

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15713

研究課題名(和文) 生細胞のRNAイメージングを志向した膜透過プローブの開発

研究課題名(英文) Cellular RNA imaging with membrane-permeable probe

研究代表者

友池 史明(Tomoike, Fumiaki)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：70708586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞内での遺伝子発現を検出するため、膜透過性核酸プローブおよび核酸をヒストン様タンパク質で輸送する手法を検討した。膜透過性核酸プローブでは、核酸の糖骨格に硫黄を導入することで膜透過性を核酸プローブに付与した。この修飾によって核酸プローブによる標的核酸の検出能は損なわれないことがわかった。しかし、遺伝子発現検出にはより効率的に細胞内へ輸送する修飾を検討する必要があることが示唆された。タンパク質による輸送する手法についてはヒストン様タンパク質を改変することで、細胞内に核酸を輸送することを示唆する結果が得られた。また、輸送された核酸が機能する条件を検討する必要があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸プローブを生細胞に効率的に導入することができれば、生体組織での遺伝子発現変化の理解が促進される。本研究で検討した膜透過性プローブおよび改変したヒストン様タンパク質による核酸輸送では、生細胞における遺伝子発現の観察に至らなかったものの、本研究で得られたホスホロチオエート体の核酸プローブの性質および膜透過性が付与されたヒストン様タンパク質の知見は、将来的に生細胞での遺伝子発現イメージングの実現に貢献が期待できる。また、改変されたヒストン様タンパク質は、輸送する核酸が核酸プローブに限定されないため、今後最適化によってヒストン様タンパク質による核酸医薬への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：To detect gene expressions in living cells, we investigated the membrane-permeable nucleic acid probe and the transfection by the modified histone-like proteins. As the membrane-permeable nucleic acid probe, we utilized the phosphorothioate modification into DNA moiety of the probe. Though the probe with this modification can detect the target nucleic acids like the probe without the modification, its transfection efficiency was insufficient to detect the target RNA in living cells.

In the development of the transfection by the modified histone-like proteins, we modified the bacterial and archeal histone-like proteins. Fluorescence microscopy and flow-cytometry indicated that the modified histone-like proteins transferred short nucleic acids into the cells. As the next step, it is necessary to optimize the transfection condition and proteins for the function of transfected nucleic acids.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：核酸プローブ ヒストン様タンパク質 細胞内輸送 遺伝子検出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内の mRNA を定量的に観察する方法として、細胞内に核酸プローブを導入する方法がある。この核酸プローブは、検出に関わる官能基が末端についた核酸からなっており、核酸の配列によって検出する標的 mRNA が定められる。また、核酸鋳型鎖反応を利用することでより高感度な検出も可能になる。例えば、蛍光前駆体が末端についた核酸プローブと、還元剤が末端についた核酸プローブの二種が、標的核酸上に隣り合って結合する場合、標的核酸存在下でのみ蛍光が見られ、標的 mRNA に結合したプローブの鎖交換により、シグナルの増幅も見られる。さらに二種類のプローブが隣り合った位置に結合した時のみ、反応が進行するため、特異性も高い。このような核酸プローブを利用することで、細胞の集団の中での遺伝子発現量の違いや生細胞での遺伝子発現量変化を観察することができる。しかし、核酸の膜透過性は低く、細胞内に導入するのが困難である。そのため、現在核酸プローブを導入するには、図 1 に示したようにマイクロインジェクションや電圧ポレーション、ストレプトリジン O の処理、リポフェクションが必要になるが、マイクロインジェクションでは細胞に直接打ち込むため、少数の細胞にしかプローブを導入できず、電圧ポレーションやストレプトリジン O では、細胞への損傷も大きく、リポフェクションでは導入にかかる時間や細胞応答が問題となる。そのため、効率よく、かつ、細胞に損傷を与えない核酸プローブの導入法が求められる。

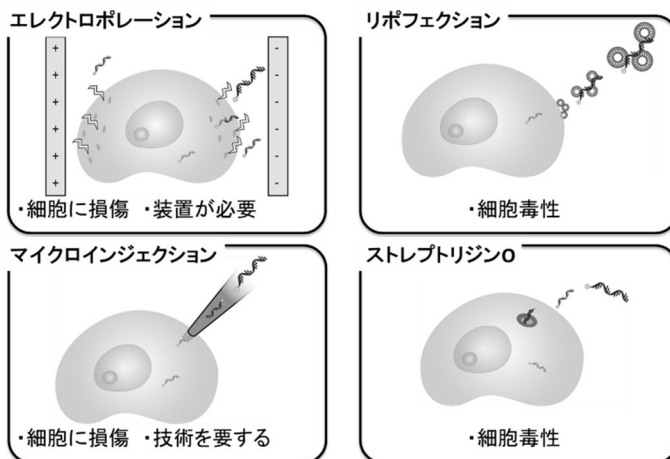


図 1 既存の核酸プローブの導入法

2. 研究の目的

本研究では、生細胞内での遺伝子発現検出を実現するため、核酸プローブを導入する手法の確立を目的としている。

具体的には、核酸プローブの核酸部分の化学修飾と、核酸結合タンパク質の利用による核酸の輸送を検証する。

3. 研究の方法

(1) PS 体の核酸プローブの検証

核酸プローブの核酸部分の化学修飾では、核酸プローブの化学合成の際に、チオ化試薬を用いることで、核酸のリン酸部分に硫黄原子が導入されたホスホロチオエート (PS) 体を合成した (図 2)。リボソーム RNA の相補配列を持つ PS 体のプローブを合成し、標的配列の DNA 存在下での蛍光を観察した。また、培養細胞である HeLa 細胞に PS 体プローブを添加し、細胞由来の蛍光を観察した。

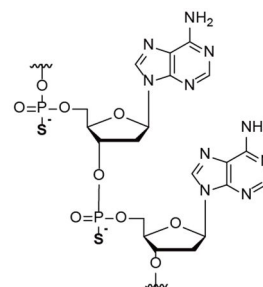


図 2 PS 体の構造

(2) ヒストン様タンパク質による核酸輸送の検証

核酸結合タンパク質を利用した核酸の輸送検証では、バクテリア由来のヒストン様タンパク質 HU とアーキア由来のヒストン様タンパク質 Alba の二種類に着目した。報告されているこれらのタンパク質の立体構造に基づいて、核酸結合部位から遠い位置にシステイン残基を導入したヒスタグ付き変異体の発現プラスミドを構築し、大腸菌内で発現させた。発現菌体を破碎後、Ni 樹脂および Heparin 樹脂を用いて精製した。精製した HU および Alba に対し、4、中性条件下でマレイミド基を末端に持つ膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide, CPP) を一晚反応させた。反応後、限外ろ過によって未反応の CPP を取り除いた。CPP 融合後も核酸結合能を有することを蛍光標識した核酸を利用したゲルシフトアッセイにより確認した。細胞への核酸輸送能については、核酸プローブの準備段階として、蛍光標識した核酸と精製タンパク質を混合し、培養細胞 HEK293 に添加し、蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで観察した。

(3) 核酸の修飾による免疫応答の変化の検証

導入した核酸プローブが引き起こしうる免疫応答についても、修飾によって軽減させられるかを検討した。こちらは核酸を化学合成する際に、アデノシンのアミダイトの代わりに N6-メチ

ルアデノシンのアミダイトを利用することで、アデノシンを N6-メチルアデノシン(図 3)に置換した核酸を合成した。この置換が機能に影響を及ぼしているか、また、免疫応答が変化するかを確認するため、ルシフェラーゼを標的とした siRNA を合成し、ルシフェラーゼを発現する培養細胞に添加し、ルシフェラーゼの発光量を観察するとともに、リアルタイム PCR によってインターフェロンの発現量を定量することで、免疫応答を測定した。

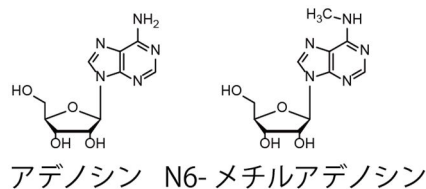


図 3 修飾の構造

4. 研究成果

(1) PS 体の核酸プローブの検証

天然の骨格を持つ核酸プローブと PS 体の核酸プローブの標的配列を有する DNA 存在下での反応を、蛍光光度計で経時的に観察したところ、蛍光の時間変化に差は見られなかった。このことから PS 体も、標的配列の検出という点においては、従来の核酸プローブを同様に扱えることが分かった。

次にリボソーマル RNA を標的とした PS 体のプローブを培養細胞の培地に加えたところ、一部の細胞で蛍光が観察された。しかし、蛍光が得られた効率は低かった。

(2) ヒストン様タンパク質による核酸輸送の検証

PS 体の核酸プローブでは細胞内への導入効率が低かったため、生細胞内に輸送する別の方法として、ヒストン様タンパク質に着目した。バクテリア由来のヒストン様タンパク質 HU およびアーキア由来のヒストン様タンパク質 Alba について、発現プラスミドを構築し、大腸菌内での発現および精製条件を最適化した。次にこれらの発現プラスミドに点変異導入 PCR をかけることで、核酸結合部位から遠い位置にシステイン残基を導入した。システインを導入したヒストン様タンパク質とマレイミドを末端に持つ CPP ペプチドを中性条件、4℃で一晩反応させ、SDS-PAGE で観察したところ、ヒストン様タンパク質に対して、8 倍量のペプチドを加えた場合、ほとんどのヒストン様タンパク質が CPP 融合体になることが観察された。また、3 kDa cut-off の限外ろ過膜を利用することで、未反応のペプチドを取り除けることが確認された。

これら CPP ペプチド融合のヒストン様タンパク質と蛍光標識した DNA を混合し、アクリルアミドゲルで電気泳動して DNA 結合能を評価した。この評価により、核酸結合能を損なわない CPP ペプチド融合位置が特定された。また、アーキア由来ヒストン様タンパク質 Alba では、二本鎖 DNA だけでなく、一本鎖 DNA、一本鎖 RNA、二本鎖 RNA との結合も確認された。

CPP 融合ヒストン様タンパク質と蛍光標識した核酸を混合し、培養細胞に添加した。この結果、バクテリア由来のヒストン様タンパク質 HU では、CPP と融合したものをを用いた時のみ、培養細胞で蛍光がみられた(図 4)。導入された核酸が細胞内で機能するかを評価するため、緑色蛍光タンパク質 GFP の発現プラスミドを輸送したが、GFP の発現が見られなかった。このことから、ヒストン様タンパク質 HU は細胞内でも輸送した核酸と結合し続け、機能することを阻害することが示唆された。よって、ヒストン様タンパク質 HU で核酸プローブを輸送するには、ヒストン様タンパク質 HU の核酸との親和性を最適化する必要があることが示唆された。

アーキア由来のヒストン様タンパク質 Alba では、CPP 融合体では細胞内への蛍光標識した核酸の輸送が見られなかった。しかし、CPP と融合していないシステインを導入したヒストン様タンパク質 Alba では、細胞に蛍光標識核酸由来の蛍光が観察された。この現象は、蛍光標識した核酸が、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA、一本鎖 RNA、二本鎖 RNA のいずれであっても観察され、フローサイトメーターによる定量解析の結果、同程度の蛍光が観察された(図 5)。ただし、還元剤

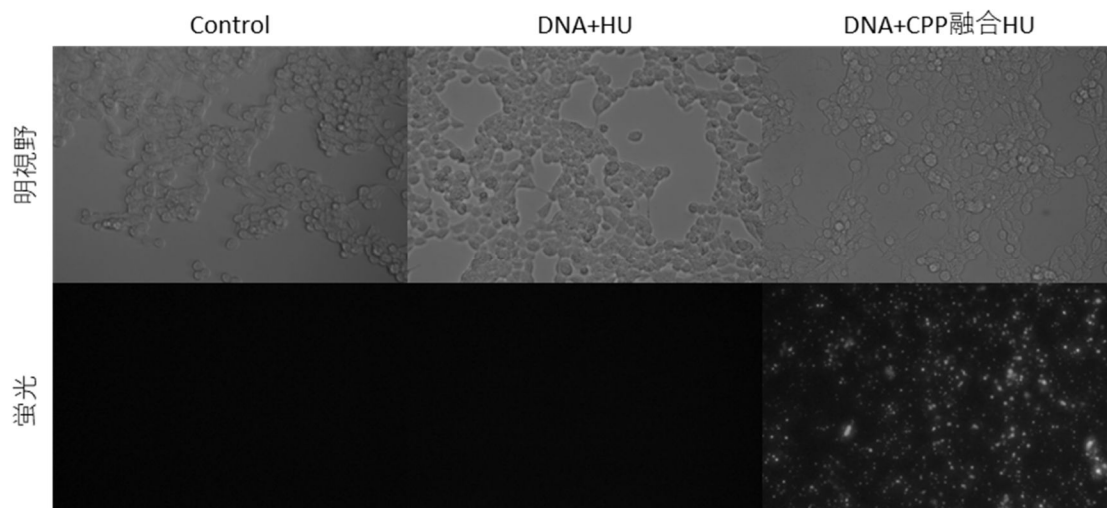


図 4 CPP 融合 HU による核酸輸送能検証

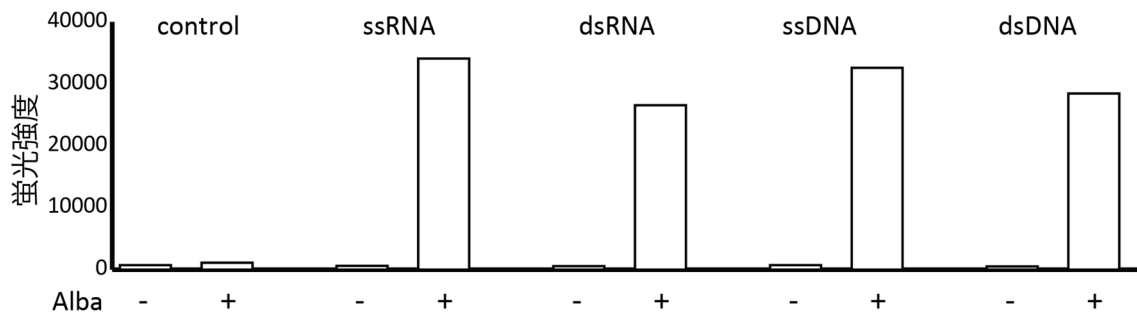


図 5 フローサイトメーターによる解析の結果

を加えた場合、細胞の蛍光が弱かったことから、ヒストン様タンパク質 Alba 同士がジスルフィド結合を形成して、凝集し、細胞に接着していることが示唆された。

(3) 核酸の修飾による免疫応答の変化の検証

アデノシンを N6-メチルアデノシンに置換した siRNA を合成し、ホタル由来およびウミシイタケ由来のルシフェラーゼの両方が発現する培養細胞にリポフェクションで導入したところ、天然の塩基から成る siRNA と同程度の遺伝子発現の抑制が観察された。また、RNA を抽出し、リアルタイム PCR でインターフェロンの発現量を定量化したところ、天然体に比べて、N6-メチルアデノシンに置換したものでは、発現量が下がっていた。このことは、核酸プローブにおいても、N6-メチルアデノシンを導入することで、核酸プローブ自体による細胞応答を回避した検出が可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaoka Kazuki, Oikawa Ryota, Abe Naoko, Nakamoto Kosuke, Tomoike Fumiaki, Hashiya Fumitaka, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Completely Chemically Synthesized Long DNA Can be Transcribed in Human Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3273 ~ 3276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100312	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 Nakamoto Kosuke, Abe Naoko, Tsuji Genichiro, Kimura Yasuaki, Tomoike Fumiaki, Shimizu Yoshihiro, Abe Hiroshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Chemically synthesized circular RNAs with phosphoramidate linkages enable rolling circle translation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6217 ~ 6220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC02140G	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 Kawaguchi Daisuke, Kodama Ayumi, Abe Naoko, Takebuchi Kei, Hashiya Fumitaka, Tomoike Fumiaki, Nakamoto Kosuke, Kimura Yasuaki, Shimizu Yoshihiro, Abe Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Phosphorothioate Modification of mRNA Accelerates the Rate of Translation Initiation to Provide More Efficient Protein Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 17403 ~ 17407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202007111	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 Imaeda Akihiro, Tomoike Fumiaki, Hayakawa Mayu, Nakamoto Kosuke, Kimura Yasuaki, Abe Naoko, Abe Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 N6-methyl adenosine in siRNA evades immune response without reducing RNAi activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 972 ~ 979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1641205	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 Tomoike Fumiaki, Abe Hiroshi	4. 巻 147
2. 論文標題 RNA imaging by chemical probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Drug Delivery Reviews	6. 最初と最後の頁 44 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.addr.2019.08.001	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 Kawaguchi Daisuke, Shimizu Saaya, Abe Naoko, Hashiya Fumitaka, Tomoike Fumiaki, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Translational control by secondary-structure formation in mRNA in a eukaryotic system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 195-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1671593	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 Fujita Haruka, Murakami Takaaki, Tomoike Fumiaki, Yabe Daisuke, Inagaki Nobuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Ceritinib associated hyperglycemia in the Japanese Adverse Drug Event Report Database	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	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) 10.1111/jdi.13168	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 Shu Zhaoma, Ota Azumi, Takayama Yukiya, Katsurada Yuri, Kusamori Kosuke, Abe Naoko, Nakamoto Kosuke, Tomoike Fumiaki, Tada Seiichi, Ito Yoshihiro, Nishikawa Makiya, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Intracellular Delivery of Antisense DNA and siRNA with Amino Groups Masked with Disulfide Units	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 129 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00811	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 Kimura Yasuaki, Shu Zhaoma, Ito Mika, Abe Naoko, Nakamoto Kosuke, Tomoike Fumiaki, Shuto Satoshi, Ito Yoshihiro, Abe Hiroshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Intracellular build-up RNAi with single-strand circular RNAs as siRNA precursors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 466 ~ 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CC04872C	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 Izumi Keisuke, Saho Eitaro, Kutomi Ayuka, Tomoike Fumiaki, Okada Tetsuji	4. 巻 8
2. 論文標題 Repertoire of morphable proteins in an organism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e8606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/719260	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 室山 晴菜、加藤 誠一、友池 史明、岡田 哲二
2. 発表標題 アクリルアミドゲルによるタンパク質結晶の保護
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 室山 晴菜、永江 峰幸、友池 史明、岡田 哲二
2. 発表標題 ハイドロゲルファイバにおけるタンパク質結晶の保護
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木満美子、友池史明、岡田哲二
2. 発表標題 膜透過性を持たせたヒストン様タンパク質による細胞への核酸導入
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久富彩友香、友池史明、岡田哲二
2. 発表標題 Distance Scoring Analysisによるヒストンタンパク質の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田惇、友池史明、竹内昌治、岡田哲二
2. 発表標題 タンパク質結晶化後のゲル保護
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質結晶のハイドロゲル包埋物の作製方法	発明者 友池史明、森田惇、 岡田哲二	権利者 学習院大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-217652	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------