

平成 21年 6月 9日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007－2008
 課題番号：19770133
 研究課題名(和文) 疾病に関連したRNAアプタマーとノンコーディングRNAの構造—機能相関
 研究課題名(英文) Studies on relationships between structure and function of RNA aptamer and non-coding RNA that related to diseases.

研究代表者
 大山 貴子 (OHYAMA TAKAKO)
 横浜市立大学・国際総合科学研究科・客員研究員
 研究者番号：70433191

研究成果の概要：

C型肝炎ウイルスの遺伝子の翻訳を特異的に阻害する RNA アプタマー、多剤耐性株の出現に関連するノンコーディング RNA、の2つの機能性 RNA の立体構造と機能の相関を NMR により解析した。多剤耐性株の出現に関連するノンコーディング RNA については、薬剤との結合を検出し、その結合は連続した芳香環またはシクロヘキサン化学構造を認識していることを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：多剤耐性, non-coding RNA, NMR, Vault RNA, 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

私の本研究では、(1)C型肝炎ウイルスの遺伝子の翻訳を特異的に阻害するRNAアプタマー、(2)多剤耐性株の出現に関連するノンコーディング RNA、の2つの機能性 RNA を取り上げる。これらの機能性 RNA は、疾病治療に応用できる可能性が高い。

(1) 翻訳阻害 RNA アプタマー

C型肝炎ウイルスのキャリアは世界中に3億人とされ、同ウイルスを抑える有効な治療法の確立が切望されている。同ウイルスの遺伝子の翻訳は、mRNA

中に存在する IRES と呼ばれる同ウイルス固有の配列にリボソームが結合する事によって開始される。この IRES に高い親和性で結合する RNA 分子(RNA アプタマー)が、西川博士等によって得られた(西川等 Nucleic Acids Res. (2005))。RNA アプタマーを用いて病気の治療を目指す場合、従来は病因性タンパク質を捕捉の標的としてきた。しかし本研究で扱う RNA アプタマーは、病因性タンパク質の mRNA 中に存在する IRES を捕捉の標的としている。この RNA アプタマーは、C型肝炎ウイル

スの遺伝子の発現を通常の10%未満まで抑える事ができる非常に優れたもので、抗C型肝炎ウイルス剤としての応用が有望視されている。C型肝炎ウイルス固有であるIRES配列をターゲットとするRNAアプタマーである為、ヒトの遺伝子の発現には影響がなく、副作用の心配も少ないという特色・利点がある。

(2) ノンコーディングRNA

癌細胞における多剤耐性能の獲得は、臨床の場において大きな問題となっている。一部の癌細胞においては、Vaultと呼ばれる粒子の多量発現が見られ、このVault粒子が、薬剤の排出に関与していると考えられている。Vaultは、13MDaのリボヌクレオプロテインであり、広範な生物種においてその存在が確認されている。ヒトのVault粒子は、3種のタンパク質と3種のnon-coding RNAから構成されている。Gopinathらは2005年にVault粒子のRNA成分が、抗癌剤Mitoxantroneと相互作用することを世界で初めて見出した。この成果はノンコーディングRNAのもつ新たな機能の発見として注目される。

2. 研究の目的

(1) 翻訳阻害RNAアプタマー

RNAアプタマーとIRESの複合体の立体構造をNMR法を用いて決定し、翻訳阻害メカニズムを原子レベルで明らかにする。そして得られた知見を基にRNAアプタマーのいっそうの高度化を試み、創薬に向けた次のステップに結びつけるための指針を獲得する。

(2) ノンコーディングRNA

物理化学的手法(NMR及びCD)と生化学的手法(*in vitro*転写・翻訳系及び*in-line*プロービング)を用いて、Vault粒子を構成するRNAと様々な薬剤との相互作用をスクリーニングする。相互作用が認められた薬剤に関しては、相互作用様式を原子レベルで明らかにし、多剤耐性を克服できる薬の開発に向けた糸口を得る事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 翻訳阻害RNAアプタマー

C型肝炎ウイルスの遺伝子のmRNA中に存在するIRES配列に高い親和性を示し、同ウイルスの遺伝子の翻訳を抑制する事ができるRNAアプタマーを、T7 RNAポリメラーゼを用いた酵素合成法によって得る。この際に原料のrNTPとして¹³C,¹⁵N標識したものをを用いる事によって、¹³C,¹⁵N標識したRNA(NMRを用いた解析に供する)も得る。RNAアプタマーは、IRES配列中のIIIbとIIIcに結合する。そこで本研究ではRNAアプタマー、IRES配列のIIIb部位、IRES配列のIIIc部位の3者複合体の立体構造をNMR法によって決定する。

(2) ノンコーディングRNA

Vault粒子のRNA成分と薬剤との相互作用をNMR法等によって研究した。¹⁵N標識したVault RNAについて、HSQCスペクトルを測定した。HSQCの各ピークはRNA中の各残基毎の情報を与える。次に様々な抗癌剤を添加して再びHSQCスペクトルを測定した。RNAと抗癌剤が相互作用をした場合には、HSQCスペクトル中のピークの移動が見られるので、これを目印にしてVault RNAがどの抗癌剤と相互作用するのかスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) 翻訳阻害RNAアプタマー

酵素合成法により、NMR測定に用いるためのRNAアプタマーを得る事ができた。得られたアプタマーは生化学実験から予想される2次構造を形成していると考えられる。またG-U塩基対やG-A塩基対などの非Watson-Crick型塩基対の形成を示唆するスペクトルが得られた。現在は主体構造の決定に向けて塩基プロトン領域の情報を取得中である。

また、IRESの部分配列を得られたRNAアプタマーに添加したところ、相互作用を示す水素結合が検出された。

(2) ノンコーディングRNA

本研究では、vaultに含まれるRNA成分(vRNA)のうちhvg-2を、相互作用領域を残した

まま NMR 測定用に短く設計した hvg-2 49-mer を用いた。上述の 3(2)の手法を用いることで、6 種類の抗がん剤との相互作用のスクリーニングを行った結果、mitoxantrone、doxorubicin、etoposide は hvg-2 49-mer との結合が検出された。また Cisplatin、mitomycin C、paclitaxel については hvg-2 49-mer の結合が検出されなかった。hvg-2 49-mer との結合が検出された mitoxantrone、doxorubicin、etoposide はいずれも連続した芳香環またはシクロヘキサンを持ち、核酸塩基間にインターカレートして結合することがよく知られている薬剤である。vRNA はこの特徴的な、連続した芳香環またはシクロヘキサン化学構造を認識していると考えられる。

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 4 件)

1. Ohyama, T., Furukawa, A., Mashima, T., Sugiyama, T., Ohgara, S., Yamazaki, T., Imai, T., Okano, H., Nagata, T. and Katahira, M. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2008 No. 52, 193-194. "Structural analysis of Musashi-RNA complex on the basis of long-range structural information", 査読有
2. Matsugami A, Ohyama T., Inada M, Inoue N, Minakawa N, Matsuda A, Katahira M. *Nucleic Acids Res.* 2008 Apr; 36(6): 1805-12. Epub 2008 Feb 5. "Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, revealed by NMR, and the implications as to the mechanism of nuclease-resistance", 査読有
3. Matsugami A, Ohyama T., Inada M, Inoue N, Minakawa N, Matsuda A, Katahira M. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2007; (51): 141-2. "Structure of 4'-thioDNA which exhibits endonuclease resistance.", 査読有
4. Ohyama T., Furukawa A, Miyoshi T, Takada Y, Ohgara S, Hiratsuka K, Imai T, Okano H, Nakagama H, Nagata T, Katahira M. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2007; (51): 77-8. "Interactions with RNA/DNA of proteins involved in the regulation of transcription, translation and telomere elongation.", 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 永田 崇, "Musashi-1 が有する二つの RNA 結合ドメインによる RNA 認識機構の常磁性効果 PRE、PCS、RDC を利用した解析", 生物物理学会, 2008 年 12 月 3-5 日, 福岡
2. 片平 正人, "Structural analysis of Musashi-RNA complex on the basis of long-range structural information" Joint Symposium of "18th International Roundtable on Nucleoside, Nucleotides and Nucleic Acids" and "35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry", 2008 年 9 月 8-12 日, 京都
3. 大山 貴子, "Structural analysis of Musashi-RNA complex with paramagnetic effects", XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2008 年 8 月 24-29 日, アメリカ合衆国
4. 片平正人, "Structures and interactions of 4'-thioDNA and RNA/DNA-binding proteins", XXIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2008 年 8 月 24-29 日, アメリカ合衆国
5. 大山 貴子, ロングレンジの距離情報の抽出に基づいたマルチドメインタンパク質 Musashi と標的 RNA の複合体の構造解析, RNA ミーティング, 2008 年 7 月 22-24 日, 札幌
6. 片平正人, "Structure determination of a multi-domain protein by the use of PRE and RDC, and the unexpected A-form structure

of 4'-thioDNA exhibiting nuclease-resistance”, Korea-Japan Symposium on Biological NMR, 2008年4月25日, 韓国

7. 片平正人, “Structural studies on transcriptional and post-transcriptional gene regulation by NMR”, “International Workshop on Perspectives on Stable Isotope Aided NMR Methods for Protein Structural Analysis”, 2008年3月, 福岡
8. 大柄晶太, ロングレンジの構造情報を利用した Musashi タンパク質と標的 RNA との複合体の構造解析, 第30回日本分子生物学会年会, 2007年12月, 横浜
9. 大山貴子, ロングレンジの構造情報を利用した Musashi タンパク質と標的 RNA との複合体の構造解析, 第45回生物物理学会, 2007年12月, 横浜
10. 永田崇, RNP型 RNA/DNA 結合ドメインを有するタンパク質 hnRNP A1/D および Musashi-1 に関する NMR を用いた構造研究, 第9回 RNA ミーティング, 2007年7月, 名古屋
11. 片平正人, “The structure of human telomeric DNA and the interactions of hnRNP A1/hnRNP D proteins with telomeric DNA”, International Workshop on Perspectives on Stable Isotope Aided NMR Methods for Protein Structural Analysis, 2007年, 大阪

[図書] (計 1 件)

1. 大山貴子, 松上明正、片平正人、生命科学のための機器分析実験ハンドブック (分担)、羊土社、pp. 24-26, 2007“紫外吸収スペクトル”

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 貴子 (OHYAMA TAKAKO)

横浜市立大学・国際総合科学研究科・客員研究員

研究者番号:70433191

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし