

# 生細胞内 small RNA イメージングのための RNA 結合性低分子蛍光プローブの創製

## Design of RNA-Binding Fluorescent Probes for Small RNA Imaging in Living Cells

(日本分析化学会推薦)

代表研究者 東北大学

西澤 精一

Tohoku University

Seiichi NISHIZAWA

協同研究者 清華大学

童 愛軍

Tsinghua University

Aijun TONG

We have developed synthetic fluorescent probes for intracellular delivery analysis of small interfering RNAs (siRNAs). The probes are based on peptide nucleic acids that are conjugated with thiazole orange (TO) and pyrene to their C- and N-termini, respectively. The probe is able to selectively bind to 3'-overhanging two nucleotides of target siRNAs, and the binding is accompanied by a significant light-up response due to intercalation of the TO moiety into the double-stranded regions near overhangs. The affinity-labeling of siRNAs with the probe facilitates fluorescence imaging of cellular uptake of polymer-based carriers encapsulating the siRNAs (polyplexes) through endocytosis and subsequent sequestration into lysosome. In addition, flow cytometric measurements reveal that the monitoring of the probe fluorescence inside the cells is successfully applicable to the analysis of the polyplex disassembly. In contrast to typical methods using fluorophore-labeled siRNAs, the present probe does not compromise the siRNA silencing activity, and is applicable to the analysis of both cellular uptake and the intracellular disassembly of the polyplexes. The use of the probe thus allows a more detailed and quantitative analysis of the siRNA delivery process, which would be very useful for siRNA-related study.

### 研究目的

ここ 15 年程の間に、RNA が関与する新規な遺伝子発現調節機構の発見が相次ぎ、RNA は、ポストゲノム時代の生命科学研究における重要な研究対象となっている。なかでも RNA 干渉<sup>1)</sup>はその代表的な遺伝子発現調節機構で、siRNA<sup>2),3)</sup> (small interfering RNA) と呼ばれる 19-21 塩基長の RNA 二重鎖が細胞質内でタンパク質と複合体を形成することで、相補的な塩基配列を有するメッセンジャーRNA を分解、タンパク質への翻訳を阻害する。そのため、siRNA は癌などの難治性疾患に対する画期的な治療薬として期待されている。現在、実用化の課題とされているのが siRNA を標的組織・細胞へ輸送するデリバリーシステムの構築であり、それと同時に、そのデリバリー過程を精密かつ定量的、簡便に評価しうるイメージング・解析技術の開発が不可欠となる。

近年の細胞内イメージング技術の進展は著しく、

なかでも緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein: GFP) を用いた蛍光プローブの開発は代表的なアプローチで、細胞内シグナル伝達因子やセカンドメッセンジャー、細胞内蛋白質相互作用などの可視化が報告されている。しかしながら、細胞内の RNA イメージングを可能とする技術のハードルは高く、例えば、siRNA を標的とする場合、専ら蛍光色素修飾に基づく手法に依存している<sup>4)-7)</sup>。従って、siRNA の蛍光色素修飾を不要とするイメージング法を開発することで、本来の siRNA 活性・機能をより反映した動態解析が可能となり、siRNA 関連研究において極めて有用な解析手法になると期待できる。

以上のような学術的背景に基づき、本研究では、RNA 結合性の低分子蛍光プローブを開発、これに基づく細胞内 RNA イメージング法の開発を試みる。ここでは、特に siRNA に標的を絞って研究を遂行し、siRNA 選択的な結合機能とシグナリング機能を有す

る蛍光プローブの分子デザインを新たに提案するとともに、細胞内での siRNA 可視化機能を評価することで、方法論としての基礎と有用性を実証することを試みた。

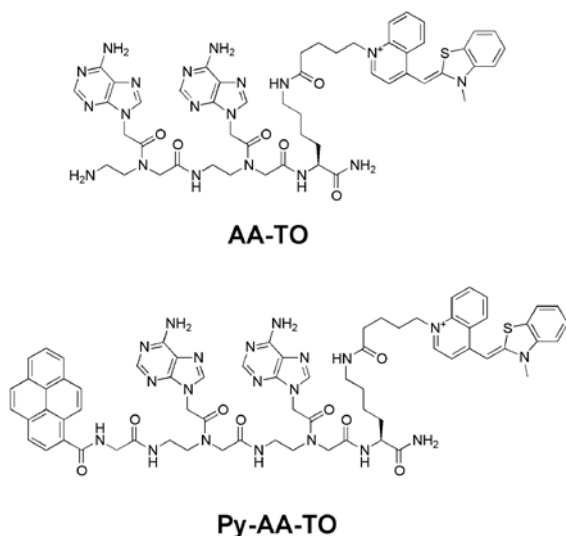
## 研究経過と考察

### (1) プローブ設計と結合機能の評価

siRNA は 20 塩基長程度の二重鎖 RNA で、3'末端に 2 塩基オーバーハング構造を有することが、他の小分子 RNA には見られない構造上の特徴である。本研究では、この 2 塩基オーバーハング構造に着目することで、可逆的かつ高選択的な siRNA 結合能を有する蛍光プローブを設計・合成した。

具体的には、オーバーハング 2 塩基の認識のためにペプチド核酸 (PNA) を用い、その PNA 骨格 C 末端側に蛍光色素チアゾールオレンジ (TO) を連結したもので、siRNA に対する light-up 型の蛍光プローブとして機能しうることが分かった (Figure 1: AA-TO)。しかし、ここでは PNA 骨格と TO とを連結するアルキル鎖長を制御することでプローブ機能の最適化を進めたが、その結合選択性は十分ではなく、細胞内解析へ適用することはできなかった。これは、TO 部位が RNA 二重鎖と非特異的に相互作用することに起因する。

以上の結果を踏まえて、プローブ機能の改良を検討した結果、PNA 骨格の N 末端側にピレンを連結することで、siRNA に対する結合選択性を飛躍的に改良できることを見出した (Figure 1: Py-AA-TO)。こ



**Fig. 1** Chemical structures of fluorescent probes developed in this study.

れは、ピレンと TO が分子内スタッキング構造をとるため、TO 部位の非特異的な相互作用が抑制されるため、加えて siRNA と結合する際には、ピレン部位が 3'末端の塩基対とスタッキングするキャッピング効果が協同的に働いた結果と考察している (誌上発表 1: *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 1421-1424.)。

### (2) siRNA デリバリー解析

**Py-AA-TO** を siRNA のアフィニティーラベル化剤 (非共有結合に基づくラベル化剤) として利用し、デリバリー解析を試みた。ここでは、siGL2 と **Py-AA-TO** を等量混合した緩衝溶液中にポリマーベースのキャリアを添加することで、**Py-AA-TO** と siRNA の錯体をキャリアに内包した。この複合体の溶液を HeLa (ヒト子宮頸がん) 細胞の培地へ添加し、3 時間後蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞質に **Py-AA-TO** の蛍光シグナルが輝点状に観測された。これはエンドサイトーシスで取り込まれた複合体がエンドソーム内にトラップされた状態であると考えられる。この小胞は時間が経つと酸性化が進み、やがてリソソームへ融合することが知られている。実際、本系においてもリソソーム染色剤との共染色実験から、プローブのシグナルの大部分がリソソームと重なっていることを確認した。また、プローブのシグナルは細胞質全体には見られず、複合体に由来する輝点状の蛍光シグナルのみが観測された。一方、蛍光色素 (Alexa647) を修飾した siRNA を用いて対照実験を行うと、Alexa のシグナルは細胞質全体に観測されたことから、siRNA の一部はこの時間スケールでは既に細胞内全体に放出されていることが分かった。これらの結果から、**Py-AA-TO** は siRNA/キャリア複合体、つまり、キャリアに内包されている siRNA を選択的に可視化していることが分かった。

この性質は、細胞内取り込みや放出を定量する際に極めて有用で、蛍光色素修飾した siRNA を利用する従来法では困難な解析が可能となる。例えば、汎用されるフローサイトメトリーを用いて、siRNA/キャリア複合体を取り込んだ細胞数を評価する場合、蛍光色素を修飾した場合では蛍光色素が複合体から放出された後も、siRNA の状態に関わらず光り続けているため、siRNA の細胞内取り込みは解析できるものの、その後の siRNA 放出過程を評価することはできない。一方、本プローブを用いて、細胞内取り込み量の経時変化 (~20 時間) を評価したところ、

プローブのシグナルが観測される細胞数が徐々に減少していくことが分かった。この結果は複合体が解消するにしたがって、プローブが siRNA から解離し、蛍光シグナルがオフになったためであると考えられる。実際、プローブのシグナル減少の半減期はおおよそ 1-2 時間と見積もられ、類似のキャリアで報告されている値<sup>8)</sup>に近い。従って、本プローブを用いれば、siRNA の細胞内取り込みだけでなく、その放出（あるいは複合体の解消）も簡便に解析することが可能である(誌上発表 2: *Anal. Sci.*, **2015**, *31*, 315-320.)。

また、デュアルルシフェラーゼアッセイにより、siRNA のサイレンシング活性を評価した結果、本プローブでアフィニティーラベル化した siGL2 を導入した時の活性は、siGL2 単体の活性と同程度であった。これは siRNA がキャリアから放出されるとプローブが速やかに解離するため、インタクトな siRNA が細胞内に輸送されたためと考えられ、本プローブによるラベル化は RNAi 活性に影響を与えないことが示唆された。

以上のように、本プローブを用いた解析では、本来の siRNA 活性を殆ど損なうことなく一連の細胞内デリバリー過程を可視化・評価することができる。共有結合を介した蛍光色素のラベル化に基づく従来のイメージング手法とは異なり、医薬として本来の構造と機能を維持した siRNA のデリバリー過程を可視化できる点に、本手法の本質的な価値がある。

### (3) プローブ機能の改良

上述したように、**Py-AA-TO** でラベル化した siRNA をキャリアに取り込ませることで、生細胞内へのデリバリー挙動を可視化することができる。しかし、解析可能な siRNA 導入濃度は 200 nM 程度とやや高く、オフターゲット効果などが起こりにくい、より低濃度の siRNA を解析できる必要がある。

本研究では、より低濃度の siRNA を可視化するために、プローブの結合力の改良を進めた結果、**Py-AA-TO** の PNA 骨格の C 末端に塩基性アミノ酸であるリシンを複数連結することで、標的 siRNA への結合選択性を維持したまま、結合力を大幅に改良できることを見出した。具体的には、リシンを 6 個連結したもので、その結合力 (解離定数  $K_d = 150$  nM) はリシンを持たない **Py-AA-TO** ( $K_d = 5,900$  nM) と比較して一桁向上した。

現在、プローブの結合力の改良をさらに進めると

ともに、長波長解析に対応できる蛍光プローブの開発を進めており、これらの改良型プローブを用いることで、より低濃度の siRNA 細胞内デリバリー解析や個体レベルでの生体 (in vivo) イメージング<sup>9)</sup>への適用が可能になると期待できる。

### 参考文献

1. A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **391**, 806-810, 1998.
2. P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals, *Cell*, **101**, 25-33, 2000.
3. S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, **411**, 494-498, 2001.
4. Y.-L. Chiu, A. Ali, C.-Y. Chu, H. Cao, T. M. Rana: Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells, *Chem. Biol.*, **11**, 1165-1175, 2004.
5. A. Järve, J. Müller, I.-H. Kim, K. Rohr, C. MacLean, G. Fricker, U. Massing, F. Eberle, A. Dalpke, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, M. Helm: Surveillance of siRNA integrity by FRET imaging, *Nucl. Acids Res.*, **35**, e124, 2007.
6. A. S. Wahba, F. Azizi, G. F. Deleavey, C. Brown, F. Robert, M. Carrier, A. Kalota, A. M. Gewirtz, J. Pelletier, R. H. E. Hudson, M. J. Damha: Phenylpyrrolocytosine as an unobtrusive base modification for monitoring activity and cellular trafficking of siRNA, *ACS Chem. Biol.*, **6**, 912-919, 2011.
7. Y. Kamiya, A. Ito, H. Ito, M. Urushihara, J. Takai, T. Fujii, X. Liang, H. Kashida, H. Asanuma: Selective labeling of mature RISC using siRNA carrying fluorophore-quencher pair, *Chem. Sci.*, **4**, 4016-4021, 2013.

8. C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, T. Stutzman, W. T. Young, R. Langer, D. G. Anderson: FRET-labeled siRNA probes for tracking assembly and disassembly of siRNA nanocomplexes, *ACS Nano*, **6**, 6133-6141, 2012.
9. H. Hong, Y. Zhang, W. Cai: In vivo imaging of RNA interference, *J. Nucl. Med.*, **51**, 169-172, 2010.
4. S. Nishizawa: Design and Synthesis of DNA- and RNA-binding Ligands for Gene Detection, 6<sup>th</sup> International Symposium on NanoBio Molecular Assembly, Department of Chemistry, Yonsei University, Seoul, Korea, January 2015.
5. 西澤精一：RNA 結合リガンドの合成と分析化学的応用、第 13 回化学系若手研究者セミナー、東北薬科大学、2014 年 9 月。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 西澤精一：核酸結合リガンドによる RNA 検出と細胞内イメージング、日本分析化学会第 64 年会、九州大学伊都キャンパス、2015 年 9 月。
2. 西澤精一：核酸結合リガンドによる DNA・RNA センシングと細胞内イメージング、第 86 回化学センサ研究会、仙台市情報・産業プラザ、2015 年 8 月。
3. 西澤精一：核酸結合リガンドによる DNA・RNA 検出と細胞内イメージング、第 13 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム、東北大学川内キャンパス、2015 年 6 月。

### 誌上発表

1. T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, S. Nishizawa, N. Teramae: Synthetic fluorescent probes capable of selective recognition of 3'-overhanging nucleotides for siRNA delivery imaging, *Chem. Commun.*, **51**, 1321-1424, 2015.
2. T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, N. Teramae, S. Nishizawa: Fluorescence Imaging of siRNA Delivery by Peptide Nucleic Acid-based Probe, *Anal. Sci.*, **51**, 315-320. 2015.