

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22704

研究課題名（和文）外来mRNAの細胞内ダイナミクスを捉えるイメージング技術の開発

研究課題名（英文）Visualization of the intracellular dynamics of artificial mRNAs

研究代表者

平岡 陽花（Hiraoka, Haruka）

名古屋大学・理学研究科・研究員

研究者番号：70880053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では蛍光核酸プローブの結合によるRNAイメージングに取り組んだ。大腸菌で確立した手法をヒト培養細胞に用いたところ、短い核酸プローブは細胞核へと移行しやすく、標的mRNAへの結合率が著しく低かった。同手法を断念し、現在は蛍光標識ヌクレオチドを利用したRNA自体の蛍光化に取り組んでいる。また、化学修飾による当該核酸プローブの細胞内導入にも取り組んだ。過去に報告した膜透過性核酸はジスルフィド修飾ユニットを5つ持ち、物性の悪さゆえの制限も多くあった。より少ないユニット数で効果的な細胞導入を実現する修飾構造の探索に取り組み、環状ジスルフィド修飾を持つ修飾核酸が有望な候補として得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAイメージングに用いる蛍光核酸プローブをダメージなく細胞に導入するために最適な化学修飾の探索を行った結果、環状ジスルフィド修飾を付加することで細胞毒性なく効果的に細胞導入できることが分かった。従来の膜透過性核酸よりも少ない修飾ユニット数で細胞膜透過を実現しており、疎水性も遥かに低い。その優れた物性から、蛍光前駆体など他の修飾基との併用や、1000塩基を超える長いmRNAの導入への適用など高い汎用性が期待される。また、本手法はエンドサイトーシスを介さず直接的に細胞質へと導入できる。この技術を用いて、蛍光mRNAの導入から翻訳に至る過程を経時的に観察することを目指す。

研究成果の概要（英文）：In this research theme, I tried to develop the RNA imaging method using fluorescence nucleic acid probe. The nucleic acid probe used for bacteria in previous research could not be used in human cells as such short oligonucleotide easily permeated into nuclei and rarely bound with target mRNA in cytosol. Therefore, instead of using the nucleic acid probe, I currently deal with the development of fluorescence mRNA composed with fluorescence nucleotides. I also achieved the intracellular delivery of the nucleic acid probe by chemical modification. Previously developed membrane-permeable oligonucleotide including 5 repeats of disulfide modification units has limited use due to their high hydrophobicity. This study reported circular disulfide group as promising modification; it enables the efficient intracellular delivery with smaller number of units.

研究分野：細胞生物学・分子生物学・核酸化学

キーワード：化学修飾核酸 RNAイメージング 翻訳 細胞デリバリー

### 1. 研究開始当初の背景

mRNA 医薬は、細胞外から投与された外来 mRNA が細胞内でタンパク質を産生することで機能する。遺伝子変異等による正常タンパク質の不足を補い疾患を治療する有用な次世代医薬品として注目されていた一方で、安定性や翻訳効率の低さなどに課題があり、実用化には至っていなかった (2020 年 5 月時点)。機能向上が困難であった原因として、外来 mRNA が細胞内に導入されタンパク質へと翻訳される過程が未解明であったことが挙げられる。外来 mRNA は内在性 mRNA とは異なる経路で分解されることが既に報告されており (Nogimori et al., *Nucleic Acids Res.* 47(1):432-449, 2019)、同様に、内在性 mRNA とは異なる独自の翻訳様式を持つことは十分に考えられた。外来 mRNA の動態を明らかにするためには、外来 mRNA および翻訳タンパク質を対象とした新しい観測手法が求められていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、外来 mRNA の細胞内導入から翻訳に至る過程を可視化する手法の開発を目指した。それによって mRNA 医薬が生体内で作用するプロセスが明らかになれば、メカニズムに基づいた理論的な機能向上が可能になると期待された。

### 3. 研究の方法

外来 mRNA の動態観察のために、RNA のライブイメージングを行うことを考えた。一般に RNA は存在量が少なくシグナルの検出限界を下回るためイメージングが困難であったが、それに対して当研究室では、核酸の鋳型反応と芳香族求核置換反応を利用した手法を開発し、RNA 由来の蛍光シグナルを約 1,500 倍増幅することに成功していた (図 1) (Shibata et al., *J. Am. Chem. Soc.* 135(38):14172-14178, 2013)。蛍光前駆体を持つ核酸鎖とチオフェノール基のついた核酸鎖の 2 本 1 組のプローブを細胞内に導入すると、それらが核酸鎖と相補的な RNA 配列に結合し近接することでプローブ間で芳香族求核置換反応が起こり、成熟した蛍光分子が作られ蛍光が生じる。その後、反応を終えたプローブが速やかに RNA から解離して未反応のプローブと置き換わることで、高速に反応が繰り返されてシグナルが増幅される。配列特異的にプローブが結合するため、標的 RNA のみを選択的に可視化できる利点がある。本手法を用いてヒト培養細胞における外来 mRNA の可視化を目指した。

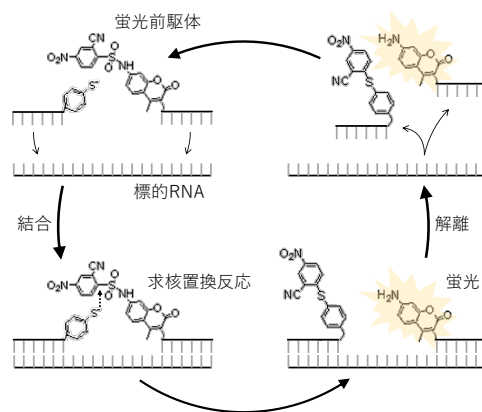


図 1. RNA イメージング手法の概要

しかし本手法は、原核生物である大腸菌の内在性 mRNA の可視化に用いた例しかこれまでになく、その際は大腸菌の外膜に部分的に穴を開けることでプローブを導入していた。そのため、ヒト培養細胞など真核生物の実験系に適用するに際して以下の 2 点について検討を要した。

- (1) 細胞にダメージを与えずに可視化プローブを細胞内に導入できるか
- (2) ヒト培養細胞において、同様の機構による RNA シグナル増幅が可能か

前者については、当研究室で開発した膜透過性核酸 MPON (membrane permeable oligonucleotide)の手法を適用することで解決を試みた。当研究室の先行研究として、20 塩基程度の短鎖核酸に対してジスルフィド修飾ユニットを付加することで、細胞膜上の膜タンパク質との結合を介してダメージなく迅速に細胞内に導入できることを示していた (図 2) (Shu et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 58(20):6611-6615, 2019)。

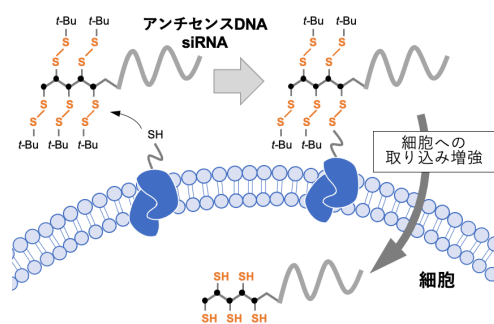


図 2. 膜透過性核酸 MPON の細胞内導入

一般的な導入経路であるエンドサイトーシスを介さずに僅か 5 分で細胞内に導入される非常に画期的な修飾核酸となる。このジスルフィド修飾法を用いることで、非侵襲に可視化プローブを導入することを目指した。

### 4. 研究成果

まず、当研究室で開発したジスルフィド修飾法を用いることで可視化プローブを細胞内に導入できるかどうかを検討した。従来用いていた初代 MPON は、疎水性の *tert*-Bu 基を含むジスルフィド修飾ユニットを 5'側に 5 つ連続させた構造になっている (図 2)。立体的にかさ高いこと

に加えて強い疎水性を持っており、可視化のための蛍光前駆体が既に修飾された核酸に対して更に当該修飾ユニットを付加することは、物性の面から困難であると推測された。そこで、より疎水性が低く、かつ少ないユニット数で同等の細胞膜透過性を持つ新規修飾核酸の開発に取り組んだ。物性を改善するために、核酸のリン酸骨格を電荷を持つリン酸ジエステル構造に変更して疎水性を低下させ、また、細胞内に存在する  $\alpha$ -リポ酸を基盤とした環状ジスルフィド構造をジスルフィド修飾ユニットとして用いることで細胞への毒性を抑えた(図3)。この基本設計に基づいて複数種のジスルフィド修飾核酸を合成し、ヒト培養細胞である HeLa 細胞を用いて細胞内導入効率を調べた。その結果、1-3 個の付加で高い細胞膜透過性を示す修飾ユニットを発見した(未発表)。細胞に対する毒性がないことも MTT アッセイにより確認されている。初代 MPON よりも優れた物性を持つ応用性の高い新規修飾核酸が得られたことから、当該修飾ユニットを付加することで、可視化プローブなど多様な核酸の細胞内導入を実現できる可能性が示された。今後は、蛍光前駆体など大きな修飾がついた核酸や mRNA などの長鎖核酸を当該修飾ユニットの付加によって細胞内に導入できるか検討していく。また、初代 MPON に対して行ったのと同様に導入過程を経時的に観察することで、導入に要する時間やメカニズム等を明らかにしていく。

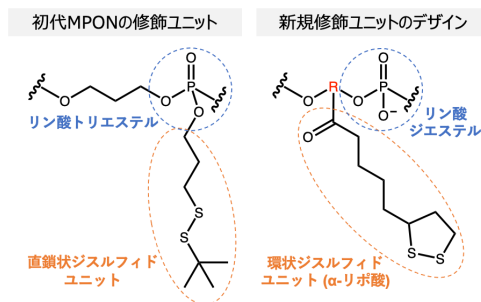


図3. 新規修飾ユニットのデザイン

次に、真核生物由来の HeLa 細胞において芳香族求核置換反応を利用した RNA イメージングが可能かどうかを検討した。まずは内在性の mRNA を標的とし、標的 mRNA と相補的な配列を持つ可視化プローブをリポフェクションにより導入して共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。しかし十分な蛍光シグナルは観測できなかった。当該手法では、標的 mRNA に対して 2 本 1 組の核酸プローブが共に結合する必要がある。多様な細胞内因子を持つ複雑な真核細胞系においては、可視化プローブの結合が起こりにくく十分なシグナル増幅が起こっていないものと思われる。標的 mRNA に対する結合率を高めるために、相補的な mRNA 配列への結合により機能するアンチセンス DNA 等に関する先行研究を参考に、活性が高く mRNA に結合しやすいと思われる配列を選択し、さらに Locked Nucleic Acid (LNA) (図 4A) などの化学修飾ヌクレオチドを利用した。候補として選択した複数の配列について、FRET を用いて RNA への結合効率を調べた(図 4A)。50 塩基ほどの短い人工 RNA を標的とし、核酸プローブの候補配列群と標的 RNA に対して蛍光色素である cy5 と FAM をそれぞれ付加して HeLa 細胞に導入した。両者が細胞内で結合すれば FRET が起こり cy5 の蛍光が確認される。しかしいずれの配列においても FRET は確認されず、標的 RNA への核酸プローブの結合を評価することは出来なかった(図 4B 上)。また、このとき cy5 ラベルした核酸プローブが細胞核へと移行していることが確認された(図 4B 右下)。今回核酸プローブとして用いた 20 塩基程度の短鎖核酸は、時間経過に伴い自然拡散によって核移行する例が過去に確認されている(Hiraoka et al., *ChemBioChem* 22(24):3437-3442, 2022)。大腸菌など細胞核を持たない原核細胞と異なり、真核細胞の実験系においては核酸プローブと標的 RNA が細胞核によって徐々に隔たれてしまうため、シグナル増幅が起こりにくくなっているものと思われる。

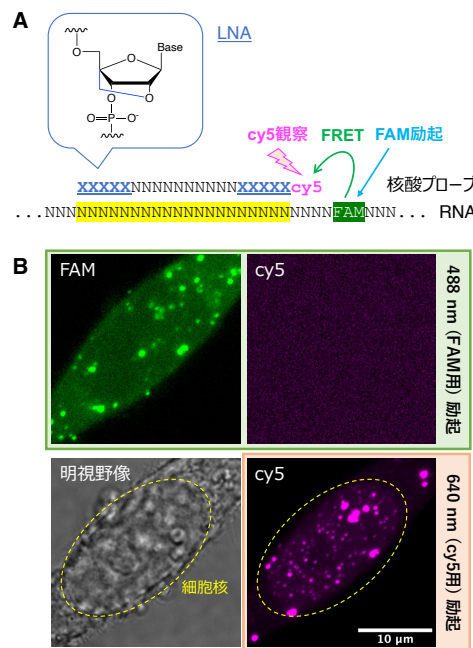


図4. 核酸プローブの結合能評価

これまでの研究から、HeLa 細胞において可視化プローブとして機能する配列を探索するのは困難と考え、化学修飾によって RNA そのものに蛍光を持たせることを目指した。類似の研究として、シトシンの塩基部に修飾を施すことで転写可能な蛍光 mRNA を作った例が報告されている(Baladi et al., *J. Am. Chem. Soc.* 143(14):5413-5424, 2021)。これを参考に、塩基部修飾による蛍光 mRNA の合成に取り組んでいる。また、翻訳過程の観察のために、任意のタイミングで翻訳開始を誘導できる翻訳制御可能な mRNA の開発にも取り組んでおり、有望な結果が得られつつある。今後は、これらを組み合わせることで、細胞内に導入された mRNA が翻訳される過程を可視化し、外来 mRNA の翻訳メカニズム解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haruka Hiraoka, Zhaoma Shu, Bao Tri Le, Keiko Masuda, Kosuke Nakamoto, Lyu Fangjie, Naoko Abe, Fumitaka Hashiya, Yasuaki Kimura, Yoshihiro Shimizu, Rakesh N Veedu, Hiroshi Abe	4. 巻 22(24)
2. 論文標題 Antisense Oligonucleotide Modified with Disulfide Units Induces Efficient Exon Skipping in mdx Myotubes through Enhanced Membrane Permeability and Nucleus Internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 3437-3442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100413	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Lyu Fangjie, 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 Development of new membrane permeable oligonucleotides for therapeutic
3. 学会等名 第15回 ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 自発的かつ超高速に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
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 松原徳明, 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 ジスルフィド結合を利用した細胞膜透過性オリゴ核酸の開発
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 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 阿部洋
2. 発表標題 自発的かつ超高速に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
3. 学会等名 第37回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山里美, 平岡陽花, 阿部奈保子, 中嶋裕子, 吉田祐希, 加瀬光希弥, 野村浩平, 阿部洋
2. 発表標題 化学修飾mRNAの合成及びその細胞膜透過性と翻訳能の検討
3. 学会等名 第37回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruka Hiraoka, Shu Zhaoma, Saki Kawaguchi, Kosuke Nakamoto, Keiko Masuda, Kotaro Hayashi, Naoko Abe, Yasuaki Kimura, Yoshihiro Shimizu, Satoshi Uchida, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Membrane permeable oligonucleotide (MPON) induce the exon skipping against pre-mRNA by the enhanced transfer of antisense DNA to nucleus
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡陽花, Zhaoma Shu, Bao Tri Le, 益田恵子, 中本航介, 林光太郎, 阿部奈保子, 木村康明, Rakesh N. Veedu, 清水義宏, 内田智士, 阿部洋
2. 発表標題 膜透過性核酸MPONは効率的に核移行しエキソンスキッピングを促進する
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山里美, 平岡陽花, 中嶋裕子, 阿部奈保子, Zhenmin Li, 加藤駿一, 吉田祐希, 加瀬光希弥, 阿部洋
2. 発表標題 化学修飾mRNAの合成及びその細胞膜透過性と翻訳能の検討
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秤谷隼世, 平岡陽花, Shu Zhaoma, 松原徳明, Lyu Fangjie, 稲垣雅人, Zhenmin Li, Steve Soo, 木村康明, 阿部洋
2. 発表標題 核酸医薬送達プラットフォームとしての細胞膜直接透過型オリゴ核酸
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 川口紗貴, 中本航介, 平岡陽花, 星和明, 阿部奈保子, 木村康明, 阿部洋
2. 発表標題 細胞膜透過性核酸(MPON)の開発
3. 学会等名 第36回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口紗貴, Zhaoma Shu, 中本航介, 平岡陽花, 星和明, 阿部奈保子, 木村康明, 阿部洋
2. 発表標題 細胞膜透過性核酸(MPON)の開発
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 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 阿部洋
2. 発表標題 自発的に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 阿部洋
2. 発表標題 自発的に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
3. 学会等名 第11回「光塾」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平岡陽花, Shu Zhaoma, 川口紗貴, 中本航介, 益田恵子, 阿部奈保子, 木村康明, 清水義宏, 阿部洋
2. 発表標題 自発的かつ超高速に細胞内に導入される膜透過性核酸MPONの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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			
オーストラリア	Murdoch University			