



表紙撮影:熊本市西区河内町塩屋

photo:永島俊介氏

## **CONTENTS**

u	$\Delta$	/1		NA	ı
$\mathbf{n}$	C /	,,	┖=	w	ı

薬物代謝酵素発現酵母を用いたヒト代謝物生産システム ●─── [1]

株式会社 TOPU バイオ研究所 西川 美宇 富山県立大学 生城 真一 榊 利之

siRNA 選択性蛍光プローブを用いた ◆ [6] 細胞内デリバリーイメージング解析

東北大学大学院 佐藤 貴哉 西澤 精一

## **Topics on Chemistry**

キノンメチドシグナル増幅システム (QMSA) ● [11] 同仁化学研究所 田中 敬子

#### Commercial

新製品

マイトファジー検出蛍光プローブ ● [12] ミトコンドリア局在型ー重項酸素検出蛍光プローブ ● [12]

S-ニトロシル化タンパク質解析キット ● [13]

包装容量追加

レドックス応答性タンパク質解析キット ● [13]

細胞毒性測定 LDH Assay Kit ● [14]

試作品

硫化水素イオン定量用試薬 ● [5]

### お知らせ

第27回フォーラム・イン・ドージン開催のお知らせ ● [11] 学会展示・ポスター発表のご案内 ● [11]

# 新製品案内

\*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

マイトファジー検出蛍光プローブ Mitophagy Detection Kit

ミトコンドリア局在型一重項酸素検出 蛍光プローブ

Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging

S - 二トロシル化タンパク質解析キット -SulfoBiotics- Protein S-Nitrosylation Monitoring Kit

## 薬物代謝酵素発現酵母を用いたヒト代謝物生産システム

Whole cell-dependent production of human metabolites using genetically engineered yeast cells



西川 美宇 株式会社 TOPU バイオ研究所 代表取締役社長



生城 真一 富山県立大学工学部 生物工学科機能性食品工学講座 准教授



**榊 利之** 富山県立大学工学部 生物工学科機能性食品工学講座 教授

#### **Abstract**

Xenobiotic phase I and II reactions generally render a compound more water soluble and pharmacologically inactive, thereby eliminating the need for further evaluation. Conjugation in phase II process is the most common pathway for detoxification and elimination of hydrophobic xenobiotics in mammals. However, if the metabolite forms a toxic compound such as acvl glucuronide. additional safety assessment may be needed. In 2008, FDA provided a new guidance for safety testing of drug metabolites. Generally, synthesis of enough amounts of metabolites for safety testing is often difficult in conventional methods. Thus, development of the efficient system for metabolite production often becomes critical during studies of xenobiotic metabolism undertaken in the development of a new pharmaceutical product. We have established whole cell-dependent production systems for human drug metabolites using genetically engineered Saccharomyces cerevisiae cells. We constructed the expression systems of 20 cytochrome P450 (CYP), 38 UDP-glucuronosyltransferase (UGT), and 6 sulfotransferase (SULT) isoforms, and we successfully produced a few hundred milligram-quantities of metabolites from several drug substrates in 1 L reaction. Efficient production of acyl-glucuronides which are chemically reactive was attained by using not only human but also other mammalian UGT isoforms. We also constructed co-expression systems of phase I and phase II enzymes combined with CYP and UGT isoforms, resulting in the reconstruction of sequential metabolism in humans. These systems would be useful for production of drug metabolites and prediction of drug metabolism for pharmaceutical candidates.

## 1. はじめに

医薬品は体内に取り込まれたのち肝臓をはじめとする種々の組織 において複数の代謝酵素による変換を受ける。これを薬物代謝とい うが、通常、代謝物は水溶性が増し、体外へ排泄されやすい形へと変 換される。薬物代謝経路には酸化、還元、加水分解等を行う第Ⅰ相 反応と、極性の高い置換基を付加する第Ⅱ相反応に大別される。第 Ⅰ相及び第Ⅱ相反応は連続的に行われる場合が多く、第Ⅰ相を担う 代表的な薬物代謝酵素にはシトクロム P450 (CYP) があり、第Ⅱ相 酵素には UDP- グルクロン酸転移酵素(UDP-glucuronosyltransferase, UGT) や硫酸転移酵素 (sulfotransferase, SULT) な どが挙げられる。多くの医薬品は代謝によって不活化されるが、 近年、一部の医薬品が代謝により毒性を増し、副作用などを引き 起こすことが明らかになってきた。これを受けて、2008年には 米国食品医薬品局(FDA)から「医薬品代謝物の安全性に関する ガイダンス」が出され、医薬品開発における基礎研究の段階から 代謝物の安全性試験を実施する必要が出てきた1)。安全性試験で はヒトが医薬品を摂取した際に体内で生じる代謝物を合成し、実 験動物に投与して毒性を評価する必要がある。

医薬品代謝物の調製法には有機合成の他、医薬品を投与した実験動物の胆汁や尿からの代謝物の単離、および肝臓ミクロソームなどの粗酵素画分を用いた生合成法などがある(表 1)。一般に実

験動物を使用した安全性試験にはグラム単位の代謝物が必要であり、有機合成法による調製が有用であるが、位置および立体選択的な水酸化あるいは抱合化は困難であるため、多くの場合、医薬品自身とは全く異なる合成ルートを考案する必要があり、多大なコストと手間がかかる。また、生体試料からの単離や酵素合成法により調製可能な量は数十 mg 程度であり、グラム単位の代謝物調製は技術的およびコスト的に困難である。そこで、筆者らは出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae に種々の薬物代謝酵素を発現させ、医薬品代謝物の効率的な生産システムを構築した。本稿では、薬物代謝酵素発現酵母による代謝物合成の特徴と、医薬品や食品由来成分からの代謝物合成例について紹介する。

表1 医薬品代謝物調製法の比較

	収量		_
調製法	標準品 ( <b>~</b> mg)	安全性試験 (~g)	短所
有機合成	0	0	しばしば合成困難
尿・胆汁からの単離	0	×	コスト高・非効率的
酵素学的反応	0	Δ	コスト高 (UDP <del>-</del> グルクロン酸、PAPS)
遺伝子組換え酵母による 生物変換	0	0	

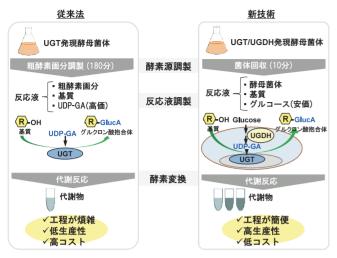


図 1 薬物代謝酵素発現酵母を用いたグルクロン酸抱合体製造法の 比較

# 2. 出芽酵母を用いた薬物代謝酵素発現システムの構築

1985 年、榊らは出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae を宿主と して薬物代謝に関与するP450およびNAPDH-P450還元酸素を発 現させることに成功し、ヒト由来 P450 分子種発現酵母を用いて さまざまな医薬品代謝物を調製することが可能となった2)3)4)。さ らに生城らは P450 と UGT を酵母に同時発現させることにより、 医薬品の連続的な代謝反応を再現した5。これらの酵素が局在す るミクロソーム画分を使用した代謝物調製が可能になったが、 UGT によるグルクロン酸抱合反応には補酵素として高価な UDP-グルクロン酸(UDP-glucuronic acid, UDP-GA)を添加しなけれ ばならず、安全性試験に必要な代謝物の大量調製にはコスト面で の課題があった。同様に、in vitro での SULT による硫酸抱合反応 には、UDP-GAよりもさらに高価な補酵素である活性硫酸(3'phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) の添加が必要であ り、安全性試験に必要な量の代謝物調製には補酵素の添加を必要 としない生産システムの確立が必要であった。そこで、補酵素供 給系を含んだ酵母菌体を用いたバイオコンバージョン法による代 謝物生産システムの確立を試みた。

# 3. バイオコンバージョン法による医薬品代 謝物の生合成

酵母菌体内で薬物代謝反応を再現するためには、前述の補酵素供給系が予め酵母内に備わっていることが必要である。酵母においては硫酸抱合反応に必要な補酵素である PAPS 合成系を有しているが<sup>6)7)</sup>、UGT の補酵素である UDP-GA 合成に必要な UDP-グルコース脱水素酵素(UDP-glucose dehydrogenase, UGDH)を持っていない。そこで、UGT および UGDH の同時発現酵母を構築し、菌体内でのグルクロン酸抱合反応を可能にした。UGT および UGDH 同時発現酵母の構築により、酵母培養液中に基質となる医薬品を添加するだけで容易に代謝物を生産することが可能になり、代謝物生産コストの大幅な削減に成功した。また、菌体をそのまま反応に用いるため粗酵素画分調製の時間も不要になり、容易に大量の代謝物を調製することが可能となった(図 1)。

◆CYP発現系		◆UGT発現系		◆SULT発現系	
Isoforms	Species	Isoforms	Species	Isoforms	Species
1A1	human, rat	1A1	human, rat, mouse	1A1	human
1A2	human, rat	1A2	rat	1A3	human
1B1	human	1A3	human, rat,	1B1	human
2A6	human	IAS	porcine (1A3a)	1C4	human
2B1	rat	1A4	human, rabbit	1E1	human
2B6	human	1A5	human, rat, mouse	2A1	
2C8	human	1A6	human, rat, bovine	ZAT	human
2C9	human	IAO	mouse (1a6a and 1a6b)		
2C11	rat	1A7	human, rat		
2C18	human	1A8	human		
2C19	human	1A9	human, mouse		
2D6	human	1A10	human		
2E1	human	2A1	human		
2J2	human	2B1	rat, mouse		
2R1	human	2B3	rat		
3A4	human	2b5	mouse		
4F3	human	2B4	human		
		2B6	rat		
		2B7	human		
		2B10	human		
		2B12	rat		
		2B15	human		
		2B18-like	porcine		
		2B31-like	porcine		
		2b34	mouse		

図2 薬物代謝酵素発現酵母のラインナップ

# 4. 薬物代謝酵素発現酵母を用いた代謝物生合成

P450、UGT および SULT はいずれも遺伝子ファミリーを形成し、 多くの分子種が存在する。我々はヒトおよび動物由来の薬物代謝 酵素発現系を構築し、これまでに 19 種類の CYP、38 種類の UGT および6種類のSULT発現酵母を揃えている(図2)。多様な分子 種の品揃えにより、幅広い化合物への対応が可能となり、これま でに多くの医薬品や食品成分の代謝物を調製した。方法は以下の 通りである。遺伝子組換え酵母は予め10Lスケールで培養して集 菌し、使用時まで冷凍保存することが可能である。代謝物調製に 際し、まずは小スケールにおける代謝スクリーニング試験により 最適分子種を選定し、0.1 ~ 1L スケールで反応を行うことで、容 易に代謝物を調製することができる(図3)。モデル化合物であ る 7- ヒドロキシクマリン(7HC)を基質とした場合、UGT 発現 酵母によるグルクロン酸抱合体への変換反応は概ね 24 時間で終 了する (図 4)。生合成反応後の代謝物精製は反応液と菌体双方を 抽出するが、菌体外に代謝物が多く存在するケースが多く、遠心 分離で菌体を沈殿させ、代謝物を精製することも可能である。現

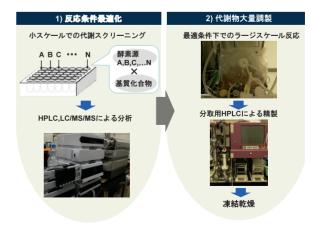


図3 薬物代謝酵素発現酵母を用いた代謝物調製スキーム

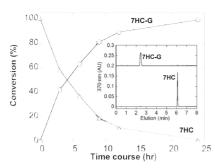


図 4 ヒト UGT1A6 発現酵母による 7HC 代謝反応の経時変化

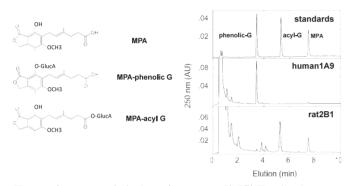


図 5 ヒト UGT1A9 およびラット UGT2B1 発現酵母によるミコフェ ノール酸(Mycophenolic acid, MPA)代謝様式の違い

在、1 リットルの反応系あたり数十〜数百 mg の代謝物合成が可能となっている。本法の特長として、酵素源調製にかかる工程が遺伝子組換え菌体の大量培養と回収のみであり、酵素源の調製と管理が非常に容易であるため、反応をさらにスケールアップすればグラム単位の代謝物調製が可能となる。

また酵素法による代謝物調製の特長として、特異的代謝物の取 得が容易であることが挙げられる。免疫抑制剤として使用される ミコフェノール酸はその構造中にフェノール性水酸基とカルボキ シル基を持ち、両方の官能基が UGT によるグルクロン酸抱合反 応を受ける。そのうちカルボキシル基における抱合は反応性の高 いアシルグルクロン酸抱合体を生じ、炎症反応を介した肝障害な どの副作用を起こすことが懸念されている。UGT 発現酵母を用 いてミコフェノール酸の代謝スクリーニングを行った結果、ヒト UGT 分子種においてはフェノール性水酸基が抱合されたエーテ ル型グルクロン酸抱合体のみが合成されたが、ラット UGT2B1 は アシルグルクロン酸抱合体を選択的に合成した(図5)。同様にカ ルボキシル基を有する複数の医薬品で代謝スクリーニングを行っ た結果、ラット UGT2B1 は効率的にアシルグルクロン酸抱合体が 生成した(表2)。このように、ヒト由来 UGT での生合成が困難 な場合でも、他の動物種由来 UGT を使用することにより目的代 謝物を特異的に調製することが可能である。これらの医薬品のア シルグルクロン酸抱合体はヒト体内においても合成されることが 知られているが 13) 14) 15) 16) 17)、ヒト UGT 発現酵母での合成効率 は極めて低かった。UGT に限らず他の薬物代謝酵素においても、 ヒト以外の動物由来の酵素を幅広く取り揃えることは重要である。 ポリフェノールは複数のフェノール性水酸基をもつ植物由来成

ポリフェノールは複数のフェノール性水酸基をもつ植物由来成分の総称であり、フラボノイドをはじめとしたポリフェノール類は速やかに薬物代謝酵素による代謝を受け、不活化・排泄される

表 2 UGT 発現酵母を使用したアシルグルクロン酸抱合体生産

Substrates	UGT isoforms	Productivity (mg/L/day)
Mycophenolic acid	rat 2B1	9
Mefenamic acid	rat 2B1	60
Flufenamic acid	rat 2B1	132
Diclofenac	rat 2B1	360
Zomepirac	porcine 1A3	47

ことが知られている。近年の報告では、体内に残存したフラボノイド代謝物が炎症部位に蓄積し、加水分解酵素による脱抱合を受けることで生じたアグリコンが局所的な生理作用を及ぼす可能性が示され 10 111 12 、食品成分の機能性評価においても代謝研究の重要性が高まっている。多くのポリフェノールは構造中の水酸基が UGT、SULT や COMT などの第 II 相酵素により代謝され、複数の代謝物を生じる。SULT 発現酵母を用いてブドウ果皮やそれを使用したワインに多く含まれるポリフェノールであるレスベラトロールを代謝させた結果、SULT1A3 は3位硫酸酸抱合体を、SULT2A1 は4'位硫酸抱合体をそれぞれ選択的に合成した。一方でSULT1E1 は3位および4'位における両抱合反応を触媒した(図6)。このように、薬物代謝酵素発現酵母の最適分子種を選定することにより位置選択的に抱合化を受けた代謝物を合成することが可能であった。

## 5. 連続代謝反応による複数代謝物の調製

前述の通り、薬物代謝反応は複数の酵素が関与する多段階の代謝反応により成り立つものが多い。我々は、前述のP450電子伝達成分系とグルクロン酸抱合反応系の同時発現系を構築し、第I相および第II相反応の連続的な代謝反応を酵母内に再構築することに成功した。CYP/UGT 同時発現系については5種のヒト由来CYPと7種のヒト由来UGTの組み合わせにより35種類のヒトCYP/UGT 同時発現酵母株を構築した。モデル化合物として使用した7-エトキシクマリン(7EC)に対するCYPによる代謝経路は、脱エトキシ反応により7HCを生じる経路と3位水酸化反応の二通りがある。35種類のCYP/UGT 同時発現酵母による7EC代謝解析を行ったところ、全ての分子種で脱エトキシ反応と3位水酸化反応から始まる連続代謝反応を確認した(図7)。また、7ECの連続代謝による7HCと7HC-グルクロン酸抱合体の同時調製

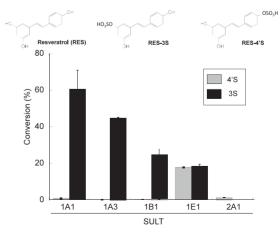


図 6 ヒト SULT1A3, 1E1 および 2A1 発現酵母によるレスベラト ロール代謝様式の違い

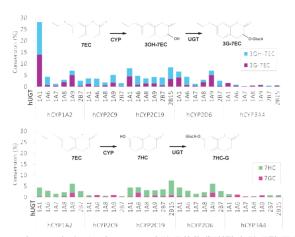


図7 ヒトCYPおよびヒトUGT同時発現薬物代謝酵素発現酵母を用いた 7EC の連続代謝と代謝様式比較

には、ラット CYP1A1/ ヒト UGT1A6 同時発現酵母の使用が有用であった(図 8)。

代表的な非ステロイド系抗炎症剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) であるジクロフェナックは、CYPおよび UGT により連続的に代謝される  $^{17}$ 。ヒト CYP2C9/ラット UGT2B1 発現酵母を用いることで、単回反応により酵母内で連続的な代謝反応を行い、水酸化体とグルクロン酸抱合体を同時調製することに成功した(図 9)。また、ジクロフェナックとヒト CYP2C9 発現酵母との反応液上清をラット UGT2B1 発現酵母との反応に用いることにより、2 ステップでの代謝物調製に成功した(図 10)。

### おわりに

これまで薬物代謝反応はその多くが不活化反応と考えられ、代謝物自体の活性は見過ごされがちであったが、近年医薬品の活性代謝物による毒性だけでなく、食品成分由来代謝物の機能性に関する報告も相次いでいる。また、薬物代謝酵素は肝臓の他、腸粘膜にも高発現しており、腸管における代謝は医薬品や機能性食品成分のバイオアベイラビリティを考慮する際の重要なファクターとなる。したがって、これらの代謝研究を行うに当たり代謝物の需要はますます高まってくることが予想される。

平成 23 年 4 月に富山県立大学発ベンチャー企業、(株) TOPU バイオ研究所が設立され、薬物代謝酵素発現酵母による代謝物製造が事業化された。現在も酵素源の拡充を図っており、調製可能な代謝物数は飛躍的に増加している。本技術が医薬品や食品成分の代謝研究推進の一助となれば幸いである。

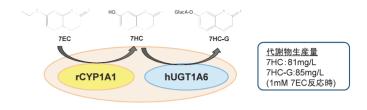


図8 ラット CYP1A1 およびヒト UGT1A6 同時発現薬物代謝酵素発現酵母を用いた 7EC の連続代謝反応による中間代謝物および最終代謝物の調製

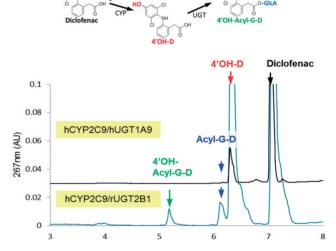


図9 ヒトCYP2C9 およびラット UGT2B1 同時発現酵母を用いたジ クロフェナック連続代謝反応による代謝物同時調製

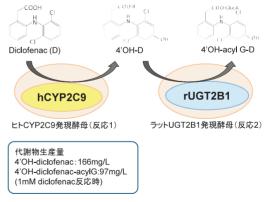


図 10 複数の薬物代謝酵素発現酵母を用いたジクロフェナックの多 段階代謝反応による中間代謝物および最終代謝物の調製

#### [参考文献]

- Food and Drug Administration, 2008, Guidance for Industry -Safety Testing of Drug Metabolites.
- H. Murakami, Y. Yabusaki, T. Sakaki, M. Shibata and H. Ohkawa., J. Biochem., 1990, 108(5): 859-865.

- T. Sakaki, M. Shibata, Y. Yabusaki, H. Murakami and H Ohkawa., DNA Cell Biol., 1990, 9(8): 603-614.
- T. Sakaki, S. Kominami, S. Takemori, H. Ohkawa, Akiyoshi-Shibata M. and Y. Yabusaki., *Biochemistry*, 1994, 26; 33(16): 4933-4939.
- S. Ikushiro, M. Sahara, Y. Emi, Y. Yabusaki and T. Iyanagi, Biochim. Biophys. Acta., 2004, 1672(2): 86-92.
- 6) U. Schriek and J.D. Schwenn, Arch Microbiol., 1986, 145(1): 32-38.
- S. Karamohamed, J. Nilsson, K. Nourizad, M. Ronaghi, B. Pettersson and P. Nyrèn., *Protein Expr. Purif.*, 1999, 15(3): 381-388.
- 8) S. Ikushiro et al.(in press)
- B. Wu, K. Kulkarni, S. Basu, S. Zhang and M. Hu., J. Pharm. Sci., 2011, 100(9): 3655-3681.
- 10) 生城ら、ビタミン、2009,83,351.
- 11) J. Terao, K. Murota and Y. Kawai, Food Funct., 2011, 2(1): 11-17.
- A. Ishisaka, K. Kawabata, S. Miki, Y. Shiba, S. Minekawa, T. Nishikawa, R. Mukai, J. Terao and Y. Kawai., PLoS One., 2013, 19; 8(11): e80843.
- 13) N. Picard, D. Ratanasavanh, A. Prémaud, Y. Le Meur and P. Marquet., *Drug Metab. Dispos.*, **2005**, 33(1): 139-146.
- J. Sato, Y. Yamane, K. Ito and H. Bando. Biol. Pharm. Bull., 1993, 16(8): 811-812
- P. Gaganis, J. O. Miners and K. M. Knights, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, 15; 73(10): 1683-1691.
- P. N. Langendijk, P. C. Smith, J. Hasegawa and L. Z. Benet, J. Chromatogr., 1984, 11; 307(2): 371-379.
- 17) S. Kumar, K. Samuel, R. Subramanian, M. P. Braun, R. A. Stearns, S. H. Chiu, D. C. Evans and T. A. Baillie, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2002, 303(3): 969-978.

[著者プロフィール]

氏名:西川 美宇 (Miyu NISHIKAWA)

所属:1) 株式会社 TOPU バイオ(トップバイオ)研究所

2) 富山県立大学

連絡先: 〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

TEL: 0766-56-0155 FAX: 0766-56-0155

E-mail: nishikawa@topubio.co.jp

出身学校: 酪農学園大学大学院獣医学研究科

学位:博士(獣医学)

現在の研究テーマ: 医薬品・食品成分の代謝様式および作用メカ ニズムの解明

氏名:生城 真一 (Shinichi IKUSHIRO) 所属:富山県立大学

連絡先: 〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

TEL: 0766-56-7500 (内線 602)、FAX: 0766-56-2498

E-mail: ikushiro@pu-toyama.ac.jp

出身学校:広島大学総合科学部

学位:博士(学術)

現在の研究テーマ:異物代謝酵素による食品中機能性成分の代謝

研究

氏名:榊 利之 (Toshiyuki SAKAKI)

所属:富山県立大学

連絡先: 〒939-0398 富山県射水市黒河 5180

TEL: 0766-56-7500 (内線 601)、FAX: 0766-56-2498

E-mail: tsakaki@pu-toyama.ac.jp

出身学校:京都大学大学院理学研究科

学位:博士(理学)

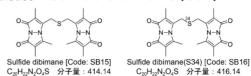
現在の研究テーマ:医薬品・食品成分の代謝様式および作用メカ

ニズムの解明

# 試作品 Dojindo Molecular Technologies, Inc.

# 硫化水素イオン定量用試薬

-SulfoBiotics- Sulfide dibimane (S34)



#### <特長>

- 1. 硫化水素イオン定量のための標準物質
- 2. HPLC 及び MS に適用可能
- 3. 標準物質の合成が不要

Monobromobimane を用いた分析法は、最も高感度で汎用性の高い硫化水素検出法として利用されています。Monobromobimane は、チオール特異的蛍光ラベル化剤であり、硫化水素 1 分子に対し、2 分子の Bimane が結合した化合物(Sulfide dibimane)を生成します(図 1)。Sulfide dibimane は、monobromobimane がグルタチオンやシステインなどのチオール化合物と反応したbimane 化合物との HPLC 分離が可能であり、また生成した化合物が蛍光を有するため、蛍光検出による高感度分析ができます。最近では、Sulfide dibimane(S34)と質量分析装置(MS)を併用することでさらなる高感度化と高選択性を達成した方法が報告され、硫化水素だけではなく、SH 基を有する種々の生体物質の詳細な解析法として確立されつつあります。

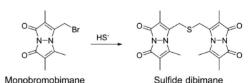
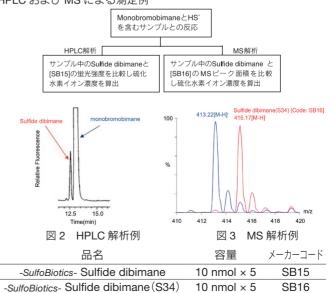


図 1 Monobromobimane と硫化水素の反応

HPLC および MS による測定例



# siRNA 選択性蛍光プローブを用いた細胞内デリバリーイメージング解析 Fluorescence imaging of siRNA delivery by siRNA-selective fluorescent probe



佐藤 貴哉

東北大学大学院理学研究科化学専攻



西澤 精一

東北大学大学院理学研究科化学専攻 教授

## **Summary**

Small interfering RNA (siRNA) has been gaining much attention as a next-generation therapeutics for targeting previously 'undruggable' diseases such as cancer and viral infection. However, the practical implementation is hindered mainly by the development of efficient and safe delivery carriers. For the successful development of such delivery carriers, useful analytical methods including fluorescence imaging are strongly required to facilitate the assessment of siRNA delivery process at the molecular level in living cells. Here, we briefly review conventional imaging methods for cellular siRNA delivery, and then we present a new imaging method using siRNA-selective fluorescent probe that we have recently developed.

## 1. はじめに

1998 年に A. Fire, C. C. Mello らによって発見された RNA 干渉 (RNAi: RNA interference) 1)、ならびに RNAi を誘起することが示 された小分子 RNA 二重鎖(siRNA: small interfering RNA)2,3) は、 ここ 15 年あまりの生化学分野の飛躍的な進歩を支えている。今 現在、siRNA は遺伝子発現パターンを制御し得る強力なツールと して、その有用性が広く認められており、特に最近では、がんや ウイルス感染症、神経疾患といったこれまでの難治性疾患に対し、 遺伝子レベルでの治療方法を開発する次世代型核酸医薬品として もますます研究・臨床試験が活発化している4)。しかし siRNA 医 薬開発が始まってから 15 年近くたった現在、承認に至ったもの はない(2016年4月現在)。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、これと同時に必要な情報(導入効率、局在、細胞内半減期 など)を分析する手法の開発が必要となる。最近、我々は siRNA 選択的な結合機能を有する蛍光プローブを開発し、これに基づく 独自の siRNA デリバリー過程のイメージング解析法を提案して いる。ここでは siRNA の特徴と既存のイメージング解析法につ いて化学的視点から簡潔に概観した後、我々が開発したイメージ ング手法を紹介する。

### 2. siRNA の構造的特徴

siRNA は一般に 19-21 塩基長の RNA 二重鎖(dsRNA)である。 細胞内に長い dsRNA が導入されると、細胞質に存在する dsRNA 切断酵素(Dicer: RNase IIの一種)により切断されて siRNA が生成する 50。この際 3' 末端に 2 塩基飛び出したオーバーハング構造が生成する。 siRNA は RNAi 機構の中核を担う Argonaute タンパク質などと RISC(RNA-induced Silencing Complex)複合体を形成し、配列特異的な標的 RNA 切断を誘発するが、この RISC 複合体は Argonaute タンパク質の PAZ ドメインへオーバーハング塩基が入り込むことで安定化している 60。 通常、化学合成される

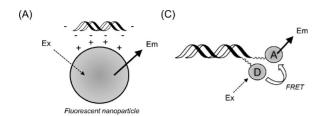
siRNAには、こうした構造を模して3'末端にdTdT(デオキシリボチミン)オーバーハング2塩基を付与する。PAZドメインは疎水性のアミノ酸が保存されたポケットであるため、どんな組み合わせのオーバーハング塩基でもよいが、合成コストを抑えるためにdTdTが汎用されている3。また、オーバーハング塩基はオーバーハングのない単純なdsRNAと比較して、ヌクレアーゼ分解耐性の向上にも寄与する。

#### 3. siRNA 医薬の実用化に向けた課題

核酸医薬開発にあたっては、その酵素耐性の低さおよび細胞膜透過性の低さが大きな課題となる。酵素耐性の低さは RNA では特に顕著であり、たとえば天然の RNA 分子は血中での半減期が 2-6 分と極めて短い $^4$ )。また、RNA は親水性のポリアニオンであるため、負に帯電した細胞膜(脂質二重膜)を貫通することはできない。これらの課題を克服するため、 ${\rm siRNA}$  の化学修飾やキャリアによる輸送技術が活用されている。化学修飾は  ${\rm siRNA}$  の酵素分解耐性の向上 $^4$ )や免疫システムによる認識の回避 $^7$ )に寄与し、RNAi 効果を向上させることも可能である $^8$ 。これまで承認された核酸医薬 3 例(Vitravene, Macugen, Kynamuro)はいずれも化学修飾を施されたものであったことからも、その必要性がうかがえる。これに加えて患部への直接注射を用いない、経口薬として ${\rm siRNA}$  医薬を開発する場合、キャリアの利用がほぼ必須である。

### 4. 実用化の要であるデリバリーキャリア

デリバリーキャリアの多くは siRNA と静電相互作用を介して siRNA/キャリア複合体を形成し、RNase からの分解を阻害し、血中の動態を調節する役割を果たす。siRNA 医薬の実用化において、優れた輸送能力を持つキャリアの開発が律速段階と考えられている。これまでに多くのキャリアが開発されているが、その中で最も実用化に近いと言われているのが、カチオン性脂質ベースのキャリアであり、それに続くのがポリマーベースのキャリアであ



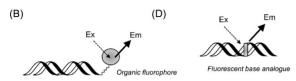


Fig. 1 Conventional siRNA imaging methodologies.

(A) siRNA bound on the surface of a fluorescent nanoparticle. (B) siRNA modified with an organic fluorophore at the terminal. (C) siRNA modified with a pair of two fluorophores. (D) siRNA modified with fluorescent base analogue (s).

EX: Excitation source, Em: Emission signal.

る<sup>9)</sup>。キャリア設計にあたっては、内包した siRNA を患部へ輸送し、必要な時に必要量の siRNA を放出し続ける能力(徐放性)が求められる。そのためには、キャリアの高度かつ精密な分子設計と、その輸送能力を生きた細胞内で分子レベルで評価することが必要である。

# 5. デリバリー過程の生細胞内イメージング 解析

細胞内へのデリバリー過程は、蛍光イメージング技術を利用することで高感度にかつリアルタイムで解析可能である。デリバリー過程には、siRNAの取り込み(uptake)、細胞内輸送(trafficking)、siRNA放出(releasing)といった多くの注目すべき段階がある。同時に siRNA導入による RNAi 活性の評価や細胞毒性評価も行わなければならない。siRNA自身は無蛍光であるため、解析には蛍光色素を siRNA やキャリアに修飾する必要がある。下記にまとめたラベル化法にはそれぞれの特徴・欠点があり、デリバリー過程の中でも解析可能な段階が異なる。

### 5-1. キャリアのラベル化

量子ドットをはじめとする蛍光性ナノ粒子は、その粒径や分光特性の調節が容易で、表面修飾を施しやすい機能性ナノマテリアルである。この表面に siRNA を共有結合あるいは静電相互作用を介して修飾することで、ナノ粒子がデリバリーマテリアルとして機能することが報告されている(Fig. 1A)<sup>10)</sup>。一般に、有機色素と比べると輝度が大きく退色しにくい優れた分光特性を有しており、蛍光性ナノ粒子をキャリアとして用いれば、siRNA/ナノ粒子複合体の取り込みや輸送を追跡することが可能である。しかしナノ粒子のコアを形成するカドミウムなどの元素の毒性が懸念されている。また広く用いられる脂質やポリマーベースのキャリアは無蛍光性であり、有機合成で色素を修飾することは必ずしも容易ではない。そのためイメージング解析に適用可能なキャリアには制限がある。

#### 5-2. siRNA のラベル化

蛍光イメージング法の多くは siRNA へ有機蛍光色素を共有結 合で修飾する手法を用いている。この方法では市販の蛍光色素を siRNA の末端に修飾し、任意のキャリアを用いてトランスフェク ションを行うことで、siRNA の取り込み・細胞内局在を直接追跡 することが可能である(Fig. 1B) 11)。特に適当な 2 種類の色素を 同一siRNA分子に修飾することで、そのFRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) シグナルを解析に用いることができ る<sup>12)</sup>。FRET は色素同士が近接した時にのみ得られるため、その シグナルは二重鎖状態の siRNA に由来する点で特徴的である。 個々の色素のシグナルを追えば、センス鎖とアンチセンス鎖を区 別してそれぞれの鎖の挙動を別々に調べることもできる(Fig. 1C)。また蛍光性の擬塩基を用いた解析法も提案されている (Fig. 1D)。蛍光性シトシン類縁体 PhenylpyrroloC 13) やシアニ 色素であるチアゾールオレンジ(TO: Thiazole Orange) 14) を siRNA に組み込むことで、siRNA の細胞内取り込みや局在だけでなく、 RISC 複合体を可視化<sup>14)</sup> できることが報告されている。

一般に、蛍光色素の修飾は siRNA と RISC タンパク質との相互作用を阻害して、RNAi 活性の減少を引き起こしてしまうことが課題で、修飾部位として、センス鎖の 5' 末端を選ぶと siRNA のサイレンシング活性の減少が最小限に抑えられることが知られている 15'。また、トランスフェクションする siRNA の内の数%のみを色素修飾 siRNA に置換することもしばしば行われる。しかし、通常の蛍光色素は比較的疎水性が高く、ミトコンドリアなどの細胞内小器官やタンパク質へ非特異吸着してしまうことによる局在パターンの変化に注意が必要である。さらに多くの色素は常に蛍光シグナルを発しているため、siRNA が分解されたのちに遊離する色素からのシグナルは、siRNA の挙動を反映していない擬陽性シグナルとなる点も解析上注意すべき点である。

# 6. siRNA 結合性蛍光プローブによるアフィ ニティーラベル化法の開発

従来のイメージング技術により、siRNA の細胞内デリバリー過程の理解は格段に進んできた。しかし広く用いられている siRNA の色素修飾体はいわば「siRNA mimic」であることに注意しなければならない。特に分子量がそれほど大きくない siRNA に対し

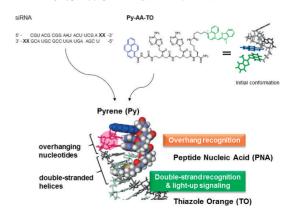


Fig. 2 Probe design and possible binding mode of Py-AA-TO to the siRNA overhang structure. Chemical structure of Py-AA-TO and the siRNA sequence against Firefly Luciferase GL2 gene are also shown. (XX = dTdT, target siRNA; dAdA, mismatched siRNA; none, fully-matched dsRNA)

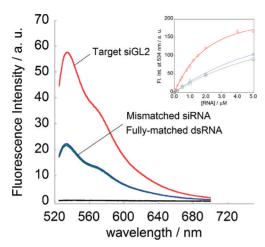


Fig. 3 Fluorescence spectra of Py-AA-TO (200 nM) in the presence of an equimolar target siGL2(red), mismatched siRNA(blue), fully-matched dsRNA (green), or in the absence of RNA (black). Inset: fluorescence titration plot of 1.0 μ M probe with 0.0-5.0 μ M RNA.

(Reproduced from Ref. 16 with permission from the Royal Society of Chemistry)

蛍光色素を共有結合で連結することは、RNAi 活性の減少といった上記の問題を引き起こす原因であり、またコストやアッセイの利便性の面でも決して最善の手法とはならないであろう。つまり医薬としての本来の姿・機能を持った siRNA を用いてデリバリー解析できることが望ましい。そこで我々は、siRNA に選択的に結合する蛍光性プローブを用いたアフィニティーラベル化法を着想した。すなわち非共有結合で標的 siRNA をラベル化することができれば siRNA 自身への色素修飾が不要となり、色素がもたらしうる RNAi 活性の低下や擬陽性シグナルといった問題への新しい解決策になると考えた。同時に分析コスト、操作性、汎用性の面でも優れた分析法となることも期待できる。

#### 6-1. siRNA 選択性蛍光プローブの設計と結合能評価

細胞内では多種多様な高次構造をとる RNA が大量に存在している。そうした環境内で siRNA への選択的な結合を達成するために、その3' 末端オーバーハング構造とその近傍の二重鎖部位を結合部位として着目した (Fig. 2) <sup>16)</sup>。オーバーハング 2 塩基認識部位として、それと相補的な 2 塩基ペプチド核酸 (PNA: Peptide Nucleic Acid)を基本骨格として用い、この C 末端へ二重鎖認識部位として light-up 型インターカレータであるチアゾールオレンジ(TO)を連結した。さらに、N 末端にはピレン (Py: Pyrene)を連結することで、プローブ Py-AA-TO を得た。

Fig. 3 にプローブの TO 部位由来の典型的な蛍光スペクトルを示す。一連の実験はホタルルシフェラーゼ GL2 遺伝子を狙った siRNA 配列(siGL2)を用いた。プローブ単体では TO 部位が励起状態でねじれることによる無輻射失活によりほぼ無蛍光である。ここへ等量の dTdT オーバーハングを有する標的 siGL2 を添加すると、40 倍以上の蛍光量子収率増大を示した。これに対し一本鎖に対する応答は 10 分の 1 程度と非常に小さかつたことから、TO 部位は二重鎖の塩基対間へ結合していることが示唆される。塩基対間へのインターカレーションにより TO 部位の回転が抑制され、明瞭な light-up 応答が観測されたものと考えられる。また、dAdA オーバーハングを有するミスマッチ siRNA やオーバーハングの

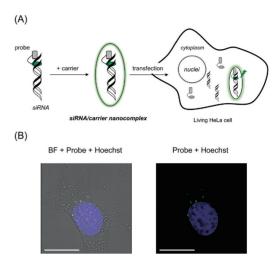


Fig. 4 (A) Schematic illustration of fluorescence imaging of siRNA delivery by using Py-AA-TO as an affinity-labeling agent for siRNA. (B) Typical fluorescence images of living HeLa cells at 3 h post-transfection.

BF: Bright Field, Green: Py-AA-TO, Blue: Hoechst33342. Scale bar:  $20\,\mu$  m.

(Reproduced from Ref. 17 with permission from the Japan Society for Analytical Chemistry.)

ないフルマッチ dsRNA に対しても蛍光強度は 3分の 1 程度に抑えられていた。このことからプローブの PNA 部位がオーバーハング構造、ならびにその塩基を識別していることが示唆された。こうした選択的蛍光応答は RNA が過剰(~ 5 倍)に存在した条件下でも維持されていた(Fig. 3, inset)。一方、Py 部位を持たないプローブ(AA-TO)を用いた場合、RNA が等量以上存在するとsiRNA 選択的な蛍光応答は見られなかったことから、Py 部位が選択的結合において重要な役割を果たしている。すなわち、スタッキング能力の高い Py を導入することにより、プローブは TO 部位と Py 部位で分子内スタッキングした初期構造をとるため(Fig. 2 参照)、TO 部位単体の非選択的な結合(二重鎖部位への結合)を抑制し、siRNA 選択性が向上したと考えている。これに加えて、結合時には末端の PNA- オーバーハング塩基対へ覆いかぶさることで 2 塩基の塩基対形成を促進する「分子キャップ」として機能していると推測している(Fig. 2 参照)。

本プローブの解離定数( $K_d$ )を蛍光滴定実験から算出したところ(Fig. 3, inset)、 $1.3\,\mu$  M と求まり、これは単純な RNA 二重鎖に対する値( $7.0\,\mu$  M)よりも 5 倍以上小さいことが分かった。さらに、dGdG オーバーハング塩基に対しては、シトシン塩基を組み込んだプローブを用いることで同様の選択性が得られたことから、汎用性のある分子設計であると言える。

### 6-2. siRNA デリバリー解析

続いて Py-AA-TO を siRNA のアフィニティーラベル化剤 (非共有結合に基づくラベル化剤) として利用し、デリバリー解析を試みた <sup>16,17)</sup>。 siGL2 と等量の Py-AA-TO を混合した緩衝溶液中にポリマーベースのキャリア (jetPRIME®, polyplus) を添加することで、キャリアに Py-AA-TO と siRNA の錯体が内包された (Fig. 4A)。こうして生成した siRNA/ キャリア複合体の平均粒径は238 nm で、プローブを添加しなかった場合 (227 nm) と同程度であった。この複合体の溶液を HeLa (ヒト子宮頸がん) 細胞の

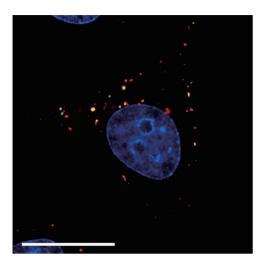


Fig. 5 Fluorescence images of living HeLa cells treated with Py-AA-TO/siGL2-containing complexes (green) in combination with lysosome staining (red) at 4 h post-transfection. The colocalization of Py-AA-TO/siGL2-containing complexes and the lysosome-staining probe is detected as yellow spots. Scale bar:  $20\,\mu$  m.

(Reproduced from Ref. 17 with permission from the Japan Society for Analytical Chemistry.)

培地へ添加し、3時間後蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞質に Pv-AA-TO の蛍光シグナルが輝点状に観測された(Fig. 4B)。こ れはエンドサイトーシスで取り込まれた複合体がエンドソーム内 にトラップされた状態であると考えられる。この小胞は時間が経 つと酸性化が進み、やがてリソソームへ融合する。実際にリソ ソーム染色剤との共染色実験から、確かにプローブのシグナルの 大部分がリソソームと重なっていた(Fig. 5)。ここで重要なこと は、プローブのシグナルは今回の濃度条件では細胞質全体には見 られず、複合体に選択的であったことである。Alexa647を修飾 した siRNA を用いて対照実験を行うと、Alexa のシグナルは細胞 質全体に観測されたことから、siRNA の一部はこの時間スケール では既に細胞内全体に放出されていることが分かった。一方、プ ローブのシグナルは変わらず複合体に由来する点状構造を示した。 これらの結果から、我々のプローブは siRNA/ キャリア複合体 (複 合体状態の siRNA) を選択的に可視化していることが分かった。 これは脂質ベースのキャリア (Lipofectamine2000®, invitrogen) を用いても同様であった。

この性質は、細胞内取り込みや放出を定量する際に極めて有用で、色素修飾した siRNA を利用する従来法では困難な解析が可能となる。例えば、汎用されるフローサイトメトリーを用いて、siRNA/キャリア複合体を取り込んだ細胞数をプローブの蛍光シグナルを検出することで評価すると、培地添加後 1 時間で 76%と見積もられ、これは Alexa-siRNA を用いた従来法で得られた 83%という値とほぼ同程度であった(Fig. 6)。このことは細胞内取り込みの初期段階においては、複合体状態の siRNA の取り込みを定量的に評価できることを示唆している。さらに、培地添加後 4 時間で培地を交換し、20 時間まで培養時間を伸ばしてみると、プローブのシグナルが観測される細胞数は徐々に減少していくことが分かった(Fig. 6)。この結果は複合体が解消するにしたがってプローブが siRNA から解離し、蛍光シグナルがオフになったためであると考えられる。実際、プローブのシグナル減少の半減期は

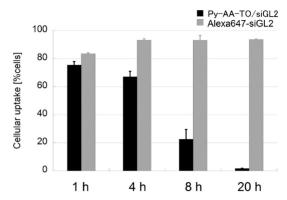


Fig. 6 Flow cytometric analysis of HeLa cells treated with Py-AA-TO/siGL2 (black) or Alexa647-siGL2 (gray)-containing complexes. The percentages of cells that exhibited fluorescence at various time points are shown.

(Reproduced from Ref. 17 with permission from the Japan Society for Analytical Chemistry.)

120
(%) 100
80
60
40
20
Control siGL2 Py-AA-TO Scramble siRNA

Fig. 7 Effect of the use of Py-AA-TO as an siRNA affinity-labeling agent on the gene silencing activity of siGL2.

(Reproduced from Ref. 16 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

およそ 1-2 時間と見積もられ、類似のキャリアで報告されている値  $^{(8)}$  に近い。従って、本プローブを用いれば、siRNA の細胞内取り込みだけでなく、その放出(あるいは複合体の解消)も簡便に解析することが可能である。一方、Alexa のシグナルは 4 時間での 93% という値のまま 20 時間後も変化が見られなかった (Fig. 6)。これは、色素を修飾した場合では色素が複合体から放出された後も、siRNA の状態にかかわらず光り続けているためで、siRNA の細胞内取り込みは解析できるものの、その後の siRNA 放出過程を評価することはできないことになる。

### 6-3. RNAi 活性への影響

デュアルルシフェラーゼアッセイにより、siRNA のサイレンシング活性を評価した。本プローブでアフィニティーラベル化したsiGL2 を導入した時の活性は、siGL2 単体の活性と同程度で、約80%であった (Fig. 7)。これは siRNA がキャリアから放出されるとプローブが速やかに解離した結果、インタクトな siRNA が細胞内に輸送されたためと考えられ、本プローブによるラベル化はRNAi 活性に影響を与えないことが示唆された。また今回の濃度条件ではプローブ導入による細胞毒性は見られなかった。

以上のように、本プローブを用いた解析では、本来の siRNA 活性を殆ど損なうことなく一連の細胞内デリバリー過程を可視化・評価することができる。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点に、本手法の本質的な価値がある。

## 7. おわりに

主に化学の観点から siRNA デリバリーのイメージング解析について概観し、我々が提案している新しいイメージング法について述べた。siRNA 選択性蛍光プローブを利用した siRNA イメージング法は、キャリアに内包された siRNA を選択的に可視化する点に特徴があり、複合体の取り込み・輸送から解消過程までを明瞭に可視化することが可能である。また、キャリアにも蛍光色素を修飾する必要がないため、実用化の要となるキャリア分子そのものの物性を評価し、かつ siRNA の活性との相関をより正確に評価し得る点も優れた特徴となる。さらに低コストかつ操作性の高い点も分析法として大きな利点となる。

一方、分子レベルでの挙動に加え、個体レベルでの siRNA/ キャリア複合体の薬物動態や RNAi 活性との相関を調べることも重要である。こうした分野では、自家蛍光や光散乱の影響を大きく受けやすい蛍光イメージングよりも、陽電子放出断層撮影(PET: Positron Emission Tomography)や 単 - 光 子 放 射 断 層 撮 影(SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography)、核磁気共鳴画像法(MRI: Magnetic Resonance Imaging)、近赤外光などを用いたいわゆる「 $in\ vivo\ 1$ メージング」が近年急速に発展している 19)。適切なモダリティを利用することで、イメージング技術は siRNA 医薬の実現に向けた研究開発において強力な分析手法になると考えられる。

#### [参考文献]

- A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans", *Nature*, 1998, 391, 806-810.
- P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp and D. P. Bartel, "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals", Cell. 2000, 101, 25-33.
- S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells", *Nature*, 2001, 411, 494-498.
- A. Gallas, C. Alexander, M. C. Davies, S. Puri and S. Allen, "Chemistry and formulations for siRNA therapeutics", *Chem. Soc., Rev.*, 2013, 42, 7983-7997.
- E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon, "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference", *Nature*, 2001, 409, 363-366.
- J.-B. Ma, K. Ye and D. J. Patel, "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain", *Nature*, 2004, 429, 318-322
- A. D. Judge, G. Bola, A. C. H. Lee and I. MacLachlan, "Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo", Mol. Ther., 2006, 13, 494-505.
- J. B. Bramsen, M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjær, B. R. Babu, T. Højland, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Odadzic, R. Smicius, J. Haas, C. Andree, J. Barman, M. Wenska, P. Srivastava, C. Zhou, D. Honcharenko, S. Hess, E. Müller, G. V. Bobkov, S. N. Mikhailov, E. Fava, T. F. Meyer, J. Chattopadhyaya, M. Zerial, J. W. Engels, P. Herdewijn, J. Wengel and J. Kjems, "A large-scale chemical

- modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity", *Nucl. Acids Res.*, **2009**, *37*, 2867-2881.
- A. Bouchie, "Companies in footrace to deliver RNAi", Nat. Biotechnol., 2012, 30, 1154-1157.
- M. V. Yezhelyev, L. Qi, R. M. O'Regan, S. Nie and X. Gao, "Proton-sponge coated quantum dots for siRNA delivery and intracellular imaging", J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 9006-9012.
- Y.-L. Chiu, A. Ali, C.-Y. Chu, H. Cao and T. M. Rana, "Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells", Chem. Biol., 2004, 11, 1165-1175.
- 12) A. Järve, J. Müller, I.-H. Kim, K. Rohr, C. MacLean, G. Fricker, U. Massing, F. Eberle, A. Dalpke, R. Fischer, M. F. Trendelenburg and M. Helm, "Surveillance of siRNA integrity by FRET imaging", *Nucl. Acids Res.*, 2007, 35, e124.
- 13) A. S. Wahba, F. Azizi, G. F. Deleavey, C. Brown, F. Robert, M. Carrier, A. Kalota, A. M. Gewirtz, J. Pelletier, R. H. E. Hudson and M. J. Damha, "Phenylpyrrolocytosine as an unobtrusive base modification for monitoring activity and cellular trafficking of siRNA", ACS Chem. Biol., 2011, 6, 912-919.
- 14) Y. Kamiya, A. Ito, H. Ito, M. Urushihara, J. Takai, T. Fujii, X. Liang, H. Kashida and H. Asanuma, "Selective labeling of mature RISC using siRNA carrying fluorophore-quencher pair", Chem. Sci., 2013, 4, 4016-4021
- Y.-L. Chiu, and T. M. Rana, "RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA", Mol. Cell, 2002, 10, 549-561.
- 16) T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, S. Nishizawa and N. Teramae, "Synthetic fluorescent probes capable of selective recognition of 3'overhanging nucleotides for siRNA delivery imaging", *Chem. Commun.*, 2015. 51. 1421-1424.
- 17) T. Sato, Y. Sato, K. Iwai, S. Kuge, N. Teramae and S. Nishizawa, "Fluorescence imaging of siRNA delivery by peptide nucleic acid-based probe", Anal. Sci., 2015, 31, 315-320.
- 18) C. A. Alabi, K. T. Love, G. Sahay, T. Stutzman, W. T. Young, R. Langer and D. G. Anderson, "FRET-labeled siRNA probes for tracking assembly and disassembly of siRNA nanocomplexes", ACS Nano, 2012, 6, 6133-6141.
- H. Hong, Y. Zhang and W. Cai, "In vivo imaging of RNA interference", J. Nucl. Med., 2010, 51, 169-172.

[著者プロフィール]

氏名:佐藤 貴哉 (Takaya SATO)

所属:東北大学大学院理学研究科化学専攻

連絡先:〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

電話 &FAX: 022-795-6551

E-mail: takaya.sato.p6@dc.tohoku.ac.jp

出身学校:東北大学理学部

学位:修士(理学)

現在の研究テーマ:細胞内 RNA 高次構造を検出する蛍光プロー ブの開発

氏名:西澤 精一(Seiichi NISHIZAWA)

所属:東北大学大学院理学研究科化学専攻

連絡先: 〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

電話: 022-795-6549 FAX: 022-795-6552

E-mail: nishi@m.tohoku.ac.jp

出身学校:北海道大学理学部

学位:博士(理学)

現在の研究テーマ:RNA 結合リガンドの開発と応用



# Topics on Chemistry

# キノンメチドシグナル増幅システム(QMSA)

同仁化学研究所 田中 敬子

癌の研究や診断において、存在量の少ないマーカーの検出が極めて重要とされている。癌マーカーの検出には抗体を用いた一般的な免疫法が用いられているが、感度が不足しており実用的とは言い難い。そのため、高感度な癌マーカー検出法の開発が必要不可欠とされている。

CARD(catalyzed reporter deposition)は、酵素を用いたシグナル増幅システムであり、HRP(Horseradish Peroxidase)とチラミド基質を用いた TSA(Tyramide signal amplification)法が一般的に用いられている。この方法では、チラミド基質が過酸化水素存在下で HRP と反応すると、反応性に富むラジカル中間体に変換され、近傍に存在するタンパク質中の電子リッチなアミノ酸残基(チロシンやトリプトファン)と共有結合する。このラジカル中間体は非常に寿命が短いため、HRP 近傍にシグナルを増幅させることが可能となる。チラミド基質として蛍光色素やビオチン誘導体を用いれば、直接的な蛍光検出やアビジン- 酵素複合体を利用した種々の測定法に適用することが可能である。

本稿では、Polaske らが開発した ALP (Alkaline phosphatase)を用いた新しいシグナル増幅システム QMSA (Quinone methide signal amplification) について紹介する。本システムは、基質がALP との反応によってキノンメチド (QMs) と呼ばれる反応性のシグナル分子を産生する機構に基づいている。基質がALP と反応すると、リン酸基の加水分解に伴い、フッ素が脱離してキノンメチドを形成する。このキノンメチドは近傍のアミノ基やチオール基などの求核性の高い官能基と結合し、蓄積される。基質として蛍光色素やビオチン誘導体を用いれば、TSA 法と同様に増幅シグナルとして検出することができる(図 1)。

Polaske らは本手法を開発するにあたり、二種類のレポーター分子(キノンメチド前駆体 1, 2)を用いて条件の最適化を試みている(図 2)。ジフルオロ型のキノンメチド前駆体 1 はジェミナルなフツ素原子を有しているため、脱リン酸化効率とキノンメチド反応率が低下する。そのため、標的部位以外への好ましくない拡散が生じ、本手法の基質としては適していないことが確認されている。一方で、モノフルオロ型のキノンメチド前駆体 2 は、最適な pH 条件において標的部位における明瞭なシグナル増幅が得られることが確認され、この基質を用いた本手法の有用性が示されている。

TSA法に加え、ALPを用いた新しい手法 QMSAを用いる利点として、多重染色への適用が可能となる点が挙げられる。Polaske らは、TSA 法にテトラメチルローダミン基質、QMSA 法に Cy5 基質を用いて、組織内の細胞膜と核の共染色を試みている。細胞膜の染色には E-cadherin、また核の染色には Ki67を抗原タンパク質として、それぞれに対し TSA 法と QMSA 法を適用した結果、明瞭な蛍光二重染色画像が得られており、多重染色への適用も可能であることが確認されている。

今回の結果は、HRP 以外の酵素を用いた高感度検出システムへの応用を示すものであり、多様な臨床診断や研究への展開が期待できるものと考えられる。

## [参考文献]

N. W. Polaske, B. D. Kelly, J. Ashworth-Sharpe, and C. Bieniarz, "Quinone Methide Signal Amplification: Covalent Reporter Labeling of Cancer Epitopes using Alkaline Phosphatase Substrates", *Bioconjugate Chem.*, **2016**, 27, 660.

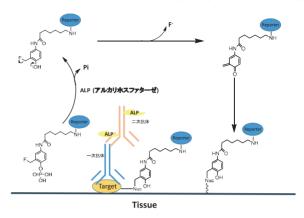


図1 キノンメチドシグナル増幅システム (QMSA)

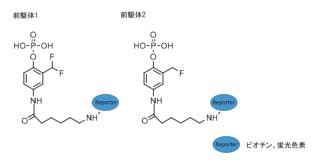


図 2 キノンメチド前駆体 1,2 の構造

## 第27回フォーラム・イン・ドージン開催のお知らせ

#### テーマ 低酸素応答の光と影 - エリスロポエチン純化から 40 年-

日時:2016年10月28日(金) 場所:熊本ホテルキャッスル

講演予定

河北 誠(熊本第一病院)

山本 雅之 (東北大学大学院医学系研究科)

藤田 祐一(名古屋大学大学院生命農学研究科)

三浦 恭子(北海道大学 遺伝病制御研究所)

魏 范研(熊本大学大学院生命科学研究部)

原田 浩 (京都大学放射線生物研究センター)

武田 憲彦(東京大学大学院医学系研究科)

※参加登録開始は、2016年7月下旬を予定しております。

## 学会展示、ポスター発表のご案内

#### 第89回日本生化学会大会

期日:2016年9月25日(日)~27日(火)

会場:仙台国際センター展示場

展示ブースでお待ちしております。

ぜひ、お立ち寄り下さい。

# 新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

## マイトファジー検出蛍光プローブ

## **Mitophagy Detection Kit**

#### <特長>

- 1. 低分子蛍光試薬を用いてマイトファジーを簡便に検出
- 2. 蛍光顕微鏡による生細胞イメージングにも適用
- 3. 付属のリソソーム染色試薬との共染色によりマイトファ ジーの確認が可能

ミトコンドリアはエネルギー産生の場として知られ、細胞内で重要な機能を持つオルガネラの一つです。近年では、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因の一つに不良化したミトコンドリアの蓄積が報告され、mitophagy がその中で重要な役割をもった機構であることが明らかになってきています。mitophagy は酸化ストレスや DNA 損傷等により不良化したミトコンドリアを選択的に除去するシステムであり、オートファゴソームにより隔離され、リソソームと融合し消化されます。

小社では mitophagy を検出する蛍光性低分子 (Mtphagy Dye) を製品化いたしました。 Mtphagy Dye は細胞内のミトコンドリアに集積し、化学結合により固定化され、周りの環境により蛍光強度が低くなつています。一方、mitophagy が誘導されると、ミトコンドリアがリソソームと融合し、その結果 Mtphagy Dye の蛍光 強度 が増大します。本キットは mitophagy を検出する Mtphagy Dye とリソソームを染色する Lyso Dye で構成されております。

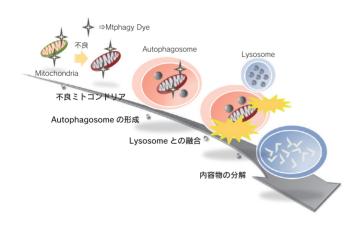


図 1 Mtphagy Dye による mitophagy 検出機構

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Mitophagy Detection Kit	1 set	36,000	MD01

# 新製品 DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

## ミトコンドリア局在型一重項酸素検出 蛍光プローブ

# Si-DMA for Mitochondrial Singlet Oxygen Imaging

#### <特長>

- 1. 細胞内で一重項酸素の蛍光イメージングが可能
- 2. 一重項酸素に非常に高い選択性

一重項酸素は活性酸素種の一つで、非常に強い酸化力を持ち、皮膚のシミやシワの原因となることが知られております。最近ではレーザー光と光感受性物質により発生する一重項酸素を利用する光線力学的治療法も行われております。一重項酸素を検出する既存の蛍光試薬は、細胞膜を透過しないため細胞で使用できないという欠点がありましたが、真嶋らが開発した一重項酸素検出蛍光試薬 Si-DMA は細胞膜を容易に透過し、ミトコンドリアに集積され一重項酸素に選択的に応答しますり。Si-DMA は一重項酸素と反応するに受出を発しませんが、一重項酸素と反応すると蛍光強度が増大します。そのため、これまでできなかった、細胞内の一重項酸素蛍光イメージングが可能です。

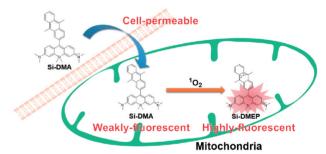


図1 Si-DMA の細胞染色原理

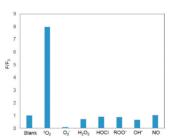


図2 Si-DMAの一重項酸素反応特異性

#### [参考文献]

 S. Kim, T. Tachikawa, M. Fujitsuka and T. Majima, J. Am. Chem. Soc., 2014, 136 (33), 11707-11715.

T. Majima, S. Kim, T. Tachikawa and M. Fujitsuka, WO 2015194606, A1(23, December, 2015)

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Si-DMA for Mitochondrial	0.44	20.000	MT05
Singlet Oxygen Imaging	2 μg	20,000	IVITUS

本製品は大阪大学の真嶋哲朗教授らにより開発された製品です。

# 20 samples 包装追加

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

## レドックス応答性タンパク質解析キット

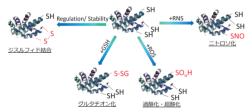
#### -SulfoBiotics-

# Protein Redox State Monitoring Kit Plus <特長>

- 1. タンパク質の SH 基数が目視で分かる
- 2. ウェスタンブロット解析が可能
- 3. 使いきりタイプで操作が簡便

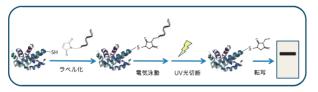
タンパク質システインのチオール基修飾は、代表的な翻訳後修飾の一つであり、生体内のレドックス変化に応答して生じます。近年、このようなチオール基の修飾が、転写やタンパク質発現、細胞死などの様々な細胞応答を制御していることが明らかにされてきています。チオール基の翻訳後修飾によるタンパク質の機能制御を理解するためには、個々のチオール基の酸化還元状態を解析することが必要不可欠です。

本製品を用いることで、タンパク質のチオール基のレドックス 状態をウェスタンブロット法において可視化することが可能で す。



複数種の修飾が生体内でコントロールされ、様々な生命現象に関わっている。

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus の解析原理



本キット中のSH標識試薬は、タンパク質へのラベル化後にUV 光の照射によりラベル化物を切断することが可能であるため、ウエスタンブロットによる解析が可能となります。

※動物細胞用に最適化されています。

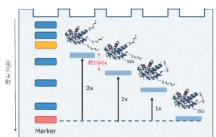


図1 電気泳動によるタンパク質 SH 基数の可視化

品名 容量 希望納入価格(¥) メーカーコード

-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus 5 samples 23,000 SB12

本製品は東京工業大学の久堀教授、原特任助教らにより開発された製品です。

# 新製品

### DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

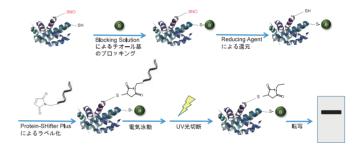
## S- ニトロシル化タンパク質解析キット

#### -SulfoBiotics-

# Protein S -Nitrosylation Monitoring Kit <特長>

- 1. タンパク質の S ニトロシル化状態が目視で分かる
- 2. ウェスタンブロット解析が可能
- 3. 使いきりタイプで操作が簡便

タンパク質 S- ニトロシル化反応は、一酸化窒素(NO)によって起こる重要な翻訳後修飾であり、転写やタンパク質発現、シグナル伝達などの様々な細胞機能の制御に関与していることが明らかにされています。本キットには、タンパク質内遊離チオール基のブロッキング剤、S-ニトロシル基の選択的還元剤および S-ニトロシル基還元後のチオール基のラベル化剤が含まれており、タンパク質内の S-ニトロシル基をゲル電気泳動法、ウエスタンブロット法によって解析することが可能です。



### [参考文献]

- S. Hara, Y. Tatenaka, Y. Ohuchi and T. Hisabori, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015, 456(1), 339.
- X. Wang, N. Kettenhofen, S. Shiva, N. Hogg and M. Gladwin, Free Radic. Biol. Med., 2008, 44, 1362.
- M. T. Forrester, M. W. Foster, M. Benhar and J. S. Stamler, Free Radic. Biol. Med., 2009, 46(2), 119.
- M. D. Kornberg, N. Sen, M. R. Hara, K. R. Juluri, J. V. K. Nguyen, A. M. Snowman, L. Law, L. D. Hester and S. H. Snyder, *Nat. Cell Biol.*, 2010, 12(11), 1094.

品名

容量 希望納入価格(¥) メーカーコード

-SulfoBiotics- Protein

S-Nitrosylation Monitoring Kit 20 samples 59,000

SB14

本製品は東京工業大学の久堀教授、原特任助教らにより開発され た高分子ラベル化剤を使用しております。

#### 関連試薬

その他の生体硫黄関連試薬は下記キーワードで検索下さい。

生体硫黄



# 細胞毒性測定 LDH Assay Kit

# Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

<特長>

- 1. 生細胞存在下(ホモジニアス)、および細胞培養液のみ(ノンホモジニアス)の両方の系で死細胞数の測定が可能
- 2. 測定毎の溶液調製が不要
- 3. [51Cr] リリースアッセイのようなラジオアイソトープは不要

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットです。本キットは、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えても細胞傷害を測定することが可能です(ホモジニアスアッセイ)。なお、一般的に用いられる細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定する方法も可能です(ノンホモジニアスアッセイ)。また、調製した溶液は長期間保存でき、用時調製する必要がありません。そのため、多検体アッセイから、少ない検体数の測定にも対応することができます。

#### Working solution 調液後の安定性評価

LDH アッセイに使用する Working solution は、調製後 6 ヶ月間冷蔵にて保存が可能です。調製後の溶液が安定なため、試薬の無駄を省くことができます。



#### 細胞毒性試験の比較

複数の指標で細胞を測定し、データの裏付けを取ることをオススメします。

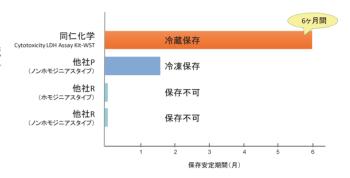


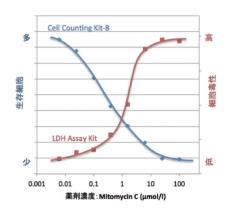
例えば、小社 Cell Counting Kit-8 は生細胞の呼吸活性を測定するキットですが、測定原理上、毒性試験を行う上で、生細胞が減少しているのか、もしくは細胞自体の活性が落ちているのか分かりません。そこで別の指標を用いて細胞アッセイを行いデータの裏付けを取ることが重要です。

右図のデータは、HeLa 細胞に Mitomycin C を各濃度で添加した際の細胞毒性を Cell Counting Kit-8 と Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を併用して測定した結果です。 Cell Counting Kit-8 を用いた生細胞アッセイでは、Mitomycin C の濃度が高くなる程、吸光度が減少しており、一方で Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた死細胞アッセイでは吸光度が増加しており、毒性試験により生細胞が減少している確かなデータが得られました。

#### Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST の測定原理







品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
Cytotoxicity LDH	100 tests	9,600	
Assay Kit-WST	500 tests	25,400	CK12
Assay Kit-W51	2000 tests	38,000	

ホームページアドレス

URL: http://www.dojindo.co.jp/ E-mail: info@dojindo.co.jp フリーファックス フリーダイヤル 0120-021557 0120-489548



ドージンニュース No.157 平成 28 年 6 月 28 日発行 株式会社同仁化学研究所 DOJINDO LABORATORIES 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 〒 861-2202 発行責任者 満田健一 編集責任者 永田貴裕 年4回発行 許可なくコピーを禁ず