

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04881

研究課題名(和文)小分子RNA二重鎖イメージングを可能にする超高親和性近赤外蛍光プローブの開発

研究課題名(英文) Design of near-infrared fluorescent probes with strong affinity for the fluorescence imaging of small RNA duplexes

研究代表者

佐藤 雄介 (Sato, Yusuke)

東北大学・理学研究科・助教

研究者番号：90583039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現制御機能を有する小分子RNA二重鎖を標的とする新規な近赤外蛍光性RNA結合プローブの開発を試みた。その結果、代表的な小分子RNA二重鎖であるsmall interfering RNA (siRNA)に対してオーバーハング構造と二重鎖領域を同時に認識するペプチド核酸をベースとした分子プローブを設計・合成し、実用的なsiRNA医薬応用に適用しうる低濃度siRNAの細胞内デリバリー過程のイメージングに資する蛍光プローブの開発に成功した。またsiRNA二重鎖の塩基配列と二重鎖構造を識別しうる新規な蛍光プローブの設計指針を提案し、これを用いた細胞内siRNA動態の精密解析法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では小分子RNA二重鎖に対して強くかつ選択的に結合し、近赤外領域で明瞭な蛍光応答を示す新規なプローブ群を開発した。これらは細胞内における小分子RNA二重鎖の動態の検出や可視化(イメージング)における有用な分子プローブとして機能することを実証した。ここで得られた成果は革新的な医薬応用が期待される小分子RNA二重鎖の動態解析における有用な分析技術に供するものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a series of fluorescent probes targeting small RNA duplexes such as small interfering RNAs (siRNAs) for the imaging analysis of their intracellular behaviors. We demonstrated that peptide nucleic acid (PNA)-based fluorescent probes with strong affinity toward the overhanging structure of siRNAs were applicable to the fluorescence imaging analysis of the intracellular delivery process of 20 nM siRNAs that could be considered to show minimal off-target effects. We also proposed new probe design strategy for the simultaneous recognition of overhanging and double-stranded region of target siRNAs in a sequence-selective manner. This probe allows the selective detection of intact siRNA duplexes with a view toward the accurate analysis of intracellular behaviors of siRNAs.

研究分野：生命分析化学

キーワード：小分子RNA 蛍光プローブ イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

20-30 塩基長の小分子 RNA による遺伝子発現抑制が関与する新規な生命現象の発見が相次ぎ、小分子 RNA はポストゲノム時代の重要な研究対象となっている。なかでも RNA 干渉機構によりメッセンジャー RNA 分解を引き起こす small interfering RNA (siRNA) は代表的な小分子 RNA であり、3'末端に 2 塩基突出したオーバーハング構造を持つ二重鎖構造を有する。siRNA はガンなどの難治性疾患に対する画期的な治療薬として期待されている。こうした遺伝子治療の実用化を進めていく上で siRNA を始めとする小分子 RNA の機能を正確に理解することが重要である。

これまでは主に細胞溶解液から抽出した小分子 RNA の機能を逆転写 PCR 法等により検出・定量することで、小分子 RNA 発現量や発現パターンの解析が進められてきた。しかし、このような細胞は会に基づく侵襲的手法では、遺伝子発現抑制における小分子 RNA の動的挙動を解析することは不可能である。小分子 RNA 機能の本質的な理解を進めるためには、細胞内、さらには生体内の小分子 RNA 動態を可視化 (イメージング) し、時空間解析しうる技術の開発が必要不可欠である。

しかしながら、細胞内・生体内 RNA イメージングを可能にする技術のハードルは高く、特に siRNA を標的とする場合、専ら蛍光色素修飾 (ラベル化) に基づく手法に依存している。しかし、蛍光ラベル化により siRNA が生来有する遺伝子発現制御活性や細胞内動態を損なうリスクが高く、分析技術として致命的な問題点を抱えている。従って、siRNA へのラベル化を不要とする、非ラベル化イメージング法を開発することで、本来の siRNA 活性・機能を正確に反映した動態解析が可能となり、siRNA 関連研究における有用な解析手法になると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では小分子 RNA 二重鎖を非ラベル化でイメージングするための分子プローブとして、有機合成化学に立脚した新規 RNA 結合性プローブを創出する。具体的には生理条件下において小分子 RNA に対する優れた結合親和性と結合選択性を併せ持つ近赤外蛍光プローブを設計・合成する。これらプローブを活用する小分子 RNA 二重鎖動態を可能とする分析法を提案するとともに、本手法を *in vivo* 解析へと応用することで方法論としての基礎と有用性を実証することを目指す。

3. 研究の方法

本研究期間では主に siRNA 二重鎖を標的として、そのオーバーハング構造と二重鎖構造とを同時に認識するペプチド核酸 (Peptide nucleic acid: PNA) を基盤とした蛍光プローブの開発を進めた。研究開始時において申請者は PNA ジヌクレオチドによりオーバーハング構造を Watson-Crick 塩基対形成により認識することに着目し、PNA の C 末端に蛍光応答性インターカレーター Thiazole Orange (TO, $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$) を、N 末端にピレンを導入したコンジュゲート (PyAATO) が siRNA 選択的な蛍光プローブとして有用であることを見出していた (図 1, 解離定数 $K_d = 5.9 \mu\text{M}$, $I = 0.16 \text{ M}$, pH 7.0, 20°C)。本課題では siRNA 動態イメージングに資するプローブ機能発現を指向して、以下の二点に重点を置き設計したプローブを開発した。

- (1) 近赤外蛍光色素：蛍光イメージングでは細胞からの自家蛍光の影響を受けにくい長波長領域で蛍光応答を示すプローブが望ましい。本項目ではシアニン構造をベースとした構造改良により、siRNA 結合反応を近赤外蛍光として出力する蛍光色素の設計を試みた。
- (2) 結合機能の向上：siRNA を治療薬として用いる場合、非特異的な遺伝子発現抑制 (オフターゲット効果) が起こりにくい低濃度での利用が望ましい。したがって、低濃度 siRNA の細胞内動態解析を可能にする高親和性プローブの開発が重要な課題である。ここでは、カチオン性オリゴペプチドを連結することで静電相互作用によるプローブの結合力強化を試みた。また二重鎖認識部位として Hoogsteen 塩基対形成に基づく三重鎖形成を利用することで、標的 siRNA に対する結合親和性の強化、さらに結合選択性を強化した新規な結合様式を有する PNA プローブの開発を進めた。

4. 研究成果

蛍光応答部位として用いるシアニン色素は二つのヘテロ環構造の種類およびこれらを連結するメチンリンカー長により合理的にその蛍光波長を調節することができる。そこで PyAATO 設計を基本構造として、そのシアニン色素としてテトラメチンリンカーを持つヘミアニン骨格を

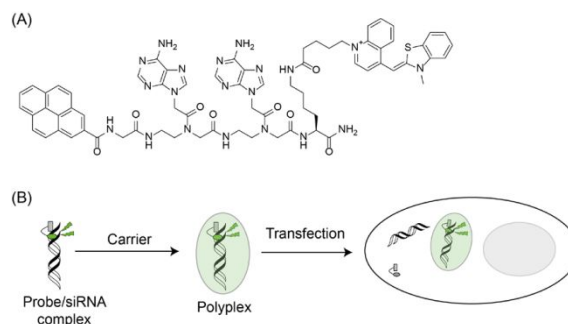


図 1. (A) PyAATOの構造式. (B) PyAATOを用いたキャリアによる細胞内 siRNA デリバリー過程イメージング法.

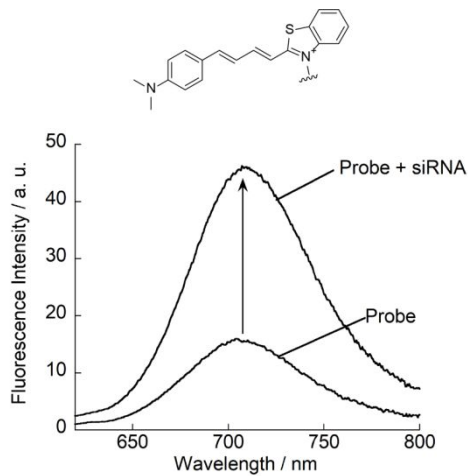


図 2. ヘミシアニン色素を用いた siRNA 結合性プローブの機能評価

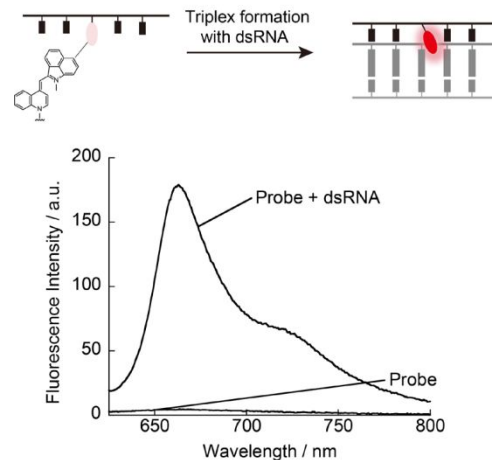


図 3. BIQ を疑似塩基として用いた PNA プローブの設計とその機能評価

持つ色素 (図 2) を導入した新規 siRNA オーバーハング結合性プローブを設計した。このプローブを用いて、GL2 遺伝子発現を抑制しうる siRNA 二重鎖に対する蛍光応答を評価したところ、siRNA 添加に伴い近赤外領域で発蛍光応答を示すことが分かった ($\lambda_{em} = 705 \text{ nm}$)。次に siRNA に対する affinity-labeling 剤として用いて、カチオン性ポリマーキャリアを介した細胞内 siRNA デリバリー過程のイメージングへと応用した結果、TO を持つ従来プローブと比較して高い S/N 比で siRNA を含む複合体の検出が可能であることを見出した。しかし、ここで用いたヘミシアニン色素は siRNA 結合に伴う発蛍光応答が数倍程度と小さいため、蛍光応答能の大幅な改良が必要であると考えた。そこで次にヘテロ環の π -共役系を拡大することに基づきモノメチンシアニン骨格を基盤とした新規な近赤外蛍光応答部位を設計することを試みた。その結果、benzo[c,d]indole 環と quinoline 環とから成る色素 (図 3, benzo[c,d]indole-quinoline cyanine: BIQ) が近赤外領域 ($\lambda_{em} = 657 \text{ nm}$) において RNA 結合に伴う明瞭な off-on 型応答を示すことを見出した (> 100 倍以上)。BIQ は後述する PNA 擬塩基として機能することも見出しており、siRNA 動態イメージングにおける有用な近赤外蛍光色素部位となるものと期待できる。

結合親和性の向上を目的として PNA-TO コンジュゲートに対してカチオン性アミノ酸残基を豊富に含むオリゴペプチドの連結を試みた (図 4A)。その結果、PyAATO の C 末端にオリゴリシンを導入した場合、オーバーハング構造に対する結合選択性を維持したまま標的 siRNA への結合力が効果的に向上することを見出した。結合力向上は導入するリシン残基数に大きく依存しており、6 個導入したプローブ (PyAATO-(Lys)₆) では PyAATO に比べて一桁以上も強い結合力を示すことが分かった ($K_d = 0.15 \mu\text{M}$)。カチオン性アミノ酸残基としてアルギニンを用いた場合でも結合力は増加するもののリシンに比べてその程度は小さかった。一方、アルギニンを用いた場合オーバーハング構造に対する結合選択性が向上するという興味深い結果を得た。詳細な検討は必要であるものの、これらの結果はカチオン性オリゴペプチド導入が結合力の強化に有効であることに加えて、結合選択性の向上にもつながる可能性を示している。PyAATO-(Lys)₆ を用いて細胞内 siRNA デリバリー解析イメージングに適用した結果、20 nM という低濃度 siRNA に対しても有用であることが分かった (図 4B)。

一方、PyAATO では細胞内で siRNA 結合に起因する蛍光シグナルが観測されなかった。この 20 nM という値はオフターゲット効果を回避しうる濃度の一つの目安であることから (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2003, 100, 6347.), PyAATO-(Lys)₆ は実用的な医薬応用を指向した siRNA 動態イメージングに有用な蛍光プローブとして機能することが期待できる。これまで設計したプローブではインターカレーション等によりオーバーハング構造近傍の二重鎖領域を認識するシアニン

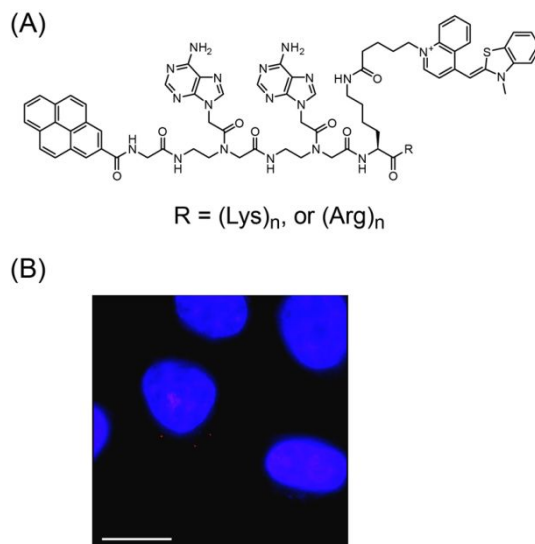


図 4. (A) PyAATO へのオリゴペプチド導入による結合親和性向上. (B) PyAATO-(Lys)₆ (赤色輝点) を用いた細胞内 siRNA (20 nM) イメージング. 核 (青色): Hoechst 33342 による染色.

色素部位を用いたものであるが、新たに三重鎖形成により二重鎖構造を配列選択的に認識しうる蛍光応答性 PNA 部位を導入することを試みた(図5)。これは TO などのシアニン色素を PNA 骨格に直接連結することで疑似塩基として活用するものであり、PNA 部位の三重鎖形成により TO 疑似塩基が構造内に入り込むことで off-on 型蛍光応答を示すことを利用したものである(*J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138, 9397.)。これにより標的 siRNA のオーバーハング構造に加えて二重鎖領域を配列選択的に認識しうるプローブ設計が可能になると期待できる。

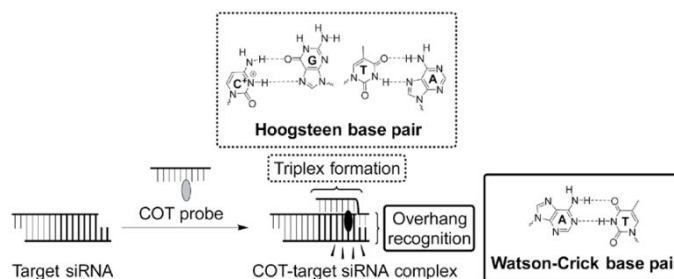


図5. 標的 siRNA におけるオーバーハング構造と二重鎖構造の配列選択的認識を指向した COT プローブ開発

ここでは二重鎖領域にプリン塩基を豊富に含み、赤色蛍光タンパク質の遺伝子発現を抑制しうる siRNA 二重鎖配列をモデルとして用いた。また TO 疑似塩基は対面する塩基対に依存せず優れた結合能および蛍光応答能を示すため、これを三重鎖形成性 PNA (triplex forming PNA:TFP)部位の結合領域中にあるウラシル塩基の対面に配置した。このように設計したプローブ (Combination of overhang recognition and triplex formation : COT probe)は標的 siRNA に対して強くかつ塩基配列選択的に結合しこれに伴い TO 疑似塩基は明瞭な発蛍光応答を示すことが分かった。また重要なことに、COT プローブは PyAATO と比べて一桁以上も大きな結合親和性を示した。これは二重鎖領域の結合部位として用いてきた TO 部位と比べて TFP 部位がより強い結合力を示すことに起因している。さらに COT プローブの N 末端にピレンを導入することで、標的 siRNA に対してその塩基配列に加えて二重鎖構造をも識別しうる機能が発現することを見出した。このプローブを用いることで遺伝子発現抑制機能を示す活性型 (siRNA 二重鎖) を選択的に検出しうるということが可能であり、細胞内 siRNA 動態を精密に解析しうる有用な分析技術に適用できることを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanabe Takaaki, Sato Takaya, Sato Yusuke, Nishizawa Seiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Design of a fluorogenic PNA probe capable of simultaneous recognition of 3'-overhang and double-stranded sequences of small interfering RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 42095 ~ 42099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8RA08759H	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 Sato Yusuke, Kaneko Mitsumasa, Sato Takaya, Nakata Saki, Takahashi Yuki, Nishizawa Seiichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Enhanced Binding Affinity of siRNA Overhang Binding Fluorescent Probes by Conjugation with Cationic Oligopeptides for Improved Analysis of the siRNA Delivery Process	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 408 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201800560	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 Sato Yusuke	4. 巻 93
2. 論文標題 Design of fluorescent peptide nucleic acid probes carrying cyanine dyes for targeting double-stranded RNAs for analytical applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 406 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190361	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 Yoshino Yukina, Sato Yusuke, Nishizawa Seiichi	4. 巻 91
2. 論文標題 Deep-red light-up signaling of benzo[c,d]indole-quinoline monomethine cyanine for imaging of nucleolar RNA in living cells and for sequence-selective RNA analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal. Chem.	6. 最初と最後の頁 14254 ~ 14260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b01997	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13件(うち招待講演 5件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 RNA高次構造を標的とした蛍光性プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Sato
2. 発表標題 Design of peptide nucleic acid-based fluorescent probes for analysis of siRNA delivery probes
3. 学会等名 14th Annual Meeting of the oligonucleotide therapeutics society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊貴昭, 高橋勇樹, 佐藤貴哉, 佐藤雄介, 西澤精一
2. 発表標題 RNA高次構造を標的とした蛍光性ペプチド核酸プローブの合成と機能評価
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 RNA・エクソソームの構造的特徴に着目した分子プローブの設計と応用
3. 学会等名 第36回九州分析化学若手の会夏季セミナー(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田邊貴昭, 高橋勇樹, 佐藤貴哉, 佐藤雄介, 西澤精一
2. 発表標題 RNA二重鎖構造を含む高次構造を標的とする蛍光性ペプチド核酸プローブの開発
3. 学会等名 平成30年度東日本分析化学若手交流会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋勇樹, 田邊貴昭, 佐藤貴哉, 佐藤雄介, 西澤精一
2. 発表標題 N末端にpyreneを導入した蛍光性ペプチド核酸プローブによるsiRNA高選択的検出
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 RNA構造を識別する蛍光性ペプチドプローブの開発
3. 学会等名 第77回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 RNA・エキソソームを認識する分析プローブの開発
3. 学会等名 平成29年度日本分析化学会東北支部若手交流会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田邊貴昭、佐藤貴哉、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 三重鎖形成反応とオーバーハング構造認識に基づくsiRNA選択性蛍光プローブの開発
3. 学会等名 平成29年度日本分析化学会東北支部若手交流会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yusuke Sato
2. 発表標題 Design of siRNA overhanging structure-selective fluorescent probes
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田邊貴昭、佐藤貴哉、佐藤雄介、西澤精一
2. 発表標題 三重鎖形成とオーバーハング構造認識を併用したsiRNA結合性プローブの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤雄介
2. 発表標題 RNA 構造を識別する分子プローブの設計と応用
3. 学会等名 第21回次世代医工学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yusuke Sato
2. 発表標題 Design of fluorescent peptide nucleic acid probes targeting double stranded-RNAs
3. 学会等名 ISNAC 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----