

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2006～2010

課題番号：18107005

研究課題名（和文） 相補性に依存しない機能性 RNA の研究

研究課題名（英文） Sequence Complementarity-Independent Functional RNAs

研究代表者

中村 義一（NAKAMURA YOSHIKAZU）

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号 40114590

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：核酸の構造、ノンコーディング RNA、アプタマー、分子擬態

1. 研究計画の概要

本研究では、1) 試験管内進化法を用いた人工アプタマーの創成による RNA 機能の多角的研究開発と、2) ncRNA に内蔵された天然アプタマーの探索研究を実施して、相補性非依存型 ncRNA 研究の分子基盤を確立する。これらの研究成果を統合して、RNA の「造形力」という新概念を創成する。

2. 研究の進捗状況

①「人工 RNA アプタマーの機能特性研究開発」

(1) Midkine (MK) アプタマー

炎症性サイトカインである Midkine に対する高親和性の RNA アプタマーを作出した。最適化した RNA を用いて多発性硬化症のモデルマウス実験を行った結果、顕著な発症抑制効果を示すことが明らかになった。作出したアプタマー RNA は 38mer のサイズで、MK に対して特異的に結合する。本アプタマーの医薬応用をはかると同時に、結合機序に関する構造生物学的な研究を進めている。

(2) FGF アプタマー

現在までに構造上の類似性からヒトにおいて 22 種類の線維芽細胞成長因子 (FGF) の存在が明らかとなっている。酸性線維芽細胞成長因子 (aFGF) は前立腺上皮細胞や前立腺癌細胞の強力な増殖刺激因子であること、並びに血管新生刺激因子であるため、新規な抗癌剤開発を目的として aFGF に対するアプタマーを作出した。その細胞活性を試験する過程で、ヘパリン+aFGF により細胞増殖が促進されるヒト軟骨肉腫細胞株 SW-1353 の増殖試験において、予想外に、取得した RNA アプタマーがヘパリンを機能的に置換する

ことを発見した。予想外のこの結果は、RNA によるヘパリンの機能的な分子擬態 (functional mimic) を示唆するため、現在複合体の共結晶解析を進めている。

(3) IgG アプタマー

ヒト IgG に対する高親和性アプタマーを作出し、IgG 抗体との複合体の構造を、NMR 分析、および X 線結晶構造分析し、1.9Å の高解像度の構造を明らかにした。その結果、アプタマー RNA が複数の分子内相互作用を織りなし、IgG の形状にジャストフィットする実像が原子レベルで明らかになった。RNA の優れた造形力は驚くほどである。

②「天然 RNA アプタマーの探索研究」

本研究項目は、non-coding RNA の体系的な研究を目指す極めてチャレンジなテーマである。non-coding RNA の存在自体が数年前に発見、認識されたばかりであるため、研究ツールや方法論が確立していない。そのため、探索システムを開発するところから研究を開始した。研究のアイデアは、SELEX 法に用いるランダム配列の合成 RNA のプールの代わりに、細胞から調整した天然の RNA プールを使用するという点である (Genomic SELEX)。最初に鎖長や量もまったく不均一な細胞の RNA を、傷つけず、微量漏らさず、分離して、SELEX 用の配列加工を加える操作が予想以上に困難であったが、ようやく、そのバリアーを解決し、複数の生理活性タンパク質に対する天然アプタマーの分離・解析を進めている。

3. 現在までの達成度

研究項目①「人工 RNA アプタマーの機能特性

研究開発」については、当初予想以上の格段の進捗を遂げ、RNA の潜在的な「造形力」という新しい概念を提唱すると同時に、人工アプタマーを利用した新たな医薬品の開発が現実的な段階となった。研究項目②「天然 RNA アプタマーの探索研究」については、生命科学の「暗黒問題 (Dark Matter)」と称される、ncRNA 研究の難しさを反映して、研究進捗が当初予想より遅れている。しかしながら、①の進捗が著しく、研究全体としては、「かたち」を創る RNA の潜在力 (=学術的な目標) を、基礎と応用の両面で開拓することができていると自己評価する。

4. 今後の研究の推進方策

本研究は、RNA のポテンシャルを明らかにすることを究極の目標として、これまで認識されることが少なかった「かたち」を創る RNA の特性と潜在力を、「作る」(①人工 RNA アプタマーの機能特性研究開発)、「見つける」(②天然 RNA アプタマーの探索研究)、という二つの視点から解析するように計画した。研究の進捗は、前者において著しい。そのため、後者の研究をないがしろにするわけではないが、研究の力点を前者に傾斜して、今後の研究を推進することが、国際的に高い評価の成果につながるものと考えている。そのことが、結果的には、RNA の本質的な理解をもたらし、non-coding RNA に内蔵されている天然アプタマーの理解に還元されるものと期待している。

5. 代表的な研究成果

(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 2 2 件)

- Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., Nakamura, Y., Svergun, D.I., Ito, K., Song, H.: Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.*, In Press
- Wang, J., Takeuchi, H., Jin S., Sonobe Y., Shijie, J., Mizuno, T., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Nakamura, Y., Kato, T., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Suzumura, A.: Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 3915-3920 (2008)

- Oguro, A., Ohtsu, T., Nakamura, Y.: Aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eIF4A. *Anal. Biochem*, 388: 102-107 (2009)
- Ohuchi, S.P., Ikawa, Y., Nakamura, Y.: Selection of a novel class of RNA-RNA interaction motifs based on the ligase ribozyme with defined modular architecture. *Nucl. Acids Res*, 36: 3600-3607 (2008)
- Miyakawa, S., Nomura, Y., Sakamoto, T., Yamaguchi, Y., Kato, K., Yamazaki, S., Nakamura, Y.: Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA*, 14: 1154-1163 (2008)
- Miyakawa, S., Oguro, A., Ohtsu, T., Imataka, H., Sonenberg, N., Nakamura, Y.: RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *RNA*, 12: 1825-1834 (2006)

[学会発表] (招聘講演計 18 件)

Nakamura, Y.: RNA aptamer: fundamentals to therapeutics. *Avison Biomedical Symposium 2008*, January 17, 2008 (Yonsei University College of Medicine, Seoul) 他

[図書] (計 1 件)

田原総一郎、中村義一: RNA ルネッサンスー遺伝子新革命、*医薬経済社* (2006)

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

「免疫グロブリン G に結合する核酸とその利用法」発明者: 宮川伸・中村義一、出願日: 平成 18 年 7 月 5 日 (PCT 出願) 他

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

TV 出演: 平成 20 年 3 月 30 日、中村義一 テレビ番組「話題の医学」放映、「アプタマー医薬品」ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/molbiol/H0.html>