

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750064

研究課題名(和文) siRNAを標的とする蛍光性リガンドの創成と細胞内解析への応用

研究課題名(英文) Design of fluorescent probes for siRNAs and their application to intracellular siRNA analysis

研究代表者

佐藤 雄介 (SATO, YUSUKE)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90583039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、RNAiの中核を担うsiRNAを標的とする蛍光性分子を開発し、これを利用した細胞内siRNA解析法の開発を試みた。siRNA構造的特徴である3'末端に存在するオーバーハング構造を認識するペプチド核酸を基本骨格として、そのN、C末端にそれぞれピレン、チアゾールオレンジを連結した分子がsiRNAオーバーハング選択的な発蛍光応答型プローブとして機能することを見出した。このプローブをsiRNAレポータとして用いることで、キャリアに内包されたsiRNAを選択的に可視化することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：We designed fluorescent probes for selective recognition of overhang nucleobases of siRNAs capable of inhibiting gene expression in cells. Our probes consist of peptide nucleic acid, pyrene and thiazole orange. The probes were found to exhibit the light-up fluorescence response upon selective binding to overhang nucleobases of siRNAs. Such a fluorescence sensing ability of the probe was applicable to distinct analysis of siRNA delivery through transfection. Then, this kind of fluorescence probe is expected to function as effective and versatile tools for the analysis of behaviors of intracellular siRNAs without relying on fluorophore modifications and labelling.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：蛍光性分子 siRNA RNA干渉 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) は 21 塩基程度の短鎖 RNA 二重鎖 (small interfering RNA; siRNA) を細胞内に導入することで、配列特異的に遺伝子発現が制御される現象であり、その高い制御効果と特異性から遺伝子機能解析の強力なツールとして広く利用されている。また、siRNA はがんやウイルス感染など様々な疾患に対して遺伝子レベルでの治療を可能とする核酸医薬としても高い注目を集めている。したがって、RNAi 機構を分子レベルで理解し、核酸医薬としての実用性を向上させていくためには、細胞内 siRNA 動態を解析する必要がある。

現在、siRNA 解析は蛍光色素などが標識された siRNA を用いることで細胞内に導入された siRNA 解析が行われているが、天然の siRNA を検出対象としていないことが本質的な問題点として指摘されている。加えて、本法では外部から導入した siRNA に適用が限られており、ベクターにより導入される siRNA や、ごく最近発見された内在性 siRNA を解析することはできない。一方で、逆転写 PCR 法に基づく siRNA 検出法では、細胞内における siRNA の動態挙動や時空間的な情報を得ることは不可能であり、これら既往法の弱点を補う新たな方法論の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、RNAi の中核を担う siRNA を標的とする蛍光性分子を開発し、これを利用した細胞内 siRNA 解析法を開発することである。具体的には、siRNA 構造的特徴である 3' 末端に存在するオーバーハング構造を選択的に認識し、蛍光シグナルを示すプローブを設計し、蛍光色素などの修飾を一切不要とした天然の siRNA 機能評価に適用しうる新たな分析技術を創製する。

3. 研究の方法

siRNA は 20 塩基長程度の RNA 二重鎖であり、3' 末端にオーバーハング 2 塩基を有する特徴的な構造を持っている。本研究ではオーバーハング選択性の発現のために、2 塩基を強固にかつ選択的に認識する人工核酸ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid; PNA) を基本骨格として用いる。さらに、2 塩基間の塩基対形成のみでは、結合力が弱いと予想されるため、PNA の C 末端に RNA インターカレーターであるチアゾールオレンジ (TO) を連結したコンジュゲートを設計した。ここでは、TO が結合安定化をもたらすだけでなく、結合に伴う発蛍光応答部位としても機能するため、PNA-TO は siRNA オーバーハング選択的な蛍光性プローブとして期待できる。

PNA-TO の設計においては、そのオーバーハングに対する結合能ならびに発蛍光応答を最大限発揮させるために、PNA と TO

との間のスペーサー長を変化させた一連のプローブを合成し、体系的に評価していく。

細胞内 siRNA 解析においては、まず siRNA-プローブ複合体をトランスフェクションにより細胞内導入過程の観測を試みる。

4. 研究成果

本研究ではホタルルシフェラーゼ GL2 遺伝子を抑制する siRNA (siGL2) を標的として、そのオーバーハング塩基であるデオキシチミジンを選択的に認識するために、PNA アデニン 2 塩基を含むコンジュゲートを設計し (AA-TO)、固相上で合成した。その後、固相から切り出し後、逆相 HPLC にて精製し、95% 以上の純度でコンジュゲートを得た。

AA-TO と合成オリゴ siGL2 との相互作用を蛍光分光法により検討した結果、AA-TO は標的 siGL2 に対して明瞭な発蛍光応答を示すことが分かった。これは siGL2 非存在下において、TO 部位がその構成部位である 2 つのヘテロ環の自由回転によって無蛍光であるが、siGL2 との結合に伴い TO 部位がオーバーハング近傍の RNA 二重鎖に結合し蛍光を示すことに起因しているものと考えられる。この蛍光応答は、プローブの PNA アデニンとミスマッチとなるオーバーハングアデニン塩基を含む RNA やオーバーハング塩基を持たない RNA に対する応答と比較して大きく、開発した AA-TO がオーバーハング選択性ならびにオーバーハング塩基選択性を発現することが分かった。また、スペーサー長効果については、いずれの AA-TO コンジュゲートにおいてもオーバーハング塩基選択的な発蛍光応答を示すものの、炭素数 4 を持つスペーサーが蛍光応答の大きさならびにオーバーハング塩基に対する選択性において優れていたため、これを最適化スペーサーとして選択した。

以上のように、AA-TO は siRNA 3' 末端オーバーハング塩基選択的な蛍光性プローブとして機能するが、その選択性はまだまだ小さく、さらに siRNA 濃度が高くなってきた場合、TO 部位単独での RNA 結合に基づく非特異的な結合が顕著になってくるため、siRNA 選択性は著しく減少していく。そこで、AA-TO の N 末端にピレンを導入した Py-AA-TO を新たに設計し、その siGL2 に対する結合能および蛍光応答を検討した。その結果、Py-AA-TO は AA-TO に比べて 3 倍以上のオーバーハング塩基選択性を示すことが分かった。分光学的および計算化学的手法による解析の結果、プローブ構造においてピレン部位と TO 部位が分子内スタッキング構造を取っており、これにより TO 部位による非特異的な結合が抑制されたものと考えられる。

Py-AA-TO を siRNA レポーターとして活用することに着目し、トランスフェクションによる siRNA 細胞導入過程の蛍光イメージングを行った。ここではまず siGL2/Py-AA-TO

複合体をポリエチレンジイミンをベースとしたトランスフェクション剤を用いて、Hela 細胞に導入し、蛍光顕微鏡により観察した。その結果、導入後 30 分で細胞質に複合体-トランスフェクション剤(ポリプレックス)由来の輝点が見られ、この輝点は 3 時間程度まで増え続けていった。これはポリプレックスがトランスフェクションにより細胞導入されている様子を観測しているものと考えられる。細胞に導入された後に、ポリプレックスは崩壊し、複合体は細胞質に放出されているが、Py-AA-TO は siGL2 から速やかに解離していくと示唆される結果が得られた。これは Py-AA-TO の結合親和力が小さいためと考えられる。一方で、興味深いことに解離した Py-AA-TO は細胞質に存在する様々な RNA などには結合せず、非特異結合に基づくバックグラウンド蛍光をほとんど示さないことが分かった。したがって、Py-AA-TO はポリプレックスを選択的に可視化し、その動態や崩壊などの過程を解析するツールとして機能することが示唆された。このような機能を持つ蛍光プローブは過去にも例が無く、細胞内 siRNA 解析に極めて有用なプローブであると考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) siRNA 選択的蛍光プローブの開発、佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、日本化学会第 94 春季年会、名古屋大学、2014 年 3 月 27-30 日
- (2) PNA-TO コンジュゲートを用いた siRNA 選択的検出、佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、日本分析化学会第 62 年会、近畿大学、2013 年 9 月 10-12 日
- (3) 細胞内 siRNA 解析を指向した蛍光性プローブの開発、佐藤雄介、佐藤貴哉、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、日本分析化学会第 62 年会、近畿大学、2013 年 9 月 10-12 日
- (4) PNA-TO conjugates as fluorescent probes for siRNA analysis、Takaya Sato, Yusuke Sato, Kenta Iwai, Shunsuke Kuge, Norio Teramae, Seiichi Nishizawa, RSC Tokyo International Conference 2013, 幕張メッセ、2013 年 9 月 5-6 日
- (5) 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、佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、平成 25 年度日本分析化学会東北支部若手交流会、仙台秋保温泉岩沼屋、2013 年 7 月 19-20 日
- (6) 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、佐藤貴哉、佐藤雄介、岩井健太、久下周佐、寺前紀夫、西澤精一、第 73 回分析化学討論会、北海道大学、2013 年 5 月 18-19 日

(7) Fluorescence sensing of siRNAs by peptide nucleic acid-thiazole orange conjugates、Takaya Sato, Yusuke Sato, Norio, Teramae, 平成 24 年度日本分光学会国際シンポジウム・年次講演会、東京工業大学、2012 年 11 月 27-29 日

(8) Peptide nucleic acid-fluorophore conjugates for siRNA analysis、Takaya Sato, Yusuke Sato, Norio Teramae, Sendai Symposium on Analytical Sciences 2012、東北大学、2012 年 11 月 9-10 日

(9) siRNA 検出を指向した新規発蛍光応答プローブの開発、佐藤貴哉、佐藤雄介、寺前紀夫、日本分析化学会第 61 年会、金沢大学、2012 年 9 月 19-21 日

(10) siRNA 選択的検出を指向した diPNA-チアゾールオレンジコンジュゲートの開発、佐藤貴哉、佐藤雄介、寺前紀夫、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学、2012 年 9 月 6-8 日

(11) siRNA 検出を指向した発蛍光応答型プローブの設計とその機能評価、佐藤貴哉、佐藤雄介、寺前紀夫、みちのく分析科学シンポジウム 2012、山形大学、2012 年 7 月 21 日

(12) siRNA 選択的検出を指向した diPNA-チアゾールオレンジコンジュゲートの設計、佐藤貴哉、佐藤雄介、寺前紀夫、平成 24 年度東日本若手交流会、いこいの村潤沼、2012 年 6 月 29-30 日

(13) Design of peptide nucleic acid-thiazole orange conjugates for selective fluorescence sensing of siRNAs、Takaya Sato, Yusuke Sato, Norio Teramae, XV International Symposium on Luminescence Spectroscopy, Barcelona University (Spain), 2012 年 6 月 19-22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：