

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19484

研究課題名(和文) コラーゲンを標的とするRNAアプタマーの取得と創薬への試み

研究課題名(英文) Selection of RNA aptamer against collagen and apply to new drug discovery

研究代表者

平芳 一法 (Hirayoshi, Kazunori)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・講師

研究者番号：80199108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲン3重らせん上のアミノ酸配列は、複数のタンパク質と特異的に相互作用することで、血液凝固などの病態に直結する多彩な生理機能を発揮する。本研究は、巨大なコラーゲンを標的として一度に複数のRNAアプタマークローンを取得し、個別のクローンの性質を解析することを目的とした。それぞれのアプタマーは、認識する3重らせん上の配列(エピトープ)により、それぞれ異なる機能を発揮し、異なる用途に供せられるものと期待される。選択の結果、いくつかのクローンを取得することに成功した。現在、SPR、EMSA等の分子間相互作用に基づく測定法の改良を行い、得られたクローンのコラーゲンに対する結合を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬標的として魅力的な生理機能を持つコラーゲンであるが、コラーゲン分子の大部分を占める3重らせんドメインに対する、抗体の作製が困難であるがゆえに、アプローチすることができなかった。本研究は、SELEXの利点を最大限活用して、新しい創薬ターゲットとしてのコラーゲンの有用性を示そうとした。様々な選択方法を組み合わせてRNAアプタマーの取得条件を最適化することにより、いくつかのクローンを得ることができた。今後、コラーゲンに対する詳細な結合様式の解析により、生体機能の維持に深く関わっているコラーゲンの機能解析の一端を担うとともに、中分子医薬品として、治療薬、診断薬への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The amino acids on the collagen triple helix can interact with several proteins. These interaction (Protein-Protein Interaction, PPI) make physiological function lead directly to pathophysiological conditions such as coagulation of blood. In this research, we select multiple clones against whole collagen molecule and analyze their characters. Each clone of aptamers is expected to bind different epitope and shows different function in the PPI. Each clone would serve to their original application. We selected several RNA aptamers against whole collagen. These clones are analyzing their binding specificity, and will determine the epitope on the triple helix molecule of collagen. We are making improvement of analytical methodology based on the molecule interaction such as SPR, EMSA and analyze each clone's function.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：RNAアプタマー コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは、さまざまな機能タンパク質(可溶性因子や受容体)と相互作用することによって、血液凝固、細胞の遊走や分化、血管新生など、病態形成にもかかわる生理機能を制御している。しかし、動物種間での相同性が極めて高く、免疫原性をほとんど示さないため、一部の例外を除いてモノクローナル抗体の作成は困難であった。このためこれまで、コラーゲンが抗体医薬の標的分子として利用されることはなかった。

2. 研究の目的

近年の抗体医薬の躍進と、低分子医薬品開発における手詰まり感によって、分子量が数千~1,2万程度の核酸やペプチドに着目した「中分子創薬」の機運が高まっている。中分子薬物は抗体医薬同様、広い接触面積をもつタンパク質間相互作用(Protein-Protein Interaction, PPI)を特異的に阻害することが可能であり、かつ化学合成で製造することができるという利点をもつ。「RNA アプタマー」は、標的分子に特異的に結合するいわば「人工核酸抗体」のことであり、中分子医薬品として期待される分子である。

RNA アプタマーは、試験管内分子進化法 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) によって選択し、取得することができるため、免疫原性に依存することなく、標的分子に対して結合するものを選別することができる。

本研究では、巨大なコラーゲンを標的として一度に複数(十個以上を目標とする)の RNA アプタマークローンを取得し、個別のクローンの性質を解析することを目的とした。本研究のパイロット実験では、三重らせん構造をとり、特定のアミノ酸配列からなる合成短鎖ペプチドを標的としたが、数サイクルの段階で、サイクルを継続するに足る量の RNA を回収することが困難になってしまった。これは、標的分子の小ささ、および選択圧の強さが原因であると考えられる。これまでの研究から、対象となる分子の特定の領域を、ピンポイントで標的にすることも可能と考えた上でのパイロット実験であったが、これまで取り組んできた転写調節因子とは異なる繊維性タンパク質であり、かつ、特徴的な立体構造に乏しいといったことを考慮すると、コラーゲン分子に対し従来のような「ピンポイント戦略」では、期待する結果を得ることが難しいと考えられた。コラーゲンが生体で担う多様な役割からも、本研究では、従来の戦略を変更し、「ワイドレンジ戦略」と言うべき方法を適用することとした。すなわち、合成ペプチドではなく巨大な型コラーゲンを標的として、比較的穏やかな選択圧のもと、選別サイクルを繰り返すことにより、コラーゲンに結合しうる候補 RNA を複数取得したのちに、それぞれの候補 RNA について、コラーゲンへの結合をはじめとする機能解析を行うという戦略である。

この戦略では、それぞれのアプタマーは、そのアプタマーが認識する3重らせん上の配列(エピトープ)により、それぞれ異なる機能を発揮し、異なる用途に供せられるものと期待できる。このような、「出口を絞り込み過ぎない」戦略は、多機能タンパク質を標的とする創薬研究に有用な指針を与え、創薬リードとなりうるアプタマー取得の確率を上げるものである。さらに、このようにマルチな出口をもつ戦略は、「選択と集中」を目指す、従来のオーソドックスな研究方法とは対をなす方法であり、多機能な巨大分子に対する新たな解析法をもたらすものであると期待される。

このような新たな選択方法を用いて、型コラーゲンに対する RNA アプタマーの取得を目指した。

3. 研究の方法

(1) ランダム配列が 30nt の RNA プールを用いた選別

RNA アプタマーの選別は、通常、ランダム配列を 40nt ほどに設定する。これは、ランダム配列で立体構造をとりやすいようにするためである。このようなプールを用いることで、我々はこれまでに転写調節因子に対する特異的なアプタマーの選別に成功してきた。一方、本研究においては、最初の RNA プールを合成するための鋳型 DNA のプールを合成するにあたり、その量に限度があることから、限られた量のプールの中で分子種を多くすることが好ましいと考え、ランダム配列の長さを 30nt に設定して鋳型 DNA プールを合成し、選別を行うこととした。また、パイロット実験の結果、プールに含まれる分子種数も考慮して、これまでに成功している転写調節因子での選別プロトコルに従った選別では、選択圧が強すぎると判断し、各サイクルの選択圧を比較的低いものに設定して、選別を行うこととした。概略でも述べたように、標的分子は、市販の型コラーゲンを用い、選別は室温をベースに行うこととした。

いくつかの点で我々がこれまでに確立していた選択方法とは異なる部分があるものの、基本的には、従来の方略に則った形での選別を、パイロット実験の結果に基づき、実施した。

(2) ランダム配列が 40nt の RNA プールを用いた選別

本研究ではさらに、40nt のランダム配列を持つ合成核酸プールを用いた選別も行なった。これは、の結果（後述）を受け、改めて、これまでの研究で用いた RNA プールと同様なものを用いることが好ましいと結論づけたためである。ただし本研究では、実験におけるハンドリングのしやすさなどを考慮し、 10^{14} 種の分子を含む合成プールを使用した。RNA とタンパク質の比にしたがって選択を進めると、もとのプールから 2×10^{13} 分の 1 へと絞られることが期待され、5 種類程度の RNA クローンが得られることを期待した。

選別は 4 で行った。これは、標的分子である型コラーゲンが、室温では凝集して不溶性の沈殿を形成するためである。また、サイクルごとにバッファー中の塩濃度を 50 ~ 150nM と変化させることで、非特異的な結合を防ぐことを試みた。

4. 研究の成果

(1) ランダム配列が 30nt の RNA プールを用いた選別

先述した方略での選別を行ない、8 サイクル終了段階でのプールに含まれる RNA についてその塩基配列を解析した結果を下図に示す。

1	GGCAGGATAAAUGAAGCACGAGCGACGGC
3	GGCGGCAUGCCACGGAAGGAGGUUAACCGCCGAGCC
4	GGCACGAGCUGAAACGCAAGC
5	GGCCAGGUAAAACGUAAGAGGAUUCAAACUGUGC
8	GCAAAAGCGUAGACCGGUUUGCGGGGUCUACCACCC
9	GGCGGGCAGUGUCGACCGUGAGGUUAUUAGA
10	GGCGUGGGCGUCGGACGCGGUA
11	GGGUGAAUGUAUCCUGUUCAGCUG
13	GGCCAACAUG
15	GCAACAACGGCAGCAGCCACAAGUACGAUCAAGGACGC
16	GGCGGAAAAACAGAAGGGCGGCAGC
17	GGCCAAGGGCGAGACGGCGAGCGU
18	GGCCAGGACGCAUAAGAAACGUAGCGUGACAACAGC
19	GGCGAGCUGCGGGGGC
21	GGCCAAGCCCAGCCACAGGAAGAAGUACGGCCCCGC
22	AGCGCGGGAAAAACACACGGCGGGCAC

図 8 サイクル終了時点での RNA の配列

一見してわかるように、ランダム配列の長さが多岐に渡る。これまでの選別プロトコルでの選別では、選択圧が強く、各サイクルで得られたプールを PCR により増幅する際に、過度な増幅を行わざるをえず、結果として、PCR の過程で鋳型 DNA の立体障害などを含む、様々なバイアスが生じたためと考えられる。この点で、選別プロトコルの見直しが必要であると考えた。

また、塩基配列については、特定の配列への収斂は見られなかった。上述の選別過程における選択圧の強さといった要因に加え、実際の実験は室温、通常の pH 下で行なったため、溶液中でコラーゲン分子が凝集体を形成し、RNA の標的分子として適切に機能しなかった可能性も考えられる。すなわち、選別の過程が期待通りに進まなかった可能性がある。

以上の結果及び考察から、この選別は、我々が期待した通りのものではなかった。加えて、ここで 30nt のランダム配列を持つプールを用いた点についても考察を行なった。すなわち、ランダム配列が短い場合、特徴的な構造をとることが難しく、このことが、選別結果に影響を与えた可能性があるのではないかと、ということである。この点も考慮し、次の実験では、ランダム配列が 40nt のプールを用いて選別を行うこととした。選別の過程に関しては、先の「研究方法」の項で詳述した通りである。以下でその実験に関する結果や考察を示す。

(2)ランダム配列が 40nt の RNA プールを用いた選別

9 サイクル後のプールをクローニングして、そこに含まれるクローンの塩基配列を確認したところ、特定の配列への収斂は確認されなかった。この理由として、選択圧が低いことや、標的となり得る場所が多様であることなどが理由と考えられる。また、選別の際に非特異的結合阻害剤としての tRNA を加えなかったことなども、一因である可能性がある。

一方で、得られたクローンについて、crustalW を用いた配列解析を行ったところ、相似性があると見なされる配列がいくつか発見された(図)。また、いずれのクローンにおいても AT リッチであるという特徴が見られた。ニトロセルロースフィルターを用いた RNA アプタマーの選別では、フィルターに対する非特異的な RNA の結合が見られることが多い。この場合、GC リッチな配列は、非特異的な結合を示しやすいとされる。今回の選別で得られたプールには AT リッチな配列をもつ RNA が複数観察されたことは、これらのクローンが非特異的な結合により回収されたものではなく、コラーゲンに対する結合によって得られたことを示唆する。

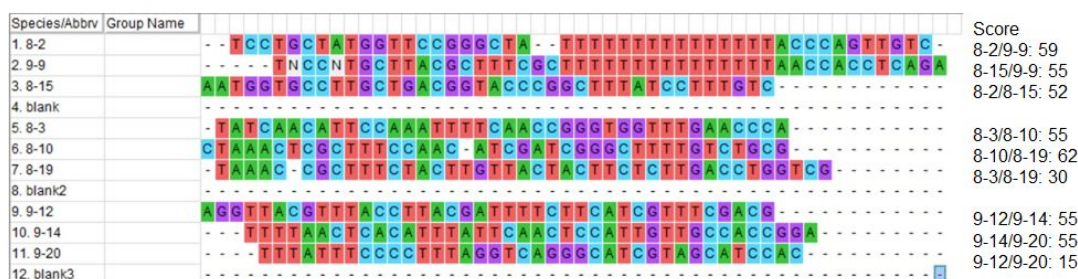


図 9 サイクル後のプールに含まれる各クローンの配列と crustalW による解析結果

crustalW による解析結果に基づき、得られたクローンについて、大きく 3 グループに分類し、各グループを代表するクローンを用いて、それぞれのコラーゲンに対する結合を、in vitro の系により解析することを試みた。ゲルシフト法により結合解析を試みた結果、

コラーゲンと RNA との結合を観察することはできなかった。この原因として、泳動に際してコラーゲンが凝集してしまい、ゲルに入らないためと考えられる。コラーゲンと結合した RNA も、ゲルに入ることが出来ないことから、コラーゲンの量依存的に、コラーゲンに結合していないフリー RNA の量が減少する傾向が観察されたものの、アプタマーの結合を評価するには至らなかった。次に BIACORE システムを利用した結合解析を行った。金膜表面に固定化したコラーゲンに対し、RNA を流し、二分子間の結合を観察することを試みた。しかし、このシステムを用いた解析についても、再現性の高い良好な結果を得ることができていない。引き続き、結合を検出できる条件を検討しているところである。

二分子間の結合を観察する方法としては、他にもフィルターバインディング法やスロットプロット法などが考えられる。これらの方法も考慮しながら、結合解析を進めていく予定である。

(3)以下に、今後の展開をまとめる。

本研究は、線維性タンパク質である Ⅰ型コラーゲンの生体内機能解析に用いるツールとしての RNA アプタマーを選別することを目的としたものである。これまでのところ、従来の「ピンポイント戦略」とは異なる「ワイドレンジ戦略」により、SELEX 法による選別を行った結果、コラーゲンに対して結合が見込まれる複数の RNA クローンを得ることができた。これは当初の目論見に沿った結果であると言える。

これまで RNA アプタマーは転写因子や受容体など、特定の分子と結合するための特徴的な立体構造を持つ分子を標的として選別されてきた。本研究で我々が取り組んでいる線維性タンパク質に対する RNA アプタマーの選別は、これまでのところ報告されていない。本研究はこの点で先駆的なものと言える。多様なアプタマー候補を選別したのち、それぞれの候補の解析を行うという戦略も、従来にない新しいものであり、今後のアプタマー研究の可能性を広げ得るものとする。

一方、得られたクローンの、コラーゲンに対する結合について、それを定性的・定量的に分析する再現性の高い手法を研究期間内に確立することができなかった。これは、コラーゲンという巨大分子ゆえのものである。今後は様々な方法を試しながら、各クローンの結合能の解析に取り組んでいきたい。

各クローンの性状解析が進めば、目的に応じたクローンの使い分けも可能となるだろう。コラーゲンのような特定のアミノ酸配列の繰り返しが見られるタンパク質の場合、各クローンを多量体化することで、より強く結合するクローンを作成することが可能となる。あるいは、様々なクローンを組み合わせた多量体を作成することで、コラーゲンのもつ複数の機能を同時に阻害できる可能性もある。このように、方法論の開発という観点からも、また、コラーゲンに対する新規分子ツールという観点からも、本研究は非常に将来性に富むものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

法邑賢一、富永祐貴、増田亮、小出隆規、平芳一法 Ⅰ型コラーゲンに対する RNA アプタマーの選別 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小出隆規

ローマ字氏名：KOIDE, Takaki

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：理工学術院

職名：教授

研究者番号（8桁）：70322253

(2)研究協力者

研究協力者氏名：法邑賢一

ローマ字氏名：HOHMURA, Kenichi

研究協力者氏名：富永祐貴

ローマ字氏名：TOMINAGA, Hiroki

研究協力者氏名：増田 亮

ローマ字氏名：MASUDA, Ryo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。