

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08218

研究課題名(和文) 高感度な核酸-蛋白質相互作用評価法の開発と核酸医薬への展開

研究課題名(英文) Sensitive assay for nucleic acid and protein interactions and its application for nucleic acid medicines

研究代表者

三重 安弘 (Mie, Yasuhiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：00415746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：疾患に関与しているマイクロRNA(miRNA)の作用を、これに相補的な配列を有する人工核酸を用いて抑制しようという医薬が注目され、がん細胞の増殖抑制効果などが報告されているがその詳細な機序は未解明となっている。miRNAはArgonauteと呼ばれる蛋白質に結合して作用するため、この蛋白質複合体と人工核酸との相互作用を分析することが重要となるが、その迅速な分析法は開発されていない。本研究では、当該反応を電気化学的に計測する迅速分析法の基盤技術を開発した。電極上に合成核酸分子を適切に固定し、複合体を作用させることで両者の結合による電極界面の変化を電流として高感度に捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、miRNA-蛋白質複合体とmiRNAに結合する人工核酸(AMO)との相互作用を迅速に評価可能な電気化学分析法の基盤技術を確立した。miRNAはがん等の疾患に関与している核酸であり、これと相互作用してその機能を抑制するAMOの開発が活発に行われ、次世代医薬として期待されている。実用に向けて、AMOとmiRNA-蛋白質複合体との相互作用の強さなどを適切に評価しその作用機序を理解することが重要であり、本研究で開発した基盤技術はこの目的に有用と期待される。

研究成果の概要(英文)：The microRNA(miRNA) functions, which relate to many diseases, can be inhibited by anti-miRNA oligonucleotides(AMOs). Some AMOs have reported to impair proliferation of cancer cells. However, the mechanistic is not fully understood. MiRNA functions with Argonaute protein; hence, the analysis for the interaction of AMOs and the protein complex is useful. Despite these, the rapid assay method has not been developed. In the present study, we succeeded in the rapid analysis for the interaction of AMOs and miRNA-protein complex by an electrochemical method, where the reaction occurred at the electrode surface.

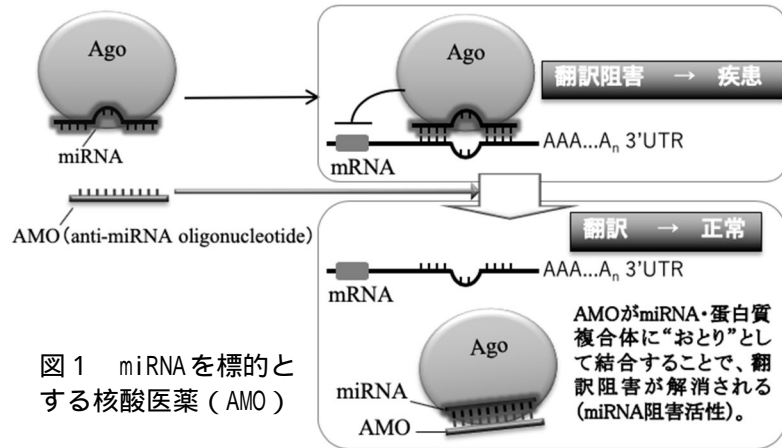
研究分野：電気化学分析

キーワード：miRNA Ago蛋白質 anti-miRNAオリゴ 電気化学分析 電極界面

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は、Argonaute(Ago)蛋白質内に取り込まれて複合体を形成し、標的 mRNA に結合して遺伝子発現を調節している。この制御システムに異常が生じると、がんを中心とするヒトの疾患の発生や進展に関わることが明らかになっている(図 1)。例えば、悪性脳腫瘍である膠芽腫細胞には、miR-21 が過剰に存在し、アポトーシス促進に必要な蛋白質発現が抑制されて(がんの進行や薬剤耐性等が生じて)いる。こういった miRNA 活性を抑制するための、該 miRNA と相補的な配列を有する、anti-miRNA oligonucleotide (AMO, 図 1)の開発が世界中で行われている。ヌクレアーゼ耐性等が強化された化学修飾核酸を用いた AMO 等が多く報告されており、標的 mRNA の代わりに Ago 蛋白質内の miRNA と結合することでその活性を阻害していると考えられている。しかしながら、その詳細な作用機序は未解明となっている。



我々は最近、共有結合で鎖間架橋した二本鎖核酸を AMO の末端に導入すると、極めて高い活性を示すこと、およびその導入位置により顕著に活性が異なることを見出した。また、Sigma 社から販売されている AMO についても、末端に導入する二本鎖核酸の長さの重要性が報告されている。すなわち、AMO による阻害反応は単純に miRNA と AMO のハイブリダイゼーションでは説明できず、その理解のためには、Ago・miRNA 複合体と AMO との反応を分子レベルで解明することが必須となってきた。このためには、種々の AMO を用いて実用的な濃度での in vitro 相互作用アッセイの比較検討が有用と考えられる。しかしながら、in vivo 実験から示唆される、該アッセイに用いるべき AMO 量は微量なため、現在は高感度検出が可能な放射標識核酸(を用いたノーザンプロットアッセイ等)による親和性評価が行われており、ロースループットという課題を有している。

一方、電気化学法は、電極基板上の分子を高感度かつ迅速に計測できる特徴を有している。これまでに、オリゴ核酸の片末端にジスルフィド構造などのリンカーを付与すると、電極上に該核酸が“適切な角度”で固定され、その動態変化による電流応答(図 2a)を高精度に計測できることを明らかにしている。また、二本鎖間を架橋した剛直なオリゴ核酸において該電流が微小になることを観察し(図 2b)、核酸の動態変化を高感度に検出できることを実証している。

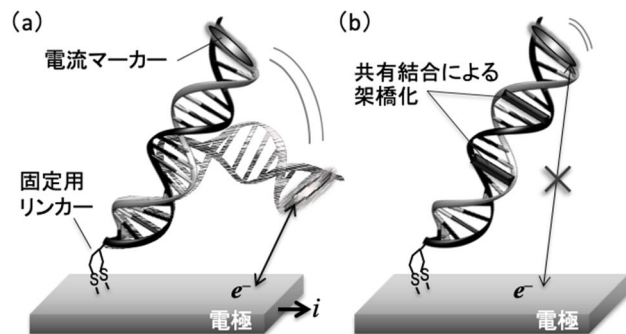


図 2 電極上に配向固定したオリゴ核酸の電気化学 : (a) 通常のオリゴ核酸ではその屈曲により、電流マーカーが電極に近づき易く、電極-マーカー間に電子移動が生じ明瞭な電流応答が得られる。(b) 架橋により剛直になった二本鎖核酸では屈曲が抑制されるため、電流応答が大きく減少する。

2. 研究の目的

本研究では、前記ジスルフィドリンカー等を導入した AMO を用いて、電極界面上で Ago・miRNA 複合体と相互作用させることで高感度かつ迅速に両者の結合をアッセイ可能な系を開発し、AMO 核酸医薬の進展に役立たせることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Ago・miRNA 複合体の調製と AMO 固定化電極の作製

Ago・miRNA 複合体は、既存の方法に従ってヒト細胞発現系を用いて Ago を調製・精製し、miRNA を混合して作製した。AMO は前記二本鎖構造を導入したものを複数調製した。ターゲットは主に miR-21 とした。二本鎖部位の導入位置等の構造の相違や AMO 活性と Ago・miRNA 複合体との相互作用の相関を調査した。

AMO の電極上への固定化は、前記ジスルフィドリンカーやビオチンを当該構造に導入しこれらを利用して行った。主に金電極を用い、金-硫黄結合や電極上にコーティングしたアビジンと結合させることで AMO 固定化電極を得た。固定化量は、水晶振動子マイクロバランス法 (QCM 法) や、固定化分子の電気化学脱離反応を用いて見積もった。

(2) 電気化学法による Ago・miRNA と AMO との相互作用評価

前記(1)で作製した複数の AMO 固定化電極を用いて、Ago・miRNA 複合体との相互作用を調べた。電気化学計測には主にサイクリックボルタンメトリー法を用い、電位-電流曲線の波形から評価した。

(3) AMO のがん細胞増殖抑制活性の評価

前記(1)で作製した複数の AMO を、神経膠芽腫(グリオブラストーマ)細胞へ任意の濃度でトランスフェクションし、がん細胞の増殖抑制活性を任意時間後の細胞数をカウントして評価した。また、miR-21 の標的蛋白質の mRNA レベルと発現量をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロットにより調べた。得られた結果を前記(2)のアッセイ結果と比較しメカニズム等を考察した。

4. 研究成果

(1) Ago・miRNA 複合体の調製と AMO 固定化電極

既報に従って様々な工夫を施しながら Ago の作製を試みたが、文献通りの大量調製には至らなかった。しかしながら、電気化学計測には十分な量を確保できたため下記(2)に示すアッセイの検討を進めた。また、ペプチドタグを導入し精製を行うことで、純度の高い Ago 蛋白質を調製できた。不純物が少ないことから電気化学計測時において当該界面の汚染等を抑制することができたと考えている。

AMO の電極上への固定化について、ジチオールリンカーおよびビオチンリンカーを用いて検討したところ、以下(2)の電気化学応答においてビオチンリンカーを用いた方がより大きな(高感度)な応答変化が観測されたため、本研究における電気化学アッセイでは主にこの手法を用いた。

(2) 電気化学法による Ago・miRNA 複合体と AMO との相互作用評価

これまでに明らかにしている高い miRNA 阻害活性を有する AMO を固定化した電極を用いて、Ago・miRNA 複合体との相互作用評価を検討した。複数の系を検討したところ、溶液中に電気化学マーカーを存在させた場合に良好な電気化学応答変化が認められることがわかった。当該 AMO 固定化電極に、10~100 fmol の Ago・miRNA 複合体を順次添加していくと、その濃度の上昇に応じて電気化学マーカーから得られる電流は大きくなった。当初は両者(AMO と Ago・miRNA 複合体)が相互作用・結合することで、電気化学マーカー分子の電極界面への物理的なアクセスが阻害され電流応答が減少すると予測しており、それと異なる結果となった。本測定では負電荷を有するマーカー分子を用いているため、結合前と結合後の核酸分子の負電荷との反発の相違が反映されたと推察している。Ago 蛋白質のみ(miRNA と結合していない非複合体)を添加した場合は、明瞭な電流応答の変化は観測されなかったことから、AMO と Ago・miRNA 複合体との相互作用を高感度に検出できることが示された。そこで、本方法を用いて miRNA 阻害活性の低い AMO を調べたところ、高い miRNA 阻害活性を示す AMO の場合と比較して、Ago・miRNA 複合体添加時の電流増加が有意に小さく、その相互作用が弱いことが示された。すなわち、miRNA 阻害活性と Ago・miRNA 複合体との結合の強さに相関があることが明らかとなった。

また、種々条件を検討する過程で電極の前処理条件がアッセイ感度に大きく影響することが示された。そこで、詳細に調査したところ電極界面の微細構造が異なっていることが確認された。本知見をベースにして新たな電極系を構築したところ、酵素などの電気化学計測・分析に有用であることも示すことができた。

(3) AMO のがん細胞増殖抑制活性の評価

前記2種の AMO を用いて、神経膠芽腫 (A172) 細胞の増殖を調べたところ、Ago・miRNA 複合体と強い相互作用を示した AMO は明瞭な増殖抑制活性を示し、10 nM の濃度でトランスフェクションした後 96 時間後の細胞数は AMO を添加していない系に比べておよそ半分となっていた。一方で、弱い相互作用を示した AMO は (検討条件下では) ほとんど抑制活性が認められなかった。Ago・miRNA 複合体との相互作用の相違よりも大きな差が見られたことから、増殖抑制活性には当該相互作用以外にも重要な因子があることが示唆された。また、前者 AMO の増殖抑制活性は市販の AMO よりも高く、当該分子構造がその活性に大きく影響することが明らかとなった。更に増殖抑制について検討したところ、アポトーシス誘導蛋白質である Programmed cell death 4 (PDCD4) などの発現が上昇していることが確認された。当該蛋白質の mRNA レベルは大きな変化がなかったことや、カスパーゼ 3/7 活性が数倍上昇したことなどからも、本 AMO はアポトーシス機構にてがん細胞を死に誘導していると推察された。更に、別の miRNA である miR-10b の相補的な配列にて作製した AMO を用いた場合でも、市販品よりも高い増殖抑制効果とアポトーシス誘導蛋白質の発現上昇が確認され、当該構造を有する AMO の有用性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasuhiro Mie, Yoshiaki Yasutake, Mashiki Ikegami, Tomohiro Tamura	4. 巻 288
2. 論文標題 Anodized gold surface enables mediator-free and low-overpotential electrochemical oxidation of NADH: A facile method for the development of an NAD ⁺ -dependent enzyme biosensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 512-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2019.03.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiro Mie, Yu Hirano, Keiko Kowata, Akiyoshi Nakamura, Mayu Yasunaga, Yoshihiro Nakajima, Yasuo Komatsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Function Control of Anti-microRNA Oligonucleotides Using Interstrand Cross-Linked Duplexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS	6. 最初と最後の頁 64-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mashiki Ikegami, Yu Hirano, Yasuhiro Mie, Yasuo Komatsu	4. 巻 166
2. 論文標題 Adsorptive stripping voltammetry for the determination of dissolved oxygen using a mesoporous Pt microelectrode	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of The Electrochemical Society	6. 最初と最後の頁 B542-B546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1149/2.0021908jes	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiro Mie, Kyoka Takahashi, Yuka Itoga, Kenta Sueyoshi, Hirofumi Tsujino, Taku Yamashita, Tadayuki Uno	4. 巻 110
2. 論文標題 Nanoporous gold based electrodes for electrochemical studies of human neuroglobin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrochemistry Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.elecom.2019.106621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro Mie, Yoshiaki Yasutake, Haruka Takayama, Tomohiro Tamura	4. 巻 384
2. 論文標題 Electrochemically boosted cytochrome P450 reaction that efficiently produces 25-hydroxyvitamin D3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Catalysis	6. 最初と最後の頁 30-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcat.2020.02.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhiro Mie, Kyoka Takahashi, Ryo Torii, Shen Jingkai, Takumi Tanaka, Kenta Sueyoshi, Hirofumi Tsujino, Taku Yamashita	4. 巻 -
2. 論文標題 Redox State Control of Human Cytoglobin by Direct Electrochemical Method to Investigate its Function in Molecular Basis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 平野悠、扇谷仁希、三重安弘、小綿恵子、小松康雄
2. 発表標題 クロスリンク 2 本鎖構造を有するanti-miRNAオリゴ核酸の細胞内動態
3. 学会等名 核酸医薬学会 第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三重安弘、小松康雄
2. 発表標題 Highly sensitive detections of protein-nucleic acid interactions and redox enzyme reactions using nanostructured electrode
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三重安弘、安武義晃
2. 発表標題 マーカー物質のその場計測
3. 学会等名 サステナブル技術連携促進シンポジウム「ヘルスケア」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三重安弘、池上真志樹
2. 発表標題 ナノ孔電極を用いるCYP反応の高効率な電気化学制御と物質変換への応用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上真志樹、平野悠、三重安弘
2. 発表標題 微細構造白金マイクロ電極を用いた溶存酸素の検出
3. 学会等名 応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三重 安弘, 平野 悠, 小綿 恵子, 小松 康雄
2. 発表標題 架橋化構造を有するanti-miRNAオリゴによる神経膠芽腫細胞の増殖抑制効果
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第3回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三重 安弘, 池上真志樹, 小松 康雄
2. 発表標題 Improvement in efficiency of electrochemically-driven cytochrome P450 reactions by nanoporous structured electrode
3. 学会等名 2017年度生命科学系合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三重安弘、小綿恵子、平野悠、中村彰良、安永茉由、中島芳浩、小松康雄
2. 発表標題 Structure-function relationship of anti-miRNA oligonucleotides modified with interstrand cross-links
3. 学会等名 RNA2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三重安弘、小綿恵子、平野悠、中村彰良、安永茉由、中島芳浩、小松康雄
2. 発表標題 クロスリンク 2 本鎖構造を有する anti-miRNA オリゴ核酸の構造と miRNA 阻害活性との相関
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第 2 回年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 平野悠、扇谷仁希、千高佐知子、三重安弘、小松康雄
2. 発表標題 クロスリンク 2 本鎖構造によるanti-miRNAオリゴの細胞内局在への影響
3. 学会等名 核酸医薬学会 第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三重安弘、安武義晃、池上真志樹、田村具博
2. 発表標題 Anodized gold surface enables mediator-free bioelectrocatalysis of redox enzymes
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三重安弘、安武義晃、高山晴香
2. 発表標題 Tuning Nanoporous Gold Catalyst and its Efficacy for Bioelectrocatalysis
3. 学会等名 International Symposium on Porous Materials 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三重安弘
2. 発表標題 Tuning Nanoporous Gold Catalyst toward Efficient Biosensing and Bioproduction Platforms
3. 学会等名 RCAS & AIST Bilateral Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三重安弘、池上真志樹、安武義晃
2. 発表標題 ナノ構造触媒を活用するバイオものづくりおよびバイオセンシング技術
3. 学会等名 第18回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三重安弘、高山晴香、安武義晃、田村具博
2. 発表標題 Electrochemically boosted cytochrome P450 reaction that efficiently produces Hydroxyvitamin D3
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bimo/research.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	小松 康雄 (Komatsu Yasuo) (30271670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長 (82626)	