

## 生命システムの動的理解を可能にする分子性プローブの開発

●古田 寿昭<sup>1)2)</sup>

1) 東邦大学理学部生物分子科学科 2) 東邦大学複合物性研究センター

### <研究の目的と進め方>

システムとしての生命現象を理解するには、生理的に意味のある細胞応答を観測することが肝要である。ケージド化合物の化学を活用して、時期および細胞(組織)特異的に細胞現象を制御する技術の開発を目指して研究を続けてきた。本申請課題では、生きた細胞の生理機能を光で操作可能にする光応答性分子を開発し、領域内の共同研究も活用しながら、生理機能をシステムとして理解するための新しい実験手法として提供することを目標にする。次の2項目を重点的に推進する。(1) ケージド化合物を用いる光制御を要素技術として確立する。(2) システムを理解するためのモデルを提供できる実験系を提案する。ケージド化合物の光照射による生理機能の制御技術をイメージング等の解析と組み合わせれば、時間と空間に関わるすべての細胞生物学分野において、生理的条件における細胞応答を制御して解析する革新的な方法論を創出できる。

### <2008年度の研究の当初計画>

#### ・プラスミド DNA のケージング

哺乳動物細胞において外来遺伝子を過剰発現するには、プラスミド DNA を用いる方法が一般的である。2007年度に引き続き、我々が開発したケージング試剤 Bhc-diazo (和光純薬より購入可能) を用いて以下の検討を行う。(1) プラスミド DNA を Bhc-diazo でケージングする条件を最適化し、発現遺伝子およびプラスミド DNA の種類によらず、再現性のよいプロトコルを確立する。(2) 光照射前後の発現タンパク質を *in vitro* 転写翻訳系によって定量し、アンケージングに必要な光の量を決定する。(3) 哺乳動物培養細胞を用いて、レポーター遺伝子 (GFP とルシフェラーゼ) の発現を定量して、細胞内で光制御できることを確認する。この検討と並行して、shRNA を発現するプラスミドをケージングして、光によって機能阻害を誘導可能か検討する。この方法の利点は、Bhc-diazo という単一の試薬と適宜構築したプラスミド DNA を利用することで、任意の遺伝子のコンディショナルな機能発現と機能抑制を、全く同一のプロトコルで実現可能な点にある。さらに、インタクトなプラスミド DNA を用いるコントロール実験も容易である。

#### ・ケージド siRNA 法の最適化

2006年度までに本領域の補助を受けて、光によって外すことの出来る光応答性の dsRNA クロスリンカーを開発している (特許出願済み)。これを用いて siRNA のケージド化合物の合成と細胞内での利用を試みているが、哺乳動物培養細胞内で RNAi を再現性よく光誘導するには至っていない。引き続き検討を続け、任意のターゲット遺伝子の機能阻害を光で制御する一般法として確立する。

#### ・ケージドペプチド核酸の合成とその利用

2007年度に引き続き、ペプチド核酸 (以下 PNA) のケージド化合物を用いて遺伝子の機能発現と機能阻害をそれぞれ光制御する可能性を検討する。PNA が他の核酸類似体と異なる点は、配列を選ぶことで、dsDNA と 3 本鎖あるいは 2 本鎖のどちらでも形成可能な点にある。この性質を利用して、PNA を人工転写因子として用いた例 (PNAS, 1994, 91, 3892-3895), およびアンチセンス分子として用いた例が報告されている (Science, 1992, 258, 1481-1485)。PNA の配列は任意に選んで合成できるので、ケージド PNA の合成法を確立すれば、機能発現と機能阻害を光制御できる遺伝子の種類に制限は無くなる。すでに、Bhc-ケージド PNA の合成法の確立、光反応性の検討はほぼ終了している。今後は、細胞内への高効率な導入法を検討し、3 本鎖形成 PNA による転写誘導の光活性化と 2 本鎖形成 PNA による翻訳阻害の光活性化を実現する。

### <2008年度の成果>

#### ・プラスミド DNA のケージング

ケージド DNA を調製するには 2 つの方法が考えられる。全長 DNA を適切なケージング試薬でランダムに修飾する方法と、化学合成したケージドプライマーから酵素的に伸長して全長のケージド DNA にする方法である。このうち、ランダム修飾による方法は、操作が簡単で試薬が手に入れば誰でも利用できる点と、適用できる DNA の配列に制限がないと考えられる点で優れている。しかし、これまでに報告されているランダム修飾によるケージド DNA は、光照射の前後で数倍程度の発現誘導の上昇しか実現できていなかった。

そこで、EGFP およびルシフェラーゼ発現プラスミドをモデル化合物に選び、Bhc-diazo による DNA のケージングと、光照射によるアンケージング条件の最適化をはかったところ、光照射によって最高で 10 倍程度の発現上昇が観察できることを明らかにした。また、照射する光の量に応じて発現量も上昇すること、さらに、均一な細胞集団のうち、光照射細胞のみで発現誘導を引き起こせることも確認した。

しかし、ケージングに使用したプラスミド DNA の量を考慮すると、光照射後に発現するタンパク質の絶対量が少ないこと (未修飾の DNA に対して 0.01% 程度)、また、使用する DNA の量を増やしても発現するタンパク質の量が一定量以上は増えないことも明らかになった。

次に、さらに効率よく発現上昇する系の構築を目指し、アンケージング後に生成したプラスミド DNA が細胞内で複製される系の効果を検討した。SV40 ori を持つルシフェラーゼ発現ベクター pRL-SV40 を Bhc-diazo でケージングし、COS-7 細胞に導入後に UV 光を照射すると、未照射細胞に比べて 100 倍以上の発現上昇が実現できた。また、発現の絶対量も未修飾のプラスミドによ

る発現量の数%程度まで増加できることを確認した。

今回開発した SV40ori を持つ ケージド プラスミド と SV40 large T 抗原発現細胞の組み合わせによる方法を用いると、光照射によって最高で 300 倍以上の発現効率の上昇が達成できることも明らかにした。これは、従来の方法が、ケージングによってプラスミド DNA から mRNA への転写を光制御するのに対し、large T 抗原発現細胞では、1 細胞内のコピー数が複製により飛躍的に上昇したことによる。すなわち、ランダム修飾によるケージングで DNA の複製を光制御可能なことを意味している。

・ケージド siRNA 法の最適化

siRNA (short interfering RNA) が引き起こす RNAi では、siRNA の 1 本鎖への解離が必要不可欠であることが明らかになっている。そこで、光解離性クロスリンカーで siRNA をクロスリンクし、標的遺伝子の発現を光で制御することを目的とした。

電気泳動、HPLC、マスペクトル測定等により siRNA がクロスリンクされていることの確認を試みた。また、クロスリンカーで修飾した siRNA と pEGFP を HeLa 細胞にトランスフェクトし、一過的な GFP の発現を RNAi の効果の指標とした。用いたクロスリンカーは両末端に Bhc-diazo 部位を持ち、RNA のリン酸と反応してクロスリンクすることが期待される (図 1)。まず、Bhc-diazo によって siRNA がケージングされることを確認するため、新規に開発したピオチン修飾した Bhc-diazo (Bio-Bhc-diazo) を用いて反応を行った。その結果、Bio-Bhc-diazo を混合するだけで siRNA がケージングされること、しかし、PAGE では未修飾 siRNA との違いが観察できないこともわかった。次にクロスリンカーでケージングした siRNA を HeLa 細胞に導入すると、

siRNA の機能は有意に抑制され、しかも用いたクロスリンカーの濃度依存的に標的タンパク質の発現が上昇すること、すなわち、RNAi 誘導能が抑制されることを確認した。さらに、ケージド siRNA 導入細胞を UV 照射すると、標的タンパク質の発現が抑制されることも明らかにした。

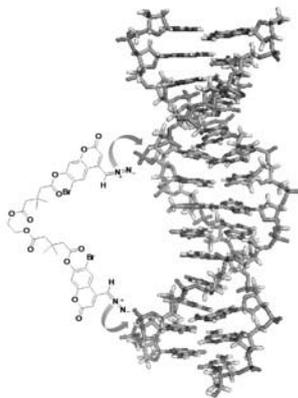


図 1 光解離性クロスリンカーの構造

・その他

ケージド化合物を活用した光制御を、細胞生物学における要素技術の一つにするために、細胞内シグナル伝達を制御する分子のケージド化合物の合成と機能評価をおこなった。リン酸化ペプチド、プロテインキナーゼの活性化剤と阻害剤、脂質性シグナル分子等がその例である。

<国内外での成果の位置づけ>

新規ケージド化合物の開発を進めているグループは、国内外で年々増加しているが、実際に生きた細胞を用いて、遺伝子発現を光制御出来ている例は非常に少ない。また、ケージドプラスミド DNA の光照射によって、100 倍以上の発現上昇を達成した例はない。しかし、RNAi の光制御については、他のグループにやや

先を越された面もある。我々のグループで開発したケージド化合物の光反応性の高さ等の、化学的性質の優位性が活かせるような応用例を示して独自性をアピールしていきたい。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

shRNA を産生するプラスミドをケージングすることによって、標的遺伝子の光による発現抑制を試みたが、光照射の前後で明瞭な差を確認するに至らなかった。細胞内に導入されたケージドプラスミドの量が少ないこと、光照射後に生成する転写活性なプラスミドの量が少ないこと等の理由が考えられた。そこで、SV40 large T 抗原発現細胞と SV40 ori を持つプラスミドの組み合わせの系を適用すべく準備を進めている。

また、ケージド PNA を用いて光で任意の遺伝子の転写を光制御する実験系を構築することはできたが、光照射によって観察された標的遺伝子の発現は非常に弱く、アッセイ系の再検討が必要である。

<今後の課題>

- ・ shRNA 産生プラスミドのケージングによって、標的遺伝子の光機能抑制の達成。
- ・ 光解離性クロスリンカーでケージングした siRNA を用いた、内因性遺伝子の光機能抑制条件の検討。
- ・ ケージド PNA を用いた光転写活性化と光翻訳阻害のアッセイ系の構築。

<成果公表リスト>

1) 論文  
 1. 0806260010  
 Kawakami, T., Cheng, H., Hashiro, S., Nomura, Y., Tsukiji, S., Furuta, T., Nagamune, T.: A Caged Phosphopeptide-Based Approach for Photochemical Activation of Kinases in Living Cells, *ChemBioChem*, 9, 1583-1586 (2008).  
 2. 0901161407  
 Katayama, K., Tsukiji, S., Furuta, T., Nagamune, T.: A bromocoumarin-based linker for synthesis of photocleavable peptidocjugates with high photosensitivity, *Chem. Commun.*, 5399-5401 (2008)