

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05550

研究課題名（和文）DNA/RNAヘテロ2本鎖核酸を切断するヌクレアーゼの同定および作用機序解明

研究課題名（英文）Identification and characterization of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide cleaving enzyme

研究代表者

浅田 健（Asada, Ken）

国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・研究員

研究者番号：70773414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究開始以降、本研究代表者が構築した新規手法を用いてマウスの肝組織からヘテロ2本鎖核酸（HDO: heteroduplex oligonucleotide）に結合すると考えられる、候補タンパク質を複数同定した。さらにバイオインフォマティクス解析により、HDOを切断すると考えられる2つの候補タンパク質を見出した。これら4つのタンパク質に対して作用機序を含む詳細な分子機構解明に取り掛かり、いずれものタンパク質がHDOの活性を制御している事を明らかにした。この成果はNucleic Acids Researchに2021年3月にアクセプトされ、AMEDおよび東京医科歯科大学からプレスリリースされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究グループはこれまでに独自に開発した核酸医薬であるHDOが、非常に高い遺伝子発現抑制効果を示すことを報告しています。しかしながら、HDOの細胞内の作用分子メカニズムは解明されていませんでした。今回研究グループは、HDOに特異的な結合タンパク質を複数同定することに成功しました。同定したタンパク質は、塩基配列に関わらず13～16塩基対の短いDNA/RNAに選択的に結合できることを見出しました。同定した結合タンパク質が、HDOの活性制御に重要な働きをしていることを明らかにしました。HDOの作用メカニズムの解明により、今後は効果が高く副作用の少ない核酸医薬の開発につながるものと期待されます。

研究成果の概要（英文）：A tocopherol conjugated DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide (Toc-HDO) as a new type of drug. Toc-HDO is more potent, stable, and efficiently taken up by the target tissues. However, the detailed mechanisms of Toc-HDO, including its binding proteins, are unknown. Here, we developed native gel shift assays with fluorescence-labeled nucleic acids samples extracted from mice livers. These assays revealed two Toc-HDO binding proteins, annexin A5 (ANXA5) and carbonic anhydrase 8 (CA8). Later, we identified two more proteins, apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1 (APEX1) and flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1) by data mining. All four proteins regulated Toc-HDO activity in Hepa1-6, mouse hepatocellular cells. In vitro binding assays and pull-down assays demonstrated the protein binding to the Toc-HDO in a biological environment. Taken together, our findings provide a brand new molecular biological insight as well as future directions for HDO-based disease therapy.

研究分野：遺伝子発現制御、核酸医薬、医療AI

キーワード：核酸医薬 遺伝子発現制御 ヌクレアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は、従来の低分子化合物や抗体医薬では困難な標的 RNA の選択的制御を可能とする先端的なバイオ医薬技術である。DNA を基盤とした核酸医薬では ASO(antisense oligonucleotides)として、家族性高コレステロール血症に対するミポメルセン、脊髄性筋萎縮症に対するヌシルセンなどが承認されている。これら以外にも多くの疾患で臨床試験が進行しており、対象疾患に苦しむ患者さんにより多くの治療法を提供するために、アカデミアとインダストリーの両方で活発に研究がなされている。

ヘテロ 2 本鎖核酸(HDO)は、当研究室で開発したアンチセンス核酸である。一本鎖アンチセンス核酸医薬である ASO と比較しても非常に高い遺伝子発現抑制効果を示すことを報告しているが、多くの研究報告がある ASO と比べて、HDO の細胞内の作用分子メカニズムは解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

Gapmer 型の ASO 核酸医薬の作用メカニズムとしては、ASO 鎖が標的 mRNA の配列依存的に結合し、続いて RNase H が 2 本鎖 ASO/RNA を認識して標的 mRNA を切断することによって、遺伝子の発現を制御することが知られている。ASO に関しては受容体、結合タンパク質、細胞内輸送機構も含めて細胞内の分子機構が解明されており、関連する多くの報告がなされている。一方で HDO に関してはどのようなタンパク質と結合するのか、どのように 2 本鎖 HDO から 1 本鎖 ASO が分離されるのかも含めて、詳細な解明はなされていなかった。そこで今後の HDO の核酸医薬としての可能性を広げるために、HDO による遺伝子発現制御メカニズム解明を目的として、HDO に結合するタンパク質の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

以下の方法を用いて研究を進めた。

- (1) マウスへの核酸投与。
- (2) マウス肝臓組織の抽出。抽出した組織のホモジネートおよび、スクロース密度勾配遠心法を用いた、サンプルのフラクション化。
- (3) native-PAGE 法を用いたサンプルの電気泳動、続く核酸およびタンパク質の両方を同一のゲル上での染色。
- (4) HDO 投与群のマウスから得られたサンプルで特異的に染色されたバンドの切り出し。続く質量分析法を利用した、HDO に結合する候補タンパク質の同定。
- (5) 同定されたタンパク質に対する、ノックダウン細胞の作成。
- (6) 樹立した安定ノックダウン細胞を利用した、HDO の取り込み、HDO の活性評価、タンパク質の局在等、HDO と同定タンパク質の詳細な解析。

## 4. 研究成果

本研究代表者が開発した独創的な手法である、同一のゲル上での核酸染色とタンパク質染色法を利用し、HDO に結合すると推測される複数のタンパク質をゲルから切り出し、質量分析法を用いて同定した。同定したタンパク質は他の手法によっても HDO 結合候補タンパクであることを確認した。

上記の手法から ANXA5 と CA8 の 2 つのタンパク質が同定された。

他にも HDO の活性に関わる可能性のあるタンパク質を見つけるために、バイオインフォマティクス解析を行い、APEX1 と FEN1 の 2 つの HDO 結合候補タンパク質を見出した。上記 4 つのタンパク質のリコンビナントタンパク質を作成し、HDO に直接結合するかどうかを、*in vitro binding* アッセイを利用して評価した。また FP(fluorescence polarization)アッセイも行い、両方の結果から、いずれのタンパク質も HDO に結合することを確認した。また HDO の配列や配列の長さ、HDO におけるリガンド修飾、および塩濃度の与える影響など、HDO とタンパク質との結合能に対する、詳細な検討を行った。

さらに同定したタンパク質が HDO 依存的な遺伝子発現制御に与える影響を検討するために、shRNA を利用して、上記 4 つのタンパク質に対するノックダウン細胞を樹立した。樹立した安定ノックダウン細胞を利用して HDO の活性を検討したところ、これらタンパク質が HDO の活

性を制御していることが明らかとなった。

これら成果は *Nucleic Acids Research* (IF=11.501)に投稿し、最終年度の3月26日に editor よりアクセプトの連絡を受けた。その後のプレスリリース準備との兼ね合いで、最終的な表記としては、Editor decision:が3月26日、アクセプトが4月23日となった。

本研究成果は、東京医科歯科大学およびAMEDのそれぞれから、プレスリリースされている。  
AMED: [https://www.amed.go.jp/news/release\\_20210430-03.html](https://www.amed.go.jp/news/release_20210430-03.html)  
東京医科歯科大学: [https://www.tmd.ac.jp/files/topics/54835\\_ext\\_04\\_2.pdf](https://www.tmd.ac.jp/files/topics/54835_ext_04_2.pdf)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asada Ken, Sakaue Fumika, Nagata Tetsuya, Zhang Ji-chun, Yoshida-Tanaka Kie, Abe Aya, Nawa Makiko, Nishina Kazutaka, Yokota Takanori	4. 巻 49
2. 論文標題 Short DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide interacting proteins are key regulators of target gene silencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4864 ~ 4876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>本研究成果は、東京医科歯科大学およびAMEDのそれぞれから、プレスリリースされている。</p> <p>AMED: <a href="https://www.amed.go.jp/news/release_20210430-03.html">https://www.amed.go.jp/news/release_20210430-03.html</a></p> <p>東京医科歯科大学: <a href="https://www.tmd.ac.jp/files/topics/54835_ext_04_2.pdf">https://www.tmd.ac.jp/files/topics/54835_ext_04_2.pdf</a></p>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------