

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 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：2016～2017

課題番号：16H06692

研究課題名(和文) 熱揺らぎの影響を踏まえた核酸医薬の分子設計

研究課題名(英文) Molecular Design of RNA aptamers

研究代表者

今清水 正彦 (Imashimizu, Masahiko)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：90465930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多様な生理・薬理機能を生み出すRNAアプタマーの高い標的分子結合性を分子科学に則して理解するため、ランダム配列RNAプールから1回の選抜のみでアプタマーを取得する新しい方法を開発し、アプタマー取得法の脱ブラックボックス化を行った。また、熱揺らぎによる構造不均質性の概念を導入した。具体的には、RNAアプタマーは、熱揺らぎで容易に変換できる2次構造の数を増やすことで標的タンパク質との結合親和性を高めるという分子モデルを提案した。本方法により、ヒトTGF- β 1とヒトthrombinの各タンパク質に特異的に結合するRNAアプタマーを複数作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Aptamers are oligonucleotide ligands with specific binding affinity to target molecules. Here we develop a non-repeated, primer-less and target immobilization-free isolation method for generating RNA aptamers, which is robust to experimental noise. Uniquely, this method focuses on finding and removal of non-aptamer sequences from the RNA pool by RNase digestion leaving target-bound aptamer molecules, and thus is independent of aptamer types. The undigested RNA sequences remaining are so few in number that they must be mixed with a large excess of a known sequence for further manipulations and this sequence is then removed by restriction digestion followed by high-throughput sequencing analysis to identify aptamers. Using this method, we generated multiple RNA aptamers targeting thrombin and TGF- β 1 proteins, independently. This method also enables us to predict a common average structural property of these aptamers that is different from input RNA.

研究分野：核酸生化学

キーワード：熱揺らぎ RNAアプタマー 核酸-タンパク質相互作用 結合アフィニティー 構造不均一性 ハイスループット法

1. 研究開始当初の背景

核酸アプタマーは、抗体のように標的物質に対して高い結合親和性を持つことが知られている。従来の RNA アプタマー取得技術として、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法がある。SELEX 法でアプタマーを取得する要点は、ランダム核酸配列プールに含まれる極めて少数の標的分子結合配列種の割合を指数的かつ段階的に高められることである。言い換えると、容易に物質として取り扱える核酸量 (マイクログラム程度) を維持しながら、全核酸量あたりのアプタマーの核酸量の割合を、1割の1兆分の1程度から1割以上まで上げられる点である。この方法概念が SELEX の「Enrichment (濃縮)」である。しかし、実際の SELEX 作業では、必ずしもアプタマーの濃縮は起こらない。複数のアーティファクトが PCR によって指数的に増幅され得るからである。ここで言うアーティファクトの原因として挙げられるのは、不十分な分画による残存核酸、プライマー配列の選抜工程への影響、担体への固定化に依る標的分子の状態変化、PCR 増幅における配列嗜好性および新規配列の形成、逆転写反応および転写反応における配列嗜好性等である。加えて、各アプタマーの分子コピー数が少ないために標的分子との結合が決定論ではなく確率論的になり得ること、標的分子が特異的な物性を持つこと、長時間の繰り返し工程に潜むヒューマンエラー等も原理的にアプタマーの濃縮が起こらない原因になる。また、作業工程の繰り返し数が多い程、これらの因子の組み合わせから成るブラックボックス化が進む。

アプタマー取得の課題は、従来方法の短縮化と脱ブラックボックス化である。この解決には、上述した SELEX 法の「濃縮」概念を、それに対応する方法概念でありながら、ブラックボックス化の余地がないシンプルなものに置き換える必要がある。具体的には、選抜工程に影響するノイズを出来る限り除いた条件で、標的分子に結合する RNA の配列情報を一回の選抜工程で同定できる方法が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者がこれまでに見出した熱揺らぎを利用する転写機構の概念 (Imashimizu et al., PNAS 2016) を医学分野に応用し、核酸・タンパク質相互作用に基づいた核酸医薬の作用機序・設計原理を解明することである。具体的な研究項目は以下に示す。

1. ハイスループット法を導入し、核酸創薬パイプラインの脱ブラックボックス化を狙う。これを基に、機能に応じた核酸医薬の分子設計原理の構築を目指す。
2. ヒト TGF-β1 と特異的に相互作用し、薬理作用 (TGF-β1 受容体への結合を阻害) を持

つ RNA アプタマーを作製する。

3. 多様な生理・薬理機能を生み出す RNA アプタマーの高い標的分子結合性を分子科学に則して理解するため、熱揺らぎの概念を導入する。

3. 研究の方法

本発明の構成の概要を図1に示す。本方法の具体的な作業工程は、ハイスループット DNA シーケンシングライブラリーの作製工程と配列解析から成り、その詳細は、図2の通り以下の(a)~(i)の工程から成る。

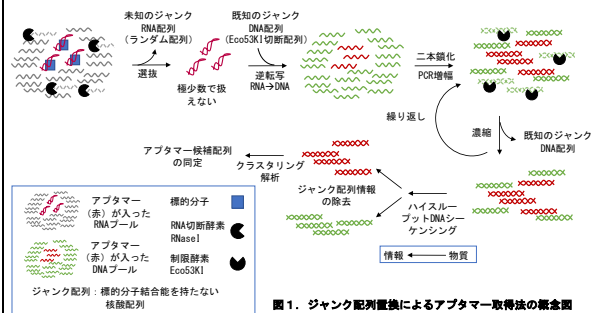
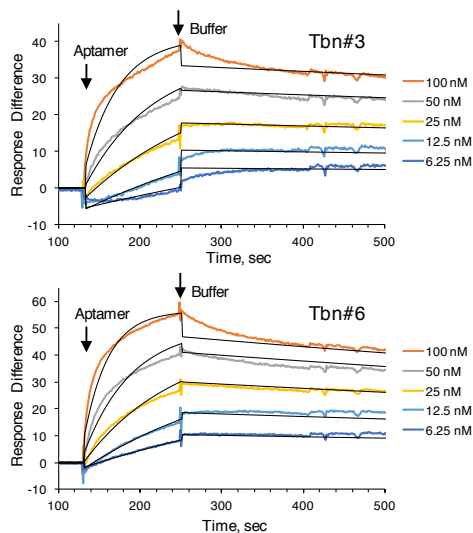


図1. ジャンク配列置換によるアプタマー取得法の概念図

(a) 転写反応による多コピー RNA 合成。この転写反応では、従来法で必要視されていた DNA 二本鎖化の工程を省いている。つまり、転写領域が一本鎖であり、T7RNA ポリメラーゼが結合する T7 プロモーター領域のみが二本鎖構造を持つ DNA を鋳型としている (図3 (a))。この鋳型を用いた転写法で転写効率の低下は見られない。RNA の長さは 40 塩基であり、転写反応により合成される各 RNA 分子種のコピー数は 10 程度である。

(b) 標的結合 RNA アプタマーの選抜。RNaseI 切断と限外ろ過を組み合わせ、安定な複合体を形成した RNA を分画する。RNA 切断酵素である RNaseI は、RNA の一本鎖領域を塩基配列に依存せずに切断するが、二本鎖領域を切断しない。従って、二本鎖領域を含み、かつ構造が標的との結合により安定化されている 40 塩基程の短い RNA は、RNaseI 切断に耐性になる。加えて、標的結合型 RNA 濃度は、非結合型 RNA 濃度に対して極めて小さいため、たとえ切断が起こった場合でも、標的結合型 RNA の切断は、非結合型 RNA の切断より大きく遅れる。つまり、一定時間で切断反応を止めることにより、標的結合型 RNA の切断を防ぐことができる。標的分子と RNA プールが入った中性緩衝液に 500 unit の RNaseI を加え、30 分間 37°C で保温した混合溶液を限外ろ過スピンカラムに入れ、RNaseI 切断産物を遠心分離により除去する。限外ろ過スピンカラムは、標的分子と RNA の複合体が膜を通過しないような分画分子量であり、低吸着性の膜材質ポリエーテルスルホンを用いる。RNaseI に部分的に切断され、かつ限外ろ過膜内に残存した RNA は 3'末端が水酸基からリン酸基に変化している。このため、リンカー DNA とのライゲーション反応



Tbn#3	5'CCUUGGUUCGGAUAAUUUAAGUAUUGUCUCAUCA3'
Tbn#6	5'GAGGUGUUUGGGUACUACUCGUAAGGAUUUCAUCA3'
TGF#2	5'UGGUAUUUGUCGUUAUACGGUCCUCGCAUUCUCCA3'
TGF#5	5'AUCCGUCACUUGCAAUGUAUAUAUUGUACCAAGCA3'
TGF#6	5'CGGGGAUAUGAUUUGCUUAGGAGUCGAGUUCUAUGSCCA3'

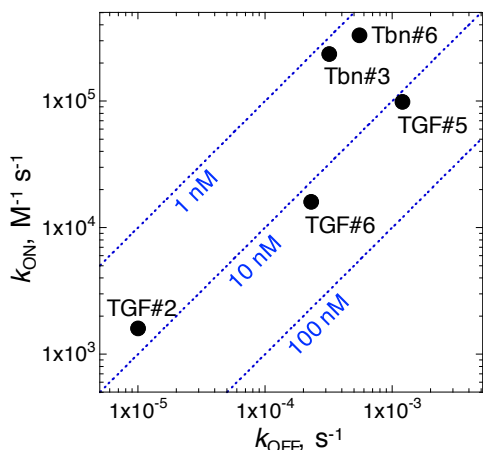


図4. SPRによるヒト thrombin 結合型アプタマーとヒト thrombin タンパク質との相互作用モニタリング例(上)。SPR センサーグラム変化から thrombin アプタマーと TGFβ1 アプタマーにおける標的結合の解離定数(青色破線)を測定した。各アプタマーの RNA 配列を示した(中央)。

扱いができない程少数である。しかし、続く工程で速やかに既知の配列から成る核酸(DNAでもRNAでも良いが、ここではDNAを用いている)を大量に投入することで極少数のアプタマーを保護し、核酸物質として簡便な扱いができるようにしている。大量に投入した既知の配列は、次の過程で行われる酵素処理により簡便かつ大幅に減らすことができる。残存する既知の配列は、ハイスループットシーケンシング解析により物質から情報に変換後、情報として簡便に除去することができる。アプタマー配列の検出限界は、配列解読総数(ハイスループットシーケンサーのスペック)に依存する。以上の作業により、特殊な仮定・技術を用いなくて、簡便にRNAプール中に極めて小さい比率で存在するアプタマーを同定することができる。公知の酵素反応に基づいた一回の選抜であるため、選抜工程における不確実性が小さい。本方法では、

核酸プールに含まれるアプタマー候補配列以外の核酸配列を「ジャンク配列」と定義している。未知のジャンク配列を既知のジャンク配列に置き換えること(ジャンク配列置換)が従来の SELEX 法の「濃縮」に対応する方法概念である。

本方法では、標的分子に結合する核酸配列集団の性質を統計的に評価することができる。このため本方法は、新しいアプタマー創薬技術になるだけでなく、臨床や環境等の診断プロファイリング技術、核酸分子ツールの分析的な製造法等、核酸と標的分子相互作用に基づいた様々な産業技術にも繋がる可能性がある。

目的2において、新たに構築したジャンク配列置換法を用い、当初目的としていたヒト TGF-β1 に対する RNA アプタマーに加えてヒト thrombin に対する RNA アプタマーを複数同定した。SPR(表面プラズモン共鳴)測定により、これらのアプタマーの標的タンパク質に対する平衡の解離定数は 1nM~10nM のオーダーと推定された(図4)。

目的3を達成するため、(i) ランダム配列 RNA ライブラリーと、(ii) その中から標的タンパク質との結合のために選択された RNA 集団の2つの配列グループを用いて2次構造の最小自由エネルギーを計算し、それらの平均的な構造特性を比較した。興味深いことに、標的タンパク質に結合する RNA 集団は、ランダム配列 RNA 集団よりも1つの安定な2次構造を取ることを好まないことが示唆された。この比較に基づいて RNA アプタマーの標的結合アフィニティーにおける新しい分子モデルを提案した。RNA アプタマーは、単独の状態では熱揺らぎで容易に変換できる構造数を増やしておき、標的タンパク質との複合体形成により安定構造にシフトするというモデルである。今後、NMR等の分子の揺らぎ運動を直接観測できる方法を用い、この分子モデルを検証したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Masahiko Imashimizu, Ariel Afek, Hiroki Takahashi, Lucyna Lubkowska and David B. Lukatsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読有, Volume 113, Issue 47, 2016 E7409-E7417, doi:10.1073/pnas.1607760113
- ② Masahiko Imashimizu and David B. Lukatsky, *Transcription*, 査読有, Volume 9, Issue 3, 2018, 196-203, doi:10.1080/21541264.2017.1393492.

- ③ Masahiko Imashimizu, Masaki Takahashi, Ryo Amano and Yoshikazu Nakamura, *Biology Methods and Protocols*, 査読有, Volume 3, Issue 1, 2018, 1-13, doi.org/10.1093/biomethods/bpy004

[学会発表] (計 3 件)

- ① Masahiko Imashimizu, Ariel Afek, Hiroki Takahashi, and David B. Lukatsk, 発表標題「Control of transcriptional pausing by biased thermal fluctuations on repetitive genomic sequences」, 学会等名: 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 発表年月日: 2016-11-25 – 2016-11-27
- ② Masahiko Imashimizu, 発表標題「Control of transcriptional pausing by biased thermal fluctuations on repetitive genomic sequences」, 学会等名: The 1934th Biological Symposium on NIG, 国立遺伝学研究所, 発表年月日: 2017-04-20
- ③ 今清水 正彦, 発表標題「転写調節機構: 熱揺らぎ、反復配列、転写 pausing の繋がり」, 学会等名: 第 19 回日本 RNA 学会年会, 富山国際会議場, 発表年月日: 2017-7-19 – 2017-7-21

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

今清水 正彦 (Imashimizu, Masahiko)
東京大学・医科学研究所・特任講師
研究者番号: 90465930

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()