

「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) 「(株)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

- 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) 「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

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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- $\beta$  受容体アプタマー: 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 により、TGF- $\beta$  のシグナル伝達を阻害する抗 TGF- $\beta$ RII アプタマーの単離に成功した。

2) VEGF 受容体アプタマー: VEGF 受容体 I 型 (Flt-1) を標的とした SELEX により、Flt-1 の自己リン酸化活性を完全に阻害する 3 種類の抗 Flt-1 アプタマーの取得に成功し、40 塩基長にまで短鎖化した。

3) aFGF アプタマー: 昨年度までに取得した抗 aFGF アプタマーはヒト軟骨肉腫細胞の aFGF 依存的な過剰増殖を亢進する。その作用機序を解析したところ、このアプタマーはヘパリンとは異なった経路を用いて aFGF 依存的な過剰増殖を亢進することが示唆された。

4) Midkine (MK) アプタマー: 通常マウス、多発性硬化症モデルマウスに MK アプタマーを静脈内投与し、MK アプタマーの臓器分布を調べたところ、脾臓やリンパ節など免疫に関係する臓器からアプタマーが検出された。これらの結果は MK アプタマーが調節性 T 細胞に影響を与えることができる場所に存在することを示している。

5) IL-17 アプタマー: ヒト多発性硬化症の動物モデルであるマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いて、IL-17 アプタマーの発症抑制効果を確認した。EAE モデルの発症は、アプタマーの投与で発症率が抑えられ、また、発症した個体の症状も軽症であった。さらに、GPI (Glucose-6-phosphate isomerase) 誘導関節炎モデルマウスを用いて IL-17 アプタマーの *in vivo* 薬効実験を行ったところ、発症率の低下と軽微な病徴、早期回復が確認された。

## **2. IgG に対する RNA センサーの多目的利用**

アプタマー (Apt8-2) のヌクレアーゼ分解実験を行い、血清中で安定性の低い結合部分を 2 か所特定し修飾を加えたところ (Apt81)、結合活性を維持したまま血清中での安定性が Apt8-2 よりも 4 倍以上向上した。

## **3. RNA に対する RNA アプタマーの開発**

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 ループを認識する新規な RNA モティーフを取得し、RNA-RNA 相互作用の結合様式の解析をすすめた。

## **4. 融合タンパク質に対する超特異的 RNA センサーの開発**

MTG8 アプタマーを用いて、リアルタイム RT-PCR により白血病融合タンパク質 AML1-MTG8 を高感度に検出する方法を開発した。AML1-MTG8 を発現する白血病細胞 Kasumi-1 を正常リンパ球に混ぜ、アプタマーによって検出したところ、白血病細胞が正常細胞の 1/50 程度であっても AML1-MTG8 を認識することができた。MTG8 タンパク質の TAF ドメインに結合するアプタマーの NMR スペクトルを測定したところ、K<sup>+</sup>イオン存在下で G カルテット構造に特徴的な NMR シグナルが観測された。G カルテット形成に必要なと思われる G 残基に変異を導入すると、TAF ドメインに結合しなくなることから、このアプタマーは G カルテット構造を形成して、TAF ドメインと結合すると考えている。

## **5. 細胞内 RNA 可視化システムの開発**

シアニン色素 Cy3 に対する RNA アプタマーの基本構造を明らかにし、その情報に基づいて Binary プローブを開発、DNA 配列や RNA-RNA 相互作用の検出に利用できることを証明した。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

- 1 Oguro, A., Ohtsu, T., Nakamura, Y.: Aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eIF4A. *Anal. Biochem*, 388: 102-107 (2009) doi:10.1016/j.ab.2009.01.046
- 2 Nakamura, Y., Endo, K., Adachi, H., Ishiguro, A.: RNA Aptamers to Translational Components. In: Hershey JWB, ed. *Translational Control in Health and Disease*. Elsevier Press, pp. 369-395 (2009) DOI: 10.1016/S1877-1173(09)90001-1
- 3 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.*, 23: 1106-1118 (2009)
- 4 Watanabe, Y., Nakamura, Y., Ito, K.: A novel class of bacterial translation factor RF3 mutations suggests specific structural domains for premature peptidyl-tRNA drop-off. *FEBS Lett.*, 584: 790-794 (2010). doi:10.1016/j.febslet.2009.12.048
- 5 Ishiwata, M., Kurahashi, H., Nakamura, Y.: A G-protein g subunit mimic is a general antagonist of prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 791-796 (2009). doi\_10.1073\_pnas.0808383106
- 6 Kurahashi, H., Shibata, S., Ishiwata, M., Nakamura, Y.: Selfish prion of Rnq1 mutant in yeast. *Genes to Cells*, 14: 659-668 (2009). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01297.x
- 7 Shibata, S., Kurahashi, H, Nakamura, Y.: Localization of prion-destabilizing mutations in the N-terminal non-prion domain of Rnq1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prion*, 3: 1-9 (2009).
- 8 Endo, K., Nakamura, Y.: A binary Cy3 aptamer probe composed of folded modules. *Anal. Biochem.*, 400: 103-109 (2010). doi:10.1016/j.ab.2010.01.015

### (4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 7件)