

研究報告書

「新規人工核酸SNAを用いた生細胞内RNAイメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 檜田 啓

1. 研究のねらい

RNA はこれまで遺伝子からタンパク質合成する際の仲介役として認識されてきたが、近年タンパク質に翻訳されない膨大なノンコーディング RNA の存在が明らかになったこともあり、非常に注目されている。従って、細胞内における RNA の局在性を明らかにすることが出来れば、細胞内における RNA の機能を解明することが期待できる。RNA を生細胞内で可視化する手法としては MS2 などの RNA タグ配列に結合する蛍光性タンパク質を利用する手法が一般的であるが、標的 RNA に結合していないタンパク質も発光するという問題点がある。一方、蛍光標識した DNA であるモлекуラービーコン(DNA-MB)は標的 RNA 非存在下では発光しないという特長があるが、その細胞内安定性に問題があった。

それに対し、我々は新たな人工核酸であるセリノール核酸(SNA)を開発した。SNA は RNA に対し高い親和性を示し、かつ高いヌクレアーゼ耐性を示すことが分かっている。また、SNA で構成されるモлекуラービーコン(SNA-MB)を合成したところ、DNA-MB よりもはるかに高感度に RNA を検出可能であることが明らかとなった(図1)。そこで、本研究ではこの SNA-MB を更に高機能化することによって生細胞内における RNA イメージングを実現すること

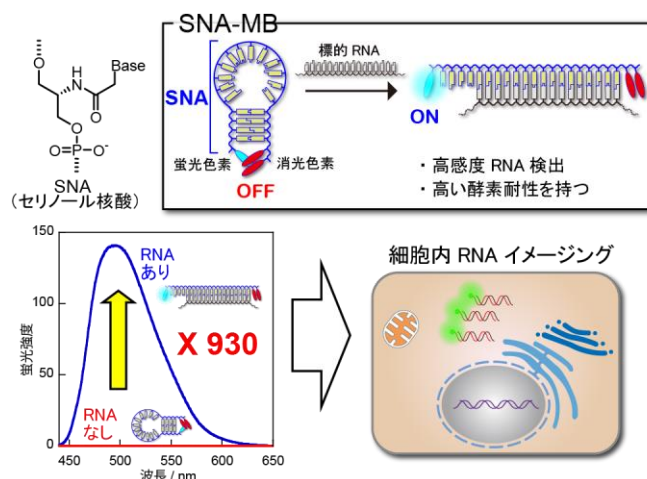


図1. SNA-MB の概略

を目指した。これまでの RNA 検出プローブには生細胞内で使用する上で①細胞内安定性(ヌクレアーゼ耐性)が低い、②検出感度が低い、③細胞内局在性の制御が困難といった問題点があった。このうち①については SNA を利用することでヌクレアーゼ耐性を劇的に向上させることができる。そこで、本研究では SNA-MB の化学修飾や SNA の構造改変などを通して②及び③の問題点を解決し、生細胞内で RNA イメージングを行うことを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞内 RNA は通常、複雑な二次構造をとっているために核酸プローブが結合しにくいことが知られている。そのため、mRNA などの長鎖 RNA を検出するためには SNA-MB の RNA

親和性を向上させる必要がある。本研究では SNA の主鎖であるセリノールの代わりに L-トレオニノールをもつ L-aTNA を開発し、これが RNA に対して SNA よりも高い親和性をもつことを明らかにした。また、修飾塩基を SNA に導入することで、RNA との二重鎖安定性を向上できることを明らかにした。更に、修飾塩基導入 SNA-MB を合成し、二次構造を形成する RNA に対してより親和性が向上することを見出した。更に、全く新しい原理で RNA を検出可能なプローブの開発を行った。従来のモレキュラービーコンの設計では自己相補的な配列を利用する必要があったが、安定な蛍光色素・消光色素ペアを DNA に導入することでステム構造不要な RNA 検出プローブの開発に成功した。

細胞内 RNA イメージングについてはまず固定化細胞における検出について検討を行った。その結果、SNA-MB が洗浄操作なしで RNA を検出可能であることが分かった。これは SNA-MB が wash-free 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)プローブとして機能したことを示している。また、SNA-MB を生細胞内に導入したところ、SNA-MB は核内に局在することが明らかになった。そこで、核内に局在化する rRNA をターゲットにした SNA-MB を合成したところ、生細胞内において RNA を検出することに成功した。更に、SNA-MB とポリマーをコンジュゲーションすることにより核内移行を抑制できることを明らかにした。以上のように細胞内における高感度 RNA 検出を実現するための様々な基盤技術の開発、及びそれらを利用した生細胞内 RNA イメージングに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「RNA との親和性向上のための SNA 化学修飾」

まず、より RNA との親和性の向上を図るために、SNA の主鎖骨格の改変を行った。SNA はセリノールを主鎖骨格にもつが、セリノールにメチル基を導入したトレオニノールを主鎖にもつ aTNA を合成し、RNA との二重鎖安定性を比較した。その結果、L-トレオニンから合成した L-aTNA が SNA よりも RNA との二重鎖安定性が高いことが分かった。すなわち、化学修飾によって RNA との親和性が SNA よりも高い新規人工核酸の開発に成功した(図2)。一方、L-aTNA の鏡像異性体である D-aTNA やメチル基置換の位置の異なる D-allo-aTNA、L-allo-aTNA はいずれも RNA との二重鎖安定性が低いことが分かった。このように、主鎖骨格のわずかな違いが天然核酸認識能に極めて大きな影響を与えることを見出し、人工核酸開発の設計指針における重要な知見を得ることが出来た。

また、チミン及びグアニンと安定な塩基対を形成可能なジアミノプリン(Dp)及び G-clamp を導入した SNA-MB を開発した(図3)。修飾塩基導入 SNA と RNA との二重鎖安定性について

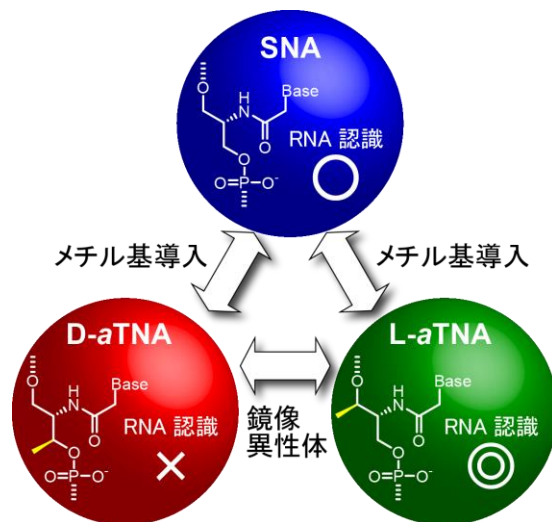


図2. 開発した人工核酸の性質

て検討したところ、導入に伴い安定性が飛躍的に向上することが分かった。更に、これらの修飾塩基導入 SNA-MB を用いた RNA 検出について検討を行った。二次構造が詳細に知られているメチオニン tRNA をターゲットにしたところ、修飾塩基導入することで tRNA に対しても親和性が向上することが分かった。更に、この SNA-MB を利用して固定化細胞での RNA イメージングを行ったところ、修飾塩基導入していない SNA-MB と比較してより高感度な検出が明らかであることが明らかとなった。

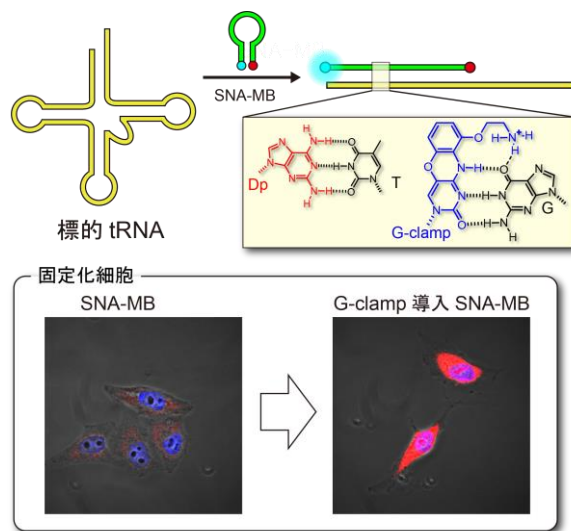


図3. 修飾塩基導入による RNA 検出の高感度化

研究テーマ B 「新しい機構に基づく RNA 検出プローブの開発」

これまでの設計はプローブが自己相補的配列をもつことでステムループ構造を形成し、蛍光色素と消光色素が会合する設計であった。しかしながら標的 RNA 検出時にステム構造が解離する必要があるため、応答速度が低下する可能性があった。そこで、安定な色素ペアを利用することでステム構造不要な新規 RNA 検出プローブを開発した(図4)。

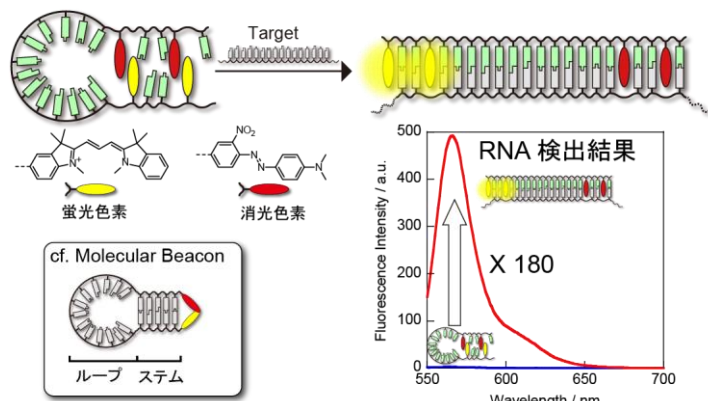


図4. 新しい機構をもつ RNA 検出プローブの模式図

具体的には電子ドナーとなる消光色素と電子アクセプタである蛍光色素を直鎖状 DNA に導入した。その結果、ターゲット RNA の添加に伴い、蛍光強度を 180 倍増大することが分かった。更に、固定化細胞における RNA 検出が可能であることも明らかにした。本設計は SNA などの他の人工核酸プローブに適用可能であるのみならず、ペプチドなど他の生体高分子プローブへの展開も期待できる。

研究テーマ C 「SNA-MB を利用した細胞内 RNA イメージング」

SNA-MB を利用した細胞内 RNA イメージングについて検討を行った。まず SNA-MB の FISH プローブとしての性能評価を行った。通常の RNA-FISH は蛍光ラベルしたプローブを添加し、RNA と結合していないプローブを洗浄することによって検出が行われている。しかしながら、検出効率が洗浄操作の効率によって大きく左右されるという問題点があった。それに対し、SNA-MB は標的 RNA 非存在下での発光を消光できるため、洗浄操作不要な FISH プローブとして機能することが期待できる。そこで、実際に SNA-MB を固定化細胞に添加し、wash-free FISH プローブとして機能するかを評価した。β-actin mRNA をターゲットとした

SNA-MB について評価を行った結果、洗淨操作なしで固定化細胞において RNA を検出可能であることが分かった (図 5)。すなわち、SNA-MB が wash-free FISH プローブとして機能することを明らかにした。

生細胞内 RNA イメージングについてはまず SNA-MB の細胞導入方法や細胞内局在性を検討した。その結果、SNA-MB をマイクロインジェクションで生細胞に導入した際には核内に局在することが明らかとなった。そこで、核内局在性 RNA のイメージング及び SNA-MB の核内移行抑制について検討を行った。核内では核小体に局在することが知られている 28S rRNA をターゲットとした SNA-MB をマイクロインジェクションによって HeLa 細胞に導入し、ライブイメージングを行った。その結果、予想通り核小体からの発光が観察された (図 6)。以上のことから、SNA-MB を利用した生細胞内 RNA イメージングに成功した。

SNA-MB の核内移行は核内 RNA イメージングには適しているが、細胞質に存在する RNA のイメージ

ングするには問題となる。そこで、SNA の核内移行を抑制するためにポリマーとのコンジュゲーションを行った。ポリマーとしては生体適合性の高い MPC-BMA 共重合体を選択した。蛍光標識した SNA とコンジュゲーションし、HeLa 細胞にインジェクションを行ったところ、8時間後においても核内からの発光は観察されなかった。すなわち、ポリマーとのコンジュゲーションによって核内移行を抑制できることを明らかにした。

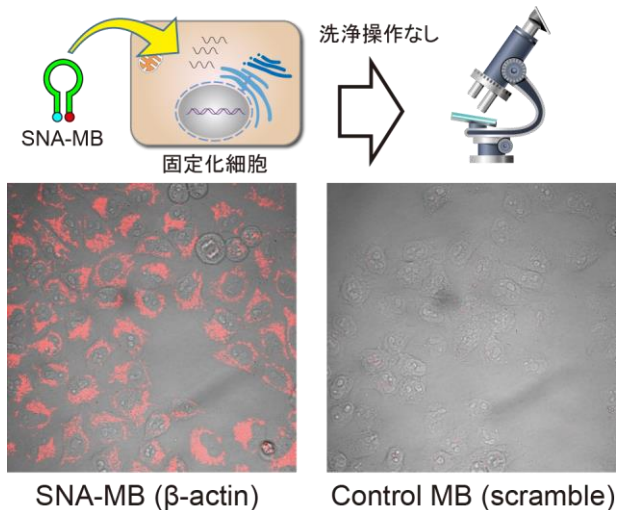


図5. SNA-MB を利用した wash-free RNA-FISH

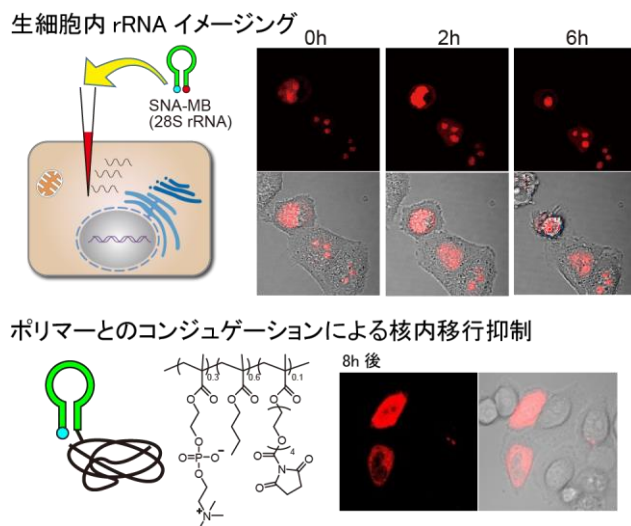


図6. 生細胞内 RNA イメージング及び核内移行制御

3. 今後の展開

本さきがけ研究によって SNA-MB を利用した核内 RNA の生細胞イメージングが可能であることを明らかにした。今後は生物学において注目されている核内ノンコーディング RNA などの可視化を検討する予定である。また、本プローブは固定化細胞においても wash-free FISH プローブとして機能することを明らかにした。FISH 法は医療・生物学をはじめ様々な領域で使用される技術であるものの、洗淨操作の煩雑性や再現性の乏しさが大きな問題点であった。本研究で開

発した SNA-MB は洗浄操作不要なため、より簡便な RNA イメージングプローブとしての応用が期待できる。このように SNA-MB を利用し細胞内で RNA を可視化することによって、様々な RNA の生物学的機能の網羅的な解明が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

生きている細胞内で RNA をイメージングするという当初の目的は概ね達成することが出来た。今後より発現量の少ない RNA 検出を実証する必要はあるが、本技術を利用し RNA の時空間的解析を行うことによって様々な RNA が細胞内ではたしている機能の解明が期待される。また、固定化細胞における wash-free FISH 法についてはさきがけ領域内外の研究者や SciFoS (Science For Society) 活動を通じて企業の研究者からも求められている技術であることを確認することが出来た。今後は実際の組織切片サンプル等での実証を行い、生物学・医療に資する技術への展開を図りたい。更に、本研究では生体分子検出の新しい原理や新規人工核酸の開発を行うことが出来た。これらは RNA イメージングにおいて有用な技術となるだけでなく、他の生体分子検出や核酸医薬開発等への応用が期待できる。

本さきがけ研究を通じてさきがけ領域内外の物理学・生物学をベースとする研究者と多くの共同研究を行う機会を得ることができた。これらは本さきがけ研究を推進する上で極めて重要であっただけでなく、今後の研究を進める上で必要な人的ネットワークを構築するという意味でもとても有意義な機会であったと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック、1 期生成果評価会での議論を踏まえ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

細胞内 RNA のイメージングのために、RNA との親和性の高い新規主鎖骨格をもった独自の L-aTNA を開発しました。また、修飾塩基導入 SNA-MB が 2 次構造を有する RNA に対してより高い親和性を示すことを見出し、安定な蛍光色素・消光色素ペアを DNA に導入してステム構造不要な RNA 検出プローブの開発に成功しました。次に核酸プローブを用いた細胞の解析法に取り組み、SNA-MB が wash-free FISH Probe として機能することを実証しました。また、生細胞では SNA-MB は核に局在することを利用して、核小体に局在する 28SrRNA を検出できること、SNA-MB をポリマーとコンジュゲイトして細胞質に留めることができることを示しました。以上の様に細胞内における高感度 RNA 検出の実現のための基盤技術の開発と、それらを利用した生細胞内 RNA イメージング手法の開発に成功し、当初の目的は達成していると評価できます。

今後、これらのツールを発展させて、生物学的に注目されている ncRNA などのイメージングや操作に展開することを期待します。また、細胞内への高効率の導入、高感度化を通じた低コピー数 RNA 検出、解析の定量化等の手法の開発を期待します。Wash-Free の FISH Probe については、領域内外の研究者との討論や SciFos 活動を通じて、企業をはじめ

めとした幅広い研究者から求められている技術であることが確認できていますので、その方向での展開も期待されます。

平成 27 年度に高分子研究奨励賞、平成 29 年度に文部科学大臣表彰 若手科学者賞を受け、多数の招待講演を行い将来を嘱望されています。さらに、日本化学会第 96,97 回春季大会(2016, 2017)、第 55 回日本生物物理学会年会(2017)では高橋康史研究者らと統合 1 細胞解析に関するシンポジウムを企画・主宰するなど、本領域の研究の発展、成果の展開に貢献しました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 主要な論文(原著論文)発表

1. K. Murayama, Y. Kamiya, H. Kashida, H. Asanuma, "Ultra-Sensitive Molecular Beacon Designed with Totally Serinol Nucleic Acid (SNA) for Monitoring mRNA in Cell", *ChemBioChem*, **2015**, 16, 1298-1301.
2. K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, "Acyclic L-Threoninol Nucleic Acid (L-aTNA) with Suitable Structural Rigidity Cross-pairs with DNA and RNA", *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 6500-6503.
3. H. Kashida, K. Morimoto, H. Asanuma, "A stem-less probe using spontaneous pairing between Cy3 and quencher for RNA detection", *Sci. Tech. Adv. Mater.*, **2016**, 17, 267-273.
4. H. Kashida, K. Murayama, H. Asanuma, "Acyclic artificial nucleic acids with phosphodiester bonds exhibit unique functions" *Polymer J.*, **2016**, 48, 781-786.
5. H. Kashida, H. Asanuma, "Development of pseudo base-pairs on D-threoninol which exhibit various functions", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2017**, 90, 475-484.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招待講演

1. Hiromu Kashida, "Design of functional DNA by using pseudo base-pair" 第 64 回高分子討論会、東北大学、2015 年 9 月 15 日
2. 樫田啓、「新規人工核酸 SNA を用いた生細胞内 RNA イメージング」日本化学会第 96 春季年会、同志社大学、2016 年 3 月 27 日
3. Hiromu Kashida, "Synthesis of Serinol Nucleic Acid (SNA) Exhibiting Unique Functions" 10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016)、つくば、2016 年 11 月 25 日
4. Hiromu Kashida, "Molecular design of pseudo base pairs for functionalization of DNA" Annual Spring Meeting of Polymer Society of Korea, Daejeon (Korea), 2017 年 4 月 6 日

5. Hiromu Kashida, "Analysis of energy transfer between dyes by using DNA scaffold"
第 53 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19 日

受賞

1. 高分子学会 高分子研究奨励賞 (H27.5)
2. 文部科学省 文部科学大臣表彰若手科学者賞 (H29.4)

著作物

1. 榎田啓、村山恵司、浅沼浩之「新規人工核酸 SNA を用いた RNA イメージング」生体の科学 66, 145-150 (2015).
2. 榎田啓、浅沼浩之「生細胞内 RNA イメージングのための人工核酸」生体の科学 68, 440-441 (2017).