

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750173

研究課題名(和文) 蛍光挿入型 siRNA アナログを用いた RNA 干渉の作動機構の解明

研究課題名(英文) Design and development of the fluorescent-labeled siRNA for studying RNAi

研究代表者

神谷 由紀子 (Kamiya, Yukiko)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・講師

研究者番号：00527947

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)：RNA干渉(RNAi)は20塩基対程度の短い二重鎖RNA(siRNA)により誘導され、その塩基配列に相補的な遺伝子の発現を抑制するシステムである。本研究ではsiRNAの細胞内動態やタンパク質との相互作用解析を行うためにsiRNAを蛍光基やクロスリンク基で化学修飾し、分析ツールとして利用可能なsiRNAのデザイン開発を行った。まず、化学修飾によって、RNAi活性の向上および副作用の抑制を両立するsiRNAの設計を見いだした。このデザインを応用して蛍光基及び消光剤を導入したsiRNAを合成することで、実際に、RNAiの活性本体であるmature RISCの選択的な可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：RNA interference (RNAi) is an endogenous gene silencing system in living cells. It has been utilized to knock down a specific gene by introducing the corresponding short double-stranded RNA (siRNA) into cells. In this research, we developed chemically modified siRNA with functional molecules including dyes or cross-linker. We found a novel design of siRNAs that are incorporated into RISC with high antisense strand selectivity without loss of RNAi activity. Using our designed fluorophore-quencher pair-conjugated siRNA, we successfully demonstrated selective monitoring of mature-RISC which embedded the anti sense strand in cells.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：RNAi RNA結合タンパク質 siRNA miRNA 機能性核酸 蛍光プローブ クロスリンク RNA-タンパク相互作用

1. 研究開始当初の背景

小分子 RNA により誘導される RNA 干渉 (RNAi) は、その塩基配列に相補的な遺伝子の発現を抑制する真核生物に普遍的なシステムである。RNAi は解析ツールとしてタンパク質の担う生体機能を解明するための手法として利用されているのみならず、特定タンパク質の異常によって引き起こされるがん等の重篤な疾患を治療する医薬品としての応用も期待されている。RNAi が誘導されるメカニズムの概要は明らかとなっており、ターゲットとなる二重鎖 RNA の認識、5' 末端の切断、二重鎖 RNA の解離、mRNA との結合といった反応が次々と仕掛けられていく。この過程は、酵素である Dicer、Argonaute2(AGO2) を中核分子とする RNA-loading complex(RLC)、RNA-inducing silencing complexes(RISC) と呼ばれるタンパク質複合体が RNA 分子を認識することによって実現されている。近年の構造生物学的研究により、様々な生物種における Dicer および AGO2 と RNA の複合体の立体構造が決定されてきた。これにより、RNAi 関連タンパク質はいずれも、複数のドメインから構成されるタンパク質であり、これらのドメインが協働して RNA と結合していることが明らかとなりつつあった。そこで、RNA-タンパク質の相互作用に基づいてプローブ型 siRNA を設計・開発し、これをツールとして用い RNAi 機構の詳細を解明することを計画した。

2. 研究の目的

RNAi の作動メカニズムの分子基盤を解明するために、RNAi 機構の誘導因子である small interfering RNA (siRNA) siRNA に着目し、蛍光基などの機能性分子を修飾することで分析ツールとなる機能性 siRNA を開発することを試みた。その際に機能性分子を修飾しても RNAi 活性を損なわないような設計にするために、RNAi 関連タンパク質の立体構造に基づいて分子デザインを行うことを試みた。

3. 研究の方法

RNAi を制御する RNA 結合タンパク質の立体構造情報に基づいて、siRNA 分子を修飾するために適した機能性分子の大きさ、その挿入位置を見積もった。機能性分子としては、蛍光色素・光応答性クロスリンカーを導入した。その際に、D-threoninol を介して疑似塩基的に RNA 鎖中に機能性分子を挿入した。作成した siRNA はルシフェラーゼレポーター法により、RNAi 効果への影響を評価した。RISC がセンス鎖、アンチセンス鎖のどちらを選択的に取込んだのかを明らかにするために、antisense-RISC 複合体のターゲット配列あるいは sense-RISC のターゲット配列を持つ二種類のプラスミドを用いることで鎖選択性も解析した。得られた siRNA を用

いて siRNA の細胞内挙動やタンパク質との相互作用を生化学的手法および蛍光顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

I. 色素対を導入した siRNA を用いた mature RISC の選択的可視化

①機能性分子の挿入によるアンチセンス鎖選択性の向上

RISC の成熟過程の詳細を解析するためには、蛍光標識した siRNA を用いた細胞内イメージングが有効である。そこで、本研究ではアンチセンス鎖を結合する RISC (mature RISC) を選択的に可視化する siRNA 型センサーの開発を試みた。

siRNA は細胞内で Dicer や内在性の酵素によって末端配列が切除されてしまうため、蛍光色素は RNA 鎖内部に導入することが望ましい。また、mature RISC を選択的に可視化するためには、off-target 効果による RISC へのセンス鎖の間違った取込みを抑制し、アンチセンス鎖を選択的に取込ませる必要がある。これらの条件を満たす siRNA の設計を行うために、まず siRNA 内部へ機能性分子を化学修飾することによって RISC のセンス鎖の取込みを抑制することを試みた。

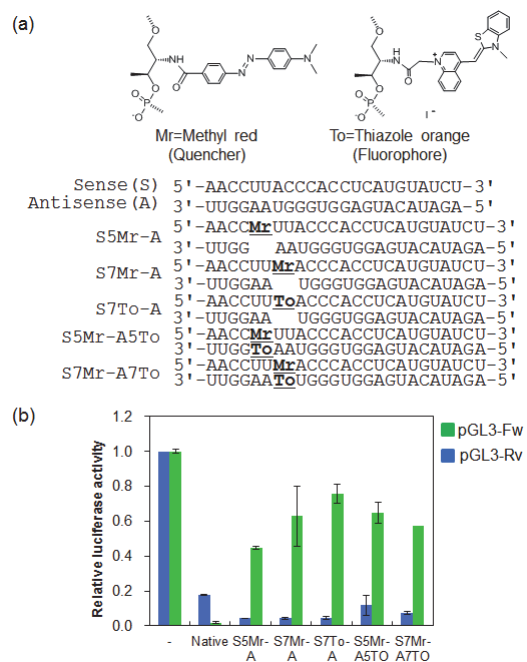


図1 色素導入 siRNA による RNAi 活性の向上と off-target 効果の抑制

(a) siRNA の配列と導入した色素

(b) アンチセンス鎖-RISC のターゲットとなる pGL3-Fw およびセンス鎖-RISC のターゲットとなる pGL3-Rv に対する RNAi 活性の解析。センス鎖の 5' 末端近傍に色素を導入した siRNA は pGL3-Fw に対する RNAi 活性 (on-target) の向上および pGL3-Rv に対する活性 (off-target) の低下が観測された。

RISCの中核タンパク質であるAGO2と一本鎖RNAの複合体の結晶構造解析から、AGO2はRNAの5'末端領域と結合することが明らかとなっていた。このことから、siRNAのセンス鎖の5'末端近傍へ機能性分子を挿入することでセンス鎖の取込み抑制によるアンチセンス鎖の選択性向上および、RNAi活性の向上を両立することが可能であると期待された。そこで消光剤メチルレッド(Mr)あるいは蛍光基チアゾールオレンジ(To)をセンス鎖の5'末端近傍に導入したsiRNAを合成しルシフェラーゼレポーター法によりRNAi効果を解析したところ、予想通りの結果が得られた(図1)。

②色素対修飾 siRNA を用いた細胞内イメージング

上記の結果より、Mature RISC を選択的に可視化する siRNA 型センサーとして色素対を導入した siRNA を設計した。センス鎖の5'末端近傍に消光剤である Mr、アンチセンス鎖の相補的な位置に蛍光色素である To をそれぞれ D-threoninol を介して配列内部に挿入した。これにより、この修飾 siRNA は二

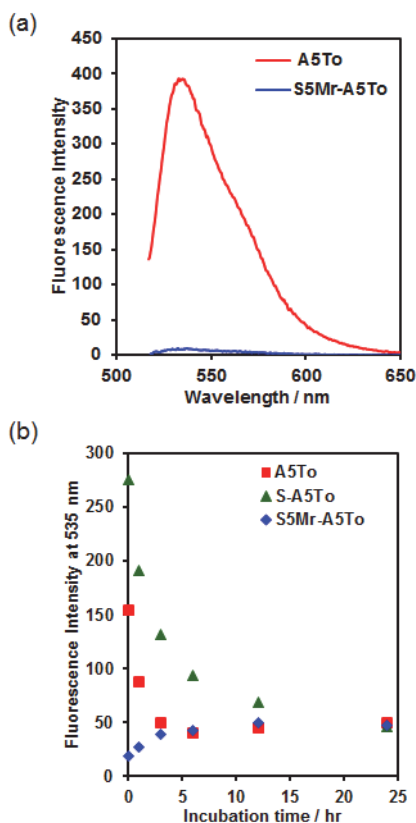


図2 色素対導入型 siRNA の蛍光スペクトル

(a)二重鎖(S5Mr-A5To)ではToの傾向は消光しているが、一本鎖状態(A5To)ではToの蛍光発光が観測された。

(b)HeLa細胞のライセートと混合し、分解されたRNA上のToはフリー状態であり、ほとんど発光しない。

重鎖状態では色素会合が形成され消光し、アンチセンス鎖のみとなった時に発光すると期待した。また、Toを用いることにより siRNA が分解され遊離状態となった蛍光色素の発光が抑制されると期待した。

合成した色素対導入型 siRNA の蛍光スペクトルを測定したところ、二重鎖状態の siRNA と比較して、To が挿入された単鎖のアンチセンス鎖の蛍光強度は顕著に増加することが明らかとなった(図2a)。また、細胞内抽出液を添加し siRNA の蛍光スペクトル変化を観測したが、24時間後においても siRNA の蛍光強度の上昇は観測されなかった。このことから、内在性の酵素によって分解された siRNA によるバックグラウンド蛍光は抑制可能であることが明らか(図2b)となった。次に、色素対修飾による siRNA の RNAi 活性への影響を解析するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、期待通り、ルシフェラーゼの発現を高効率で抑制した(図1)。またこの siRNA はアンチセンス鎖が選択的に RISC へ取り込まれることも明らかとなった。以上の結果より、本研究で開発した色素対標識 siRNA を用いることで、細胞内の mature RISC の選択的な検出が可能であると期待された。そこで、実際に HeLa 細胞に色素対標識 siRNA を導入し、共焦点顕微鏡による観測を行ったところ、時間経過とともにアンチセンス鎖に標識した To の蛍光が増大していく様子をとらえることに成功した(図3)。また、免疫染色の結果より、RISC タンパク質 AGO2 および P/GW-body タンパク質 GW182 と共局在する様子が観測できた。このことから、mature RISC の細胞内モニタリングに利用できるプローブの開発に成功した。

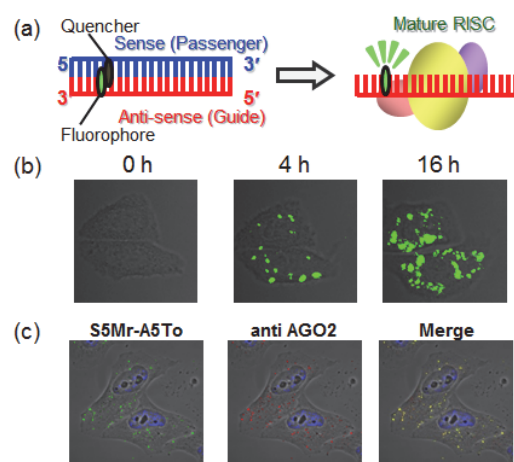


図3 色素対導入型 siRNA(S5Mr-A5To)を用いた mature RISC の可視化

(a)mature RISC イメージングの概念図

(b)mature RISC 形成の経時変化

(c)Toの蛍光とAGO2の局在は一致する。

II. 光クロスリンク基による小分子 RNA と RNAi 関連タンパク質との相互作用解析

RNAi 関連タンパク質と RNA との相互作用を明らかにするために、クロスリンク基を導入した小分子 RNA の開発を行った。光クロスリンク基として一般的なジアジリンを RNA 鎖内に導入することを試みた。RNA と結合するタンパク質とジアジリンが選択的にクロスリンクするために、まずはジアジリン誘導体の設計を行った。ジアジリンが相補鎖 RNA とクロスリンクしてしまわないように、光反応性部位が二重鎖外に位置するような新たなジアジリン化合物の合成を行った。反応性を解析したところ、期待通り相補鎖に対する架橋性は観測されなかったため、この新規ジアジリンを pre-miRNA に導入し、RNAi 関連タンパク質である Dicer とのクロスリンクを試みた。ウェスタンブロットによる解析の結果、Dicer/pre-miRNA 複合体を検出した。

以上のように RNA 結合タンパク質を検出するための適切な光クロスリンク基の設計に成功し、RNAi 関連タンパク質である Dicer との結合を捉えることができた。

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 2 件)

Y. Kamiya, A. Ito, H. Ito, M. Urushihara, J. Takai, T. Fujii, X.G. Liang, H. Kashida, and H. Asanuma

Selective labeling of mature RISC using siRNA carrying fluorophore-quencher pair
Chem. Sci., (2013) 4, 4016-4021. 査読有

Y. Kamiya and H. Asanuma

Light-driven DNA nanomachine with a photoresponsive molecular engine
Acc. Chem. Res., In press 査読有

[学会発表] (計 10 件)

①漆原雅朗・伊藤浩・藤井大雅・梁興国・伊藤杏奈・榎田啓・神谷由紀子・浅沼浩之, "色素対型 siRNA を用いた RISC 形成過程の可視化解析" 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム

②Y. Kamiya, J. Takai, M. Urushihara, H. Ito, X.G. Liang, A. Ito, K. Yoshida, T. Fujii, H. Kashida, and H. Asanuma "Design and development of the functionalized siRNA for studying RNAi" ISNAC2012

③神谷由紀子・伊藤杏奈・高井順矢・漆原雅朗・伊藤浩・藤井大雅・梁興国・榎田啓・浅沼浩之, "色素対型 siRNA を用いた RISC の細胞内可視化解析" 日本薬学会第 133 年会

④神谷由紀子、伊藤杏奈、高井順矢、漆原雅

朗、伊藤 浩、藤井大雅、梁 興国、榎田 啓、浅沼浩之, "アンチセンス鎖と結合した mature RISC の選択的ナノ可視化" 第 77 回日本生化学会中部支部例会

⑤Y. Kamiya, J. Takai, M. Urushihara, H. Ito, X.G. Liang, A. Ito, K. Yoshida, T. Fujii, H. Kashida, H. Asanuma, "Development of Modified siRNA for Improvement of RNAi Activity and Monitoring in Cells" 第 62 回高分子学会年会

⑥神谷由紀子、伊藤杏奈、高井順矢、榎田 啓、浅沼浩之, "mature RISC を選択的に可視化する修飾 siRNA の開発" 第 15 回日本 RNA 学会年会

⑦神谷由紀子、伊藤杏奈、高井順矢、漆原雅朗、伊藤 浩、藤井大雅、梁 興国、榎田 啓、浅沼浩之, "RISC を選択的に可視化する色素導入型 siRNA の開発と細胞内イメージング解析" 第 23 回バイオ・高分子シンポジウム

⑧神谷由紀子 "化学修飾による機能性 siRNA の開発" 名古屋大学予防早期医療創成センター 第 4 回ワークショップ, 名古屋大学【招待講演】

⑨神谷由紀子、津田弘貴、吉田健司、土居哲也、浅沼浩之, "光反応性クロスリンク基を導入した小分子 RNA の設計と反応性の評価", 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋大学, 2014.3

⑩神谷由紀子、高井順矢、伊藤杏奈、村山恵司、伊藤浩、榎田啓、浅沼浩之, "非環状骨格を導入した siRNA による RNAi 活性の向上と酵素耐性の獲得" 日本化学会第 94 春季年会

[図書] (計 2 件)

①神谷由紀子、浅沼浩之, "ナノ環境に優しい光応答性 DNA の設計", p.192-210, コロナ社 (2013) "太陽エネルギー社会を築く材料テクノロジー (I) -材料・デバイス編-", 名古屋大学大学院工学研究科 材料バックキャストテクノロジー研究センター 編、査読有

②神谷由紀子、浅沼浩之, "核酸医薬を目指した機能性 siRNA", p.94-98, (2013) 最先端メディカルエンジニアリング 第 2 版 -名古屋大学最先端メディカルエンジニアリング編集委員会編

[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

<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/seigyol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷由紀子 (KAMIYA, Yukiko)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・講師

研究者番号：00527947