

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20087

研究課題名（和文）ウイルス様粒子を新規材料とした膜タンパク質結合RNAアプタマー創製法の開発

研究課題名（英文）Development of RNA aptamer against membrane protein using virus-like particle

研究代表者

高橋 理貴（TAKAHASHI, MASAKI）

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：00549529

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）：ウイルス様粒子（virus-like particle, VLP）で生理的構造を維持した膜タンパク質を標的とした新規のアプタマー創製技術の確立に成功した。モデル標的として、重要な創薬標的である数種のGタンパク質共役型受容体（GPCR）を選定し当該技術の最適化と高度化を図った。その結果、GPCRの機能を阻害するアンタゴニストに加えパーシャルアゴニストの取得にも成功し、VLPを活用した膜タンパク質に対する特異的結合分子の創製技術の有効性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は細胞や生体の機能を制御する重要なタンパク質である。しかしながら、それらに特異的に結合し、活性を制御する分子の汎用的創製法は依然存在しない。本研究では、VLPと核酸抗体・RNAアプタマーを用いた新たな切り口から、創薬標的として需要の高いGPCRをモデル標的として、膜タンパク質の特異的活性制御分子の創製基盤を構築することに成功した。今後、当該技術の更なる最適化と高度化を実現することで、基礎ならびに創薬における幅広い研究分野の発展に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Here we present a novel method to generate RNA aptamer to membrane protein whose structure are stabilized with virus-like particles (VLPs). In this project, several G-protein coupled receptors (GPCRs) are used for development of the method as model targets. After optimization of the method, our assessment showed that aptamers isolated from the method can bind to target GPCR and affect their function as not only antagonist but also partial agonist. Therefore, it seemed that our method provides a novel strategy for finding affinity molecules against various membrane proteins and is useful for drug discovery.

研究分野：RNA医科学

キーワード：アプタマー 膜タンパク質 virus-like particle

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

1. 研究開始当初の背景

細胞膜タンパク質は細胞および生体の機能維持と破綻に深く関わるタンパク質である。多くの現行医薬が膜タンパク質を標的としており、応用研究領域における注目度は極めて大きい。勿論、基礎研究領域においても重要であり、生体の恒常性維持機構の理解の深化とその制御の実現のため多くの研究が成されることで、知の構築とそれに基づく応用研究が発展してきた。しかしながら、未だ数多くのオーファン受容体が存在しそれらの生物学的意義が不明である事、また構造生物学的なアプローチが困難であることから分子レベルでの機能発現機構に未解明な点が多い等、依然、膜タンパク質の作用機序の全容解明とその制御を実現するためには多くの課題が残されている。その主要原因の一つとして、活性を制御する特異的結合分子の創製が困難なことが挙げられる。多くの膜タンパク質は、その量、質、局在や機能を知るために数多くの特異的な結合分子が必要とされ、その結合分子の作製には標的的精製タンパク質の調製が欠かせない。しかしながら、膜に深く埋もれ複雑な構造をとる膜タンパク質は高発現や細胞膜外において生理的構造を維持したタンパク質を精製することが極めて困難である。従って、低分子や抗体などの結合分子を探索する際に必須となる“材料”の調製が長年ボトルネックとなり、特異的結合分子の創製が停滞している。

近年、上記課題の克服のため、G タンパク質共役型受容体 (以下、GPCR) をウイルス様粒子 (Virus-like particle, 以下 VLP) の膜上に発現・濃縮した材料を用いて抗体を作製する試みがあった。VLP を活用することで GPCR の高い発現量、困難なタンパク質精製過程の省略、生理的構造保持の課題をクリアした材料に対し結合分子の探索実験が可能になった。しかし、実際には標的タンパク質以外に結合する分子を積極的に除去できないこと等から GPCR 発現 VLP 抗体の作製は依然困難を強いられている。これに対し、核酸抗体とよばれる RNA アプタマーの独特な創製過程では、非標的とする類似材料 (VLP) を用いることで目的以外に結合する分子を除去可能なカウンターセレクションが可能なる事に加え、低分子より遥かに大きい約 100 兆分子以上からなるライブラリの使用、ハイスループットシーケンサーによる大量配列の解読技術、バイオインフォマティクスを用いた統計的解析手法を活用できる等、多くの利点を有する。また、GPCR に対するアプタマー作製技術も需要が高いながら、未だ確立されていないことから、VLP をアプタマー選抜の新たな材料とすることで GPCR に対する核酸抗体・RNA アプタマー創製技術基盤が確立できるのではないかと考え、本研究の発案とその検証に至った。

2. 研究の目的

ウイルス様粒子で生理的構造を安定化させた GPCR を選抜材料としたアプタマー創製技術基盤の確立を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、市販のウイルス様粒子 (VLP) 作製キット (Expi293 Expression System, Thermo Scientific 社) を用いて数種の GPCR が発現した VLP を作製し、これに対しアプタマー選抜方法の最適化を実施した。標的 GPCR 以外に特異的あるいは非特異的に結合する分子を *in silico* で効率よく選別するためにハイスループットシーケンサーとアプタマーに特化したバイオインフォマティクスソフト (FASTAptamer) を使用し、配列解析技術の最適化を図った。また GPCR を発現した VLP への結合、標的 GPCR への機能障害効果を測定する細胞評価系を確立する事で、VLP を活用した GPCR に対するアプタマー創製技術基盤の構築と最適化を行った。

4. 研究成果

(1) 固相化 free のアプタマー選抜法の確立：数種の GPCR (EP4, ETB, P2RY2, GCGR) をそれぞれ発現する VLP を作製し、GPCR に付加した V5 タグに対する抗体を用いたウエスタンブロットにて発現を確認した。次いで、VLP に対して最適なアプタマー選抜法を確立するため、free のアプタマーと VLP-アプタマー複合体を分離する手法として、ウイルスを捕捉可能なウイルス精製ビーズ (Viro-Adembeads) を用いる方法、限外ろ過膜カラムで分子サイズに基づき分離する方法、の2つを検討した。その結果、後者の限外ろ過膜カラムで分離する方法、つまり標的 VLP をビーズなどに固相化し標的の「形・質」に影響しない分離手法によって、VLP - アプタマー複合体を回収できる方法を確立した。また、標的 GPCR 以外に特異的あるいは非特異的に結合する配列を除去するため、標的としない GPCR を発現した VLP とアプタマーライブラリーとを混ぜ合わせるカウンターセレクションを実施する事で、目的としないアプタマーを効率的に排除しつつ、ライブラリを濃縮する手法を構築することでできた。

(2) 配列解析技術の最適化：目的以外のアプタマーを効率的に除去できるように、数回のセレクション (8 - 10 回) から得られた濃縮ライブラリは、標的 GPCR と非標的 GPCR とを発現する VLP とそれぞれ混ぜ合わせ、両者に結合した配列をハイスループットシーケンサーにて解析 (約 100 万 read/run) を行った。読み込んだ配列は、Web 上から入手可能なアプタマー解析ソフト (FASTAptamer) にて解析した。数塩基 (約 6 塩基程度) 違いの配列を同一クラスターとして処理し、さらに標的 GPCR に特異的な配列、あるいは非標的 GPCR 発現 VLP と比較した際に標的への濃縮 (2 倍以上) が確認できた配列を候補配列とした。濃縮率の使用と、数塩基違い

の配列群を一つのクラスターとして処理することで、迅速かつ簡便な客観的指標に基づき、ハイスループットシーケンサーから得られる膨大な配列情報から類似性の少ない幅広い候補配列抽出法を構築した。

(3) アプタマーの結合評価系および GPCR の機能阻害効果の評価系構築: 標的とする各種 GPCR に対する結合アッセイ系の確立を試みた。具体的には SPR 解析 (Biacore system)、フローサイトメトリー (FCM)、VLP を immunoplate に固相化しアプタマーの結合を real-time PCR ベースで検出する系の確立を試みた。その結果、SPR 解析法では、SA チップによりアプタマーを固相化する系、L1 チップによる VLP を固相化する系の確立を、抗体をポジティブコントロールとして用いることで試みたが S/N 比が改善できず断念した。一方、FCM を用いた系では、VLP を脂質を染色する Dye (FM1-43) で標識し、アプタマーを Alexa647 にて標識する結合評価系を確立することができた。また、スループット性の高い方法として、96-well plate で評価する VLP 固相化プレートを作製・利用する結合評価系では、未標識のアプタマーと VLP との結合を PCR ベースで簡便に評価する系を確立することに成功した。これらの結合評価系にて、結合を確認したアプタマーについては、GPCR の機能に影響を与えるか否かを評価する「機能評価系」にて、更なる解析を行った。GPCR 機能への影響評価系確立のための検証実験では、標的とする各種 GPCR に対するセカンドメッセンジャーを検出する系を確立した。具体的には、HEK293 細胞を用いて、cAMP を cAMP-Glo assay (Promega 社) によって検出する系 (対象 GPCR: GCGR, EP4, ETB, A2a)、カルシウムをエクオリンタンパク質を介して検出する系 (対象 GPCR: P2RY2) を最適化した。その結果、GPCR (GCGR, P2RY2) に対する機能阻害効果を有するアプタマーを見出す事に成功した。さらに、特定の GPCR (P2RY2) についてはアゴニスト活性を有するパーシャルアゴニスト分子も含まれており、当該技術によって様々な機能を有する GPCR アプタマーを獲得できる事を証明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Imashimizu M, Takahashi M, Amano R, Nakamura Y. Single-round isolation of diverse RNA aptamers from a random sequence pool. *Biology Methods & Protocols*. 2018 2(1) bpy004 査読有 doi.org/10.1093/biomethods/bpy004

Fukuoka M †, Takahashi M †, Fujita H, Chiyo T, Popiel HA, Watanabe S, Furuya H, Murata M, Wada K, Okada T, Nagai Y, Hohjoh H. Supplemental Treatment for Huntington's Disease with miR-132 that Is Deficient in Huntington's Disease Brain. († equally contributed) *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2018 11 79-90, 査読有 doi.org/10.1016/j.omtn.2018.01.007

Takahashi M. Aptamers targeting cell surface proteins. *Biochimie*, 2018 145 63-72, 査読有 doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.019

〔学会発表〕(計 4 件)

Masaki Takahashi, Ryo Amano, Anna Martinez, Kazumasa Akita, Yoshikazu Nakamura. Generation of aptamers against GPCR by a novel SELEX employing virus-like particles (VLPs), 14th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2018/9/30, USA, Seattle

天野亮、高橋理貴、Anna Martinez、秋田一雅、中村義一、ウイルス様粒子を用いた GPCR 結合 RNA アプタマーの創製、第 41 回日本分子生物学会年会、2018/11/28、パシフィコ横浜
Anna Martinez、秋田一雅、今井博貴、猪俣恵美礼、高橋理貴、天野亮、中村義一、ミセル化 GPCR を標的とした SELEX 手法の開発、第 41 回日本分子生物学会年会、2018/11/29、パシフィコ横浜

高橋理貴、天野亮、Anna Martinez、秋田一雅、中村義一、ウイルス様粒子を用いた GPCR アプタマー創製法の開発、第 41 回日本分子生物学会年会、2018/11/30、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/rnaikagaku/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。