

氏名（本籍）	天野 亮（東京都）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 207 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	RNA aptamer の選別過程およびその標的タンパク質への結合についての生物物理学的な研究
論文審査委員	(主査) 教授 河合 剛太 (副査) 教授 村上 和仁 教授 坂本 泰一 准教授 寺本 直純 東京学芸大学 教授 原田 和雄

学位論文の要旨

RNA aptamer の選別過程およびその標的タンパク質への結合についての生物物理学的な研究

本学位論文では、「SELEX 過程のモニタリング」および「RNA aptamer と標的タンパク質の相互作用についての速度論的および熱力学的解析」について述べている。この 2 つは、RNA aptamer の開発において重要な課題となっている。

RNA aptamer は、*in vitro* selection の一つである試験管内分子進化法（SELEX）によって、巨大なランダム配列 RNA ライブラリー ($>10^{15}$ 分子) から標的分子に対する高い結合親和性に基づいて選別される RNA 分子である。SELEX における選別条件は、高親和性の RNA aptamer を取得するために非常に重要である。しかしながら、標的分子の特性に強く依存するため、選別条件を最適化するためには試行錯誤を重ねる必要がある。したがって、SELEX 過程をモニタリングすることは、RNA aptamer の効率的な選別にとって重要である。近年、High-Throughput Sequencing (HTS) 技術が RNA pool における配列濃縮の評価に適用されている。しかしながら、HTS のための試料調製および測定には時間と労力がかかる。したがって、SELEX 過程を簡便かつ迅速にモニタリングすることのできる手法の開発が必要である。そこで本研究では、SELEX において構造を形成した RNA aptamer が濃縮される過程をモニタリングするために、NMR を用いることを発案し、実際にその効果を検証した。

RNA aptamer は、標的分子に対する高い親和性と特異性という特徴を持つ。そのため、RNA

aptamer は分子標的治療薬として有望であると考えられている。しかしながら、RNA aptamer の示す高い親和性および特異性に関する生物物理学的な研究は非常に少ない。そこで本研究では、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法および等温滴定型熱量測定 (ITC) 法を用いて、取得した RNA aptamer と標的タンパク質の相互作用を速度論的および熱力学的に解析した。これらの生物物理学的な解析から、RNA aptamer の合理的な修飾や最適化のために有用な情報を得られることが実証できた。

本学位論文は、5章から構成されている。第1章は序論とし、本研究を行うに至った経緯や既往研究について記述した。第2章では、急性骨髄性白血病 (AML) に関係する AML1 タンパク質の Runt domain (RD) を標的とした SELEX について記述した。高い親和性をもつ RNA aptamer を取得するため、SELEX の選別工程を高塩濃度条件で行った。全 8 Round の SELEX の結果、11 個の新規の RNA aptamer (S1-S11) を取得することができた。SPR 解析によって、S1-S11 は RD の本来の標的である DNA よりも強く RD と結合することが明らかとなった。第3章では、SELEX 過程の RNA pool における aptamer の濃縮を、NMR を用いてモニタリングする手法の開発について記述した。この手法では、SELEX 中に調製した RNA pool を用いて NMR スペクトルを測定するため、RNA pool あるいは標的分子の固定化や標識などの余分な試料調製を必要としない。さらに、NMR 測定後は NMR tube から RNA pool を回収し、その後の選別工程に直接使用できるため、簡便かつ迅速に SELEX の過程をモニタリングすることが可能である。実際に、第2章の SELEX の各 Round の RNA pool を用いて検証したところ、NMR を用いて RNA aptamer の濃縮を検出することができた。したがって、NMR は SELEX 過程のモニタリングに有用であることが示唆された。第4章では、S4 を短鎖化した S4-S と RD との相互作用について SPR 法により速度論的に解析し、ITC 法を用いて熱力学的に解析したことについて記述した。SPR 解析の結果、高塩濃度条件下において S4-S の結合速度は低下するものの、その解離速度は変化せず、RD に対する結合活性を保持することが明らかになった。ITC 解析の結果、S4-S と RD との相互作用は、負に大きなエンタルピー変化を示した。さらに、その有利なエンタルピー変化が不利なエントロピー変化を補償するエンタルピー駆動の相互作用様式であることが明らかとなった。また、S4-S 結合時において負に大きい熱容量変化を示したことから、S4-S は RD の広い無極性表面を覆うように結合することが示唆された。以上の SPR および ITC の解析結果から、S4-S と RD の結合の初期段階には、負に帯電した S4-S と RD の塩基性アミノ酸の間の静電的相互作用が大きく関与していることが示唆された。さらに、S4-S は RD との会合に伴って、立体構造を変化させ、多くの水素結合や van der Waals 力を用いて RD の広い表面を認識することが示唆された。最後に、第5章では、本研究の総括および今後の展望について述べた。

審査結果の要旨

RNA aptamer は、試験管内分子進化法 (SELEX) という手法により得られる RNA 分子であり、次世代の分子標的薬として期待されている。SELEX では、ランダムな配列の RNA ライブラリーから、標的分子に対して高い親和性を持つ RNA aptamer を選別するが、高親和性の RNA aptamer を取得するためには、SELEX における選別条件の検討が重要である。標的分子の特性に強く依存するため、選別条件を最適化するためには、実際に SELEX を様々な条件で行う試行錯誤が必要となっている。そのため、高親和性の RNA aptamer が取得されているか否かを迅速に判断するため、SELEX 過程をモニタリングが重要である。近年、High-Throughput Sequencing (HTS) 技術を用いて SELEX 過程をモニタリングできるようになったが、そのための試料調製および測定には時間と労力がかかる。そこで本論文では、SELEX 過程を簡便かつ迅速にモニタリングするために NMR 法を提案している。さらに NMR 法では、構造を形成した RNA aptamer が濃縮される SELEX の過程をモニタリングしており、HTS では得られない情報を得ることに成功している。

また、RNA aptamer は標的分子に対する高い親和性と特異性という特徴を持つが、その高い親和性および特異性に関する生物物理学的な研究は非常に少ない。そこで本論文では、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法および等温滴定型熱量測定 (ITC) 法を用いて、取得した RNA aptamer と標的タンパク質の相互作用を速度論的および熱力学的に解析している。これらの生物物理学的な解析から、RNA aptamer の合理的な修飾や最適化のために有用な情報を得られることが期待される。

本学位論文は 5 章から構成されている。第 1 章では、序論として本研究を行うに至った経緯や既往研究について述べ、本研究を行う意義および目的を述べている。

第 2 章では、急性骨髄性白血病の原因となっている AML1 タンパク質の Runt domain (RD) を標的とした SELEX について記述している。高い親和性をもつ RNA aptamer を取得するため、SELEX の選別工程を高塩濃度条件で行い、11 個の新規の RNA aptamer を取得している。さらに SPR 解析によって、得られた RNA aptamer は RD の本来の標的である DNA よりも強く RD と結合することを明らかにしている。

第 3 章では、SELEX 過程における RNA aptamer の濃縮を NMR によりモニタリングする手法について記述している。この手法では、SELEX 中に調製した RNA pool の NMR スペクトルを測定するため、モニタリングのための余分な試料調製を必要としない。さらに、NMR 測定後は NMR チューブから RNA pool を回収し、その後の選別工程に直接使用できるため、簡便かつ迅速に SELEX の過程をモニタリングすることが可能である。実際に、RD に対して行った SELEX の RNA pool を用いて検証したところ、NMR を用いて RNA aptamer の濃縮を検出することを明らかにしている。さらに、RNA pool における RNA aptamer の構造情報を得ることに成功している。

第 4 章では、第 2 章で取得した RNA aptamer の一つである S4 を短鎖化することに成功し

(S4-S と命名), SPR 法および ITC 法を用いて S4-S と RD との相互作用を解析したことについて述べている. SPR 解析の結果, 高塩濃度条件下において S4-S の結合速度は低下するが, 解離速度は変化しないことを明らかにしている. ITC の結果から, S4-S と RD との相互作用により, 大きな発熱をともなうエンタルピー変化が生じた. さらに, 結合に不利なエントロピーの減少も起きているが, エンタルピー変化がエントロピー変化を補償するかたちで相互作用していることを明らかにしている. また, S4-S が結合する際に負に大きい熱容量変化を示すことから, S4-S は RD の広い表面を覆うように結合すると考察している. 以上の SPR および ITC の解析結果から, S4-S と RD の結合の初期段階には, 負に帯電した S4-S と RD の塩基性アミノ酸の間の静電的相互作用により会合し, さらに induced fit によって S4-S の立体構造を変化して結合し, 多くの水素結合や van der Waals 力を用いて RD の広い表面を認識していると考察している.

最後に, 第 5 章では, 本研究を総括している. さらに, 本研究で得られた結果が, 今後 RNA 医薬品や RNA 材料の開発にどのように活用されるのか, 今後の展望について述べている.

以上, 本論文は RNA aptamer の選別過程およびその標的タンパク質への結合について, 物理化学的手法を駆使して研究について記したものであり, NMR 法により RNA aptamer の選別過程をモニタリングできることを明らかにしている. さらに, SPR および ITC を用いることにより, 速度論的, 熱力学的な見地から RNA aptamer と標的タンパク質の相互作用の機序について明らかにしている. 本論文によって得られた知見は, 今後, RNA 医薬品や RNA 材料の開発につながるものであり, 当分野に寄与するところが非常に大きいと判断される.

したがって, 学位申請者の天野亮は, 博士 (工学) の学位を得る資格があると認める.