

「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性 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、本実験の体制が整った。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ちうる、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 センサーの開発
- ② 細胞内 RNA 可視化システムの開発

- ③ RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発
- ④ 抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用
- ⑤ 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

2. 研究実施内容

(1) 「リボミック」グループ新規実験設備の整備

高機能性アプタマーの作製および開発を効率的におこなうために、リボミック本社内に『RNA 創薬研究所』（所長：藤原将寿）を設立した。所内には、サーマルサイクラーや高速冷却遠心機、シークエンサー等の分子生物学実験機器類、ならびに安全キャビネットや CO₂ インキュベータ等の細胞培養実験機器類を整備し、SELEX によるアプタマーの作製から培養細胞をもちいたアッセイにいたる一連の実験をすべておこなうことが可能となっている。また、新技術開発のため、キャピラリー電気泳動装置や CD スペクトロメーターを設置した。

(2) 細胞表面受容体・リガンドに対する RNA センサーの開発

RANK、RANKL、TGF β 、炎症性サイトカイン P、ならびに VEGFR、TSHR の細胞表面発現株をもちいて SELEX をおこなったところ、サイトカイン P に対して特異的に結合する RNA アプタマーが複数取得された。これら取得されたアプタマーのうちの数種類については、サイトカイン P 刺激に依存的な細胞機能に対する阻害活性を示す事が確認された。さらにこれらのアプタマーは、サイトカイン P のファミリーに属する他のサイトカインの活性には影響しないことから、極めて高い特異性を持った炎症性サイトカイン阻害剤としてもちいる事ができると考えられる。今後、最も高い阻害活性を示したアプタマーの最適化をおこない、また、これと並行してこのアプタマーをもちいた診断システムおよび炎症性疾患治療薬の開発に着手する。

他の標的タンパク質に対しては、現時点ではアプタマー取得に至っていないため、引き続き SELEX をおこなう。

(3) 細胞内 RNA 可視化システムの開発

蛍光誘起化合物に対するアプタマーの作製を試みた。これまで1年間の試行錯誤を行ったが、取得は容易ではなかった。その理由は、蛍光誘起化合物は平面構造となるものが大半であり、RNA アプタマーは平面構造を作るには不向きなためであろう。更なる試行錯誤の結果、ようやく候補となる RNA が取得できた。それら候補 RNA の検証を実施中である。

(4) RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発

ビーズに固相化した HIV-1 ウィルスの制御 RNA シグナルを標的とした SELEX をおこない、標的 RNA シグナルに対する RNA アプタマーの作製を試みた。結合した RNA 分子を回収する際、結合にもちいたバッファーから、キレート剤によって 2 価カチオンのみを排除するこ

とによって、塩基対形成によってではなく、立体構造によって標的 RNA シグナルと結合している RNA 分子のみを遊離させた。これによってすでに、標的 RNA のステム・ループ部分に結合する新規な kissing-loop 型 RNA アプタマーが取得されており、現在、その解析を進めている。また、今後これと並行して、ライブラリーのデザインをふくめた条件検討を引き続きおこない、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を開発する。

(5) 抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用

1) ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの解析

ヒト IgG に結合する RNA アプタマーを取得しており、それらの特性を詳細に分析し、最適化を行った。その結果、化学合成が容易な鎖長まで最小化し、必須な機能構造を特定することができた。また、要所の塩基に修飾を導入することにより、アプタマーの安定化にも成功した。取得したアプタマーはヒト IgG に特異的で異種動物の IgG にはほとんど交差しない。これらのアプタマーは、IgG の不変領域 Fc 部分に結合する。アプタマーを樹脂に固相化した affinity resin を作製し性能を試験した結果、ヒトの血清から高効率に IgG を分離精製できることを確認した。

2) ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの立体構造解析

ヒト IgG に結合する RNA アプタマーの NMR スペクトルを測定したところ、コンフォメーションが多形となっていることがわかった。温度・試料溶液について条件検討をおこなったが解析可能なスペクトルは得られなかったため、現在、多形を示さないような RNA アプタマーの配列を検討している。

(6) 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発

次年度より参加する「埼玉がんセンター」グループは、白血病の原因となる染色体転座由来の融合タンパク質に対する RNA アプタマーの作製を計画しているが、すでに融合前の各タンパク質に対するアプタマーを取得している。今後、これらを利用して、転座由来の融合タンパク質に対する特異的な検出系を作製する。そのため、各のアプタマーの小型化・最適化をおこない、これらをプローブとして同時に結合させることで正常な産物と区別して融合タンパク質を判別できる検出系を作製する。融合蛋白質を過剰発現させた培養細胞を特異的に認識できる検出系を作成した後、白血病細胞からの特異的な高感度検出系を開発する。

また、すでに取得済みのアプタマーについては、現在、ふたつのドメインに分割して NMR による構造解析を進めている。それぞれのドメインについて良好なスペクトルが得られており、すでに内部ループ部分における非ワトソン・クリック型の GA 塩基対の存在を示唆する結果が得られている。さらに、標的タンパク質の調製も進めており、アプタマーとの相互作用を解析するための準備をおこなっている。

3. 研究実施体制

「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 基礎医科学部門・遺伝子動態分野、教授）
- ② 研究項目：
 - 細胞表面受容体に対する RNA センサー及び治療薬の開発
 - RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発
 - 細胞内 RNA 可視化システムの開発

「リボミック」グループ

- ① 研究分担グループ長：藤原 将寿（(株)リボミック、開発部長）
- ② 研究項目：
 - RNA センサー及び治療薬の開発
 - 抗 IgG アプタマーを用いた RNA センサーの開発

「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、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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Sakamoto, T., Oguro, A., Kawai, G., Sonenberg, N., Ohtsu, T., Nakamura, Y.: NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A (ISSUE COVER selected). Nucl. Acids Res., **33**: 745-754 (2005).
- Mochizuki, K., Oguro, A., Ohtsu, T., Sonenberg, N., Nakamura, Y.: High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation. RNA, **11**: 77-89 (2005).
- Ohuchi, S.P., Ohtsu, T., and Nakamura, Y. (2006) Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie*, in press.

（2）特許出願

平成 17 年度特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：1 件）