

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870026

研究課題名（和文） 立体構造情報に基づいた白血病原因蛋白質に結合する新規 RNA アプタマーの創製

研究課題名（英文） Structure based design of novel RNA aptamer against AML1.

研究代表者

野村 祐介 (NOMURA YUSUKE)

東京理科大学・理学部・応用化学科・助教

研究者番号：10609308

研究成果の概要(和文)：

本研究では AML1 に対する RNA アプタマーの立体構造の情報を基に、RNA アプタマーを設計し、Runt への親和性の向上を目指した。1. 融合型 RNA アプタマーの Apt14 において、Runt へ高い親和性を示すことが明らかとなった。2. Apt14 変異体と Runt の相互作用解析から、内部ループと末端のステム構造が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The purpose of this study is to obtain a novel RNA aptamer against AML1 Runt domain by the structure based design. (1)The designed aptamer, Apt14 has high affinity for the Runt domain. (2) The mutant analysis of the Apt14 suggested that internal loop and terminal stem structure are important for the affinity to the Runt domain.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野:生物学

科研費の分科・細目:構造生物学

キーワード:RNA アプタマー, 立体構造

### 1. 研究開始当初の背景

白血病の一種である急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) は 8 番と 21 番の染色体転座 t (8;21)によって転写因子 AML1 と転写抑制因子 MTG8 の融合蛋白質がつくられることによって起こることがわかっている [Look AT, Science 278, 1059-1064 (1997)]. この AML1 の DNA 結合領域である Runtドメインに対する数種類の RNA アプタマーがすでに取得されており, Runt に対する RNA アプタマーの親和性は, 標的 DNA の親和性に比べて約 10 倍強いことが明らかとなっている. 二次構造予測を基にこの RNA アプタマーに残基置換の変異を加えても, 親和性がより強くなる変異体は見いだせなかった. これはアプタマーを得る際に SELEX によって親和性の強い配列が得られていることを意味しているが, それ以上の親和性をもつ配列は従来の SELEX だけで得るのは非常に困難であることも意味している.

研究代表者は得られた RNA アプタマー (Apt1 ~ Apt8)のうち, Apt1 について NMR 法を用いた立体構造解析を行った. その構造および配列解析を行ったところ, SELEX により得られた配列の二次構造予測だけでは見いだせなかった, すべてのアプタマーに保存するモチーフを見出すことができた (図 1). この保存モチーフの立体構造を DNA および RNA と比較したところ, RNA アプタマーは DNA の構造を擬態することで Runt ドメインと相互作用していることを明らかにした. しかしながら, この DNA 擬態モチーフだけでは DNA に比べて 10 倍という強い親和性は再現できない. つまり, RNA アプタマーが Runtドメインに強く結合するためには, DNA 擬態モチーフだけではなく, その他の部分関わっていることが考えられた.

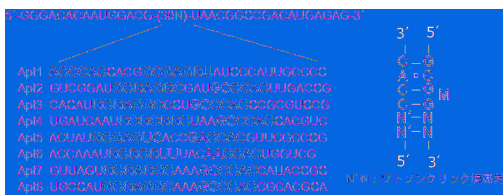


図1. SELEX によって得られたアプタマーと保存されたモチーフの二次構造.

### 2. 研究の目的

本研究では, 白血病原因蛋白質の Runtドメインに対する RNA アプタマーについて, その立体構造から, Runt ドメインに対し, より高い親和性を有する RNA アプタマーを創製することが目的である. 通常, SELEX は 30~40 残基ほどのランダム配列からセレクションを行うため, 親和性の非常に強い配列がそれ以上の長さの場合, 従来の SELEX では親和性の高い RNA アプ

マーを得ることはできない. また, 塩基置換が行われることも多いが, RNA の二次構造予測の情報だけでは結合モチーフを見出し, 最適化することはできない. 研究代表者は, この RNA アプタマーの立体構造を決定することに成功し, DNA を擬態した構造であることを明らかにしている [Submitted Paper]. そこで, この立体構造情報を基にして Runt ドメインに高い特異性を有すると期待できる新規 RNA アプタマーのデザインを行うことにより, 従来の SELEX 法だけでは得られないような, 新規の高親和性 RNA アプタマーを創製することを目指した.

### 3. 研究の方法

研究代表者は既に Runtドメインに結合する RNA アプタマーの DNA 擬態モチーフの立体構造を決定していた [Submitted Paper]. そこではじめに, (1) SELEX によって得られた DNA 擬態モチーフをもつ RNA アプタマー 8 種類 (Apt1 ~ Apt8) について, Apt1 を基本とし, 別のアプタマーの配列を融合 (例 Apt1 + Apt2 = Apt12) させることによって, DNA 擬態モチーフの上流および下流に内部ループを持つ 7 種類の RNA アプタマーをデザインした (Apt12 ~ Apt18). デザインされた RNA アプタマーは, T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写系を用いて合成し, ポリアクリルアミドゲル (PAGE) によって精製した. Runtドメインは大腸菌発現系によって調製し, アフィニティカラム, イオン交換カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって精製した. RNA アプタマーと Runtドメインとの相互作用解析を BIAcore を用いた表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) によって行うことで, RNA アプタマーの Runt との結合親和性について評価した (図 2). 次に, それらの情報を基にして, (2) デザインされた RNA アプタマーのなかで, Runt との親和性の高かった Apt14 を基に塩基配列改変を行った. ここでは, DNA 擬態モチーフ以外の部位に関して, ステム長の変更や, 残基置換などを行い, それらについても SPR 法によって, Runt との結合親和性を評価した. その結果を基に, アプタマーの短鎖化と Runt との相互作用に重要な部位の特定を行った.

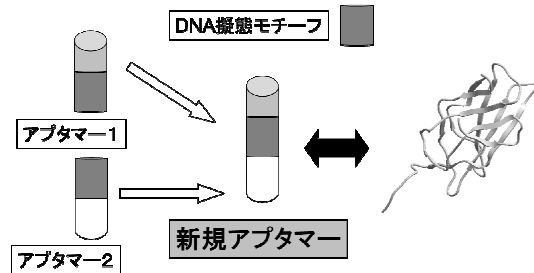


図 2. 研究スキーム

#### 4. 研究成果

SELEXによって得られたDNA擬態モチーフをもつRNAアプタマー8種類(Apt1~Apt8)について、DNA擬態モチーフの上流および下流に内部ループを持つ7種類のRNAアプタマー(Apt12~Apt18)を転写合成および調製を行ない、解析を行うのに十分なRNAサンプルを得ることができた。調製したこれらRNAアプタマーのRuntに対する結合親和性をSPRによって解析した結果、もともとのApt1よりも親和性の落ちるRNAも見られたが、Apt14において、SELEXによって得られたアプタマーよりも強い結合能を示した(図3)。Apt14はApt1とApt4の融合アプタマーであり、Apt1およびApt4のRuntとの親和性を1とすると、Apt14は4倍近くの親和性を示した(表1)。

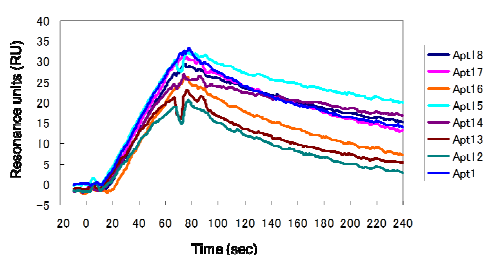


図3. デザインしたRNAのRuntとの相互作用解析。

表1. デザインしたRNAのRuntに対する親和性。

	fold (Apt1/Apt1#)
Apt1	1.00
Apt12	1.00
Apt13	0.94
Apt14	3.79
Apt15	1.50
Apt16	0.59
Apt17	0.78
Apt18	1.18

これらの結果から、Runtとの相互作用には、アプタマーのDNA擬態モチーフと、その付近に内部ループ、つまり一本鎖領域が存在していることが重要であると考えられた。そこで、Apt14のDNA擬態モチーフの付近を一本鎖のRNAに置換した変異体を作成し、SPRによって親和性の評価を行なった。その結果、ただの一本鎖では、Runtとの親和性がなくなることが分かった。これはただの一本鎖領域にしてしまったことで、DNA擬態モチーフそのものが維持できなくなったためであると考えられる。

さらに、Apt14の隣接する内部ループの長さ、その先にあるステムの長さを変えた変異体を作

成し、同様にSPRによってRuntとの親和性について解析した。その結果、ステムの長さは変えても親和性に影響はないが、内部ループの長さを変えた変異体では、Runtとの親和性が低下した。このことから、アプタマーがRuntと強い相互作用をするためには、DNA擬態モチーフの上流および下流に内部ループを持ち、その先に、ループを閉じるためのステム構造が重要であることが示唆された。特に内部ループの長さか配列、または両方がRuntとの相互作用に非常に重要であることがわかり、この内部ループが標的DNAよりもはるかに強いRuntとの相互作用を生み出していることが示唆された。RuntとDNAの複合体の立体構造から考察すると、アプタマーの内部ループがRuntの特定の部位と相互作用できる可能性が考えられ、これがDNAを超える親和性の原動力となっていることが考えられた。

通常のSELEXでは、長さの限界や、選択性に限界があるため、最も親和性の高いRNAを選択することが困難である。しかし、本研究のように、SELEXによって得られた配列から、結合モチーフを見つけ、それをベースにアプタマーをデザインすることで、最も親和性の強いRNAに近づけることができる。このような研究成果は世界でも例がなく、これからのRNA研究に大いに役立つと考えられる。今後は、最も親和性の高かったアプタマーについて、さらに高い親和性を持たせるために、修飾体の導入などを行なっていく予定である。また、Runt側にも変異導入することで、デザインされたアプタマーの相互作用部位を特定し、その情報を基にしたデザインも行っていく。本研究のような新しいRNAアプタマーの創製は、あらゆる分野でのアプタマーの利用の際に役立つと考えられる。

#### 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1件)

The Runt domain of AML1 (RUNX1) binds a sequence-conserved RNA motif that mimics a DNA element

Jun-ichi Fukunaga\*, Yusuke Nomura\*, Yoichiro Tanaka\*, Taku Tanaka, Yoshikazu Nakamura, Gota Kawai, Taiichi Sakamoto, and Tomoko Koza

RNA 2013. 19: 927-936

査読あり

[学会発表](計5件)

① 2012 ICMRBS (August 19-24 2012 Lyon France)

NMR analysis of the interaction between AML1 Runt domain and RNA aptamer

Ryo Amano, Yusuke Nomura, Takashi

Nagata, Jun-ichi Fukunaga, Yoichiro Tanaka,  
Masato Katahira, Yoshikazu Nakamura,  
Tomoko Kozu and Taiichi Sakamoto

- ② 第14回 RNA ミーティング(2012年7月18日(水)~20日(金)東北大学百周年記念会館川内萩ホール)  
AML1 Runt domain に結合する RNA アプタマーの改良  
野村祐介, 山崎 香, 福永淳一, 田中陽一郎, 中村義一, 神津知子, 坂本泰一, 鳥越秀峰
- ③ 第14回 RNA ミーティング(2012年7月18日(水)~20日(金)東北大学百周年記念会館川内萩ホール)  
RNA アプタマーと AML1 Runt domain の相互作用解析  
天野亮, 野村祐介, 永田崇, 福永淳一, 田中陽一郎, 片平正人, 中村義一, 神津知子, 坂本泰一
- ④ CREST「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」研究領域シンポジウム, 新しい計測で生命に迫る(2011年12月12日(月)~13日(火) 東京ガーデンパレス)  
「転写因子 AML1 の DNA 結合ドメインに結合する RNA モチーフの解析」  
福永淳一, 野村祐介, 中村義一, 坂本泰一, 神津知子
- ⑤ CREST「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」研究領域シンポジウム, 新しい計測で生命に迫る(2011年12月12日(月)~13日(火) 東京ガーデンパレス)  
「RNA アプタマーの立体構造解析」  
坂本泰一, 野村祐介

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 祐介(NOMURA YUSUKE)  
東京理科大学・理学部・応用化学科・助教  
研究者番号:10609308

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: