

「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、① RNA 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關与する Midkine(MK)を標的とした SELEX を実施、約 20 種類の第一世代アプタマーを取得することに成功、その配列をもとに約 60 種の改変体(構造修飾、短鎖化)を作製した。その中で、多発性硬化症(MS)の疾患マウスモデル(EAE モデル)で優れた病態改善効果を示す MK アプタマーを見出すことに成功し、発症の予防のみならず(従来にはない)顕著な治療効果も確認された。さらに、際立った薬効更にその作用機序は、MK が調節性 T 細胞(Treg)に作用し病態悪化を起こすが、MK アプタマーは MK に結合することで、結果として病態改善が認められることを明らかにした(Wang et al., PNAS 105:3915-3920, 2008)。この事実は、自己免疫疾患において MK と Treg が關与する疾患にも本アプタマーが効果を示すことを示唆している。MS は有効な治療薬のない難治性の中樞神経系自己免疫疾患であり、現在、医薬品開発を目的に GLP 安全性・毒性試験に必要な予備検討(MK アプタマーの定量法の確立、マウスを用いた体内動態試験等)を、薬剤候補 MK アプタマーを用いて実施中である。更には、抗がん剤としての適応を考えたスクリーニングについても実施中である。

#### (2) 細胞表層発現系を用いた SELEX

CHO 細胞膜表面に組換え型ヒト RANK タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立し、非発現細胞を併用した differential な細胞丸ごと SELEX を継続的に実施し、多数の候補分子を分離した。単離したクローンと soluble RANK の親和性を SPR 法を用いて確認した結果、アプタマーの 1 クロオンが soluble RANK に結合することを確認し、その性状分析を進めている。

#### (3) 精製タンパク質を用いた SELEX

VEGF 受容体 II 型(KDR)-Fc キメラ蛋白質を標的とした SELEX により取得されていた計 16 クロオンの抗 KDR アプタマーについて、培養細胞をもちい、これらのアプタマーによる KDR の機能阻害効果を解析したが、明確な機能阻害を示すクローンはみられなかった。現在、KDR の機能阻害能をもったアプタマーを取得するために、リガンド結合に關与していないと考えられる Ig 様ドメイン 7 を欠失させた標的蛋白質の調製を行っている。

His 標識可溶化型ヒト TGF  $\beta$  II 型受容体(TGF  $\beta$  RII)を標的として SELEX を行うことにより、TGF  $\beta$  RII を認識する RNA アプタマーを単離することに成功した。表面プラズモン共鳴法を用いた生体分子相互作用測定により、アプタマーが TGF  $\beta$  RII に特異的に結合することを明らかにした。現在、抗 TGF  $\beta$  RII アプタマー、抗 TGF  $\beta$  RIII アプタマーを蛍光色素 Alexa Fluor で標識し、II 型、III 型

受容体の細胞表面発現パターンを解析するセンサーとして利用できるか検討している。

炎症性サイトカインや growth factor、ならびにそれらのレセプターを標的として SELEX を行い、複数の RNA アプタマーを取得した。それらの特性分析を進めているが、リガンド-レセプターの相互作用を阻害するアプタマーやレセプターの細胞外ドメインに強い結合を持つクローン等を確認。今後、in vitro 細胞試験に解析を進める。

## 2. IgG に対する RNA センサーの多目的利用

### (1) 抗体精製用分離剤の開発

抗体医薬品の精製に応用できる IgG アプタマーの商品化を目指し、アプタマーの性能評価を行った。クロマトグラフィー法を用いた動的条件下でのアプタマー樹脂の性能評価を行った結果、1.0 mL/min の流速下においてもヒト血清中の IgG が高純度で精製できることがわかった。また、SPR 法を用いて IgG アプタマーに対するキメラ抗体やヒト化抗体の親和性について調べた。その結果、IgG アプタマーが、キメラ抗体 Remicade、ヒト化抗体 anti-CD26 mAb、Fc 融合タンパクである RANK-Fc、CD28-Fc と強く結合することがわかった(Miyakawa et al., RNA in press)。さらに、アプタマー樹脂を用いて細胞培養上清からヒト化抗体 anti-CD52 mAb を精製することを試みた結果、高純度に精製できることがわかった。本アプタマー樹脂の IgG 精製効率を上げるため、樹脂の選定、リンカーや末端修飾の改良、固定化方法の最適化、及び合成アプタマーの高純度化を行った。その結果、ほぼ Protein A 樹脂と同等の IgG 精製効率を備えたアプタマー樹脂を作製することに成功した。

### (2) 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 とアプタマーの相互作用解析を行い結合部位を特定した(Miyakawa et al., RNA in press)。今年度はさらに、X線結晶構造解析によって、それらの複合体の立体構造を明らかにした(同研究領域の大阪大学・森グループとの共同研究)。アプタマーは、その内部ループ部分の塩基をフリップアウトすることによって、IgG のチロシン残基とスタッキング相互作用していることがわかった。このようなスタッキング相互作用の他にも、多くの水素結合が形成されていることが示唆された。また、結合に必要な金属イオンについても、相互作用面やアプタマーの立体構造形成に重要な部位にあることが明らかとなった(投稿論文作成中)。

## 3. RNA に対する RNA アプタマーの開発

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実験系として、人工のリボザイム(RNA 酵素)の触媒反応を指標としたセレクション系の確立に成功した。このリボザイムは、触媒(RNA ライゲーション)反応を直接的に担う活性部位の他に、RNA-RNA 相互作用によって活性部位の構造を安定化させる周辺領域が高効率な反応に必要であるため、周辺領域の一部を標的 RNA 構造に、その領域と相互作用する部位をランダム配列に置換したライブラリーから、リボザイムの触媒活性を指標として標的 RNA 構造と相互作用する RNA モティーフ(アプタマー)を取得できる。GAAA テトラループに対するセレクションを行い、既知の GAAA ループ受容

体モチーフを持ったクローンを多数取得することができた。また、天然の RNA 構造体において RNA-RNA 相互作用に関与しない C ループに対するセレクションを行い、C ループに対する新規受容体モチーフの取得に成功した(Ohuchi et al., NAR in press)。

#### 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

これまでの in vitro の実験により、抗 MTG8 アプタマーが白血病の原因となる AML1-MTG8 融合タンパク質を DNA から解離させることを明らかにしていた。そこで、レンチウイルスベクターを用いてアプタマーの発現系を白血病細胞のゲノムに導入し、安定してアプタマーを発現させる系を構築した。現在、細胞内でのアプタマーの発現によって、AML1-MTG8 による転写阻害が解除されるか検討している。

##### (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 アプタマーは AML1 に強く結合するが、塩基置換解析から、AML1 は本来の基質となる DNA 上の認識塩基と相同な塩基をアプタマー上でも認識していることが示唆された。しかし、AML1 は基質 DNA と同じ配列の RNA とは(立体障害のために)結合できない。そのパズルを解決する目的で、AML1 結合部位と考えられるアプタマーのヘアピン部分の立体構造を NMR 解析によって決定した。その結果、RNA の二重らせん構造の主溝を広げることで、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(投稿論文作成中)。現在、X 線結晶構造解析のための結晶化を推進中。

#### 5. 細胞内 RNA 可視化システムの開発

RNA の細胞内蛍光標識法の開発を目的として、細胞膜透過性の Cy3(Cyanine 3)に対する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)「東京大学」グループ

① 研究分担グループ長: 中村 義一(東京大学、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

(2)「リボミック」グループ

① 研究分担グループ長:藤原 将寿(株式会社リボミック、開発研究部長)

② 研究項目

- ・細胞表面レセプター・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、主幹)

② 研究項目

- ・細胞表面レセプター・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、助教)

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
- ・X 線結晶構造解析法を用いた RNA アプタマーとターゲットの複合体の立体構造解析

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Tanaka, Y., Akagi, K., Nakamura, Y., Kozu, T: RNA aptamers targeting the C-terminal of KRAS oncoprotein generated by an improved SELEX with isothermal RNA amplification. *Oligonucleotides*, 17: 12-21 (2007).
2. 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*, 13: 811-816 (2007)
3. Ohuchi, S.P., Nakamura, Y.: Slight sequence modifications unexpectedly alter the metal dependency of a kissing-loop interaction. *Nucl. Acids Symp. Series*, 51: 395-396 (2007).
4. Wang, J., Takeuchi, H., Jin S., Sonobe Y., Shijie, J., Mizuno, T., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Nakamura, Y., Kato, T., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Suzumura, A.: Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis

through the expansion of regulatory T cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 3915-3920 (2008)

5. Ohuchi, S.P., Ikawa, Y., Nakamura, Y.: Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. Nucl. Acids Res, In Press (2008)
6. Miyakawa, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Yamazaki, S., Nakamura, Y.: Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. RNA, In Press (2008)

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:1件 (CREST 研究期間累積件数:7件)