

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17932

研究課題名(和文) siRNA可視化プローブによる細胞内イメージング解析

研究課題名(英文) Fluorescent imaging of siRNA by introduction of dye-pairs

## 研究代表者

神谷 由紀子 (Kamiya, Yukiko)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00527947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRNAiシステムで生じる様々な状態のsiRNAを検出するための各種siRNA型プローブを開発し、siRNAの細胞内運命の解明に向けた研究を展開したいと考えた。申請者はこれまでに、RNAiの中核因子として機能するRISCの鎖選択性を制御し、アンチセンス鎖を選択的に取り込ませることが可能なsiRNAの設計を見出していた。本研究ではこの設計を基盤として、イメージングプローブとなる蛍光基-消光剤ペアならびにFRET型色素対を導入したsiRNAを開発することに成功した。またこれらを細胞内に導入し、可視化解析に取り組んだ。その結果、RISCの細胞内局在化の機構の一端を明らかにすることができた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAi機構は遺伝子発現を制御する生体反応であり、RNAの新たな生物学的役割を示す興味深い知見をもたらす一方で、RNAiを応用した核酸医薬の開発が成功すれば実社会での応用が可能であることから魅力的な生体反応として注目されている。本研究で得られた知見は、核酸医薬となるべくsiRNAやAnti-miRNA oligonucleotideの設計において、細胞内動態の観点も取り入れた分子デザインの開発の基盤となるものである。また、様々なsiRNA型の核酸医薬が開発されているが、その細胞内動態を調査するための重要な技術となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：RNA interference (RNAi) is an endogenous gene silencing system in living cells. miRNAs are endogenously regulate gene expression through the RNAi. Also knocking down of specific gene can be controlled by introduction of the corresponding short double stranded RNA (siRNA). In this research we attempted to visualize the intracellular dynamics of siRNA or pre-miRNA for deeper understanding of RNAi system. Firstly we developed siRNAs possessing quencher-fluorophore pairs or FRET dye pairs. By using these systems, we demonstrated visualization of pre-miRNA, siRNA, and RISC localization in cells.

研究分野：生体関連化学

キーワード：RNAi siRNA pre-miRNA FRET 色素対 細胞内動態 RISC

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

RNAi 機構は遺伝子発現を制御する生体反応であり、生物学では RNA の新たな役割を示す興味深い知見をもたらす一方で、核酸医薬の開発が成功すれば実社会での応用が可能であることから魅力的な生体反応として注目されている。国内外の研究者によって、RNAi 機構の分子基盤の解明が進められており、RNA と関連タンパク質の相互作用ネットワークに関する知見は得られている。細胞内で siRNA は Dicer や Ago2 によってプロセシングされることで活性を示すこと、RNAi 関連タンパク質と RISC と呼ばれる複合体を形成することが明らかとなっている。RISC 上では、中核分子である Ago2 が siRNA の二重鎖解離を誘導する。これによって RISC は配列特異的に標的 mRNA を捕捉することが可能になり、遺伝子発現抑制能を發揮する。一方で、RISC が細胞内のどこでどのようにして形成され機能しているのかといった、細胞内挙動に関する知見は十分に得られていないのが現状であった。

細胞生物学的な研究により Ago2 の細胞内局在は調べられているが siRNA は細胞内でプロセシングを受けるため、Ago2 の局在 = siRNA の局在というわけではない。また、siRNA 分子の観点から解析した例として、配列の末端に蛍光色素が修飾された siRNA に関して解析されているが、色素由来の蛍光の分布が報告ごとに異なっており、siRNA の動態に関して統一的な見解が得られていなかった。これは、RISC 形成の際にアンチセンス鎖ではなくセンス鎖が結合した RISC も形成されてしまうこと(オフターゲット効果)、また siRNA のプロセシングによって遊離した色素由来のバックグラウンド蛍光が観測されてしまっているからと考えられる。こうした現状のもと、本研究では RNAi システムで生じる様々な状態の siRNA を検出するための各種 siRNA 型プローブを開発し、siRNA の細胞内運命の解明に向けた研究を展開したいと考えた。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、酵素分解、オフターゲット効果などの siRNA の課題を解決する高性能 siRNA の開発を行ってきた。その結果、RNAi の中核因子として機能する RISC の鎖選択性を制御し、アンチセンス鎖を選択的に取り込ませることが可能な siRNA の設計を見出した。この設計を基盤として、イメージングプローブとなる色素対導型 siRNA を開発することで、これまで詳細が不明であった siRNA の細胞内動態を解析し、RNAi 機構の可視化を実施する。本研究では解析において着目する点を、①siRNA の細胞内取り込みと RISC 形成、②RISC の擬ターゲットであるセンス鎖制御機構にしぼり、これらの機構の分子基盤を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

siRNA は二重鎖 RNA であるが RISC 形成とともに一本鎖に解離することから、この変化を利用して活性型 RISC を可視化することが可能な蛍光基-消光剤ペア導入型の siRNA(F-Q siRNA) を用いた。また、活性型となる前の二重鎖状態の siRNA や pre-miRNA の挙動を追跡するために、FRET ラベル型 siRNA および pre-miRNA の開発を行った。さらに、これらの RNA を用いて共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング解析を行った。

一方、RISC の中核タンパク質である AGO2 を細胞内で可視化するために、HaLotag 融合型として発現させ、siRNA と AGO2 の挙動を同時観察した。また、siRNA に作用する未知タンパク質の同定を行うため、クロスリンカー型 siRNA の開発も行った。

### 4. 研究成果

#### (1)F-Q siRNA を用いた RISC 局在化解析

RNAi 機構において siRNA は AGO2 タンパク質と複合体 RISC を形成する。その後 RISC 上でセンス鎖が取り除かれ RISC に残されたアンチセンス鎖が相補的な標的 mRNA と結合することで遺伝子発現が抑制される。我々は以前の研究において RISC を選択的に可視化することが可能な F-Q siRNA を開発している。これは蛍光色素、消光剤を siRNA 二重鎖内部に導入し、RISC 形成時の二重鎖解離による発光を観察することを狙ったものである(Fig. 1a)。この色素対導型 siRNA を用いた解析によって、RISC は細胞質の P-body に局在化することを見出している。そこで、RISC 局在化機構を解明するため、①siRNA と AGO2 および、②P-body 局在化タンパク質 GW182 と AGO2 の相互作用の 2 点に着目した細胞内イメージング解析を試みた。細胞内で可視化するために、AGO2 は Halotag 融合タンパク質 AGO2-Halotag として発現させ、Halotag と結合する TMR リガンドによって一過的に蛍光ラベルした。その後、色素対導型 siRNA をトランスフェクションし、培養しながら共焦点レーザー顕微鏡で経時的にアンチセンス鎖と AGO2 の蛍光を観察した。その結果、Fig. 1b に示すようにアンチセンス鎖と共局在している AGO2 が細胞質内で局在化している様子が観察された。このことから、AGO2-Halotag を用いることで局在化する RISC をモニタリングできることがわかった。この手法を用いることで、GW182 および siRNA との相互作用能を失った各種 AGO2 変異体と色素対導型 siRNA のイメージング解析を行うことに成功した。とくに、siRNA に対する結合能を持たない AGO2 変異体を用いてイメージング解析を行った結果、RISC が局在化する様子は観察されず、AGO2 は細胞質に分散したままであった。このことから、AGO2 は単独では局在化せず、siRNA との結合が局在化には必要であることが明らかとなった。

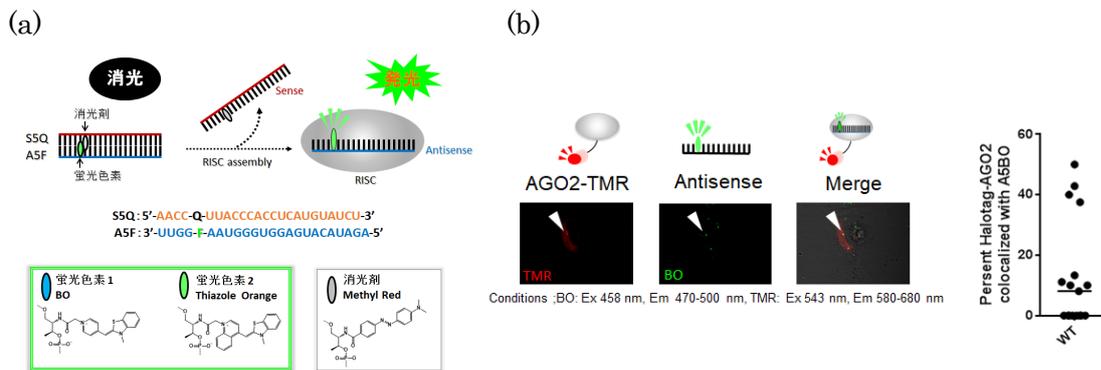


Fig. 1 (a)F-Q siRNA の設計、(b)F-Q siRNA と AGO2-HaloTag を用いた可視化解析

## (2)RNA 二重鎖内への FRET 色素導入の最適化と FRET 型 pre-miRNA を用いた miRNA の細胞内可視化解析

RISC を形成し、一本鎖となる前の二重鎖状態と siRNA の可視化、また、RISC から解離したもう一方の鎖を細胞内でモニタリングするために、それぞれの鎖に種類の異なる蛍光色素を 1 つずつ導入した FRET 型 siRNA の開発を試みた。

細胞内で効率よく、かつ正確に FRET を検出するためには、適切な蛍光色素ペア、色素間距離を検討し、高効率な FRET 系を構築する必要がある。そこで、細胞内で FRET を検出するために適切な蛍光色素ペア、色素間距離の検討を行った。色素として、BO、TO、TR、Cy3 を組み合わせ、色素間距離を変えた各種 siRNA を合成し、蛍光スペクトル解析を行った(Fig. 2)。その結果、BO-Cy3 のペアを用いた場合に最も効率よく FRET が起き、高いアクセプター発光が得られることが明らかとなった。

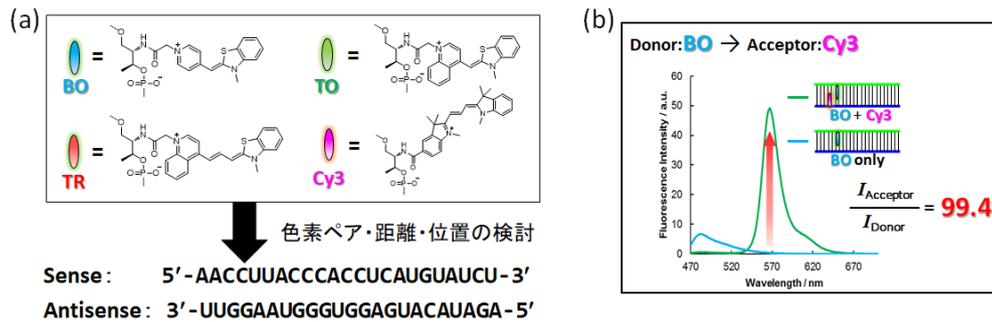


Fig. 2 二重鎖 RNA に導入する FRET ペアの最適化。(a)検討した色素のなかで (b)BO-Cy3 ペアを導入する設計が最も効率のよい FRET を観測できた。

上記の結果にもとづいて、pre-miRNA のステム領域の対応する部位に BO-Cy3 ペアの色素を導入した miStem を合成し、細胞内でイメージング解析を行った。miStem を導入した細胞では、Cy3 の発光と AGO2 の発光の共局在化が観測された。この細胞を FRET 条件で撮影した結果、AGO2 と Cy3 の共局在点において、FRET が観測される細胞が存在することが確認された(Fig.3)。この結果より、AGO2 とともに細胞質にて局在化する miRNA は、二重鎖状態で存在しているものがあると明らかになった。

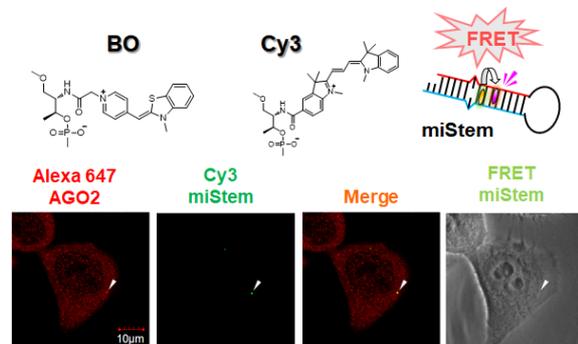


Fig. 3 miStem 導入細胞のイメージング解析

## (3)光クロスリンカー導入 RNA の開発

RNAi には RISC を形成する AGO2 タンパク質以外にも様々なタンパク質がかかわることが明らかとなっている。siRNA がたどる細胞内運命を明らかにするために siRNA に結合するタ

ンパク質を同定し、機能解析を行うことが有効である。そこで、siRNA に光クロスリンカーを導入し、結合因子の探索を行うための、システムの開発を試みた。本研究ではジアジリン誘導体を導入した siRNA を 293FT 細胞に導入し、光照射を行うことで RISC 状態を検出できるか検証した (Fig.4a)。その結果、siRNA とクロスリンク状態の AGO2 を検出することに成功した (Fig.4b)。このことから、ジアジリン誘導体を導入した siRNA が、結合タンパク質の同定において有効であることを示すことができた。

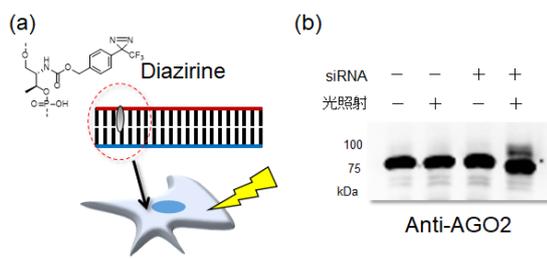


Fig. 4 ジアジリン導入 siRNA(a)を用いて RISC を検出する(b)ことで光クロスリンカーの導入が有効であることを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Hiroyuki Asanuma, Keiji Murayama, Yukiko Kamiya, Hiromu Kashida, "The DNA Duplex as an Aqueous One-Dimensional Soft Crystal Scaffold for Photochemistry", Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2018, 91, 1739-1748, 査読有
- ② Yukiko Kamiya, Yuka Donoshita, Hiroshi Kamimoto, Keiji Murayama, Jumpei Ariyoshi, Hiroyuki Asanuma, "Introduction of 2,6-Diaminopurines into Serinol Nucleic Acid Improves Anti-miRNA Performance", ChemBioChem, 2017, 18, 1917-1922, 査読有
- ③ Hiroyuki Asanuma, Keiji Murayama, Yukiko Kamiya, Hiromu Kashida, "Design of photo-functional oligonucleotide by "copolymerization" of natural nucleobases with base-surrogate prepared from acyclic scaffold.", Polymer J., 2017, 49, 279-289, 査読有
- ④ Hiroyuki Asanuma, Rie Niwa, Mariko Akahane, Keiji Murayama, Hiromu Kashida, Yukiko Kamiya, "Strand-invading linear probe combined with unmodified PNA", Bioorg. Med. Chem., 2016, 24, 4129-4137, 査読有
- ⑤ Yusuke Nakasone, Hideaki Ooi, Yukiko Kamiya, Hiroyuki Asanuma, Masahide Terazima, "Dynamics of Inter-DNA Chain Interaction of Photoresponsive DNA", J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 9001-9004, 査読有

〔学会発表〕 (計 23 件)

- ① 神谷由紀子  
人工核酸を活用した遺伝子発現を制御する機能性核酸の開発  
サントリー生有研シンポジウム 分子で解き明かす生命現象 ～生体分子を「見る」「捕まえる」  
「操作する」～ (招待講演)、2018 年
- ② 神谷由紀子, 竹山雄貴, 高井順矢, 村山恵司, 浅沼浩之  
非環状骨格型人工核酸を活用した RISC 形成を制御する siRNA の設計  
第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、2018 年
- ③ 神谷由紀子, 竹山雄貴, 浅沼浩之  
SNA 導入 siRNA の活性発現機構の解明を目指した相互作用解析  
第 28 回バイオ・高分子シンポジウム、2018 年
- ④ 神谷由紀子, 堂下裕香, 神元寛, 高井順矢, 有吉純平, 村山恵司, 浅沼浩之  
非環状型人工核酸を骨格とする anti-miRNA oligonucleotide の開発  
日本核酸医薬学会第 4 回年会 (依頼公演)、2018 年
- ⑤ 神谷由紀子  
RNA 干渉を理解し制御する人工核酸の開発  
第 67 回高分子学会年次大会 (招待講演)、2018 年

- ⑥神谷由紀子, 堂下裕香, 神元寛, 高井順矢, 村山恵司, 有吉純平, 浅沼浩之  
RNAi に作用する機能性核酸の高性能化に向けた非環状型人工核酸 SNA の活用  
日本化学会第 98 春季年会、2018 年
- ⑦佐武真有, 神元寛, 伊藤杏奈, 神谷由紀子, 浅沼浩之  
色素対導型 siRNA を用いた RISC 局在化機構の蛍光イメージング解析  
日本化学会第 98 春季年会、2018 年
- ⑧佐武真有, 神元寛, 伊藤杏奈, 神谷由紀子, 浅沼浩之  
色素対導型 siRNA による RISC 局在化機構の蛍光イメージング解析  
第 66 回高分子討論会、2017 年
- ⑨神谷由紀子, 神元寛, 浅沼浩之  
miRNA の成熟過程を解析する色素対導型 pre-miRNA の開発  
第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年
- ⑩佐武真有, 神元寛, 伊藤杏奈, 神谷由紀子, 浅沼浩之  
色素対導型 siRNA による RISC 局在化機構の可視化解析  
第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年
- ⑪神谷由紀子, 神元寛, 浅沼浩之  
色素対導型 pre-miRNA の開発と miRNA 成熟過程の解析  
第 27 回バイオ・高分子シンポジウム、2017 年
- ⑫佐武真有, 神元寛, 伊藤杏奈, 神谷由紀子, 浅沼浩之  
色素対導型 siRNA を用いた RISC 局在化機構の可視化解析  
第 27 回バイオ・高分子シンポジウム、2017 年
- ⑬Yukiko Kamiya, Yuka Donoshita, Hiroshi Kamimoto, Keiji Murayama, Jumpei Ariyoshi,  
Hiroyuki Asanuma  
Development of anti-miR oligonucleotide by using serinol nucleic acid and  
2,6-diaminopurines  
The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)、2017 年
- ⑭佐武真有、神元寛、伊藤杏奈、神谷由紀子、浅沼浩之  
色素対導型 siRNA による RISC 局在化機構のイメージング解析  
日本化学会第 97 回春季年会、2017 年
- ⑮神元寛、堂下裕香、村山恵司、神谷由紀子、浅沼浩之  
非環状骨格型人工核酸を利用した miRNA を標的とするアンチセンス核酸の開発  
日本化学会第 97 回春季年会、2017 年
- ⑯神谷由紀子  
人工核酸を用いた RNA 干渉機構の理解と制御法の開発  
第 160 回名古屋市立大学薬学談話会(招待講演)、2016 年
- ⑰神谷由紀子  
人工核酸による RNA 干渉機構の理解と制御  
分子研シンポジウム 2016 (招待講演)、2016 年
- ⑱神谷由紀子、堂下裕香、村山恵司、浅沼浩之  
非環状骨格型人工核酸を用いた miRNA を標的とするアンチセンス核酸の開発  
第 26 回バイオ・高分子シンポジウム、2016 年
- ⑲佐武真有、伊藤杏奈、神谷由紀子、浅沼浩之  
色素対導型 siRNA を用いた RISC 局在化機構の解析  
第 26 回バイオ・高分子シンポジウム、2016 年
- ⑳神元寛、神谷由紀子、浅沼浩之  
色素対導型 pre-miRNA を用いた miRNA の細胞内可視化解析  
第 10 回バイオ・関連化学シンポジウム、2016 年

②1 神谷由紀子、堂下裕香、村山恵司、浅沼浩之  
非環状骨格型人工核酸を用いた anti-miRNA oligonucleotide の開発  
第 10 回バイオ・関連化学シンポジウム、2016 年

②2 佐武真有、伊藤杏奈、神谷由紀子、浅沼浩之  
色素対導入型 siRNA による RISC 局在化解析  
第 10 回バイオ・関連化学シンポジウム、2016 年

②3 神元寛、神谷由紀子、浅沼浩之  
miRNA の細胞内可視化解析を目指した色素導入型 pre-miRNA の開発  
第 65 回高分子討論会、2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ：<http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal3/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 無

(2) 研究協力者 無

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。