

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655150

研究課題名(和文)凝集型機能性RNA薬剤のデザイン

研究課題名(英文)Designing aggregated functional RNA medicine

研究代表者

梅影 創 (UMEKAGE, SO)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30419436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：RNAは一般的に分解されやすいと考えられており、RNA分解耐性には人工核酸のしようが必須であると考えられている。本研究では、人工核酸を用いずに(天然型のヌクレオチドのみを用いて)RNAを安定化する方法について検討を行った。その結果、RNAはある決まった条件を満たすと凝集体を形成するらしいことを発見し、凝集体の形成によって熱安定性やRNA分解酵素耐性を獲得することが分かった。また、凝集体の形成条件については、転写反応時の鋳型長とRNA配列が関係することが示唆された。本成果は、RNAを作成する際に重要な知見をもたらすものとして、RNA工学分野、RNA医薬分野に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：RNA is well known to be labile against nucleases attack, and it is assumed that using artificial ribonucleotides is inevitable for obtaining nuclease-resistance when preparing RNA therapeutics. In this research, we tried to obtain ribonuclease-resistant RNA transcripts by using only natural ribonucleotides. We found that in vitro transcribed RNA aggregated when meeting some specific conditions and these aggregates obtained both thermostable and ribonuclease-resistance. Also we showed that this aggregation depended on the length of DNA template and RNA contents. These findings will give significant insight into RNA engineering and/or RNA therapeutics when preparing functional RNAs.

研究分野：RNA医薬

キーワード：RNA RNase 凝集 RNA医薬

1. 研究開始当初の背景

RNA 医薬品は、例えば抗生物質などの従来の医薬品とは異なる作用機序を持つこと、遺伝子の発現を特異的に制御できることなどの特徴を持ち、次世代型医薬としてその開発が期待されている。しかし、RNA そのものは細胞内のリボヌクレアーゼによって速やかに分解されてしまうため、効能持続性のある RNA 医薬の開発には、リボヌクレアーゼによる分解を受けない人工核酸の使用が必須であるとされる。人工核酸の使用に際しては、合成が高コストであることや、ヒトへの使用に際しての副作用の懸念等が指摘されている。RNA 医薬が今後、世の中に普及して行くためには、これらの問題を解決し、安全、安心、安価な RNA 医薬のデザイン方法を開発する必要がある。これまでの申請者の研究において、RNA は単独では分解されてしまうが、複数の RNA が凝集すると RNA 分解酵素による分解を免れる新現象を見出している。この RNA の凝集化のメカニズムを解明し、RNA 創薬に応用することができれば、人工核酸を使用することなく、安全、安心、安価な RNA 医薬を開発することが可能になるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、前述の RNA 凝集化メカニズムを解明し、この現象を積極的に RNA 医薬のデザインに応用することで、人工核酸フリーな RNA 医薬の設計方法を確立することを目的とする。これにより、副作用の懸念がなく、安価な RNA 医薬の創成基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

凝集するタイプの RNA 配列 (23 塩基) に変異を導入したものを試験管内転写により合成し、凝集形成の有無を変性 PAGE によって判定した。凝集形成の有無から、RNA 凝

集に関する RNA 配列部位を決定し、コンピュータソフトを用いて二次構造予測を行った。また、得られた各変異体の RNaseA などのリボヌクレアーゼ耐性についても評価を行った。

得られた凝集型 RNA を用い、実際に shRNA 配列を導入し、RNA 分解酵素耐性となるかを検証し、培養細胞中での RNA 干渉誘導能についても検証した。

凝集体を形成しないが RNA 分解酵素耐性を示した RNA については、ラジオアイソトープラベルを行った後、二次構造マッピングを行い、さらに $^1\text{H-NMR}$ 解析を行った (千葉工業大学坂本泰一教授との共同研究)。

4. 研究成果

凝集する RNA 配列 (23 塩基) の変異体を作成し、凝集形成の有無を調べたところ、RNA の末端配列部位が特に RNA の凝集形成に重要であることが分かった。また、転写するさいの DNA 鋳型の長さも凝集形成に関与するらしいことが示された。これらのことから、RNA はある決まった条件を満たすと凝集体を形成するらしいことが分かってきたが、完全に凝集化のメカニズムの解明には至っていない。この部分については、研究期間外ではあるが、引き続き研究を進めていく。

また、得られた凝集体は RNA 分解酵素耐性を獲得する以外にも熱安定性が向上することも示された。

shRNA を導入した凝集型 RNA については、当初の予定通り、RNA 分解酵素耐性化に成功し、また、Dicer によるプロセッシングを受けることを確認したが、細胞導入実験については、現時点で RNA 干渉効果を観察することはできていない。現在も引き続き細胞導入条件等について検討を行っている。

さらに、凝集しないタイプの RNA 分解酵素耐性を示す RNA の二次構造マッピングおよび $^1\text{H-NMR}$ 解析の結果、ステムループ構造

を形成することがわかった。この配列については、機能性 RNA の末端保護基として使える可能性があり、現在機能性 RNA の末端保護基としての応用方法を検討している。

本研究により、人工核酸を用いなくとも RNA 配列を RNA 分解酵素耐性にすることが可能であることが示された。得られた成果は、特に小さな RNA の RNA 分解酵素耐性化等に適用可能であり、RNA 工学分野、RNA 医薬分野に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) Evidence for RNA template-directed elongation. Y. Kakimoto, A. Fujinuma, T. Sakamoto, Y. Kikuchi, and S. Umekage*, *AIP Conf. Proc.*, 1649, 116-120 (2015) 査読あり
- 2) Abnormal rapid non-linear RNA production induced by T7 RNA polymerase in the absence of an exogenous DNA template. Y. Kakimoto, A. Fujinuma, S. Fujita, Y. Kikuchi, and S. Umekage*, *AIP Conf. Proc.*, 1649, 113-115 (2015) 査読あり

[学会発表](計 14 件)

- 1) Y. Kakimoto, A. Fujinuma, T. Sakamoto, Y. Kikuchi, and S. Umekage, Evidence for RNA template-directed elongation, Irago conference 2014 (Tsukuba)
- 2) Y. Kakimoto, A. Fujinuma, S. Fujita, Y. Kikuchi, and S. Umekage, Abnormal rapid non-linear RNA production induced by T7 RNA polymerase in the absence of an exogenous DNA template, Irago Conference 2014 (Tsukuba)
- 3) 藤沼輝、梅影創、菊池洋 「凝集体形成によりヒト血清耐性を示す未修飾アンチセンス RNA」、『13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム』、P03、板橋、2013 年 5 月 11 日

- 4) 藤沼輝、梅影創、菊池洋「自己凝集によりヒト血清中でも安定して存在する RNA 配列の解析」、『第 86 回日本生化学会大会』、3P-424、横浜、2013 年 9 月 11-13 日
- 5) 梅影創、菊池洋、細胞内環状 RNA 発現技術、生物工学会(広島)、2P-236 (2013)
- 6) 梅影創、菊池洋、環状 RNA アプタマーの細胞内発現、生化学会(横浜)、103 (2013)
- 7) 藤沼輝、梅影創、菊池洋、自己凝集によりヒト血清中においても安定して存在する RNA 配列の解析、生化学会(横浜)、103 (2013)
- 8) 梅影創、菊池洋、機能性 RNA を用いて天然高分子のゾルーゲル転移を制御する試み、高分子学会(京都)、18 (2013)
- 9) 梅影創、越智明德、Pan Yu、藤沼輝、菊池洋、RNA ワールド仮説を補強しうる RNA 分解酵素抵抗性 RNA の発見、生命の起源および進化学会(博多)、23 (2013)
- 10) 藤沼輝、梅影創、菊池洋、凝集体形成によりヒト血清耐性を示す未修飾アンチセンス RNA、遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム(東京)、P3 (2013)
- 11) 藤沼輝、梅影創、菊池洋、凝集体形成によりヒト血清耐性を示す未修飾 RNA 配列の解析、生命の起源および進化・アストロバイオロジー夏の学校 2013 (東京)、15 (2013)
- 12) 横田哲朗、藤田能巨、鈴木宏道、梅影創、菊池洋、Functional RNA production by *Rhodobacter capsulatus* containing T7 RNA polymerase、第 14 回 RNA 学会(仙台)、(2013)
- 13) 横田哲朗、藤田能巨、鈴木宏道、長尾信義、梅影創、菊池洋、Functional RNA production by *Rhodobacter capsulatus*、JSBBA2012(京都)、LE1507 (2012)
- 14) 長尾信義、鈴木宏道、梅影創、沼野利佳、菊池洋、Extracellular production and processing of short hairpin RNA by the marine phototrophic bacterium、JSBBA2012(京都)、LE435 (2012)

15) S. Umekage, Y. Kikuchi, Designed RNA-induced agarose sol-gel transition, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference (AP-IRC) 2012, Irigo, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:RNA分子にヌクレアーゼ耐性能を付与する方法、ヌクレアーゼ耐性能を有するキメラRNA分子

発明者:梅影創、藤田隼輔、藤沼輝、菊池洋

権利者:国立大学法人豊橋技術科学大学

種類:特許

番号:特願2013-256425号

出願年月日:2013年12月

国内外の別:国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅影 創(Umekage So)・豊橋技術科学大学・
大学院工学研究科・講師

研究者番号:30419436