

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」  
平成 17 年度採択研究代表者

中村 義一

(東京大学医科学研究所 教授)

## 「多目的 RNA ナノセンサー・モジュレーターの開発」

### 1. 研究実施の概要

遺伝暗号の発見から 40 年間余り、64 通りの遺伝暗号のうち、終止コドンの解読の仕組みが不明であったが、我々は 15 年余り費やし、解離因子がペプチド・アンチコドンをコードし、終止コドンを読み取ることを発見した(Nature 2000)。この発見は遺伝暗号解読の完全解明という基本的な貢献とともに、タンパク質による tRNA 分子の「機能的な擬態」を証明した点からも重要である(Cell 2000; TiBS 2003)。これまでに我々の研究を含め複数の翻訳因子の結晶構造が解かれ、tRNA 分子との「構造的な擬態」が明らかになった。このように、タンパク質と RNA との分子擬態が機能と構造の両面で“make sense”であるならば、RNA を用いて目的とする標的分子を擬態あるいは識別する機能的 RNA の創成も夢ではない。

この可能性に関する feasibility study が完了し、本研究の体制が整った。利用した技術は、試験管内人工進化(SELEX)法とよぶ、ランダムな配列の RNA プールの中から標的分子に結合する特異的な RNA (アプタマー)を釣り上げる公知技術である。その結果、①RNA 結合部位を持たない標的や細胞表面受容体に対してアプタマーを創製可能、②塩基修飾により血清中や細胞内で安定化可能、③抗体よりも強い結合力と特異性をもたらす、④細胞内や細胞表面で機能しうる、⑤標的物質の表面構造を広範囲に認識する、といった点が明らかになった。

このような RNA の特性は、単に一次配列や配列相補性に依存して働くだけでなく、タンパク質と同レベルの個性ある立体構造を形成して機能する、高分子マテリアルとしての RNA のポテンシャルを強く裏打ちする結果であった。そのため、RNA マテリアルを利用した医用あるいは計測分析の基盤を確立するために本研究を構想した。

本研究は標的分子を選び、それらに対する RNA アプタマーを創成し利用するという、目的が明確な「もの作り」プロジェクトであるため、以下のように標的分子に区分して研究項目を定める。

- ① 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- ② IgG に対する RNA センサーの多目的利用
- ③ RNA に対する RNA アプタマーの開発
- ④ 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発
- ⑤ 細胞内 RNA 可視化システムの開発

## 2. 研究実施内容

### 1. 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発

#### 1) 炎症性サイトカイン Midkine に対する RNA アプタマーの開発

種々の自己免疫疾患に関与する Midkine を標的とした SELEX を実施し、約 20 種類のアプタマーを取得することに成功した。このうち、Midkine の有する細胞遊走活性を阻害する数種の最適化（構造修飾、最小化）アプタマーを得ることができた。さらに、多発性硬化症 (MS) の疾患マウスモデルである EAE モデルや術後臓器癒着のモデルを用いて薬効試験を実施した結果、優れた病態改善効果が認められた。MS は効果的な医薬のない難治性の中枢神経系の自己免疫疾患であり、世界で約 250 万人の患者が存在する。本研究で作製した Midkine アプタマーは過去に試験されたいずれの MS 医薬（含む候補）品に比較して圧倒的に優れた予防・治療成績が確認され、米国 (FDA) での臨床試験を前提とした臨床開発のステージに到達した。かねて MS が調節性 T 細胞 (Treg) の減少と相関することが指摘されていたが、本研究の過程で、Midkine が Treg の抑制因子であることを世界で初めて発見し (Nature Medicine 投稿)、Midkine アプタマーが MS のみならず自己免疫疾患に対する広範な新規医薬に発展する可能性も期待される。

#### 2) 細胞表層発現系を用いた SELEX

細胞表層に破骨細胞分化因子 RANK を恒常的に発現する培養細胞株 (CHO 細胞由来) を樹立し、細胞を用いた SELEX を行い、RNA アプタマー候補を取得した。また、甲状腺刺激ホルモン TSH の受容体 (TSHR) を過剰発現する細胞株 (CHO 細胞由来)、あるいは TGF- $\beta$  受容体 II 型 (TGF  $\beta$  RII) を一過性に過剰発現する培養細胞系 (293T 細胞) を標的とした SELEX により RNA アプタマー候補を取得した。蛍光ラベルしたアプタマー候補を用いたフローサイトメリーにより標的タンパク質を特異的に認識するアプタマーが存在するか、また、表面プラズモン共鳴テクノロジーによりアプタマー候補と標的タンパク質との結合があるか検索している。

昨年度取得した抗 TGF- $\beta$  受容体 III 型 (TGF  $\beta$  RIII) RNA アプタマーを FITC 標識し、プローブとして用いフローサイトメリーを行い、TGF  $\beta$  RIII への特異的な結合を可視化する系を確立した。

#### 3) 精製タンパク質を用いた SELEX

血管内皮細胞成長因子 VEGF の受容体 II 型 (KDR) と抗体不変部 Fc とのキメラタンパク質を標的とした SELEX を行い、計 16 クローンの抗 KDR アプタマーの取得に成功した。現在、培養細胞を用いて、これらアプタマーが KDR の機能に影響を及ぼすか検証している。TGF- $\beta$  RII については、細胞内ドメインおよび細胞膜貫通ドメインを欠失させた His 標識可溶化型 TGF- $\beta$  RII (sTGF- $\beta$  RII-His) 発現ベクターを構築し、ヒト培養細胞へ導入し、その培養上清から金属アフィニティクロマトグラフィー樹脂により sTGF- $\beta$  RII-His を精製し SELEX を行い、RNA アプタマーの取得を進行中。

当初計画のその他のサイトカインと受容体については、大腸菌によるリコンビナントタンパク質の発現系を作製し、SELEX を行うのに十分な量のタンパク質の調製を完了した。これらのタンパク質を用いて SELEX を行っている。また、ヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する接着分子で、がん細胞の増殖および浸潤・転移を制御することが明らかになっているレセプターを新たに標的タンパク質として、SELEX を開始した。

## 2. IgG に対する RNA センサーの多目的利用

### 1) 新規アプタマーの開発

ヒト以外の動物種の IgG に対する新規アプタマーの開発を目的としてマウス IgG を標的タンパク質とした SELEX を行い、サブクラスの一つに特異的に結合するアプタマーの取得に成功した。取得した RNA アプタマーは最適化のため、各ヌクレオチドに対する化学修飾による安定化の検討及び、鎖長の最小化を施した。また、非特異的結合を減少させ、目的のアプタマーを少ないサイクル数で効率的に取得するため、キャピラリー電気泳動を用いた SELEX 法の開発に着手した。喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に関与し、創薬ターゲットとしても有効とされるヒト IgE に対して SELEX を行った。3 サイクルの後、収束した配列の結合活性を評価したところ、特異的にヒト IgE に結合する新規な DNA アプタマーを取得することに成功した。

### 2) 抗体精製用分離剤の開発

ヒト IgG アプタマーをリガンドとした抗体医薬品精製用アプタマー樹脂の開発を進めた。精製効率を上げるため、樹脂、リンカー、固定化法などの選定を行った。並行して、クロマトグラフィーを用いた動的分離精製評価法および HPLC を用いた IgG オリゴマー分析法を確立した。このように、IgG アプタマーは基礎研究がほぼ完了し、大手試薬メーカーへのライセンス導出段階にある。1年以内に世界初のアプタマー試薬として発売を目指している。

### 3) ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

NMR 法を用いてヒト IgG に結合する RNA アプタマーと IgG との相互作用解析を行った。RNA アプタマーは、天然に IgG と相互作用する Fc レセプターや ProteinA とは異なった様式でヒト IgG に結合することが示唆された。また、複合体の X 線結晶構造解析を試みている (同研究領域の大阪大学・森グループとの共同研究)。フェムト秒レーザーを用いた結晶核発生技術により、結晶が得られており、構造解析に適した結晶化条件のスクリーニングを行っている。

## 3. RNA に対する RNA アプタマーの開発

### 1) 抗 HIV-1 TAR アプタマー

昨年度取得した HIV-1 TAR-RNA に結合する新規 kissing-loop 型 RNA アプタマーの生化学的・物理化学的解析を行った。アプタマーの結合活性には、すでに報告されていた kissing-loop 型アプタマーとは異なり、1 価カチオンによって部分的に代替され得る 2 価カチオンと、絶対的に必須な 2 価カチオンが関与することが示唆された。この結果は、シンプルな塩基対形成を基盤とする kissing-loop 型 RNA-RNA 相互作用に、作用機構の異なる複数の 2 価カチオンが関与する事を示す初めての報告である。

### 2) リボザイム (RNA 酵素) の活性化を指標としたセクション系の確立

塩基対形成に依存せずに RNA 構造を認識する RNA アプタマーを取得するための普遍的な実験系として、リボザイムの触媒反応を指標としたセクション系の開発を試みた。人工的なリガーゼ活性をもったリボザイムの RNA-RNA 相互作用領域を、標的 RNA 構造とランダム配列に置換したライブラリーを用いることにより、RNA 構造を認識する RNA アプタマーを取得するための選別システム

の開発に成功した。

#### 4. 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

##### 1) AML1-MTG8 融合タンパク質に対する RNA センサーの開発

抗 AML1 アプタマーならびに抗 MTG8 アプタマーを用いて、AML1-MTG8 融合蛋白質に特異的な白血病細胞の識別系の作製を行った。アプタマーの検出法には、RNA を高感度にかつ迅速に検出できる Real-Time RT-PCR を用いた。タンパク質または白血病細胞のライセートとアプタマーを混合し、タンパク質に結合したアプタマーと結合しないものを陽イオン交換カラムによって分離し、結合したアプタマーのみを Real-Time PCR で定量することで、AML1-MTG8 の検出に成功した。また、アプタマーの生理活性の評価を行っており、抗 MTG8 アプタマーが、MTG8 による転写抑制を阻害することができるかどうかを調べ、診断薬だけでなく治療薬としての可能性を探っている。

##### 2) AML1 タンパク質に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

AML1 タンパク質に結合する RNA アプタマーの NMR スペクトルの解析から、コンパクトで安定な CACG ループと C:G:A の塩基が平面に並ぶ Base triple 構造を形成することがわかった。AML1 タンパク質は細胞内で DNA の広い主溝と相互作用するが、Base triple 構造の形成によって RNA の A 型らせん構造の主溝が広がることから、RNA アプタマーが DNA を擬態して AML1 タンパク質に結合していることが示唆された。現在、立体構造の精密化を行っている。

#### 5. 細胞内 RNA 可視化システムの開発

RNA の蛍光標識に用いる Cy3(Cyanine 3)、Cy5(Cyanine5)は細胞内へ容易に透過し、また細胞毒性もないため、Cy3 や Cy5 に対するアプタマーを作製してこれを上手く利用すれば、標識した RNA の細胞内動態を瞬時に簡便に検出することが可能となる。本年度の研究によって、Cy3 に対する RNA アプタマーの作製に成功した。アプタマー結合により Cy3 の蛍光特性と強度が変化し、また、Cy5 に対しても交差性を有することを見出した。また、Cy3 アプタマーを固相化したチップが特異的な Cy3(蛍光)センサーとして働くことも確認した。アプタマーの最適化、蛍光特性の詳細な分析、可視化ツールとしての開発を進めている。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「東大医科研」グループ

①研究分担グループ長：中村 義一(東京大学医科学研究所 教授)

#### ②研究項目

- ・細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- ・RNA に対する RNA アプタマーの開発
- ・細胞内 RNA 可視化システムの開発

(2)「リボミック」グループ

①研究分担グループ長：藤原 将寿(㈱リボミック 研究開発部長)

②研究項目

- ・細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- ・IgG に対する RNA センサーの多目的利用

(3)「埼玉がんセンター」グループ

①研究分担グループ長：神津 知子(埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 主幹)

②研究項目

- ・細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサー及び治療薬の開発
- ・融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

(4)「千葉工大」グループ

①研究分担グループ長：坂本 泰一(千葉工業大学工学部 講師)

②研究項目

- ・NMR 法を用いた RNA アプタマーの立体構造解析
- ・RNA アプタマーとターゲットとの相互作用解析

## 4. 研究成果の発表等

### (1)論文発表(原著論文)

- Ohuchi, S.P., Ohtsu, T., Nakamura, Y.: Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie*, **88**:897-904 (2006).
- Miyakawa, S., Oguro, A., Ohtsu, T., Imataka, H., Sonenberg, N., Nakamura, Y.: RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA*, **12**:1825-1834 (2006).
- Y. Tanaka, K. Akagi, Y. Nakamura, T. Kozu. RNA aptamers targeting the C-terminal of KRAS oncoprotein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification. *Oligonucleotides*, **17**:12-21 (2007).
- Tanaka-Fujita, R., Soeno, Y., Satoh, H., Nakamura, Y., Mori, S.: Human and mouse protein non-coding snoRNA host genes with dissimilar nucleotide sequences show chromosomal synteny. *RNA*, in press.

### (2)特許出願

平成 18年度特許出願:2件(CREST 研究期間累積件数:6件)