

「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 基礎医科学部門・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だったが、我々は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」の証明という側面をもつ。これまでに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。

この可能性について、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)を釣り上げる技術を利用して試験研究を実施した。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 センサー及び治療薬の開発
- (2) 細胞内 RNA 可視化システムの開発
- (3) 抗体 IgG に対する RNA センサーの多目的利用
- (4) RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発
- (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(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

1. 細胞表面受容体に対する RNA センサー及び治療薬の開発

1) TGF- β 受容体アプタマー: His 標識可溶化型ヒト TGF- β II 型受容体(TGF- β RII)を標的として SELEX により、抗 TGF- β RII アプタマーの単離に成功した。また、VEGF 受容体 I 型(Flt-1)を標的とした SELEX により、抗 Flt-1 アプタマーの取得にも成功した。今後、取得したアプタマーの in vitro、in vivo での薬効薬理試験を実施する。

2) aFGF アプタマー: 抗癌剤開発を目的として酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)に対するアプタマーを作出した。ヒト軟骨肉腫細胞株である SW-1353 はヘパリン存在下で aFGF を添加すると細胞増殖が促進される。この系にアプタマーを加えて細胞増殖が抑制されるか否か試験した結果、増殖抑制はみられず、逆にヘパリンがなくとも、アプタマーと aFGF のみで細胞の増殖を促進することがわかった。この結果は、アプタマーが aFGF に対してヘパリンと同じ生理作用をすることを示唆しており、RNA が糖質であるヘパリンを機能的に分子擬態している可能性が高い。さらに、構造的な擬態を検証するために、アプタマー・aFGF 共結晶の X 構造解析を開始している。

3) Midkine アプタマー: 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抗 Midkine (MK) アプタマーについて、hybridization を原理とした ELISA 変法を用いて、マウスでの薬物体内動態分析を行い、薬剤として十分に薬効を期待できる血中半減期を確認した。さらに、医薬開発を目的とする動物実験を開始した。

2. IgG に対する RNA センサーの多目的利用

1) 本年度は、23-mer の IgG アプタマーに対して、新たな修飾を加え、NaOH 耐性アプタマーの作製に成功した。さらに、アプタマーの品質評価系の構築を行い、高分解能 LC/MS を用いた分析法によって、分子量 1 以下の誤差で対象とするアプタマーを同定可能で、0.1%以下の F 脱落体の検出可能な分析系の作製に成功した。

2) 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 1.9 Å の分解能で明らかにした結果(同研究領域の大阪大学・森グループとの共同研究; 投稿論文作成中)、予想外に狭い領域で相互作用していることが明らかとなった。現在、構造情報を用いてアプタマーの安定化を検討するとともに、アプタマーの高親和性の原因を物理化学的に解明することを計画している。

3. RNA に対する RNA アプタマーの開発

これまでに、天然の RNA 構造体において RNA-RNA 相互作用には関与しない C ループを認識する全く新規な RNA 構造モチーフの取得に成功している。本年度は、この新規 RNA モチーフの生化学的解析を行い、その活性に重要な一次配列・二次構造の特定を行った。

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) アプタマーによる細胞内の微量タンパク質検出法確立を目的として、MTG8 アプタマーによる白血病融合タンパク質 AML1-MTG8 の微量検出法を検討した。スピンカラムを用いて AML1-MTG8 を陽イオン交換樹脂に結合した上でアプタマーを結合し、AML1-MTG8 に結合したアプタマーをリアルタイム RT-PCR 法によって定量した。この方法でナノグラムオーダーの AML1-MTG8 の検出が可能となり、さらに AML1-MTG8 を発現した細胞破碎液からの検出にも成功した。

2) AML1 アプタマーとして、38 残基のアプタマーと 34 残基のアプタマーが取得されており、NMR

法によって、両アプタマーの立体構造を決定し比較した。38 残基のアプタマーの立体構造については、A:C ミスマッチ塩基対および Base triple によって主溝が広がっており、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を示唆された(投稿論文作成中)。一方、34 残基の RNA アプタマーのヘアピン部分は、安定な GCAA テトラループ構造を形成することが明らかになった。変異体を用いた解析から、それぞれのアプタマーと AML1 タンパク質との結合に重要な塩基が明らかとなり、立体構造上両アプタマーのこれら塩基をターゲット DNA の認識塩基と重ねてみると見事に一致することが明らかとなった。

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 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 の蛍光が増強し、Cy5 に対しても交差性を有することを見出した。また、アプタマー固相化チップが Cy3 (蛍光) センサーとして働くことも確認した。

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

- 1) 細胞表面受容体に対する RNA センサー及び治療薬の開発
- 2) RNA 高次構造を識別する RNA アプタマーの開発
- 3) 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)リボミック、開発研究部長)

②研究項目

- 1) 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
- 2) 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、主席主幹)

②研究項目

- 1) 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
- 2) 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、准教授)

②研究項目

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

3) 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. Ohuchi, S.P., Ikawa Y., and Nakamura, Y. (2008) Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. *Nucl. Acids Res.*, 36: 3600-3607.
2. Yamamura, Y., Lee, W. L., Goh, M. X., and Ito, Y. (2008) Role of TAp73 \square in induction of apoptosis by transforming growth factor- \square in gastric cancer cells. *FEBS Lett* 582:2663-2667, 2008.
3. 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. (2008) Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 3915-3920.
4. Miyakawa, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Yamazaki, S., Nakamura, Y. (2008) Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA*, 14:1154-63.
5. Sugiyama S., Nomura Y., Sakamoto T., Kitatani T., Kobayashi A., Miyakawa S., Takahashi Y., Adachi H., Takano K., Murakami S., Inoue T., Mori Y., Nakamura Y., Matsumura H. (2008) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of an RNA aptamer in complex with the human IgG Fc fragment. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 64: 816-818.
6. Oguro, A., Ohtsu, T., Nakamura, Y.: Aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eIF4A. *Anal. Biochem*, 388: 102-107 (2009)
7. Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., Nakamura, Y., Svergun, D.I., Ito, K., Song, H.: Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.*, In Press (2009)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 6 件)