

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0195

研究課題名(和文)細胞内侵入型ペプチド核酸ビーコンによるマイクロRNAのライブイメージング

研究課題名(英文)Live imaging of microRNA by intracellular-invasion peptide nucleic acid beacon

研究代表者

北松 瑞生(KITAMATSU, Mizuki)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：60379716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、細胞内に病気の指標となるマイクロRNAを検出するための方法を開発することを目的としている。特に細胞内での直接的なマイクロRNAの検出のために細胞内運搬ペプチドとペプチド核酸ビーコンを連結させた。また、ペプチド核酸の両端に蛍光共鳴エネルギー移動を生じる2種類の蛍光基を連結することによって蛍光発光の色に基づいて標的のマイクロRNAの検出できるようにした。申請者は、このペプチド核酸ビーコンを用いることによってin vitroでうまくRNAを検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、マイクロRNAを細胞内で直接的に検出することによって、病気の早期で安全な診断を可能にしたいと考えている。ペプチド核酸は、RNAを検出するのに最適なプローブである一方で、視覚的な確認は難しい。そのため申請者は、蛍光発色団を利用して視覚的にRNAを検出できるようにするよう分子を設計した。また、ペプチド核酸は直接細胞内に侵入できないので、細胞内運搬ペプチドと連結した。この研究が成功することにより、様々な病気の早期診断が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aim to develop methods to detect microRNAs that are indicators of disease in cells. In particular, cell-penetrating peptide and peptide nucleic acid (PNA) beacon were conjugated for direct detection of microRNA inside cells. We also used the PNA beacon to enable detection of the target microRNA based on the color of the fluorescence emission by modified with two fluorescent groups that generate fluorescence resonance energy transfer at N- and C- terminal on the PNA. We successfully detected the RNA by using the PNA beacon in vitro.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ペプチド核酸 細胞内運搬ペプチド RNA 蛍光 細胞

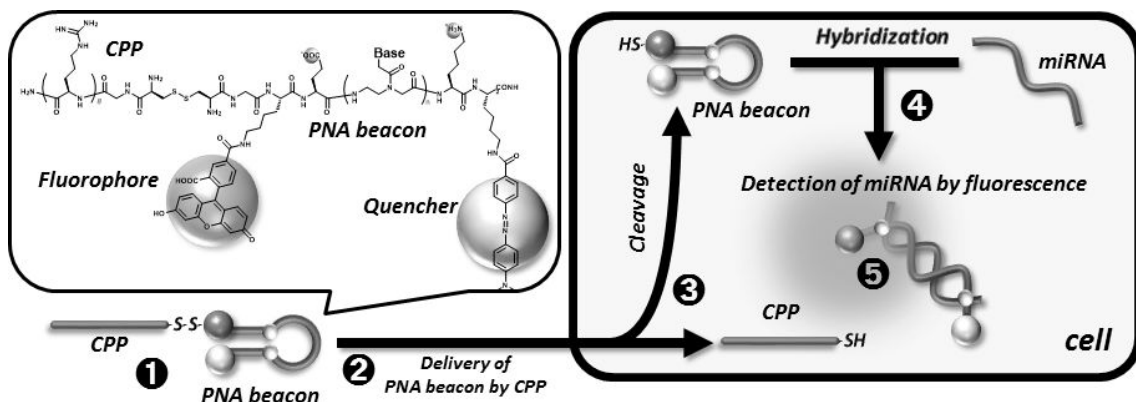
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、疾患特異的なマイクロ RNA (以下 miRNA) が数多く見いだされ、現在、それらをバイオマーカーとした病気の診断が注目されている。また今後、複数の miRNA の細胞内プロファイルを知ることで、より詳細な病態の進行の予測ができると考えられる。この流れに従い、標的 miRNA の検出法の開発は重要になる。しかし従来の miRNA の検出法は、細胞破碎後にトータル RNA を抽出し、標的 miRNA を逆転写してから PCR (ポリメラーゼ連鎖反応法) で増幅するといった、時間がかかり、熟練したプロトコルを必要とする。またこの検出法では細胞内で時々刻々と量が変化する miRNA を連続的に追跡・検出することは難しく、より迅速で精密な診断・予測の妨げになる。そこで本研究では miRNA の検出のために、蛍光検出可能なペプチド核酸ビーコン (PNA) と細胞内運搬ペプチド (CPP) との連結体 (以下 CPP-PNA ビーコン) を用いる。

この CPP-PNA ビーコンによる標的 miRNA の検出方法を概要図に示す。CPP-PNA ビーコンは、蛍光基であるフルオレセイン基 (以下 Fam 基) と消光基であるダブシル基 (以下 Dbc 基) を含んでいる。細胞外では同じく CPP-PNA ビーコンに含まれる Lys と Glu の静電相互作用により PNA ビーコンは折りたたまれ、それに伴い Fam 基は Dbc 基に近づき消光している (①)。CPP-PNA ビーコンは、細胞培養液中でインキュベートするだけで、そのまま細胞内へと運搬される (②)。CPP-PNA ビーコンは、細胞内の還元環境下でジスルフィド結合が切断され、PNA ビーコンと CPP とに分離する (③)。運搬された PNA ビーコンは、標的 miRNA が細胞内に存在するときのみ、塩基配列特異的にハイブリッド形成する (④)。このとき PNA ビーコンの Lys と Glu の静電相互作用は解消され、それに伴い Fam 基は Dbc 基から遠ざかり蛍光発光する (⑤)。

この方法により miRNA は細胞内で直接観測できるため 迅速な検出が行なえる。また、miRNA を 高感度に検出できる PNA と蛍光の双方が用いられており、蛍光強度により miRNA の 定量も可能になる。そして、生きた細胞内で検出できるので miRNA の 連続的な観測・追跡が同一細胞内で可能になる。さらに、多種類の蛍光基ならびに PNA 配列の組み合わせの同時使用により、 多種類の miRNA の同時検出が可能になる。これらのことから本法は効果的に miRNA から疾病発症および病態の進行の予測・診断を行なう手段となりうる。



概要図 本研究の概要。

2. 研究の目的

本研究は、「生きた (活動した) 状態の細胞内で蛍光発光により、マイクロ RNA を 迅速に、高感度に、定量的に、連続的に、多種類を同時に検出するため、細胞内侵入可能なペプチド核酸ビーコンを開発する」ことを目的とする。

3. 研究の方法

片末端にアクリドニル (Acd) 基およびもう一方の片末端にベンズアクリドニル (Bad) 基を含む PNA ビーコンをペプチド固相法により合成した。合成の確認は MALDI-Tof Mass および RP-HPLC により行なった。これらの化合物と相補的ないしは非相補的な RNA をリン酸緩衝溶液 (PBS) 中で混合した後に蛍光スペクトルを測定することで、PNA ビーコンの評価を行なった。

4. 研究成果

我々は、マイクロ RNA の一種である mir-221 を標的とした PNA ビーコンを合成した。そのアミノ酸配列は、H-Sp28-E(n)-Ala(Bad)-E(n)-PNA(CCCAGCAGAC)-K(n)-Ala(Acd)-K(n)-NH₂ である。ここで Sp28 は、エチレングリコール鎖が 28 回繰り返したアミノ酸ユニットであり、PNA ビーコンの水溶性を向上させる目的でペプチド内に連結させている。また、E と K はそれぞれグルタミン酸ユニットとリジンユニットであり、括弧内の n はそのユニットの数を示している。Bad 基と Acd 基はそれぞれアラニンユニットの 位に連結している。PNA の塩

基配列は N'-CCCAGCAGAC-C'であり、mir-221 の配列の一部と相補的になっている。このペプチドの N 末端はアミノ基、C 末端は第一アミドとなっている。これらのペプチドは、n=1、2 および 3 をそれぞれ合成した。PBS (pH=7.0) での蛍光スペクトルを PNA の塩基配列に相補的な RNA、非相補的な RNA を加えて測定した。蛍光スペクトル測定時の励起波長は、380 nm であり、通常ならば Acd 基の発光が観測できるが、本 PNA ビーコンは、E と K の静電相互作用により Acd 基と Bacd 基が近接する結果、Bacd 基の発光が観測される。もし、この PNA ビーコンに RNA がハイブリッドを形成すれば、Acd 基と Bacd 基が遠ざかり、本来の Acd 基の発光が観測される。蛍光スペクトルを測定した結果、n=2 のときに、相補的な RNA を PNA ビーコンに添加すると、添加する前には 540 nm 付近に Bacd 基に由来する蛍光発光が最も大きく観測されていたが、添加によって 540 nm の蛍光発光は小さくなり、その代わりに 450 nm 付近の Acd 基に由来する蛍光発光が大きく観測された (図 1)。相補的な RNA の添加による 540 nm の蛍光発光の減少と、450 nm の蛍光発光の増大は RNA の濃度に依存しており、また、RNA の濃度が PNA の濃度を上回るとその蛍光発光の変化は小さくなった。さらに、この n=2 の PNA ビーコンに非相補的な RNA を添加しても、蛍光スペクトルに変化は生じなかった。これらの結果より、n=2 においては、PNA ビーコンは、うまく RNA を塩基配列特異的に識別しており、蛍光発光の色相変化によってそれを観測できることが明らかとなった。

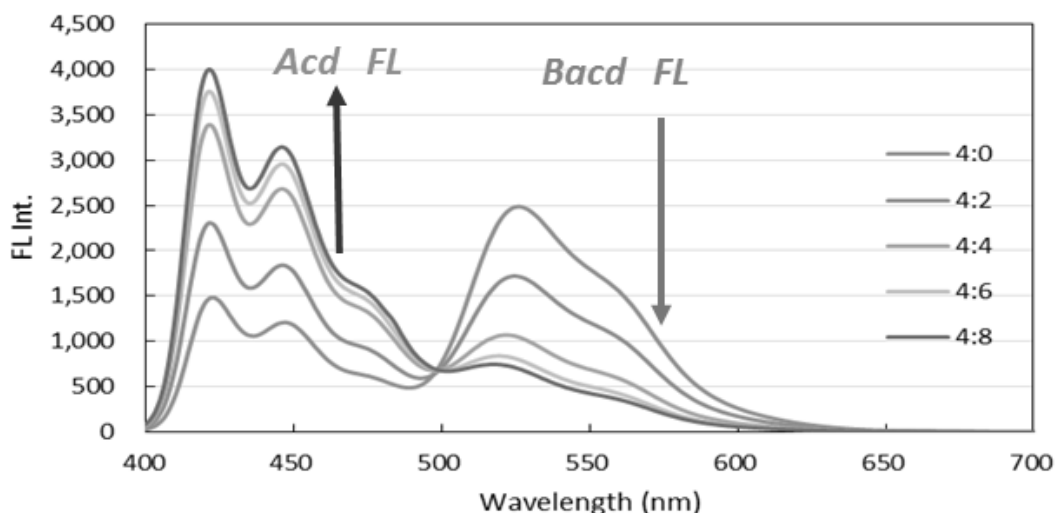


図 1 室温、PBS バッファー (pH=7.0) 中で PNA ビーコン (n=2) に相補的な RNA を添加したときの蛍光スペクトルの結果。励起波長は 380 nm である。

一方で、n=1 や n=3 では、相補的な RNA の添加により、540 nm と 450 nm の両方の蛍光発光が小さくなり、PNA ビーコンと相補的な RNA とのハイブリッド形成が指摘できるものの、結果として蛍光発光の色相変化が明確でないことがわかった。E と K の数により相補的な RNA の添加による蛍光発光の変化の挙動の違いが生じた理由ははっきりしないが、E と K との間の静電相互作用の強さが本研究の成功に重要な意味を持つことがわかった。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 7件)

岸高稚, 北松瑞生, 大槻高史

フルオレセイン基とダブルシル基を含むペプチド核酸をプローブとして用いた RNA の蛍光検出
日本化学会第 99 春季年会, 兵庫県神戸市・甲南大学 (岡本キャンパス), 2019/3/16-19

松原慶季, 北松瑞生, 大槻高史

アクリドニル基とベンゾアクリドニル基を含むペプチド核酸をプローブとして用いた RNA の蛍光検出

日本化学会第 99 春季年会, 兵庫県神戸市・甲南大学 (岡本キャンパス), 2019/3/16-19

松原慶季, 北松瑞生, 大槻高史

マイクロ RNA 検出のための FRET 型ペプチド核酸ビーコンの構造最適化

第 35 回関西地区ペプチドセミナー, 滋賀県大津市・龍谷大学 (瀬田キャンパス), 2018/12/22

岸高稚, 北松瑞生, 大槻高史

マイクロ RNA 検出のための蛍光基/消光基型ペプチド核酸ビーコンの構造最適化

第 35 回関西地区ペプチドセミナー, 滋賀県大津市・龍谷大学 (瀬田キャンパス), 2018/12/22

松原慶季, 北松瑞生, 大槻高史

ペプチド核酸ビーコン中の蛍光色素の位置による蛍光発光の影響

近大若手シンポジウム, 大阪府東大阪市・近畿大学 (東大阪キャンパス), 2018/11/28

松原慶季, 北松瑞生
ペプチド核酸ビーコン中のグルタミン酸およびリジンの数の影響
近畿大学大学院サイエンスネットワーク 2018・第8回院生サミット, 大阪府東大阪市・近畿大
学(東大阪キャンパス), 2018/9/16

松原慶季, 北松瑞生, 大槻高史
細胞内侵入型ペプチド核酸ビーコンの開発
第34回関西地区ペプチドセミナー, 兵庫県神戸市・甲南大学(ポートアイランドキャンパス),
2017/12/16

〔その他〕
ホームページ等
http://www.apch.kindai.ac.jp/kitamatsu_lab/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大槻 高史

ローマ字氏名: OHTSUKI, Takashi

所属研究機関名: 岡山大学

部局名: 大学院ヘルスシステム統合科学研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 80321735

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。