

令和 5 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究助成金	<input type="checkbox"/>
研究課題名	ピレン修飾ペプチド核酸プローブ対による生細胞内標的 RNA の蛍光検出	
研究者所属・氏名	研究代表者：理工学部応用化学科 北松 瑞生 共同研究者：該当無し	

1. 研究目的・内容

本研究の目的は、1 対のペプチド核酸プローブのおののにおに蛍光成分を修飾させ、標的の核酸と対合したときにその蛍光成分が発光する仕組みを構築することである。この仕組みができれば、標的核酸の蛍光検出が可能となり、病気の診断に役立てることができる。

2. 研究経過及び成果

DNA や RNA などの核酸は、様々な疾患マーカーとして使用されている。そのため、標的核酸を検出する方法の開発は、疾患の診断と治療にとって重要である。特に生きた細胞内の標核酸を検出できれば、より正確な疾患の診断と治療につながる。蛍光核酸プローブは、これを実現するための選択肢の 1 つである。配列特異的な設計に基づきこのようなプローブは蛍光シグナルの変化によって特定の核酸を検出できる。我々は、蛍光色素ピレン (Pyr) を修飾した 2 つのペプチド核酸 (PNA) をプローブとして、核酸の蛍光検出法を開発している。この方法では、2 つの PNA のそれぞれが DNA と対合し、Pyr を局所的に集合させる。その結果、Pyr はエキシマー蛍光シグナルを発する。現在この研究を進めているが、十分な研究成果は今のところ得られていない一方で、同じ原理に基づく下記のプローブで研究成果が得られたので報告する。

我々は、蛍光ホウ素センサー Pyp に着目した。Pyp は、リガンドであるフェニルボレート部位 (Boa) と安定な錯体を形成し、480 nm で蛍光発光する。すなわち、これらがコンプレックス化していない状態では蛍光を示さず (OFF)、コンプレックス化すると蛍光を示す (ON) ため、この蛍光成分はプローブとして適している (図 1 左側)。今回我々は、この PNA を Boa または Pyp で修飾したツインプローブを開発した。本研究で使用した PNA ツインプローブおよび DNA 配列の化学構造と配列を示す (図 1 右側)。これらのペプチドは、固相合成法によって調製した。各 PNA プローブに結合した Arg テイルは、これらのプローブの水溶性を向上させることに加えて、生細胞への送達ツール (細胞透過性ペプチド: CPP) として機能することが期待できる。各 PNA プローブは DNA D1 と部分的に相補的な配列を持ち、DNA とハンチパラレル配向で対合したプローブは Boa と Pyp が互いに向き合うように設計されている (図 1 の中央)。D11 は、D1 のスクランブル配列である。

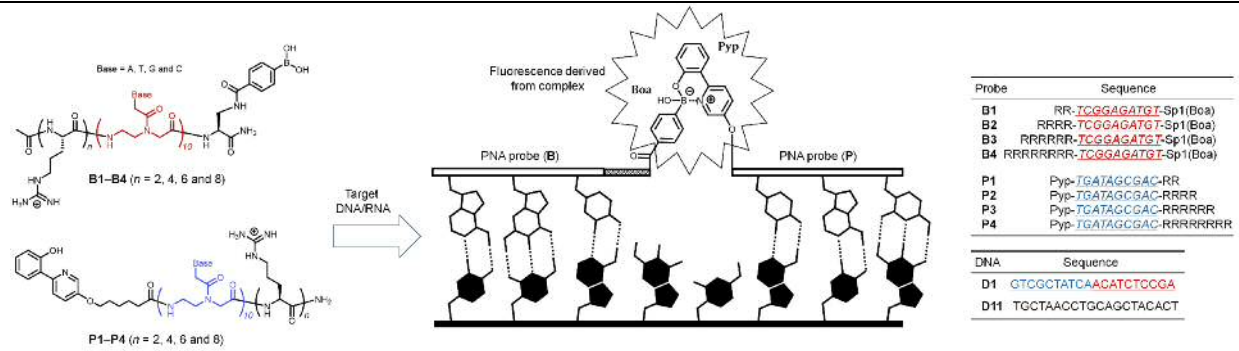


図 1. (左) PNA ツインプローブの化学構造。(中央) PNA ツインプローブによる標的核酸の蛍光検出の模式図。(右) PNA ツインプローブと DNA の配列。色付きのイタリック体は PNA の塩基配列を示す。Sp1 はジアミノプロピオン酸骨格であることを示す。

まず、PNA ツインプローブ (B1/P1) の蛍光スペクトルを、水溶液中の DNA の存在下と非存在下で測定した (図 2A)。2 つの Arg テイルを修飾した PNA ツインプローブのみ (黒線) またはプローブと D11 の 1:1:1 混合物 (青線) では蛍光は観察されなかった。一方、Boa と Pyp の複合体に由来する 480 nm 付近の蛍光が、プローブと D1 の 1:1:1 混合物 (赤線) で観察された。これらの結果は、PNA ツインプローブが DNA と配列特異的ハイブリッドを形成し、Boa と Pyp が DNA 上でこれらの隣接プローブ間でコンプレックスを形成し、それに由来する蛍光を発することを示唆している。次に、異なる長さの Arg テイル (図 2B-2D) を持つ PNA ツインプローブの蛍光スペクトルも測定した。これらの測定は、Arg テイルがプローブの DNA への非特異的吸着に与える影響を調べるために実施した。4 つの Arg テイルを持つ B2/P2 では、D1 との混合水溶液 (図 2B の赤線) は B1/P1 よりも高い蛍光を示した。しかし、D11 との混合物でも弱い蛍光が観察された (青線)。さらに、DNA が無い場合でもわずかな蛍光が観察された (黒線)。6 つの Arg テイルを持つ B3/P3 (図 2C) でも、D1 (赤線)、D11 (青線)、DNA なし (黒線) の混合物の順に蛍光強度が増加したが、これらの蛍光強度の差はわずかだった。8 つの Arg テイルを持つ B4/P4 (図 2D) では、DNA の有無にかかわらず、同じレベルの弱い蛍光が観察された。これらの結果は、PNA を修飾する Arg テイルの数が、標的 DNA を検出するための蛍光応答に影響を与えたことを示している。図 4E に、各混合物の 480 nm での蛍光強度に対する Arg テイルの影響をまとめる。D1 と PNA ツインプローブでは、Arg テイルが長くなると (2 から 4)、強度が増加するが、さらに長くなると (4 から 8)、強度は減少した。結果として、B2/P2 は最大の蛍光強度を示した。これは、より長い Arg テイルが DNA との静電的および非特異的相互作用を引き起こし、PNA ツインプローブと DNA との配列特異的対合を阻害することを示唆している。一方、Arg テイルは DNA との静電引力を通じてプローブ DNA へのアクセスをサポートしているように見えることは注目値する。D11 の PNA ツインプローブでは、B1/P1 で蛍光は観察されないが、B2/P2 ~ B4/P4 では同レベルの弱い蛍光が観察された。これは、これらの実験条件下では、Boa と Pyp が偶然に接近し、PNA プローブの 4 つ以上の Arg テイルの正電荷と DNA の負電荷との間の非特異的静電相互作用によりコンプレックスを形成することを意味する。PNA ツインプローブの蛍光強度は、Arg テイルの数に比例して増加した。これは、プローブ内の PNA と Arg テイルの親水性と疎水性のバランスを介して非特異的会合が起こり、Boa と Pyp のコンプレックスが偶然形成されることを示している。これらの結果は、PNA を修飾する Arg テイルが PNA と DNA の特異的対合を促進するトリガーとして機能することを示し、Arg テイルが増えると、対合よりも DNA との非特異的凝集が促進されることを示している。これらの結果はまた、プローブ自体が両親媒性バランスにより弱く非特異的に凝集することを示している。しかし、Arg テイルが少ない場合、PNA と DNA の配列特異的対合がこれらの非特異的凝集よりも優先される。PNA ツインプローブの生細胞への送達と細胞内の核酸の検出を考慮して、細胞内運搬の実験では 4 つの Arg テイルを備えた B2/P2 を使用した。

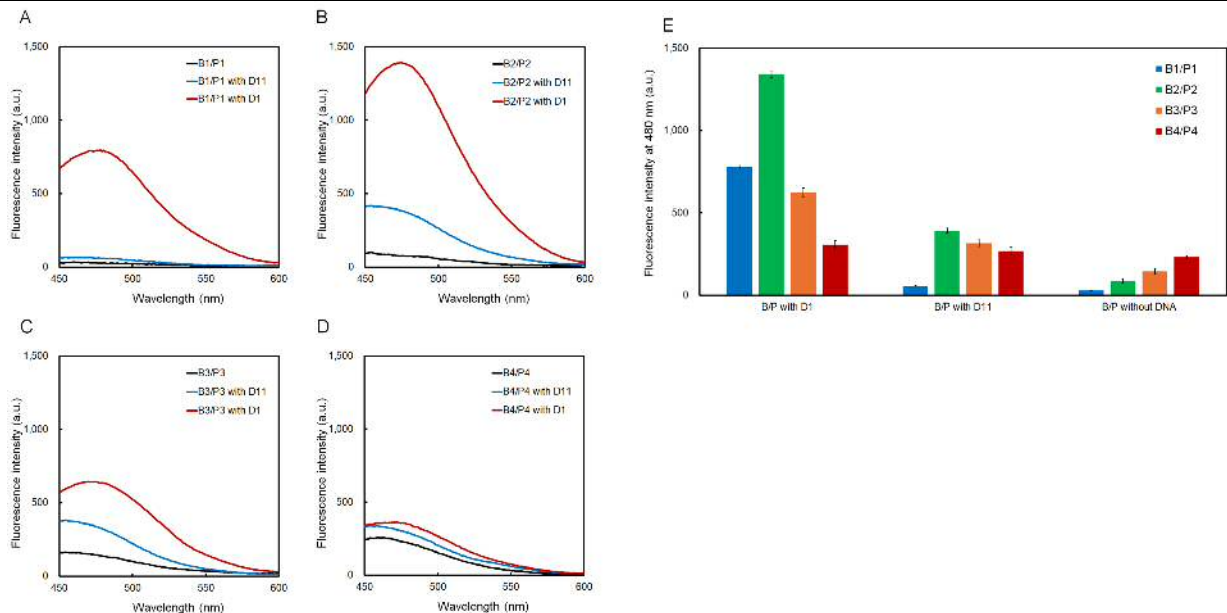


図 2. 末端にそれぞれ 2、4、6、8 個の Arg テイルを持つ(A) B1/P1、(B) B2/P2、(C) B3/P3、(D) B4/P4 の DNA に対する蛍光スペクトル。B、P、DNA は 1:1:1 の比率で混合した。(E) DNA 無し、および D11 または D1 ありの PNA ツインプローブの 480 nm における蛍光強度のまとめ。

次に、B2/P2 による細胞内標的 RNA の蛍光検出を評価した。ここでは、標的 RNA として、エクソン 19 を欠き、肺腺癌細胞株 PC9 で発現しているエクソン 19 欠失変異 (5'-GUCGCUAUCAAAACAUCUCCGA-3') を有する EGFR を選択した。対照として、変異していないエクソン 19 を発現している A549 細胞 (5'-GUCGCUAUC AAGGAAUUAAGAGAAGCAACAUCUCCGA-3') も同様に評価した。図 5A は、Cell Tracker を使用して、B2/P2 (各 2 μ M) の有無で 20 時間培養した細胞の共焦点レーザー顕微鏡で得られた蛍光画像を示している。B2 または P2 のいずれでも処理していない PC9 では、プローブからの蛍光は観察されなかった (図 5A の a~c)。しかし、B2 と P2 の両方で処理した PC9 (図 5A の d) では、細胞内でプローブ由来の蛍光が明確に観察された。一方、A549 細胞では、B2/P2 の有無に関わらず、プローブ由来の蛍光はほとんど観察されなかった (図 5A の e~h)。これらの観察結果は、4 つの Arg テイルからなる CPP でも PNA プローブを細胞内にうまく送達し、その後、細胞内でも B2/P2 が標的 RNA と対合し、プローブ内の Pyp と Boa が特異的な複合体を形成することを示している。また、ツインプローブと対合すると予測されるエクソン 19 の存在は、それらの蛍光にほとんど影響を与えないことも示している。これらの観察結果を、複合体由来の蛍光強度を定量化して図 5B にまとめた。これらの結果から、B2/P2 は標的エクソン 19del を含む EGFR を発現する PC9 細胞でのみ明瞭な蛍光(9.4)を示すことがわかる。変異していないエクソン 19 を含む A549 細胞もわずかな蛍光発光(1.8)を示すが、これは PNA ツインプローブの非特異的な結合によるものと考えられる。これらの実験条件下では、B2/P2 はエクソン 19 del に対して他の組み合わせよりも少なくとも 5 倍強い蛍光を示している。これらの結果は、PNA ツインプローブが標的エクソン 19 del を含む EGFR を細胞内の変異していないエクソン 19 やその他の RNA と区別することを示している。

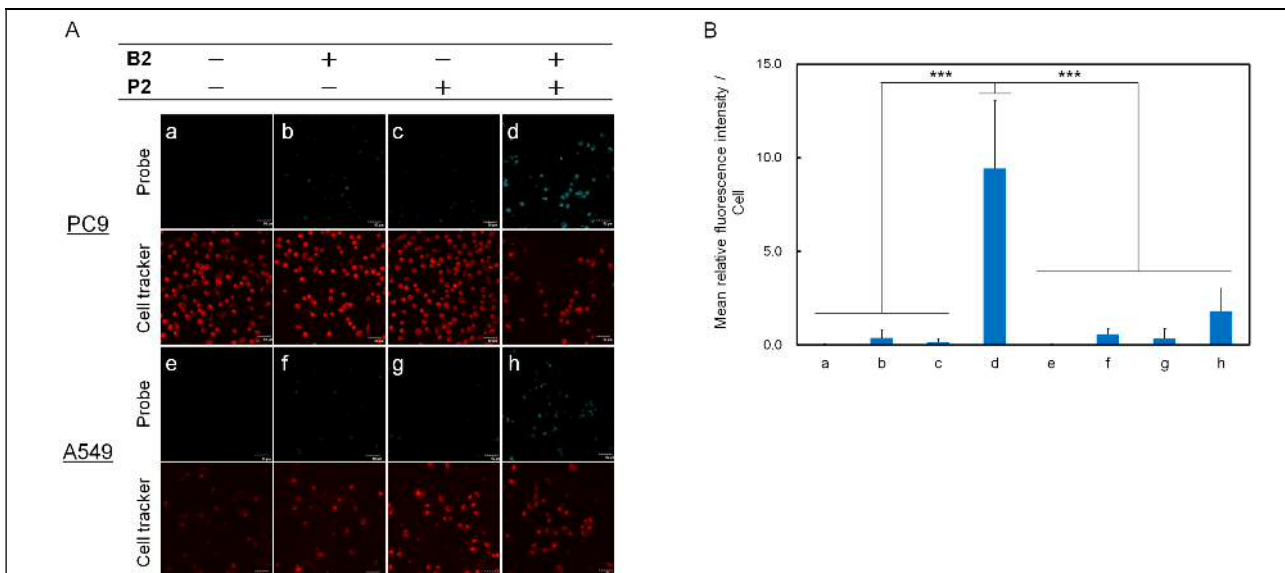


図 5. PC9 または A549 細胞を用いた生細胞イメージングの蛍光画像 (A) と、蛍光画像から複合体由来の蛍光発光を定量化したグラフ (B)。

本研究では、ホウ酸部位とそのリガンドを蛍光成分として含む新しい PNA ツインプローブを開発した。このプローブは、生細胞内の標的 RNA の検出にも成功した。4 つの Arg テイルはプローブを細胞内に送達できたが、その導入効率は、より長い Arg テイルの場合よりも低いことが予想される。今後は、より長い Arg テイルでも DNA とプローブの非特異的な会合を防ぐ方法を開発する必要がある。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究は、PNA を介した核酸上への蛍光成分の集合による発光に基づいた核酸検出法である。上記の研究成果は、480 nm での発光による核酸検出であるが、蛍光成分を変更することでより長波長 (短波長) の発光を生じさせることができる。このことから蛍光発光波長によって複数の標的核酸を同時に検出することも可能である。我々は左記について今後検討したいと考えている。ピレン間の色相変化による蛍光発光についても引き続き検討したい。昨年度は、十分な成果は得られなかったが、例えば、蛍光成分間で架橋するような仕組みを創り出せば、より強い蛍光発光が得られると考えられる。我々は左記についても今後検討したいと考えている。それと本研究はさらに細胞内での核酸の蛍光検出という点でさらに開発を進めるべきであると考えている。細胞内での検出が可能であれば、その時々々の細胞内の性状をリアルタイムで蛍光により追跡することが可能であり、そのことはより細胞が関係した病気の理解につながるからである。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
日本ケミカルバイオロジー学会第 17 回年会	ポスター発表 (2 件)	2023/5/29-31
The 6th Asian Chemical Biology Conference (ACBC2023)	ポスター発表 (2 件)	2023/8/20-23
第 60 回ペプチド討論会	口頭発表 (1 件)、ポスター発表 (1 件)	2023/11/8-10
Chemistry Letters	学術論文	2024 年 6 月投稿予定
Bioorganic and Medicinal Chemistry	学術論文	2024 年 9 月投稿予定