

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26560429

研究課題名(和文)天然RNAライブラリを基盤とした新規機能性RNAおよび新規機能性ペプチドの探索

研究課題名(英文) In vitro selection of novel functional RNAs and peptides by means of natural RNA library

研究代表者

加藤 敬行 (Kato, Takayuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：90567760

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)：本研究では、in vitroセレクション法を用いて生体内標的分子に特異的に結合する新規機能性RNAおよび新規機能性ペプチドの探索を行った。本研究の特色は、生体から抽出したRNA(=天然RNA)をライブラリ化した点にあり、これをビーズ担体に固定化した葉酸などの標的分子と相互作用させビーズ画分を回収することにより、標的分子に結合する天然機能性RNAのセレクションを行った。また、天然RNAライブラリをin vitro翻訳したペプチドライブラリを用いてmRNA display法と組み合わせることにより、Keap1などの標的分子に特異的に結合する天然ペプチドの探索を行った。

研究成果の概要(英文)：We developed a new method for screening novel functional RNAs and peptides that specifically bind to target molecules in cell. Here, we prepared a total RNA library derived from various human tissues, then mixed them with folate molecules covalently immobilized on magnetic beads to isolate folate-binding RNAs. The RNA library was also subjected to in vitro translation to prepare a peptide library, which was then used to screen Keap1 binding peptides by means of mRNA display.

研究分野：分子生物学

キーワード：機能性ペプチド 機能性RNA in vitroセレクション アゴニスト

1. 研究開始当初の背景

(1) リボスイッチは小分子の結合により構造が変化し機能制御される RNA であり、これまでにいくつかの例が報告されているが、報告例は原核生物の mRNA の 5'-UTR 部分に集中しており、原核生物 mRNA 以外の RNA での報告例は非常に少ない。その理由として、そのような小分子結合性の RNA を探索するための効率的な手法が確立されていないことが挙げられる。

(2) また、生体内には GPCR に代表される多種多様なレセプター分子が存在しており、多くの場合ペプチドがその特異的リガンドとして機能していることが知られているが、オーファンレセプターのようにリガンドが同定されていないレセプターも数多く存在する。GPCR などは薬剤標的としても非常に重要であり、リガンド分子の同定が待望されているが、現状ではそのようなリガンド分子を効率的に探索する手法がないことが問題となっている。

これらの問題点を克服するために、小分子結合性の RNA や新規ペプチドリガンドを効率よく探索するための新しい手法を開発することが求められている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) を応用して、ヒト non-coding RNA(ncRNA)ライブラリから新規リボスイッチ RNA を探索する手法を確立することを目指したものである。従来の SELEX 法は人工のランダム RNA ライブラリを用いて標的分子に結合する RNA をセレクションすることにより人工の機能性 RNA を探索する手法であるが、本研究では人工ランダム RNA の代わりに生体から抽出した RNA をライブラリとして用いることにより生体内に実際に存在する機能性 RNA をセレクションする点が特色である。

(2) また、この天然 RNA ライブラリを in vitro 翻訳してペプチドライブラリに変換し、これを mRNA ディスプレイ法と組み合わせることで標的タンパク質に特異的に結合するリガンドペプチドの探索を試みた。

本研究は、従来の in vitro セレクション法と異なり、生体内で実際に機能している RNA やペプチドリガンドを取得できるという点において一線を画するものである。

3. 研究の方法

(1) 様々なヒト培養細胞から RNA を抽出しライブラリの構築を行った。通常、RNA の大部分は rRNA や tRNA が占めており、それ以外の RNA が占める割合はごく小さいことが知られている。そこで、フレキシザイムという人工アミノアシル化リボザイム(文献

)を用いることにより RNA ライブラリから tRNA を除去する方法を開発した(tRid 法、図 1)。また、rRNA については固相化 LNA プローブ(ribominus)を用いて除去した。これにより tRNA や rRNA を含まない RNA プールを得た。このようにして得られた RNA プールの 5'末端、3'末端双方にアダプター配列をライゲーションし、逆転写、PCR を行うことにより DNA プール化した。この時、5'末端側のアダプター配列に T7 プロモーターを配置しておくことで、RNA 配列を容易に転写合成することが可能になる。実際のセレクションには、いったん作成した DNA プールから転写合成したものをを用いた。次に、標的として葉酸を磁気ビーズに固定化するための条件検討を行い、葉酸結合性 RNA のセレクションを実施した。

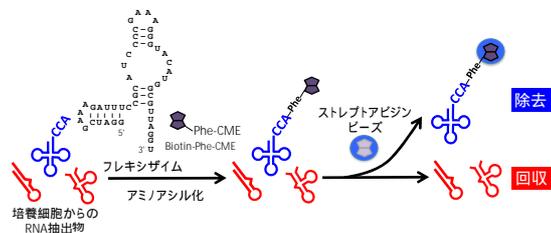


図1: RNAプールからのtRNAの除去法
フレキシザイムとN-ビオチン化フェニルアラニンシアメチルエステル(Biotin-Phe-CME)をRNAプールに加えて反応させることで、tRNAのみを特異的にビオチン化できる(tRid法)。さらにストレプトアビジンビーズを用いることで結合したtRNA画分を除去できる

(2) また、構築したヒト天然 RNA ライブラリを in vitro 翻訳することにより天然ペプチドライブラリを構築した。具体的には、RNA プールの 5'末端側に T7 プロモーター、SD 配列、開始コドンを含むアダプターを、3'末端側には終止コドンを含むアダプターをライゲーションした後、RT-PCR して DNA プール化した。さらにこれを転写し、ピューロマイシン・リンカーを 3'末端に連結させた後、大腸菌由来無細胞翻訳系を用いて翻訳することによって生成したペプチドと mRNA とをピューロマイシンを介して連結させた。このライブラリを mRNA ディスプレイ法と組み合わせることにより、Keap1 を標的とする

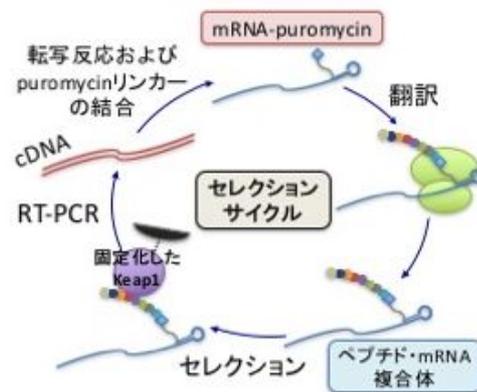


図2: ペプチドセレクション法の概要

ペプチドリガンドの探索を行った。磁気ビーズに固定化した標的タンパク質(Keap1)に特異的に結合したペプチドを回収し、そのペプチドに連結された mRNA を逆転写・PCR によって増幅した後、得られた DNA をクローニングし配列解析することで、標的に結合するペプチドを決定した(図2)。

<引用文献>

Goto, Y., Katoh, T., Suga, H.
"Flexizymes for genetic code reprogramming."
Nat Protoc, 6, 779-90 (2011).

4. 研究成果

(1) 上記の方法によりヒト培養細胞から抽出した small RNA 画分を用いて RNA ライブラリの構築を行い、葉酸を標的とした RNA の in vitro セレクションを実施した。その結果、セレクションを4ラウンド実施したところで葉酸に結合するとみられる small RNA 画分の増幅が見られ、その配列を複数種類同定することに成功した。中でもマイクロRNA 前駆体の一つである pre-miR-125a に対する着目して、その結合能の解析をインラインプロービング法などにより実施した。葉酸と pre-miR-125a の結合様式を解析したところ、葉酸は pre-miR-125a のループ部分に結合していることが示された(図3)。

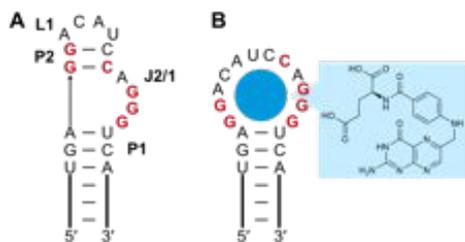


図3：葉酸と pre-miR-125a との相互作用様式

一般に、pre-miRNA は図3に示すようにヘアピン構造を有しており、そのループ部分が RNase の一種である Dicer により切除されることによって成熟化するため、葉酸の結合が Dicer による pre-miR-125a の切断効率に影響を及ぼすか否かについても解析をおこなったが、Dicer の切断効率には影響がないことが確認された。今後、葉酸の結合が pre-miR-125a の成熟化および機能にどのような影響を及ぼしているのかについてさらに解析を進めたいと考えている。

本研究の成果のうち、天然 RNA ライブラリから tRNA のみを選択的に除去する手法(tRid法)を後述の論文において報告した。また、葉酸を標的とする RNA の in vitro セレクションの結果および pre-miR-125a と葉酸の相互作用様式の解析結果について論文にお

いて報告した。

(2) また、ヒト天然 RNA ライブラリを翻訳することによって作成した天然ペプチドライブラリを用い、mRNA ディスプレイ法によって Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) に特異的に結合する天然ペプチドリガンドの探索を行った。その結果、astrotactin-1 (ASTN1) に由来するペプチドの断片が Keap1 結合ペプチドとして得られた。この ASTN1 ペプチドと Keap1 との相互作用の強さを表面プラズモン共鳴法により解析した。また、細胞抽出液を用いたプルダウンアッセイの結果、確かに Keap1 と ASTN1 ペプチドとの結合が見られることが確認された。Keap1 の天然のリガンドとしては既に Nrf2 が知られているが、今回得られた ASTN1 ペプチドはこの Nrf2 由来のペプチドよりも Keap1 への結合力が強いことが示された。

これらの Keap1 結合ペプチドのセレクションの結果、および Keap1-ASTN1 ペプチドの相互作用様式の解析結果については現在論文投稿の準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Futai, K., Terasaka, N., Katoh, T., Suga, H.
"tRid, an enabling method to isolate previously inaccessible small RNA fractions."
Methods, 106, 105-11 (2016).
doi: 10.1016/j.ymeth.2016.04.033
査読有り

Terasaka, N., Futai, K., Katoh, T., Suga, H.
"A human microRNA precursor binding to folic acid discovered by small RNA transcriptomic SELEX."
RNA, 22, 1918-1928 (2016).
doi: 10.1261/rna.057737.116
査読有り

〔学会発表〕(計2件)

矢嶋亮・加藤敬行・菅裕明
「試験管内選択によるヒト内在性タンパク質間相互作用の網羅的探索法の開発」
日本化学会第97春季年会(2017)

Yajima, R., Hideshima, T., Katoh, T., Suga, H.
"Exploration of human protein-protein or peptide-protein interactions by means of mRNA display."
日本化学会第97春季年会(2017)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 敬行 (KATO, Takayuki)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90567760

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし