

相補性に依存しない機能性RNAの研究

Sequence Complementarity-Independent Functional RNAs

中村 義一 (YOSHIKAZU NAKAMURA)

東京大学・医科学研究所・教授



研究の概要

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、これまで注目されることがなかったRNAの「造形力」について、「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研究を実施した。

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. 研究開始当初の背景

20万種類とも予想されるヒトのノンコーディングRNA(ncRNA)の大部分は、配列相補性に依存せずに機能するタイプと予想され、未開の大陸に等しい。これら相補性非依存型のncRNAは、タンパク質と同レベルの個性ある立体構造を形成して、様々な生体分子と相互作用するとみられる。そのような性質をもつ分子は「アプタマー」と総称される。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

(主な購入設備等を含む)

ncRNAの大部分が、配列相補性に依存せずに働く分子であるならば、ncRNA研究の最重要課題は、ゲノムにコードされた生体内アプタマー(以下、天然アプタマーとよぶ)の解明につきる。この研究は、必然的にRNAというマテリアル自体のもつ機能的なポテンシャルを深く理解することが不可欠である。そのため、一歩先んじて、試験管内人工進化(SELEX)法を利用して各種標的分子に対して人工アプタマーを創成し、それらの機能・構造研究を通して、配列相補性に依存しない機能性RNAの分子基盤を確立することが、

「機能性RNA研究」の推進に大きな駆動力となりうる。そのため、本研究開発テーマでは、次の2つの目的を設定する。

- ①「人工RNAアプタマーの機能特性研究開発」
- ②「天然RNAアプタマーの探索研究」
(主なRNA分取用の購入設備は微量高速冷却遠心機)

4. これまでの成果

- 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成し、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、1.9 Å 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ングなテーマである。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。

5. 今後の計画

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。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、
連携研究者は一重下線)

- 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)

ホームページ等

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