

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05745

研究課題名(和文) RNAiを標的とする核酸医薬の作用機序解明に向けたイメージング解析

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms of action of RNAi related nucleic acid drugs by imaging analyses

研究代表者

神谷 由紀子 (Kamiya, Yukiko)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00527947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： siRNAやアンチセンス核酸は、疾患に関連するRNAを阻害する核酸医薬として期待されている。本研究は申請者らが開発した非環状型人工核酸を活用したsiRNAや抗miRNA核酸の活性発現機構を細胞内可視化解析によって解明すること目的とした。これらの機能性核酸の活性体として予想されるRISCとの複合体を検出する手法として、目的とする複合体を形成した時にのみRCA増幅によるシグナルの増大やFRET検出が可能となるような設計開発を実施した。その結果、活性複合体の細胞内検出を初めて達成することができた。得られた成果により、機能性核酸の作用機序を提唱することができた。本成果は現在論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された手法や細胞生物学的知見は、核酸医薬の作用機序の解明に貢献すると期待される。また、得られた知見を活用することで、より効果的で安全なsiRNAや抗miRNA核酸の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)： siRNAs and antisense nucleic acids are expected to be nucleic acid drugs that inhibit disease-related RNAs. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of activity of siRNA and anti-miRNA nucleic acids designed by acyclic artificial nucleic acids. For this we attempted to develop the scheme to perform intracellular visualization analyses. To detect the expected complexes of these functional nucleic acids with RISC, we designed the methods that enable signal amplification by RCA system or FRET detection only when the complexes are formed. We succeeded in the observation of fluorescent signals from the expected complex in cells. Based on our results, we proposed the mechanism of action of the functional nucleic acids.

This approach is a valuable tool for further understanding of the mechanism of the nucleic acid drugs and contributing to the development of more effective, and safer therapeutic anti-miR drugs. The result is currently being submitted for publication.

研究分野：生体関連化学

キーワード：核酸医薬 nucleic acid drug anti-miRNA miRNA siRNA RNAi

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疾患タンパク質をコードする mRNA や疾患に関連する miRNA を標的とし、その機能を阻害する機能性核酸の開発に注目が集まっている。申請者のグループでは、RNA 干渉を利用した siRNA や、RNA 干渉を抑制するための anti-miRNA 核酸の開発を行ってきた [ChemBioChem, 15, 2549 (2014), Biomater. Sci., 3, 1534 (2015), ChemBioChem, 18, 1917 (2017)]。開発にあたっては、非環状型的人工核酸 SNA の化学構造に着目した分子デザインにより、酵素耐性能の向上に加え、活性の向上や核酸配列由来の副作用の抑制を達成することができた。これらの機能性核酸を発展させるためには、機能性核酸の作用機序の詳細な理解が必要である。しかしながら、特に anti-miRNA 核酸においては、標的 miRNA 阻害機構の詳細は明らかとなっていないのが当時の現状であった。また、siRNA が mRNA と結合した状態の複合体を細胞内で検出された例はなかった。これまでに、RNA 干渉の機構解明に向け、消光剤-蛍光基導入型の siRNA プローブを開発することに成功し [Chem. Sci., 4, 4016 (2013)]、RISC の成熟と細胞内における局在性の変化を捉えることが可能になった。その一方で、これら機能性核酸が作用すると期待される RISC との相互作用を直接的に解析した例はなかった。以上のことから、siRNA や anti-miRNA 核酸といった核酸医薬の作用機序を明らかにするためには、細胞内における活性複合体を検出する手法を開発し、複合体の検出と機能性核酸の細胞内運命を明らかにすることが重要であると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが独自の非環状型人工核酸を活用して開発を進めている siRNA や anti-miRNA 核酸の作用機序解明のため、RISC と機能性核酸との相互作用にともなう活性複合体の検出法を開発し、細胞内可視化解析を実施することを目的とした。

3. 研究の方法

siRNA の活性は、siRNA-mRNA-AGO2 複合体を通じて発揮される。こうした既存の知見から、anti-miRNA 核酸は anti-miRNA 核酸-miRNA-AGO2 複合体を形成すると予想した。本研究では機能性核酸が RISC に結合する活性複合体した状態を検出する手法の開発を行い、細胞内イメージング解析を実施した。

(1) 標的 RNA を検出するためのアンチセンス核酸の設計

miRNA に対しては anti-miRNA 核酸、mRNA に対しては siRNA の標的部近傍の配列に対して相補的なアンチセンス核酸を設計した。設計の際には、人工塩基 2,6-diaminopurin(D) 等を導入することで標的とする RNA に対する親和性を向上させた。

(2) 機能性核酸と RISC の複合体の検出法の開発

アンチセンス核酸を用いて、機能性核酸/RISC 複合体の細胞内観察のため、複合体を検出する手法が必要であった。具体的には siRNA と標的 mRNA が結合している複合体、anti-miRNA 核酸が標的である miRISC と結合している複合体の状態を観察するための仕組みの開発を試みた。手法としては、miRNA あるいは mRNA に対するアンチセンス核酸、また RISC タンパク質である Ago2 の抗体を介して、近接状態にのみ反応が起こりシグナルが増幅される系の設計、また、機能性核酸が標的 RNA と結合した際に FRET によって検出される系を設計した。

申請者らがこれまでに開発してきた色素対導入型 siRNA や蛍光修飾 anti-miRNA 核酸の手法を組み合わせ検出系が確立された後、目的とする複合体の細胞内局在を解析した。また RISC が局在するといわれている P-body 等のマーカータンパク質の局在と比較し、活性複合体の細胞内局在や細胞内運命の解明のためのイメージング解析を実施した。

4. 研究成果

1) Ago2 抗体とアンチセンス核酸を用いた PLA と RCA による siRNA/RISC/mRNA 複合体検出

siRNA の活性複合体 (siRISC と mRNA の複合体) の検出において、蛍光標識を用いて共局在を観察する一般的な方法では、蛍光顕微鏡の分解能の限界から、mRNA と RISC がただ近くに存在しているだけなのか、複合体を形成しているのか区別できないという問題点がある。したがって本研究では、複合体のみをイメージングするため、近接ライゲーション (PLA) と、rolling circle amplification (RCA) と呼ばれる反応を利用することで mRNA・RISC 複合体の可視化を目指した。

研究当初の設計では、RISC と mRNA の複合体を検出する為に、mRNA/Ago2/DNA タグ A の 3 つが複合体を形成させ、さらに、Ago2 に DNA タグ B を抗体を介して付加し、PLA と RCA を行うこととした。まず、RISC 構成タンパク質である Ago2 に対して PLA/RCA 反応が適応可能か調査するために、Ago2 と結合タンパク質 GW182 との間のアッセイを試みた結果、Fig.1 に示すように DNA タグの間での PLA と RCA が進み顕著なシグナルが観察された。

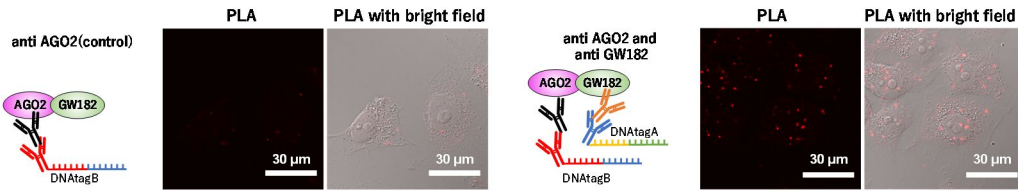


Fig.1 RISC 構成タンパク質 Ago2 と相互作用する P-body のマーカータンパク質との間に本アッセイが適応できることを確認した。

続いて、目的とする siRISC と mRNA の複合体の検出を目指した。mRNA に結合する DNA タグの配列長、DNA タグのリンカー長、mRNA との二重鎖形成部位の設定等を検討するなか、DNA タグを介した非特異相互作用が課題となった。解決のため、ハイブリダイズ条件やブロッキング条件を検討した。その結果、非特異的相互作用を抑えることができた。検討した条件に基づき、siRISC と mRNA の複合体検出を行ったところ、蛍光シグナルを観察された(Fig.2)。ただし、siRNA 非存在下においてもシグナルが観察されたことから、観察されたシグナルには、複合体形成に由来するシグナルに加えて、P-body のような分子が込み合った空間の中で近接して存在している状態の Ago2 と mRNA に由来するシグナルも含まれていると考えられた。

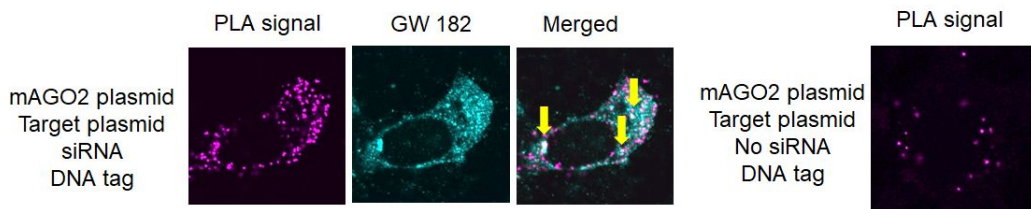


Fig.2 Ago2 抗体とアンチセンス核酸を用いた PLA/RCA アッセイによる siRISC/mRNA の細胞内イメージング解析

2) FRET を用いた anti-miRNA 核酸の活性複合体の細胞内イメージング解析

上述のアッセイによる siRNA の活性複合体検出の結果、目的とする複合体の特性に合わせて設計条件やプロトコル条件の精査が必要であるとわかった。そこで、anti-miRNA 核酸の活性複合体検出においては、FRET を用いた複合体の検出法を開発し、イメージング解析を実施することとした。

消光剤で標識した miRNA* と蛍光色素で標識した miRNA からなる miRNA/miRNA* を用い、RISC 形成に伴いクエンチャーを有する miRNA* が解離することにより蛍光発光する仕組みによって、ドナー色素でラベルされた成熟型 miRISC を調製した。その後、アクセプター色素で標識された anti-miRNA 核酸が先ほどの miRISC に結合する場合、ドナーを有する miRISC 上の miRNA が FRET アクセプターを有する anti-miRNA 核酸と二重鎖を形成することによって FRET シグナルが観察されると期待した(Fig. 3)。

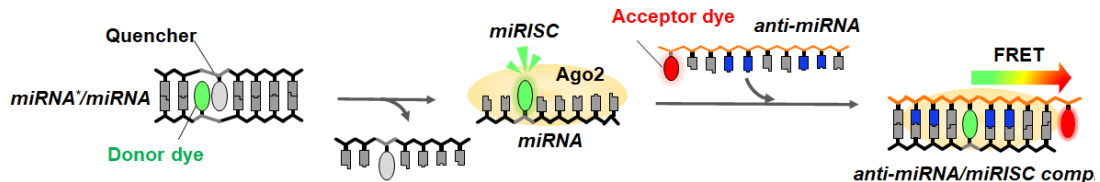


Fig.3 色素対の組み合わせによる、miRISC ならびに anti-miRNA/miRISC の選択的検出

本設計を実現するために、miRNA/miRNA* に修飾する消光剤メチルレッドとドナー色素となる BO の導入位置の検討および非環状型人工核酸 SNA の導入を行い、BO 標識された miRNA による選択的な miRISC 形成を達成した。また、アクセプター色素として Cy3 で標識した非環状型人工核酸 SNA からなる anti-miRNA 核酸の設計を最適化した。これらの miRNA/miRNA* および Cy3-anti-miRNA を用いて細胞内イメージング解析を行った結果、

BO-miRISC と Cy3-anti-miRNA のあいだに FRET が観察された(Fig.4)。このことから、SNA からの anti-miRNA 核酸は miRISC に作用し miRNA を阻害することを明らかとした。また、本複合体は P-body に存在することを明らかとした。さらに、FRET ratio の計測により、anti-miRNA 核酸と miRNA の複合体状態は動的に変化すると予想され、anti-miRNA 核酸が miRISC と複合体を形成した後、miRISC からの miRNA の放出と分解が起こる可能性が提唱された。

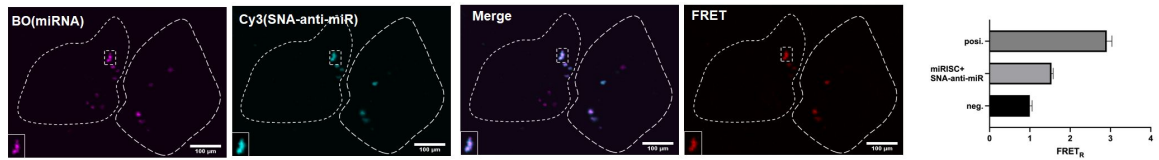


Fig. 4 BO-miRISC と Cy3-anti-miRNA の FRET によるイメージング解析により anti-miRNA 核酸の活性複合体を検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Fuminori, Kamiya Yukiko, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 88
2. 論文標題 Syntheses of Base-Labile Pseudo-Complementary SNA and L-aTNA Phosphoramidite Monomers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 796 ~ 804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c01911	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 Asanuma Hiroyuki, Kamiya Yukiko, Kashida Hiromu, Murayama Keiji	4. 巻 58
2. 論文標題 Xeno nucleic acids (XNAs) having non-ribose scaffolds with unique supramolecular properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 3993 ~ 4004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc05868a	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 Kamiya Yukiko, Kamimoto Hiroshi, Zhu Hongyu, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Development and Modification of Pre-miRNAs with a FRET Dye Pair for the Intracellular Visualization of Processing Intermediates That Are Generated in Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1785 ~ 1785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s21051785	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 Kamiya Yukiko, Satoh Tadashi, Kodama Atsuji, Suzuki Tatsuya, Murayama Keiji, Kashida Hiromu, Uchiyama Susumu, Kato Koichi, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Intrastrand backbone-nucleobase interactions stabilize unwound right-handed helical structures of heteroduplexes of L-aTNA/RNA and SNA/RNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-020-00400-2	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 Kaniya Yukiko, Takeyama Yuuki, Mizuno Tomonari, Satoh Fuminori, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Investigation of Strand-Selective Interaction of SNA-Modified siRNA with AGO2-MID	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5218 ~ 5218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155218	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28件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 朱 紅宇、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 FRET型プローブによるSNA型AMOと標的miRNAの相互作用の可視化
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤史経、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 塩基条件下で脱保護可能なPseudo-complementary SNA/L-aTNA amidite monomerの合成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朱 紅宇、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 SNA型抗アンチセンス核酸の細胞内作用機構解明に向けたFRET検出システムの開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤史経、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 塩基性条件下で脱保護可能なPseudo-complementary核酸塩基のSNA/L-aTNAホスホロアミダイトモノマーの合成
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷由紀子
2. 発表標題 非環状型人工核酸による天然核酸認識の設計
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤史経、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 Pseudo-complementary SNA/L-aTNAの合成と自己二重鎖形成の抑制
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朱 紅宇、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 細胞内イメージングによるSNA型抗miRNA核酸と標的miRNAの相互作用の可視化
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 Pseudocomplementary 塩基対の導入によるSNAからなる抗miRNA-21核酸の高活性化
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukiko Kamiya, Fuminori Sato, Tomonari Mizuno, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Development of siRNA and anti-miRNA oligonucleotide modified with SNA or L-aTNA
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fuminori Sato, Keiji Murayama, Yukiko Kamiya, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Development of acyclic nucleic acid incorporating pseudocomplementary bases to promote hybridization with RNA
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朱紅宇、神谷由紀子、浅沼浩之
2. 発表標題 Elucidation of the Mechanism of SNA-Anti-miRNA through Intracellular Imaging
3. 学会等名 2021年度東海高分子研究会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 SNAの自己相互作用抑制法の開発と抗miRNA核酸の高活性化
3. 学会等名 第52回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朱紅宇, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 SNA型抗miRNAアンチセンス核酸の作用機序解明に向けたイメージング解析
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 二次構造形成を抑制することによるSNA型抗miRNA核酸の高活性化
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第32回サマースクール
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷由紀子, 神 元寛, 朱 紅宇, 浅沼浩之
2. 発表標題 FRET型pre-miRNAの開発とmiRNA成熟過程の可視化解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 高次構造形成の抑制によるSNA型抗miR核酸の高活性化
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朱 紅宇, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 SNA型抗miRNAアンチセンス核酸の作用機序解明に向けたイメージング解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 SNA型抗miR核酸の高次構造形成抑制と高活性化
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会 サテライト若手シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神谷由紀子
2. 発表標題 非環状型人工核酸を用いた核酸医薬を指向する機能性核酸の設計" (WS11: 生体分子の人工設計で切り開く生命科学研究)
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 RNA認識能を向上させるPseudo-complementary SNAの開発
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷由紀子, 佐藤匡史, 兒玉篤治, 鈴木達哉, 内山 進, 加藤晃一, 浅沼浩之
2. 発表標題 RNAを認識する非環状型人工核酸の結晶構造解析
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷由紀子, 佐藤史経, 村山恵司, 浅沼浩之
2. 発表標題 Pseudo complementary塩基対を用いたSNA型アンチセンス核酸の高活性化
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 非環状型核酸と修飾塩基からなる抗miR核酸の開発
3. 学会等名 第69会高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤史経, 村山恵司, 神谷由紀子, 浅沼浩之
2. 発表標題 Pseudo complementary塩基対を用いたSNA型アンチセンス核酸の開発
3. 学会等名 2020年度東海高分子研究会学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Kamiya, Tadashi Satoh, Atsuji Kodama, Tatsuya Suzuki, Susumu Uchiyama, Koichi Kato, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Helix of life: New study shows how 'our' RNA stably binds to artificial nucleic acids
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Kamiya, Tadashi Satoh, Atsuji Kodama, Tatsuya Suzuki, Susumu Uchiyama, Koichi Kato, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Helix of life: New study shows how 'our' RNA stably binds to artificial nucleic acids
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Kamiya, Tadashi Satoh, Atsuji Kodama, Tatsuya Suzuki, Susumu Uchiyama, Koichi Kato, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Helix of life: New study shows how 'our' RNA stably binds to artificial nucleic acids
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Kamiya, Tadashi Satoh, Atsuji Kodama, Tatsuya Suzuki, Susumu Uchiyama, Koichi Kato, Hiroyuki Asanuma
2. 発表標題 Helix of life: New study shows how 'our' RNA stably binds to artificial nucleic acids
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 浅沼浩之, 神谷由紀子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 228
3. 書名 「光応答性DNAの搭載によるナノマシンとナノ構造体の光制御」進化を続ける核酸化学 日本化学会編	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 アミダイトモノマー	発明者 浅沼浩之、佐藤史 経、神谷由紀子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-007792	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 RNA作用抑制剤及びその利用	発明者 浅沼浩之、神谷由紀 子、村山恵司、石本 卓嗣、國料俊男、そ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT / JP2020/31513	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 一本鎖ポリヌクレオチド	発明者 浅沼浩之、神谷由紀 子、佐藤経文、村山 恵司、横山純也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/003332	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------