

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

東北大学 西澤 精一

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 干渉はその代表的な遺伝子発現調節機構で、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる 20 塩基長程度の 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。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、siRNA 結合性の低分子蛍光プローブを世界に先駆けて開発、これに基づく siRNA 細胞内デリバリーイメージング法を提案した。

siRNA は 3' 末端に 2 塩基オーバーハングを有しており、この点が他の小分子 RNA には見られない構造上の特徴である。演者らは、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) を連結したもので、さらに PNA 骨格の N 末端側にピレンを連結することで、siRNA に対する高選択的な light-up 型の蛍光プローブとして機能しうることを見出した (*Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 1421-1424.)。さらに、細胞内での siRNA 可視化機能を評価した結果、開発したプローブを用いることで、細胞へ導入したキャリア-siRNA 複合体を選択的に可視化し、その細胞内取り込み過程や細胞内局在・輸送、及び siRNA の放出挙動といった一連の細胞内デリバリー過程を可視化することに成功した (*Anal. Sci.*, **2015**, *31*, 315-320.)。

本プローブを用いた解析では、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ため、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。現在、三重鎖核酸形成 PNA (S. Nishizawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9397; *Chem. Eur. J.* **2017**, in press (DOI: 10.1002/chem.201604676)) を連結する等により、プローブの結合力・結合選択性の改良を進めるとともに、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、より高感度の siRNA 細胞内デリバリー解析や個体レベルでの生体 (in vivo) イメージングへの適用が可能になると期待できる。