

間にも違いは認められなかった。一方で、細胞によっては両アレルからの遺伝子発現を示唆する結果も得られた。特に、TIMM17Bの発現解析においては、#153のように、完全に両アレルから1:1の割合で遺伝子発現しているケースも認められた。今回の検討では、疾患とX染色体不活性化機構の破綻・逸脱との関係は明らかにできなかったが、同一個人であっても細胞によってはX染色体不活性化機構を免れて遺伝子発現する場合もあることが明らかとなった。

D. 考察

自己免疫性疾患は、本来、自己以外の異物（細菌、ウイルスなど）やガン細胞などを排除するために備わっている免疫系が、自己の正常な細胞やタンパク質を異物であると認識してしまい、攻撃を加えることで起こる疾患の総称である。多くの自己免疫性疾患は、男性よりも女性において高頻度に発症することが知られている。その例として、関節リウマチ（3-4倍）、全身性エリテマトーデス（9倍）、シェーグレン症候群（1.4倍）、多発性硬化症（2-3倍）、多発性筋炎・皮膚筋炎（2倍）、強皮症（9倍）、混合性結合組織病（1.3-1.6倍）、原発性胆汁性肝硬変（8倍）、甲状腺機能低下症（1.0-2.0倍）、甲状腺機能亢進症（3-4倍）などが挙げられる。これらの疾患で性差を生じる原因としては、男女における「性ホルモン」の違いと「性染色体」の違いが考えられる。自己免疫性疾患と性ホルモンの関係については、エストロゲンが免疫反応を亢進するのに対して、アンドロゲンが免疫反応を抑制することが多数報告されている。一方で、小児期に発症する若年性特発性関節炎（若年性関節リウマチ）においては、小児患者の方が多い（2-3倍）ことや、小児期発症全身性エリテマトーデスの思春期前発症例の男女比が1:4であることから、性ホルモン以外の因子の関与が考えられた。

そこで、本研究では、性染色体、特にX染色体に注目した疾患遺伝子研究を進めることを計画した。正常女性の性染色体は、父親由来と母親由来のX染色体を1つずつ受け継いで構成されている。正常男性の性染色体は1つのX染色体と1つのY染色体から成り、単純にX染色体の数を比較すると女性の方が1つ多い。しかし、正常女性のX染色体からの遺伝子発現量は正常男性の2倍にはならない。その理由は、X染色体不活性化による遺伝子量補償が行われるためである。X染色体不活性化は、体細胞の細胞ごとにランダム（不活性化されるX染色体が、父方か母方かが細胞ごとに異なる）に起こり、正常男性と正常女性のX染色体からの遺伝子発現量を同じレベルにするための遺伝子発現制御機構である。X染色体上の遺伝子発現量は男女間で同じレベルに調整されている。一方で、近年、X染色体不活性化を免れて発現する多数の遺伝子の存在が明らかにされた。このような遺伝子は、2つのX染色体から発現することにより、発現量は正常女性（または正常男性）より多くなっている可能性がある。また、X染色体不活性化を免れる遺伝子の発現パターンは個人によって異なることも示唆されている。このことから、X染色体不活性化機構を免れることにより、結果的に過剰発現状態になっている遺伝子が自己免疫疾患の発症に関与している可能性が考えられた。本研究は、この点に注目して計画したものである。

体細胞におけるX染色体不活性化機構は、1細胞レベルでランダムに起こっており、「細胞集団」を対象にした遺伝子発現解析では、平均的な現象しか観察できない。我々は、このような問題を解消するため、1細胞レベルでX染色体不活性化機構とその破綻による遺伝子発現を検出する方法を開発することを目指した。そして、その方法を用いて、自己免疫疾患患者および健常者におけるX染色体不活性化機構の破綻・逸脱の有無について検討することを目標とした。

今回の検討の結果、1細胞レベルでのアレル特異的発現解析の基盤技術開発には成功したが、実際に、X染色体上の遺伝子の発現を調べるにあたって、いくつかの問題点が明らかとなった。それは、解析対象とするX染色体上の遺伝子の発現レベルが低い場合、信頼に足りうるデータを得ることが難しいという点である。今回は、3つの遺伝子(TIMM17B、MECP2、IRAK1)を解析対象としたが、これらの遺伝子の発現量は必ずしも十分に高いとは言えない。データベースを用いた我々による検索によると、本研究計画で解析可能と判断されるX染色体上の遺伝子は約120遺伝子であると計算されるが、発現量までを考慮した場合、いくつかの遺伝子で解析可能かについてはまだ不明である。今後の課題としては、発現量が低くても精度の高い解析を可能にするような改良を行わなくてはならない。

E. 結論

1細胞レベルでのアレル特異的遺伝子発現解析法の開発に成功した。今後は、X染色体上のどのような遺伝子を解析対象にするかについて検討する必要がある。また、今回は、全身性エリテマトーデス患者と健常者の間で比較を行ったが、今後は別の自己免疫性疾患患者におけるX染色体不活性化機構の破綻・逸脱に関する検討を行う。

F. 健康危機情報
(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表
IV. 研究発表一覧表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

「マイクロ RNA を検出するための蛍光 DNA プローブの設計と解析」 に関する研究

研究要旨

マイクロ RNA は、遺伝子発現の制御を司る 22 塩基程度の小さな RNA である。これまでに 700 種類以上のマイクロ RNA が発見され、発生や分化において時期特異的・空間特異的に発現していることが示唆されているが、生理活性を担うマイクロ RNA を測定する簡便な技術がないため、詳細なマイクロ RNA の解析が行なえていないのが現状である。従来利用されてきた蛍光プローブでは、マイクロ RNA を検出することは可能であったが、目的マイクロ RNA の長さをリアルタイムで判別することができないという問題点があった。我々はこれまでに、蛍光消光現象を利用して前駆体 RNA と成熟 RNA を区別して検出できるプローブを開発しており、この高機能プローブを用いて、RNA 研究だけではなく診断薬としても利用できるシステムを確立する。

研究分担者

加藤義雄 産業技術総合研究所 研究員

A. 研究目的

2004 年にヒトゲノムの概要が発表され、タンパク質をコードする遺伝子の数は従来の予想よりも遥かに少ない 2 万 2 千個程度である事がわかった。タンパク質をコードしない「ノンコーディング領域」はゲノムの 98% を占めており、さらにこのノンコーディング領域の割合は、生物の複雑さに応じて高くなることが明らかとなった。すなわち、ノンコーディング領域に、高次生命現象の鍵が眠っていることになる。特に近年、ノンコーディング RNA として最も注目されているのが、マイクロ RNA である。マイクロ RNA は 22 塩基程度の小さな RNA であり、生体の発生段階で時期・組織特異的に発現し、細胞の運命を左右することが分かってきた。また、癌や糖尿病、肝炎など様々な疾病にマイクロ RNA が関与していることが明らかになってきており、近い将来、治療や診断の対象分子となる可能性が高い。

本研究プロジェクトの主軸は、小児リウマチ性疾患や自己免疫疾患におけるマイクロ RNA を新規に同定・解析し、これらのマイクロ RNA を診断や治療に役立てていく

ことにある。現在までに、自己免疫疾患に関与するマイクロ RNA として、miR-146 の機能を評価しており、将来的に新たな診断法へと展開して行くことが期待されている。しかしながら、検出の対象とするマイクロ RNA は 22 塩基程度の小さな RNA であり、研究対象として確立された技術がほとんどないため、従来の分子生物学的な手法が適用できない場面に遭遇することもある。

一般的には、様々な疾病に対する分子レベルでの知見が蓄積されてきたことにより、従来最先端研究で用いられてきた分子の検出技術が、診断に用いられるようになってきた。身近なところでは、インフルエンザの診断キットが、抗体を利用してウイルス粒子を検出しており、タンパク質実験に不慣れた医師でも 15 分程度で結果の確認をすることができる。また、妊娠初期の尿中に含まれる hCG ホルモンを抗体で検出する妊娠検査薬などは、一般市民でも利用できるほどに簡便化され、街角の薬店で市販されている。

このように抗体を用いたタンパク質の検出は身近になる一方で、核酸 (DNA/RNA) を直接検出する手法が一般的に用いられている例は少ない。マイクロアレイ法などに代表される近年の遺伝子発現の網羅的な解析を通じて、疾病に特徴的な遺伝子の発現

パターンを理解することはできるようになってきた。しかしながら実際の診断では、検査対象として同定された遺伝子 (DNA/RNA) そのものよりも、遺伝子産物であるタンパク質を検出の対象分子とする場合が多く、いわゆるオンサイト(現場)診断には、技術的な障壁が立ちはだかっているのが現状である。

そこで本分担研究では、マイクロ RNA を対象とした診断へと将来的に応用できるような新規マイクロ RNA 検出法の開発を行なう。マイクロ RNA のような低分子核酸を取り扱うには、原子レベルでの構造を考慮した核酸化学の研究が不可欠となってくる。我々がこれまで培ってきた核酸化学の知見を活かし、新規蛍光 DNA プローブや新規蛍光色素の構築を通じて新しい分子診断システムへと展開する。

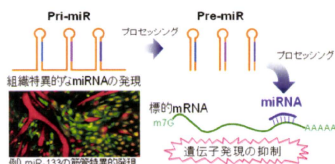


図1 発生や分化における miRNA の役割。時期・組織特異的に転写された miRNA 前駆体 (Pri-miR および Pre-miR) がプロセッシングを受けて短い RNA が生じる。miRNA は塩基配列依存的に標的 mRNA と相互作用して遺伝子の発現を抑制する。

B. 研究方法

マイクロ RNA に限らず、新規ノンコーディング RNA の作用機序解明のためには、発現プロファイルを調べる必要があるが、小さな RNA の検出法に関しては、まだ研究がスタートしたばかりであり、確立されている技術も少ない。迅速、簡便に小さな RNA の検出を行う技術が確立できれば、ライフサイエンス研究だけではなく、診断薬の分野でも利用される可能性が高い。

実際のマイクロ RNA 研究現場では、ノーザンブロット法や、マイクロアレイ法などが利用されている。RT-PCR 法は一般的な RNA 検出法であり、組合せによってマイクロアレイ法や qPCR にも用いられるが、マイクロ RNA 解析には利用されにくい。その理由は、マイクロ RNA が 20 塩基程度と短いために、2 本のプライマーが結合するのが難しいためである。そのため、マイクロ RNA に付加配列を酵素的に連結する等の前処理が不可欠になる。

RNA を直接検出する方法として、in situ ハイブリダイゼーション法を用いた RNA の局在の可視化は魅力的な方法論である。しかし in situ ハイブリダイゼーション法のためのプローブを設計する際、成熟したマイクロ RNA に相補的な配列を利用すれば、そのようなプローブは、同時に、前駆体マイクロ RNA ともハイブリダイゼーションしてしまう。すなわち、成熟したマイクロ RNA だけの細胞内局在を通常の in situ ハイブリダイゼーション法で決定することはできないという問題に直面する (図2)。

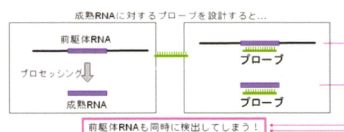


図2 成熟 RNA 検出のためのプローブの問題点。成熟 RNA と塩基対形成するプローブを設計すると、前駆体 RNA にも結合してしまい、区別できない。

そこで我々は、Molecular Beacon 法を改良し、塩基対形成に基づいて蛍光色素が消光する現象 (Kurata S. et al.2001) を利用し、前駆体マイクロ RNA とは塩基対を形成して消光するが、成熟マイクロ RNA とは塩基対を形成しないことにより蛍光を生じるプローブを設計した。そして、この蛍光プローブを用いることにより、成熟マイクロ RNA とその前駆体とを識別でき、成熟マイ

クロ RNA のみを検出できることを見いだした(文献1/特許出願)。また、この手段はマイクロ RNA だけではなく、選択的プロセッシングに関わる RNA や SNP の検出などにも利用できる。

Molecular Beacon 法は、1996 年に Tyagi らによって開発された核酸分子検出技術であり、目的分子がハイブリダイズした場合にのみ蛍光を発する核酸分子に基づく手法である。ステムループ構造を有する核酸分子の一方の末端に蛍光分子を連結し、他方の末端に、その蛍光色素を消光する分子を連結する。ループ部分は標的分子とハイブリダイズする配列を含み、プローブ分子のみの場合には、蛍光分子が消光され、蛍光を発しない。標的分子と塩基対形成すると、蛍光分子と消光分子が離れ、蛍光を発するようになる(図3左)。

我々は、この Molecular Beacon 法と、核酸塩基による蛍光消光現象を組み合わせ、成熟した RNA だけを検出し、前駆体の RNA は検出しないようなプローブを考案した。すなわち、前駆体 RNA とプローブ分子がハイブリダイズする場合には、前駆体 RNA に含まれる核酸塩基が、プローブに結合している蛍光色素を消光して蛍光を発さず、成熟した短い RNA とプローブ分子がハイブリダイズした場合にのみ蛍光を発する仕組みである(図3右)。さらに、プローブ分子だけの場合にはステムループ構造を形成し、ステム部位に連結された蛍光色素が、塩基対によって近接する消光分子(核酸塩基)によって蛍光を発しないため、蛍光検出時のバックグラウンドが極めて低くなる。本法は、Molecular Beacon 法の概念をさらに発展させ、成熟した短い RNA を検出するだけでなく、前駆体 RNA によって蛍光分子を消光して区別することから、“Molecular Spotter 法”と名付けた。グアニン残基自体が消光分子(Quencher)として機能するため、従来の Molecular Beacon プローブに不可欠であった Dabcyl 基の様な消光分子を必要としない。

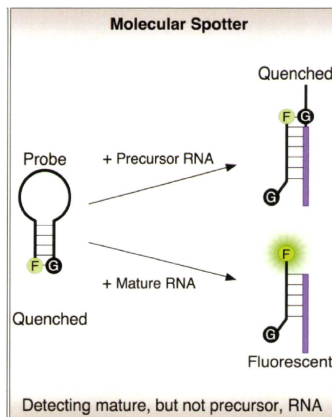


図3 新規蛍光プローブ。Molecular Spotter 法。プローブ分子だけの場合には蛍光消光により光らず、ターゲット分子との結合に伴って光る。今回新規に開発した Molecular Spotter 法では、前駆体 RNA と成熟 RNA を区別して検出することができる。

他の RNA 検出法とは異なり、酵素をまったく用いずに標的 RNA を検出することができること、および、ハイブリダイゼーション後に蛍光プローブ分子の洗浄の必要性がないことが、生細胞における検出のアドバンテージとなっている。本研究課題では、新規蛍光プローブの組み合わせによる検出系の最適化を行う。

C. 研究結果

提案者が考案した新規プローブは、目的 RNA と混ぜるだけで検出できる。始めの実験として、マイクロ RNA に対する蛍光プローブ分子を作製し、モデル実験を行った(図5)。蛍光プローブ分子だけの溶液では、蛍光色素が、隣接するグアニン残基によって消光され、蛍光を示さない(図4A)。ここに、マイクロ RNA 前駆体を加えると、ハイブリダイズはするが、マイクロ RNA 前駆体

に含まれるグアニン残基とプローブ中の蛍光色素が塩基対形成によって近接し、蛍光が消光された(図4 B)。一方、蛍光プローブにマイクロ RNA を加えると、ハイブリダイズに伴って、消光していた蛍光色素がオープンな状態になり、蛍光を発することが確認された(図4 C)。したがって、目的分子をハイブリダイゼーションだけではなく、グアニン残基の有無でも選択することが可能となる。

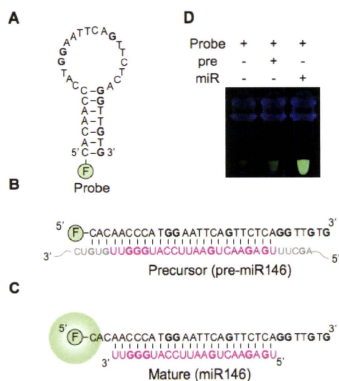


図4 Molecular Spotter Probe の設計。
A: プローブ分子だけの場合には消光される。B: 前駆体 RNA と結合しても消光される。C: 成熟 RNA と結合した場合にだけ蛍光を発する。D: 実験例。200 nM のプローブとターゲット核酸を混合し、UV 光で検出した。

本研究で用いられる蛍光 DNA プローブは、酵素を利用しないため、室温で反応させることが可能である。実際に、どの程度の温度範囲で蛍光 DNA プローブが使用できるのかを調べるため、蛍光 DNA プローブの融解温度曲線を求めた。蛍光 DNA プローブは、そのステム(二本鎖領域)の長さが長いほど、高温で反応することが可能であるが、一方で、反応時間が長くなる蛍光にある。ステム長を4塩基対、5塩基対、6

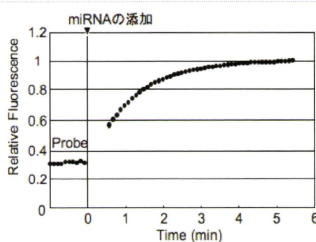
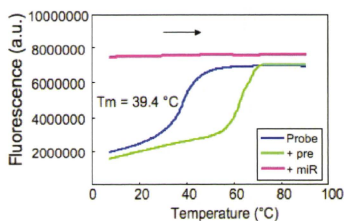


図5 蛍光 DNA プローブの融解温度曲線および反応時間。

塩基対、7塩基対および8塩基対において条件検討を行ったところ、7塩基対の場合に最も効率的にマイクロ RNA を検出できることが明らかとなった。そこで、7塩基対のステムを持つ蛍光 DNA プローブの融解温度曲線を求めたところ、39.4°Cとなり、室温では確実にマイクロ RNA の有無を区別できることが明らかとなった(図5)。

次に、目的のマイクロ RNA を検出するためのどれくらいの時間を要するのかを計測した。今回、7塩基対のステムを有する蛍光 DNA プローブにおいて、マイクロ RNA と混合後にどれくらいでハイブリダイゼーションが起きるのかを調べたところ、ほぼ5分以内にハイブリダイゼーションがプラトーに達することが明らかとなった(図5)。一般的なマイクロアレイやノーザンブロットニング法ではハイブリダイゼーションに10時間以上の時間をかけるのが通常であるが、これらの方法では、固相と液相の界

面で行なわれるハイブリダイゼーションであるために時間がかかってしまう。一方で、今回の研究で使用される蛍光 DNA プローブは液相でハイブリダイゼーションが行なわれるため、非常に速やかに DNA/RNA 鎖の塩基対が形成される。

さらに蛍光 DNA プローブの感度を向上させるため、蛍光 DNA の構造について検討を行った。本研究で用いている蛍光色素は BODIPY-FL であり、蛍光値に関しては十分な強度が得られている一方で、グアニン残基による蛍光消光が完全ではないためにバックグラウンドの蛍光が存在し、全体的な感度に影響を及ぼしている。そこで、より蛍光消光されやすいような蛍光 DNA の構造の探索を行なった。現在利用しているプローブの化学修飾は、3' 末端にアミノリンカーを介した DNA に BODIPY-FL をコンジュゲートしたものである。原理としては、グアニン残基に蛍光色素が近接したほうが、蛍光消光の効率が高いと予想されるため、シトシン残基の5位に BODIPY-FL をリンクさせる方法を検討した。また、グアニンとシトシンの塩基対結合力向上のために、G-クランプと呼ばれる修飾塩基を用い、さらなる効率化を図った。その結果、G-クランプのアミノ基に BODIPY-FL で修飾した蛍光 DNA プローブは、グアニン残基が近傍に無い場合にも蛍光強度がほとんど見られず、この構造が利用できないことが明らかとなった。シトシン残基の5位に BODIPY-FL を修飾した場合には、グアニン残基が近傍に無い場合にも蛍光強度感度が減少してしまい、全体的な感度を向上させることができなかった。一方で、3' 末端にアミノリンカーを介して BODIPY-FL を結合させ、5' 末端に Dabcyl 基を導入させた場合には、バックグラウンドを限りなく減らせることが明らかとなった。

D. 考察

これまでの研究において、我々が考案した Molecular Spotter 法について様々な条件

検討を行ってきた。特に、バックグラウンドの蛍光を減らすため、構造化学的な見地から、新たな材料となる蛍光 DNA を創製し、その有効性を評価した。さらなるバックグラウンド蛍光を減らすためには、LNA (Linked Nucleic Acid) などの修飾核酸を導入することが有効であると考えられる。

一方、現段階の Molecular Spotter 法では、標的分子と検出分子 (プローブ) との対応が 1 対 1 であるため、RI を用いたノーザンプロット法や、鋳型を増幅してシグナルを得る RT-PCR 法などの他法には感度の点で劣る。実際プレートリーダー装置を用いた方法では、3 オーダーの直線性のある検量線が得られたが、検出限界は数 nM 程度であり、マイクロ RNA の検出には 10^6 個程度の細胞数が必須となる。ただし、プレートリーダー装置の光源が水銀ランプであり青色光の出力が弱いことを考慮すると、半導体レーザーの使用により検出感度が高くなることが期待される。また本年度中に、マイクロ RNA を選択的に検出する別の方法を独自に考案しており、妥当性の評価を来年度以降の実験として計画している。

年々、臨床における遺伝子発現検査の比重が高まってきているが、その多くは、抗体を用いたタンパク質の定量化になっている。しかし、今後は RNA を検査する方向にシフトし、提案者の方法が活用できる場面が増えてくと想像している。その理由の一つが、RNA 安定化剤の開発である。Ambion 社 RNAlater 試薬、QIAGEN 社 RNAProtect 試薬など、臨床サンプル中に含まれる RNA の分解を防ぐ試薬が開発され、簡単な前処理だけで、検査会社へサンプル輸送することが容易になると考えられる。検査会社は安定化されたサンプルから RNA を抽出精製して、RT-PCR やその他の検査に使用することができる。

この RNA 安定化剤の組成は、クエン酸や EDTA などの金属イオンキレート剤と pH 5.2 のバッファーである。ほとんどの酵素がこの条件で不活性化されるので、RNA の分

解を防ぐことができるようになる。当然この条件下では、PCR などのポリメラーゼも働かなくなるが、提案者の方法はこの条件下でも使用できる。つまり、RNA 安定化剤の中で蛍光プローブの検出を行うことができるので、迅速かつ安心して検査することが可能である。もちろん、検査残りの RNA は抽出用にまわして、再検査してもよい。

抗体から RNA 検査にシフトする第2の理由は、蛍光測定器の小型化とコストダウンである。抗体検査では発色により、可視光（肉眼）で結果を判断することができるが、RNA をベースとした検査法では、蛍光検出が欠かせない。この点が、RNA 検査におけるネックになっていたと思われる。ところが、近年の発光ダイオードの発展で、レーザー光を手軽に利用できるようになってきた。高い出力の光源が得られれば、それだけ蛍光プローブの感度も向上する。本研究で用いた蛍光色素は、BODIPY-FL である。フルオレセインと波長特性は同等であり、極大吸収波長を 488 nm に持ち、510 nm の蛍光を発する。多くの蛍光検出器がフルオレセイン用の蛍光フィルターを有しているため、BODIPY-FL を利用すれば、多くの研究者が利用することができる。高度検査と簡易検査の二極化が進む中、両方に対応できるツールとして本法が活用できれば、と期待している。

E. 結論

我々は、核酸塩基が隣接すると蛍光が消光するという蛍光色素を利用し、RNA の長さを区別して短い RNA を検出するという

新しいタイプの蛍光プローブを設計して、特許を出願している。Molecular Spotter 法として報告したこの方法は、標的 RNA とハイブリダイゼーションした場合にのみ蛍光を発する仕組みになっており、マイクロアレイ法等で必要な洗浄操作が必要ない。また、液相での反応のため、ハイブリダイゼーションに時間がかからず、30 秒程度で結果が判断できる。さらに、酵素反応を用いないことから、SDS や EDTA など RNA 分解酵素の阻害剤を含んだ状態で検出することが可能で、検体から RNA を抽出・精製する必要がないという利点がある。また、この手段はマイクロ RNA だけではなく、SNP の検出などにも利用できる。マイクロ RNA が関与する遺伝子制御ネットワークの解明によって、これまでその実用化が困難であった医療産業応用への加速化が期待できる。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshio Kato (2008) An efficient fluorescent method for selective detection of mature miRNA species. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, 52, 71-72.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

加藤義雄ほか、「新規蛍光標識核酸」特許公開 2008-86296 (出願日 2006.10.5)

「生細胞で miRNA を検出するための新規ウイルスベクターの開発とモデル解析」 に関する研究

研究要旨

マイクロ RNA (miRNA) は、遺伝子発現の制御を司る 22 塩基程度の小さな RNA である。これまでに 700 種類以上の miRNA が発見され、発生や分化において時期特異的・空間特異的に発現していることが示唆されているが、生細胞で miRNA を定量化する技術がないため、詳細な miRNA の解析が行なえていないのが現状である。従来利用されて来たマイクロアレイやノーザンブロットでは生きた細胞では検出できないという問題点があった。我々は本研究を通じ、分化に伴って発現が変動する miRNA をリアルタイムに観測かつ定量化するシステムを開発しており、様々な miRNA を 1 細胞レベルで観測することにより、診断ツールとしても利用できるシステムを確立する。

研究分担者

加藤義雄 産業技術総合研究所 研究員

A. 研究目的

ヒトゲノム中には、タンパク質をコードしていない領域が大量に存在する。このノンコーディング領域の DNA は進化の過程で溜め込まれた「ジャンク DNA」であると考えられてきたが、近年の網羅的発現解析の成果によって、ノンコーディング RNA として機能していることがわかってきた。特に昨今、ノンコーディング RNA として注目されているのが、microRNA (miRNA) である。miRNA は 22 塩基程度の小さな RNA であり、生体の発生段階において時期・組織特異的に発現し、細胞の運命を左右することが分かってきた。また、癌や糖尿病、肝炎など様々な疾病に miRNA が関与していることから、治療や診断の対象分子となると考えられている。

現在、ヒトにはおよそ 1000 種類の miRNA が見出されており、各々の発現量は細胞や組織、あるいは健康人や疾病者において変化する。したがって miRNA を指標とした診断を行なう場合にはこれらの miRNA を並列的に検出する必要がある。これまでに報告されている miRNA の検出法としてはノーザンブロット法が最も利用されてきているが、1000 種類の miRNA を同時並行的に検出する方法としては全く適していない。

そこで最近では、miRNA の網羅的検出法として RT-PCR と組み合わせたマイクロアレイ法が利用されている。このマイクロアレイ法は、通常の mRNA を検出するための手法としても頻繁に用いられている。

しかしながら、細胞から RNA を抽出してから解析するマイクロアレイ法などの従来の手法には問題点もある。1 つ目は、平均化効果である。「細胞」や「組織」と一口に言ってもそれは均一な細胞集団であるはずもなく、隣り合う細胞でその発現量が異なると考えるのが自然であり、細胞や組織をすり潰して RNA を抽出し、その RNA から miRNA の解析を行ってきた従来の手法では、個々の細胞の個性を消してしまうことになる。また、従来法問題点の 2 つ目としては、死んだ細胞を解析するために、外界刺激応答性に対する変化を観測できない点が上げられる。すなわち、従来の方法論では細胞をすり潰して(殺して) RNA を解析するため、生きた細胞で観測できるような細胞の形態変化や薬剤に対する経時変化を追うことができないのである。

上記のような問題点を解決するために、我々は、生きた細胞で miRNA をリアルタイムで検出する手法の開発に取り組んで来た。本研究プロジェクトの軸は、小児リウマチ性疾患や自己免疫疾患における miRNA を新規に同定・解析し、これらの miRNA を

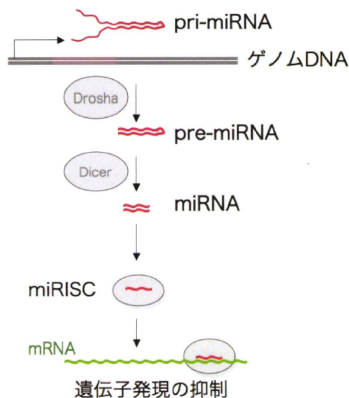


図1 発生や分化における miRNA の役割。
時期・組織特異的に転写された miRNA 前駆体 (Pri-miR および Pre-miR) がプロセッシングを受けて短い RNA が生じる。miRNA は塩基配列依存的に標的 mRNA と相互作用して遺伝子の発現を抑制する。

診断や治療に役立てていくことにある。現在までに、自己免疫疾患や関節炎に関与する miRNA として、miR-146 や miR-140 の機能を評価しており、将来的に新たな診断対象と展開して行くことが期待されている。しかしながら現在解析段階ということもあり、新たに開発するシステムを検証するためには、複数のグループから報告され、より一般的に認知されている miRNA をモデルケースとした方が好ましいと思われる。そこで本研究では、筋肉特異的 miRNA として知られている miR-133、およびアデノウイルス由来 miRNA (miR-VAIT5、miR-VAIT3) を指標として、生きた細胞内での miRNA の観測および定量化を試みることにした。

B. 研究方法

レトロウイルスベクターの構築

pMXCRGb: プラストサイジン耐性遺伝子と融合した GFP の DNA 断片は、pEGFP-C3 および pTracer を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - AGGGATCCGCCACCATTGGTGTAGCAAGGGCGAG -3'、5' - ACTACTCGAGGTTAAACG AATTCTAGCCCTCCCAC -3' および 5' - GACAAAGGCTTGGCTTGGCCATCGATTTGTACAGCTCGTCCATGC -3'。PCR 産物を BamHI、XhoI で切断し、pMX-puro に組み込み、pMXGb を得た。RFP を含む断片は、pRSET-mCherry を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - CGGAAGCTTGCACCATGGTGAGCAAGGGCGA -3' および 5' - AAAAGTCGACTAATCGATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3'。PCR 産物を HindIII、SalI で切断し、pMXGb に組み込み、pMXCRGb を得た。CMV プロモーターは、pEGFP-C3 を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - AACTCGAGTAG TTATTAA TAGTAATCAATTACGG -3' および 5' - ACAAGCTTCTAGTGATCTGACGGT TCACTAAA -3'。PCR 産物を XhoI、HindIII で切断し、pMXCRGb に組み込み、pMXCRGb を得た。

pMXCRGb[133]: miR-133 に完全に相補的な標的配列の3回繰り返した DNA 断片は、以下の2つの DNA をアニーリングして調整した: 5' - AATTACAGCTGGTTGAAGGGGACCAACAGTGGTTGAAGGGACCAA -3' および 5' - TCGATTGGTCCCCTTCAACCAGCTGTTGGTCCCCTTCAACCAGCTGTTGGTCCCCTTCAACCAGCTGTTGGTCCCCTTCAACCA GCTGT -3'。得られた二本鎖 DNA を pMXCRGb の ExoRI、XhoI サイトに組み込み、pMXCRGb[133] を得た。

レンチウイルスベクターの作製

レンチウイルスベクターを構築するため、Phusion DNA ポリメラーゼを用いて2つの連結した遺伝子を融合 PCR 法を用いて増幅させた。GFP および RFP は、同じプライマーと制限酵素サイトを用いて互いに可換である。

pLV. WPRE: ユニークな制限酵素サイトを導入するため、元ベクターpCMV-GIN-ZEOを組換えることによって新たに pLV. WPRE を基本ベクターとして構築した。WPRE 領域は pCMV-GIN-ZEO を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した：5'-AAAGGGCCCTCGAAGCGCGCCCTCGAGGAATCAACCTCGATTACAAA-3'、5'-ATGTTTTTCTAGGTCTCGATGATCAGCGGGGAGCGGCCCA-3'、5'-AAAGGTACC TGAGGTGTGAC-3'。PCR 産物は ApaI、KpnI で切断後、pCMV-GIN-ZEO の ApaI/KpnI サイトに挿入し、pLV. WPRE を得た。

pLV. PtR: マウスホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーターは、NIH3T3 細胞のゲノム DNA を鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-ACAGCGGCCCAATTCTACCGGTAGGG-3'、5'-CTTGCTCACCATGGTGGCTAGCGAAGGCCCGGAGATG-3'。PGK プロモーターに連結した RFP 断片は pRSET- tdTomato と先の PCR 産物を鋳型として、以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-TTCCTCAGGATCCCGGAAATTCATTGTACAGCTCGTCC-3'、5'-ACAGCGGCCGAATTCTACCGGTAGGG-3'。モノマーに相当する PCR 産物は、NotI、XhoI で切断後、pLV. WPRE の NotI/XhoI サイトに挿入し、pLV. PtR を得た。

pLV. SGx. PtR: SV40 プロモーターに連結した GFP 断片は、pEGFP および pMX-puro を鋳型として以下のプライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-AATTGGCGCGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA-3'、5'-TTGCTCACCATGGTGGCATTCTCTTAGATTTTGCAAAAGCCTAGCCCTCAAA-3'、5'-AAATTCGAATCGATTTTGTACAGCTCGTCCAT-3'。PCR 産物は NotI、Csp45I で切断後、pLV. PtR の NotI/Csp45I サイトに挿入して、pLV. SGx. PtR を得た。

pLV. SG. PtR: プラストサイジン耐性遺伝子に連結したボリアデニル化シグナルは、pTracer-EF/Bsd を鋳型として、以下のプ

ライマーを用いて、PCR で増幅した：5'-GGGCCCTCGAACCATAGAGCCCAACCGCATC-3'、5'-CTGGCAACTAGAAGGCA CAGACGCGTGGATCCCGGGAATTCAGCCCTCCACACA CATAAC-3'、5'-AATCTA GACCATGGGAATCGATGGCCAGCCCAAGC-3'。PCR 産物は Csp45I、ClaI で切断後、pLV. SGx. PtR の ClaI サイトに挿入し、pLV. Sgb. PtR を得た。

pHV. Sgb. PtR: RSV プロモーター断片は、pLenti6 を鋳型として、以下のプライマーを用いて増幅した：5'-TGACCTGACAATGT AGTCTTATGCAATACTCT-3'、5'- ATGTTT TTCTAGGTCTCGATGATCAGCGGGGAGCGGCCCA-3'。PCR 産物は SalI、BssHII で切断後、pLV. Sgb. PtR の SalI/BssHII サイトに挿入し、pHV. Sgb. PtR を得た。

pHV. SiGb. PtR: 人工イントロンは、pBIND を鋳型として、以下のプライマーを用いて増幅した：5'-GGAGGCTAGGCTTTTGC AAATCTCTGACACAACAGTCTCTCG-3'、5'-TTGCTCACCATGGTGGCATCTCTCTTAGATTGCAAAAGCCTAGGCTCCAAA-3'。PCR 産物は AvrII、XbaI で切断後、pHV. Sgb. PtR の AvrII/XbaI サイトに挿入し、pHV. SiGb. PtR を得た。

pHV. FtRb. PG: 伸長因子 1a (EF1a) プロモーターは、pTracer-EF/Bsd を鋳型として、以下のプライマーを用いて増幅した：5'-AAAAAGCGCGCGCTCCGGTCCCGTCA-3'、5'-CCCTCTAGATCAGCAGACC TGAATGGAAG-3'。PCR 産物は、NotI、XbaI で切断後、pHV. StRb. PG の NotI/XbaI サイトに挿入し、pHV. FtRb. PG を得た。

miRNA センサーベクターの構築

VAI RNA の二本鎖領域と相補的な配列の 3 回繰り返しに相当する断片は、T7 DNA ポリメラーゼおよび以下のプライマーを用いて、プライマー自己伸長反応により調整した。得られた断片は、BamHI、EcoRI で切断後、pLV. Sgb. PtR の BamHI/EcoRI サイトに挿入した。

VAI T5: 5'-AAGAATTCACCAGACCAGG AAGAGTGCCACCAGACCAGGAAAGAGTGCCACCAGA

CCACGGAAGAGTGCCCGGATCCGG-3', VAI T3:
 5'-AGAATTC
 AAGGAGCGCTCCCCGGTTGTCTGAAGAGCGCTCCCC
 GTTGCTGAAGGAGCGCTCCCCGGTTGTCTGGATCCAG
 -3', VAI A3:
 5'-AAGAATTC AACCCCGGTCGCCCATGATAACCC
 CGGTGCTGCCCATGATAACCCCGGTCGCCCATGA
 TAGGATCCTA-3', VAI A3:
 5'-AGAATTCATCACGGC
 GGACGCCGGACTCTACACGGCGGACGCCGGGACTAT
 CACGGCGGACGCCGGATCCGG-3', miR-1:
 5'-AAGAATTCACA
 TACTCTTTACATCCATACACTCTTTTACATCCA
 TACATACTCTTTACATCCAGGATCCCTG-3',
 let-7: 5'-AAGAATTC
 AACTATACAACCTACTACCTCAACTATACAACCTACTA
 CCTCAACTATACAACCTACTACCTCAGGATCCCTG-3'.

Whole-mount in situ hybridization

Whole-mount in situ ハイブリダイゼーションは従来法どおりに行なった。マウス胚 (E11.5) を、4% PFA、0.2% グルタルアルデヒドで室温 20 分間処理した。ジゴキシン (DIG) 標識されたアンチセンス鎖プローブ (500 ng/ml) を、70° C、14 時間ハイブリダイゼーションさせた。マウス胚は、抗 DIG 抗体のアルカリフォスファターゼ Fab 断片および NBT/BCIP で処理した。pri-miR133a2 の断片は、マウス cDNA を鋳型として、以下のプライマーを用いて PCR で増幅した: 5' - TCTGCCTCCAGCCATG-3' および 5' - TAATACGACTACTATAGGGATCCACTGGGAGGAGAGACTCC-3'。成熟 miRNA 領域は我々の条件下では、検出には短くすぎたため、primary 領域を使用しているが、LNA プローブの検討も可能である。DIG 標識されたプローブは DIG-RNA 標識キットおよび T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写させた。

筋分化の誘導

マウス筋芽細胞 C2C12 は、10%ウシ血清および DMEM から構成される増殖培地 (GM) に

て培養した。C2C12 を高密度になるまで培養した後、2%ウマ血清および DMEM から構成される分化誘導培地 (DM) に置き換えた。

レトロウイルスの作成と感染

レトロウイルスパッケージング細胞株 Plat-E は、10%ウシ血清、1µg/ml ビューロマイシン、10 µg/ml プラストサイジンおよび DMEM から構成される培地にて培養した。細胞には、TransIt-293 を用いてトランスフェクションを行なった。80%密度の細胞にレトロウイルスベクターをトランスフェクションしてから 18 時間後、培養培地を新しいものに置き換え、さらに 30 時間後に培地を回収して 0.45µm のフィルターで濾過した。フィルター濾過したウイルス入の培地は、5µg/ml のポリブレンとともに、C2C12 筋芽細胞へと感染させた。遺伝子導入された細胞は、適宜選択後、顕微鏡下にて観察した。

レンチウイルスの作製と感染

293T および HT1080 細胞は、10%ウシ血清、DMEM 培地で培養した。プラスミドは、TransIt-293 を用いてトランスフェクションを行なった。6 ウェルに播種した 293T 細胞が 80%コンフルエントになった時、レンチウイルスベクター (0.8µg)、pMDL-gp-RRE (0.4 µg)、pRSV-Rev (0.4 µg)、pCMV-VSVG (0.4 µg) をトランスフェクションした。18 時間後、培地を新しいものと交換した。さらに 30 時間後、培地を回収し、0.45 µm フィルターで濾過した。濾過されたウイルス溶液をポリブレン (5 µg/ml) とともに HT1080 細胞に添加し感染させた。感染から 2 日後、細胞にプラストサイジン (100 µg/ml) を添加し選択した。組換えウイルスの操作にあたっては、遺伝子組み換えの安全指針に従って適切におこなった。

ノーザンブロット

ISOGEN 試薬を用いて RNA を抽出・精製し、12%ポリアクリルアミド電気泳動 (8M 尿素

存在下)を行なった。電気泳動後、エレクトロブロットニングにより RNA を Hybond-XL 膜へと固定化した。³²P 標識された RNA プローブを用いて、miRNA の検出を行なった。

アデノウイルスの FACS 解析

組換えアデノウイルス Ad2/βGal-4 を HT1080 細胞に感染させた後、5 日目に細胞をトリプシン処理して FACS Aria で解析を行った。GFP および RFP の蛍光シグナルは、488nm のレーザーで励起された後、515-545 nm (FL1) および 562-588 nm (FL2) バンドパスフィルターで蛍光を測定した。RFP の発現が高い場合、GL2 フィルターにおける GFP の漏れ込みは、補正を行なわずとも無視できる程度であった。

C. 研究結果

生きた細胞内の miRNA の発現をリアルタイムで観測することができれば、その細胞がまさに miRNA を発現しつつあるという状況を捉えることができる。しかし、miRNA を直接的に定量するためには、現状では細胞を殺して RNA を抽出せざるを得ない。一方で、miRNA を間接的に検出する方法として、miRNA による遺伝子発現抑制効果を利用する方法が報告されている。miRNA に完全に相補的な配列をレポーター遺伝子の下流に組み込むと、そのレポーター遺伝子の発現が抑制されることが知られており、これまでの報告例では、ルシフェラーゼや β-ガラクトシダーゼといったレポーター遺伝子を用いて miRNA の活性が評価されてきた (Zeng ら, Mol. Cell, 2002)。しかしながら、細胞を溶解または固定化させなければならず、不均一な細胞集団の中で miRNA を発現する細胞を特定することは困難であった (Brown ら, Nat. Med., 2006)。

そこで我々は、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (RFP) を採用し、生きた細胞内で miRNA の活性を測定することを試みた。

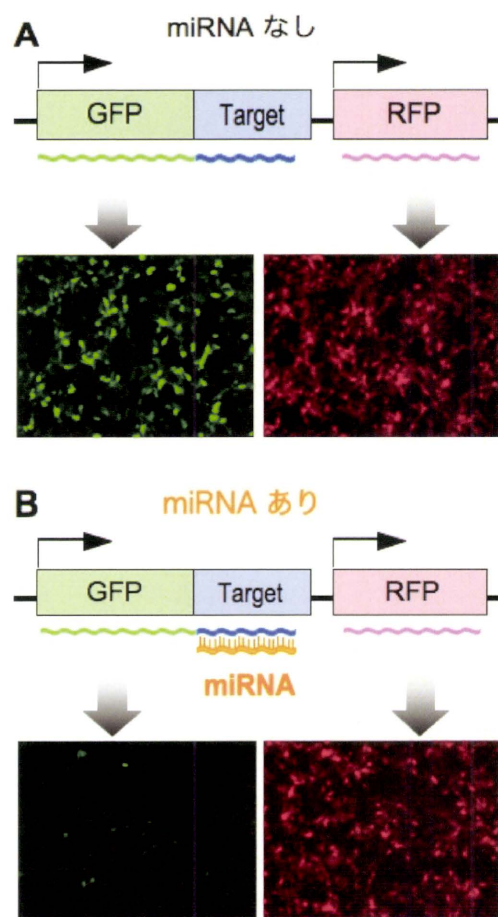


図 2 miRNA 標的遺伝子を検出する方法。GFP・RFP 発現ベクターを細胞に導入した場合の蛍光顕微鏡像を示す。GFP 遺伝子の 3' 非翻訳領域に標的配列を組み込んでおくと、miRNA 導入時に、GFP の蛍光が減少する。RFP の赤色蛍光は内部コントロールとして用いており、miRNA の導入による蛍光強度の変化はない。

従来、1 色の蛍光タンパク質を用いた評価系が報告されているものの、1 色の蛍光だけでは目的の蛍光強度の減少なのか、細胞活動の低下による蛍光の減少なのか、あるいは蛍光タンパク質遺伝子導入の効率が悪かったのか判別できないという問題点があった。上記研究代表者による方法では、2 色の蛍光タンパク質を同一発現ベクターに搭載することにより細胞ごとに内部標準と

することで、miRNAの活性を定量化することを可能とした(図2)。

筋分化における miR-133 の発現

最近の miRNA に関するマイクロアレイやパイオインフォマティクスによるアプローチから、筋肉特異的な発現を示す miRNA として、miR-1、miR-133 および miR-206 が同定された。これらの筋肉特異的 miRNA は筋肉の成長や分化と深く関わっている。miR-1 と miR-133 はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存された miRNA である。miR-133 は筋肉の分化に伴って発現が上昇する一方で、miR-133 筋芽細胞の増殖を促進することが報告されている。これは、筋分化を促進する miR-1 や miR-206 とは逆方向の働きを持っていることを示している。

C2C12 細胞は、マウス骨格筋の筋芽細胞であり、培養状態において、間葉系細胞として多分化能を有する。C2C12 筋芽細胞が筋分化誘導時において、miR-133 の発現が上昇することが報告されている。我々もノーザンブロット解析において他のグループと同様の結果を得ており、増殖培地 (GM) から分化誘導培地 (DM) へと培養条件を変えることによって、4・7 日の間に 6 倍程度発現が上昇することを確認した(図3)。miR-133 の発現についてさらに、定量 RT-PCR 解析を行ない、およそ 5 倍の発現上昇を確認した。筋分化に伴う miR-133 の発現は、myoD や myogenin といった古典的な筋肉マーカーと同様に、分化の指標として新たに利用できる可能性がある。次に我々は、発生時における miR-133 の役割を解析するため、whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。

miR-133 (今回解析したのは前駆体である pri-miR-133) は、マウス胚の体節で強く発現していることが明らかとなった。しかしながら、上に記載したノーザンブロット法、RT-PCR 法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を含めた従来の方法論では、

細胞や組織をホモジェナイズあるいは固定化しなければならず、筋分化における miR-133 の発現挙動を追跡する上では、あまり適した方法ではない。

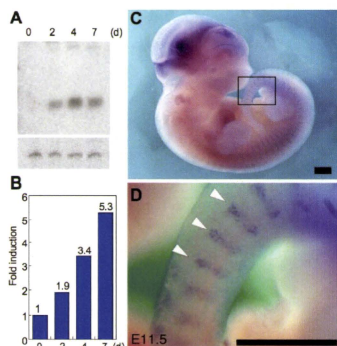


図3 miR-133 の発現プロファイル。A. C2C12 を分化誘導させた際の miR-133 の発現変動。B. RT-PCR 定量解析。C, D. *in situ* ハイブリダイゼーションによる miR-133 局在の確認。

緑色および赤色蛍光タンパク質を搭載したレトロウイルスベクター

筋分化を生きた細胞で観測するため、我々は 2 種類の蛍光タンパク質を搭載した独自のレトロウイルスベクターを用いて、2 色同時測定する系を構築した。前項(研究方法)に記載した通り、レトロウイルスベクターは、マウス白血球ウイルス (M-MLV) ベクター pMX に基づいている。このレトロウイルスベクターは、自己不活性化型 (SIN) ではなく、2 つの活性型 LTR を有しているため、レトロウイルスがゲノム DNA へ挿入された後においても、上流 LTR からの転写が起きる。その結果、プロウイルスは 2 つの独立した転写産物を発現ことになる。一つは、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター駆動で赤色蛍光タ

ンパク質 (RFP) を発現し (transcript 1)、もう一方は、LTR プロモーター駆動で GFP を発現する (transcript 2)。後者の転写産物 (transcript 2) は、RFP および GFP 両方の配列を有してはいるが、真核生物では二つ目の ORF からは翻訳が起きないため、事実上、GFP しか発現しない。3'LTR 中の R 領域は、両方の転写における共通のポリアデニル化シグナルとして働く。

蛍光タンパク質の近年の凄まじい発展によって、従来利用されてきた水色 (CFP) や黄色 (YFP)、緑 (GFP)、赤 (DsRed) の他にも、様々な色の蛍光タンパク質が利用できるようになってきた。特に赤色においては、波長特性や蛍光収率が飛躍的に向上し、マルチカラー観測に応用されるようになってきた。波長が重複しないように観測するためには、緑色と赤色の組合せは、水色と黄色よりも好ましい。GFP とともに利用することができる RFP の最適な組合せを探るため、RFP 発現プラスミドをトランスフェクションしたところ、明るさとしては $\text{tdTomato} > \text{mCherry} \sim \text{mOrange} > \text{DsRed}$ であった。しかしながら我々の蛍光顕微鏡のフィルターセットでは、mOrange、tdTomato、DsRed が、緑色蛍光とオーバーラップしてしまうことが明らかとなったため、以降の実験では RFP として mCherry を用いている。

我々が構築したレトロウイルスベクターを用いて miR-133 の発現を観測するために、miR-133 と相補的な配列を pMXCRGb プラスミドの GFP と CMV の間に挿入し、pMXCRGb[133] を作製した。miRNA は標的 mRNA に相補的に相互作用してその発現を抑制するため、miR-133 と相補的な配列を持つ GFP の mRNA は、miR-133 の発現に伴って減少することになる。この際、RFP の発現レベルは変化しない。標的配列を 3 回繰り返すことによって、1 つの標的配列よりも発現抑制効果が高くなることが報告されている。レトロウイルスはゲノム DNA にランダムに挿入されるため、挿入位

置によってはレトロウイルスからの遺伝子発現が変動することがある。そのため、RFP はその発現変動を補正する意味合いがある。

筋分化における miR-133 のリアルタイム観測

構築したプラスミド (pMXCRGb または pMXCRGb[133]) を 293T ヒト腎細胞由来の Plat-E パッケージ細胞にトランスフェクションした後、培養上清を回収して組換えレトロウイルス粒子を得た。レトロウイルスを C2C12 筋芽細胞に感染後、プラストサイジン薬剤で感染細胞だけを選択した。プラストサイジン耐性遺伝子は、GFP との融合遺伝子となっている。レトロウイルス (MXCRGb または MXCRGb[133]) が導入された C2C12 筋芽細胞では、GFP および RFP の蛍光が観測された (図 4 左)。GM 培地で培養されているこの段階の細胞では、miR-133 は発現していない (図 2 A)。

次に、内在性の miR-133 の発現を観測するため、レトロウイルスを導入した細胞を DM 培地で 6 日間培養したところ、細胞は通常通り分化した。分化誘導に伴って、MXCRGb[133] が導入された C2C12 筋芽細胞では、GFP 発現の減少が見られた (図 4 右)。特に、筋管細胞において GFP 蛍光の顕著な減少が確認された。RFP 蛍光には影響がなかったことから、この蛍光変化は GFP に特異的なものである。一方、miRNA の標的配列が含まれていない MCRGb が導入された C2C12 では、筋管細胞へと分化誘導しても、GFP 蛍光に変化は見られなかった。これらの結果から、筋管細胞へと分化している細胞において、miR-133 が発現しているものと考えられる。筋管細胞は、細胞同士が融合して大きな細胞塊を形成するため、フローサイトメトリー解析を用いた定量解析ができない。そこで、顕微鏡像を画像解析することによって分化前後の細胞の蛍光強度を測定することにした。その結果、筋管細胞での GFP の蛍光強度が顕著に減少していることが明らかとなった。興味

深いことに、GFP の発現は筋管細胞形成に先立って減少しており、miR-133 は表現型の変化よりも前に発現していることが示唆された。我々の解析結果は他の報告を裏付けるものであり、筋分化における生きた細胞内での miR-133 の動的挙動を明らかにするものである。

新規レンチウイルスベクターへの展開

我々はこのベクターをさらに発展させ、新たにレンチウイルスベクターを構築した。この際、特に重要視したのは GFP と RFP の発現の相関性である。GFP と RFP の発現が常に(i)転写干渉を引き起こさないようにするため 2 つのプロモーターを逆向きに配置する離散型 (divergent) 転写ユニットの採用、および(ii)クロマチン制御を受けやすい YY1 転写因子結合配列を有する CMV プロモーターを使わない様に、レンチウイルスベクターを数十種類構築した。その中から最もウイルス作製の力価が高く、GFP および RFP の発現量が高いベクター pLV.SGb.PtR を採用することとした。

この最適化したベクターを用いることにより、緑色・赤色蛍光タンパク質の発現量の相関性が飛躍的に向上した。実際に、研究代表者が発見したアデノウイルス由来 miRNA (miR-VAIT3 および miR-VAIT5) の標的遺伝子をタンデムに連結したインジケーターベクターを上記のレンチウイルスベクターを用いて構築し、HT1080 細胞に感染させたところ、フローサイトメトリー解析において斜めの線状プロットを示した (図5)。これは緑色・赤色蛍光タンパク質の発現量が相関していることを示している。さらに、この細胞にアデノウイルスを感染させたところ、細胞集団全体が左側に移動した。すなわち、アデノウイルス由来 miRNA の発現に伴って、標的配列を有する GFP の発現量が低下したことを示している。同様の方法で内在性発現の miRNA 「let-7」を検出することに成功している。

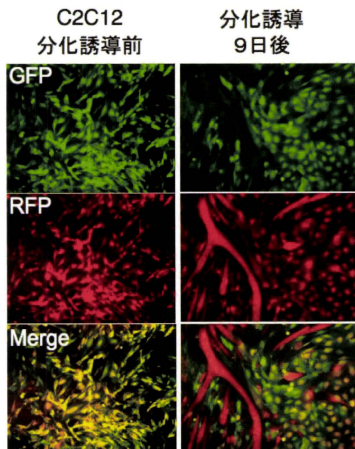


図4 骨格筋特異的な発現を示す miR-133 の発現を、生きた細胞内で可視化することに成功した。GFP および RFP を搭載したレトロウイルスベクターを用い、マウス筋芽細胞 (C2C12) に感染させた。筋分化する際に miR-133 が特異的に発現することを見出した。

D. 考察

分化における miRNA 可視化の重要性

今回システムの検証のために利用した miR-133 は、筋肉特異的な miRNA であるが、他にも組織特異的な miRNA が数多く知られている。また、疾病特異的な miRNA なども報告されるようになってきており、miRNA を標的とした分子診断の重要性は年々高まりつつある。

miR-133 においては、miR-133 の発現を調節する転写因子、血清応答因子 (SRF) が標的であることが最近明らかとされた。転写因子と miRNA は様々な生命現象において相互に調節し合うことが示唆されている。一つの miRNA が複数の遺伝子を標的

とし、また一つの遺伝子が複数の miRNA から調節されることを考えると、miRNA が関与している筋分化もまた、複雑な分子ネットワークを構築していると考えられる。これまでの知見に加えて、今回の解析結果から新たに、筋管形成に先立って miR-133 が発現してくることが明らかとなった。分化時の 1 細胞レベルにおける miRNA 発現のリアルタイム解析は、筋肉特異的 miR-133 だけではなく、他の miRNA 発現変動にとっても今後重要な解析ツールとして用いられることが期待される。

miRNA の継続的観測ツールとしてのレトロウイルスベクター

今回の研究では、2 色の蛍光タンパク質を使って miRNA を生きたまま観測するレトロウイルスベクター系を設計した。GFP 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-133 の標的配列を連結し、また、同一ベクター上に内部コントロールとして機能する RFP が独立して発現させた。配列内部リボソーム進入部位 (IRES) は、1 つの mRNA 上から複数のタンパク質を翻訳させることが知られているが、IRES が連結された mRNA は、siRNA によって mRNA が分解されてしまうことが知られている。したがって、今回の目的に IRES は使用できない。我々は今回 miR-133 による GFP の現象を観測したが、miR-133 の標的が無い場合 (MXCRGb) には変化が無かったことから、これはプロモーター影響によるものではない。同様のレトロウイルスベクター系を用いることによって、他の種類の miRNA、例えば、内在性の let-7 やアデノウイルス由来 miRNA も検出することが可能であった。また、レト

ロウイルスベクター中の miRNA 標的配列が繰り返されていることにより、内在性の miRNA が捕捉されて阻害を受けることが懸念されるが、我々の行なった C2C12 の誘導実験の結果を見る限りではそのような影響は無いようである。この件に関しては、miRNA の標的配列が完全に相補的であるならば、過剰に発現されていたとしても、素早いターンオーバーによって、miRNA の調節に影響を与えることはないとの報告例がある。

筋分化や筋管形成には通常 1 週間程度かかるため、レポーター遺伝子はその間、定常的に発現していなければならない。トランスフェクションから 3-4 日で減少してしまうプラスミドの導入とは違って、レトロウイルスベクターはゲノム DNA に挿入され、細胞分裂後も娘細胞へと伝播されていくため、恒常的な遺伝子の発現が期待できる。しかしながら、レトロウイルスベクターはランダムな位置でゲノム DNA に挿入されるため、挿入位置によっては、導入した遺伝子の発現に影響を受けるかもしれない。

現在、レトロウイルスベクターの欠点を補った新たなレンチウイルスベクターを開発中である。感染性を脊椎動物へと広げることによって miRNA の解析を *in vitro* の培養細胞だけでなく、*in vivo* の組織にも応用できることが期待される。我々の miRNA 可視化システムは、様々な生物学的現象における種々の miRNA の解析へと応用できるだろう。

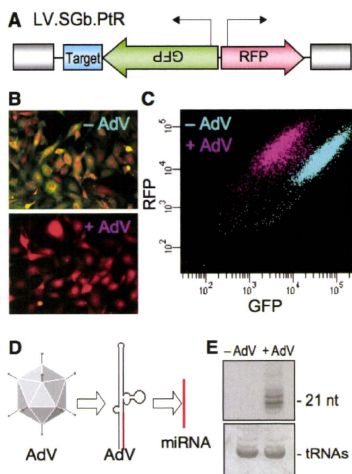


図5. 新規レンチウイルスベクター。A. ベクターの構造。B. アデノウイルスを感染させると (+AdV) 緑色蛍光が減少する。C. FACSを用いた蛍光強度の定量解析。D. E. アデノウイルス由来 miRNA の発現様式と、ノーザンプロットによる発現確認。

E. 結論

蛍光タンパク質遺伝子の非翻訳領域に、miRNA と完全に相補的な配列を挿入したウイルスベクターを構築し、miRNA の発現を生きた細胞内で検出する方法を構築した。筋肉特異的に発現する miR-133 について、筋芽細胞から筋細胞へと分化する際に発現上昇する miR-133 の様子を生きた細胞内でレシオイメージングすることが可能であった。生きた哺乳動物細胞内で miRNA を定量的に観測することに成功した世界初の例であり、今後様々な miRNA の解析に展開して行くことが期待される。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

IV. 研究発表一覧表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成20年度 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
関敦仁	上腕・肘関節・前腕構造と機能	越智隆弘	最新整形外科学大系14	中山書店	東京都	2008	1-20
川合眞一	薬効群別副作用 非ステロイド抗炎症薬	監修：高橋隆一	医薬品副作用ハンドブック第1版	日本臨牀社	東京	2008	110-113
楠夏子, 川合眞一	治療薬剤：(1)非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)	宮坂信之編集	新しい診断と治療のABC ⑧ 関節リウマチ [改訂第2版]	最新医学社	東京	2008	176-184
川合眞一		単著	ササッとわかる最新「関節リウマチ」治療法	講談社	東京	2008	
橋口正行, 井上幸恵, 田中孝典, 高木賢治, 川合眞一, 望月眞弓	メトトレキサートのよる関節リウマチ個別化療法の確立のための臨床薬理学的研究		臨床薬理の進歩2008 NO.29	発行：財団法人臨床薬理研究振興財団	東京	2008	143-153
川合眞一	1. ステロイド内用剤とは？	宮坂信之編集	正しいステロイド剤の使い方 1. 内用剤編	医薬ジャーナル社	大阪	2008	8-11
川合眞一	薬効群別副作用. 8. 鎮痛薬 [1] 非ステロイド性抗炎症薬	伊藤澄信編	頻用薬・常用薬上手に使っていますか？ 日常診療でよく使う薬の使い方とそのポイント	日本医事新報社	東京	2009	176-179
川合眞一	フェルティ症候群	山口徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集	今日の治療指針2009年版	医学書院	東京	2009	619-620
川合眞一	診療ガイドライン. 19. 関節リウマチの診療マニュアル 診断のマニュアルとEBMに基づく治療ガイドライン (2004)	山口徹, 北原光夫, 福井次矢 総編集	今日の治療指針2009年版	医学書院	東京	2009	1644-1648