

令和元年6月11日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14652

研究課題名(和文)新規抗真菌薬創製を目指したRNA アプタマーの創製

研究課題名(英文)Creation of RNA aptamers aiming at the creation of new antifungal drug

研究代表者

藤原 俊伸 (FUJIWARA, Toshinobu)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：80362804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：真菌のキャッピング酵素Ceg1、Cet1および、Ceg1と結合できないCet1変異体を用いて、核移行シグナルはCet1のみに存在し、Ceg1はCet1に結合しないと核移行できないこと、細胞質でCet1とCeg1が結合し、Cet1-Ceg1複合体が核に移行することを明らかにしている。そして、酵母を用いた遺伝学的研究により、Cet1とCeg1の結合が真菌の生育に必須であることが示された。このことから、Cet1-Ceg1結合阻害が新規抗真菌薬の作用機序となりうる事が示された。そして、これまでにモデルとした出芽酵母のcapping反応を選択的に阻害するアプタマーを取得している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真菌と哺乳類とで異なる反応経路をとるmRNAのcapping反応に着目し、真菌のcapping反応のみを阻害するRNAアプタマーの創製を試みた。その結果、Cet1-Ceg1結合阻害が新規抗真菌薬の作用機序となりうる事が示し、これまでにモデルとした出芽酵母のcapping反応を選択的に阻害するアプタマーを取得している。また、今後作動性が確認されたRNAアプタマーはそれ自身を修飾すること、またはその構造を解析することによる新規化合物のスクリーニングにより、抗真菌薬開発に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Using the fungal capping enzymes Ceg1, Cet1 and Cet1 mutants that can not bind to Ceg1, we show that nuclear translocation signals are present only in Cet1, and that Ceg1 can not translocate to the nucleus without binding to Cet1. Furthermore, we demonstrate that Cet1 and Ceg1 bind in the cytoplasm, and that the Cet1-Ceg1 complex translocates to the nucleus. Moreover, genetic studies using yeast show that Cet1 and Ceg1 binding is essential for fungal growth. These data indicate that inhibition of Cet1-Ceg1 binding may be the mechanism of action of novel antifungal agents. Then, we obtained the aptamers that selectively inhibit the capping reaction of budding yeast that has been used as a model so far.

研究分野：RNA生化学

キーワード：RNAアプタマー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化、広域抗菌薬、ステロイド、抗悪性腫瘍薬、免疫抑制薬、留置カテーテルなどの使用、さらには AIDS 患者に代表される細胞免疫低下症例などで深在性真菌症の増加が問題になっている。抗真菌薬はヒトと同じ真核細胞を有する真菌細胞に対してその増殖抑制もしくは殺真菌作用を示す薬剤で、ヒトの細胞にも障害を示す場合も少なくない。また、深在性真菌症の原因として、アスペルギルス、カンジダ、クリプトコッカス、ムーコルが 4 大病原真菌として知られているが、これら全てに適応する抗真菌薬は非常に少ない。更に、耐性化やブレイクスルー感染などの増加も問題となっている。そのため、本研究開始当初の時点において、真菌選択性の高い新規機序を有する抗真菌薬の開発が急務となっていた。

2. 研究の目的

深在性真菌症は、高齢化社会の到来、抗悪性腫瘍薬治療等による易感染宿主の増加にともない世界的に増加傾向にあり、選択係数の高い新しい抗真菌薬の開発が急務である。

全ての真核生物において mRNA の 5' 末端に付加される cap 構造はタンパク質の合成に必須であり、その欠損は致死となる。cap 構造は転写と連携して capping 酵素により付加される。哺乳動物のキャップ構造は 1 つのタンパク質で合成される。一方、真菌では Ceg1、Cet1 の 2 つの異なるタンパク質が結合することで 1 つの酵素として機能し、cap 構造を合成する。すなわち、ヒトと真菌類ではキャップ構造を異なる素過程で合成する。そこで、ヒトと真菌類で異なる capping 反応の素過程に着目し、新規抗菌開発を最終目的に、真菌の capping 反応のみを阻害する RNA アプタマー創製を試みる。

3. 研究の方法

1) Ceg1 の Cet1 結合ドメインを標的とした SELEX の実施：

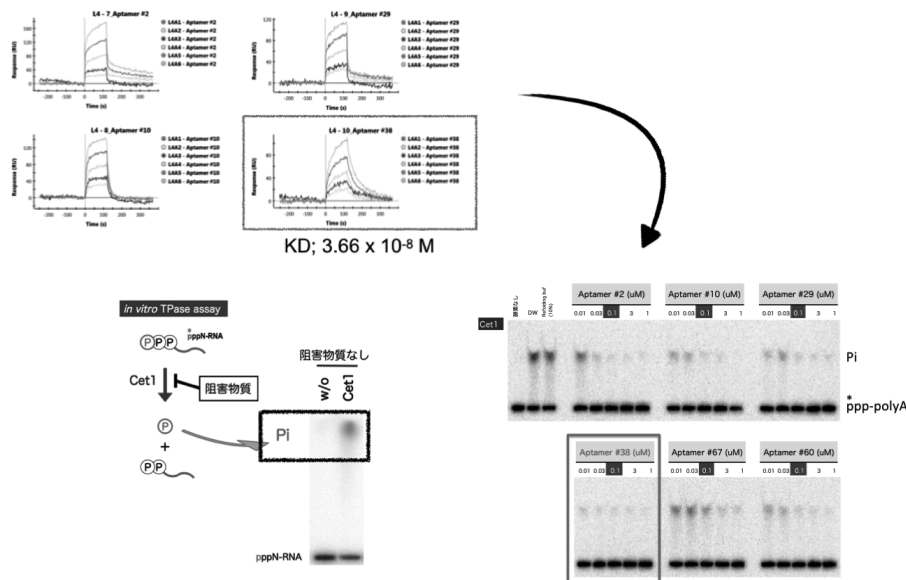
申請者はこれまでにカンジダ (*C. albicans*) 由来の高純度 Cet1 タンパク質および Ceg1 タンパク質の調製に成功している。さらに、それぞれの TPase 活性および GTase 活性を測定する *in vitro* 系および、*in vitro* 結合解析系も構築済みである。特に、Ceg1 中の Cet1 結合ドメイン (OB ドメイン) は種を越えてアミノ酸配列が保存され、その立体構造も明らかとなっており、Cet1-Ceg1 の結合阻害の標的として最適である。そこで、この OB ドメインを標的とした SELEX を実施し、RNA アプタマーを得る。得られたアプタマーは速やかに Cet1-Ceg1 結合解析系において結合阻害活性を示すかどうかを検証する。

2) 酵母を用いた Cet1-Ceg1 結合阻害検証系の構築：

申請者はこれまでに出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた、Cet1-Ceg1 機能評価系を構築している。この系では、Cet1 および Ceg1 ノックアウトバックグラウンドにおいて、ヒト由来 capping 酵素存在下において生育可能とした酵母を用い、外来の Cet1 および Ceg1 の機能を評価できる。そこで、このシステムを応用し、*C. albicans* 由来 Cet1 および Ceg1 の機能を評価するシステムを確立する。

4. 研究成果

本研究課題では、真菌のキャッピング酵素 Ceg1、Cet1 および、Ceg1 と結合できない Cet1 変異体を用いて、① 核移行シグナルは Cet1 のみに存在し、Ceg1 は Cet1 に結合しないと核移行できないこと、② 細胞質で Cet1 と Ceg1 が結合し、Cet1-Ceg1 複合体が核に移行することを明らかにしている。このことから、Cet1-Ceg1 結合の阻害により、Ceg1 が核移行できず cap 構造が合成されない、つまり真菌類が死ぬという可能性が示唆された。そして、酵母を用いた遺伝学的研究により、Cet1 と Ceg1 の結合が真菌の生育に必須であることが示された。このことから、Cet1-Ceg1 結合阻害が新規抗真菌薬の作用機序となりうる事が示された。そして、これまでにモデルとした出芽酵母の capping 反応を選択的に阻害するアプタマーを取得している (下図)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Kohno K., *Itoh S., Hanai A., Takii T., Fujiwara T., Onozaki K., Tsuji T., Hida S. : Identification of matrix metalloproteinase 9-interacting sequences in staphylococcal superantigen-like protein 5 *Biochemical and biophysical research communications* 497, 713-718 (2018) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.138 (査読有り)
- 2) *Igarashi M., Sawa R., Yamasaki M., Hayashi C., Umekita M., Hatano M., Fujiwara T., Mizumoto K., Nomoto A. : Kribellosides, novel RNA 5'-triphosphatase inhibitors from the rare actinomycete *Kribbella* sp. MI481-42F6. *The Journal of antibiotics* 70, 582-589 (2017) doi: 10.1038/ja.2016.161. (査読有り)

[学会発表] (計 58 件)

1. 藤原俊伸 : 細胞・組織特異性を規定するリボソーム結合因子を介した転写後制御機構。
第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
2. 坂村由梨佳, 友廣拓生, 大塚衆志, 深尾亜喜良, 船上仁範, 鈴木亨, 山本雅, 藤原俊伸 : 哺乳類における miRISC による翻訳抑制機構の解明。
第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
3. 石田一希, 貞廣暁利, 安達俊吾, 深尾亜喜良, 船上仁範, 夏目徹, 藤原俊伸 : ポリオウイルス組織特異性を生み出す, IRES 依存的翻訳制御機構の解析。
第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
4. Yurika Sakamura, Takumi Tomohiro, Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Kent E Duncan, Toshinobu Fujiwara : New insights into CCR4-Not deadenylase complex function in microRNA-mediated gene silencing.
The complex life of RNA (Germany) 2018 年
5. Toshinobu Fujiwara : ARE binding protein ZFP36L1 represses translation via CCR4-NOT complex independently of RNA degradation machinery
ELAVENICE (Italy) 2018 年
6. Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Kent E Duncan, Toshinobu Fujiwara : ARE binding protein ZFP36L1 represses translation via CCR4-NOT complex independently of RNA degradation machinery.
Translational Control (U.S.A.) 2018 年
7. Akira Fukao, Takumi Tomohiro, Yurika Sakamura, Hiroshi Otsuka, Kent E Duncan, Yukihide Tomari, Toshinobu Fujiwara : New insights into CCR4-Not deadenylase complex function in microRNA-mediated gene silencing.
Translational Control (U.S.A.) 2018 年
8. 深尾亜喜良, 西阪皓理, 松木香菜子, 大塚衆志, 船上仁範, 藤原俊伸 : ARE 結合タンパク質 AUF1 による遺伝子発現制御機構の解析。
第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年
9. 坂村由梨佳, 友廣拓生, 大塚衆志, 深尾亜喜良, 船上仁範, 鈴木亨, 山本雅, 足立俊吾, 夏目徹, 藤原俊伸 : 哺乳類における miRISC による翻訳抑制機構の新たな知見。
第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年
10. 石田一希, 貞廣暁利, 安達俊吾, 深尾亜喜良, 船上仁範, 夏目徹, 藤原俊伸 : ポリオウイルス組織特異性を生み出す IRES 依存的翻訳制御機構の解析。
第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年
11. 貞廣暁利, 深尾亜喜良, 小坂実央, 滝沢直己, 船上仁範, 竹内理, Kent E Duncan, 藤原俊伸 : A 型肝炎ウイルス IRES 依存的翻訳は肝臓特異的因子により活性化される。
第 20 回日本 RNA 学会年会、2018 年
12. Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Kent E Duncan, Toshinobu Fujiwara : ZFP36L1 represses translation initiation independently of deadenylation mediated by AU-Rich elements.
Post-transcriptional Control of Gene Expression: Mechanisms of RNA Decay (U.S.A.) 2018 年
13. Takumi Tomohiro, Yurika Sakamura, Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Kent E Duncan, Toshinobu Fujiwara : New insights into CCR4-Not deadenylase complex function in microRNA-mediated gene silencing.
Post-transcriptional Control of Gene Expression: Mechanisms of RNA Decay (U.S.A.) 2018 年
14. 藤原俊伸 : 非典型的な翻訳開始機構から見えてきた巧妙なタンパク質合成制御機構。
第 6 回 CCR4-NOT 研究会、2018 年
15. 深尾 亜喜良、大塚 衆志、藤原俊伸 : ARE 結合蛋白質 ZFP36L1 による脱アデニル化非依存的な翻訳抑制機構の解析
第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017、2017 年
16. 貞廣 暁利、深尾 亜喜良、竹内 理、藤原俊伸 : Poliovirus の組織特異的増殖を生み出す IRES 依存的翻訳機構の解明

- 第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017、2017
17. 武知 美和、大塚 衆志、深尾 亜喜良、船上 仁範、藤原俊伸: BRF1 による mRNA 分解と共役した翻訳抑制機構の解析
- 第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017、2017 年
18. 貞廣 暁利、小坂 実央、深尾 亜喜良、竹内 理、藤原俊伸: A 型肝炎ウイルスの細胞種特異性を生み出す、IRES 依存的翻訳制御機構の解析
- 第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017、2017 年
19. 佐藤 亮介、萩原 加奈子、深尾 亜喜良、藤原俊伸、平井 晋哉、谷 時雄、高崎 輝恒、杉浦 麗子: RNA 結合タンパク質の MAPK 依存的なリン酸化の役割 -RNA 結合能と細胞内局在の二重制御-
- 第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017、2017 年
20. 坂村 由梨佳、友廣 拓生、大塚 衆志、深尾 亜喜良、船上 仁範、鈴木 亨、山本雅 雅、藤原俊伸: 哺乳類における miRNA による翻訳抑制機構の解明
- 第 40 回日本分子生物学会年会 ConBio2017、2017 年
21. Toshinobu Fujiwara: ZFP36L1 represses translation initiation independently of deadenylation mediated by AU-Rich elements.
Cutting Edge Developments in RNA Biology for the Control of Gene Expression, 2017 年
22. Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara: Elucidation of elementary processes in which RNA-binding protein HuD stimulates the cap-poly(A)-dependent translation.
Cutting Edge Developments in RNA Biology for the Control of Gene Expression, 2017 年
23. Takumi Tomohiro, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Toshinobu Fujiwara: Mysterious eukaryotic translation initiation factor eIF4H.
Cutting Edge Developments in RNA Biology for the Control of Gene Expression, 2017 年
24. Hiroshi Otsuka, Akira Fukao, Yoshinori Funakami, Kent Duncan, Toshinobu Fujiwara: Elucidation of elementary processes in which RNA-binding protein HuD stimulates the cap-poly(A)-dependent translation.
Protein Synthesis and Translational Control (ドイツ) 2017 年
25. Akira Fukao, Hiroshi Otsuka, Yoshinori Funakami, Kent Duncan, Toshinobu Fujiwara: ZFP36L1 represses translation initiation independently of deadenylation mediated by AU-Rich elements.
Protein Synthesis and Translational Control (ドイツ) 2017 年
26. 坂村由梨佳、友廣拓生、大塚衆志、深尾亜喜良、船上仁範、鈴木亨、山本雅、藤原俊伸: 哺乳類における miRISC による翻訳抑制機構の解明
- 第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年
27. 佐藤亮介、萩原加奈子、深尾亜喜良、藤原俊伸、平井晋哉、谷時雄、杉浦麗子: KH 型 RNA 結合タンパク質 Rnc1 の Rael 依存的な核外輸送を介した MAPK シグナル制御機構
- 第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年
28. 深尾亜喜良、友廣拓生、大塚衆志、青山智彦、船上仁範、足達 俊吾、夏目 徹、藤原俊伸: in vitro 翻訳システムを用いた miRNA による翻訳制御分子機構の解析
- 第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年
29. 西阪皓理、松木香菜子、大塚衆志、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸: ARE 結合タンパク質 AUF1 による遺伝子発現制御機構の解析
- 第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年
30. 大塚衆志、武知美和、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸: BRF1 による mRNA 分解と共役した翻訳抑制機構の解析
- 第 19 回日本 RNA 学会年会、2017 年
31. Akitoshi Sadahiro, Akira Fukao, Kent Duncan, Osamu Takeuchi, Toshinobu Fujiwara: Analyses of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains.
The 22nd Annual Meeting of the RNA Society (チェコ) 2017 年
32. Tomohiko Aoyama, Akira Fukao, Nahum Sonenberg, Toshinobu Fujiwara: The novel function of PABP interacting protein 1 (Paip1) in translation initiation
The 22nd Annual Meeting of the RNA Society (チェコ) 2017 年
33. 藤原俊伸: in vitro 翻訳実験系で見えてきた哺乳類における翻訳制御の「妙」
- 第 2 回デザイン生命工学研究会大会、2017 年
34. 藤原俊伸: ARE 結合タンパク質による CCR4-NOT 複合体を介した翻訳制御機構
- 第 5 回 CCR4-NOT 研究会、2017 年
35. 藤原俊伸: AU-Rich Element (ARE) 結合タンパク質 BRF1 によって誘起される mRNA 分解非依存的な翻訳抑制

- 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
36. 武知美和、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸: RNA 結合タンパク質が仲介する mRNA 分解と翻訳との共役
- 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
37. 貞廣暁利、足達俊吾、深尾亜喜良、船上仁範、夏目徹、竹内理、藤原俊伸: ポリオウイルスの細胞種特異的な IRES 依存的翻訳の解析
- 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
38. 青山智彦、大塚衆志、船上仁範、深尾亜喜良、藤原俊伸: PABP interacting protein 1 (Paip1) による翻訳制御機構の解析
- 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
39. 友廣拓生、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸: cap 依存的翻訳における eIF4H の機能解析
- 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
40. 大塚衆志、深尾亜喜良、船上仁範、藤原俊伸: RNA 結合タンパク質 HuD による翻訳促進機構の素過程の解析
- 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
41. Aoyama T, Fukao A, Sonenberg N, Fujiwara T: The novel function of PABP interacting protein 1 (Paip1) in translation initiation.
The Cold Spring Harbor Asia conference on RNA Biology (Suzhou, China), 2016 年
42. Tohsinobu Fujiwara: Neural specific RNA-binding proteins grasp the translation regulatory networks
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
43. Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
44. Akitoshi Sadahiro, Akira Fukao, Naoki Takizawa, Osamu Takeuchi, Toshinobu Fujiwara: Analyses of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains.
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
45. Yuka Yamada, Manabu Yamasaki, Naoki Takizawa, Akira Fukao, Toshinou Fujiwara: High affinity RNA for capping enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
46. Tomohiko Aoyama, Akira Fukao, Nahum Sonenberg, Akiko Yanagiya, Toshinobu Fujiwara: Analyses of the molecular function of PABP interacting protein 1 (PAIP1) in translational regulation.
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
47. Takumi Tomohiro, Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: Mysterious eukaryotic translation initiation factor eIF4H
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
48. Hiroshi Ohtsuka, Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: Elucidation of elementary processes in which RNA-binding protein HuD stimulates the cap- poly(A) dependent translation
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
49. Hiroshi Ohtsuka, Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: 薬剤師教育の問題点
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
50. Miwa Takechi, Akira Fukao, Keizo Tomonaga, Toshinou Fujiwara: Butyrate response factor1 induces translation repression independently of ARE-mediated mRNA decay
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
51. Daisuke Ikeda, Akira Fukao, Toshinou Fujiwara: Effect of interaction between RNA binding protein HuD and SMN protein on protein synthesis
12th International Congress on Protein Phosphatase (ICPP12)、2016 年
52. Miwa Takechi, Hiroshi Otsuka, Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: Butyrate response factor1 induces translation repression independently of ARE-mediated mRNA decay
EMBO|EMBL Symposium:The Complex Life of mRNA (Heidelberg, Germany)、2016 年
53. Toshinobu Fujiwara: The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD
第 89 回日本生化学会大会、2016 年
54. Miwa Takechi, Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: The coupling mechanism between translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD
Translational Control 2016 (CSHL)、2016 年
55. 貞廣暁利、足達俊吾、深尾亜喜良、夏目徹、竹内理、藤原俊伸: ポリオウイルスの細胞種特異的な IRES 依存的翻訳の解析
RNA フロンティアミーティング 2016、2016 年
56. Miwa Takechi, Akira Fukao , Toshinobu Fujiwara: The coupling mechanism between

translation and mRNA degradation mediated by RNA-binding protein HuD

RNA2016、2016年

57. Akitoshi Sadahiro, Akira Fukao, Naoki Takizawa, Osamu Takeuchi, Toshinobu Fujiwara: Analyses of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains.

RNA2016、2016年

58. Tomohiko Aoyama, Akiko Yanagiya, Nahum Sonenberg, Akira Fukao, Toshinobu Fujiwara: Analyses of the molecular function of PABP interacting protein 1 (PAIP1) in translational regulation.

RNA2016、2016年

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山崎 学

ローマ字氏名：YAMASAKI manabu