理してからUV光を照射すると、顕著に細胞数が低下し、アポトーシス様の形態変化を示すものが多数観察された。(図5)

また、ケージドsiRNA (lamin B1)導入後、光照射した細胞では、lamin B1タンパク質の発現がほとんど観察されなかったため、ここで観察された変化は、特異的なRNAiによるlamin B1の機能阻害であると結論される。(図5)

以上の結果から、動物細胞でのケージドRNAi法実現の可能性は極めて高いと言える。

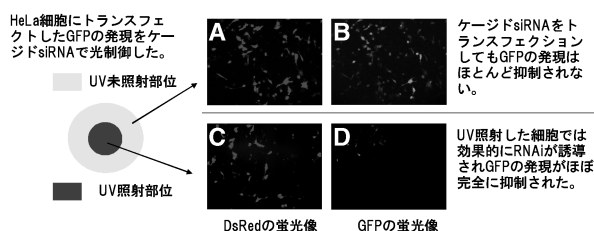


図4 ケージド化合物を用いたRNAiの光制御

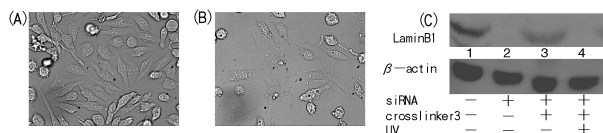


図5 光解離性クロスリンカーによるRNAiの光制御

(A) ケージドsiRNA (lamin B1)を導入したHeLa細胞の顕微鏡像；(B) ケージドsiRNA (lamin B1)を導入後UV光照射した細胞の顕微鏡像；(C)ウェスタンブロットによるLamin B1の発現解析。レーン1：未処理細胞，レーン2：siRNA (lamin B1)，レーン3：ケージドsiRNA (lamin B1)，レーン4：ケージドsiRNA (lamin B1) 導入後UV光照射。

また、2つ目のアプローチとして、細胞内でshRNAを生成するプラスミドベクターのケージングを検討した。まず、レポーター遺伝子の発現を指標に、プラスミドDNAとケージング試剤であるBhc-diazoとの反応条件を検討した。現在までのところ、ほ乳動物培養細胞でルシフェラーゼの発現を指標にして、プラスミドケージングに最適な条件を確立しつつある。

(項目2) ケージドアンチセンスオリゴの設計と合成

アンチセンスオリゴを用いた時期および部位特異的な機能阻害を行うため、ケージドアンチセンスオリゴの合成をめざして研究を行った。様々なアンチセンスオリゴをケージド化合物へと変換するには、核酸塩基部位に光分解性保護基を導入する方法を確立する必要がある。そこで、様々なアンチセンスオリゴに共通する核酸塩基部分に光分解性保護基を導入する条件を検討した。その結果、我々のグループで開発した新しい光分解性保護基、Bhcmoc基とBmcmoc基を、デオキシアデノシンおよびシチジンのアミノ基に導入することに成功した。合成した新規ケージドデオキスクレオシドの光反応性を、これまでに報告されているケージドヌクレオシドと比較したところ、いずれの化合物も20-30倍高い効率であることが分かった。このことは、導入したケージ1個につき照射する光の量を1/20から1/30に落とせることを意味する。アンチセンスオリゴは、通常15塩基程度の長さのものをを用いるので、その活性を光制御するためには、複数個の

ケージを導入する必要がある。その場合、BhcmocおよびBmcmoc基で観測された高い光反応性は、大きな利点になる。

(項目3) 新規ケージド化合物の開発

本研究課題実現の基礎技術として、新規ケージド化合物の開発も並行して進めた。以下に得られた成果を記す。(1) 遺伝子発現の光制御を実現する1方法として、核内レセプターのリガンドのケージド化合物合成を計画した。コル酸類は、核内オーファンレセプターの1つFXRの内因性リガンドで、コレステロール7 α ヒドロキシラーゼの発現を抑制して自らの生成を調節している。コル酸類の水酸基の1つを選択的に修飾することで、ケージド化合物を4種類合成することに成功した。その光反応性を明らかにし、光照射の有無によって、活性が調節できる可能性を示すこともできた。(論文1)

(2) 光で解裂して色が変わる新規蛍光タンパク質kaedeの解裂メカニズムを明らかにし、本研究課題への応用の可能性を検討した。(論文2)

(3) 脂質性メッセンジャー分子のケージド化合物として、ジアシルグリセロールおよびアラキドン酸に代表される長鎖不飽和脂肪酸(PUFA)のケージド化合物を合成することに成功した。光反応性の詳細を明らかにし、生きた細胞内で、プロテインキナーゼC(PKC)の、キナーゼ活性と細胞内局在を光制御する可能性を示した。(論文4)

(4) 細胞内2次メッセンジャー分子である、サイクリックヌクレオチドのケージド化合物を合成し、その活性を光制御できることを示した。(論文3-6, 8) 合成したBhc-cAMPとBhc-cGMPは、1光子および2光子励起、いずれの条件でも従来のものより10-100倍程度高い光反応性を示すこと、暗所での安定性も高いこと、細胞膜透過性および水溶性いずれの誘導体も合成可能であることを明らかにした。また、cAMPやcGMPが関わるシグナル伝達を、光照射によって制御できることを示した。合成したケージドcAMPおよびcGMPを用いて、ウニ精子が示す走化性時の細胞内シグナル伝達の解析に利用した。その結果、細胞内のcAMPとcGMPの濃度上昇に伴ってカルシウムイオン濃度が上昇し、鞭毛の運動が制御されること。cGMP濃度が上昇したときのみ、カルシウムイオン濃度が低下後に再び上昇する早い過程があることを明らかにした。(図7)

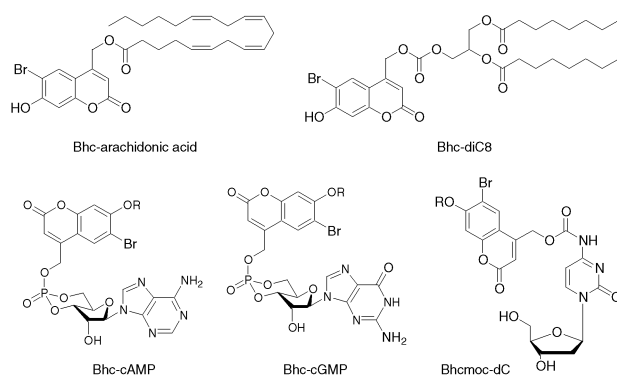


図6 本課題で合成したメッセンジャー分子等のケージド化合物の構造

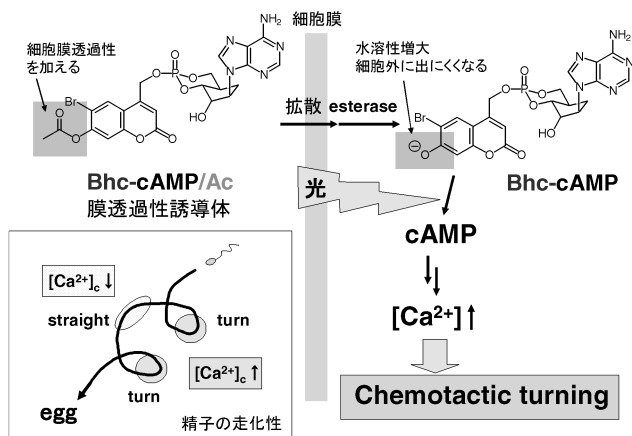


図7 膜透過性ケージドcNMPを用いたウニ精子の鞭毛運動の光制御

(5) ケージド化合物の化学を活用して、mRNAや様々な細胞内生理活性分子の機能を光制御する方法を開発した。(論文7, 8)

〈国内外での成果の位置づけ〉

サイクリックヌクレオチドのケージド化合物は、国内外の複数のグループとの共同研究に発展し、その成果を論文として発表することができた(大阪大学の倉橋教授のグループ、メキシコ自治大学のA. Darszon教授のグループ)。また、脂質性メッセンジャー(ジアシルグリセロール、アラキドン酸)のケージド化合物についても問い合わせが複数あり、共同研究を進めている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ケージドRNAi法の確立について：ケージング反応、動物培養細胞へのトランスフェクション、およびRNAiの活性の測定法のそれぞれについて、いつ、誰が、どこであっても同じ結果が再現性よく得られる条件を検討した。しかし、肝心のケージング反応に関して、再現性よく繰り返すことが出来る反応条件を、公募研究期間内では確立することができなかった。再現性が十分得られなかった理由としては、クロスリンカーとsiRNAの反応生成物の構造を解析することが困難なことが挙げられる。同様な理由で、プラスミドのケージングも再現性の低さが問題となった。その後の研究で、ケージング反応を著しく促進する条件を見出すことができたので、この点については、ほぼ解決したと考えている。

アンチセンスオリゴのケージド化合物の開発について：公募期間内では、ケージドヌクレオシドの合成法の確立と光反応性の検討までしかできず、実際に遺伝子の機能を光で制御するには至らなかった。ケージドヌクレオシド類をオリゴヌクレオチドに組み込む合成法の確立に時間がかかってしまったことによる。その後の研究で、アンチセンス分子として選んだペプチド核酸のケージド化合物の合成法を確立することが出来た。また、これを用いて、相補的な配列を持つDNAとの2本鎖形成を光制御できるところまで確かめている。

〈今後の課題〉

ケージドsiRNAの安定性、細胞毒性、必要な濃度、siRNAの配列依存性等の検討。クロスリンカーの分子構造の見直し。具体的には、siRNAとの反応性の向上、生成したケージドsiRNAの水溶液中での安定性の向上と精

製法の検討。

EGFPの蛍光強度を指標にして、ケージドプラスミド導入細胞への光照射条件を最適化する。

ケージドペプチド核酸を用いたアンチセンスノックダウンの光制御の実現。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0303202209

Y. Hirayama, M. Iwamura and T. Furuta, Design, Synthesis and Photochemical Properties of Caged Bile Acids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 905-908 (2003).

2. 0404061158

H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura, A. Miyawaki, Photo-induced peptide cleavage for the green-to-red conversion of a fluorescent protein, *Molecular Cell* 12, 1051-1058 (2003)

3. 0404061140

A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Iwamura and T. Furuta, Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as Phototriggers for Alcohols and Phenols, *Org. Lett.*, 5, 4867-4870 (2003).

4. 0404061208

T. Furuta, K. Nishiyama, A. Manabe, M. Fukuoka, M. Iwamura, Design, synthesis and photochemical properties of caged compounds of lipid mediators, *Proceedings of the First International Symposium on Biomolecular Chemistry* 2003, 124-125 (2003).

5. 0602101109

T. Nishigaki, C. D. Wood, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Furuta, D. Elias, K. Shiba, S. A. Baba, A. Darzon, A sea urchin jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca^{2+} before its increase, *Dev. Biol.* 272, 376-388 (2004).

6. 0602101124

T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Sugimoto, M. Kanehara, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, M. Iwamura, R. Y. Tsien, Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photo-releasable cyclic nucleotides for both one and two-photon excitation, *ChemBioChem*, 5, 1119-1128 (2004).

7. 0602101129

H. Ando, T. Furuta, H. Okamoto, Photo-mediated Gene Activation using Caged mRNA in Zebrafish Embryos, *Methods in Cell Biology*, 77, 159-171 (2004).

8. 0602101134

T. Furuta, K. Noguchi, Controlling cellular systems with Bhc-caged compounds, *Trends Anal. Chem.* 23, 501-509 (2004).

3) 特許

9. 0602101052

古田寿昭, 今泉奈津代, 深間内杏子, 伊藤友紀, 渡辺直子, 「架橋剤, それを用いた架橋方法, 遺伝子発現調節方法および遺伝子機能調査方法」, 特願2005-058923, 平成17年3月出願