

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350033

研究課題名(和文) ノンコーディングRNAを標的とする蛍光検出リガンドの創製と応用

研究課題名(英文) Development of fluorescent ligands for the analysis of non-coding RNA

研究代表者

西澤 精一 (Nishizawa, Seiichi)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40281969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ノンコーディングRNA研究に寄与しうる新しい分析手法として、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)のtrans-activation responsive region RNA及びC型肝炎ウイルスRNAのinternal ribosome entry site(IRES)と結合しうる蛍光性リガンドを見出し、これに基づく転写阻害物質のスクリーニング法を提案した。さらに、microRNA検出のためのlight-up型の蛍光性リガンドを開発するとともに、細胞内RNA可視化のためのパイオプローブとして、small interfering RNAを標的とする蛍光プローブを開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this work, new analytical methods using synthetic fluorescent ligands are successfully developed for the study of non-coding RNA, including trans-activation-responsive region (TAR) RNA of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), microRNA, and small interfering RNA (siRNA). First, we report on promising binding and signaling functions of thiazole orange (TO) to recognize TAR RNA. We found that TO does bind to selectivity TAR RNA with a nanomolar affinity, and TO was utilized as a fluorescent indicator for the high-throughput screening assay to identify new class of scaffolds of HIV inhibitors. As for the detection of microRNA in vitro, fluorescent ligands are designed and synthesized based on abasic site-binding ligands that are conjugated with cyanine dyes. Furthermore, fluorescent probes are successfully developed based on peptide nucleic acids for intracellular delivery analysis of siRNA.

研究分野：分析化学

キーワード：ノンコーディングRNA TAR RNA microRNA siRNA 蛍光性リガンド スクリーニング 検出 イメージング

1. 研究開始当初の背景

タンパク質に翻訳されずに機能する RNA は、ノンコーディング RNA (ncRNA) と呼ばれる。ここ 10 年程の間に、ncRNA が関与する新規な遺伝子発現調節機構の発見が相次ぎ、ncRNA は、ポストゲノム時代の生命科学研究における重要な研究対象となっている。なかでも RNA 干渉はその代表的な遺伝子発現調節機構で、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる 20 塩基長程度の RNA 二重鎖が細胞質内でタンパク質と複合体を形成することで、相補的な塩基配列を有するメッセンジャー RNA を分解、タンパク質への翻訳を阻害する。そのため、siRNA は癌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。しかし、今後、siRNA 機能のより本質的な理解と医学的応用を進めるためには、生きた細胞内の siRNA イメージング技術・挙動解析技術の開発が不可欠となる。

また、miRNA (microRNA) と呼ばれる 20~25 塩基長程度の 1 本鎖 RNA も、特に注目されている ncRNA ファミリーのひとつで、癌や感染症など様々な疾患に関わっていることが明らかにされつつある。現在、miRNA の解析・定量は、尿や唾液、全血、組織等を測定対象として、PCR 法を主体とする既存の DNA 解析技術を流用することで行われている。しかし、塩基長が極端に短いため、そのまま PCR 増幅に供することができないといった本質的な問題を抱えており、PCR 増幅を不要とする高感度かつ高選択的な miRNA 検出法の開発が重要な課題となっている。

一方、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の TAR RNA (Trans-activation responsive region RNA) に代表されるように、メッセンジャー RNA の非翻訳領域も遺伝子発現調節に重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。TAR RNA とは、HIV の初期転写産物 (メッセンジャー RNA) の 5' 末端に存在する全長 59 塩基のヘアピン構造部分を指したもので、転写活性化タンパク質 (Tat) が TAR RNA に結合することでその転写を促進する。このため、HIV 治療における創薬標的として注目されており、アミノグリコシド類やペプチド類を中心とした薬剤開発が進められている。しかし、その報告例は極めて限られており、より効果的な阻害剤の開発をより効率よく進めるためには、阻害剤開発を支援する迅速、簡便かつ安価なスクリーニング法の開発が重要となる。

2. 研究の目的

以上のような学術的背景に基づき、本研究では、ノンコーディング RNA 研究に寄与する新しい分析ツールの提供を目指して、「RNA 非翻訳領域を特異的に認識しうる新規な低分子蛍光性リガンドを設計・合成、これらの化合物に基づく RNA 解析法並びに薬剤スクリーニング法を開発する」ことを試みる。具体的には、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

の Trans-activation responsive region (TAR RNA) や microRNA、また、siRNA (small interfering RNA) などを研究対象とするもので、これらを標的とする高親和性・高選択的な蛍光検出リガンドを利用する RNA 解析法を提案、新規な分析方法論としての有用性を実証するとともに、その技術基盤を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) TAR RNA を主な標的として、種々の蛍光性複素環化合物の RNA 結合能を網羅的に評価した。結合能が認められる化合物に関して、その基礎特性 (結合定数など) を定量的に評価するとともに、必要に応じて、機能改良のための改変合成を行った。さらに、1600 化合物からなる化合物ライブラリーを対象として、阻害剤スクリーニングを実施した。

(2) microRNA を標的とする蛍光性リガンドを有機合成した。合成したリガンドは、我々の研究グループが独自に開発した DNA 脱塩基部位結合リガンドをベースとするもので、これに蛍光色素 (シアニン誘導体) を連結した。ここでは、連結に用いたスパーサー構造を種々検討することで、検出機能 (結合力、結合選択性、蛍光応答特性) を最適化した。

(3) 生きた細胞内の siRNA イメージングのためのバイオプローブとして、siRNA に選択的かつ可逆的に結合する低分子蛍光プローブを有機合成した。合成した蛍光プローブは、ペプチド核酸を基本骨格とするもので、これにシグナリング機能部位として蛍光色素を連結した。蛍光色素としては、シアニン誘導体を利用し、ペプチド核酸へ連結するスパーサー長や構造に関して網羅的に合成・検討することで機能の最適化を図った。新たに合成した蛍光プローブについて、細胞外での基礎特性 (結合定数など) を評価するとともに、生細胞内での siRNA 可視化機能の評価した。

4. 研究成果

(1) TAR RNA を標的とする蛍光性リガンドの開発と阻害剤スクリーニングへの応用 : Tat タンパク質と TAR RNA との結合において、アルギニン残基 (52 番目のアミノ酸) の Guanidyl 基が TAR RNA のバルジ部位と水素結合を形成することが知られており、これまでに、Tat タンパク質を模倣した環状ペプチド類やキノロン誘導体、アクリジン誘導体等が TAR RNA のバルジ部位近傍に結合することが報告されている。本研究では、種々の蛍光性複素環化合物の TAR RNA 結合能を評価した結果、核酸染色剤であるチアゾールオレンジ (TO) が HIV-1 TAR RNA に結合する蛍光性リガンドとして機能することを見出した。TO は DNA 及び RNA 二重鎖への結合により発光応答を示すが、一般に結合における配列および構造選択性は乏しいとされている。これに対して本研究では、TO が TAR RNA 野生型に対して優れた結合選択性及び結合親

和力を発現することを見出すとともに、TO を蛍光指示薬として用いることで、HIV 転写阻害物質探索のためのハイスループットスクリーニングへ適用した。

具体的に、TO と 31-mer モデル TAR RNA との相互作用を蛍光分光法により評価した ($I = 0.05 \text{ M}$, $\text{pH } 6.5$, 5°C)。その結果、TO が明瞭な light-up 型の蛍光応答 (蛍光極大波長 530 nm) を伴い、TAR RNA と結合することを見出した。その結合親和力 (解離定数 K_d) は 60 nM に達しており、既存の TAR 結合性小分子の中でも最強クラスの結合親和力である。また、結合選択性の評価では、TO は TAR RNA 野生型への明瞭な結合選択性を持つことから、TO が TAR RNA のバルジ部位近傍の塩基と相互作用していることが示唆された。

以上の結果を踏まえて、TO を蛍光スクリーニングにおける指示薬として利用したところ、Tat ペプチド及び TAR RNA 結合能を有するネオマイシン B の結合を TO の蛍光応答から明瞭かつ簡便に判定できることがわかった (図 1)。さらに、1600 化合物から成る化合物ライブラリーに対して、スクリーニングマシーンをを用いたハイスループットスクリーニングを行った。その結果、既存の TAR RNA 結合分子に例のない新規骨格を含むヒット化合物を得ることができた。現在、これらの化合物に対し、TAR RNA 結合能および Tat 阻害能について評価を進めている。

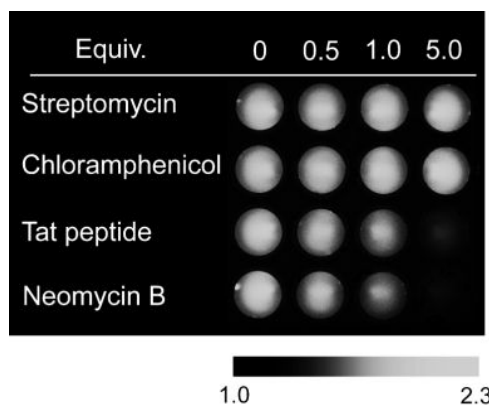


図 1 TO を蛍光指示薬として利用した TAR RNA 結合リガンドのスクリーニング

TAR RNA とリガンド (Tat ペプチド、ネオマイシン) が結合することに伴い、TO が解離するため、TO 由来の蛍光強度 (検出波長 530 nm) が小さくなる

以上のように本研究では、TO が TAR RNA 結合リガンド (阻害剤) のスクリーニングのための蛍光指示薬として有用であることを明らかにするとともに、ヒット化合物を得ることに成功した。なお、TO は HCV (C 型肝炎ウイルス) RNA の非翻訳領域に存在するヘアピン構造 (Internal ribosome entry site,

IRES: リボソームの 40 S サブユニットとの複合体形成によって HCV の翻訳が開始される) に対しても優れた結合力を示すことを見出しており、現在、TO を利用した IRES 結合リガンドのスクリーニングを進めている。加えて、リボソーム RNA の A サイト (このサイトにおいて、mRNA と tRNA が結合することでタンパク質合成が行われる) に結合する蛍光性リガンドの開発にも成功しており、スクリーニング指示薬としての応用が十分に期待できる。

(2) microRNA を標的とする蛍光性リガンドの開発: 我々の研究グループでは、最近、RNA 二重鎖中の脱塩基部位 (AP site) に対して著しい結合選択性とナノモルレベルの結合力を発現する蛍光性リガンドを見出し、これに基づく独自の microRNA 検出法を提案している (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 6369-6372; *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 9983-9985)。なかでもジアミノピラジン誘導体 (アミロライド) の結合特性は優れたもので (*Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 6369-6372)、一本鎖 RNA や完全相補 RNA 二重鎖とは結合せず、AP site 含有 RNA 二重鎖と特異的に結合し (AP site 対面のウラシルに高選択的に結合)、RNA 二重鎖との結合親和力 (解離定数 $K_d = 9.5 \text{ nM}$) は、DNA 二重鎖 ($K_d = 740 \text{ nM}$) と比較して二桁増大した。また、実在配列 (let-7 ファミリー) を対象とした場合、 1.2 nM (59 fmol in $50 \mu\text{L}$) の試料検出が可能である。しかし、網羅的な microRNA 検出には他の塩基に対して結合選択性を有するリガンドの開発が必要であり、さらには light-up 型の蛍光応答特性を付与することで、より実用に適した検出リガンドになりうると期待できる。

本研究では、AP site 結合リガンドと蛍光色素とを連結することで、新たに light-up 型の蛍光性リガンドを開発することに成功した (*Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 515-517)。具体的には、ピリミジン塩基選択性を有するナフチリジン誘導体とチアゾールオレンジ (TO) とをアルキル鎖を介して連結したもので (図 2: ATMND-TO)、RNA と結合することにより、明瞭な light-up 型 (緑色) の蛍光応答を示す (励起 506 nm , 検出 530 nm)。また、連

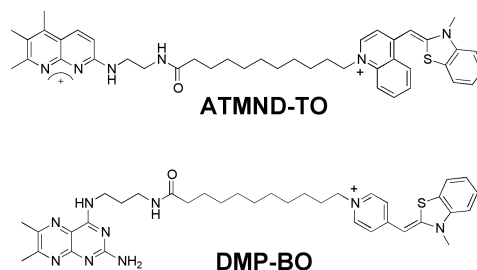


図 2 本研究で開発した miRNA を標的とする蛍光プローブ

結する AP site 結合リガンドと蛍光色素の組み合わせを適宜選択することで、マルチカラーアッセイに対応した蛍光プローブも開発できる。例えば、蛍光色素としてベンゾチアゾールオレンジ (BO) を利用し、これをグアニン選択性のプテリジン誘導体に連結することで、青色の light-up 型蛍光性リガンドを開発した (図 2: DMP-BO, 励起 449 nm, 検出 483 nm) (Chem. Commun., 2014, 50, 515-517)。なお、この他に、light-up 型のアデニン選択性リガンドとウラシル選択性リガンドを開発することに成功している。

以上のように本研究では、microRNA を標的とする蛍光性リガンドの開発を達成した。現時点における検出感度は、既存のノーザンプロット法とほぼ同程度であるものの、今後さらにリガンドの改良を進めることで、PCR 増幅を不要とする microRNA に特化した検出法になりうると期待できる。

(3) siRNA を標的とする蛍光プローブの開発と細胞内 siRNA イメージング: siRNA は 20 塩基長程度の二重鎖 RNA で、3'末端に 2 塩基オーバーハング構造を有することが、他の小分子 RNA には見られない構造上の特徴である。本研究では、この 2 塩基オーバーハング構造に着目することで、可逆的かつ高選択的な siRNA 結合能を有する蛍光プローブを設計・合成した (Chem. Commun., 2015, 51, 1421-1424)。

具体的には、オーバーハング 2 塩基の認識のためにペプチド核酸 (PNA) を用い、その PNA 骨格 C 末端側に蛍光色素チアゾールオレンジを連結したもので、さらに PNA 骨格の N 末端側にピレンを連結することで、siRNA に対する高選択的な light-up 型の蛍光プローブとして機能しうることを見出した (図 3: Py-AA-TO)。わずか 2 塩基のみから構成されるペプチド核酸型プローブが、標的 siRNA に対して高選択性を発現しうる事実は特筆に値する。これは、Py-AA-TO が相補的塩基対を介して siRNA と結合する際に、ピレン部位が 3'末端の塩基対とスタッキングするキャッピング効果が効果的に働くため、加えて、プローブ単体 (非結合時) では、ピレンと TO が分子内スタッキング構造をとるため、TO 部位と RNA との非特異的な相互作用が抑制されているためと考察している。

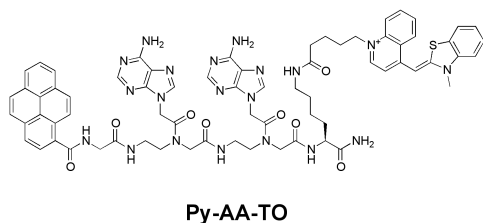


図 3 本研究で開発した siRNA 選択的蛍光プローブ

さらに、細胞内での siRNA 可視化機能を評価した結果、開発したプローブ (Py-AA-TO) を用いることで、細胞へ導入したキャリア-siRNA 複合体を選択的に可視化し、その細胞内取り込み過程や細胞内局在・輸送、及び siRNA の放出挙動といった一連の細胞内デリバリー過程を可視化することに成功した (Anal. Sci., 2015, 31, 315-320)。

以上のように本研究では、細胞内 RNA 可視化のためのバイオプローブとして、siRNA を標的とする蛍光プローブを開発することに成功した。本プローブを用いた解析では、本来の siRNA 活性を殆ど損なうことなく一連の細胞内デリバリー過程を可視化することができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, N. Teramae, S. Nishizawa, Fluorescence Imaging of siRNA Delivery by Peptide Nucleic Acid-based Probe, *Anal. Sci.*, 査読有, 51, 2015, 315-320

DOI: 10.2116/analsci.31.315

T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, S. Nishizawa, N. Teramae, Synthetic fluorescent probes capable of selective recognition of 3'-overhanging nucleotides for siRNA delivery imaging, *Chem. Commun.*, 査読有, 51, 2015, 1321-1424

DOI: 10.1039/C4CC08800J

Y. Sato, M. Kudo, Y. Toriyabe, S. Kuchitsu, C.-X. Wang, S. Nishizawa, N. Teramae, Abasic Site-Binding Ligands Conjugated with Cyanine Dyes for "Off-On" Fluorescence Sensing of Orphan Nucleobases in DNA Duplexes and DNA/RNA Hybrids, *Chem. Commun.*, 査読有, 50, 2014, 515-517

DOI: 10.1039/C3CC47717G

[学会発表] (計 50 件)

S. Nishizawa, Design and Synthesis of DNA- and RNA-binding Ligands for Gene Detection, 6th International Symposium on NanoBio Molecular Assembly, January 9, 2015, Department of Chemistry, Yonsei University (Seoul, Korea) (招待講演)

佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、蛍光性ペプチド核酸プローブを用いた siRNA アフィニティラベル化法の開発、第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014、2014 年 10 月 16 日、タワーホール船堀 (東京) (優秀ポスター発表賞)

佐藤雄介、核酸特定部位に結合する蛍光性分子の開発とその分析化学的应用、日本分析化学会第 63 回年会、2014 年 9 月

17日、広島大学東広島キャンパス（広島県東広島市）(招待講演)

西澤精二、RNA 結合リガンドの合成と分析化学的応用、第 13 回化学系若手研究者セミナー、2014 年 9 月 6 日、東北薬科大学（宮城県仙台市）(招待講演)

西澤精二、小さな有機分子による遺伝子分析、第 37 回教師のための化学教育講座、2014 年 8 月 11 日、東北大学理学部化学科（宮城県仙台市）(招待講演)

伊東良子、佐藤雄介、寺前紀夫、西澤精二、TAR RNA を標的とする蛍光性小分子の開発：蛍光スクリーニングへの応用、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 29 日、名古屋大学東山キャンパス（愛知県名古屋市）

西澤精二、核酸結合リガンドの合成と分析化学的応用、日本化学会東北支部秋田地区講演会、2014 年 2 月 21 日、秋田大学ベンチャービジネスラボラトリー（秋田県秋田市）(招待講演)

佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精二、細胞内 siRNA 解析を目指した蛍光性プローブの開発、第 7 回 6 専攻合同シンポジウム「ヤングブレインズの連携による学際的研究の興隆」、2014 年 2 月 20 日、東北大学北青葉山キャンパス（宮城県仙台市）（若手講演ポスター賞）

S. Nishizawa, Design and Synthesis of DNA- and RNA-binding Ligands for Analytical Applications, The 3rd Dalian University of Technology-Tohoku University Joint Symposium in Chemistry, December 19, 2013, Katahira Sakura-Hall, Tohoku University (宮城県仙台市) (招待講演)

S. Nishizawa, Design and Synthesis of DNA- and RNA-binding Ligands for Analytical Applications, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, September 28, 2013, Tohoku University (宮城県仙台市) (招待講演)

伊東良子、佐藤雄介、寺前紀夫、西澤精二、ウイルス RNA を標的とする蛍光性リガンドの開発とハイスループットスクリーニングへの応用、日本分析化学会第 62 回年会、2013 年 9 月 10 日、近畿大学東大阪キャンパス（大阪府東大阪市）（若手講演ポスター賞）

齋藤裕貴、佐藤雄介、寺前紀夫、西澤精二、ペプチド性側鎖の導入によるルマジン誘導体の RNA 結合力の向上、日本分析化学会第 62 回年会、2013 年 9 月 10 日、近畿大学東大阪キャンパス（大阪府東大阪市）（若手講演ポスター賞）

Y. Ito, Y. Sato, N. Teramae, S. Nishizawa, Thiazole Orange as a fluorescent ligand to target TAR RNA, RSC Tokyo International

Conference 2013, September 5, 2013, Makuhari Messe International Convention Complex (千葉県千葉市)

伊東良子、佐藤雄介、寺前紀夫、西澤精二、TAR RNA を標的とする蛍光性リガンドの開発：HIV 転写阻害物質の蛍光スクリーニングへの応用、平成 25 年度日本分析化学会東北支部若手交流会、2013 年 7 月 20 日、岩沼屋（宮城県仙台市）（優秀賞）

西澤精二、有機低分子化合物による核酸認識、第 30 回無機分析化学コロキウム、2013 年 6 月 1 日、東北大学川渡共同セミナーセンター（宮城県大崎市）(招待講演)

〔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〕
ホームページ等
<http://www.anal.chem.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 精一 (NISHIZAWA, Seiichi)
東北大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40281969

(2) 研究分担者

佐藤 雄介 (SATO, Yusuke)
東北大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：90583039