

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06529

研究課題名（和文）繊維芽細胞増殖因子FGF5と受容体の相互作用およびアプタマーの阻害機序の解明

研究課題名（英文）Study of the interaction between fibroblast growth factor FGF5 and its receptor and the inhibitory mechanism of aptamer

研究代表者

坂本 泰一（Sakamoto, Taiichi）

千葉工業大学・先進工学部・教授

研究者番号：40383369

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）：私たちは、試験管内分子進化法（SELEX法）を用いて、繊維芽細胞増殖因子FGF5に結合するアプタマーの取得に成功し、このアプタマーは、FGF5に対して特異的に、そして強固に結合することを明らかにした。そこで、FGF5とアプタマーの相互作用を原子座標レベルで明らかにすることを目的として、短鎖化した変異体を作成した。その結果、アプタマーを42残基まで短くすることに成功し、FGF5の結合活性を保持することを確認した。さらにNMR解析により、アプタマーは2つのステム・ループ構造と多岐ループを持つことを明らかにした。また、従来法より効率よくアプタマーを取得する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アプタマーとよばれる核酸は、標的タンパク質に特異的に結合し、その機能を阻害することから、医薬品としての開発が行われている。アプタマー医薬品は、低分子製剤のように化学合成でき、抗体医薬品のように特異性が高いことから副作用が少ない次世代型分子標的薬として注目されている。本研究では、脱毛および血管新生に関わるFGF5タンパク質に結合するアプタマーの短鎖化に成功した。また、効率よくアプタマーを取得する方法を確立した。今後、アプタマーとFGF5の相互作用機序が明らかになれば、さらに効率よくアプタマー医薬品を開発できるようになることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We successfully obtained aptamers that bind to the fibroblast growth factor 5 (FGF5) using Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) method and find that the aptamer specifically and tightly binds to FGF5. To reveal the interaction between FGF5 and aptamer at the atomic coordinate level, we synthesized deletion mutants. As a result, we succeeded in shortening the aptamer to 42 residues and confirmed that it retained FGF5 binding activity. NMR analysis of the mutant revealed that the aptamer has two stem-loop structures and a multi-branched loop. We also established a method to obtain aptamers more efficiently than conventional methods.

研究分野：構造生物学

キーワード：アプタマー 繊維芽細胞増殖因子 構造解析 物理化学的解析 FGF

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、様々な細胞や組織の増殖や分化の過程において重要な役割を担う成長因子であり、血管新生、創傷治癒、胚発生などを促進する働きを持つことが知られている。ヒトでは 22 種類の FGF が同定されており、そのうち 15 種類が FGF 受容体 (FGFR) に作用すると考えられている。一方、FGFR には 7 種類のタンパク質がある。細胞特異的な FGF の作用発現のためにはそれぞれ異なるシグナル伝達を担う FGFR が存在し、それぞれの FGF と FGFR は特異的に相互作用すると考えられている。これまでに、FGF の一つである FGF2 と、その主な受容体である FGFR1c の複合体の結晶構造が明らかとなっており、FGF2 と FGFR1c の原子座標レベルでの相互作用が明らかとなっている。

(2) 毛は生えて抜け落ちるサイクルを繰り返しており、これは毛周期とよばれている。本研究で着目している FGF5 は、毛周期の成長期の終わりに発現し、毛乳頭細胞にある FGFR1c に結合して、退行期への移行を促進することが明らかとなっている。FGF5 は、病気との関りが少ないと考えられてきたため、他の FGF に比べて研究の報告は少なかった。しかし近年、FGF2 と同様に FGF5 が血管新生を促進することが報告され、様々な病気に関与することが示唆されている。これまで、FGF5 は構造が不安定であり、調製が容易ではなかったため、立体構造は明らかとなっていない。

(3) アプタマーとよばれる核酸は、標的タンパク質に特異的に結合し、その機能を阻害することから、医薬品としての開発が行われている。アプタマー医薬品は、低分子製剤のように化学合成でき、抗体医薬品のように特異性が高いことから副作用が少ない次世代型分子標的薬として注目されている。アプタマー医薬品の開発をリードするリボミック社では、FGF2 を標的としたアプタマーが開発されており、加齢黄斑変性症の治療薬として、phase 1/2a の臨床試験をクリアしている。私たちは、JST のマッチングプランナープログラムおよび A-Step (機能検証フェーズ) の研究資金の援助を受け、FGF5 に強く結合するアプタマーの取得に成功し (解離定数 K_d = 約 0.1 nM)、このアプタマーが非常に高い特異性を有し、FGF5 以外の FGF、例えば FGF2 には結合しないことを明らかにした。また、アプタマーが FGF5 による NIH3T3 細胞の増殖を阻害することを確認した。このアプタマーは、今後、アドバンジェン社において育毛剤としての開発が進められている。

2. 研究の目的

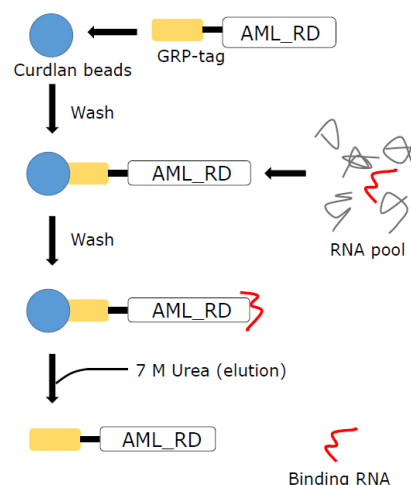
(1) これまで FGF5 についての研究は多くなく、FGF5 がどのように FGFR と相互作用するのかは明らかになっていない。そこで、FGF5 と FGFR の原子座標レベルでの相互作用が明らかにすることを目的とした。

(2) 本研究では、育毛剤の開発研究ではなく、基礎研究として、このアプタマーが FGF5 に対して非常に高い親和性と特異性を有する理由を明らかにしたいと考えた。そこで、アプタマーは FGF とどのように特異的に結合し、FGF5 と FGFR の相互作用を阻害するのかを明らかにすることを目的とした。FGF5 と FGF2 に結合するアプタマーの相互作用の比較により、アプタマー医薬品の開発に有用な情報が得られることが期待される。

3. 研究の方法

(1) FGF5 については、大腸菌を用いた発現系により大量調製した。FGFR1c については、哺乳細胞を用いた Gibco Expi293 Expression System により調製した。FGF5 と FGFR1c の複合体を形成させた後、様々な条件で結晶化を行った。

(2) アプタマーを T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写反応によって大量調製した。さらに、アプタマーと FGF5 の複合体を形成させた後、様々な条件で結晶化を行った。また、運動性が高い場合、アプタマーとタンパク質の複合体の結晶化は容易ではないことが予想されたので、アプタマーの短鎖化を行った。短鎖化したアプタマーの FGF5 との親和性については、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって解析した。また、アプタマーについては、NMR によって二次構造の解析を行った。



(3) 本研究では、FGF5 の調製のために -1,3-グルカ

図 1 GRP を用いたアプタマーの取得

ン認識タンパク質(GRP)タグとカードランビーズを用いた独自の技術を利用しているが、この GRP タグを標的タンパク質に結合させる系を用いて、新しいアプタマーの作成を試みた(図1)。すでにアプタマーの取得に成功している急性骨髄性白血病の原因タンパク質 AML1 の RUNT ドメイン(AML_RD)のN末端にGRPタグを付加し、それをカードランビーズに固定化した。40残基のランダム配列を含む鋳型DNAから調製したRNAプールを用いてSELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)実験を行った。8ラウンドのSELEX実験の後、次世代シーケンサー、SPRなどを用いて、アプタマーを分析した。

4. 研究成果

(1) FGF5とFGFR1cの複合体を形成させた後、様々な条件で結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。また、アプタマーとFGF5の複合体についても、様々な条件で結晶化を試みたが、結晶は得られなかった。

(2) 結晶化のためには、アプタマーを短鎖化することが有効であると考え、SELEX実験により得られた複数のアプタマーの配列を比較し、それらの配列を組み合わせキメラ型のアプタマーを作成し、さらにそれを短鎖化した変異体を作成した。その結果、FGF5との結合活性を保持したまま、アプタマーを43残基まで短くすることに成功した(図2a)。また、短鎖化の際に、アプタマーの多岐ループがFGF5結合能に重要であり、3つのステムは、直接FGF5との結合に関わっていないことが示唆された。そこで、3つのステム部分をDNAに置換し、末端ループを非常に安定なGAAループに置換し、43残基まで短くしたDNA/RNAキメラ型のアプタマーを化学合成した(図2b)。SPRを用いて、このDNA/RNAキメラ型のアプタマーもFGF5との結合能を保持することを確認した。RNAに比べてDNAは安価であるため、DNAへの置換によって、アプタマーの合成コストを半額以下にすることに成功した。さらに、血清中における安定性を調べたところ、DNA/RNAキメラ型のアプタマーのヌクレアーゼ耐性は大幅に上昇し、アプタマーを薬剤として応用する際の有用な情報が得られた。

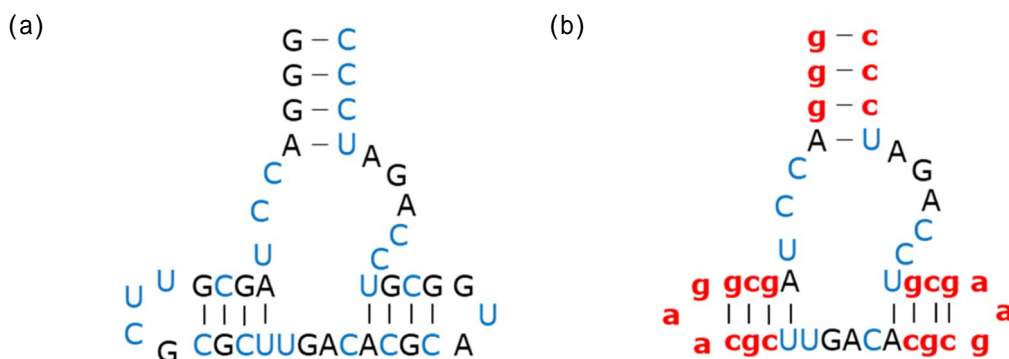


図2 アプタマーの二次構造。(a)43残基の短鎖化アプタマー。(b)42残基のDNA/RNAキメラ型アプタマー。黒字はRNA、青字は2'-F修飾、赤の小文字はDNAを示す。

(3) NMRを用いて、DNA/RNAキメラ型のアプタマーのイミノプロトンスペクトルを解析した。イミノプロトンは易動性のプロトンであり、塩基対を形成した際に観測されることから、予想通り、2つのステム・ループ構造と多岐ループを持つことを確認した。また、非常に安定なGAAループに特徴的なNMRシグナルについても確認することができた。一方で、内部ループに由来する非易動性プロトンのシグナルについてはブロードであったことから、内部ループ部分が柔軟な構造であり、多形であることが示唆された。今後は、内部ループの安定化を試みたり、FGF5との安定な複合体の形成を試みたりすることによって、アプタマーとFGF5の相互作用メカニズムが明らかになることが期待される。

(4) GRPタグを付加したAML1_RDに対してSELEX実験を行ったところ、非常に結合力が強いアプタマーを取得することができた。一般的に使用されているヒスチジン(His)タグとニックルビーズを用いたSELEXと同様にアプタマーを取得することができることを明らかにした。また、Hisタグとニックルビーズを用いたシステムでは、Hisタグの部分に結合するアプタマーが取得されることがあるという欠点が報告されているが、GRPタグはマイナスの表面電荷を有するため、非特異的な核酸の結合が起きにくいことが考えられる。GRPタグがRNAと競合的にはたらくことによって、標的タンパク質に対するRNAの非特異的な結合を抑制することが期待される。今後、GRPタグとカードランビーズのシステムを利用することによって、効率的にアプタマーが取得されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kumagai Kazuyuki, Okubo Hiroki, Amano Ryo, Kozu Tomoko, Ochiai Masanori, Horiuchi Masataka, Sakamoto Taiichi	4. 巻 174
2. 論文標題 Selection of aptamers using α -1,3-glucan recognition protein-tagged proteins and curdlan beads	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 433 ~ 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 山岸 賢司、坂本 泰一	4. 巻 50
2. 論文標題 核酸アプタマーとターゲットの相互作用の熱力学的解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 熱測定	6. 最初と最後の頁 96 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11311/jscta.50.3_96	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amano, R., Namekata, M., Horiuchi, M., Saso, M., Yanagisawa, T., Tanaka, Y., Ghani, F.I., Yamamoto, M., Sakamoto T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Specific Inhibition of FGF5-induced Cell Proliferation by RNA Aptamers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82350-w	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 -
1. 著者名 Fukunaga, J., Nomura, Y., Tanaka, Y., Torigoe, H., Nakamura, Y., Sakamoto, T., Kozu, T.	4. 巻 594
2. 論文標題 A G-quadruplex-forming RNA aptamer binds to the MTG8 TAFH domain and dissociates the leukemic AML1-MTG8 fusion protein from DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3477-3489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Kusaka, Shunsuke Kita, Takashi Tadokoro, Kouki Yoshida, Yoshiyuki Kasai, Harumi Niiyama, Yukari Fujimoto, Shinya Hanashima, Michio Murata, Shigeru Sugiyama, Toyoyuki Ose, Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka	4. 巻 172
2. 論文標題 Efficient preparation of human and mouse CD1d proteins using silkworm baculovirus expression system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Expr. Purif.	6. 最初と最後の頁 105631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2020.105631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kazuyuki Kumagai, Hiroki Okubo, Ryo Amano, Tomoko Kozu, Masanori Ochiai, Masataka Horiuchi, Taiichi Sakamoto
2. 発表標題 Selection of RNA aptamers using -1,3-glucan recognition protein tag and curdlan beads to immobilize target proteins
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuyuki Kumagai, Keisuke Kamba, Li Wan, Takuya Suzuki, Yuto Sekikawa, Kayoko Nagata, Akifumi Takaori-Kondo, Masato Katahira, Takashi Nagata, Taiichi Sakamoto
2. 発表標題 NMR analysis of biomolecules for development of novel biomaterials
3. 学会等名 The 14th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金内七海, 笹生みなみ, 山本昌邦, 杉山成, 堀内正隆, 坂本泰一
2. 発表標題 繊維芽細胞増殖因子FGF5とそれに結合するaptamerの調製と構造解析
3. 学会等名 2023年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金内七海, 堀内正隆, 笹生みなみ, 杉山成, 山本昌邦, 坂本泰一
2. 発表標題 繊維芽細胞増殖因子FGF5とそれに結合するaptamerの相互作用解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂本泰一
2. 発表標題 核酸医薬のNMR
3. 学会等名 よこはまNMR研究会第69回ワークショップ「RNA構造とNMR」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野 亮, 行方 昌人, 堀内 正隆, 笹生 みなみ, 柳澤 拓也, 田中 陽一郎, ガニ ファロハナ イスラット, 山本 昌邦, 坂本 泰一
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子FGF5に対するAptamerの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiichi Sakamoto
2. 発表標題 Biophysical study of the aptamer that binds to a target protein
3. 学会等名 The 7th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiichi Sakamoto, Tomoki Sakamoto, Hisae Yoshida, Kenji Yamagishi, Takeshi Ishikawa, Masato Katahira, Takashi Nagata
2. 発表標題 NMR analysis of artificial biomolecules that regulate the function of biomolecules
3. 学会等名 The 13th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本泰一
2. 発表標題 アプタマーのPEG付加の影響についてのNMR解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本泰一
2. 発表標題 標的タンパク質とアプタマーの結合の生物物理学的解析
3. 学会等名 第2回Aptamer Seminar in Tokyo (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiichi Sakamoto, Takashi Nagata, Risa Koji, Tae Maeda, Yumi Takeda, Naohiro Kobayashi, Peter Guntert, Masato Katahira, Colin A. Smith, Kazuo Harada
2. 発表標題 NMR Analysis of Interaction between Artificial Peptides and RNAs Derived from HIV-1 Rev and RRE RNA
3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本泰一
2. 発表標題 アプタマー研究におけるITC
3. 学会等名 MICROCAL ITCワークショップ2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本泰一
2. 発表標題 核酸医薬のNMR
3. 学会等名 日本分光学会NMR分光部会集中講義 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuyuki Kumagai, Takuya Suzuki, Yuto Sekikawa, Keisuke Kamba, Li Wan, Kayoko Nagata, Akifumi Takaori-Kondo, Masato Katahira, Takashi Nagata, Taiichi Sakamoto
2. 発表標題 NMR analysis for the development of artificial RNAs to control biomolecular functions
3. 学会等名 The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷紀志, 鈴木拓也, 関川湧斗, 神庭圭介, 万里, 永田佳代子, 高折晃史, 片平正人, 永田崇, 坂本泰一
2. 発表標題 Vif-CBF -CUL5-ELOB-ELOC複合体に結合するアプタマーのNMR解析
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹生みなみ , 天野亮 , 行方昌人, 堀内正隆, 柳澤拓也, 西本翔, 田中陽一郎, GHANI Farhana Ishrat, 山本昌邦, 坂本 泰一
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子5 (FGF5) に対するAptamerアプタマーの解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masataka Horiuchi, Shiro Kuninaga, Izumi Saito, Masato Katahira, Takashi Nagata
2. 発表標題 Development of the crystalline cellulose degradation system consisting of the psychrophilic fungus-type hybrid enzymes
3. 学会等名 The 11th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内正隆、国永史朗、齋藤泉、片平正人、永田崇
2. 発表標題 好冷菌Sclerotinia borealis由来 -グルコシダーゼのクローニングおよびキャラクタリゼーション
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 胡 艶萍、佐藤 卓史、福田 夏希、小橋川 敬博、堀内 正隆、増田 豪、大槻 純男、森岡 弘志
2. 発表標題 血液試料を用いたバイオマーカー探索のための新規アフィニティー精製システムの開発
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山岸賢司，坂本泰一（第6節RNAの立体構造と計算化学49～59ページを分担執筆）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 411
3. 書名 mRNAの制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用	

1. 著者名 杉山成，他 51名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社シーエムシー出版	5. 総ページ数 288
3. 書名 タンパク質結晶の最前線（普及版）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	堀内 正隆 (Horiuchi Masataka) (90322825)	北海道医療大学・薬学部・准教授 (30110)	
研究分担者	杉山 成 (Sugiyama Shigeru) (90615428)	高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授 (16401)	

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
---------	---------