

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06136

研究課題名(和文) 核酸アプタマーによる受容体型チロシンキナーゼ活性化過程の速度論解析

研究課題名(英文) Kinetic analysis of the activation process of receptor tyrosine kinases by using DNA aptamer

研究代表者

植木 亮介 (Ueki, Ryosuke)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：90755703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：受容体型チロシンキナーゼは細胞の増殖や分化を制御する増殖因子の受容体として機能する。本研究ではこれら受容体の詳細な活性化機構の解明に向けて、細胞膜上での受容体クラスタリング挙動を制御する分子ツールの開発、およびクラスタリング様式が細胞シグナルへ与える影響について評価することを目的とした。具体的には、標的受容体に結合する核酸アプタマーの複合体を設計し、受容体のクラスタリング挙動の制御を試みた。また、受容体クラスタリングの解析手法として超解像イメージングに着目し、標的受容体の解析に供するプラスミド構築と真核細胞における発現の検討を行い、イメージング実験に向けた遺伝子発現系の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Receptor tyrosine kinases (RTKs) are known as receptors for growth factors. In this research, we tried to develop novel molecular tools that can evaluate clustering behavior of RTKs on cell surface in order to get a deeper insight into the activation mechanism of RTKs at a molecular level. We designed some DNA aptamer-based functional ligands and applied them in regulation of clustering behavior of RTKs. For analysis of RTK clustering, we focused on super-resolution imaging methods. We constructed some plasmid vectors and tested them in transfection experiments for the imaging analysis.

研究分野：核酸化学

キーワード：DNAアプタマー チロシンキナーゼ受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療等の分野において細胞の増殖・分化の制御に関連する受容体型チロシンキナーゼ (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs) が注目を集めている。細胞膜上に存在する RTK はリガンド分子である増殖因子が結合することによってクラスタリングし、近接した細胞内ドメインが互いにリン酸化することで活性化する。上記の受容体活性化機構を分子レベルで理解し、制御することは、細胞シグナル伝達の全容解明や、細胞の増殖・分化などの機能・運命制御に向けた重要課題として位置付けられる。

これまで RTK 活性化の理解と制御に向けた試みは、主に受容体-リガンド間の相互作用に着目したアプローチを中心に進められてきた。具体的には、結晶構造の解析 (H. H. Niemann *et al.*, *Cell*, 130, 235.) やリガンド分子の改変 (W. D. Tolbert *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 13264.) が例として挙げられる。一方で、これら受容体活性化現象の本質は細胞膜上という極めて動的な環境における受容体のクラスタリング現象にあると考えられるものの、これまでに得られている知見は極めて限定的である。そのため、RTK のクラスタリング挙動と細胞内シグナルとの関連を体系的に評価することが求められている。

2. 研究の目的

上記のような背景において、近年申請者らは試験管内進化法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, SELEX 法) によって獲得可能な核酸リガンド分子、核酸アプタマーを用いることで、標的とする RTK のクラスタリング・活性化を人為的に誘起することに成功した (R. Ueki *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 579.)。具体的には、RTK に結合する核酸アプタマーを、共有結合的に連結、あるいは相補鎖形成により多量化することで、複数の受容体のクラスタリング誘起・活性化に成功した。誘導される受容体活性化は天然増殖因子と同様の細胞シグナルを誘起することから、化学合成可能かつ、その構造を論理的に制御可能な増殖因子ミメティクスとしての応用が期待される。

本研究では、この核酸アプタマー複合体によって誘導される受容体活性化過程を、一分子蛍光イメージングにて解析を行うことで、細胞膜上での受容体クラスタリング現象が細胞内シグナル伝達へ及ぼす影響について評価することを試みた。

3. 研究の方法

本研究課題における研究の遂行方法について、以下の通り要約する。

本研究では、異なる受容体のクラスタリン

グ形式を誘導するアプタマー複合体のレポーターを構築し、それらが誘導する受容体活性化過程を一分子蛍光イメージングにより解析することを目指した。実際には、以下の方法により研究計画を遂行した。

核酸アプタマー複合体レポーターの構築：受容体クラスタリングにおける受容体の価数・距離と配向性に着目し、これらの要素を体系的に変化させた RTK 結合性アプタマー複合体の設計を行った。また、アプタマー複合体の形成手法に関しても、共有結合・DNA 相補鎖形成・小分子リガンド/タンパク質結合などの形式を検討した。設計したアプタマー複合体はウェスタンブロットング、ELISA などによって、標的 RTK の活性化挙動を確認した。

標的受容体の超解像蛍光イメージング系の確立：細胞表層における RTK クラスタリング挙動を詳細に解析するため、超解像蛍光イメージング技術、中でも、標的受容体と光活性化蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いる PLAM (Photo-Activated Localization Microscopy) に着目した (E. Betzig *et al.*, *Science* 313, 5793.)。本手法により、細胞表層での RTK の挙動を十数 nm の解像度でイメージングすることが期待される。具体的には、標的とする RTK の C 末端側 (細胞内ドメイン末端) にリンカーを介して光活性化蛍光タンパク質を融合した真核細胞用ベクターを数種類構築した。これを真核細胞へと遺伝子導入したのち、ウェスタンブロット、および蛍光顕微鏡による発現確認を行った。

4. 研究成果

本研究課題で得られた成果について、上記「研究の方法」に記載の内容に照らし合わせ、以下の通り要約する。

核酸アプタマー複合体レポーターの構築：様々な受容体クラスタリング様式を誘導する種々のアプタマー複合体を設計し、それらによる RTK 活性化効率を評価した結果、活性化効率の異なるアプタマー複合体のレポーターの構築に成功した。これらの受容体活性化過程を一分子レベルでイメージングすることで、RTK のクラスタリング挙動と細胞内シグナルとの関連を明らかにすることが期待される。

また、アプタマー複合体の形成手法として、共有結合・DNA 相補鎖形成・小分子リガンド/タンパク質結合・タンパク質/核酸結合などの形式を検討した結果、これらの相互作用形式による RTK の活性化誘導が可能であることが見出された。上記の結果は、今回標的とした RTK の活性化が、我々の想定以上に多様な形式のクラスタリングによって誘導

可能であることを示している。

この知見を応用し、標的 RTK の活性を任意の分子によって誘導する新たな方法論を考案した。具体的には、RTK 結合性アプタマーに対し、特定の分子に結合する別種の核酸アプタマーを結合した、「二重特異性アプタマー」を利用した。この二重特異性アプタマーは標的分子存在下で二量化するよう適切に設計することで、標的分子依存的な RTK の活性化が可能であることが実証された。上記の研究成果は学術論文に投稿し、採択された (R. Ueki *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 6554.)。

標的受容体の超解像蛍光イメージング系の確立：標的とする RTK の C 末端側に光活性化蛍光タンパク質を融合したベクターを数種類構築した。シーケンス解析により、目的のベクターの構築が確認されたのち、モデルとなる真核細胞への遺伝子導入を行った。得られた結果の解釈を容易にするため、解析に供する細胞として、既知のヒト細胞株のうち、標的 RTK の内在的発現量の少ないものをウェスタンブロット法により評価を行い、選定した。

構築したベクターを選定したモデル細胞に遺伝子導入を行い、ウェスタンブロットによる発現解析の結果、目的分子量に相当するバンドが確認され、細胞における発現が示唆された。落斜蛍光顕微鏡での観察において、遺伝子導入した細胞からの蛍光が確認された。一方で、構築した数種のベクター間での蛍光強度差が見受けられた。これらベクターは異なるリンカー配列を持っており、リンカー配列による目的タンパク質の発現量・フォールディング・蛍光強度等への影響が示唆された。

次に、共焦点蛍光顕微鏡による観察の結果、遺伝子導入を行った細胞において細胞表層からの蛍光が確認された。このことから、光活性化蛍光タンパク質を融合発現させた標的 RTK は細胞膜に局在することが期待され、細胞膜上でのクラスタリング挙動解析に適応可能であることが期待される結果となった。

最後に、上記で検討した遺伝子導入細胞を用いて PALM 測定を行った。蛍光タンパク質の発現が認められた細胞を観測し、実際に数十 nm の解像度での受容体イメージングが可能であることが確認された。今後、本研究課題で構築されたベクターを用いて PALM での受容体クラスタリング解析系を最適化することで、細胞表層における RTK のクラスタリング挙動の直接的解析、および受容体クラスタリング様式と細胞シグナルの関連を解析することが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ryosuke Ueki, Saki Atsuta, Ayaka Ueki, Shinsuke Sando, Nongenetic Reprogramming of the Ligand Specificity of Growth Factor Receptors by Bispecific DNA Aptamers, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有、Vol.139、2017、pp.6554–6557、DOI: 10.1021/jacs.7b02411

〔学会発表〕(計 5 件)

Ryosuke Ueki, Functional oligonucleotide for regulation of cellular activities (1): Oligonucleotide-based growth factor mimetics-Regulation of cellular functions and its application-, 日本化学会第 97 春期年会、2017 年 3 月 17 日、慶応大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)

熱田 早紀、機能性核酸に基づく細胞機能制御 (2) 増殖因子シグナルの外部環境依存的スイッチング、日本化学会第 97 春期年会、2017 年 3 月 17 日、慶応大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)

Ryosuke Ueki, Synthetic Growth Factors based on Functional Oligonucleotides, The 43th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016 年 9 月 28 日、熊本大学黒髪キャンパス (熊本県・熊本市)

Ryosuke Ueki, DNA nanotechnology for controlling receptor signaling, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015 年 12 月 19 日、ハワイ (米国)

Ryosuke Ueki, Effect of DNA aptamer-based functional ligands on cellular motility, The 42th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015 年 9 月 25 日、あいめっせホール (兵庫県・姫路市)

〔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://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sandolab/Ueki_Ryosuke.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

植木 亮介 (UEKI, Ryosuke)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：90755703