

## RNA 解析・生細胞イメージングのための深赤色蛍光色素

西澤 精一, 佐藤 雄介

## 1 はじめに

Tsien らが開発したカルシウム蛍光プローブ<sup>1)</sup>に端を発した生体分子イメージングは、生体の時空間情報が得られる技術として必要不可欠な分析技術となっている。緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) を用いた蛍光プローブの開発が代表的なアプローチで、細胞内シグナル伝達因子や細胞内タンパク質相互作用などの可視化が報告されている。

RNA を標的とする場合、標的塩基配列との相補的塩基対形成 (ハイブリダイゼーション) を利用する核酸プローブ (オリゴヌクレオチド) は、最も基盤となる技術であり、イメージングはもとより、PCR 法や DNA チップなど、近年の生命科学研究の飛躍的な進展を支える分析技術のベースとなっている。なかでも Tyagi らにより提案されたモレキュラービーコン (MB: molecular beacon)<sup>2)</sup>は、標的核酸への高い結合選択性と効果的な蛍光シグナル変化を実現した核酸プローブとして、その有用性が広く認められている。これまでに MB を用いて、mRNA や microRNA など様々な種類の RNA の細胞内イメージングが報告されている<sup>3)~5)</sup>。Seitz らによって提案された FIT (forced intercalation of thiazole orange) プローブ<sup>6)</sup>も極めて有用で、生細胞内 mRNA イメージング<sup>7)</sup>や microRNA 局在性解析<sup>8)</sup>が報告されている。FIT プローブでは、シアニン色素 (チアゾールオレンジ: TO, 図 2) を核酸塩基の代わりとして導入することで、すなわちシアニン色素を擬塩基として活用することで、標的 RNA 配列に対する高い検出機能 (off-on 型の蛍光応答) を実現している。また、著者らの研究グループでは、二重鎖 RNA 検出・イメージングに特化した蛍光性ペプチド核酸 (PNA) プローブの開発を進めており、これまでに生細胞内 siRNA デリバリーイメージング法<sup>9)~11)</sup>や三重鎖核酸形成プローブ (tFIT: triplex-forming FIT)<sup>12)~17)</sup>を提案している。なお、核酸プローブ (オリゴヌクレオチド) は生体膜透過性がないため、トランスフェクションにより生細胞内に導入する。

一方、RNA イメージング (染色) に適用しうる蛍光性小分子 (色素) の開発は試行錯誤的な状況にある<sup>18)~21)</sup>。これは、一般に既存の核酸結合低分子化合物が DNA 選択性を示すため、「RNA に対して明確な結

合選択性と十分な結合力を発現させる分子設計指針は未だ確立していない」と言って過言ではない。実際、市販されている RNA 染色色素はわずか 3 種類 (SYTO RNA select, Nucleolus Bright Red 及び Nucleolus Bright Green: 化学構造は非公開) であり、いずれも生細胞イメージングに適用することができない。DNA 染色に汎用される蛍光色素 DAPI やヘキスト 33342 のように、生体膜透過性をもち細胞培養液に加えるだけで細胞を染色できる蛍光性小分子色素の有用性は明らかであり、これらに準じた RNA 染色色素を開発することができれば、RNA 関連研究において極めて有用な解析プローブになると期待できる。さらには、細胞の自家蛍光や他プローブとの共染色の観点から、できるだけ長波長領域の蛍光色素が望ましく、長時間観測に対応するためには、低い細胞毒性と高い光耐性が必要となる。

本稿では、生細胞 RNA イメージング色素の開発例をいくつかピックアップするとともに、著者らが開発した深赤色蛍光 RNA イメージング色素<sup>22)</sup>を紹介する。合わせて、著者らが見いだした FID (Fluorescent indicator displacement) 法における深赤色蛍光インジケータ<sup>23)24)</sup>も紹介させていただきたい。

## 2 細胞内 RNA イメージング色素の開発例

市販されている RNA 染色色素 SYTO RNA select は、プローブ単体ではほぼ無蛍光であり、RNA との結合に伴い優れた off-on 型の蛍光応答を示す ( $I/I_0=100$ -fold 以上,  $\lambda_{em} \sim 530$  nm)。しかし、生細胞に適用できないことや光安定性が極めて悪いなど、染色色素としての有用性は限定的である。また、2018 年に、(株)同仁化学研究所から市販された Nucleolus Bright Red ( $\lambda_{em}=605$  nm) 及び Nucleolus Bright Green ( $\lambda_{em}=538$  nm) は、優れた off-on 型の蛍光応答と核小体染色機能 (細胞質内の RNA も染色) を示すものの、生細胞に適用できない。

一方、生細胞 RNA イメージング色素に関する先駆的な研究は、Chang らにより報告されている<sup>18)</sup>。彼らは 1336 種類からなるスチリル色素誘導体ライブラリーに対してスクリーニングを実施し、3 種類の色素 (図 1: E36, E144, F22) を選抜した。これらの色素の RNA 選択性は *in vitro* においては乏しいものの、細胞質内及び核内の RNA (核小体) を選択的に染色できる。三つの

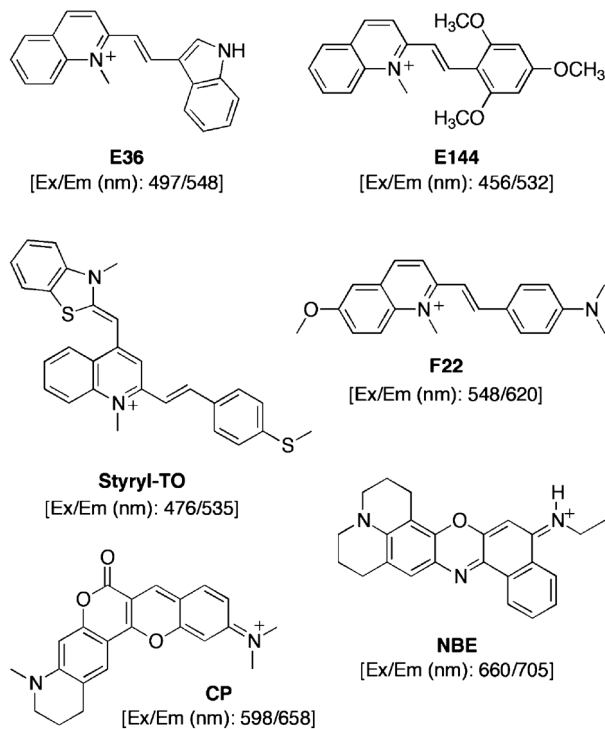


図1 既存の生細胞 RNA 染色蛍光色素

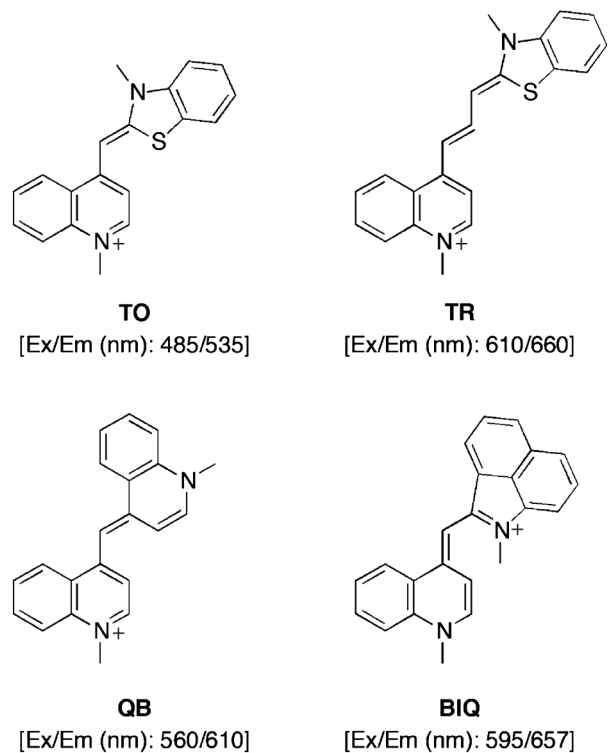


図2 シアニン色素の長波長化例と著者らが開発した新規色素 BIQ

色素はいずれも、6-メトキシキノナルジン (6-methoxy quinaldine) 環を有していることから、細胞内 RNA 選択性の発現に必要な構造である可能性を指摘している。また、*p*-メチルチオスチリル (*p*-(methylthio)styryl) 基とシアニン色素 (TO) とを組み合わせた Styryl-TO (図1) が、生細胞イメージング色素として報告されている<sup>19)</sup>。Styryl-TO は、*in vitro* において明瞭な RNA 選択性と off-on 型の蛍光応答 ( $I/I_0=152$ -fold,  $\lambda_{em}=535$  nm) を示し、核小体を選択的に染色できる。

生細胞 RNA イメージングに適用できる深赤色蛍光 ( $\lambda_{em}>650$  nm) 色素としては、二つの報告例がある (図1: CP, NBE)。CP ( $\lambda_{em}=658$  nm) はクマリンを基本骨格とするもので、*in vitro* における RNA 選択性は乏しいものの、核小体を選択的に染色できる (細胞質内のリソソームにも局在化)<sup>20)</sup>。細胞毒性も低く、光耐性も良好で、有糸分裂中の RNA 動態観察に適用されている。一方、ナイルブルーを基本骨格とする NBE ( $\lambda_{em}=705$  nm) は、*in vitro* においても優れた RNA 選択性を示し、核小体を選択的に染色できる<sup>21)</sup>。ただし、CP 及び NBE は、いずれも剛直な基本骨格であるため、明瞭な off-on 機能を付与することが難しく、その蛍光応答は穏やかである (CP:  $I/I_0=3$ -fold, NBE:  $I/I_0=5$ -fold)。

### 3 深赤色蛍光モノメチンシアニン色素 BIQ : 生細胞イメージングと擬塩基としての活用

著者らは、明瞭な off-on 型の light-up 応答機能をもつ深赤色蛍光色素を開発するにあたり、シアニン色素の活用に着目した。核酸 (DNA) 染色色素としても活用

されているシアニン色素は、二つのヘテロ環がリンカーを介して自由回転できるため、単体ではほぼ無蛍光であり、核酸と結合すると分子内回転が抑制されて蛍光を発するようになる<sup>25)</sup>。その off-on 型の蛍光応答特性は、核酸染色剤として群を抜いている。また、シアニン色素は構成されるヘテロ環構造やヘテロ環の連結の仕方を交えることで励起・蛍光波長を調節可能である (図2)。例えば、キノリンブルー (QB) やチアゾールレッド (TR) など、TO と比べてより長波長域に励起・蛍光波長を有するシアニン色素が開発されており、FIT プロブの擬塩基として活用されている<sup>26)27)</sup>。著者らは、特に Benzo[c,d]indole 環を有するモノメチンシアニン色素を種々合成し、その機能を評価した。その結果、Benzo[c,d]indole 環と quinoline 環の 4 位とを連結した新規色素 BIQ (図2) が深赤色蛍光 RNA 染色色素として機能することを見いだした<sup>22)</sup>。

BIQ は、*in vitro* においても優れた RNA 選択性を示し、RNA との結合に伴い off-on 型の明瞭な light-up 応答を示す ( $I/I_0=105$ -fold,  $\lambda_{em}=657$  nm)。つまり、色素単体ではほぼ無蛍光の状態から、結合によって蛍光を発するようになる ( $\phi_{free}<0.0001$ ,  $\phi_{bound}=0.0085$ )。BIQ は、固定細胞はもとより生細胞イメージングに適用可能で、リボソーム RNA (rRNA) を豊富に含む核小体を選択的に染色できる (図3)。細胞質内の蛍光応答は、BIQ がミトコンドリアに集積することに由来するもので、選択性 (局在化) の改良が課題であるものの、

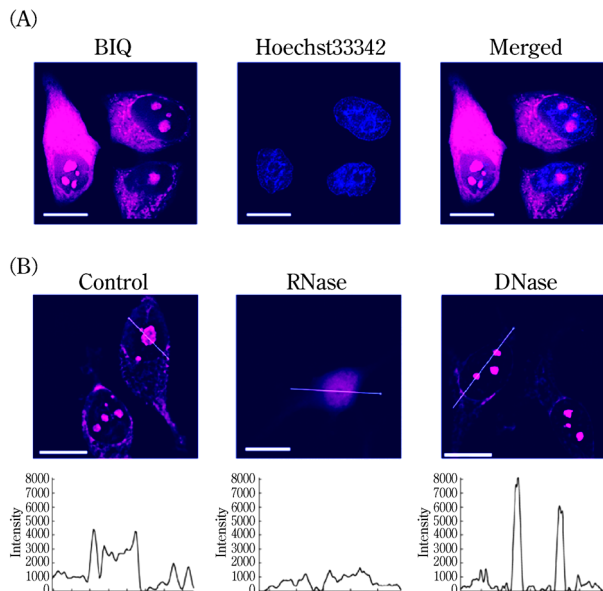


図3 BIQ (5.0 μM) による MCF7 細胞の蛍光イメージング (文献 22 より許可を受け転載)

(A) Hoechst33342 (176 nM) との共染色 (生細胞), (B) RNA, DNA 分解酵素処理した固定細胞イメージング, スケールバー: 15 μm

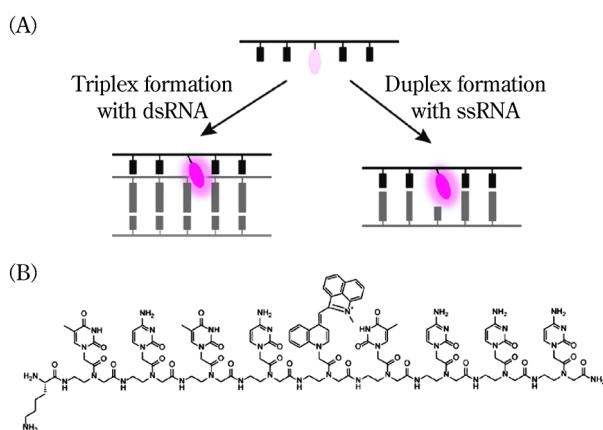


図4 BIQ を擬塩基として活用する PNA プローブ (文献 22 より許可を受け転載)

(A) 三重鎖形成・二重鎖形成による RNA 二重鎖・一本鎖検出, (B) PNA-BIQ の化学構造

市販の RNA 染色色素と比較して、「生きた細胞に適用できること」は大きな利点である。さらには、深赤色領域での明瞭な蛍光応答を実現しており、細胞毒性も低く、また、優れた光耐性を示すことから、タイムラプス観測など、長時間測定にも対応可能である。

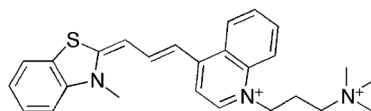
さらに、BIQ はペプチド核酸 (PNA) プローブにおける light-up 型の深赤色蛍光擬塩基 (ユニバーサル塩基) としても機能する (図 4)<sup>22)</sup>。深赤色蛍光色素 TR を擬塩基とする FIT プローブの応答 ( $I/I_0$ ) がわずか 2 倍程度であるのに対して<sup>26)</sup>、BIQ の off-on 型の蛍光応答特性は蛍光性擬塩基として世界トップレベルで、一本鎖 RNA 検出 ( $I/I_0=50$ -fold) のみならず二重鎖 RNA 検出 ( $I/I_0=41$ -fold) にも適用できる。

#### 4 深赤色蛍光トリメチンシアニン色素 TO-PRO-3: FID 法における蛍光インジケータ

先に述べたように、RNA 選択性を有する小分子を開発することは容易ではなく、そのため RNA 結合分子の探索には、化合物ライブラリーのスクリーニングに基づく手法が最も有力なアプローチである。例えば、創薬の標的としてその重要性が最も知られている、リボソーム RNA (rRNA) の A-site (三つのアデニンから成るインターナルループ部位を含む二重鎖構造)<sup>28)</sup> を標的として、A-site 結合分子 (MPED: 4-メチルピリジン誘導体) が 10,000 種類以上の化合物ライブラリーのスクリーニングにより見出されている<sup>29)</sup>。MPED は、非アミノグリコシドとして世界最強の結合力を有しているものの (発表当時: 解離定数  $K_d=3$  μM)、その結合力はアミノグリコシドに比べて極めて弱く、実用レベルに達していないのが現状である。

MPED のスクリーニングでも用いられているように、現在、阻害剤等の一次スクリーニングにおいて NMR 法が汎用されているが、少量サンプルで低コスト、網羅的かつハイスループットなスクリーニングが可能となるのは蛍光法である<sup>30)</sup>。特に、RNA 結合能を有する蛍光インジケータを用いて、標的 RNA に対する競合的な結合反応を利用する手法 (fluorescent indicator displacement (FID) assay)<sup>31)</sup> では、RNA の蛍光ラベル化が不要であるため、1 アッセイあたりのコストを大幅に削減できる利点がある。しかし、蛍光法 (FID アッセイ) が主体と成り得ていない最大の理由は、標的 RNA と候補化合物との相互作用を正確に評価できる蛍光インジケータが欠如していることにある。つまり、ナノモルレベルの結合力と結合選択性、さらには明瞭な蛍光応答と深赤色蛍光検出 ( $\lambda_{em}>650$  nm) 機能を兼ね備えた蛍光インジケータであり、これを開発することができれば、蛍光法の利点を最大限に活かしたスクリーニングが可能となるため、阻害剤開発の要となる技術基盤 (スクリーニング法) を格段に発展させることが期待できる。

著者らは、rRNA の A-site を標的として、深赤色蛍光インジケータを探索することを試みた。その結果、核酸染色色素として汎用されているトリメチンシアニン色素 TO-PRO-3 が A-site のインターナルループ部位に極めて強く結合すること ( $K_d=1.1$  μM)、また、off-on 型の明瞭な light-up 応答 (深赤色蛍光:  $\lambda_{em}=663$  nm) を示すことを見いだした (図 5)<sup>23)</sup>。TO-PRO-3 の結合特性は優れたもので、A-site に対して高選択的に結合し、その結合力は既存の非アミノグリコシド系の A-site 結合分子の中でも最高レベルである。モノメチンシアニン色素など、一連のシアニン色素との比較から、



**TO-PRO-3**  
[Ex/Em (nm): 632.5/663]

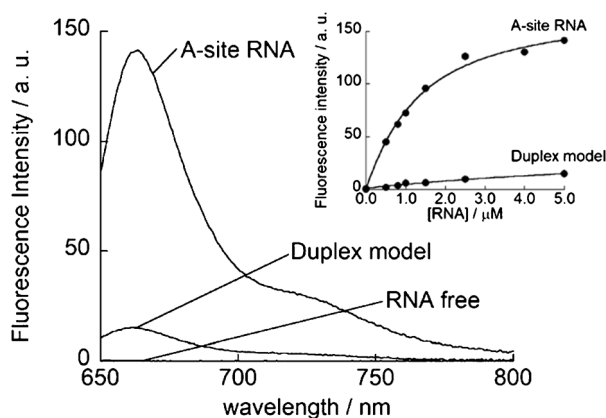


図5 TO-PRO-3 (0.50 μM) の A-site RNA (5.0 μM) に対する蛍光応答 (文献 23 より許可を受け転載)

TO-PRO-3 のトリメチル構造がインターナルループ部位への結合選択性発現に重要であることが示唆された。

FID 法における蛍光インジケータとしての性能を評価したところ、TO-PRO-3 を用いることで、青色～緑色蛍光性の候補化合物の A-site 結合能を正確に評価できることが分かった。ここで重要なことは、TO-PRO-3 が A-site との結合・解離反応に伴い深赤色領域で明瞭な蛍光変化を示す点であり、これにより候補化合物由来の蛍光の干渉を全く受けずに A-site 結合能を評価することが可能である。さらに、本アッセイはプレートリーダー (96 穴プレートなど) を用いたスクリーニングに応用できるため、様々な蛍光性化合物を含む大規模な化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングへの展開が期待できる。

また、TO-PRO-3 は、rRNA の A-site と類似のインターナルループ部位 (二つのアデニンと一つのウラシル) を有する A 型インフルエンザウイルス RNA のプロモーター領域にも結合し ( $K_d=2.9 \mu\text{M}$ )、FID 法に適用できることを見いだした<sup>24)</sup>。

なお、A 型インフルエンザウイルス RNA のプロモーター領域は、変異しにくく、高度に保存されていることから、創薬 (抗ウイルス剤開発) の標的としての重要性が急速に認められつつある。実際、この領域のインターナルループ部位に結合できる小分子 (2,4-ジアミノキナゾリン誘導体) が、化合物ライブラリー (4279 化合物) を対象としたスクリーニング (NMR 法) により見いだされ、弱いながらも抗ウイルス活性を示すことが報告されている<sup>32)</sup>。著者らも、この部位を標的とする分子プローブの開発に成功しており、ウイルス RNA の複

製・転写を阻害できることを見いだしている<sup>33)</sup>。現在、さらに TO-PRO-3 をインジケータとして活用し、より強力な分子プローブの開発を進めている。

## 5 おわりに

本稿では、著者らが開発した深赤色蛍光色素 BIQ を紹介させていただいた。繰り返し述べるように、RNA 選択性を発現する小分子の明確な設計指針はなく、これまでに見いだされた RNA 染色色素はいずれも偶然の産物とも言える。幸運にも、BIQ は、溶液中・固定細胞・生細胞、いずれにおいても優れた RNA 選択性と蛍光応答を示し、さらには核酸プローブの擬塩基としても機能することから、多彩な活用が期待できる。特に、核小体は、ウイルス感染<sup>34)</sup>やオートファジー<sup>35)</sup>、細胞老化<sup>36)</sup>との関連性が注目されつつあり、核小体研究に資することを期待している。また、TO-PRO-3 は、深赤色蛍光応答 (Ex 632.5 nm/Em 663 nm) を示す世界初の FID インジケータであり、青色～緑色蛍光性化合物のスクリーニングへも適用できるため、極めて有用なインジケータとして期待できる。

現在、さらに BIQ の改良を進めており<sup>37)</sup>、BIQ 及び改良版を活用したウイルス RNA 検出法の開発を進めている。

## 文献

- 1) G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien: *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
- 2) S. Tyagi, F. R. Kramer: *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303 (1996).
- 3) M. M. Mhlanga, S. Tyagi: *Nat. Protoc.*, **1**, 1392 (2006).
- 4) N. Nitin, P. J. Santagelo, G. Kim, S. Nie, G. Bao: *Nucleic Acids Res.*, **32**, e58 (2004).
- 5) M. B. Baker, G. Bao, C. D. Searles: *Methods Mol. Biol.*, **1039**, 279 (2013).
- 6) O. Kohler, D. V. Jarikote, O. Seitz: *ChemBioChem*, **6**, 69 (2005).
- 7) M. V. Sonar, M. E. Wampole, Y.-Y. Jin, C.-P. Chen, M. L. Thakur, E. Wickstrom: *Bioconjugate Chem.*, **25**, 1697 (2014).
- 8) A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, D. Williams, N. Al-Obaidi, F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, O. Seitz, M. J. Gait: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 2152 (2012).
- 9) T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, S. Nishizawa, N. Teramae: *Chem. Commun.*, **51**, 1421 (2015).
- 10) T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, N. Teramae, S. Nishizawa: *Anal. Sci.*, **31**, 315 (2015).
- 11) Y. Sato, M. Kaneko, T. Sato, S. Nakata, Y. Takahashi, S. Nishizawa: *ChemBioChem*, **20**, 408 (2019).
- 12) T. Sato, Y. Sato, S. Nishizawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9397 (2016).
- 13) T. Sato, Y. Sato, S. Nishizawa: *Chem. Eur. J.*, **23**, 4079 (2017).
- 14) T. Chiba, T. Sato, Y. Sato, S. Nishizawa: *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 7765 (2017).
- 15) T. Sato, N. Sakamoto, S. Nishizawa: *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 1178 (2018).

- 16) T. Tanabe, T. Sato, Y. Sato, S. Nishizawa: *RSC Advances*, **8**, 42095 (2018).
- 17) Y. Sato, Y. Takahashi, T. Tanabe, S. Nishizawa: *Org. Biomol. Chem.*, **18**, 4009 (2020).
- 18) Q. Lin, Y. Kim, J. Namm, A. Kulkarni, G. R. Rosania, Y.-H. Ahn, Y.-T. Chang: *Chem. Biol.*, **13**, 615 (2006).
- 19) Y.-J. Li, Q. Deng, D.-P. Hu, Z.-Y. Wang, B.-H. Huang, Z.-Y. Du, Y.-X. Fang, W.-L. Wong, K. Zhang, C.-F. Chow: *Chem. Commun.*, **51**, 15241 (2015).
- 20) B. Zhou, W. Liu, H. Zhang, J. Wu, S. Liu, H. Xu, P. Wang: *Biosens. Bioelectron.*, **68**, 189 (2015).
- 21) Q. Yao, H. Li, L. Xian, F. Xu, J. Xia, J. Fan, J. Du, J. Wang, X. Peng: *Biomaterials*, **177**, 78 (2018).
- 22) Y. Yoshino, Y. Sato, S. Nishizawa: *Anal. Chem.*, **91**, 14254 (2019).
- 23) Y. Sato, S. Yajima, A. Taguchi, K. Baba, M. Nakagomi, Y. Aiba, S. Nishizawa: *Chem. Commun.*, **55**, 3183 (2019).
- 24) Y. Sato, Y. Aiba, S. Yajima, T. Tanabe, K. Higuchi and S. Nishizawa: *ChemBioChem*, **20**, 2752 (2019).
- 25) J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista: *Biopolymers*, **46**, 39 (1998).
- 26) F. Hovelmann, I. Gaspar, J. Chamiolo, M. Kasper, J. Steffen, A. Ephrussi, O. Seitz: *Chem. Sci.*, **7**, 128 (2016).
- 27) N. Kolevzon, D. Hashoul, S. Naik, A. Rubinstein, E. Yavin: *Chem. Commun.*, **52**, 2405 (2016).
- 28) A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan: *Nature*, **407**, 340 (2000).
- 29) L. Yu, T. K. Oost, J. M. Schkeryantz, J. Yang, D. Janowick, S. W. Fesik: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4444 (2003).
- 30) J. R. Thomas, P. J. Hergenrother: *Chem. Rev.*, **108**, 1171 (2008).
- 31) S. L. Wicks, A. E. Hargrove: *Methods*, **167**, 3 (2019).
- 32) M.-K. Lee, A. Bottini, M. Kim, M. F. Bardaro Jr., Z. Zhang, M. Pellicchia, B.-S. Choi, G. Varani: *Chem. Commun.*, **50**, 368 (2014).
- 33) 佐藤雄介, 西澤精一, 田邊貴昭, 三浦弘真, オケケ シオマ ウシエ, 川口敦史, 特願 2020-129884.
- 34) B. K. Dove, J.-H. You, M. L. Reed, S. R. Emmett, G. Brooks, J. A. Hiscox: *Cell. Microbiol.*, **8**, 1147 (2006).
- 35) N. Katagiri, T. Kuroda, H. Kishimoto, Y. Hayashi, T. Kumazawa, K. Kimura: *Sci. Rep.*, **5**, 8903 (2015).
- 36) H. Tanaka, S. Takebayashi, A. Sakamoto, T. Igata, Y. Nakatsu, N. Saitoh, S. Hino, M. Nakao: *Cell Rep.*, **18**, 2148 (2017).
- 37) 西澤精一, 佐藤雄介, 芳野幸奈, 富樫奈央, 特願 2020-139795.

西澤精一 (Seiichi NISHIZAWA)



東北大学大学院理学研究科化学専攻 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)。東京大学大学院理学系研究科博士後期課程修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》生体物質, 特に RNA を標的とする分子プローブ設計と応用。《主な著書》G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K. A. Schug 著, 今任稔彦・角田欣一監訳 (分担翻訳), “クリスチャン分析化学 原書7版”, (丸善出版), (2016)。《趣味》カメラ。

E-mail: seiichi.nishizawa.c8@tohoku.ac.jp

佐藤雄介 (Yusuke SATO)



東北大学大学院理学研究科化学専攻 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)。東北大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》細胞内生体高分子の分析・機能制御を指向した化学プローブの開発。