

SNA 型抗アンチセンス核酸の細胞内作用機構解明に向けた FRET 検出システムの開発

○朱紅宇¹・神谷由紀子¹・浅沼浩之¹ (1名大院工)

The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹.) Hongyu Zhu¹, Yukiko Kamiya¹, Hiroyuki Asanuma¹

MicroRNA (miRNA) は遺伝子発現を抑制する Non-coding RNA の一種である。miRNA は miRISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるリボヌクレオプロテインを形成して初めて遺伝子発現抑制能を獲得する。近年、miRNA の発現異常ががんをはじめとした様々な疾患の要因の 1 つであることが示されている。miRNA の機能を特異的に抑制する抗 miRNA アンチセンス核酸(AMO)は新たな核酸医薬として期待されている。当研究室では、非環状人工核酸 Serinol nucleic acid (SNA) と修飾塩基を組み合わせ、高酵素耐性・高活性な anti-miR21 核酸(SNA-AMO)を開発することに成功している^[1]。しがしながら、開発した SNA-AMO による miRNA 阻害機構の詳細は明らかになっていない。特に、AMO は miRISC と結合して、miRNA の機能を阻害することが一般的に考えるが、これまでに、AMO は miRISC と結合している様子を、直接的に観察した例は、報告されていない。そこで、本研究では、開発した SNA-AMO の miRNA 阻害機構の解明を目指し、miRNA が発現するまでの過程で、SNA-AMO がどの段階で阻害効果を発揮しているか明らかにする。

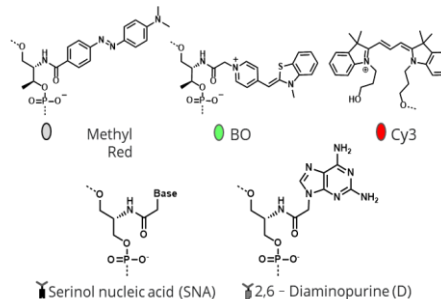


Fig1. Chemical structure of fluorophores, SNA and 2,6-

そのため、蛍光共鳴エネルギー移動 FRET 技術を用いて、細胞内における SNA-AMO と miRISC の相互作用解析を試みた(図 1、2)。具体的には、細胞内で miRISC を選択的に可視化するため、標的 miRNA の前駆体 miRNA/miRNA* に蛍光基-消光剤ペアである BO とメチルレッド(MR)を、活性を妨げない特定の部位に導入した。また鎖選択性を制御することで、miRNA 特異的な miRISC 形成も可能にした。そこに Cy3 を導入した SNA-AMO を作用させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を検出することにより、生細胞内における miRNA と AMO の相互作用の観察に成功した。さらに、これらの蛍光シグナルと miRISC タンパク質である AGO2 を同時に可視化したところ、SNA-AMO と miRISC が細胞内共局在している様子が観察された。このことから、AMO は miRISC に作用するものと考えられた。

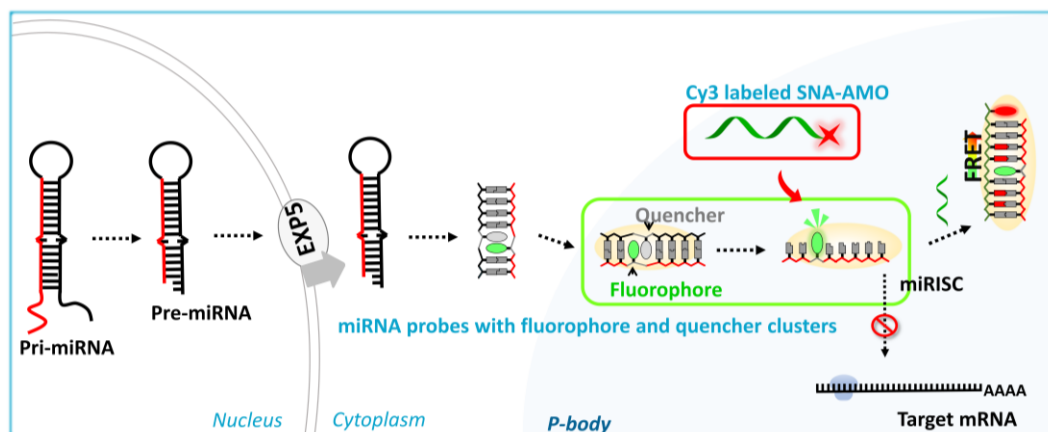


Fig2. Schematic illustration of SNA-AMO mechanism of action

[1] Kamiya, et al., *ChemBioChem*, 2017, 18, 1917-1922.