

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0057

研究課題名(和文) 分解反応の遷移状態構造に立脚した新型核酸医薬を志向した核酸酵素の創製

研究課題名(英文) Development of nucleic acid enzymes for new nucleic acid medicines based on the transition state in molecular degradation

研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：60314233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：菌の増殖は、食物発酵や環境衛生に関連する分野では、モニターすべき最も基本的な情報である。今までは、採取した菌を培養しそれを顕微鏡で観察しており、さらにより詳しい情報を得るためには菌から核酸を抽出し増幅することによって元の菌の量を定量していた。菌を扱うには、簡便かつ即時的な分析が必要であるが、これまでの方法では困難だった。われわれは、その場で菌の増殖を蛍光で検出できる化学システムを構築した。増殖の元になるリボソームの存在量に合わせて蛍光を出す人工RNAを開発し、これを混ぜるだけで菌の増殖を目で見えるようにした。この新技術は、発酵や衛生など菌の増殖を取り扱う分野での菌増殖の簡単分析に有効である。

研究成果の概要(英文)：The solid-state fermentation (SSF) bioprocesses are performed in complex solid-rich systems that present significant challenges for effective monitoring of bacterial population dynamics. We have developed an efficient chemical system that allows quantification of bacteria population by fluorescence-based analysis. The key component in the system is the exciton-controlled fluorescent RNA aptamer, which was covalently conjugated to two thiazole orange moieties and serves as a competitor of bacterial ribosome. The intensity of fluorescence from such a ribosome-sensing system was controlled by the excitonic interaction between dyes in the RNA aptamer and it increased drastically in the presence of *Escherichia coli*. This innovative fluorescence-based competition system is valuable for quantification without any extraction of bacterial nucleic acids, and provides the simplest and most feasible way to optimize SSF bioprocesses.

研究分野：生物有機化学

キーワード：RNA アプタマー 核酸構造 バクテリア

1. 研究開始当初の背景

身体的な機能障害を起こす疾病の例として、ポンペ病やパーキンソン病などが知られる。それらは、それぞれグリコーゲンやアセチルコリンが加水分解を受けて代謝されずに蓄積されることによって引き起こされる。酵素補充療法などによってそれらの疾病の解決が試みられているが、重篤な副作用を引き起こすこともあり、別のアプローチが求められている。

最近の医薬のアプローチの一つにアプタマー型核酸医薬がある。核酸医薬には、RNAi やアンチセンスなどのアプローチもあるが、標的分子に結合する能力としてはアプタマーが最も性能が高い。アプタマーは標的小分子をテンプレートにして容易に製造しやすいのに加えて、体内で一定時間のうちに代謝されるので毒性が低い。一方で、アプタマーは、標的分子に結合する阻害剤として働くことはできるが、反応を触媒することはできない。他方、RNA ホスホジエステル結合を切断する酵素機能を持つ「リボザイム」と呼ばれる RNA が知られているが、反応に多様性がない。アプタマー型核酸医薬を飛躍的に発展させるためには、単なる阻害剤ではなく、積極的に標的分子を分解する機能を持たせることも必要であろう。その設計の方法を確立させるためには、目的の反応の遷移状態を理解し、それを RNA の構造の中で模倣するところからスタートしなければならない。

研究代表者はこれまでに、本研究を達成するために必要な技術を獲得し、成果を出している。研究グループですでに獲得している技術は次の通り。

- 遷移状態を模倣した活性小分子の化学合成
- スクリーニングで用いられる 60~80 塩基の RNA (30~50 塩基のランダム配列を含む) の作製
- 小分子を結合したアフィニティーゲルの作成

上記の通り RNA アプタマーは、これまで小分子に結合する機能を持つだけであったが、分子が結合したあとに、例えば加水分解反応を触媒するような機能は持ち合わせていなかった (RNA を切断するリボザイム機能は除く)。新たに結合切断反応を触媒する RNA を得るためには、結合切断反応の遷移状態を模倣した分子に強く結合できる RNA を創り出せばよい。そうすると、アプタマーを作製する方法をそのまま使って反応触媒性 RNA を創り出せるとともに、積極的に遷移状態構造に結合できる立体構造を RNA が形成することによって、反応系のポテンシャルエネルギー局面の鞍点を大きく引き下げ、化学反応の速度や生成物の選択性を積極的に決定できるかもしれない。得られた触媒 RNA をさらに化学的に改良すれば、新たな「RNA 医薬」へと転換させることができる。

2. 研究の目的

本研究では、より緩和な条件下での高収率で高選択的に化学反応を検出する新しい機能性核酸を獲得する。

目的の化学反応の遷移状態を近似した安定小分子を作製して、遷移状態近似分子が結合可能な化学反応触媒 RNA を創製する。

蛍光性核酸をアプタマー構造に変換して、目的分子の存在を可視化する方法を確立する。

3. 研究の方法

本研究は、3 年間の研究期間で、反応を触媒する新しい機能性 RNA を創り出し、その触媒反応性評価をすることを目指した。さらに、得られた触媒 RNA の機能を最大化するための RNA 構造の単純化を行うことによって、核酸医薬のリード分子を獲得するための新しいアプローチを提供することも目指した。

上記目的の に対しては、特にテンプレートとなる小分子の設計と合成を中心に行った。まず、この概念を達成するための遷移状態構造モデル反応として、「クリックケミストリー」に着目した。クリックケミストリーでは、生体分子を構成するあらゆる官能基と反応することなく、生体分子間もしくは生体分子 - 小分子間を接続することができる官能基直交的な化学反応である。特に、アルキンとアジドの間のヒュスゲン環化付加反応がクリックケミストリーの代表的な反応としてよく知られている。この反応を用いて、最近では、さまざまな修飾が生体分子に施されて生体分子の機能化が達成されている。しかし、ヒュスゲン環化付加反応を生体内で行うことはできない。なぜなら、アルキンを強く歪ませることができる分子量の大きな構造を使わない限り、ヒュスゲン環化付加反応では一般的に銅触媒を必要とする。触媒とはいっても、実際には相当量の銅イオンを効率的反応の実現のために必要とし、生体内の反応への応用には向かない。したがって、ヒュスゲン環化付加反応の遷移状態を活性化する能力を持つリボザイムを分子進化工学的に取得 (in vitro selection) して、銅触媒を加えることなくヒュスゲン環化付加反応を進行させられる系の開発に、まず取り組むこととした。

また、上記目的の に対しては、リボソームの検出を研究標的として設定した。細菌の活動度を知る上で一つの分子指標になるのが、リボソームである。リボソームは、高次構造の RNA とタンパク質から構成される複合体であり、リボソームを通して遺伝子情報がタンパク質へ翻訳されるので、細菌の生命活動において必須の分子である。われわれは、細菌リボソームを蛍光モニタリングによって検出するために、チアゾールオレンジ特有の分子機能を利用した蛍光性 RNA 鎖を設計した。チアゾールオレンジの蛍光強度は、メ

る。ネオマイシンが取り除かれると蛍光色素がアプタマー内の二重らせん構造にインターカレーションできるようになり強い蛍光を発光するようになったと考えられる。このアプタマーシステムの蛍光を用いることにより、固体発酵した混合物にこのシステムの溶液1滴を加えるだけで大腸菌の増殖状況を把握することができるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Guo, L.; Okamoto, A.
Fluorescence-switching RNA for detection of bacterial ribosome
Chem. Commun. 2017, 53, 9406-9409.

〔学会発表〕(計 1 件)

L. Guo and A. Okamoto, "Bacterial population quantification in solid state fermentation by exciton-controlled fluorescent neomycin-competition RNA aptamer", the 18th Tetrahedron Symposium, Budapest, Hungary, 26-29 June, 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〕

2017.7.31 『菌増殖を蛍光で検出』化学工業日報

2017.8.24 『細菌の増殖、蛍光で検出』日経産業新聞

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 晃充 (OKAMOTO, Akimitsu)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号： 6 0 3 1 4 2 3 3

(2)研究分担者

林 剛介 (HAYASHI, Gosuke)
東京大学・工学系研究科・助教
研究者番号： 4 0 6 4 8 2 6 8