

## 論文内容の要旨

論文題目 RNA アプタマーを基盤とする RNA 機能解明システムの開発

(Development of RNA aptamer-based novel systems for analyzing functionality of RNA)

氏名 遠藤 慧

### 背景

RNA アプタマーは、標的分子に対して結合親和性を持つ人工的な RNA 分子である。SELEX 法と呼ばれる人工進化的な手法を用いて試験管内で取得されるため、任意の結合条件を設定することができ、これまでに低分子から高分子まで様々な標的分子に対するアプタマーが取得されている。核酸から成るアプタマーは、化学合成が可能など、同じく標的分子に結合する抗体とは異なる特徴を持つ。その特徴を活かして、チップや担体に固相化し、検出や精製のために標的分子を捕捉するリガンドとして、あるいは標的分子を検出するプローブとして応用研究がなされている。また標的分子の阻害剤としての利用も進められ、RNAi に先駆けて医薬品として上市された。このように様々な目的を実現する方法の 1 つとしてアプタマーが期待されている。

### 目的

近年タンパク質をコードしない RNA が注目されており、従来考えられていた以上に RNA 分子は細胞内で多様な機能を担うと推測されている。タンパク質研究において、タグペプチドやレポータータンパク質といったペプチド性研究ツールがこれまで数多く開発され、タンパク質の機能や動態解明に大きく貢献した。同様に、担体への結合機能や可視化・定量といった検出機能、あるいは活性の制



図 1 アプタマーの組み込みによる RNA 分子への機能付加

御機能など、任意の RNA 分子に新たな機能を付加する RNA 性研究ツールの開発は、機能性 RNA の研究に大きく貢献すると推察される。そこで本研究は、RNA アプタマーを組み込み、標的分子を係留することによって、機能性 RNA の動態にせまるシステムの構築を試みた (図 1)。

細胞内動態のよく調べられている RNA 分子のひとつに mRNA がある。mRNA は転写から翻訳に至るまで様々なプロセッシングを受ける。その過程の多種多様な細胞内因子との相互作用が、各過程の効率や mRNA の安定性や局在などの mRNA 動態を大きく支配している。また、mRNA の一部の領域が、細胞内因子との相互作用を通じて、*cis* 因子として遺伝子発現の転写後制御機能を担うことも知られている。RNA アプタマーの mRNA 上への組み込みは、mRNA 動態の解明だけでなく、*cis* 因子として遺伝子発現の人工的な制御にも大きく寄与すると期待される。

## 実験と結果

### 1. 抗色素アプタマーによる RNA の可視化・検出

GFP をはじめとする蛍光タンパク質は、標的とするタンパク質と融合させることによって、生細胞内におけるタンパク質の時空間的挙動の研究を飛躍的に加速させた。さらに、生体分子を認識するタンパク質と融合させて細胞内で発現可能なプローブとしたり、2 つに分割された一組のタグペプチドとして用いてタンパク質間相互作用の検出タグとするなどの応用もなされている。そこで、任意の RNA に蛍光色素分子を係留し、検出・可視化する RNA アプタマーの取得とその応用システムの構築を行った。

#### 1-1. 抗 Cy3 アプタマーの取得

細胞毒性が低く検出感度の高い蛍光色素 Cy3 を標的分子とする RNA アプタマーを取得した。得られた抗 Cy3 アプタマーの存在下では、アプタマー濃度依存的に Cy3 の蛍光強度の増強が観察された。二次構造を破壊・復帰させる変異を導入し、Cy3 に対する結合活性を評価した結果、抗 Cy3 アプタマーは 2 つのステムループドメインから構成されることが示唆された (図 2A)。このことは既存の低分子に対するアプタマーと比較して特徴的であり、アプタマーを 2 つの断片に分割して他の RNA 分子に組み込む場合でも機能性が損なわれにくいと期待される。アプタマーを短小化し、さらに構造安定化のため複数の塩基置換を導入することにより、Cy3 に対する結合活性の向上に成功した。このアプタマーについて、Cy3

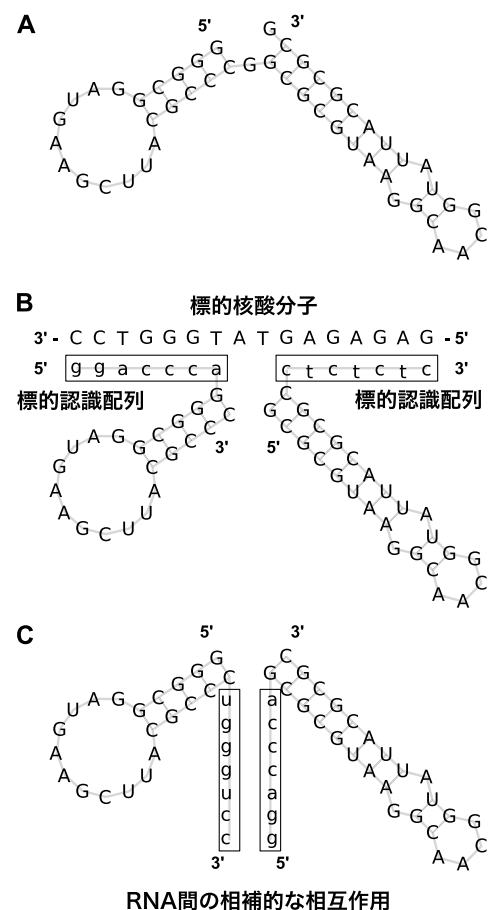


図 2 抗 Cy3 アプタマーとその応用 (A) 抗 Cy3 アプタマーの予測二次構造 (B) 分割型プローブの設計 (C) RNA 間相互作用 検出タグの設計

との相互作用を SPR 法にて解析したところ、解離定数は 60  $\mu\text{M}$  と測定された。

## 1-2. 抗 Cy3 アプタマーを応用した検出システムの構築

抗 Cy3 アプタマーを利用して核酸分子を検出する分割型プローブを作製した (図 2B)。標的核酸分子上で分割した抗 Cy3 アプタマーの各断片が会合し、Cy3 に対する親和性が復帰するよう、標的核酸分子と相補的な標的認識配列を抗 Cy3 アプタマーの各断片に付加した。この分割型プローブを用いて、核酸分子を 1 塩基の特異性をもって検出できることが示された。また、RNA 間相互作用の検出タグ (図 2C) として利用できることも示された。

## 2. mRNA 動態制御を誘導する *cis* シグナルへの RNA アプタマーの応用

mRNA 上に形成されるタンパク質複合体はプロセシング過程で動的にその組成が変化する。そのため、mRNA の品質管理機構など、多段階のプロセシング過程に依存する転写後制御機構の解明が難航している。そこで、アプタマーを *cis* 制御因子として mRNA 上に組み込むことにより、複雑なプロセシング過程依存的に形成される複合体を再現し、mRNA 動態を人為的に制御するシステムの構築を目指した。

### 2-1. eIF4AIII 特異的 RNA アプタマーの取得

EJC はスプライシング反応後にイントロンのつなぎ目に形成される複合体であり、その構成因子のうち eIF4AIII が mRNA に直接結合していると考えられている。3' UTR 上に EJC を持つ mRNA は、NMD と呼ばれる mRNA 品質管理機構によって異常と認識され、速やかに分解される。そこで、アプタマーにより eIF4AIII を mRNA 上に係留することで、スプライシング反応非依存的に EJC を mRNA 上に再構築し、NMD を誘導することを試みた。

eIF4AIII と高い相同性を持つ翻訳開始因子 eIF4AI の係留が遺伝子発現に及ぼす影響を排除するため、eIF4AI と eIF4AIII の双方に結合するアプタマーに変異導入後、再選別を行い、eIF4AI への結合活性を保持しない 5 種類の eIF4AIII 特異的アプタマーを取得した。eIF4AI と eIF4AIII のキメラタンパク質や eIF4AIII のドメイン断片を作製し、これらに対するアプタマーの結合活性を評価した結果、得られた 5 種類のアプタマーは eIF4AIII に対して異なる結合特異性を持つことが示唆された。また、これらのアプタマーと eIF4AIII の相互作用における解離定数を測定したところ、 $10^1 - 10^2$  nM のオーダーにあった。

### 2-2. 抗 eIF4AIII アプタマーによる転写後制御

mRNA 上で EJC を再構築するためには、アプタマーが eIF4AIII をその機能を阻害することなく mRNA 上に係留する必要があると考えられる。eIF4AIII は ATPase 活性を持つこと、他の EJC 構成因子や翻訳開始因子 eIF4G と相互作用することが知られている。今回得られたアプタマーはいずれも、

これら eIF4AIII の機能に対する明らかな阻害効果を示さなかった。これらのアプタマーをレポーター遺伝子の 3' UTR 上に組み込んだ (図 3) ところ、アプタマーはイントロンと同程度にレポーター遺伝子の発現を抑制した。しかし、阻害剤に対する感受性の違いから、3' UTR に存在するイントロンとアプタマーとは異なる機構で遺伝子発現が抑制されることも示唆された。

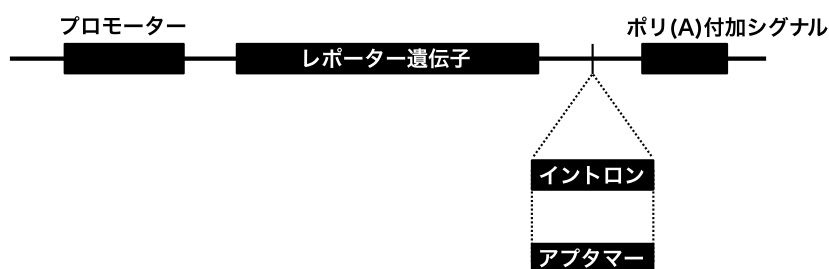


図 3 抗 eIF4AIII アプタマー組み込み mRNA の発現システム

## 結論と展望

本研究では、抗 Cy3 アプタマーを、相補的な相互作用により標的を認識する RNA に組み込むことによって、核酸分子や核酸間相互作用を検出するシステムを構築した。今後、細胞内環境で効果的に機能させるために、抗 Cy3 アプタマーの親和性改善のほか、アプタマーが Cy3 の蛍光特性に影響を与えたことから、アプタマーとの複合体のみが蛍光性を示すような Cy3 誘導体の開発が考えられる。

eIF4AIII に特異的に結合する RNA アプタマーを mRNA 上の *cis* 因子として用いることにより、細胞内で遺伝子発現を抑制することができた。mRNA の安定性や翻訳効率といった発現抑制効果の原因や、NMD に必須な因子への依存性を解析することにより、アプタマーが EJC の誘導する NMD を完全あるいは部分的に再現しているのか、さらに検証する必要がある。

人工的に得られた機能物質を細胞内に導入して機能させる場合、細胞内における挙動や想定外の相互作用など数多くの問題に直面する。RNA アプタマーを、細胞内動態に関する知見や発現・解析方法の充実した mRNA へ組み込むことによって、アプタマーの細胞内動態だけでなく、標的とする転写後制御因子との相互作用への保証も期待できる。このことは RNA アプタマーが外来遺伝子の解析や発現制御ツールとしても高い有用性を持つことを示唆する。また、RNA アプタマーの他の RNA 分子への組み込みは、他の方法では代替できない独自の応用展開として RNA アプタマーの利用価値を高めるものと確信している。