プロダクト イノベーション

非酵素的に高効率シグナル増幅を可能とする新規RNA検出法を開発

*¹ 岐阜大学, *² 理化学研究所, *³ 北海道大学

柴田 綾 *¹, 鶴澤尊規 *², 伊藤嘉浩 *², 周東 智 *³, 阿部 洋 *³

RNAは細胞内で遺伝情報を伝達する重要な役割を果たしているが、最近では、non-coding RNA (ncRNA) の発見など、RNAが生体内でさまざまな機能を果たしていることが示唆されている。ncRNAなど細胞内RNAの機能解明を進めるためには、生細胞でRNAがいつ、どのように機能発現をしているかを知る必要がある。しかしながら、生細胞を用いてのRNAイメージングの報告はこれまでのところごく少数に限られ、確立した方法がないのが現状である。そのため、実用的なプローブの開発が望まれている。

生細胞内RNAの検出の際には、過剰量の試薬を洗浄・除去することができないことから、標的特異的な蛍光シグナルを発生させる必要がある。その方法として、標的核酸を鋳型とした化学反応プローブが複数のグループから報告されている⁽¹⁾。化学反応としては、native chemical ligation反応、求核置換 (S_N2) 反応、加水分解反応、Staudinger反応、DNAzyme、転移反応および金属触媒反応などが用いられている。これらの遺伝子検出法の利点は標的核酸を鋳型とした反応サイクルを回すことで、シグナルを増幅することができる点にある。2006年、Seitzらは蛍光分子の転移反応を利用した化学反応プローブを用いた場合、鋳型となる標的遺伝子が24時間で402回転することを報告した⁽²⁾。この結果は、ほかに光などの外部刺激を必要としない遺伝子検出プローブとしては2012年の段階で最高値であった。しかし、このプローブを用いても検出できる遺伝子量は10pMであり、細胞内の1分子の遺伝子(約1pMに相当)を検出するには不十分である。そのため、化学反応プローブのさらなる検出感度の改善が必要であった。

化学反応プローブのシグナル増幅サイクルは(1) プローブの標的配列への結合；(2) 標的遺伝子上での化学反応；(3) 標的遺伝子からのプローブの解離の3つの段階からなっている(図1A)。各段階の速度を調べると、

これまでに報告されている化学反応プローブでは(2)の化学反応速度がほかの段階に比べ格段に遅いことがわかった。このことから化学反応段階がシグナル増幅の律速であることが示された。そこで、われわれはこの化学反応速度を改善できれば、プローブのシグナル増幅効率を改善できるのではと考え研究に取り組んできた。

本稿ではわれわれが開発した芳香族求核置換反応を利用した高いシグナル増幅能をもつ遺伝子検出プローブについて紹介する⁽³⁾。

芳香族求核置換反応を利用した検出プローブの開発

新たなプローブに利用する化学反応として芳香族求核置換反応 (S_NAr 反応) に着目した。 S_NAr 反応は電子の豊富な反応基(求核基)が芳香環の電子不足(求電子的な)部位を求核攻撃することで起こる。この S_NAr 反応による蛍光シグナルの off/on 制御の機構を用いた遺伝子検出プローブを設計した(図1B)。設計したプローブは S_NAr 反応を引き金として蛍光を発するクマリン誘導体を結合したDNAプローブと、求核剤を結合したDNAプローブの2本1組のプローブで構成されている。これらが標的核酸に隣り合って結合し、 S_NAr 反応を起こすことで蛍光が発生し、標的遺伝子を認識できるシステムとなっている。アミノクマリン誘導体は、2位置換4-ニトロベンゼンスルホン基でアミノ基が保護されることで蛍光が消光している。もう一方のプローブの求核基よりこの保護基のイプソ炭素への求核攻撃が起こると、マイゼンハイマー錯体を經由して2位置換4-ニトロベンゼン部位がアミノクマリンより脱離し、蛍光シグナルが発生する。

一般的に、 S_NAr 反応の反応速度は求核剤の求核性と芳香環に結合した置換基の電子吸引性によりコントロールされている。そのため、われわれは求核剤と保護基の

図1 ■ (A) 化学反応プローブによるシグナル増幅サイクル, (B) S_NAr反応を利用した蛍光発生メカニズム

図2 ■ (A) 実験に用いたプローブの構造, (B) 各プローブ組み合わせによる遺伝子検出

電子吸引性の2点について検討を行った (図2). 求核剤としてはホスホロチオエート基 (PSプローブ) とチオフェノール基 (MBAプローブ) の2種類を用いることにした. これらはいずれもチオール基のpK_aが6以下であることから, 中性条件下で安定なチオアニオン (S⁻) を形成することが期待できた. 一方, 蛍光剤の保護基と

しては2位置換基の求電子が異なる2,4-ジニトロベンゼンスルホニル (DNs) 基と2-シアノ-4-ジニトロベンゼンスルホニル (CNs) 基の2つを用いた (図2A). これら4通りの組み合わせで, 標的遺伝子の有無が検出できるかどうかを検討した (図2B). その結果, 求核剤にチオフェノール基を用いた場合, 標的配列存在下, 約30秒

図3 ■ 微量遺伝子の検出および反応回転数

図4 ■ シグナル増幅サイクルにおける各段階の速度

で反応が完結していることが確認できた。一方で、ホスホロチオエート基を求核基に用いた場合、反応の進行は非常に遅く、30分後でも蛍光分子の生成は1%未満にとどまった。このとき、蛍光分子の保護基はDNs基でもCNs基でも反応速度に大きな違いは見られなかった。しかしながら、標的配列が存在しない場合、チオフェノール基とDNs基の組み合わせの場合、30秒後に蛍光分子が1.5%生成していることが確認された。この標的配列非存在下でのバックグラウンド蛍光の発生は、微量の遺伝子を検出する場合、感度低下を招く原因となる。そのため、DNs基を保護基として用いるのは不適切であることがわかった。それに対しCNs基を保護基として用いた場合は、そのようなバックグラウンド蛍光の発生は見られなかった。以上のことから、プローブとしては、求核剤にチオフェノール基、蛍光分子の保護基にCNs基を用いる組み合わせが一番良いことがわかった。

次にこのプローブの検出限界を検討することにした。実験はプローブ濃度を50nMに固定し、標的遺伝子量を5nMから0.5pMの濃度範囲で行った。反応の進行はアミノクマリンの蛍光を測定することで計測し、15時間

後の蛍光強度からアミノクマリンの生成収率を計算した(図3)。この結果、0.5pMの標的遺伝子存在下で、標的遺伝子非存在下の値よりも有意な値を示したことから、S_NAr反応を利用した検出プローブは細胞内の1分子の遺伝子を検出できる可能性が示された。またこのとき、鋳型となった標的遺伝子は約1,500回転したことが示された。この回転数は光などの外部刺激を必要としない遺伝子検出プローブとしてわれわれが知る範囲において最高値である。

化学反応プローブの律速段階の検討

われわれはS_NAr反応を利用することで、化学反応プローブのシグナル増幅能を大幅に改善することに成功した。この回転数の増加が当初の予測どおり化学反応速度の改善によるものかを確認するために、増幅サイクルの各段階の速度を検討することにした(図4)。増幅サイクルを図4に示すように各段階に分け、各速度を計測することにした。プローブと標的配列との会合速度(k_{on})は260nmのUV変化をストップフロー法で測定する

図5 ■ シグナル増幅サイクルのシミュレーション

図6 ■ RETFプローブと細胞内イメージング図

ことで行った。解離速度 (k_{off}) は vant's Hoffプロットより結合定数 (K) を求めた後に、会合速度を結合定数で割ること求めた。 S_NAr 反応の反応速度 (k_r^+) は図3の蛍光の経時変化のデータをもとにフィッティングを行うことで求めた。これらの測定結果から、プローブの解離速度がそれぞれ 2.2×10^{-2} と $18.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ であったのに対し、化学反応速度は $8.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ になり、非常に近い値であることがわかった。以上の結果から、われわれの予想どおり、化学反応速度をプローブの解離速度に近づけることでシグナル増幅の反応回転数を改善でき

ることが示された。

最後に、増幅サイクルの各段階を変化させることで、反応回転数にどのような影響が出るかをシミュレーションしてみた (図5)。結果、会合速度と解離速度を固定した場合、反応速度を上げることで、検出限界濃度が向上することが示された (図5A)。また、反応速度を上げる場合、合わせて解離速度を増すことが効果的であることがわかった。図5B, C, Dはそれぞれ会合速度が1桁ずつ異なるのだが、これらの結果から会合速度を改善することで、さらに大幅な反応回転数の改善が期待できるこ

とが示された。しかし、残念なことにプローブの長さや配列組成は解離速度に影響を及ぼすが、会合速度には影響しない。また、現在報告されている核酸の化学修飾（たとえばLNAやペプチド核酸など）を用いても、会合速度は影響を受けないことが報告されている⁽⁴⁾。逆を言えば今後、会合速度を改善できる手法が開発できれば化学反応プローブのさらなる高感度化が可能になると考えられる。

一方で、われわれはこれまでに生きた細胞内の遺伝子を検出するために、Staudinger反応を引き金としたRETF (reduction triggered fluorescence) プローブの開発を行ってきた⁽⁵⁻⁷⁾ (図6)。RETFプローブは蛍光分子のアジド誘導体もしくは、還元剤であるトリフェニルホスフィンと結合したDNAの2本1組のプローブで構成されている。蛍光分子のアジド誘導体は、還元剤であるホスフィンと反応することにより、アジドがアミンに還元され、蛍光を発生する。RETFプローブを用いてわれわれは、比較的発現量の多いRNA (28S rRNA, β -actin mRNA) について生きた細胞内 (ヒト白血病細胞HL-60) でのイメージングに成功している⁽⁶⁾。このRETFプローブの反応回転数は4時間で約54回転であった⁽⁶⁾。

今回われわれは S_NAr 反応を利用することでプローブの反応回転数を大幅に改善することに成功した。生細胞内の遺伝子を検出するためにはクマリン (450nm) よりも長波長領域 (520nm以上) の蛍光分子を用いる必要があるため、さらなるプローブの改良が必要ではあるが、 S_NAr 反応を用いたプローブを用いることでさらに発現量の少ないRNA種の検出が可能になると考えている。

まとめ

われわれは、 S_NAr 反応による蛍光シグナルのoff/on制御の機構を用いた遺伝子検出プローブを開発した。本プローブは従来法と比較して非常に高いシグナル増幅能をもち、微量の遺伝子を検出できることが特徴として挙げられる。これは、増幅サイクルにおける化学反応の段階の速度を改善することで達成できた。加えて、増幅サイクルの各段階を詳細に検討した報告はこれまでになく、本研究で得られた知見は化学反応プローブを開発するうえで重要な指針となる。今後さらに研究を重ねるこ

とで、われわれが開発したプローブを含む化学反応プローブによる遺伝子検出法は、RNAの抽出操作やPCRによる増幅操作を必要としない次世代の細胞内遺伝子発現検出法として、あるいは生細胞内RNAイメージング技術としての応用が期待できる。

文献

- 1) A. Shibata, H. Abe & Y. Ito: *Molecules*, **17**, 2446 (2012).
- 2) T. N. Grossmann & O. Seitz: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15596 (2006).
- 3) A. Shibata, T. Uzawa, Y. Nakashima, M. Ito, Y. Nakano, S. Shuto, Y. Ito & H. Abe: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14172 (2013).
- 4) U. Christensen, N. Jacobsen, V. K. Rajwanshi, J. Wengel & T. Koch: *Biochem. J.*, **354**, 481 (2001).
- 5) H. Abe, J. Wang, K. Furukawa, K. Oki, M. Uda, S. Tsuneda & Y. Ito: *Bioconjug. Chem.*, **19**, 1219 (2008).
- 6) K. Furukawa, H. Abe, K. Hibino, Y. Sako, S. Tsuneda & Y. Ito: *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1026 (2009).
- 7) K. Furukawa, H. Abe, Y. Tamura, R. Yoshimoto, M. Yoshida, S. Tsuneda & Y. Ito: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **50**, 12020 (2011).

プロフィール

柴田 綾 (Aya SHIBATA)

<略歴>2002年岐阜大学工学部生命工学科卒業/2007年同大学工学研究科物質工学専攻博士課程後期課程修了/同年理化学研究所協力研究員/2010年同研究所基礎科学特別研究員/2013年より岐阜大学テニュアトラック助教<研究テーマと抱負>有機化学を基礎とした核酸化学研究、特に細胞内での核酸の挙動に興味をもっている<趣味>寺巡り

鵜澤 尊規 (Takanori UZAWA)

<略歴>2006年京都大学大学院工学研究科分子工学専攻卒業/日本学術振興会特別研究員 (PD/SPD)、理化学研究所基礎科学特別研究員を経て、同研究所定年制研究員<研究テーマと抱負>生体高分子と高機能な人工化合物との融合による新規酵素の開発<趣味>10カ月の息子の行動観察

伊藤 嘉浩 (Yoshihiro ITO)

<略歴>1981年京都大学工学部高分子化学科卒業/京都大学助手、助教授などを経て2004年から理化学研究所伊藤ナノ医工学研究室主任研究員<研究テーマと抱負>診断・治療システムのための分子デバイスの開発<趣味>散策

周 東 智 (Satoshi SHUTO)

＜略歴＞1980年北海道大学薬学部製薬化学学科卒業／1982年同大学大学院薬学研究科修士課程修了／同年東洋醸造(株)医薬品研究所研究員／1992年旭化成工業(株)ライフサイエンス総合研究所研究員／同年北海道大学薬学部助教授／2005年同大学大学院薬学研究院教授＜研究テーマと抱負＞創薬化学＜趣味＞うまい肴と酒，山歩き

阿 部 洋 (Hiroshi ABE)

＜略歴＞1991年北海道大学薬学部製薬化学学科卒業／2001年同大学大学院薬学研究科博士後期課程創薬化学専攻修了／同年マサチューセッツ工科大学博士研究員／2002年スタンフォード大学博士研究員／2005年理化学研究所研究員，2013年より北海道大学大学院薬学研究院准教授＜研究テーマと抱負＞核酸のケミカルバイオロジー研究＜趣味＞コンピューター計算，水泳

Copyright © 2014 公益社団法人日本農芸化学会