

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620102

研究課題名(和文)細胞内RNAイメージングのための小分子蛍光プローブの創製

研究課題名(英文)Development of fluorescent small probes for RNA imaging in cells

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):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(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。

本研究で開発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、siRNAに特有な3'末端の2塩基オーバーハング構造に高選択的に結合し、siRNAの細胞内への取り込み過程やキャリアからの放出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ができる。

本手法では、siRNAの蛍光色素修飾が不要なため、本来のsiRNA活性・機能をより反映した動態解析が可能であり、siRNA関連研究において有用な解析手法になると期待できる。

研究成果の概要(英文):In this work, synthetic fluorescent probes are successfully developed for intracellular delivery analysis of small interfering RNAs (siRNAs). The probes are based on peptide nucleic acids that are conjugated with thiazole orange (TO) and pyrene to their C- and N-termini, respectively. The probe is able to selectively bind to 3'-overhanging two nucleotides uniquely found in siRNAs, and the binding is accompanied by a significant light-up response due to intercalation of the TO moiety into the double-stranded regions near overhangs. In contrast to typical methods using fluorophore-labeled siRNA, the present probe does not compromise the siRNA silencing activity, and is applicable to the analysis of both cellular uptake and the intracellular disassembly of the polyplexes. The use of the probe thus allows a more detailed and quantitative analysis of the siRNA delivery process, which would be very useful for siRNA-related study.

研究分野：分析化学

キーワード：siRNA 蛍光プローブ イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

ここ10年程の間に、RNAが関与する新規な遺伝子発現調節機構の発見が相次ぎ、RNA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。

近年の細胞内イメージング技術の進展は著しく、なかでも緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein: GFP) を用いた蛍光プローブの開発は代表的なアプローチで、細胞内シグナル伝達因子やセカンドメッセンジャー、細胞内蛋白質相互作用などの可視化が報告されている。しかしながら、細胞内のRNAイメージングを可能とする技術のハードルは極めて高く、例えば、siRNAを標的とする場合、専ら蛍光色素修飾に基づく手法に依存している。従って、siRNAの蛍光色素修飾を不要とするイメージング法を開発することで、本来のsiRNA活性・機能をより反映した動態解析が可能となり、さらには細胞内で産生される内在性のsiRNA解析も可能となることから、siRNA関連研究において極めて有用な解析手法になると期待できる。

### 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、RNA結合性の低分子蛍光プローブを開発、これに基づく細胞内RNAイメージング法の開発を試みる。ここでは、特にsiRNAに標的を絞って研究を遂行し、siRNA選択的な結合機能とシグナリング機能を有する蛍光プローブの分子デザインを新たに提案するとともに、細胞内でのsiRNA可視化機能を評価することで、方法論としての基礎と有用性を実証することを試みた。

### 3. 研究の方法

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ペ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可視化機能を評価した。

### 4. 研究成果

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。

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 (TO) を連結したもので、siRNAに対するlight-up型の蛍光プローブとして機能しうることが分かった (図1: AA-TO)。しかし、ここではPNA骨格とTOとを連結するアルキル鎖長を制御することでプローブ機能の最適化を進めたが、その結合選択性は十分ではなかった。これは、TO部位がRNA二重鎖と非特異的に相互作用することに起因する。

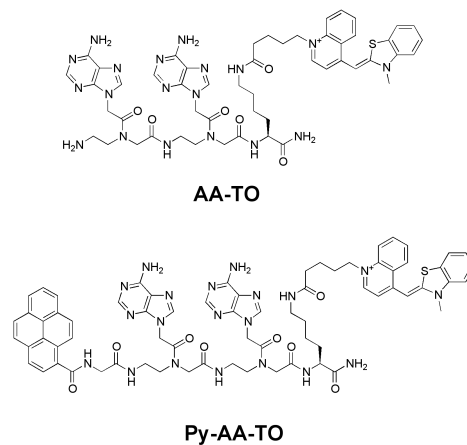


図1 本研究で開発したsiRNA選択的蛍光プローブ

以上の結果を踏まえて、プローブ機能の改良を検討した結果、PNA骨格のN末端側にピレンを連結することで、siRNAに対する結合選択性を飛躍的に改良できることを見出した (図1: Py-AA-TO)。これは、ピレンとTOが分子内スタッキング構造をとるため、TO部位の非特異的な相互作用が抑制されるため、加えてsiRNAと結合する際には、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協同的に働いた結果と考察している (Chem. Commun., 2015, 51, 1421-1424.)。

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と機構、細胞内局在・輸送、及びsiRNAの放出挙動を正確に評価できることを明ら

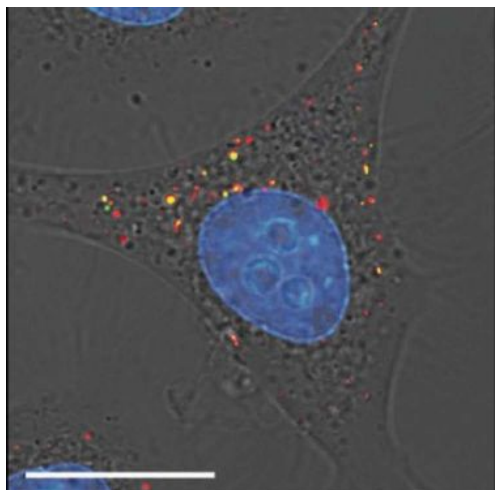


図2 本研究で開発した蛍光プローブ (Py-AA-TO) を用いた、HeLa 細胞内での siRNA 選択的蛍光イメージング

青色：核 (Hoechst 33342 で染色)、赤色：リソソーム、緑色：キャリア-siRNA 複合体 (Py-AA-TO が siRNA と結合して緑色蛍光を発する)、黄色：リソソームに取り込まれたキャリア-siRNA 複合体  
(*Anal. Sci.*, **2015**, *31*, 315-320 より、許可を得て転載)

かにした (*Anal. Sci.*, **2015**, *31*, 315-320.)。例えば、図 2 に示すように、HeLa 細胞内で青く染色された核の周辺に、黄色に可視化されたキャリア-siRNA 複合体が存在していることが観測できる (赤色の輝点はリソソームで、緑色のキャリア-siRNA 複合体がリソソームに取り込まれた結果、黄色の輝点として観測されている)。

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。今後、さらに結合力等の機能改良を進めることで、内在性の siRNA 解析に対応できるプローブの開発も期待できる。

#### 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3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

##### [学会発表](計28件)

S. Nishizawa, Design and Synthesis of DNA- and RNA-binding Ligands for Gene Detection, 6<sup>th</sup> 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利用した小分子RNA二重鎖の細胞内動態解析法の開発、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)

西澤精一、RNA 結合リガンドの合成と分析化学的应用、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)

西澤精一、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)

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細胞内 siRNA 解析、生体機能関連化学部会若手の会第26回サマースクール、2014年7月25日、ラフォーレ蔵王(宮城県蔵王町)

佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、siRNA 結合能をもつ蛍光性プローブの開発と細胞内 siRNA 解析への応用、第74回分析化学討論会、2014年5月24日、日本大学工学部(福島県郡山市)

佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、siRNA 選択的蛍光プローブの開発、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)

西澤精一、核酸結合リガンドの合成と分析化学的应用、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、西澤精一、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 3<sup>rd</sup> 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 70<sup>th</sup> 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)

佐藤雄介、佐藤貴哉、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精二、細胞内 siRNA 解析を指向した蛍光性プローブの開発、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)

T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, N. Teramae, S. Nishizawa, PNA-TO conjugates as fluorescent probes for siRNA analysis, RSC Tokyo International Conference 2013, September 5, 2013, Makuhari Messe International Convention Complex (千葉県千葉市)

佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精二、siRNA 解析を目指したピレン-PNA-TO 分子の設計とその機能評価、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)

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)

佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精二、siRNA 解析を指向した PNA-チアゾールオレンジコンジュゲートの開発、第73回分析化学討論会、2013年5月19日、北海道大学水産学部函館キャンパス(北海道函館市)

〔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