

千葉工業大学

博士學位論文

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

平成 29 年 9 月

天野 亮

論文目次

第1章 序論	1
1-1 Aptamer 創薬の現状と課題	
1-2 Aptamer の取得方法の現状と課題	
1-3 Aptamer と標的分子との相互作用の解析の意義	
1-4 研究対象としての AML1 タンパク質	
1-5 本研究の目的および本論の構成	
第2章 AML1 Runt domain に対する高親和性 RNA aptamer の取得と解析	19
2-1 はじめに	
2-2 方法	
2-2-1 AML1 RD の調製	
2-2-2 SELEX 実験	
2-2-3 RNA および RDE の調製	
2-2-4 表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) 測定	
2-3 結果	
2-4 考察	
第3章 SELEX 過程における RNA aptamer の濃縮の NMR モニタリング手法の開発.....	47
3-1 はじめに	
3-2 方法	
3-2-1 試料調製	
3-2-2 NMR 測定	

3-2-3 SPR 測定

3-2-4 High-throughput sequencing 解析

3-3 結果

3-3-1 SELEX 過程における RNA pool の構造多様性の変化

3-3-2 SELEX 過程の各 RNA pool と RD との結合親和性の評価

3-3-3 SELEX 過程における RNA pool 中の配列組成の変化

3-3-4 SELEX 過程の RNA pool と単離した aptamer の NMR スペクトルの相関性

3-3-5 RNA pool の構造的多様性に及ぼすプライマー結合配列の影響

3-4 考察

第 4 章 RNA aptamer と RD との相互作用の解析 77

4-1 はじめに

4-2 方法

4-2-1 試料調製

4-2-2 SPR 測定

4-2-3 等温滴定型熱量 (Isothermal Titration Calorimetry : ITC) 測定

4-3 結果

4-3-1 取得した RNA aptamer (S4) の二次構造予測と短鎖化

4-3-2 S4-S と RD との相互作用における塩濃度の影響

4-3-3 S4-S と RD との相互作用の熱力学的解析

4-4 考察

第 5 章 総括 106

5-1 本研究により得られた知見

5-2 今後の展望

参考文献	110
研究業績	122
謝辞.....	125
付録.....	126

略語表

A (amino acid)	alanine
A (base)	adenine
A (nucleotide)	adenosine
AML	acute myeloid leukemia
ARM	arginine-rich motif
ATP	adenosine triphosphate
C (base)	cytosine
C (nucleotide)	cytidine
CTP	cytidine triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ExSELEX	genetic alphabet expansion select
F	fluoro
FACS	fluorescence-activated cell sorting
G (base)	guanine
G (nucleotide)	guanosine
GTP	guanosine triphosphate
HDAC1	histone deacetylase 1

略語表

HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HTS	high-throughput sequencing
INF- γ	interferon-gamma
INTT	in nmr tube transcription
IPTG	isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside
ITC	isothermal titration calorimetry
N-CoR	nuclear receptor corepressor
NFAT	nuclear factor of activated t cells
NF-kB	nuclear factor-kappa b
NHR	nervy homology regions
NMR	nuclear magnetic resonance
nt	nucleotide
OMe	o-methyl
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
Py	pyrimidine
R	round
R (amino acid)	arginine
RD	runt domain

略語表

RDE	the runt-binding double-stranded dna element
RNA	ribonucleic acid
RRE	rev responsive element
RT	reverse transcription
RU	resonance unit
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SOMAmer	slow off-rate modified aptamer
SPR	surface plasmon resonance
STAT-1	signal transducers and activator of transcription-1
T (base)	thymidine
T (nucleotide)	thymidine
tRNA	transfer rna
U (base)	uracil
U (nucleotide)	uridine
UTP	uridine triphosphate
UV	ultraviolet
VEGF	vascular endothelial growth factor
W (amino acid)	tryptophan
Y (amino acid)	tyrosine

第1章 序論

1-1 Aptamer 創薬の現状と課題

Aptamer は、*in vitro* selection 法の一つである試験管内分子進化法（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment : SELEX）によって、ランダムな塩基配列を有する核酸ライブラリーから、標的分子に対する結合親和性に基づいて選別される核酸分子である[1-6]. Aptamer は、抗体と同様に、広い範囲の標的分子（例：ヌクレオチド、補因子、アミノ酸、ペプチド、多糖類、タンパク質、細胞、ウイルス粒子および単細胞生物）を高い親和性および特異性をもって認識する[7-9]. 抗体は、標的分子を認識するために最も一般的に使用される分子ツールであるが、aptamer には、高い熱安定性、低い免疫原性、生産の容易さなど、抗体にはないいくつかの利点を有する[10-12]. このような利点故、aptamer は抗体に次ぐ分子標的薬として期待されており、実際に、血管内皮細胞増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF）に対する aptamer が開発され、加齢黄斑変性症（Age-related Macular Degeneration : AMD）の治療薬（Macugen[®]）として、上市されている。

分子標的薬として aptamer を応用するためには、標的分子に対して高い結合親和性を有する必要がある。前述の VEGF aptamer においても、標的分子に対して pM オーダーの解離定数 (K_d) を有する[13]. 一方で、これまでに報告されている aptamer の中で、標的分子に対し pM オーダーの K_d 値を有するものは多くない[14]. 必ずしも良質な aptamer が取得されるとは限らない理由として、後述する SELEX 法における課題が関わっている。

Aptamer の結合親和性を向上させる方法としては、いくつかアプローチが存在するが、その中で最も効果的と思われる方法に、疎水性塩基などの修飾塩基の付加が挙げられる。天然型のヌクレオチドから成る aptamer は、主に、水素結合、静電的相互作用

用および van der Waal 結合を用いて標的分子と相互作用していると考えられ、疎水的相互作用は形成されにくい。したがって、aptamer に疎水性塩基を導入することで、結合親和性の向上を図る研究がされている。Gold らのグループは、天然型の塩基に比べて疎水性の高い化合物で修飾した dUTP を含むランダム配列の DNA ライブラリーを用いて、13 種類のタンパク質に対して SELEX 実験を行い、その全てにおいて K_d 値が数十 nM から数百 pM の aptamer (Slow Off-rate Modified Aptamer : SOMAmer) を取得することに成功した[15]。また、Kimoto らのグループは、天然型の 4 種のヌクレオチドに加え、高い疎水性を有する人工塩基 Ds (7-(2-thienyl)-imidazo[4,5-b]pyridine) を含むランダム DNA ライブラリーを用いて、VEGF-165 および interferon (INF) γ に対して改良型 SELEX (genetic alphabet expansion SELEX : ExSELEX) 実験を行い、pM オーダーの K_d 値を有する DNA aptamer を取得した[16]。このように、非天然型の疎水性塩基を含む aptamer を取得する際には、既存の aptamer に非天然型の疎水性ヌクレオチドを導入するのではなく、そのヌクレオチドを導入したライブラリーを用いて再度 SELEX 実験を行っている。これは、天然型のヌクレオチドで構成される aptamer に対して、後から高度な化学修飾を施すと、ほとんどの場合において、結合活性が低下してしまうことが原因であると考えられる。この修飾ヌクレオチドライブラリーを用いた方法は、高親和性 aptamer を取得するためにとっても有効であるが、SELEX 実験内の増幅工程 (逆転写, PCR および転写) の際に、修飾ヌクレオチドが酵素の基質として認識される必要があるなど、SELEX 法への適応にも多くの課題を残している。

また、aptamer を医薬品化する上では、標的分子に対する高い結合親和性以外に、生体内における安定性や動態についても考慮する必要がある。一般的に、天然の核酸を生体内に静脈投与した場合、速やかに分解される原因の一つとして、核酸分解酵素が挙げられる。この問題は、核酸分解酵素の作用部位が ribose の 2'位や末端部位であることから、ribose の 2'位の OH 基の代わりに、Fluoro (F) 基もしくは *O*-methyl (OMe) 基を導入することや 3'末端に inverted dT cap を入れることで、ある程度回避できる。

また、Healy らは、種々の修飾 aptamer を用いて体内動態、臓器分布について調査し、報告している[17]。その報告では、5'末端に 20 あるいは 40 kDa の PolyEthylene Glycol (PEG) を付加すると、体内の滞留時間が数時間から半日程度まで向上していた。さらに、投与後の臓器分布をみると、腎臓および肝臓に多く分布していた。しかしながら、PEG を付加した aptamer は肝臓への蓄積が多いのに対して、5'末端への修飾なし、あるいは ribose の 2'位の OH 基を全て OMe に置換した aptamer は、腎臓への蓄積の割合が肝臓と比較して多く、尿中への排泄も明らかに多かった。このように、aptamer の安定性および体内動態の改善には ribose の 2'位の置換基および末端修飾が重要である。

1-2 Aptamer の取得方法の現状と課題

RNA aptamer を取得するための SELEX 実験は、標的分子への結合、結合 RNA と非結合 RNA の分離、結合 RNA の溶出から成る「選別」工程および逆転写、PCR、転写から成る「増幅」工程の二つの工程に分けられる (Fig. 1-1)。通常、ランダム配列ライブラリーから高親和性の aptamer を得るためには、これらの工程を 10 回程度繰り返さなければならない。この二つの工程はどちらも重要であるが、高親和性の aptamer を取得するためにより重要となるのが選別工程である。この選別工程の条件は標的分子の特性に強く依存する。そのため、標的分子ごとに選別条件を最適化しなければならず、それには多くの経験、時間と労力が必要とされる。この試行錯誤を軽減するためには、SELEX 実験の過程を随時モニタリングして、選別条件を調整することがとても有効である。

現在までに、SELEX 過程をモニタリングするための様々な方法が報告されている [18-36]。最も直接的なモニタリング方法は、次世代シーケンサーによる High-

Throughput Sequencing (HTS) 技術を生かした RNA pool 中の配列の網羅的解析である [17-22]. しかしながら, HTS による解析では, 解析用の試料を別途調製しなければならないため, 時間と労力がかかる. その他の効果的なモニタリング手法としては, 表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) 法, ゲルシフトアッセイ (Electrophoretic Mobility Shift Assay : EMSA) , フィルター結合アッセイなどを利用して, 標的分子に対する RNA pool の結合親和性を評価する方法がある[26-36]. さらに, 最近では, 蛍光活性化細胞選別法 (Fluorescence-Activated Cell Sorting : FACS) を応用したモニタリング手法も開発されている[35, 36]. しかしながら, SPR 法では, RNA pool あるいは標的分子を sensor chip 上に固定化する必要がある. また, EMSA, フィルター結合アッセイ, FACS を実施するためには, RNA pool あるいは標的分子を蛍光物質や放射性同位体などで標識しなければならない. このような固定化や標識は時間がかかる上, 時として RNA pool あるいは標的分子の立体構造や結合特性を変化させてしまう. したがって, これら固定化や標識を必要とせず, 簡便で迅速なモニタリング手法の開発が必要となっている.

1-3 Aptamer と標的分子との相互作用の解析の意義

一本鎖の核酸である aptamer は, Watson-Crick 塩基対および non-Watson-Crick 塩基対を分子内で形成し, 特定の立体構造をとることで標的分子と結合する[37]. したがって, 既存の aptamer に対して修飾ヌクレオチドを導入し, 結合親和性を向上させるためには, aptamer の立体構造を壊さずに, 標的分子との相互作用を増やさなければならない. そのためには, aptamer の立体構造や標的分子との相互作用機序を理解した上で, 化学修飾を行う必要がある. 近年, 低分子化合物においては, SPR 法や等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry : ITC) 法などから得られる物理化学的な相互作用情報や X 線結晶構造解析および核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance :

NMR) 解析から得られる立体構造情報に基づいた合理的な最適化を行い, 結合親和性を向上させている[38-41]. しかしながら, RNA aptamer ではそのような合理的な最適化の報告例は皆無である. その原因として, 立体構造解析の難しさが挙げられる. RNA は adenine (A), uracil (U), cytosine (C), guanine (G) の4種類のみで構成されるため, シグナルの重なりが激しく, NMR による立体構造解析が容易ではない. それに加え, RNA aptamer と標的分子の複合体では, 分子量が大きくなり, 解析がより一層難しくなる. また, 一般的に RNA の結晶化は容易ではなく, X 線結晶構造解析による立体構造解析も難しい. 一方, SPR 法や ITC 法などを用いた分子間相互作用の解析は, 立体構造情報は得られないものの, NMR および X 線結晶構造解析と比べて解析は容易であり, 詳細な相互作用情報を得ることができる. 現在までに, SPR 法や ITC 法を用いた低分子化合物や抗体に関する研究は多く報告されているが, aptamer に関する研究の報告例は著しく少ない. したがって, RNA aptamer と標的タンパク質との相互作用の研究に, SPR 法や ITC 法などの物理化学的な解析技術を導入することによって得られる相互作用情報およびそれら情報の蓄積は, 高親和性の aptamer の合理的な開発にとっても役に立つものになることが期待される.

1-4 研究対象としての AML1 タンパク質

AML1 タンパク質は造血系細胞の発生にとっても重要な制御因子のひとつであり, 血液細胞に特異的な様々な遺伝子の転写制御に関与している[42-44]. AML1 タンパク質において, 進化的に最も保存されている領域は Runt domain (RD) と呼ばれる DNA 結合ドメインであり, RD は特異的な DNA 配列と結合する[45, 46]. RD は s-type immunoglobulin fold に分類される β バレル構造をもつ. この構造は p53, Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT), Signal Transducers and Activator of Transcription-1 (STAT-1) などの他の DNA 結合ドメインと高い相同性をもつ[47].

RD および RD と DNA の複合体の立体構造は、NMR や X 線結晶構造解析を用いて決定されている[48-50]. それらの研究結果によると、RD は二つのループ領域と C 末端領域を用いて、リン酸骨格を挟み込むようにして、DNA 共通配列 PyGPyGGTPy (Py: pyrimidine 塩基) を特異的に認識している (Fig. 1-2) . C 末端領域と一つのループ領域は、DNA の主溝側と相互作用しており、DNA 共通配列の三つの guanine は、主溝内で C 末端近傍の三つの arginine 残基 (R80, R174 および R177) と水素結合を形成する. 残りのループ領域は DNA の副溝側と相互作用する. さらに、DNA のリン酸骨格と RD の主鎖および側鎖とのいくつかの相互作用によって、DNA と RD の複合体は安定化される.

通常の造血系細胞の発生の制御に加えて、*AML1* 遺伝子はがん原遺伝子の一つでもある. 急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia : AML) において、最も共通の染色体転座の一つである t (8;21) は発がん性の融合遺伝子 *AML1-ETO* を産生する. この *AML1-ETO* 遺伝子から翻訳された *AML1-ETO* 融合タンパク質 (Fig. 1-3) は、*AML1* タンパク質の RD と、*ETO* タンパク質の Nery Homology Regions (NHR) 2-4 の転写制御因子結合ドメインを持ち、一般的に、転写共役制御因子 (例 ; Nuclear receptor CoRepressor : N-CoR および Histone DeAcetylase 1 : HDAC1 など) や転写因子 (例 ; C/EBP α , GATA1 および E タンパク質など) と相互作用することで、転写抑制因子として働くと考えられている[51-62]. また、近年では、NHR2 領域を介して二量体化することで、白血病を誘発するという報告もされている[63].

AML の治療薬や診断薬を開発する目的で、埼玉県立がんセンターの神津博士らによって、RD に対して SELEX 実験が行われ、RNA aptamer を取得されている[64]. これらすべての RNA aptamer (Apt1-8) には、保存配列 5'-GCGMG-3' と 5'-CCAC-3' (M : A または C) が含まれていた (Fig. 1-4) . これらの aptamer のうち、最もよく保存されていた Apt1 が短鎖化され、全長 38 残基の Apt1-S が作製された. SPR 法を用いて、

Apt1-S および内在標的である DNA (The Runt-binding double-stranded DNA Element : RDE) と RD との相互作用が解析されたところ、Apt1-S および RDE の RD に対する解離定数 (K_d) は、それぞれ 0.99 ± 0.02 nM および 9.6 ± 0.2 nM であり、Apt1-S は RDE よりも 10 倍強く RD と結合することが明らかとされた (Fig. 1-5) .

次に、NMR を用いて Apt1-S の二次構造が解析され、Apt1-S は CACG テトラループ、二つのステム構造および内部ループを形成しており、さらに、二つのステム構造のうちの一つは、保存配列同士で形成されたステム構造 (以後、保存配列モチーフと呼称) であることが判明した (Fig. 1-5) . この保存配列モチーフでは、A のバルジアウトおよび A-C ミスマッチ塩基対が形成されていた。さらに、SPR 法を用いて、Apt1-S 変異体と RD の相互作用解析が行われた。その結果、保存配列モチーフの 3 つの G-C 塩基対、1 つの A のバルジアウトおよび A-C のミスマッチ塩基対の塩基を置換した変異体は RD に対する結合活性を完全に喪失することが判明した。したがって、保存配列モチーフのこれらの塩基および塩基対が RD との結合にとっても重要であることが明らかにされた。一方で、保存配列モチーフではなく、内部ループ部分の塩基を置換した変異体も結合活性の減少を示したことから、Apt1-S が RD に強く結合するためには、内部ループ部位も必要であることが明らかにされた。

さらに、Apt1-S との結合において、RD のどのアミノ酸残基が重要であるかを調べるために、SPR 法を用いて Apt1-S と RD 変異体の相互作用が解析された。その結果、RDE との相互作用に重要であった 3 つの arginine 残基 (R80, R174 および R177) を alanine (A) に置換した変異体において、結合活性が著しく失われることが明らかとなった。

次に、この保存配列モチーフの立体構造を決定するため、当時、本研究室の博士研究員であった野村博士主導のもと、CACG テトラループと保存配列モチーフから成る Apt1-S2 が作製され、NMR によって立体構造が決定された[65]。その結果、Apt1-S2 は、

C14-G23-A24 三重塩基対と A15H⁺-C22 ミスマッチ塩基対を形成することで、二重らせん構造が歪み、主溝の広い B 型らせん様の立体構造を形成することが明らかとされた (Fig. 1-6) .

次に、RD における Apt1-S との相互作用部位を調べるために、RD と RDE の複合体の RD の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルと RD と Apt1-S の複合体の RD の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較し、化学シフトが大きく異なったアミノ酸残基を RD の立体構造上にマッピングした (Fig. 1-7) [66]. その結果、DNA 結合部位である C 末端近傍に化学シフトが大きく異なったアミノ酸残基が多く存在していた. 一方で、それ以外の本来 DNA 結合部位ではない領域においても、化学シフトが大きく異なったアミノ酸残基が存在していた. したがって、Apt1-S と RD の結合には C 末端の DNA 結合部位およびその近傍の非 DNA 結合領域が関与していると考えられる.

以上の SPR 法による Apt1-S および RD の変異体解析、NMR による Apt1-S2 の立体構造解析および相互作用解析の結果を総合的に考えると、Apt1-S の保存配列モチーフは内在標的である RDE を配列的および構造的に擬態することで、RD と結合することが示唆された. さらに、Apt1-S は RDE 同様に、RD の C 末端に結合しており、内部ループ部分が RD の C 末端近傍の非 DNA 結合領域と相互作用するため、Apt1-S は RDE より強く RD と結合することが示唆された.

また、Barton らのグループによっても、RD に対する RNA aptamer が報告されている[67]. それらの RNA aptamer は、二つの配列ファミリーに分かれ、それぞれに単一の共通モチーフをもつが、神津博士らの aptamer に含まれるものとは一致しない (Fig. 1-8) . さらに、神津博士らの aptamer は、Barton らの aptamer と比べて、10 倍以上の高い親和性をもつ. したがって、神津博士らの aptamer と Barton らの aptamer は異なる様式で RD と結合していると考えられる.

1-5 本研究の目的および本論の構成

現在までに、様々な標的分子に対して SELEX 実験が行われてきた。しかしながら、最適な実験条件は標的分子ごとに異なるため、SELEX 実験の成功は、研究者の経験と試行錯誤によるところが大きいのが現状である。近年、次世代シーケンサーを用いた High-Throughput Sequencing (HTS) 技術が発展し、SELEX 実験の効率化も進められてはいるが、未だに多くの時間および労力が掛かる。したがって、簡便かつ迅速に SELEX 実験の過程をモニタリングできる手法が必要とされている。

また、低分子化合物では、物理化学的な相互作用情報や立体構造情報に基づいて、合理的に結合親和性を向上させることが試みられている。しかしながら、aptamer になるとその報告例は皆無である。この原因として、aptamer と標的タンパク質との相互作用における物理化学的な情報が不足していることが考えられる。

そこで、本研究では、SELEX 実験における時間と労力の問題を解決するため、新規のモニタリング手法を開発することを目的とした。さらに、物理化学的な手法を用いて、実際に取得した aptamer と標的分子との相互作用の機序を解明することを目的とした。

本学位論文では、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。実際の研究内容としては、3 章構成となっており、第 2 章では、急性骨髄性白血病に関係する AML1 タンパク質の DNA 結合ドメインである Runt domain (RD) を標的分子として SELEX 実験について記述した。高親和性の RNA aptamer を取得するため、SELEX 実験の選別工程を高塩濃度条件で行った。全 8 Round の SELEX 実験の結果、11 個の新規の RNA aptamer (S1-S11) を取得することができた。SPR 法を用いて、S1-S11 および RD の内在標的である DNA と RD との相互作用を解析したところ、S1-S11 は DNA よりも非常に強く 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 実験中に調製した RNA pool を用いて NMR スペクトルを測定するため、試料の固定化や標識などのモニタリングのための別途の試料調製を必要しない。さらに、NMR 測定後は、NMR チューブから RNA pool を回収し、次の選別工程に使用できるため、簡便かつ迅速に SELEX 過程をモニタリングすることが可能である。本モニタリング手法の有用性に関して、第2章の SELEX 実験の各 Round の RNA pool を用いて検証したところ、SPR 法および次世代シーケンサーを用いたモニタリング手法と同じ Round において、aptamer の濃縮が検出された。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、物理化学的な解析手法を用いて RNA aptamer と AML1 RD との相互作用を解析したことについて記述した。第2章で取得された高親和性 RNA aptamer の一つを研究対象として、SPR 法や ITC 法を用いて RNA aptamer と RD との相互作用の機序を解明した。そして最後に、第5章では、本研究の総括と今後の展望について述べた。

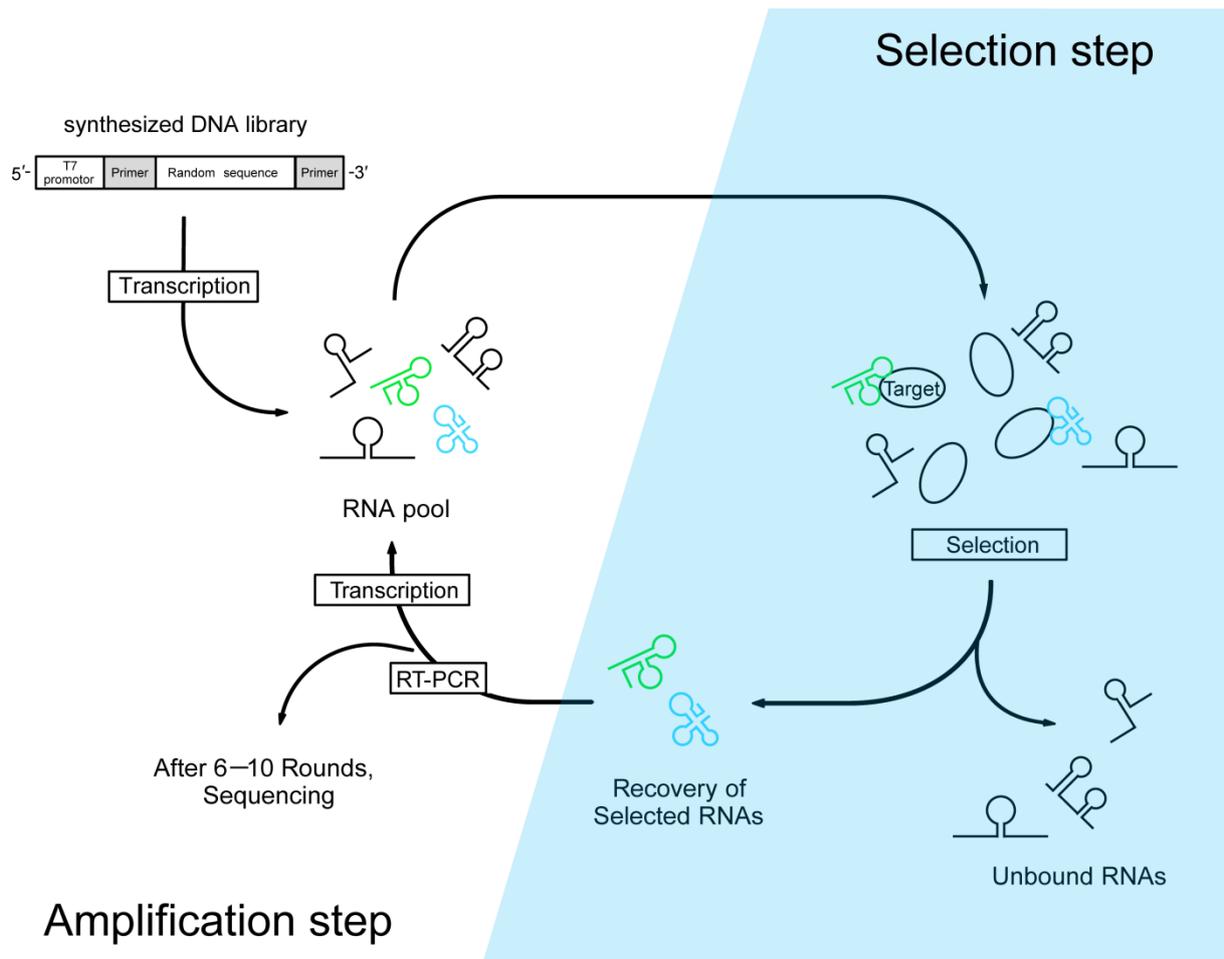


Fig. 1-1 SELEX 実験の概略図

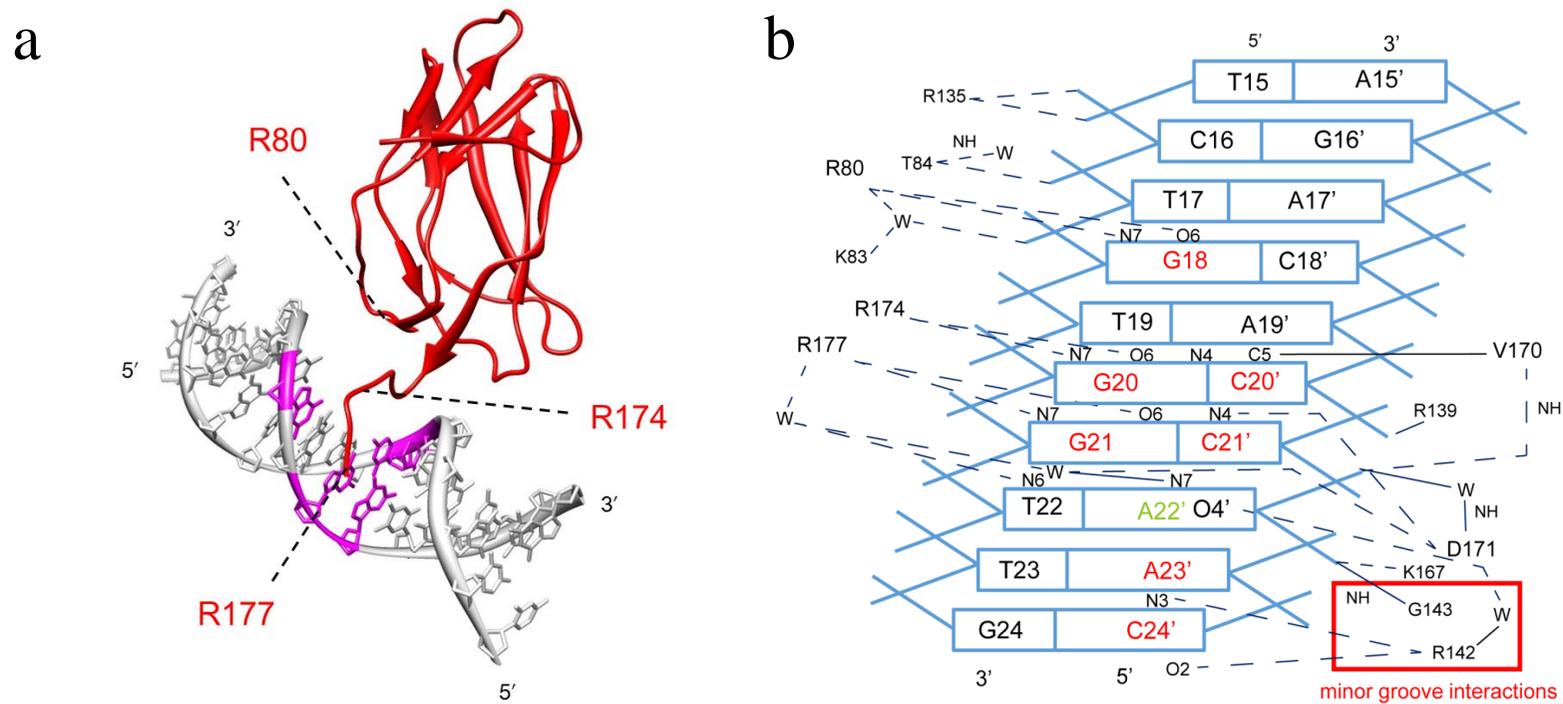


Fig. 1-2 RD の DNA 認識様式

(a) RD と DNA の複合体の結晶構造 (PDB ID : 1HJC) . 桃 : RD との結合に重要な塩基 (DNA 共通配列) . (b) RD による DNA 認識の概要 . 点線 : 分子間水素結合 , 実線 : van der Waals 結合 , 赤四角 : 副溝側の相互作用 , 赤 : アミノ酸と直接相互作用する塩基 , 緑 : 水分子を介してアミノ酸と相互作用する塩基 .

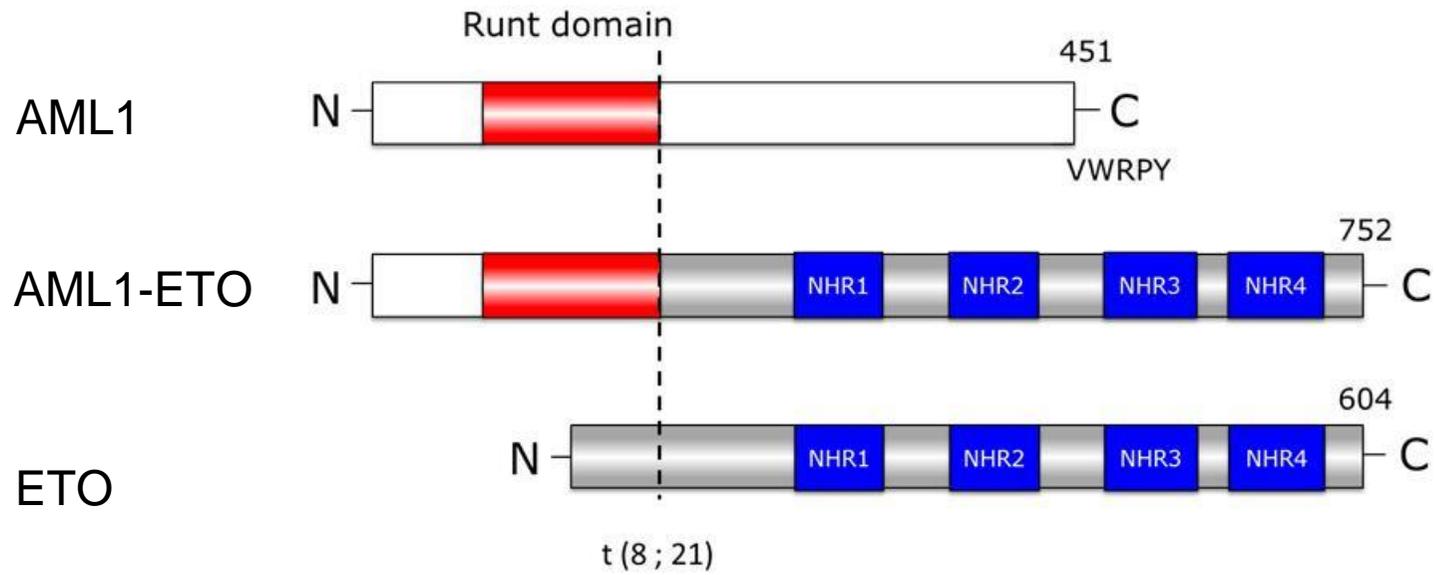


Fig. 1-3 AML1 タンパク質と ETO タンパク質

赤 : Runt domain, 青 : Nervy Homology Regions (NHR) 2-4.

5' -GGGACAAUGGACG- (30N) -UAACGGCCACAUGAGAG-3'

		Frequency
Apt1	AC CCAC CACG GCGAG GUUAUCCCAUUGCCCC	13.8 %
Apt2	GUCGGAU GCGAG GGCGAUG CCAC UUGACCG	8.3 %
Apt3	CACAU GCGA GGCCCUG CCAC CCGCGUCCG	8.3 %
Apt4	UGAUCAAU GCGCG GCUAAG CCAC CACGUC	8.3 %
Apt5	ACUAUG CGAGU CACCG CCAC GUUCGCCCCG	5.5 %
Apt6	ACCAAU GCGCG UUUACA CCAC UGGUCG	5.5 %
Apt7	GUUAGU GCGAG GCAAAG CCAC CAUACCGC	5.5 %
Apt8	UGCCAU GCGAG GCAAAG CCAC CGCACGCA	5.5 %

Fig. 1-4 RD に対して選別された RNA 配列

赤：保存配列.

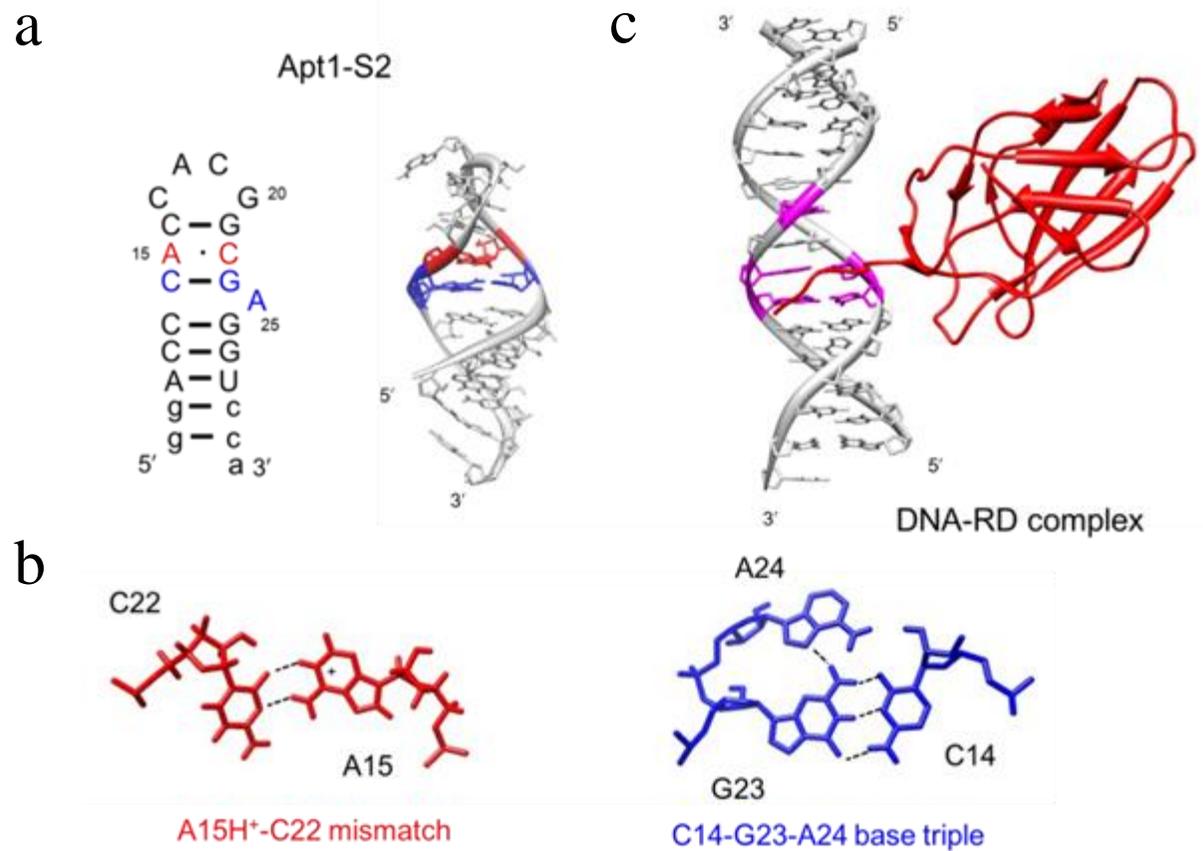


Fig. 1-6 Apt1-S2 の立体構造および DNA の立体構造との比較

(a) Apt1-S2 の二次構造および立体構造. 赤 : A15H⁺-C22 mismatch base pair, 青 : C14-G23-A24 base triple. (b) A15H⁺-C22 mismatch base pair および C14-G23-A24 base triple. (c) RD と DNA の複合体の結晶構造. 桃 : RD との結合に重要な塩基.

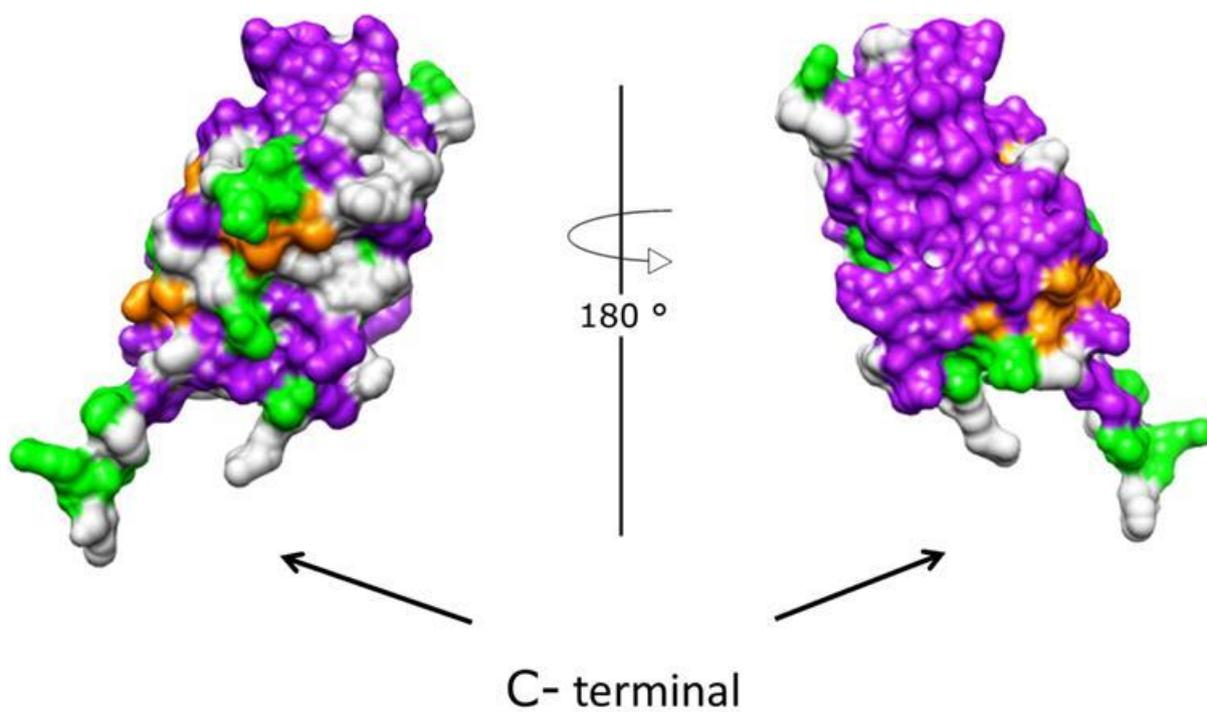
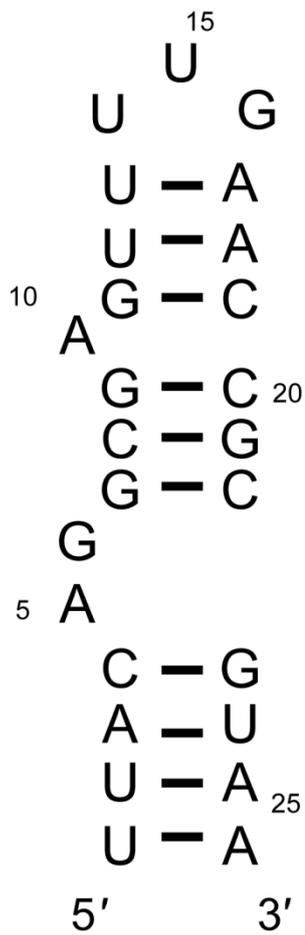


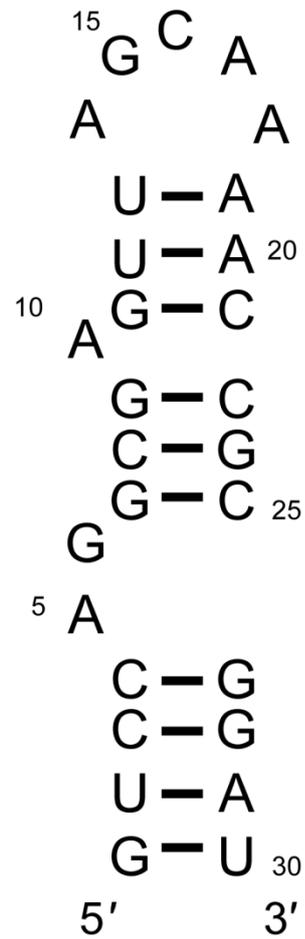
Fig. 1-7 Apt1-S と RD の相互作用における化学シフト差のマッピング

緑および橙：NMR シグナルが消失もしくは大きく変化した残基，紫：NMR シグナルの変化が小さいもしくは変化しなかった残基，灰：未帰属の残基.

Family 1



Family 2



$$K_d = \sim 100-160 \text{ nM}$$

Fig. 1-8 Barton らによって取得された RNA aptamer および解離定数

解離定数はゲルシフトアッセイ法により算出.

第2章 AML1 Runt domain に対する高親和性 RNA aptamer の取得と解析

2-1 はじめに

本章では、まず AML1 タンパク質の Runt domain (RD) に対する新規の高親和性 RNA aptamer の取得について述べた。本研究では、厳しい選別条件下、特に高塩濃度条件において RD に対して SELEX 実験を行い、新規の高親和性 RNA aptamer の取得を試みた。

2-2 方法

2-2-1 AML1 RD の調製

本研究では、RD をコードした配列が組み込まれた pQE80 plasmid vector (ampicillin 耐性) (QIAGEN 社製) を用いた (Fig. 2-1) 。本研究で用いた RD は N 末端側に hexahistidine-tag を有する (Fig. 2-2) 。hexahistidine-tag 付き RD を大腸菌 BL21 (DE3) 株にて発現させた。まず、種菌としてグリセロールストックにした大腸菌を、ampicillin を含む 5 mL の LB 培地にて、BioShaker (BR-23FP ; TAITEC 社製) を用いて 37 °C で OD₆₀₀ が 0.6-0.8 程度になるまで振とう培養した。次に、OD₆₀₀ が 0.6 付近になったとき、JAR-FARMENTER (高杉製作所社製) 内の 3.5 L の LB 培地に対して 5 mL の菌溶液を植菌し、再び OD₆₀₀ が 0.6-0.8 程度になるまで振とう培養した。OD₆₀₀ が 0.6 付近になったとき、温度を 20 °C に設定し、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を最終濃度 1 mM になるように添加し、一晩振とう培養した。その後、高速冷却遠心機 (Model 6000 ; KUBOTA 社製) を用いた遠心分離 (7000 g, 30 分, 4 °C) によって大腸菌を集菌した。得られた湿菌から RD を抽出するために、まず、ULTRA SONIC

HOMOGENIZER UH-300 (SMT 社製) を用いて湿菌の超音波破碎を行った。緩衝溶液 A [20 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoethanol] を加えて懸濁し, Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-Free (MERCK 社製) および, リゾチーム (卵白由来) 0.1 g を加えた。超音波破碎後, 遠心分離 (14000 rpm, 60 分, 4°C) によって, 可溶画分と不溶画分に分けた。次に, 高速液体クロマト装置 ÄKTA prime (GE Healthcare 社製) を用いて, Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィー精製を行った。まず, 可溶画分を緩衝液 A で平衡化した 5-mL His Trap HP column (GE Healthcare 社製) に通した。緩衝溶液 A 100 mL でよく洗浄後, RD を 10-500 mM imidazole 濃度勾配により溶出した。その後, 緩衝液 B [20mM sodium phosphate (pH 6.5) , 50 mM NaCl, 1 mM DTT] に対して透析を行った。透析は外液量 1 L として, 3 時間以上を 2 回行った。次に, ÄKTA prime を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。透析後の試料を緩衝溶液 B で平衡化した 5-mL Hi Trap SP column (GE Healthcare 社製) に通し, 緩衝溶液 B 100 mL でよく洗浄後, RD を 50-1000 mM NaCl の濃度勾配により溶出した。精製した RD は, 用途に応じた緩衝溶液に対して一晩透析した。最後に, 紫外可視分光光度計 (BioSpec-1600 ; SHIMADZU 社製) を用いて, 280 nm における紫外 (UV) 吸収を測定し, (2-1) 式より調製した RD の濃度の定量を行った。さらに, 吸光度 280 nm と 260 nm の値から, 核酸が付着していないかどうか確認した。280 nm/260 nm の値が 1.5 以上で核酸の混入がないと考えられる。

$$\text{濃度(M)} = \frac{a(\text{OD})}{(Y \times 1480) + (W \times 5540)} \quad (2-1)$$

a : OD 値, Y : Tyrosine の個数, W : Tryptophan の個数

2-2-2 SELEX 実験

はじめに、本章で用いる合成 DNA を Table 2-1 に示す。また、これらの合成 DNA は、すべて北海道システムサイエンス社で委託合成した。

本研究では、一本鎖の鋳型 DNA (DNA ライブラリー1) および二種類のプライマー (プライマー1 ならびにプライマー2) を用いた。はじめに、鋳型 DNA とプライマー 1 を用いて、伸長反応により二本鎖の DNA ライブラリーを調製した。最終濃度 $1\times$ Buffer for KOD-Plus- Ver.2, 0.2 mM dNTPs (each) (TOYOBO 社製), 1.5 mM $MgSO_4$, 0.625 μ M 鋳型 DNA, 1.3 μ M プライマー1, 0.0625 U/ μ L KOD-Plus- (TOYOBO 社製) の伸長反応液 800 μ L を調製した (Table 2-2)。次いで、サーマルサイクラー (LifeECO ver 2.0 ; NIPPON Genetics 社製) を用いて、94 $^{\circ}C$ 2 分, 94 $^{\circ}C$ 15 秒, 50 $^{\circ}C$ 30 秒, 68 $^{\circ}C$ 3 分の反応を行った。その後、高速遠心機 (Centrifuge 5418 ; eppendorf 社製) および微量高速冷却遠心機 (MX-305 ; TOMY 社製) を用いて、反応産物をフェノールクロロホルム処理 (14000 rpm, 2 分), およびエタノール沈殿 (14000 rpm, 30 分, -10 $^{\circ}C$) によって精製し、二本鎖の鋳型 DNA ライブラリーを調製した。

次に、T7 RNA polymerase を用いた試験管内転写合成 (*in vitro* transcription) により、先ほどの二本鎖の鋳型 DNA ライブラリーから初期 (未選別) の RNA pool を調製した。二本鎖の鋳型 DNA を全量用いて、最終濃度 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 35 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine, 0.01 wt% TritonX-100, 80 mg/mL PEG8000, 10 mM DTT, 9 mM ATP, 9 mM UTP, 9 mM CTP, 9 mM GTP, T7 RNA polymerase の転写反応液 200 μ L を調製し、37 $^{\circ}C$ の条件で一晩反応させた (Table 2-3)。続いて、0.1 U/ μ L Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa 社製) を加えて、37 $^{\circ}C$ 30 分間反応させた。DNase I 処理後、フェノールクロロホルム処理, およびエタノール沈殿, Micro Bio-Spin Columns with Bio-Gel P-30 (BIO-RAD 社製) を用いたゲルろ過によって精製した。最後に、紫外可視分光光度計を用いて 260 nm における UV 吸収を測定し、(2-2) 式により RNA

pool の定量を行った。その際、RNA pool の 40 塩基分のランダム配列には adenine (A), uracil (U), cytosine (C), guanine (G) が均等に 10 塩基ずつ含まれると仮定した。

$$\text{濃度 (mM)} = \frac{a(\text{OD})}{15 \times w + 9.9 \times x' + 7.4 \times y + 11.4 \times z} \quad (2-2)$$

a: OD 値, w: A の個数, x': U の個数, y: C の個数, z: G の個数

次に、選別時に用いる樹脂を洗浄した。本 SELEX 実験では、Ni-NTA Agarose (QIAGEN 社製), Ni-NTA Superflow (QIAGEN 社製), TALON Metal Affinity Resin (Clontech 社製) の三種類の樹脂を用いた。RD 固定用の樹脂 2 μL に 1 \times 結合用緩衝液 [20 mM sodium phosphate (pH 6.5), 500 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 5 wt% glycerol, 0.1 wt% TritonX-100, 5 mM β -mercaptoethanol] 200 μL を加え静置した。その後、卓上遠心機 (プチまる 8; WAKEN 社製) を用いて遠心し、樹脂が沈殿したのを確認して上清を捨て、樹脂の洗浄を行った。

次に、RNA のフォールディングを行った。まず、50 μL の超純水に溶解した 400 pmol の RNA pool を、サーマルサイクラーを用いて、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間変性させ、4 $^{\circ}\text{C}$ まで急冷した。続いて、2 \times 結合用緩衝液 50 μL を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間以上保温した。その後、1 \times 結合用緩衝液で溶解した競合剤としての tRNA (Invitrogen 社製) を、最終濃度 2 mg/ml になるように加えた。なお、その際は、RNA pool と tRNA を合わせた液量の総量が 100-200 μL で収まるように調整した。続いて、樹脂に結合する RNA を除くため (ネガティブ選別), フォールディング後の RNA pool を洗浄済みの樹脂の入

ったマイクロチューブに移して、30 分間室温で回転させた。30 分後、遠心分離により樹脂を沈殿させて、上清をネガティブ選別後の RNA pool として回収した。

次に、RD を樹脂に固定化するために、40 pmol の RD を 1×結合用緩衝液 100 μ L で溶解して、洗浄済み樹脂に移して、30 分間室温で回転させた。その後、遠心分離により樹脂を沈殿させ上清を捨てた。続いて、未吸着の RD を洗浄するために、結合用緩衝液 200 μ L で 3 回洗浄し、上清を捨てた。

そして、RD に結合するものを選別するため（ポジティブ選別）、ネガティブ選別済の RNA pool を樹脂に固定した RD の入ったマイクロチューブに移して、30 分間、室温で回転させた。その後、遠心分離により樹脂を沈殿させ、上清を捨てた。次に、400 μ L の結合用緩衝液によって 6 回洗浄した。最後に、溶出用緩衝液 [20 mM sodium phosphate (pH 6.5), 500 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 5 wt% glycerol, 0.1 wt% TritonX-100, 5 mM β -mercaptoethanol, 500 mM imidazole] 200 μ L で RD ごと結合 RNA を回収し、フェノールクロロホルム処理、およびエタノール沈殿によって精製した。なお、この際は結合 RNA を効率よく回収するために、共沈剤として Ethachinmate（ニッポンジーン社製）を用いて、エタノール沈殿を行った。

回収した結合 RNA を液量 24 μ L の超純水で溶解し、その後、逆転写反応および PCR を行うことで、次の Round (R) に用いる DNA pool を調製した。なお、RNA の高次構造形成による反応阻害を緩和するため、逆転写反応は 2 段階の方法で行った。まず、プライマーと RNA をアニールさせるため、先ほどの超純水に溶解した RNA に、100 μ M プライマー2 を 1 μ L を加え、サーマルサイクラーを用いて、65°C 5 分間恒温し、4°C 10 分間急冷した。その後、最終濃度 1×RT Buffer, 0.25 mM dNTP (each), 0.8 U/ μ L RNase Inhibitor Recombinant (TOYOBO 社製), 5 U/ μ L 逆転写酵素 RevTraAce (TOYOBO 社製) に調製した反応液 50 μ L を、50°C 1 時間、99°C 5 分間で反応させた (Table 2-4)。続いて、逆転写反応物の全てを用いて、最終濃度 1×Buffer for KOD-Plus-Ver.2,

0.2 mM dNTPs (each) (TOYOBO 社製), 1.5 mM MgSO₄, 3 μM プライマー1 および 2, 0.0625 U/μL KOD -Plus- (TOYOBO 社製) の反応液 400 μL を調製した (Table 2-5) .
その後, サーマルサイクラーを用いて, 94 °C 2 分, 94 °C 15 秒, 50 °C 30 秒, 68 °C 30 秒で PCR を行った. なお, SELEX 実験では, ランダム配列を含む DNA を用いて PCR を行うため, PCR サイクル数を増やしすぎると目的の配列よりも長い配列や短い配列が出現してしまう. それを防ぐため, 最初の 8 サイクルまで全量の反応液量で行い, その反応液から任意の本数に 10 μL ずつ分注した. 残りの反応液を 4 °C で保存しておきながら, 10 μL ずつ分注したそれぞれ反応液のサイクル数を 2 サイクルずつ増やして PCR を行った. 10-20 サイクルの間で反応を行った後, それぞれサイクル数の異なる反応液を native Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) を用いて評価し, 長い配列や短い配列が出現しておらず, 十分な量の DNA が確保できる PCR サイクル数を決定した. その後, そのサイクル数まで保存しておいた残りの反応液の PCR を行った. これ以外に, SELEX 実験のようにランダム配列を含む DNA を PCR する際には, 今回のようにプライマーの濃度を数μM と高く設定して, PCR 中にランダムな配列同士でアニールしてしまうことを防ぐことも重要である. PCR 後, フェノールクロロホルム処理, およびエタノール沈殿によって精製した. 次に, PCR 産物の全量を用いて, 転写反応を行い, 次の Round で使用する RNA pool を調製した. 転写反応の組成および条件は, 上記の初期 RNA pool の調製と同様である.

本研究では, SELEX 実験における 1 Round を, 選別 (ネガティブ選別およびポジティブ選別), 逆転写反応, PCR および転写反応による RNA pool の調製までと定義した. 2 Round 目以降は Table 2-6 に示す選別条件で 8 Round まで行った. なお, 今回は, 1-8 Round を通して逆転写, PCR および転写反応は同じ反応液量で行ったが, 2 Round 目以降に関しては, 1 Round 目の PCR によっておのおの分子種が複数種存在しているので, それら一連の操作の反応量を半分以下に落とすことも可能である.

次に、全 8 Round 後の DNA pool の配列を解析した。まず、8 Round 後の DNA pool 内の配列を単離するために、TA-cloning を行った。TA-cloning には、pGEM-T Vector Systems (Promega 社製) を使用した。しかしながら、KOD-Plus- (TOYOBO 社製) によって合成された 8 Round 後の DNA pool は、平滑末端を有するため、直接 TA-cloning に使用することはできない。そこで、TaKaRa EX Taq (TaKaRa 社製) を用いて、8 Round の DNA pool の 3'末端に A を付加した。まず、転写反応によって 8 Round の DNA pool から RNA pool を調製し、その RNA pool を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応の組成は基本的に Table 2-4 と同様である。最終濃度 1×RT Buffer, 0.25 mM dNTP (each), 0.8 U/μL RNase Inhibitor Recombinant (TOYOBO 社製), 0.02 μM RNA pool, および 5 U/μL 逆転写酵素 RevTraAce (TOYOBO 社製) に調製した逆転写反応液 50 μL を、50°C 1 時間、99°C 5 分間で反応させた。続いて、逆転写反応物の全てを用いて、最終濃度 1×Ex Taq Biffer, 0.2 mM dNTPs (each) (TaKaRa 社製), 3 μM プライマー1 および 2, 0.1 U/μL TaKaRa Ex Taq (TaKaRa 社製) の PCR 反応液 300 μL を調製した (Table 2-7)。その後、サーマルサイクラーを用いて、96 °C 15 秒, 50 °C 15 秒, 72 °C 15 秒で PCR を行った。PCR の操作は、前述した SELEX 実験の際の操作と同様である。PCR 後、フェノールクロロホルム処理、およびエタノール沈殿によって精製した。また、PCR 産物の濃度は native PAGE のバンドの輝度から見積った。UV 吸収による定量を行わなかった理由は、PCR の際にプライマーを過剰に加えているため、エタノール沈殿などではプライマーを取り除き切ることができず、正確な吸光度の値を得られないためである。次に、下記の計算式 (2-3) を用いて、ライゲーション反応に必要な PCR 産物の量を計算した。本実験のライゲーション反応は、insert と vector の molar ratio 8 : 1 で行った。最終濃度 1×Rapid Ligation Buffer, 5 ng/μL pGEM-T Vector (ampicillin 耐性), 0.3 U/μL T4 DNA ligase, 必要量 (13 ng) の insert に調製したライゲーション反応液 10 μL を、4 °C で一晩反応させた (Table 2-8)。

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert vector molar ratio} \quad (2-3)$$

MicroPulser Electroporater (Bio-Rad 社製) を用いたエレクトロポレーション法によって、ライゲーション反応液中の plasmid vector (ampicillin 耐性) を宿主大腸菌 XL1-Blue (tetracycline 耐性) に導入した。その後、LB 寒天培地 (50 µg/mL carbenicillin, 20 µg/mL tetracycline, 80 µg/mL X-Gal, および 1 mM IPTG) にまき、37 °Cで一晩培養した。XL1-Blue は、blue white selection が可能な宿主大腸菌であるため、形成した白色および薄い青色のコロニーを 36 個選び、5 mL の LB 培地 (50 µg/mL carbenicillin, 20 µg/mL tetracycline) に入れ 37 °Cで培養した。その後、OD₆₀₀ の値が最低でも 1.0 以上で集菌した。集菌後は、Fast Gene Plasmid Mini Kit (ニッポンジーン社製) を用いて plasmid 抽出を行った。抽出した plasmid を UV 吸光度測定によって定量し、ファスマック社に plasmid の配列解析を委託した。ファスマック社では、capillary sequencing 法を用いて配列解析を行っている。なお、SELEX 実験で用いる DNA は 100 塩基対前後と短いため、vector に挿入されていても、β-galactosidase の活性を完全には抑えられない場合がある。その場合、白色のコロニーではなく、少し青みがかかったコロニーが形成される。本実験では、選び取ったコロニーに insert が挿入された plasmid が入っているかを調べるため、コロニーPCR を行った。36 個のコロニーのうち、6 個を無差別に選び、それぞれ超純水 10 µL に懸濁し、95°C 5 分間恒温した。最終濃度 1×Standard Taq Reaction Buffer (New ENGLAND BioLabs 社製) , 0.2 mM dNTPs (each) , 0.5 µM M13 Forward プライマー, 0.5 µM M13 Reverse プライマー, および 0.025 U/µL Hot Start Taq DNA Polymerase (New ENGLAND BioLabs 社製) の PCR 反応液 100 µL を調製し

(Table 2-9) , 10 μ L ずつに分注した. 続いて, 分注したそれぞれ反応液に, 別々の大腸菌懸濁液を 1 μ L を加え, 95 $^{\circ}$ C 30 秒, (95 $^{\circ}$ C 1 分, 50 $^{\circ}$ C 1 分, 68 $^{\circ}$ C 3 分) \times 30 サイクル, 68 $^{\circ}$ C 5 分で PCR を行った. PCR 後, アガロースゲル電気泳動で insert 由来のバンドの有無を確認した.

2-2-3 RNA および RDE の調製

後述する SPR 測定では, リガンドとなる分子を sensor chip 上に固定化する必要がある. 本実験の SPR 測定では, dT16 oligomer を固定化した sensor chip 上に, RNA および RDE を固定化する方法を用いるため, それぞれの 3'末端側に adenine (A) を 16 個付加する必要がある.

3'末端側に A が 16 個付加された S1-S11 RNA (A16_S1-S11) の二本鎖の鋳型 DNA は, TA-cloning 後の plasmid を用いた PCR によって, それぞれ調製した. 最終濃度 1 \times Standard Taq Reaction Buffer (New ENGLAND BioLabs 社製), 0.2 mM dNTPs (each), 3 μ M プライマー1 および 3, 1 ng/ μ L plasmid (S1-S11) および 0.025 U/ μ L Hot Start Taq DNA Polymerase (New ENGLAND BioLabs 社製) の PCR 反応液 100 μ L を調製し (Table 2-10) , 95 $^{\circ}$ C 30 秒, (95 $^{\circ}$ C 1 分, 50 $^{\circ}$ C 1 分, 68 $^{\circ}$ C 3 分) \times 30 サイクル, 68 $^{\circ}$ C 5 分で PCR を行った. PCR 産物をフェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿によって精製し, 鋳型 DNA とした. 次に, A16_S1-S11 RNA を試験管内転写合成法によって調製した. 転写反応は, それぞれ全量の鋳型 DNA を用いて 60 μ L の反応液量で行った. また, 反応液の組成は Table 2-3, 条件は 2-2-2 と同様である. 転写反応物は PAGE 法によって精製し, 260 nm における UV 吸収を測定して, (2-2) 式を用いて定量した.

RDE の A を 16 個付加させた sense 鎖 (A16_sense 鎖) および antisense 鎖を PAGE 法により精製し, 260 nm における UV 吸収を測定して, (2-4) 式を用いて定量した.

$$\text{濃度 (mM)} = \frac{a(\text{OD})}{15 \times w + 8.4 \times x + 7.4 \times y + 11.4 \times z} \quad (2-4)$$

a : OD 値, w : A の個数, x : T の個数, y : C の個数, z : G の個数

次に, A16_sense 鎖と antisense 鎖を molar ratio 1 : 1 になるように混合し, 等液量の 2 × PBS 緩衝液 [1 × PBS 緩衝液 ; 1 mM KH₂PO₄, 3 mM Na₂HPO₄, 155 mM NaCl, pH 7.4] を加えた. その後, 95 °C で 5 分間保温し, 徐々に室温まで下げた. これを A16_RDE とした. なお, 3'末端側に A が 16 個付加された Apt1-S の RNA に関しては, 共同研究者の一人である横浜国立大学機器分析評価センターの田中陽一郎博士から分けて頂いたものを使用した.

2-2-4 表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) 測定

SPR 法とは, プラズモン共鳴を利用して分子の相互作用を sensor chip 上に再現することで, リアルタイムに結合の強さ, 速さ, 選択性を測定して, 結合速度定数 (k_{on}) と解離速度定数 (k_{off}), ならびに解離定数 (K_{d}) を算出できる手法である. 本研究での SPR 測定は, BiacoreX (GE Healthcare 社製) を用いて 298 K の温度条件で行った [55]. はじめに, streptavidin sensor chip (GE Healthcare 社) を, 洗浄液 [50 mM sodium

hydroxide, 1 M sodium chloride]で3回洗浄した。次に、5'末端に biotin が付加された dT16 oligomer を sensor chip の flow cell 2 におよそ 800 Resonance Unit (RU) 固定した。続いて、sensor chip を 1×SPR 用緩衝液 [20 mM sodium phosphate (pH 6.5) , 300 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 0.1 wt% Tween, 1 mM DTT]で洗浄および平衡化した。続いて、1×SPR 用緩衝液で溶解した各種 A16_RNA および A16_RDE を、流速 90 $\mu\text{L}/\text{min}$ で、flow cell 2 におよそ 100 RU 固定した。次に、1×SPR 用緩衝液で溶解した RD (0.625-2400 nM) およそ Rev ペプチド (62.5-2000 nM) を 90 秒間、flow cell 1 と 2 に injection し、180 秒間解離させた。最後に、sensor chip の再生化、つまり、結合した RD と固定化された RNA および RDE を dT oligomer 付 sensor chip 上から完全に除去するために、4 M urea を 60 秒間 injection した。なお、dT oligomer および sensor chip への RD の非特異的な結合の影響を除くため、flow cell 2 のセンサーグラムから flow cell 1 のセンサーグラムを差し引いた。また、測定したセンサーグラムの解析には、BIAevaluation software (GE Healthcare 社製) を使用した。langmuir (1 : 1) binding model を用いて、結合速度定数 k_{on} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) と解離速度定数 k_{off} (s^{-1}) の解析を行った。解離定数 K_{d} は解離速度定数 k_{off} と結合速度定数 k_{on} の比 ($K_{\text{d}} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) から算出した。各パラメータは独立した3回の実験測定値の平均値 \pm 標準誤差で示した。

2-3 結果

SELEX 実験によって、40 塩基長のランダム配列を含む RNA pool から RD に対する RNA aptamer を取得した。高親和性の RNA aptamer を取得するため、高塩濃度条件 (500 mM potassium acetate) での選別と並行して、洗浄の回数、競合分子としての tRNA の濃度およびネガティブ選別の回数を増やす、並びにポジティブ選別での RD の濃度を減らすことで、徐々に選別条件を厳しくした。全 8 Round の SELEX 実験の後、cloning および配列解析を行った。ランダムに選択した 36 個のクローンから、11 個の

異なる RNA 配列を単離した (Table 2-11) . 次に, これら S1-S11 の RNA 配列の二次構造予測を行った (Fig. 2-3) . 二次構造予測プログラムは, 千葉工業大学構造生物学研究室の河合剛太教授らによって開発された vs_subopt program (http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vsfold/vs_subopt/) を用いた[68, 69]. その結果, S1-S5, S7, S8, S10 はいずれも多岐ループ構造を形成していた. また, S6, S9, S11 は多岐ループ構造を形成していないものの, 3つ以上のヘアピンステムループ構造を形成していた.

次に, SPR 法を用いて 11 個の RNA 配列の RD に対する結合親和性を解析したところ, 全ての配列は RD に対して, K_d が 0.3 nM 以下の高い結合親和性を示した (Table 2-12) . 36 個のクローンのうち 10 個のクローンを占めていた, 最も出現頻度の高かった配列 S1 の K_d は 0.27 ± 0.02 nM であり, 最も結合親和性の高かった配列 S4 の K_d は 0.044 ± 0.002 nM であった. また, RDE と Apt1-S の K_d は, それぞれ $K_d = 10 \pm 1$ nM, $K_d = 1.1 \pm 0.1$ nM であり, 以前報告された K_d 値とほぼ一致していた (Fig. 1-5) . したがって, S4 は RDE の 250 倍以上, Apt1-S の 25 倍以上強く RD と結合することが明らかとなった. この RD に対する結合親和性の違いは, S4 と RD の結合における k_{off} が RDE あるいは Apt1-S と RD の結合における k_{off} よりもとても低いことに起因していた.

2-4 考察

本研究では, 厳しい選別条件, 特に高塩濃条件において SELEX 実験を行うことで, RD に対して非常に高い親和性をもつ RNA aptamer を取得した (Table 2-12) . これらの RNA aptamer は, 以前神津博士らに報告された RNA aptamer (Apt1-S) はもちろん, Barton らのグループによって報告された aptamer と, 塩基配列が全く異なっており, 新規の RNA aptamer であるといえる (Fig 1-8) [64, 67]. さらに, 取得された全ての

RNA aptamer は, Apt1-S ($K_d = 1.1 \pm 0.1$ nM) や Barton's aptamer ($K_d = 100-160$ nM) よりも強い結合親和性を示した. そこで, それぞれの SELEX 実験の条件を比較してみると, 使用したランダム配列 DNA ライブラリーの塩基数 (神津博士ら: 30N, 本研究: 40N, Barton ら: 50N) や RD の resin への固定化方法 (神津博士らおよび本研究: his-tag による固定, Barton らの実験: biotin による固定) などの違いの他に, 選別の際に用いる緩衝液の塩濃度の違いが挙げられる. 本研究の SELEX 実験では 500 mM potassium acetate の条件であったが, 神津博士らの SELEX 実験では 50-200 mM potassium acetate, Barton らの SELEX 実験では 100 mM NaCl の塩濃度であった. 塩濃度の高さや結合親和性の強さに相関関係があることから, この選別工程における塩濃度の違いが取得された aptamer の結合力の違いの原因の一つであると考えられる.

今回取得された RNA aptamer の中で, S4 は最も高い親和性を示した ($K_d = 0.044 \pm 0.002$ nM). 一方で, 最も出現頻度の高い S1 の K_d 値は, 0.27 ± 0.02 nM であった. 以前, Ruigrok らのグループによって, aptamer の出現頻度は K_d よりもむしろ k_{on} に依存するという報告がされた[70]. しかしながら, 本研究の場合, S1 の k_{on} は S8 を除いた他のどの aptamer の k_{on} よりも低く, 報告された論文の事例と一致しなかった. したがって, 最も出現頻度の高い S1 が最も高い結合親和性を示さなかった理由として, SELEX 実験内での転写, 逆転写あるいは PCR の増幅効率における影響が考えられる[71]. すなわち, S1 配列は他の aptamer の配列に比べて SELEX 実験内での増幅工程 (逆転写, PCR あるいは転写) において増幅されやすい配列であった可能性がある.

Table 2-1 第2章で用いた合成 DNA

Sample	Sequence (5' to 3')
DNA library 1	CTCTCATGTCGGCCGTTA-40N-CGTCCATTGTGTCCCTATAGTGATCGTATTA
Primer 1	TAATACGACTCACTATAGGGACACAATGGACG
Primer 2	CTCTCATGTCGGCCGTTA
Primer 3	TTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTCATGTCGGCCGTTA
M13 forward primer	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 reverse primer	CAGGAAACAGCTATGAC
5'-biotinylated poly dT	biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTT
Sense strand of RDE + A16	GTCGTTTGCGGTTTGGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Antisense strand of RDE	TCCCCAAACCGCAAACGAC

Table 2-2 伸長反応の組成

Reagents	Final concentration
RNase free water	
1×Buffer for KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO)	
dNTPs (each)	0.2 mM
MgSO ₄	1.5 mM
Template DNA	0.625 μM
Primer	1.3 μM
KOD -Plus- (TOYOBO)	0.0625 U/μL

Table 2-3 転写反応の組成

Reagents	Final concentration
RNase free water	
Tris-HCl (pH 7.9)	40 mM
MgCl ₂	35 mM
Spermidine	2 mM
TritonX-100	0.01 wt%
PEG8000	80 mg/mL
DTT	10 mM
NTP (each)	9 mM
T7 RNA polymerase	Unknown

Table 2-4 逆転写反応の組成

Reagents	Final concentration
RNase free water	
1×RT Buffer	
dNTP (each)	0.25 mM
RNase Inhibitor Recombinant (TOYOBO)	0.8 U/μL
Primer	2 μM
RevTraAce (TOYOBO)	5 U/μL

Table 2-5 KOD-plus-を用いた PCR の組成

Reagents	Final concentration
Reverse transcribed products	
RNase free water	
Buffer for KOD -Plus- Ver.2 (TOYOBO)	
dNTPs (each)	0.2 mM
MgSO ₄	1.5 mM
Primer (each)	3 μM
KOD -Plus- (TOYOBO)	0.0625 U/μL

Table 2-6 SELEX 実験の条件

Round	RNA (pmol)	RD (pmol)	Resin	tRNA (mg/mL)	Number of Wash treatment	Number of PCR cycle
1	400	40	Nickel	2	6	13
2	400	40	Cobalt	3	8	14
3	400	20	Nickel	3	8	14
4	400	20	Cobalt	4	10	15
5	400	10	Nickel	4	10	15
6	300	5	Cobalt	5	12	12
7	200	2.5	Nickel	5	12	13
8	125	1.25	Cobalt	5	12	12

Table 2-7 EX Taq を用いた PCR の組成

Reagents	Final concentration
Reverse transcribed products	
RNase free water	
1×Ex Taq Buffer (TaKaRa)	
dNTPs (each)	0.2 mM
Primer (each)	3 μM
Ex Taq (TaKaRa)	0.1 U/μL

Table 2-8 ライゲーション反応の組成

Reagents	Final concentration
RNase free water	
1×Rapid Ligation Buffer (Promega)	
Insert	1.3 ng/μL
pGEM-T Vector (Promega)	5 ng/μL
T4 DNA ligase (Promega)	0.3 U/μL

Table 2-9 コロニーPCR の組成

Reagents	Final concentration
RNase free water	
A colony of E. coli	
1×Standard Taq Reaction Buffer (New ENGLAND BioLabs)	
dNTPs (each)	0.2 mM
M13 Forward primer	0.5 μM
M13 Reverse primer	0.5 μM
Hot Start Taq DNA Polymerase (New ENGLAND BioLabs)	0.025 U/μL

Table 2-10 Hot Start Taq を用いた PCR の組成

Reagents	Final concentration
RNase free water	
1×Standard Taq Reaction Buffer (New ENGLAND BioLabs)	
dNTPs (each)	0.2 mM
Primer (each)	3 μM
Plasmid (S1-S11)	1 ng/μL
Hot Start Taq DNA Polymerase (New ENGLAND BioLabs)	0.025 U/μL

Table 2-11 RD に対する RNA aptamer の配列

Clone ID	Sequence (5' to 3')	Frequency	
S1	gggacacaauggacgUGUCGGCCCUGCCGUGUAACGCUGGGCGGGGAUGUUCUCCuaacggccgacaugagag	10/36	(27.8 %)
S2	gggacacaauggacgGCCCAGCCACCUAGAGCGAGCGCGCAAUGGAGACCCAUUGuaacggccgacaugagag	8/36	(22.2 %)
S3	gggacacaauggacgUGUCGGCCCUGCCGUGUAACGCUGGGCGGGGACUUCUCCuaacggccgacaugagag	6/36	(16.7 %)
S4	gggacacaauggacgGCCCUGCCACGAUAGCGGCGCGGGAAGUAAAGUAUACACCuaacggccgacaugagag	3/36	(8.3 %)
S5	gggacacaauggacgUGUCGGCCCUGCCGUGUAAUGCUGGGCGGGGACGUUCUCCuaacggccgacaugagag	2/36	(5.6 %)
S6	gggacacaauggacgGUCAGCCACCACUGUGCGGCGAGCGGAAGCACACCGUCCGuaacggccgacaugagag	2/36	(5.6 %)
S7	gggacacaauggacgGCCCUGCCACCUAGAGCGAGCGCGCAAUGGAGACCCAUUGuaacggccgacaugagag	1/36	(2.8 %)
S8	gggacacaauggacgGCCCUGCCACGAAGGCGGCGCGCAGGCUACCCGCACCUGuaacggccgacaugagag	1/36	(2.8 %)
S9	gggacacaauggacgAUGCCGGCCCUGCCACACCAAUGCGGCGGGUCAAUAGACuaacggccgacaugagag	1/36	(2.8 %)
S10	gggacacaauggacgGCCCAGCCACCUAGUGCGAGCGCGCAAUGGAGACCCAUUGuaacggccgacaugagag	1/36	(2.8 %)
S11	gggacacaauggacgACGCCGGCCCUGCCACACCAAUGCGGCGGGUCAAUAGACuaacggccgacaugagag	1/36	(2.8 %)

小文字：プライマー結合配列由来の塩基，大文字：ランダム配列由来の塩基

Table 2-12 RNA aptamer と RD の結合における速度論的パラメータ

Clone ID	$k_{\text{on}} (\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_{\text{off}} (\times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$	$K_{\text{d}} (\text{nM})$
S1	8.5 ± 0.4	2.3 ± 0.1	0.27 ± 0.02
S2	9.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.11 ± 0.01
S3	9.7 ± 0.3	2.1 ± 0.1	0.21 ± 0.01
S4	9.1 ± 0.1	0.40 ± 0.02	0.044 ± 0.002
S5	9.3 ± 0.4	1.1 ± 0.1	0.11 ± 0.01
S6	13 ± 2	1.5 ± 0.1	0.12 ± 0.01
S7	11.6 ± 0.2	0.65 ± 0.03	0.056 ± 0.003
S8	6.8 ± 0.3	0.53 ± 0.08	0.077 ± 0.008
S9	13.1 ± 0.3	0.82 ± 0.02	0.063 ± 0.002
S10	10.7 ± 0.5	0.97 ± 0.04	0.090 ± 0.001
S11	13.7 ± 0.2	1.27 ± 0.03	0.093 ± 0.002
RDE	6.4 ± 0.8	65 ± 3	10 ± 1
Apt1-S	6.7 ± 0.2	7.6 ± 0.6	1.1 ± 0.1

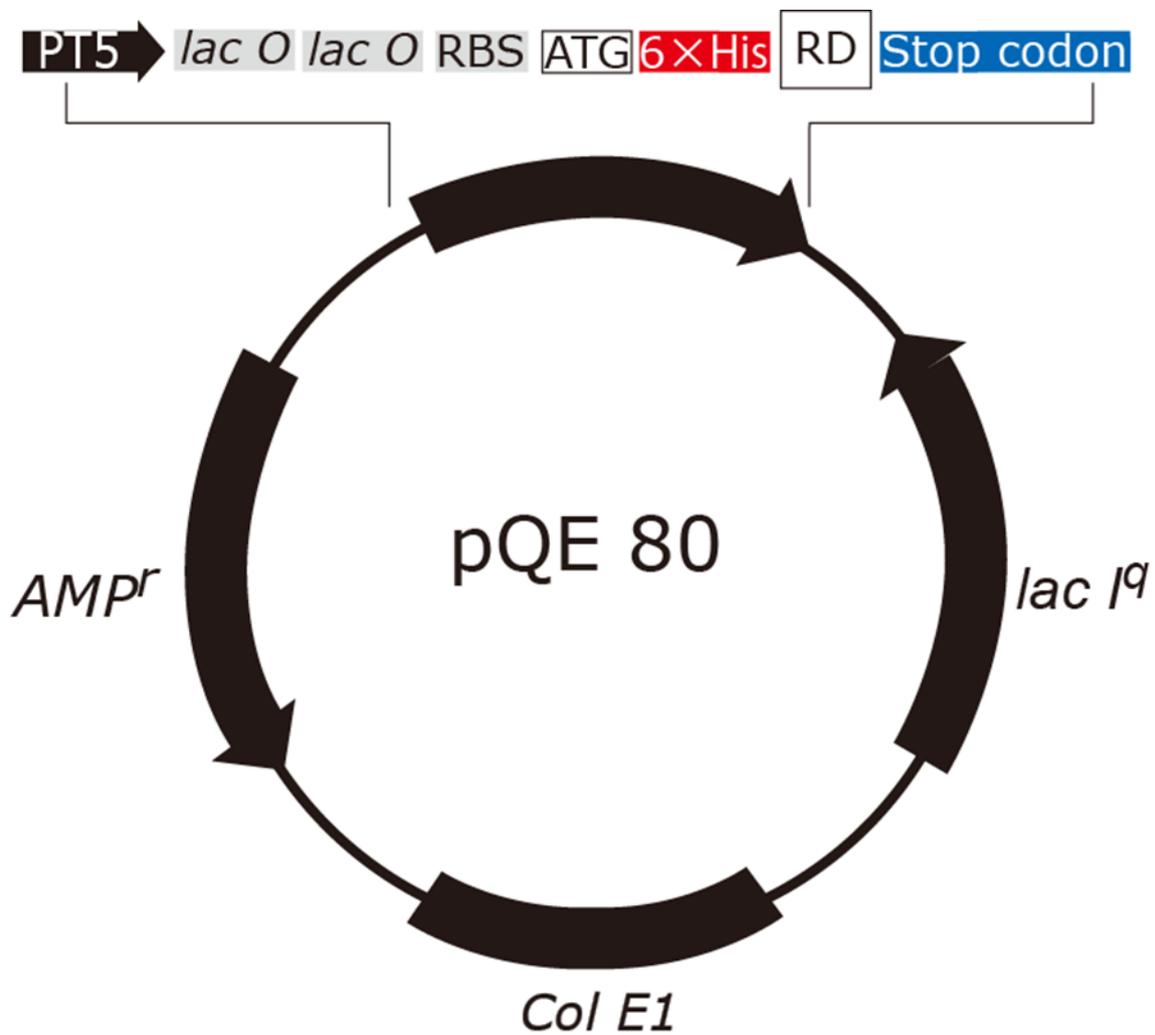


Fig. 2-1 pQE80 プラスミドのコンストラクト

Amp^r : ampicilin 耐性遺伝子, *lacq* : lac repressor 遺伝子, *Col E1* : colicin E1 origin if replication, RD : AML1 Runt domain.

1 **MRGSH HHHHH GSMVE** VLADH
21 PGELV RTDSP NFLCS VLP
41 WRSNK TLPIA FKVVA LGDVP
61 DGTLV TVMAG NDENY SAE
81 NATAA MKNQV ARFND LRFVG
101 RSGRG KSFTL TITVF TNPPQ
121 VATYH RAIKI TVDGP REPRR
141 HRQKL DDQTK

Fig. 2-2 RD のアミノ酸配列

赤 : hexahistidine-tag, 分子量 : 16,769 Da.

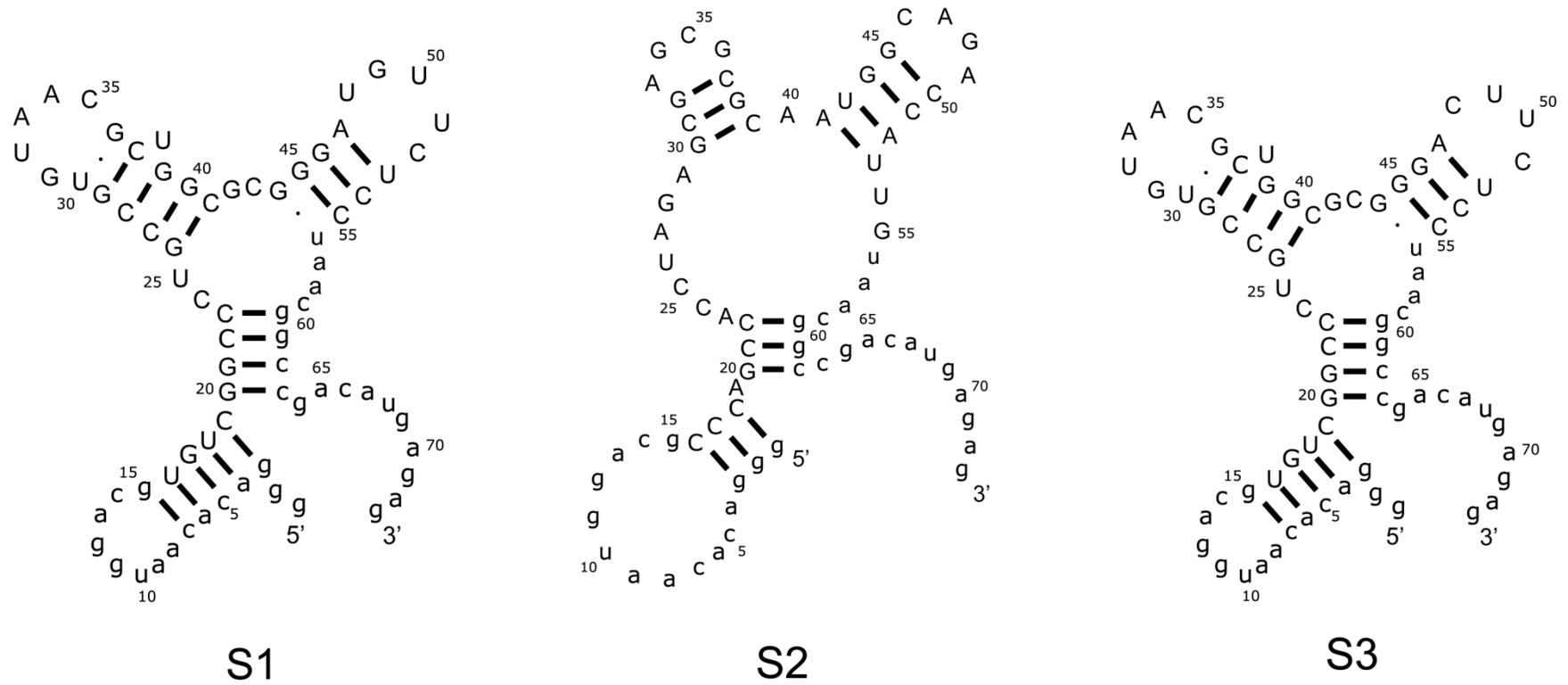
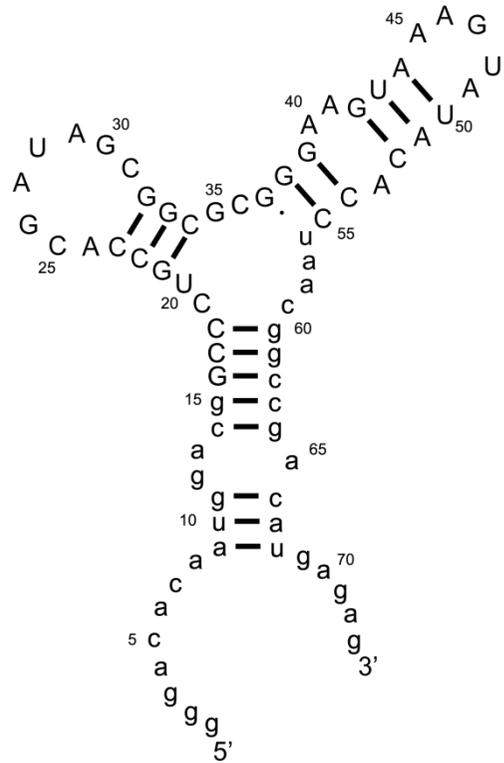
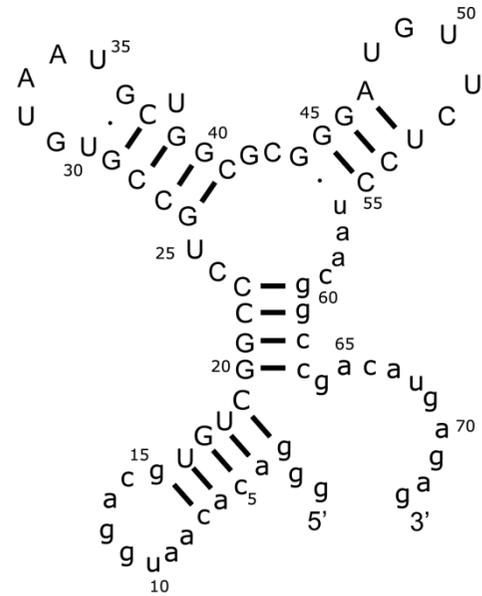


Fig. 2-3 S1-S11 の二次構造

小文字：プライマー結合配列由来の塩基，大文字：ランダム配列由来の塩基。



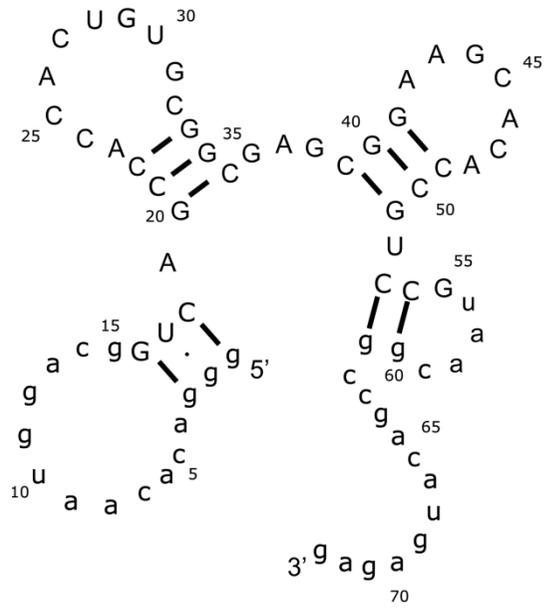
S4



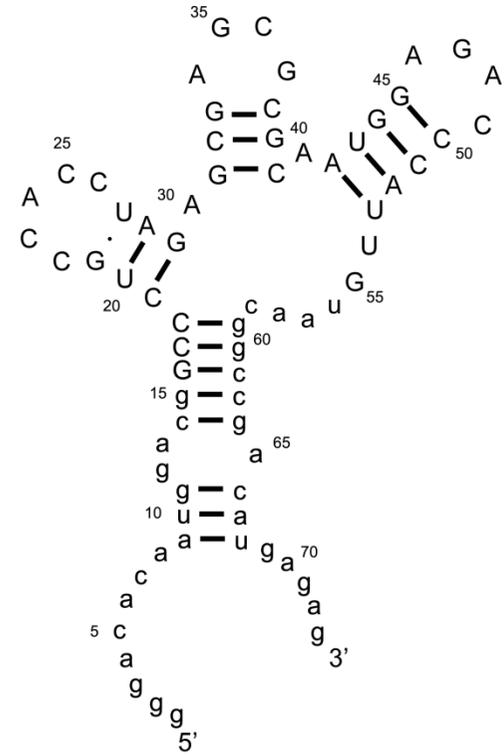
S5

Fig. 2-3 のつづき

小文字：プライマー結合配列由来の塩基，大文字：ランダム配列由来の塩基。



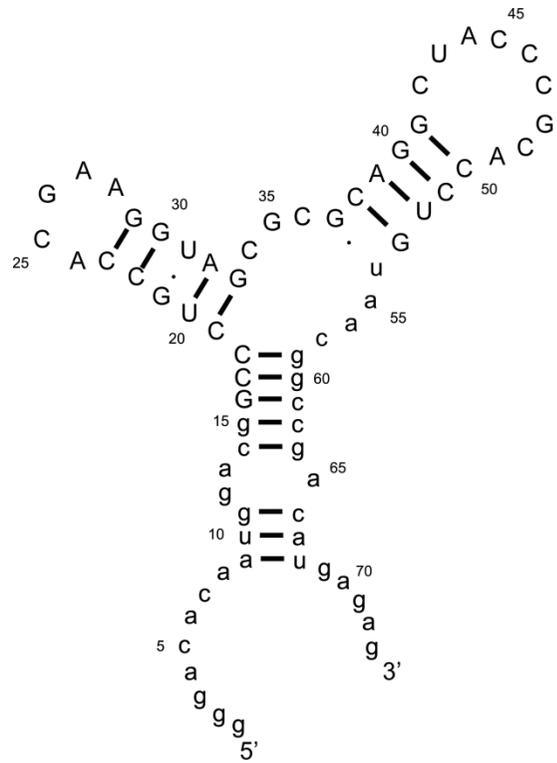
S6



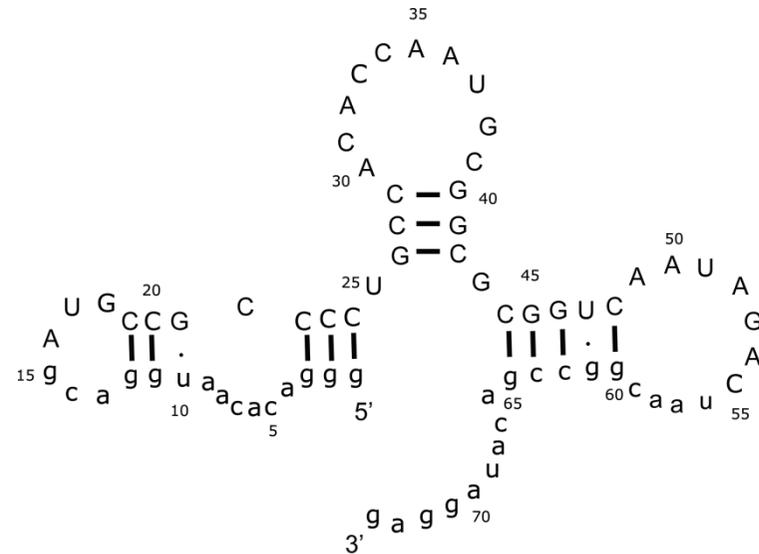
S7

Fig. 2-3 のつづき

小文字：プライマー結合配列由来の塩基，大文字：ランダム配列由来の塩基.



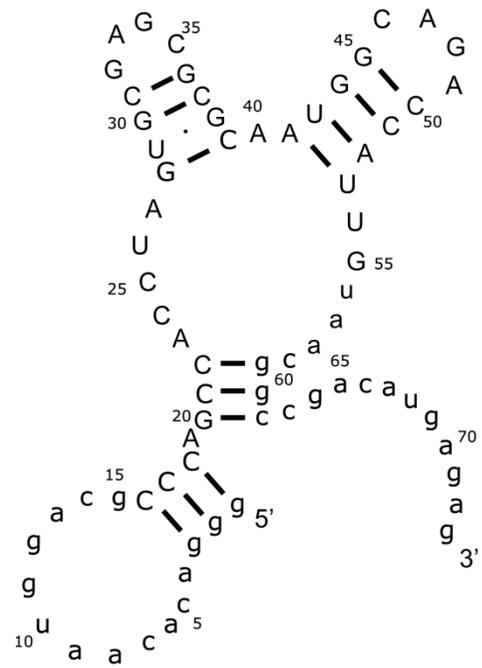
S8



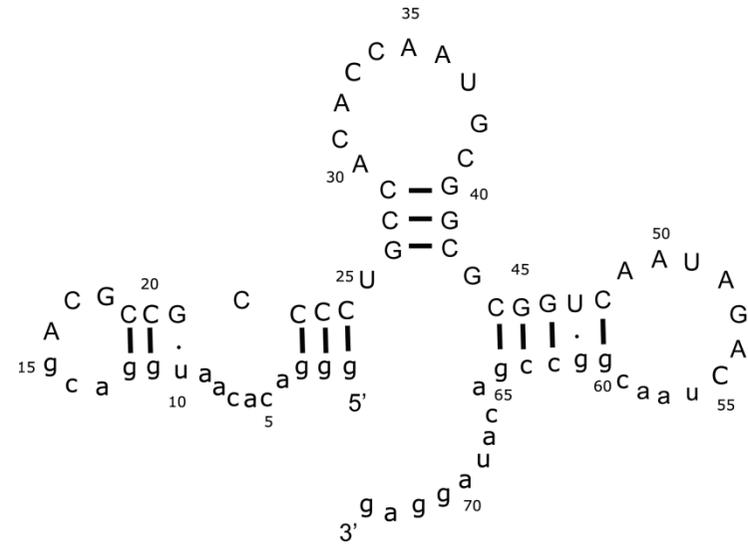
S9

Fig. 2-3 のつづき

小文字：プライマー結合配列由来の塩基，大文字：ランダム配列由来の塩基。



S10



S11

Fig. 2-3 のつづき

小文字：プライマー結合配列由来の塩基，大文字：ランダム配列由来の塩基.

第3章 SELEX 過程における RNA aptamer の濃縮の NMR モニタリング手法の開発

3-1 はじめに

本章では、SELEX 過程の RNA aptamer の濃縮の NMR モニタリング手法の開発について述べる。NMR では、RNA の塩基対形成に関する貴重な情報得ることができる [72-74]。guanosine (G) 残基あるいは uridine (U) 残基が Watson-Crick 塩基対 (G-C, A-U 塩基対) および non-Watson-Crick 塩基対 (G-U, G-A 塩基対など) を形成すると、12-15 ppm および 10-12 ppm の領域に NMR シグナル (イミノプロトンシグナル) が観測される [75-77]。一方、RNA aptamer は様々な塩基対を形成し、フォールディングすることで、標的分子を認識できる立体構造を形成することが知られている。したがって、SELEX 過程の RNA pool の一次元 (one-dimensional : 1D) イミノプロトンスペクトルを測定することで、構造を形成した RNA、すなわち RNA aptamer の濃縮をモニタリングできるのではないかと考えた (Fig. 3-1)。そこで、実際に、第2章の SELEX 実験における各 Round の RNA pool について 1D イミノプロトンスペクトルを測定した。1D イミノプロトンスペクトルは、試料の固定化および標識を必要とせず、わずか 1-2 時間で測定できる。さらに、Fig. 3-1 で示すように、SELEX 実験中に調製した RNA pool を用いて直接測定するため、余分な試料調製も必要としない。また、RNA pool に標的分子を加えることで、RNA pool と標的分子の結合をスペクトルの変化として検出できる。NMR 測定後は、RNA pool を NMR チューブから回収し、次の選別工程に直接使用できる。本研究では、NMR モニタリングの有用性を確かめるため、次世代シーケンサーによる RNA pool の配列解析および SPR 法による RNA pool の結合親和性の評価も同時に行い、結果を比較した。最後に、プライマー結合配列が異なる複数の RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルを測定し、プライマー結合配列が RNA pool の構造的多様性に及ぼす影響についても考察した。

3-2 方法

3-2-1 試料調製

はじめに、本章で用いる合成 DNA を Table 3-1 に示す。また、これらの合成 DNA はすべて北海道システムサイエンス社で委託合成した。

SELEX 実験において、選別工程を除いた実験をコントロール実験（全 8 Round）として実施した[18]。

S1 および S2 の二本鎖の鋳型 DNA については、TA-cloning 後の plasmid を用いて PCR することによって調製した。最終濃度 $1 \times$ Standard Taq Reaction Buffer（New ENGLAND BioLabs 社製），0.2 mM dNTPs（each），3 μ M プライマー1 および 2，1 ng/ μ L plasmid（S1, 2）および 0.025 U/ μ L Hot Start Taq DNA Polymerase（New ENGLAND BioLabs 社製）の反応液 400 μ L を調製し（Table 2-10），95 $^{\circ}$ C 30 秒，（95 $^{\circ}$ C 1 分，50 $^{\circ}$ C 1 分，68 $^{\circ}$ C 3 分） \times 30 サイクル，68 $^{\circ}$ C 5 分で PCR を行った。また，primer-binding sequence RNA はプライマー1，poly（A-U）RNA pool はプライマー4，RNA pool 2 と 4 はプライマー5，RNA pool 3 はプライマー6 とそれぞれの一本鎖の鋳型 DNA あるいは DNA ライブラリーを用いた伸長反応によって二本鎖の鋳型 DNA あるいは DNA ライブラリーを調製した。伸長反応の組成（Table 2-2）および条件は 2-2-2 の伸長反応と同様であるが，液量は 400 μ L で行った。poly（A-U）RNA pool の二本鎖の DNA ライブラリーは，プライマー6 および 7 と一本鎖の DNA ライブラリーを用いた PCR によって調製した。その後，全ての反応産物をフェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿によって精製した。

次に，S1，S2，primer-binding sequence RNA，poly（A-U）RNA pool，RNA pool 2，3 および 4 を試験管内転写合成法によって調製した。転写反応は，それぞれ全量の鋳型 DNA を用いて 200 μ L の反応液量で行った。また，転写反応液の組成は Table 2-3，

条件は 2-2-2 と同様である。転写反応後、0.1 U/ μ L Recombinant DNase I (RNase-free) (TaKaRa 社製) を加えて、37 °C 30 分間反応させた。DNase I 処理後、フェノールクロロホルム処理、およびエタノール沈殿、Micro Bio-Spin Columns P-30 (BIO-RAD 社製) を使ったゲルろ過によって精製した。最後に、260 nm における UV 吸収を測定し、定量を行った。その際、S1, S2, primer-binding sequence RNA, poly (A-U) RNA pool, RNA pool 2, 3 および 4 の定量は、2-2-2 と同様である。

サーマルサイクラーを用いて、全ての RNA 試料を、95 °C 5 分間で変性させ、4 °C まで急冷させた。その後、1×NMR 緩衝液 [20 mM sodium phosphate (pH 6.5) , 300 mM potassium chloride, 2 mM magnesium chloride, 5 wt% D₂O] に溶解した。全ての RNA 試料の最終濃度は 0.1 mM とした。NMR 測定後、RNA 試料を NMR チューブ (Shigemi 社製) から回収し、精製済みの RD と混合した。続いて、分画分子量 3000-5000 の限外濾過膜 Vivaspin (Sartorius AG 社製) を用いて、1 mM 重水素化 DTT を加えた 1×NMR 緩衝液に溶解した。その際の最終試料濃度は 0.05 mM とした。

3-2-2 NMR 測定

NMR スペクトルは Bruker AVANCE 600 分光器 (Bruker Biospin 社製) を用いて測定し (Table 3-2) , 解析処理は TOPSPIN3.5 (Bruker Biospin 社製) を使用した。1D イミノプロトンスペクトルの測定において水のシグナルを消すために、jump and return pulse を使用した[78]。測定時のプローブ温度は 298 K とした。

3-2-3 SPR 測定

2-2-4 と同様の測定条件で実施した。sensor chip 上には、第 2 章の SELEX 実験における各 Round の RNA pool を固定化し、10 nM RD を injection した。

3-2-4 High-throughput sequencing 解析

HTS 解析には、Ion PGM シーケンサー (Life Technologies 社製) を用いた。SELEX 実験の各 Round からの DNA pool を Life Technologies 社推奨の barcode 付きプライマーと Ex Taq polymerase (TaKaRa 社製) を用いた PCR によって調製した。最終濃度 $1 \times$ Ex Taq Biffer, 0.2 mM dNTPs (each) (TaKaRa 社製), $2 \mu\text{M}$ barcode 付きプライマー, $0.08 \text{ U}/\mu\text{L}$ TaKaRa Ex Taq (TaKaRa 社製) および $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ DNA pool の反応液 $250 \mu\text{L}$ を調製し、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 分, ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 秒, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 秒, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 秒) $\times 4-10$ サイクルで PCR を行った。PCR の操作は、2-2-2 で示した SELEX 実験の際の操作と同様である。続いて、Exonuclease I (New England BioLabs 社製) $5 \mu\text{L}$ を加えて、 37°C で 1 時間保温した。Exonuclease I 処理後、PCR 産物をフェノールクロロホルム処理、およびエタノール沈殿で精製した。精製した PCR 産物は、 260 nm における UV 吸収を測定し、定量した。定量の仕方は、2-2-2 と同様である。

次に、 1.3 amol の各 Round の barcode 付き PCR 産物 (1.1 pM PCR 産物を $1.2 \mu\text{L}$) を混合し、Ion PGM Template OT2 200 kit (Life Technologies 社製) を用いて、clonal emulsion PCR によって増幅した。次いで、Ion OneTouch 2 および Ion OneTouch ES System (Life Technologies 社製) を用いて、Template-positive Ion Sphere particles の生成および濃縮を行った。HTS には、Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 と Ion 314 Chip (Life Technologies

社製) を用いた。得られた HTS データは、Ion PGM Torrent Server にアップロードして、シーケンス品質を評価した。配列クラスタリングには、Aptamer Clustering 2.0 software (Life Technologies) を用いた。単離された配列は、Microsoft Excel を使用して処理した。なお、Ion PGM シーケンサー (Life Technologies 社製) を用いた測定および配列解析に関しては、共同研究者の一人である株式会社リボミックの青木一晃博士に指導のもと行った。

3-3 結果

3-3-1 SELEX 過程における RNA pool の構造多様性の変化

SELEX 過程の NMR モニタリングを評価するために、全く選別していない初期の RNA pool (0R) および RD に対する SELEX 実験における 1 Round から 8 Round (1R-8R) までの RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルを測定した (Fig. 3-2)。その結果、0R RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルに多数のシグナルが観察された。このことは、0R RNA pool 中に構造を形成した RNA が多く含まれていることを示している。また、0 Round から 8 Round の RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトル間に、大きな変化は観察されなかった。しかしながら、10-12 ppm 領域に焦点を当てたとき、いくつかのシグナルが変化していた。これらの 10-12 ppm 領域のシグナルは、RNA pool 中の non-Watson-Crick 塩基対を形成する RNA の存在を示している。一度の選別工程を経た 1R RNA pool では、0R RNA pool のスペクトルに観測されていた 10-12 ppm 領域のシグナル a1 および a2 が消失していた。一方、5R RNA pool では、シグナル a3, a4 および a5 が新しく出現した。さらに、5-8R RNA pool において、シグナル a3, a4 および a5 の強度は減少し、新しいシグナル a6 および a7 の強度は増加した。

次に、コントロール実験として、SELEX 実験の選択工程を除いた操作を 8 Round 行い、各 RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルを測定した (Fig. 3-3) . これらのイミノプロトンスペクトルは、全 8R 通してほとんど変化を示されなかった. したがって、イミノプロトンスペクトルの変化は SELEX 実験の選択工程によって引き起こされたものであると判断できる.

次に、RD に対する SELEX 実験の各 Round の RNA pool に RD を加え、限外ろ過膜を用いて濃縮した. しかしながら、RD を加えた 0R RNA pool は、RD が凝集してしまい、濃縮することができなかった. そのため、0R を除いた、RD 存在下の 1-8R RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルを測定し (Fig. 3-4) , RD 非存在下のスペクトルと比較した (Fig. 3-5) . 次いで、RD 非存在下においてシグナルの変化が確認できた 10-12 ppm 領域を拡大して比較した (Fig. 3-6) . まず、1-3R RNA pool のスペクトルの比較では、RD の有無によるスペクトルの変化は確認できなかった. 一方、4R RNA pool のスペクトルでは、RD の添加時に 10.5-12 ppm 領域でシグナル b1 および b2 が新しく観察された (Fig. 3-5 および 3-6) . さらに、5-8R RNA pool のスペクトルでは、これらのシグナルは RD の添加によって劇的に変化した.

3-3-2 SELEX 過程の各 RNA pool と RD との結合親和性の評価

SPR 法を用いて、RD に対する SELEX 実験の各 Round の RNA pool と RD の結合親和性を調べたところ、0-3R RNA pool は RD に対する結合親和性を示さなかった. 一方、4R RNA pool はわずかな結合親和性を示し、5-8R RNA pool は顕著な結合親和性を示した (Fig. 3-7) . この結果は、RD 存在下で 10-12 ppm 領域のイミノプロトンシグナルが 4R において現れ、5-8R の間で顕著に変化した NMR のデータと一致していた (Fig. 3-5 および 3-6) .

3-3-3 SELEX 過程における RNA pool 中の配列組成の変化

RD に対する SELEX 実験の 0-8R RNA pool について、HTS 解析を行った。読み取られた全クローンを、barcode 配列によって選別し、プライマー結合配列に基づいて解析したところ、各 Round の RNA pool から読み取られた総クローン数は、0R ; 36,504, 1R ; 11,543, 2R ; 33,699, 3R ; 16,711, 4R ; 25,869, 5R ; 40,904, 6R ; 18,489, 7R ; 49,037 および 8R ; 6,820 であった (Fig. 3-8)。

次に、第 2 章の capillary sequencing 法を用いた 8R RNA pool の配列解析の結果 (Fig. 2-11) と 8R RNA pool の HTS 解析の結果を比較した。capillary sequencing 法による解析では、36 クローンの配列のうち、S1 ; 27.8 % , S2 ; 22.2 % および S3 ; 16.7 % の割合であった。一方、HTS 解析では、6,820 クローンの配列のうち、S1 ; 26.7 % , S2 ; 18.2 % および S3 ; 7.2 % の割合となった。したがって、capillary sequencing 法による解析結果と HTS 解析は類似していることが明らかとなった。

さらに、HTS 解析データを用いて、0-8R RNA pool における S1, S2 および S3 の割合の変化を調べた。0-2R RNA pool では、S1, S2, および S3 は全く検出されず、3R RNA pool において、たった一つの S2 の配列が検出された。このことから、0-3R RNA pool 中に存在する総配列数は 0-3R RNA pool から読み取られた総配列数よりも多いことが明らかとなった。さらに、4R では S2 の割合がわずかに増加した (4.7 %)。5R においては、S2 の割合が著しく増加し (57.2 %) , S1 と S3 の割合は非常に低かった (1%未満)。6R から 7R にかけて S2 の割合は減少したが、S1 および S3 の割合は増加した。最終的に、8R では S1 の割合は S2 の割合よりも増加した。この結果は、RD 非存在下において、10-12 ppm のイミノプロトンシグナルが 5R で出現し、6R から 8R まで徐々に変化する NMR データと一致していた。

3-3-4 SELEX 過程の RNA pool と単離した aptamer の NMR スペクトルの相関性

HTS 解析によって、S1 と S2 の配列が 5-8R RNA pool 内に高い割合で存在することが判明したため、単離した S1 と S2 を NMR 試料用に調製し、RD 非存在下および存在下において 1D イミノプロトンスペクトルを測定した。まず、RD 非存在下と比べて、RD 存在下では、S1 および S2 の両方のスペクトルにおいてシグナルの広幅化が観察された (Fig. 3-9)。次に、RD 非存在下および存在下において、S1、S2 および 5-8R RNA pool のスペクトルを比較した (Fig. 3-10)。その結果、RD 非存在下では、S1 のスペクトルで観察されたおよそ 10.3, 11.1 および 12.1 ppm のシグナルが、8R RNA pool のスペクトルにおいても観測された。しかしながら、S1 の割合が低い 5-7R RNA pool のスペクトルでは、これらのシグナルは明確に同定できなかった。また、S2 のスペクトルで観察されたおよそ 10.5 ppm, 10.9 ppm, 11.2 ppm および 12.0 ppm のシグナルは、5-7R のスペクトルにおいても観察された。RD 存在下では、S1 のスペクトルで観察されたおよそ 11.7 ppm および 12.1 ppm のシグナルが、8R RNA pool において観察された。また、S2 のスペクトルで観察されたおよそ 10.8 ppm および 12.0 ppm のシグナルは、5-7R のスペクトルにおいても観察された。さらに、S1 および S2 の両方のスペクトルで観察されたおよそ 10.5 ppm および 12.0 ppm のシグナルは、5-7R のスペクトルにおいて観察された。このように、RNA pool の NMR スペクトルは RNA pool 中の RNA aptamer の割合を反映していることが示唆された。

3-3-5 RNA pool の構造的多様性に及ぼすプライマー結合配列の影響

0R RNA pool の NMR スペクトルに観測された多くのシグナルが、プライマー結合配列の影響を受けるかどうかについて調べた。はじめに、vs_subopt を用いて 0R RNA pool の二次構造を予測した。その結果、1つのバルジ A 残基を含む短いステム構造が

予測され、プライマー結合配列を含んだ安定なステム構造は予測されなかった (Fig. 3-11a) . 次に、40 塩基のランダム配列を持たないプライマー結合配列のみの RNA (primer-binding sequence RNA) を調製し (Fig. 3-11b) , 1D イミノプロトンスペクトルを測定した (Fig. 3-12) . primer-binding sequence RNA の 1D イミノプロトンスペクトルは、0R RNA pool のスペクトルととても類似していたが、いくつかのシグナルは 0R RNA pool のシグナルより強度が弱かった. この 2 つのスペクトルの差異は、0R RNA pool とプライマー結合配列を直接繋げた primer-binding sequence RNA の間に生じたプライマー結合配列領域の構造的差異が原因と考えられる. しかしながら、この 2 つのスペクトルの類似性は、0R RNA pool の NMR スペクトルがプライマー結合配列に由来することを示唆している.

次に、A または U に富んだプライマー結合配列と隣接した 40 塩基のランダム配列を含む poly (A-U) RNA pool を調製し (Fig. 3-11c) , 1D イミノプロトンスペクトルを測定した (Fig. 3-12) . その結果、A-U 塩基対に典型的な 13.5 ppm 付近のシグナルは大きく観察されたが、他のシグナルはほとんど観測されなかった.

さらに、3 つの異なるプライマー結合配列をもつ 0R RNA pool (RNA pool 2, 3 および 4) を調製し (Fig. 3-13) , 1D イミノプロトンスペクトルを測定した (Fig. 3-14) . その結果、これらのスペクトルは著しく異なっていた. したがって、ランダム RNA pool のスペクトルはプライマー結合配列に著しく依存することが判明した.

3-4 考察

S1 および S2 の NMR スペクトルにおいて、10-15 ppm の領域にイミノプロトンシグナルが観測されたことから、S1 および S2 が Watson-Crick および non-Watson-Crick 塩基対の両方を形成していることがわかる. 二次構造予測の結果、S1 および S2 はス

テム構造とループ構造を形成していた (Fig. 2-3) . 以上の二点から, S1 および S2 のループ領域は non-Watson-Crick 塩基対を含む特徴的な立体構造を形成していると考えられる. これらの特徴的な立体構造が, RNA aptamer と RD との結合にとって重要である可能性がある.

OR RNA pool の二次構造予測の結果から, プライマー結合配列自体は安定な構造を形成していないことを示されたが (Fig. 3-11) , OR RNA pool のスペクトルには複数のイミノプロトンシグナルを観測された (Fig. 3-12) . さらに, OR RNA pool とプライマー結合配列を直接繋げた primer-binding sequence RNA のイミノプロトンスペクトルはとても類似していることから, OR RNA pool の NMR スペクトルがプライマー結合配列に由来していることが示唆された. 一方で, プライマー結合配列同士で poly (A-U) のステム構造を形成するように設計された poly (A-U) RNA pool では, A-U 塩基対由来以外のシグナル, すなわち 40 塩基長のランダム配列からのシグナルはほとんど観測されなかった. このことは, poly (A-U) RNA pool 内の 40 塩基長のランダム配列はプライマー結合配列の影響をほとんど受けておらず, 高い構造的多様性を保持することを示唆している. しかしながら, SELEX 実験での poly (A-U) RNA pool の使用は, 逆転写, PCR や転写の増幅工程の効率が非常に低いため, 実用的ではない. さらに, それぞれ異なるプライマー結合配列をもつ RNA pool 2, 3 および 4 のスペクトルは, OR RNA pool およびそれらの間で著しく異なっていた (Fig. 3-13 および 3-14) . 以上の結果から, プライマー結合配列の配列は, 初期の RNA pool における構造的多様性に影響することが示唆された. SELEX 実験を成功させるためには, 初期の RNA pool の構造的多様性を保つことはとても重要である. したがって, NMR を用いた RNA pool の構造的多様性に対するプライマー結合配列の影響についてのさらなる研究は, SELEX 実験の成功効率の促進に繋がることが期待される. すでに, プライマー結合配列を持たないランダム配列から成る DNA あるいは RNA ライブラリーを使用した SELEX (Tailored-SELEX) 実験が報告されている [79, 80]. この方法を用い

ば、プライマー結合配列の構造的多様性に対する影響を取り除くことができる。しかしながら、プライマー結合配列を、選別工程後に pool に連結する必要があり、通常の SELEX 実験に比べて余計に手間が掛かってしまう。

RD 非存在下の 0R RNA pool のスペクトルでは、10-12 ppm 領域にイミノプロトンシグナルが観測されたが、これらのシグナルは 1R RNA pool のスペクトルにおいて消失した (Fig. 3-2) 。この NMR スペクトルの変化は、一度の選別において、0R RNA pool 中に存在した non-Watson-Crick 塩基対を形成する RNA 分子が減少したことを示す。しかしながら、なぜ、そのような RNA 分子が減少したかについては不明であり、本研究のデータだけでは解明は難しい。また、新しいイミノプロトンシグナルは、5R RNA pool のスペクトルの 10-12 ppm 領域に現れ、6R から 8R にかけて変化した。さらに、RD 存在下では、4R RNA pool のスペクトルの 10.5-12 ppm 領域にイミノプロトンシグナルが現れた。そして、これらのシグナルは、5R から 8R にかけて大きく変化した (Fig. 3-4, 3-5 および 3-6) 。並行して行った SPR 法を用いた RNA pool の結合親和性の評価および RNA pool の HTS 解析においても、4R あるいは 5R において、結合親和性の上昇および配列の濃縮が観測されており (Fig. 3-7 および 3-8) , NMR の結果と一致していた。さらに、5-8R RNA pool のスペクトルの 10-12 ppm 領域のシグナルと、5-8R で高度に濃縮されていた S1 および S2 のスペクトルの 10-12 ppm 領域のシグナルを比較した。その結果、S1 が最も濃縮されていた 8R では S1 のシグナルと同じ位置に、S2 が最も濃縮されていた 5-7R では S2 のシグナルと同じ位置に、シグナルが観測された。すなわち、RNA pool の NMR スペクトルは RNA aptamer の濃縮の程度を反映していることが判明した。以上の結果を考慮すると、NMR は SELEX 過程の RNA pool 中の RNA aptamer の濃縮をモニタリングすることに適していると考えられる。

本研究の HTS 解析では、各 Round の RNA pool から読み取られた総クローン数に大きな違いがあった。この原因として、各 HTS 配列解析用試料の定量の不正確さが考えられる。本実験では、barcode 配列を付加するための PCR の後、Exnuclease I 処理によってプライマーを除去し、フェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿によって精製した。その際の PCR 副産物や残存プライマーなどの不純物がその後の UV 吸収による定量に悪影響を与えたと考えられる。したがって、定量を正確に行うためには、PCR 産物を PAGE 精製し、不純物の少ない試料を調製することが有効であると考えられる。また、Ion PGM シーケンサーを用いた HTS 解析では、解析用試料は emulsion PCR によって beads 上に固相化され、固相化された配列のみが解読される。したがって、定量方法においても、UV 吸収によって全 DNA 濃度を定量するのではなく、配列解析用プライマーを用いた Real-time PCR（定量 PCR）によって PCR がかかる DNA 配列の濃度を算出し、その濃度に基づいて、解析用試料を調製することで、より定量的な HTS 解析の結果が得られると考えられる。

S2 は S1 よりも高い結合親和性を示すにもかかわらず (Table 2-12) , 各 Round の RNA pool における S2 の割合は 5R から 8R へと徐々に減少した。一方で、S1 の割合は徐々に増加し、ついに 8R で S2 の割合を上回った (Fig. 3-8) 。この RNA pool 中の配列組成の変化の原因として、RNA pool の初期配列の偏りを考えたが、0R RNA pool から読み取られた総クローン数 36,504 において、偏りを確認できなかった。また、PCR では、fidelity の非常に高い KOD DNA polymerase を使用した。KOD DNA polymerase を用いた PCR 中に変異が入る割合は 0.016 % と非常に低く [81]、用いた DNA ライブラリーも 90 塩基と短い。さらに、SELEX 実験中の PCR は副産物を極力抑えるため、10-15 の少ないで PCR サイクルで行っている (Table 2-6) 。したがって、PCR 中の変異導入の可能性は低いと考えられる。もう一つの考えうる可能性として、転写、逆転写または PCR の増幅効率の配列による違いが挙げられる [71]。SELEX 実

験における増幅工程において、S1 の配列の方が S2 の配列と比べて、増幅に適していたことが考えられる。

SELEX 実験では、標的分子への結合親和性に基づいて RNA pool を選別するため、SPR 法などを用いて RNA pool と標的分子の結合を直接評価する方法は、NMR を用いる方法よりも明確であり、高親和性の aptamer を得るためにおいても有効と考えられる。しかしながら、NMR を使用した際においても NMR チューブに標的分子を添加するだけで、RNA pool の標的分子への結合をモニタリングすることが可能である。また、本研究の RD のように単体では濃縮できない標的分子も限外濾過膜を用いて添加することができる。

HTS 解析では、詳細な配列情報を得ることができるため、配列の濃縮をモニタリングすることに関しては NMR よりも有効である。しかしながら、前述したように、SELEX 実験では、増幅工程（逆転写、PCR および転写）の繰り返しによって、増幅されやすい配列が偏って濃縮されることが多々あり、HTS 解析によって得られる配列の濃縮率から標的結合性は必ずしも保証できない。一方、NMR モニタリングでは、aptamer の濃縮率と標的結合性を同時に判別できる。さらに、NMR モニタリングでは、RNA pool に関する構造的情報も得ることができる。多くの aptamer は G-quadruplex 構造を形成している[82-84]。この G-quadruplex 構造をもつ RNA あるいは DNA の NMR スペクトルでは、10-12 ppm で独特なイミノプロトンシグナルが観測されるため、NMR モニタリングは G-quadruplex 構造をもつ aptamer の検出に適している。最後に、NMR モニタリングにおける最も重要な点として、操作の簡便さと速さが挙げられる。SPR 法と HTS 解析では、試料調製に 2-3 日、測定に 1 日かかってしまうが、NMR では、SELEX 実験中に調製した RNA pool を用いるため、余分な試料調製を必要とせず、測定は 1-2 時間以内と短い。さらに、NMR 測定後は NMR チューブから RNA pool を回

収し, 直接次の選別工程に使用することができるため, 非常に簡便かつ迅速な SELEX 過程のモニタリングを可能とする.

Table 3-1 第3章で用いた合成 DNA

Sample	Sequence (5' to 3')
Template DNA for primer-binding sequence RNA	CTCTCATGTCGGCCGTTACGTCCATTGTGTCCCTATAGTGATCGTATTA
DNA library 2	CAAGGAGCGACCAGAGG-40N-TGGCATCCTTCAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
DNA library 3	GGGTGTTAGCTGTTAGTATC-40N-GGTACGATCAGCTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
DNA library 4	AGATGGCACGACTCGG-40N-TGGCATCCTTCAGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Template DNA for poly (A-U) RNA pool	CGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG-40N-ATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Primer 4	TAATACGACTCACTATAGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAT
Primer 5	TAATACGACTCACTATAGGGCTGAAGGATGCCA
Primer 6	TAATACGACTCACTATAGGGCTAGCTGATCGTACC

Table 3-2 NMR の測定パラメータ

Temperature (K)	298
pulse program	zg0jr.g
TD (point)	32768
NS	1024
DS	8
SW (ppm)	23.9411
SF (MHz)	600.13
O1 (Hz)	2798.49
d1 (s)	1
d9 (μ s)	50
p0 (μ s)	10
p1 (μ s)	9.9
RG	256
SI (point)	32768
WDW	EM
LB (Hz)	10
BC_mod	quad

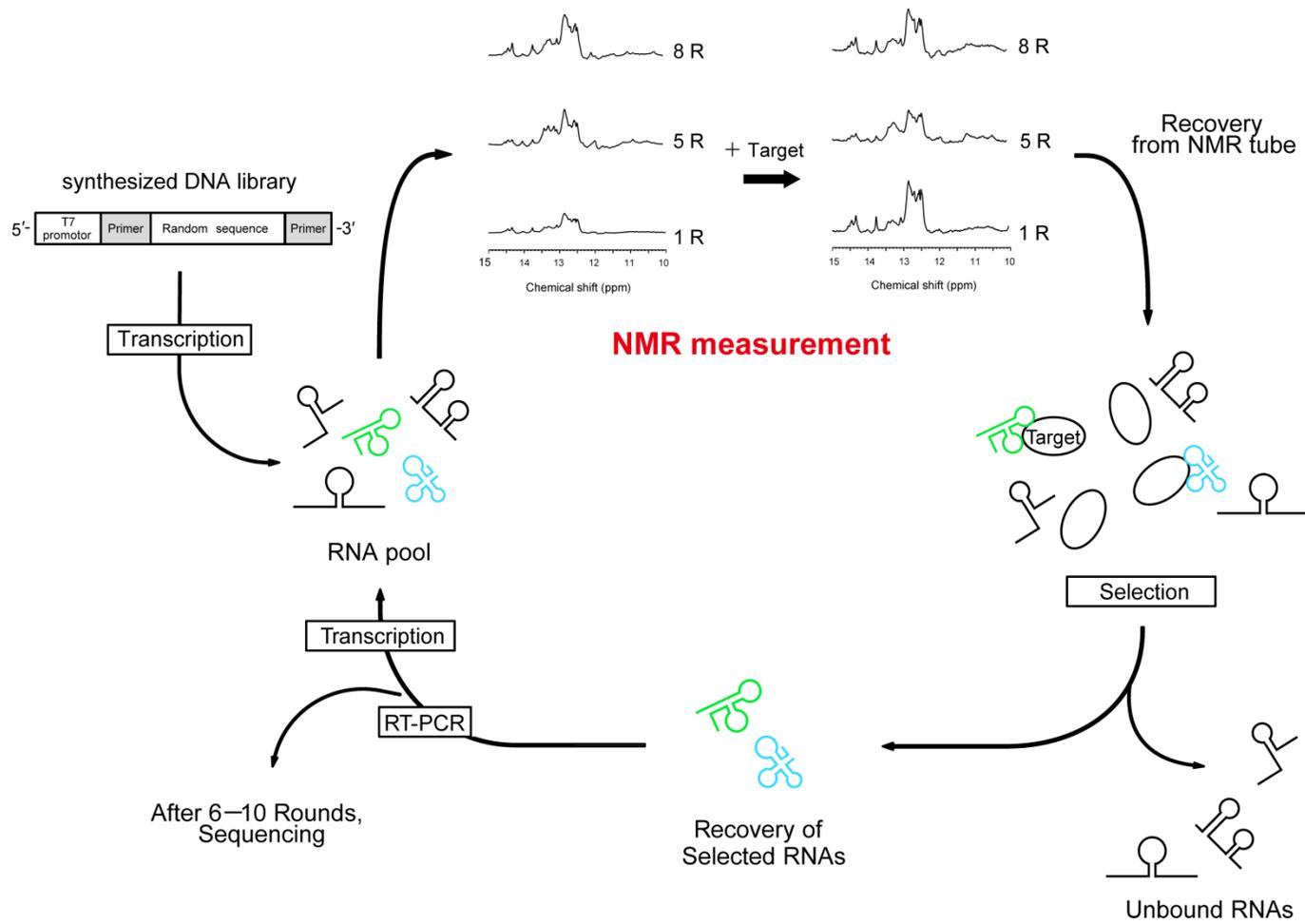


Fig. 3-1 SELEX 過程の NMR モニタリングの概略図

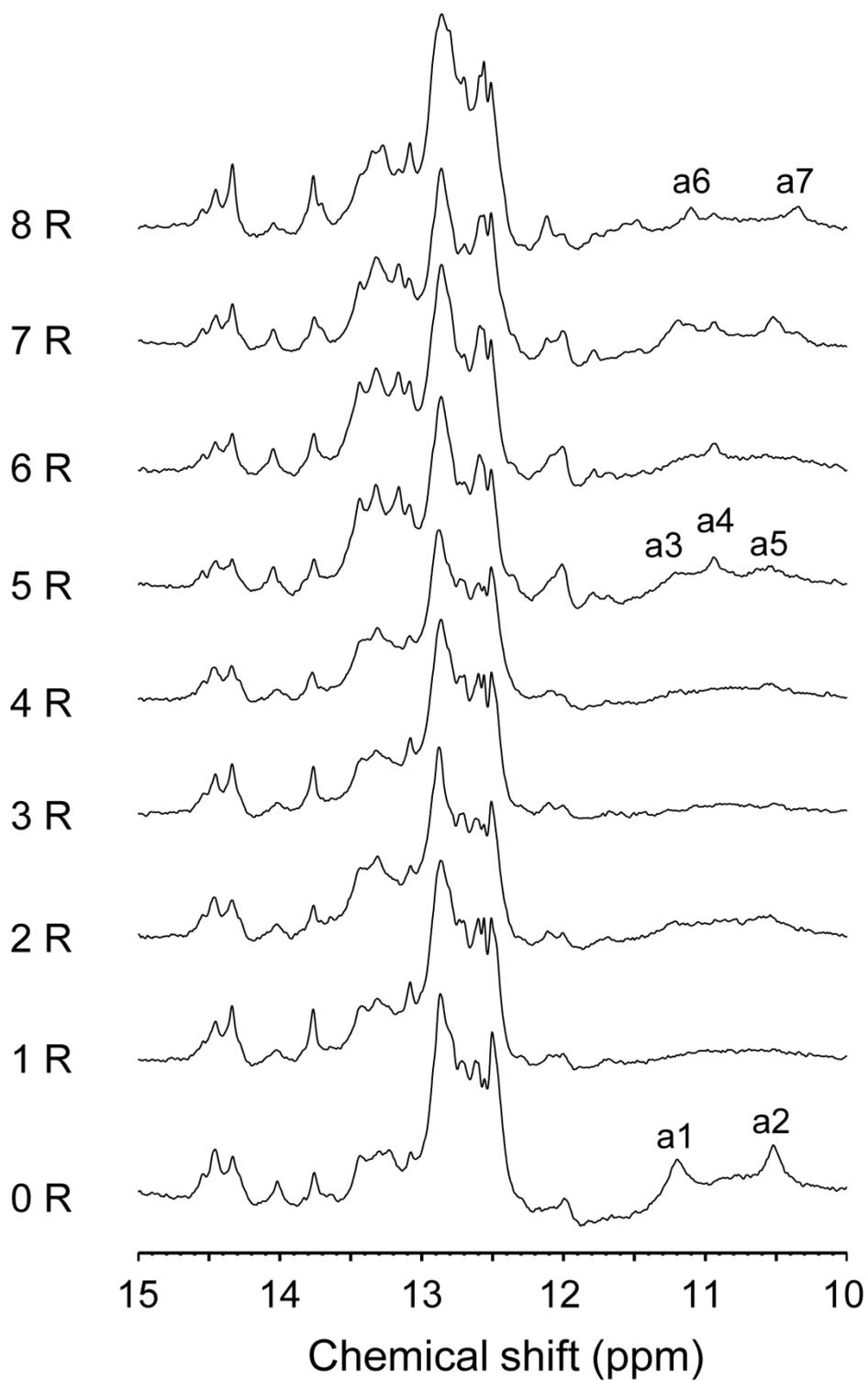


Fig. 3-2 RD 非存在下における各 Round の RNA pool の 1D イミノプロト
ンスペクトルの比較

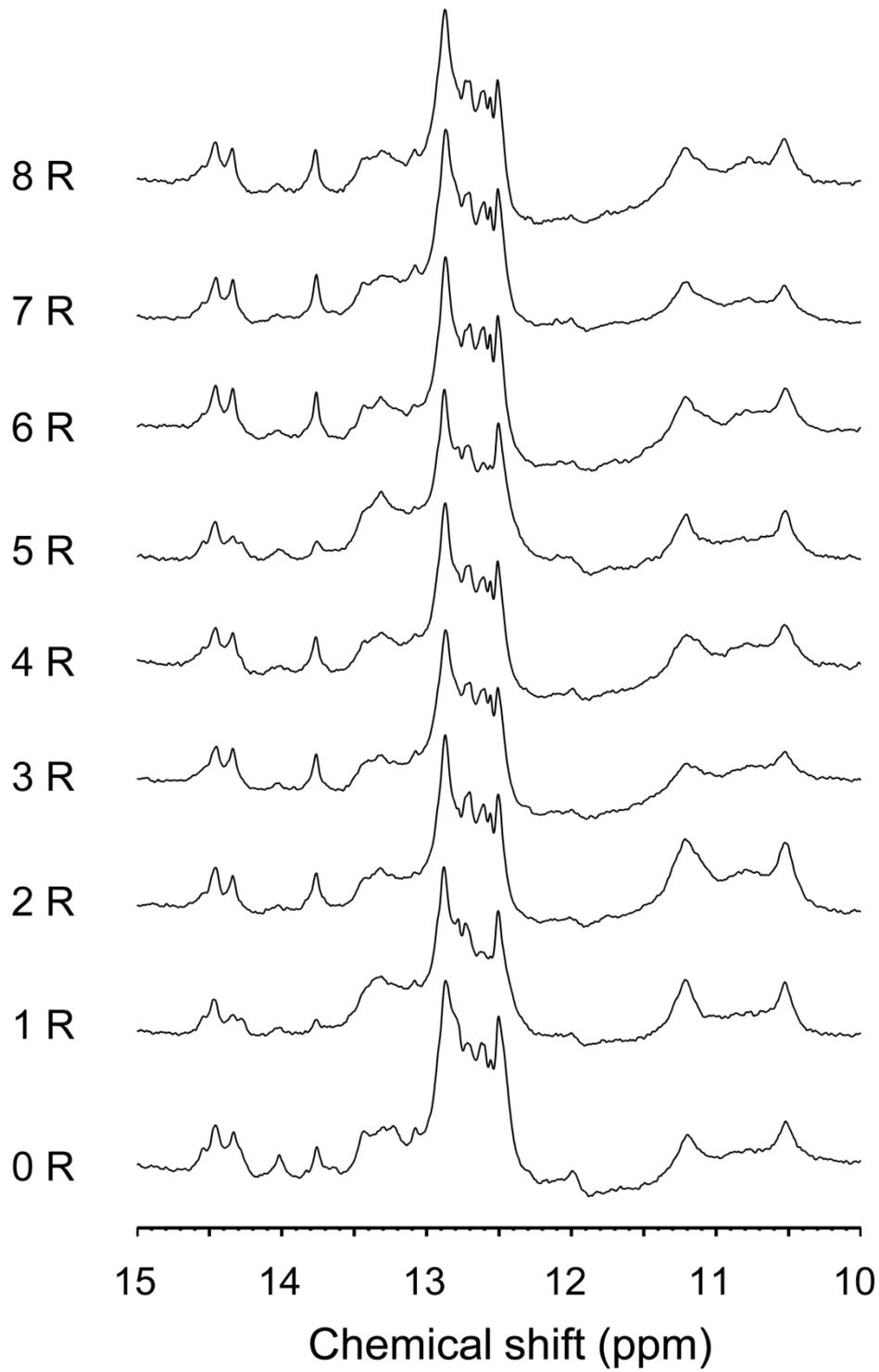


Fig. 3-3 コントロール実験における各 Round の RNA pool の 1D イミノプロトンスpekトルの比較

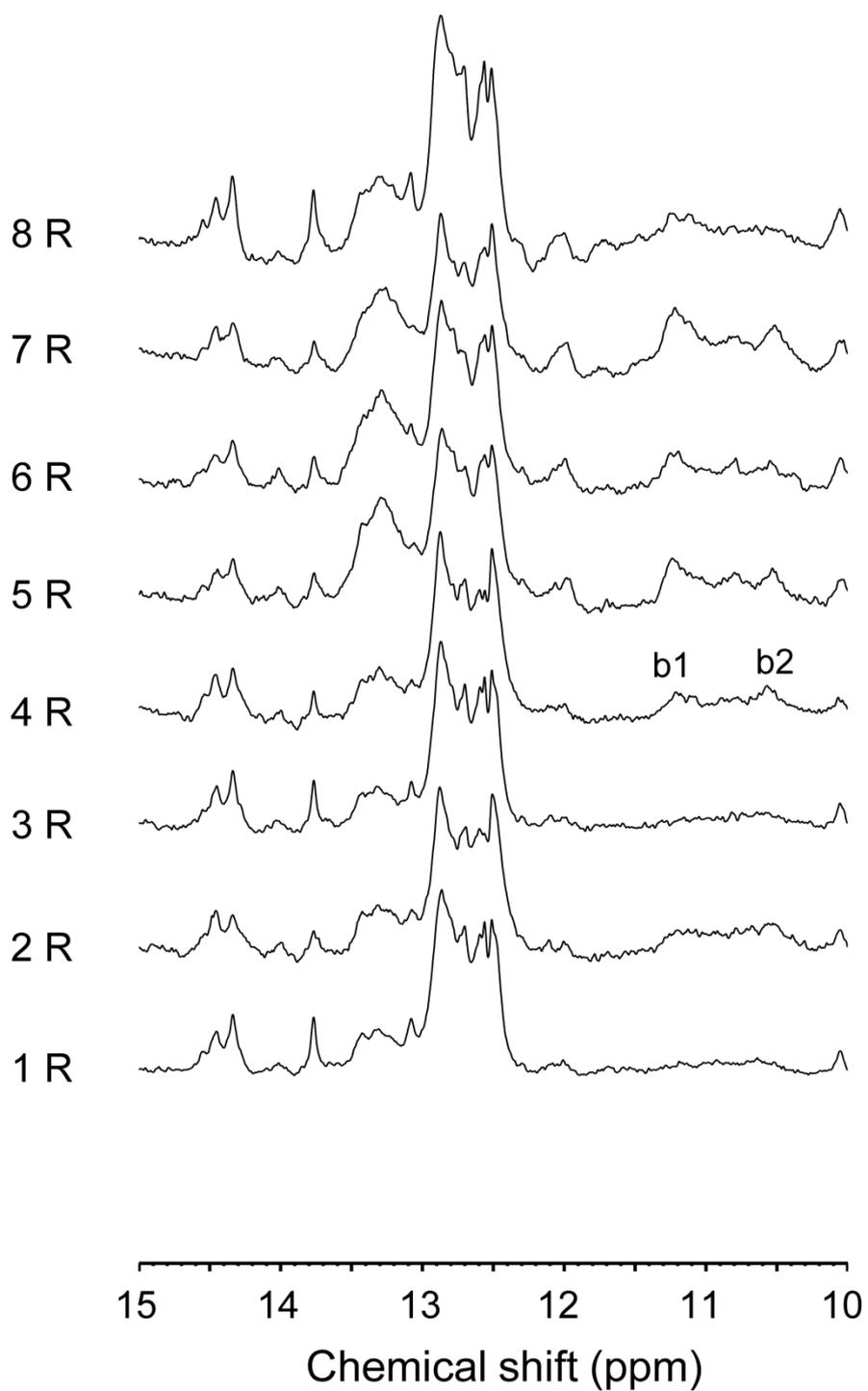


Fig. 3-4 RD 存在下における各 Round の RNA pool の 1D イミノプロトン
スペクトルの比較

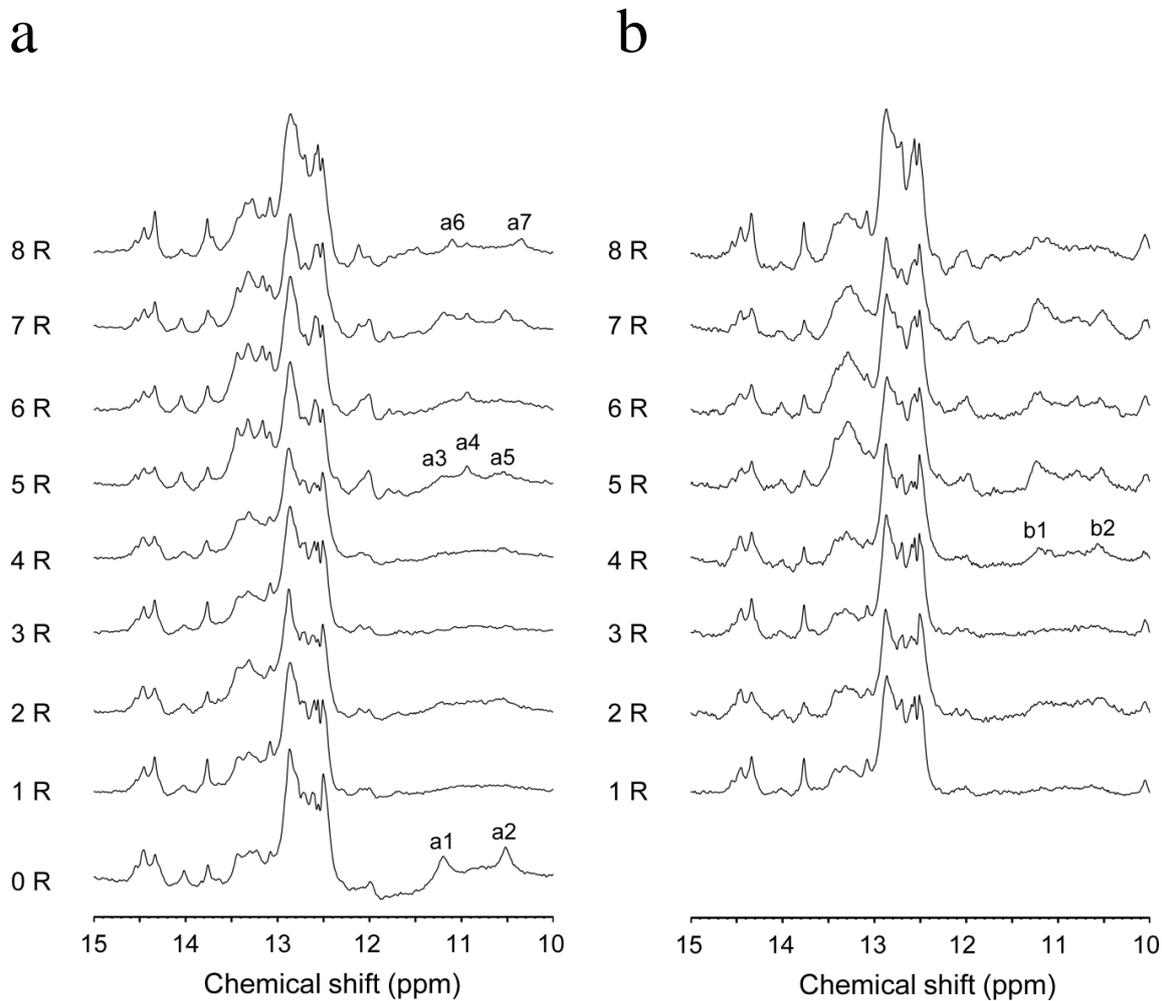


Fig. 3-5 RD 非存在下および存在下における各 Round の RNA pool の 1D

イミノプロトンスペクトルの比較

(a) RD 非存在下, (b) RD 存在下.

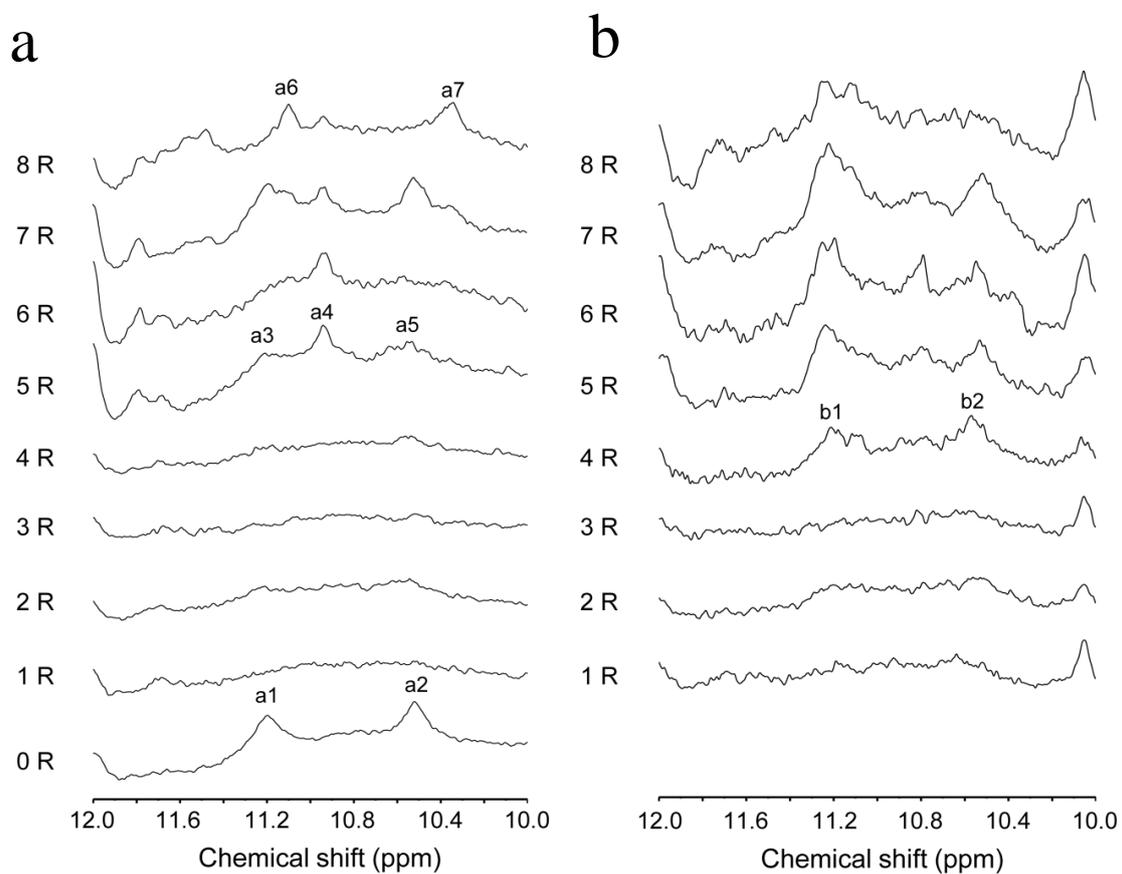


Fig. 3-6 RD 非存在下および存在下における各 Round の RNA pool の 1D

イミノプロトンスペクトル (10-12 ppm) の比較

(a) RD 非存在下, (b) RD 存在下.

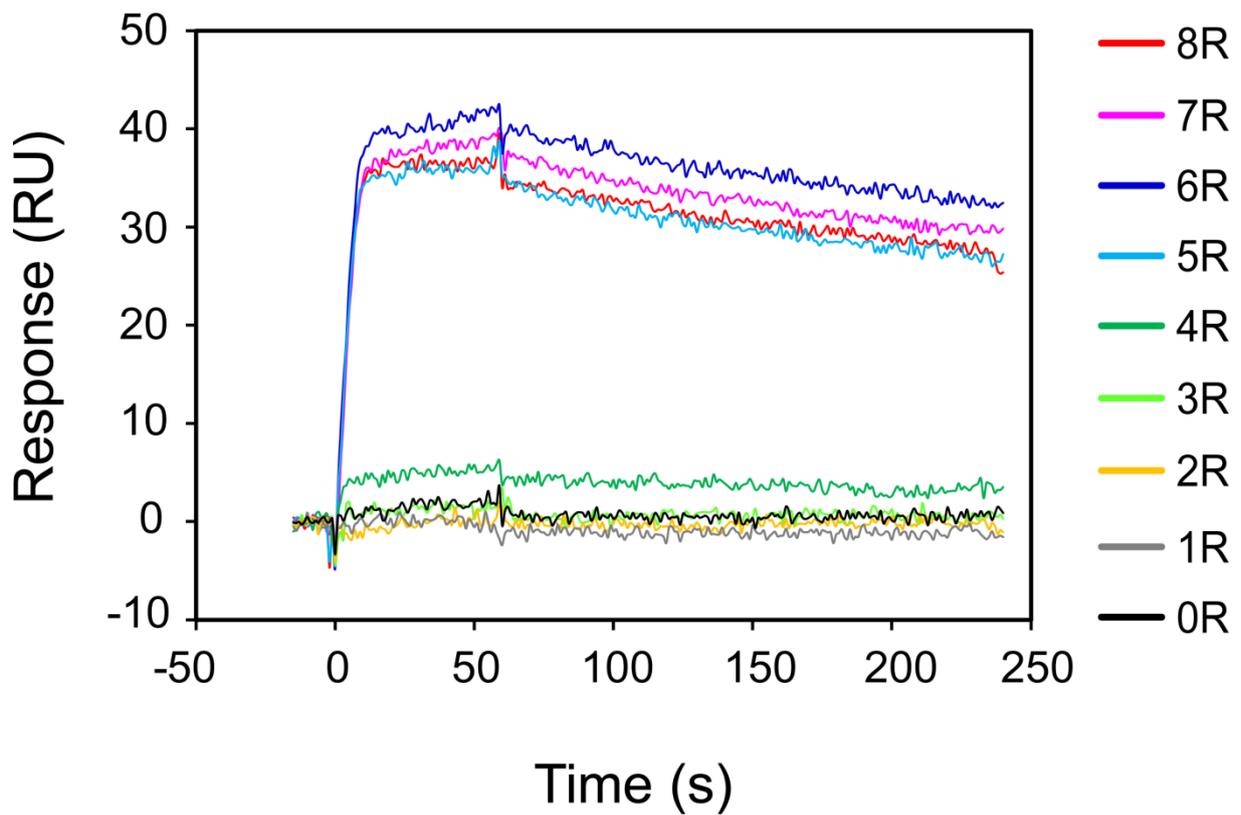


Fig. 3-7 各 Round の RNA pool の RD に対する結合親和性の比較

10nMRD を使用. 赤 : 8R, ピンク : 7R, 青 : 6R, シアン : 5R, 緑 : 4R, 黄緑 : 3R, 黄 : 2R, 灰 : 1R, 黒 : 0R.

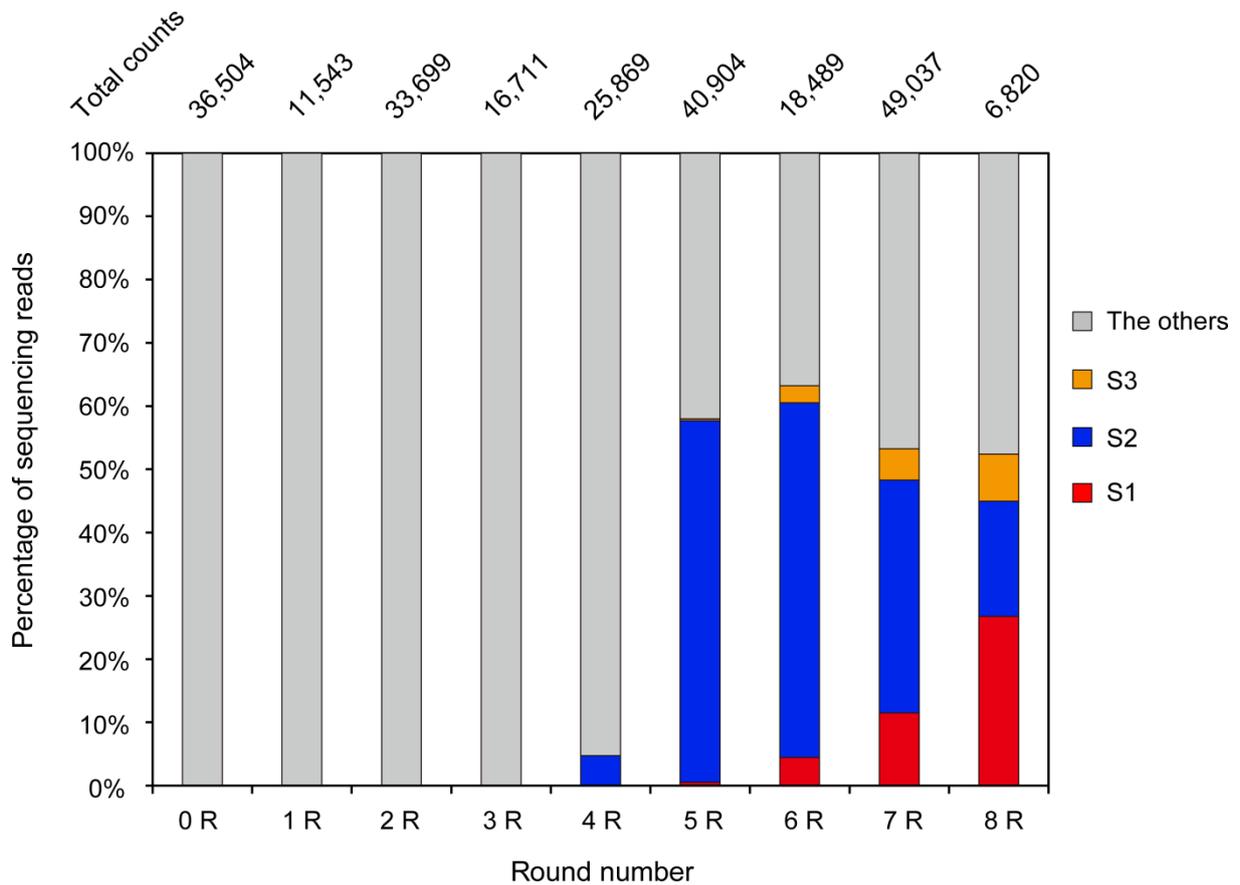


Fig. 3-8 各 Round の RNA pool における S1, S2 および S3 の存在割合

Total counts は各 RNA pool における HTS 解析で読み取られた総配列数を示す. 赤 : S1 配列, 青 : S2 配列, 黄 : S3 配列, 灰 : その他の配列.

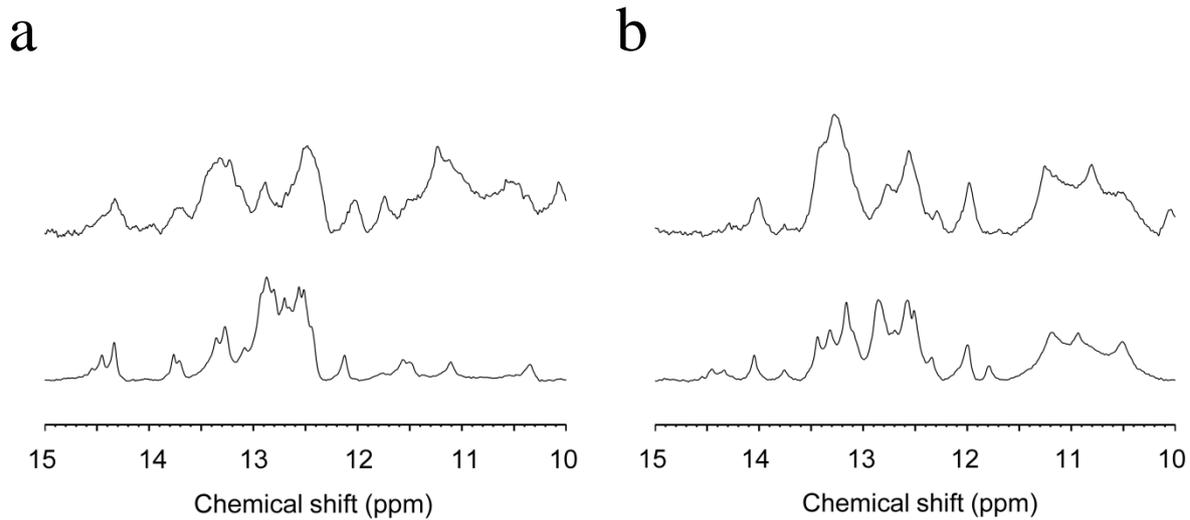


Fig. 3-9 RD 非存在下および存在下における S1 および S2 の 1D イミノプロトンスペクトルの比較

(a) S1, (b) S2 の 1D イミノプロトンスペクトル.

上 : RD 存在下, 下 : RD 非存在下.

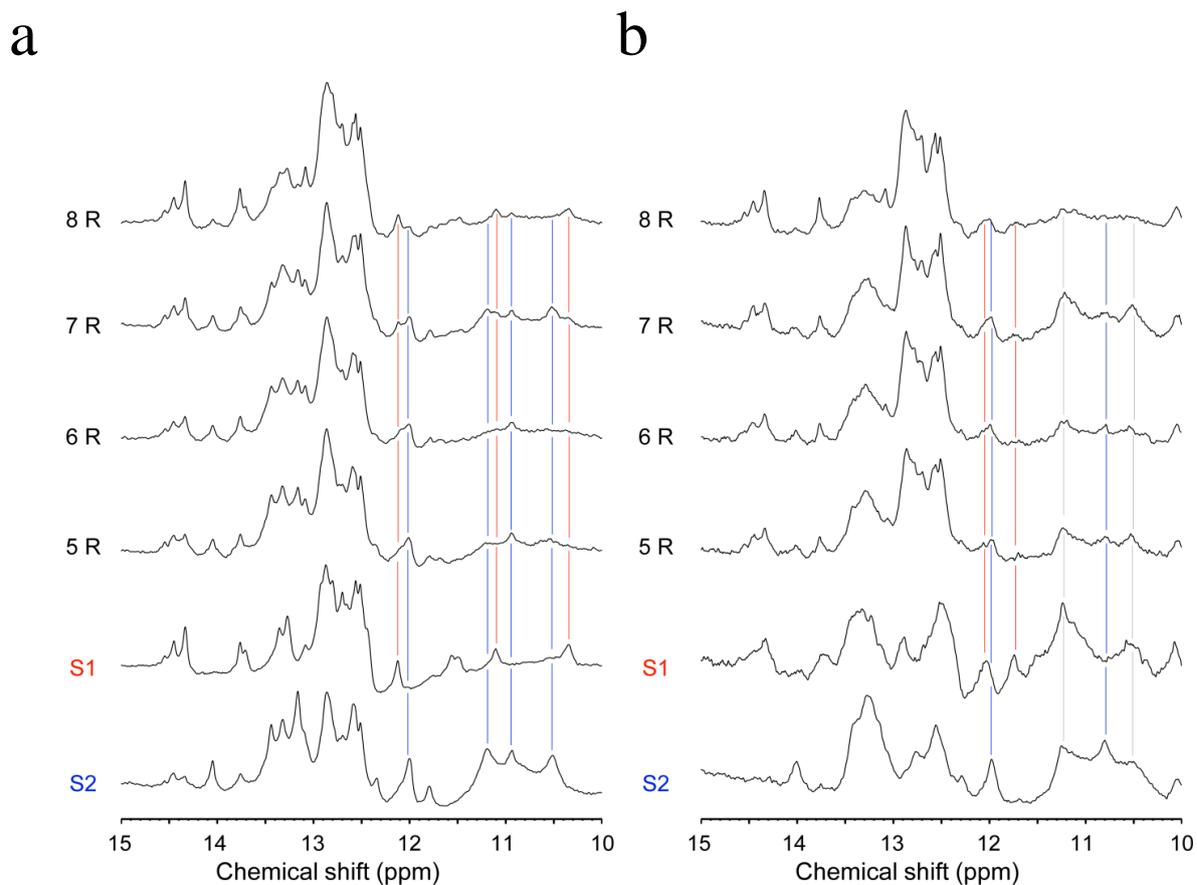


Fig. 3-10 RD 非存在下および存在下における S1 および S2 と 5-8R RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルの比較

(a) RD 非存在下, (b) RD 存在下. 赤 : S1, 青 : S2, 赤線 : S1 のスペクトルで観察されたシグナル, 青線 : S2 のスペクトルで観察されたシグナル, 灰色線 : S1 および S2 の両方のスペクトルで観察されたシグナル.

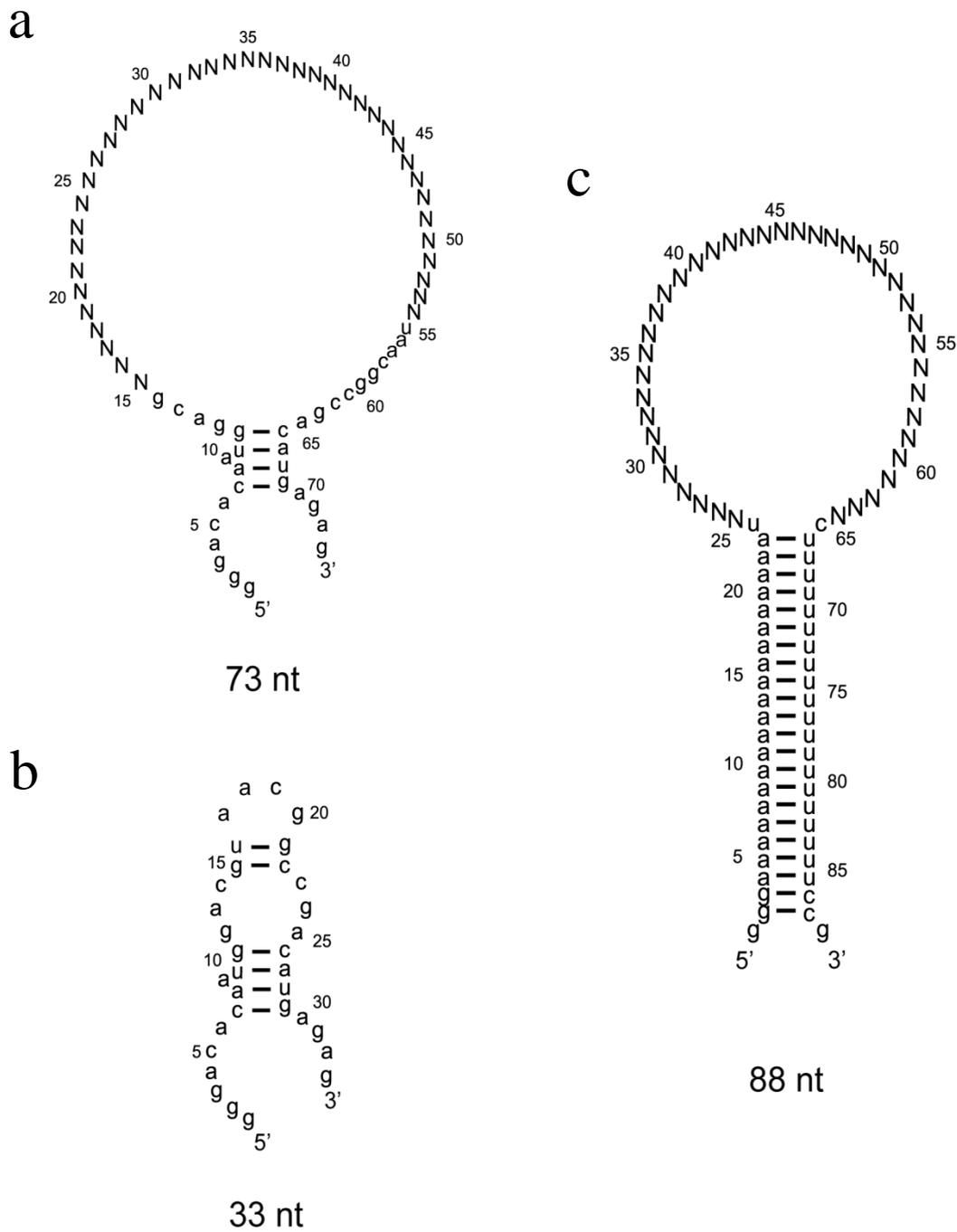


Fig. 3-11 OR RNA pool, primer-binding sequence RNA, poly (A-U) RNA pool の二次構造

(a) OR RNA pool, (b) primer-binding sequence RNA, (c) poly (A-U) RNA pool.

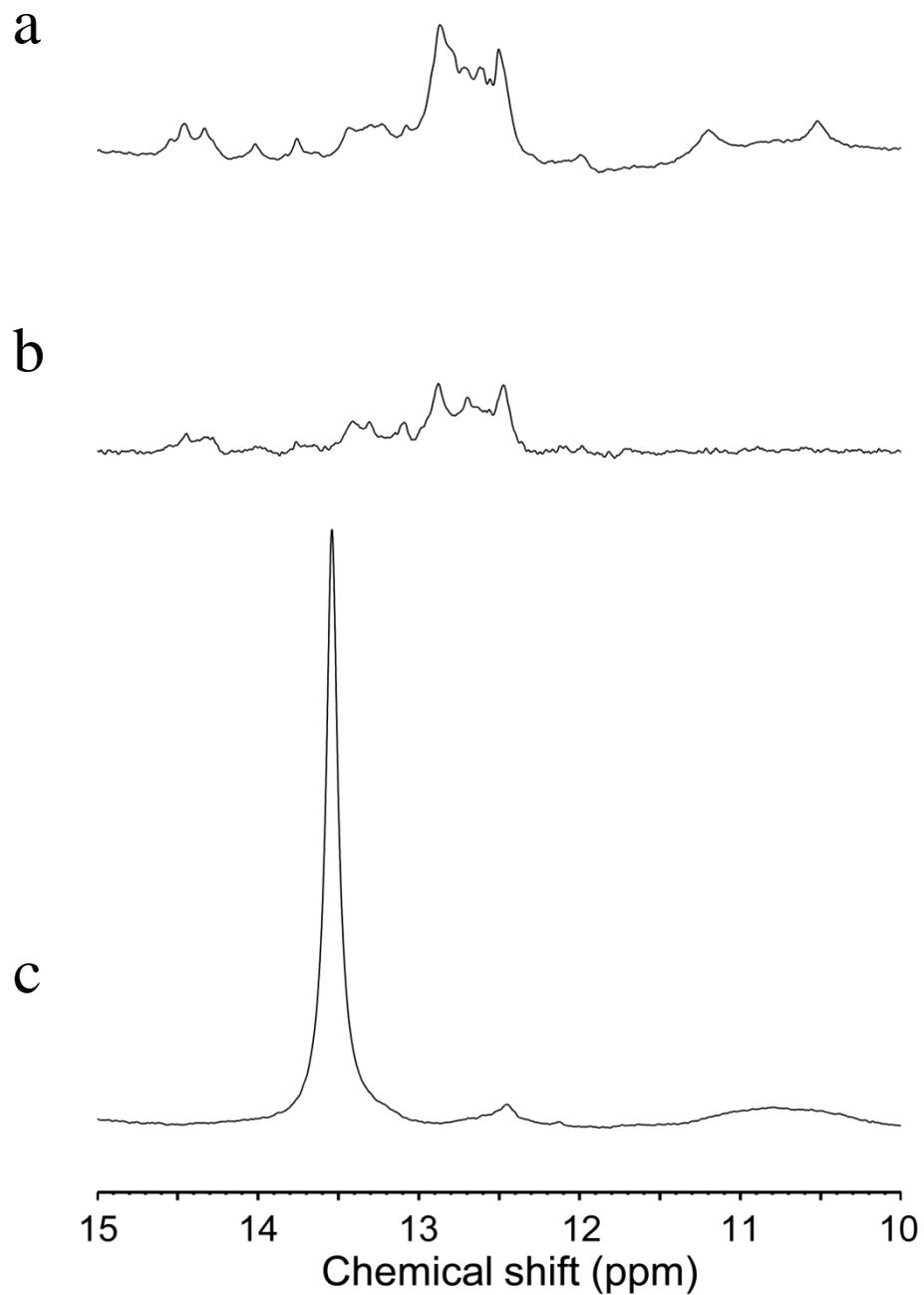


Fig. 3-12 0R RNA pool, primer-binding sequence RNA, poly (A-U) RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルの比較

(a) 0R RNA pool, (b) primer-binding sequence RNA, (c) poly (A-U) RNA pool.

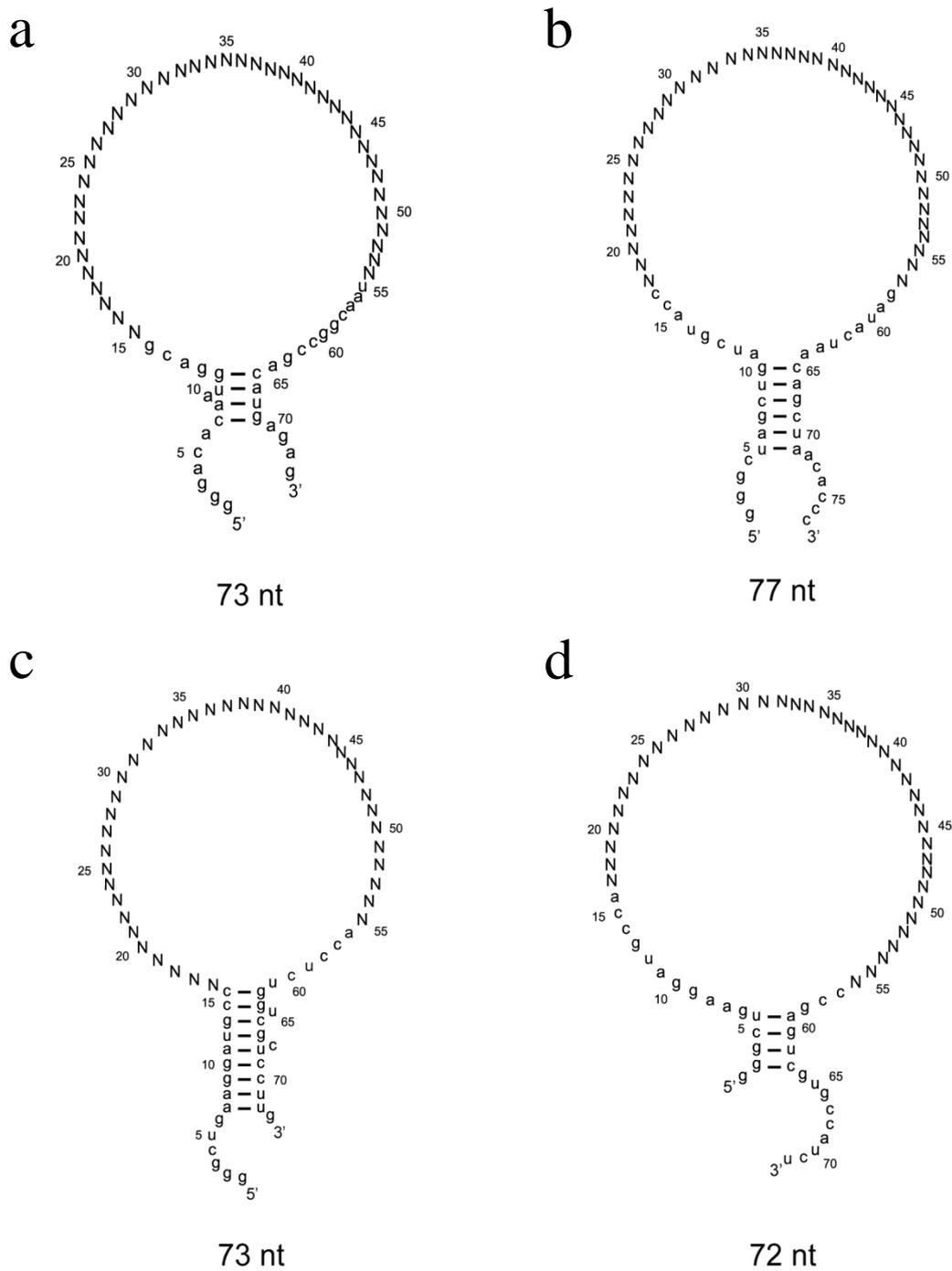


Fig. 3-13 様々な RNA pool の二次構造

(a) 0R RNA pool, (b) RNA pool 2, (c) RNA pool 3, (d) RNA pool 4.

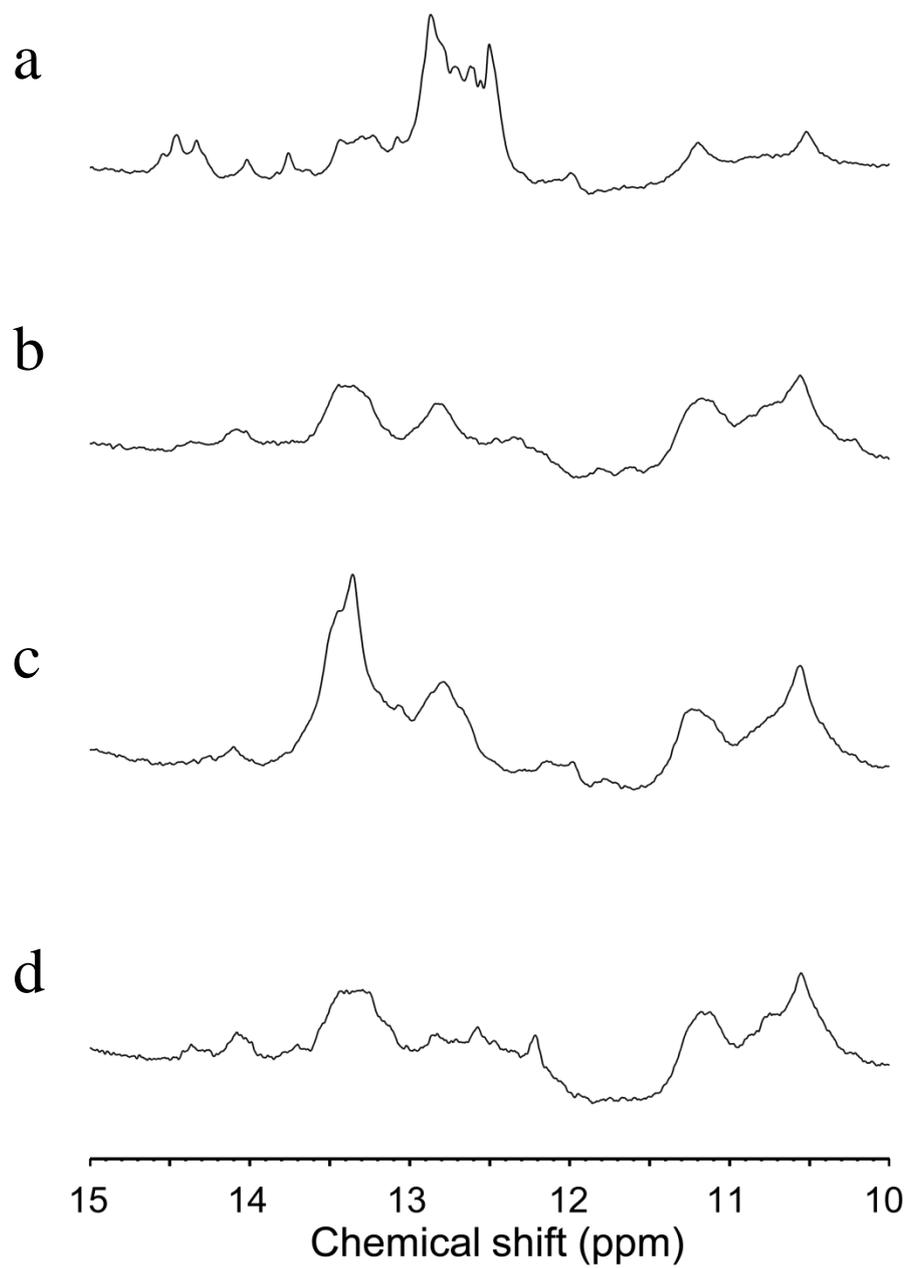


Fig. 3-14 様々な RNA pool の 1D イミノプロトンスペクトルの比較

(a) 0R RNA pool, (b) RNA pool 2, (c) RNA pool 3, (d) RNA pool 4.

第4章 RNA aptamer と RD との相互作用の解析

4-1 はじめに

本章では、第2章で取得した RNA aptamer と RD との相互作用の解析について述べる。序章で述べたように、医薬品候補となる低分子化合物では、物理化学的な相互作用情報や立体構造情報に基づいて合理的に最適化し、標的分子への親和性が向上されている。しかしながら、RNA aptamer では、そのような例は皆無である。その原因として、RNA aptamer と標的タンパク質との相互作用の情報が低分子化合物や抗体に比べて不足していることが考えられる。そこで、RNA aptamer と標的タンパク質との相互作用について生物物理学的に解析し、相互作用情報を得ることおよびそれらの情報を蓄積することは、RNA aptamer の合理的な最適化にとっても重要であると考えた。したがって、本研究では、SPR 法や ITC 法を用いて RNA aptamer と RD との相互作用を解析した。まず、第2章で取得された RNA aptamer の中で最も高い結合親和性を示した S4 を短鎖化し、S4-S を作製した。次に、SPR 法を用いて S4-S と RD の結合における塩濃度の影響について調べた。さらに、ITC 法を用いて、S4-S と RD との相互作用について、熱力学的な側面から解析した。

4-2 方法

4-2-1 試料調製

はじめに、本章で用いる合成 DNA を Table 4-1 に示す。また、これらの合成 DNA はすべて北海道システムサイエンス社で委託合成した。

3' 末端側に A が 16 個付加された S4-S (A16_S4-S) および A が付加されていない S4-S (S4-S) の二本鎖の鋳型 DNA は、それぞれプライマー7 とプライマー8 あるいはプライマー9 を用いた PCR によって、S4 全長の鋳型 DNA から抜き出して調製した。PCR の組成や条件は、Table 2-10 と同様である。転写反応液の組成は Table 2-3 と同様であるが、S4-S の転写反応は 2 mL の液量で行った。転写反応物は、PAGE 法によって精製し、260 nm における UV 吸収を測定して定量した。RDE の sense 鎖は、2-2-3 と同様に、精製および定量したのち、antisense 鎖と二本鎖を形成させた。

4-2-3 SPR 測定

2-2-4 と同様の測定条件で実施した。SPR 用緩衝液として、300 mM potassium acetate および 1 M potassium acetate の 2 種類を用いた。

4-2-3 等温滴定型熱量 (Isothermal Titration Calorimetry : ITC) 測定

ITC 法は、結合成分 (リガンド試料) を標的分子に滴下した際に起こる化学反応もしくは結合反応を観測する方法である。物質同士が結合するときには熱の発生もしくは吸収が起こるため、この熱量を測定することにより、enthalpy 変化 (ΔH) を直接観測でき、その値から相互作用の解離定数 (K_d)、結合比 (N)、entropy 変化 (ΔS) を精度よく算出できる。さらに、試料への化学修飾や物理的固定化などを必要としないため、自然状態に近い環境下での相互作用を測定することが可能である。ITC 実験では、混合する溶液の不一致から生じる熱変化を最小限に抑えることが必要である。すべての試料の緩衝液組成や濃度条件を同じにする方法として有効であるのが透析である。測定したいリガンド試料と高分子試料を同時に透析することで、組成の不一

致により生じる熱変化を最小限に抑えることが可能となる。また、透析が難しいリガンド試料の場合には、高分子を透析後、透析外液に直接溶解する、あるいは透析外液をもちいて緩衝液交換を行うことによって調製できる。

そこで、まず、調製した RD を ITC 用緩衝液 [20 mM sodium phosphate (pH 6.5) , 300 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 10 wt% glycerol, 1 mM DTT] に対して透析を行い、molecular weight cut-off 3000-5000 の Vivaspin 2 (Sartorius AG 社製) を用いて、S4-S および RDE を透析後の透析外液に溶解した。

次に、透析後の RD と、緩衝液交換後の RDE および S4-S の定量を行った。RD の定量は 280 nm における UV 吸収を測定し、(2-1) 式を用いて、吸光係数よりタンパク質濃度の定量を行った。また、RDE は DNA 分子、S4-S は RNA 分子であり、260 nm 付近に極大吸収をもつため、吸光度を測定することによって定量できる。しかしながら、実際には、DNA 分子や RNA 分子は二重らせん構造や複雑な高次構造を形成するため、淡色効果 (hypochromicity) と呼ばれる吸光度の減少が起こってしまう。そこで、Beckman DU-640 (BECKMAN COULTER) を用いて、10 °C から 95 °C まで温度を上昇させて高次構造を解きながら、260 nm の吸光度を測定した。その後、25 °C と 95 °C の吸光度から淡色効果の影響を算出し、25 °C の吸光度を補正した。その淡色効果による吸光度の減少割合を Table 4-2 に示す。

今回の ITC 測定は、Microcal iTC200 (Malvern 社製) を用いて、288 K, 293 K, 298 K および 303 K の温度条件で行った。injection syringe 内の 100 μ M S4-S あるいは RDE を cell 内の 10 μ M RD に滴下した。滴定回数は 19 回、初めの滴下は 0.4 μ L、それ以降の残り 18 回は 2 μ L ずつ滴下した。injection syringe の回転数は 1250 rpm とし、reference power は 5.0 μ cal s^{-1} に設定した。ITC 実験の測定パラメータを Table 4-3 に示す。ITC 測定によって得られたデータは Origin software 7.0 (OriginLab 社製) を用いて解析した。まず、希釈熱を差し引くために、全てのサーモグラムから S4-S ある

いは RDE を ITC 用緩衝液のみに滴定した際のサーモグラムを差し引いた。次に、滴定ごとに観測された heat pulse の面積をそれぞれ積分し、その積分値を molar ratio に対してプロットした。N, K_d , ΔH は Origin software 7.0 の one-site binding model curve fitting に従って算出した。gibbs free energy 変化 (ΔG) と ΔS は、 K_d および ΔH に基づいて次式より算出した。

$$\Delta G = -RT \ln (1/K_d) \quad (4-1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4-2)$$

R: 気体状数, T: 絶対温度

各パラメータは独立した 3 回の実験測定値の平均値 \pm 標準誤差で示した。熱容量変化 (ΔC_p) については、 ΔH を温度に対してプロットし、その傾きから算出した。

4-3 結果

4-3-1 取得した RNA aptamer (S4) の短鎖化

第 2 章で取得された RNA aptamer のうち、最も高い結合親和性を示した S4 の短鎖化を行った (Fig. 4-1) . vs_subopt program による二次構造の予測結果に基づいて、S4 のプライマー結合配列の一本鎖領域を切り詰め、T7 RNA polymerase による効率的な

転写および末端ステム構造の安定化のためのステム構造 (5'-GGA/CCGA-3') を付加させた全長 52 塩基の S4-S を設計した. S4-S の二次構造予測を行った結果, 設計した通りの二次構造を形成することが判明した. さらに, SPR 法による解析の結果, S4-S の K_d 値は 0.034 ± 0.004 nM であり, S4 と比べて結合親和性が向上したことが明らかとなった (Table 4-4) .

S4-S と RD の結合特異性を調べるために, SPR 法を用いて, S4-S, RDE および Apt1-S とネガティブコントロールとしての HIV Rev タンパク質由来の Rev ペプチドの Arginine-Rich Motif (ARM) との結合を評価した. Rev ペプチドは Rev Responsive Element (RRE) RNA と高い結合親和性 ($K_d = 6.8$ nM ; 298 K 条件での ITC 実験において算出) と特異性で結合することがよく知られている[85, 86]. S4-S, RDE および Apt1-S は, Rev ペプチドに対して K_d 値が μ M オーダーの非特異的な結合を示した (Table 4-5 および Fig. 4-2) . したがって, S4-S は高い特異性をもって RD に結合することが示唆された.

4-3-2 S4-S と RD との相互作用における塩濃度の影響

次に, S4 が高塩濃度条件下で選別されてきたことを考慮し, S4-S と RD の結合における塩濃度の影響を調べた (Table 4-6, Fig. 4-3, 4-4 および 4-5) . 実際には, potassium acetate 濃度を 1 M まで上げて SPR 測定を実施し, その測定値を 300 mM potassium acetate 条件下の測定値と比較した. その結果, S4-S と RD の結合では, k_{on} は減少するものの k_{off} は変化せず, 高い結合親和性を保持していた ($K_d = 3.5 \pm 0.4$ nM) . 一方で, RDE と RD の結合については全く検出できなかった. また, Apt1-S と RD の結合においては, k_{on} の減少および k_{off} の著しい増加がみられ, 結合親和性も著しく減少し

た ($K_d = 2800 \pm 200$ nM) . したがって, 高塩濃度条件下での S4-S の結合親和性の減少の主な原因は, k_{off} の増加ではなく k_{on} の減少であった.

4-3-3 S4-S と RD との相互作用の熱力学的解析

次に, ITC 法を用いて, S4-S と RD との相互作用を熱力学的に解析した. 288 K, 293 K, 298 K および 303 K の温度条件において, S4-S と RDE を RD へ滴定したところ, すべての条件でどちらも発熱反応を示した (Fig. 4-6, 4-7, 4-8 および 4-9) . これらの測定から得られた各熱力学的パラメータを Table 4-7 に示した. 各温度における S4-S と RD および RDE と RD の結合比 N はそれぞれ 0.87-0.96 および 0.93-1.02 であり, およそ 1 を示した. この結合比 N のずれには, S4-S, RDE あるいは RD の濃度の正確さおよび溶液中の不活性型 RD の割合が影響している可能性がある. K_d 値を比較すると, 288-303 K の範囲では, S4-S は RD に対してほとんど同じ値を示したが, 一方で, RDE の RD に対する K_d 値は, 温度が上がるにつれて増加した. また, 298 K の条件において, S4-S と RDE の K_d 値はそれぞれ 5 ± 3 nM, および 66 ± 5 nM であり, S4-S は RDE よりもおよそ 10 倍以上強く RD と結合することが明らかとなった. さらに, S4-S と RD との結合の enthalpy 変化 ($\Delta H = -56 \pm 1$ kcal mol⁻¹) は RDE と RD との結合の enthalpy 変化 ($\Delta H = -25.5 \pm 0.4$ kcal mol⁻¹) と比べて負に大きく, S4-S と RD との結合の entropy 変化 ($-T\Delta S = 45 \pm 1$ kcal mol⁻¹) は RDE と RD との結合の entropy 変化 ($-T\Delta S = 15.7 \pm 0.4$ kcal mol⁻¹) と比べて, 正に大きいことが判明した. 以上の結果から, S4-S と RD の結合は RDE と RD の結合に比べて enthalpy 的な相互作用が強く, 結合に不利な $-T\Delta S$ を有利な ΔH で補償していることが明らかとなった.

次に, S4-S および RDE と RD との結合における ΔC_p を求めるために, ΔH 値を温度に対してプロットした (Fig. 4-10) . その結果, S4-S と RD あるいは RDE と RD との

結合は、温度が上がるにつれて、発熱量も直線的に上昇していた。さらに、288-303 K の範囲の ΔH 値プロットに対して直線を引き、その傾きから熱容量変化 (ΔC_p) を算出した。S4-S あるいは RDE と RD との相互作用は両方とも負の熱容量変化を示したが、S4-S と RD との結合の熱容量変化 ($\Delta C_p = -0.82 \pm 0.14 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) は RDE と RD との結合の熱容量変化 ($\Delta C_p = -0.52 \pm 0.05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) よりも負に大きいことが判明した。続いて、S4-S と RD あるいは RDE と RD との結合の $-T\Delta S$ 値を温度に対してプロットした (Fig. 4-11)。その結果、S4-S と RD あるいは RDE と RD との結合の entropy 変化は両方とも、温度上昇に伴い、次第に結合にとって不利な変化となった。

なお、本実験では、滴定試料 (S4-S) と cell 側試料 (RD) は全く同一緩衝液 (組成およびロットも同じ) に溶解している。また、解析時には S4-S を緩衝液に滴定したデータを差し引き、希釈熱の影響を可能な限り除外することで、各熱力学パラメータをできるだけ正確に算出した。

4-4 考察

第2章で取得された RNA aptamer のうち、RD に対して最も高い結合親和性を示した S4 を短鎖化して、S4-S を設計した (Fig. 4-1)。vs_subopt program を用いた二次構造予測の結果から、S4-S は1つの多岐ループ構造、2つのヘアピンステムループ構造および1つの末端ステム構造をもつ設計通りの二次構造をとることが明らかとなった。さらに、S4-S は短鎖化前の S4 よりも RD に対する結合親和性が向上した ($K_d = 0.034 \pm 0.004 \text{ nM}$) (Table 4-4)。このことから、切り詰めた S4 の 5'および 3'領域は RD との結合には不要であり、そして末端ステム構造の安定化は RD との結合に有利に働くことが示唆された。

本研究においても観測されたように、SPR 法によって得られた K_d 値は、ITC 法によって得られた K_d 値よりも小さく観測されることがある[87, 88]. この K_d 値の違いが生じる原因は明らかにされていないが、本研究の場合において、以下の原因が考えられる. 第一に、2つの実験間の緩衝液の組成の違いが挙げられる. ITC 法に用いた緩衝液には、RD の沈殿を防ぐために 10 wt% グリセロールが含まれているが、SPR 法に用いた緩衝液にはグリセロールは含まれていない. このグリセロールが、S4-S と RD の相互作用表面に作用し、それらの相互作用を妨げている可能性がある. 第二に、2つの測定方法間の基本的な物理条件の違いが挙げられる. SPR 法は sensor chip 上に固定化された S4-S に対する RD の結合を観測する固相測定であるのに対して、ITC 法は溶液中における S4-S と RD の結合を観測する液相測定である. 固定化された S4-S と RD の会合時の entropy 変化は、溶液中における S4-S と RD の会合時の entropy 変化よりも小さく、結合に有利であることが想定される[89, 90]. したがって、SPR 法によって観測される K_d 値は、ITC 法によって観測される K_d 値よりも小さく算出されると考えられる. そして、最も決定的な原因として、S4-S と RD の結合における K_d 値が、ITC 法による検出限界を超えていることが考えられる. ITC 法を用いて正確に測定可能な結合の強さは、 K_d 値にして 1 nM-100 μ M 範囲である. さらに、Turnbull らの報告によると、ITC 実験において、以下の (4-3) 式に基づいて算出できる c 値 (実験の正確さを表す値) が $1 \leq c \leq 1000$ の範囲内にあるとき、正確な K_d 値を測定可能と報告されている[91-94].

$$c = N K_a [M]_t \quad (4-3)$$

N : stoichiometry, K_a : 結合定数, $[M]_t$: タンパク質濃度

本研究において、S4-S と RD の ITC 実験の c 値が 1000 を超えていたことから、ITC 法によって算出した S4-S と RD の結合の K_d 値は正確ではなく、実際には、現在の K_d 値よりも小さい K_d 値を示すことが示唆された。今後、ITC 法を用いて S4-S と RD の結合における正確な K_d 値を算出するためには、RDE や結合能が低下した S4-S 変異体を競合分子として、displacement titration 法を行うことが必要だと考えられる[92]。

SPR 法を用いて、S4-S、RDE および Apt1-S と RD の結合における塩濃度の影響について調べた (Table 4-5)。その結果、1 M potassium acetate 条件下において、RDE の RD に対する結合親和性は完全に失われ、Apt1-S の RD に対する結合親和性もまた著しく減少した。しかしながら、S4-S は高い結合親和性を保持していた。さらに、S4-S と RD の結合では、塩濃度の上昇に伴い、 k_{on} は減少したものの k_{off} はほとんど変化しなかった。一方、Apt1-S と RD の結合では、 k_{on} の減少および k_{off} の著しい増加が見られた。この k_{on} の減少は、負に帯電している S4-S あるいは Apt1-S のリン酸骨格と RD の塩基性アミノ酸残基の間の比較的長距離で働く静電的な相互作用がイオンによって相殺されたことで引き起こされた可能性が考えられる[95-98]。また、現在までに報告されているいくつかの aptamer と標的タンパク質の複合体の結晶構造において、aptamer は標的タンパク質表面の広い範囲と相補的な構造を形成し、多くの弱い結合 (例；水素結合や van der Waals 力) を用いて、そのタンパク質表面にフィットするように結合していることが報告されている[7, 98, 99]。したがって、塩濃度の増加によって k_{off} が変化しなかったことに関しても、S4-S と RD の相互作用表面の良好な構造相補性によるものと考察できる。

ITC 法による解析から得られる熱力学的なパラメータには、生体高分子間の相互作用についての多くの情報が含まれている[100-106]。S4-S と RD および RDE と RD の結合に対する ΔH 、ならびに $-T\Delta S$ の寄与を比較した Fig. 4-12 をみると、両者の結合とも不利な $-T\Delta S$ を非常に有利な ΔH で補う ΔH 駆動の結合様式を示すが、RDE と RD の

結合は S4-S と RD の結合と比べて、 ΔH および $-T\Delta S$ の寄与が相対的に少ない。しかしながら、前述したように、算出した S4-S と RD の結合の K_d 値は正確でなく、実際には、現在の K_d 値よりも小さくなるため、(4-1 および 4-2) 式から算出された $-T\Delta S$ は、現在の値より低くなり、S4-S と RDE における $-T\Delta S$ の寄与の差は縮まると考えられる。 ΔH の寄与の差は、S4-S と RD の結合が RDE と RD の結合と比べて、 ΔH 的に有利であることを示しており、S4-S は RDE よりも多くの水素結合や van der Waals 力を用いて、RD と結合していることを示唆している。また、S4-S と RD の結合における不利な $-T\Delta S$ の寄与の原因として、結合状態での溶媒和 entropy や配座 entropy の減少が考えられる。さらに、S4-S および RDE の RD との結合における K_d 値の ΔC_p を比較すると、S4-S と RD との結合における ΔC_p の方が負に大きい。一般的に、 ΔC_p の値が負に大きいほど非静電的な表面の被覆の大きい特異的な相互作用であることを示す。つまり、S4-S と RD の結合の方が、RDE と RD の結合よりも非静電的な被覆の大きい結合であることを示唆している (Table 4-7 および Fig. 4-10)。したがって、S4-S と RD の結合における不利な $-T\Delta S$ の寄与は溶媒和 entropy の減少によるものではなく、構造的拘束による配座 entropy の減少である可能性が高い。

以上の考察をまとめると、S4-S と RD との相互作用の機序について、Fig. 4-13 のように考えることができる。まず、1 M potassium acetate 条件下において、 k_{on} が減少したことから、S4-S と RD の結合の初期段階 (会合時) には、負に帯電した S4-S と RD の塩基性アミノ酸の間の比較的長距離の静電的相互作用が大きく関与している。次に、1 M potassium acetate 条件下においても k_{off} は変化せず、また、 ΔH 駆動の結合様式をもち、構造的拘束による配座 entropy の減少が観測されることから、S4-S は RD との会合に伴って、立体構造を変化させて、多くの水素結合や van der Waals 結合を RD との間に形成する。さらに、S4-S と RD および RDE と RD の結合における ΔC_p の比較から、S4-S は RDE よりも RD の広い表面を認識している。

Table 4-1 第4章で用いた合成 DNA

Sample	Sequence (5' to 3')
Primer 7	CTAATACGACTCACTATAGGACCCTGCCACGATAGCG
Primer 8	TGGACCGTTAGGTGTATACTTTACTT
Primer 9	TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACCGTTAGGTGTATACTTTACTT
Sense strand of RDE	GTCGTTTGCGGTTTGGGGA
Antisense strand of RDE	TCCCCAAACCGCAAACGAC

Table 4-2 淡色効果による吸光度の減少割合

Sample	Hypochromism
RDE	26%
S4-S	28%

Table 4-3 ITC 測定パラメータ

Experimental parameters	
Total # injection	19
Cell Temperature (K)	288-303
Reference Power (μ cal/s)	5
Initial Delay (s)	60
Syringe Concentration (mM)	0.1
Cell concentration (mM)	0.01
Stirring Speed (rpm)	1250
Injection parameters	
Volume (μ l)	2
Duration (s)	4
Spacing (s)	150
Filter Period (s)	5

Table 4-4 0.3 M potassium acetate 条件下での S4 および S4-S と RD の結合における速度論的パラメータ

	k_{on} ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	K_{d} (nM)
S4	9.1 ± 0.1	0.40 ± 0.02	0.044 ± 0.002
S4-S	10.7 ± 0.3	0.37 ± 0.06	0.034 ± 0.004

Table 4-5 0.3 M potassium acetate 条件下での S4-S, RDE および Apt1-S と Rev ペプチドの結合における速度論的パラメータ

	k_{on} ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_{off} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	K_{d} (nM)
S4-S	0.172 ± 0.003	256 ± 5	1490 ± 50
RDE	0.11 ± 0.01	300 ± 30	2800 ± 500
Apt1-S	0.16 ± 0.01	290 ± 40	1900 ± 200

Table 4-6 0.3 M および 1M potassium acetate 条件下での S4-S, RDE および Apt1-S と RD の結合における速度論的パラメータ

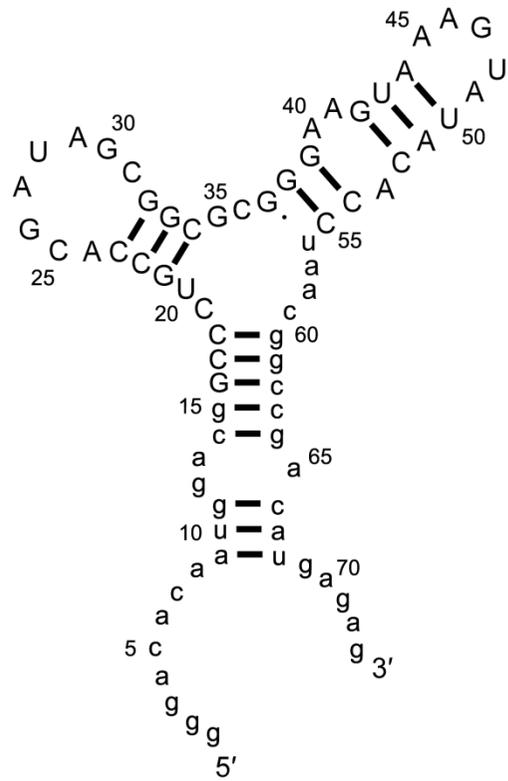
	0.3 M potassium acetate			1 M potassium acetate		
	k_{on}	k_{off}	K_{d}	k_{on}	k_{off}	K_{d}
	($\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	(nM)	($\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	(nM)
S4-S	10.7 ± 0.3	0.37 ± 0.06	0.034 ± 0.004	0.13 ± 0.02	0.47 ± 0.02	3.5 ± 0.4
RDE	6.4 ± 0.8	65 ± 3	10 ± 1			N.D.
Apt1-S	6.7 ± 0.2	7.6 ± 0.6	1.1 ± 0.1	0.10 ± 0.01	280 ± 10	2800 ± 200

N.D. : 検出不可能

Table 4-7 0.3 M potassium acetate 条件下での S4-S および RDE と RD の結合における熱力学的パラメータ

	Temperature (K)	N	K_d (nM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	ΔC_p (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)
S4-S	288	0.96 ± 0.03	3 ± 2	-11.2 ± 0.3	-45.4 ± 0.2	34.2 ± 0.2	-0.82 ± 0.14
	293	0.89 ± 0.03	5 ± 3	-11.2 ± 0.4	-51.4 ± 0.4	40.2 ± 0.8	
	298	0.87 ± 0.02	5 ± 3	-11.4 ± 0.4	-56 ± 1	45 ± 1	
	303	0.90 ± 0.03	6 ± 3	-11.4 ± 0.3	-57.5 ± 0.8	46 ± 1	
RDE	288	1.02 ± 0.04	20 ± 4	-10.2 ± 0.1	-21.1 ± 0.4	11.0 ± 0.3	-0.52 ± 0.05
	293	0.93 ± 0.02	28 ± 2	-10.13 ± 0.03	-23.69 ± 0.02	13.56 ± 0.04	
	298	0.99 ± 0.08	66 ± 5	-9.82 ± 0.05	-25.5 ± 0.4	15.7 ± 0.4	
	303	0.87 ± 0.08	130 ± 30	-9.6 ± 0.2	-29 ± 1	20 ± 1	

a



b

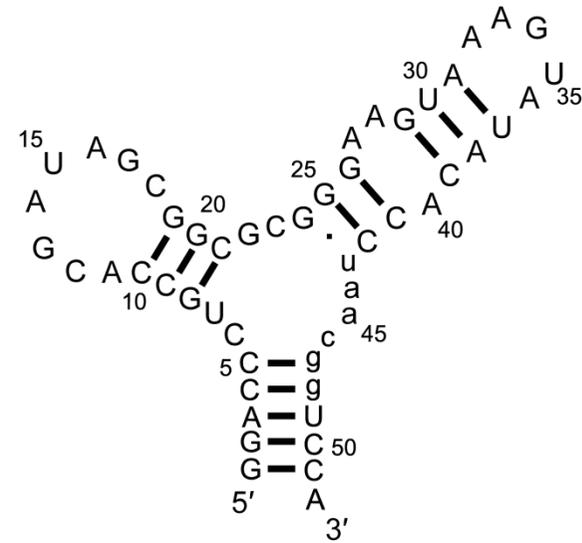


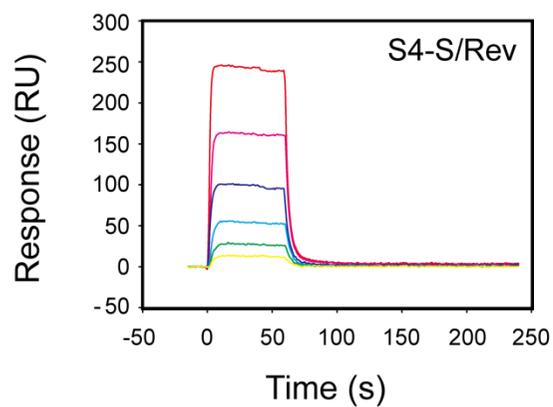
Fig. 4-1 S4 および S4-S の二次構造

(a) S4, (b) S4-S. 小文字の配列は, プライマー結合配列由来の塩基を示す.

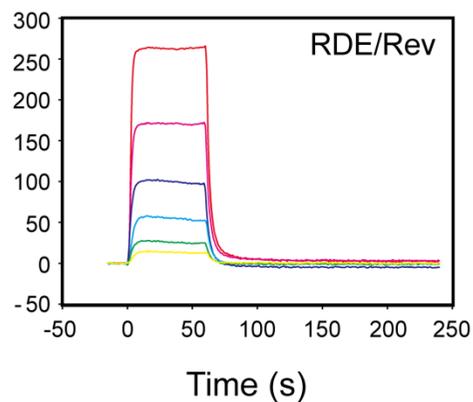
a

MATRQARRNRRRRWRERQRAAAA

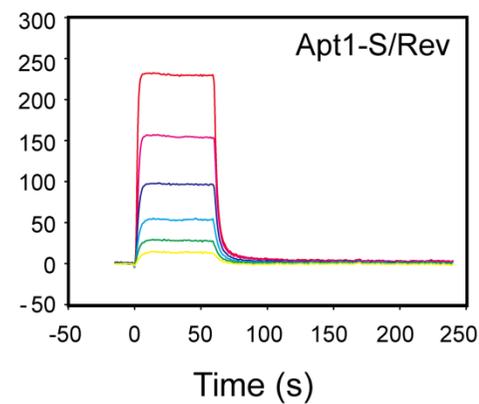
b



c



d



RD
— 2000 nM
— 1000 nM
— 500 nM
— 250 nM
— 125 nM
— 6.25 nM

Fig. 4-2 0.3 M potassium acetate 条件での S4-S, RDE および Apt1-S と Rev ペプチドの結合における

SPR 実験のセンサーグラム

(a) Rev ペプチドのアミノ配列, (b) S4-S, (c) RDE, (d) Apt1-S.

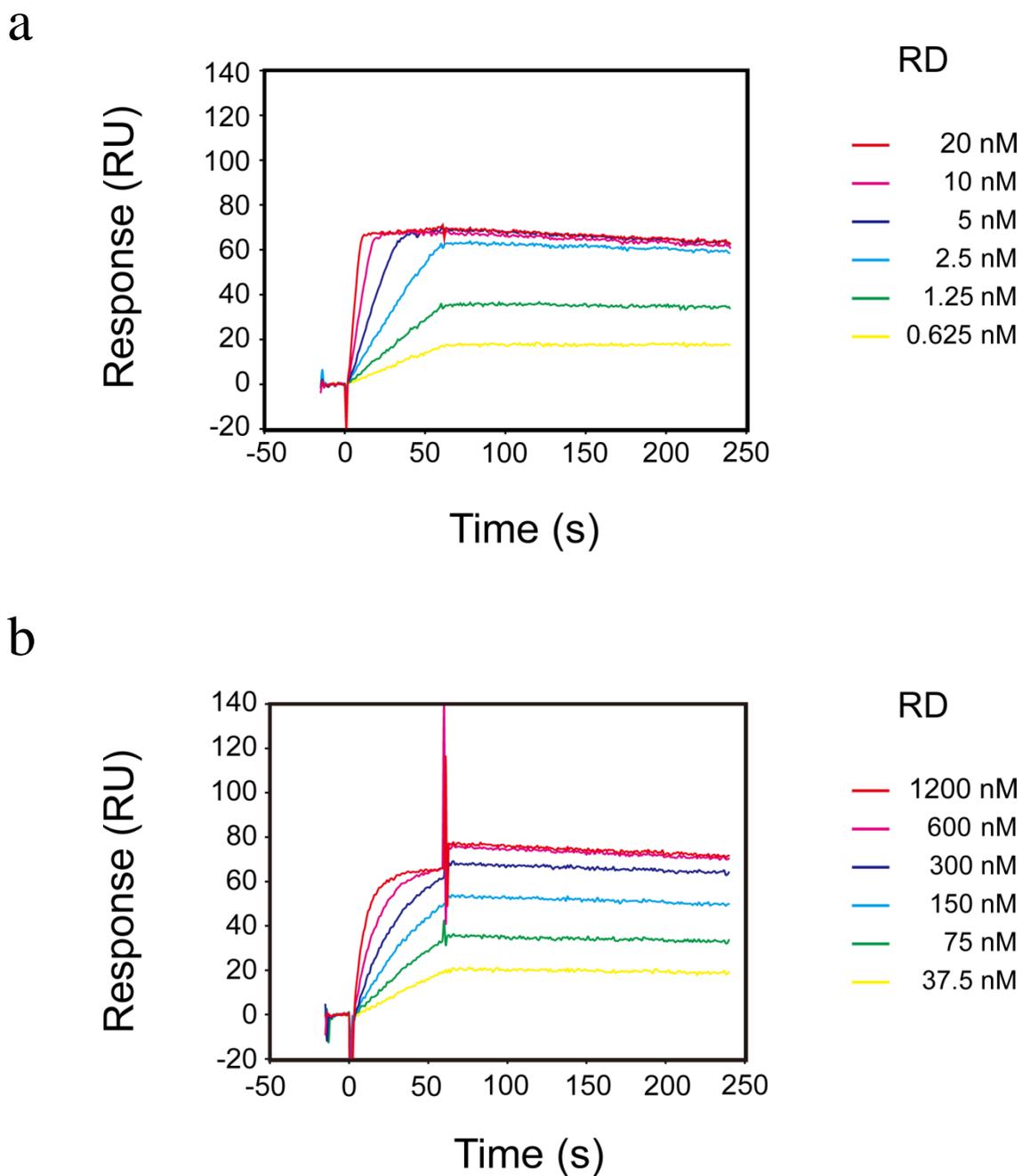


Fig. 4-3 0.3 M potassium acetate および 1 M potassium acetate 条件における S4-S と RD の結合における SPR 実験のセンサーグラム
 (a) 0.3 M potassium acetate 条件, (b) 1 M potassium acetate 条件.

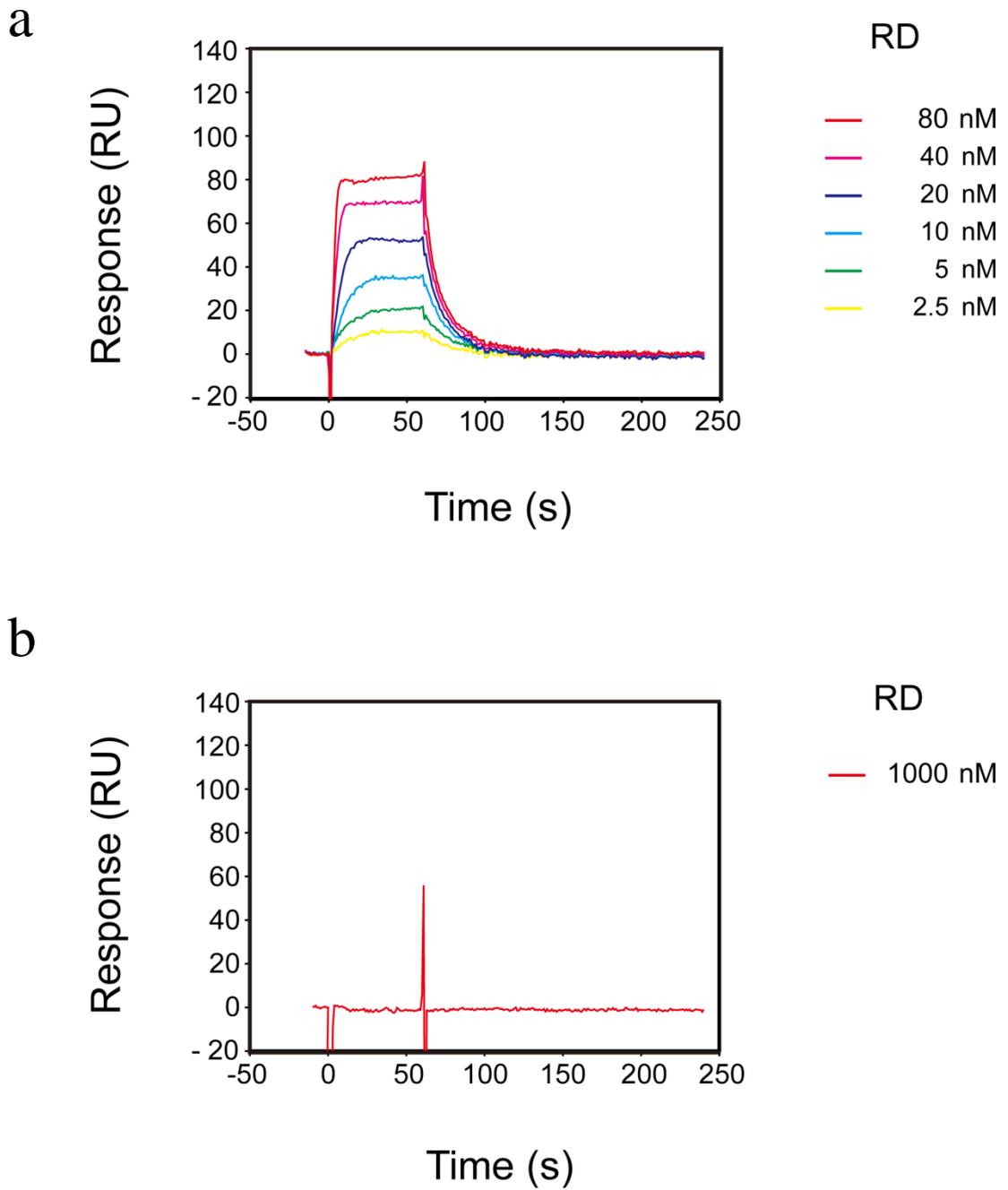


Fig. 4-4 0.3 M potassium acetate および 1 M potassium acetate 条件における RDE と RD の結合における SPR 実験のセンサーグラム
 (a) 0.3 M potassium acetate 条件, (b) 1 M potassium acetate 条件.

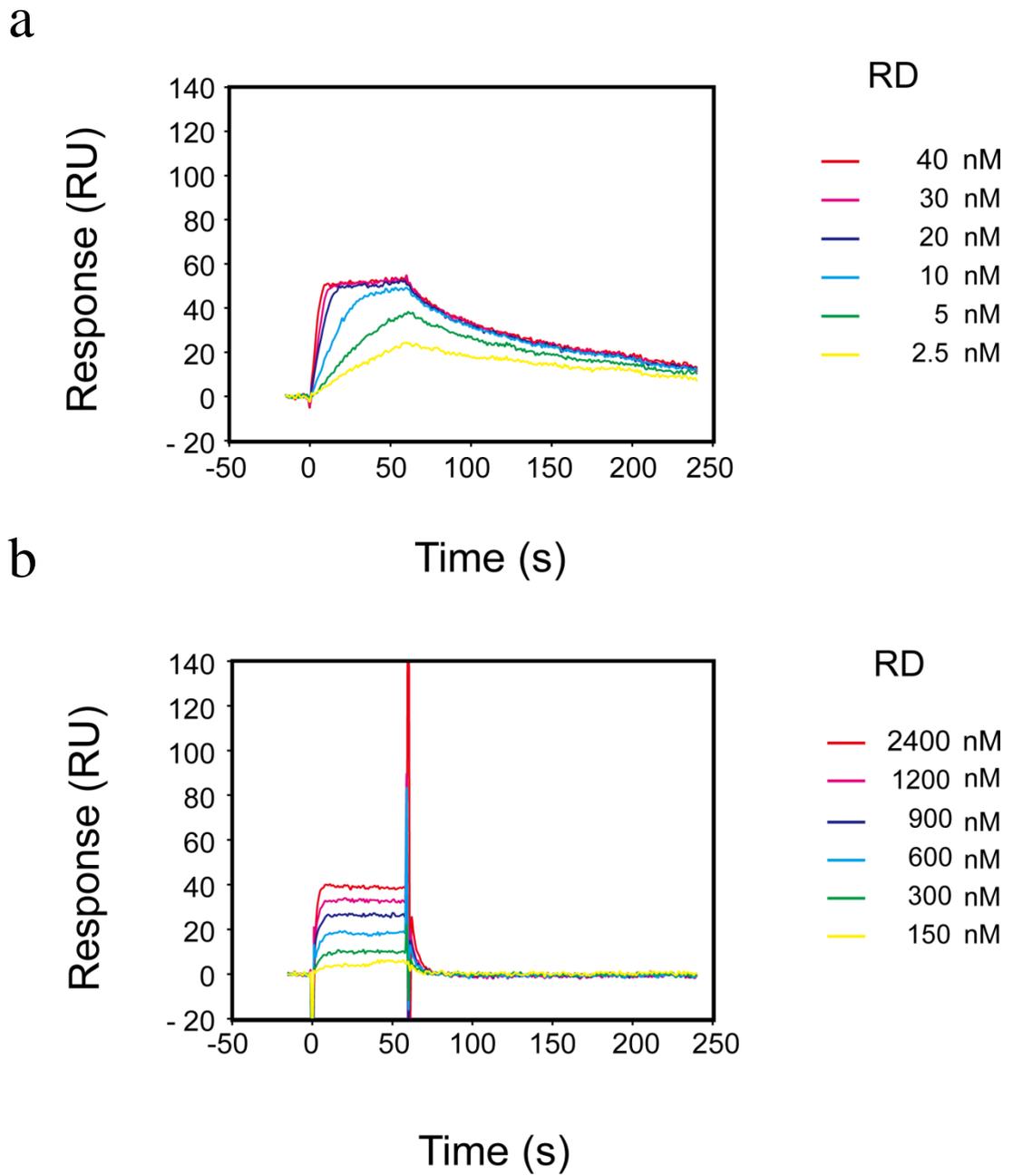


Fig. 4-5 0.3 M potassium acetate および 1 M potassium acetate 条件での

Apt1-S と RD の結合における SPR 実験のセンサーグラム

(a) 0.3 M potassium acetate 条件, (b) 1 M potassium acetate 条件.

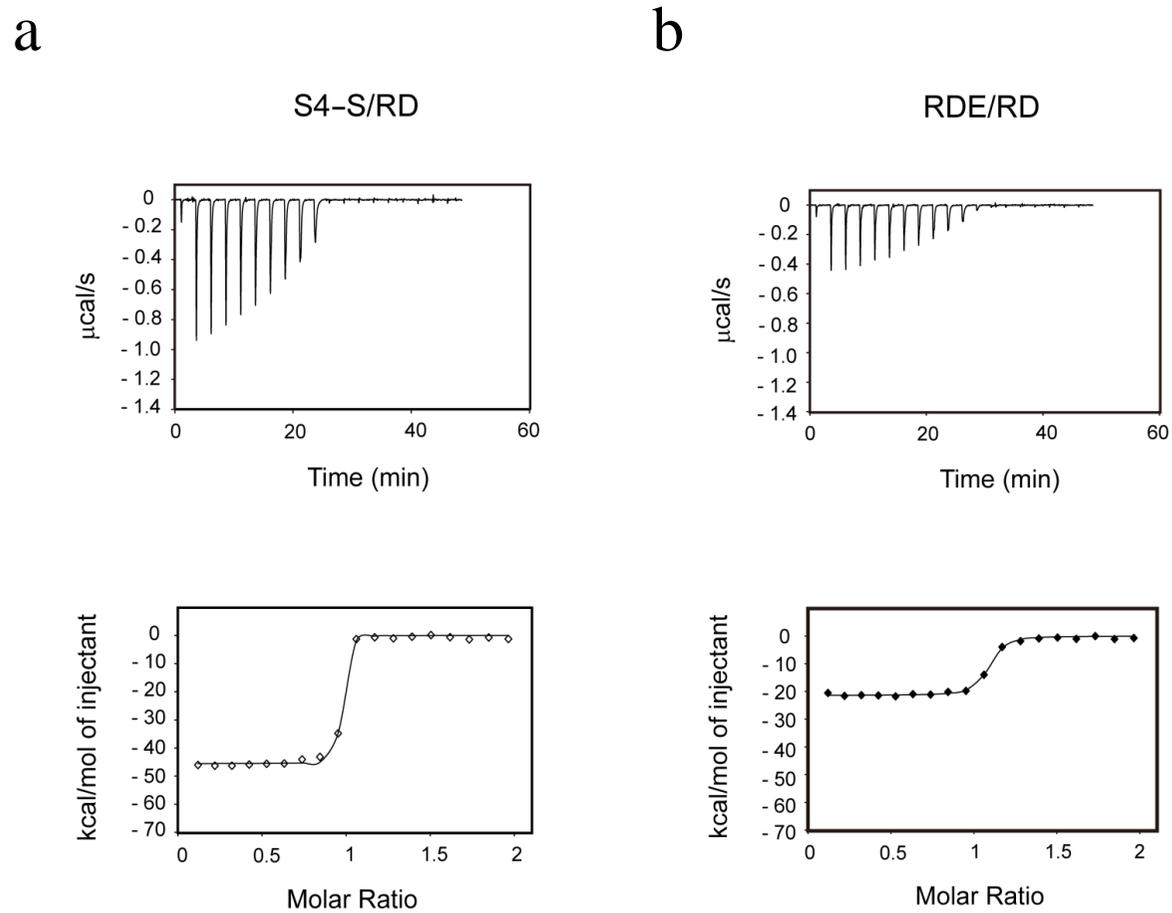


Fig. 4-6 288 K での S4-S および RDE と RD の結合における ITC データ

(a) S4-S, (b) RDE. 上の図は測定データ, 下の図は解析データを示す.

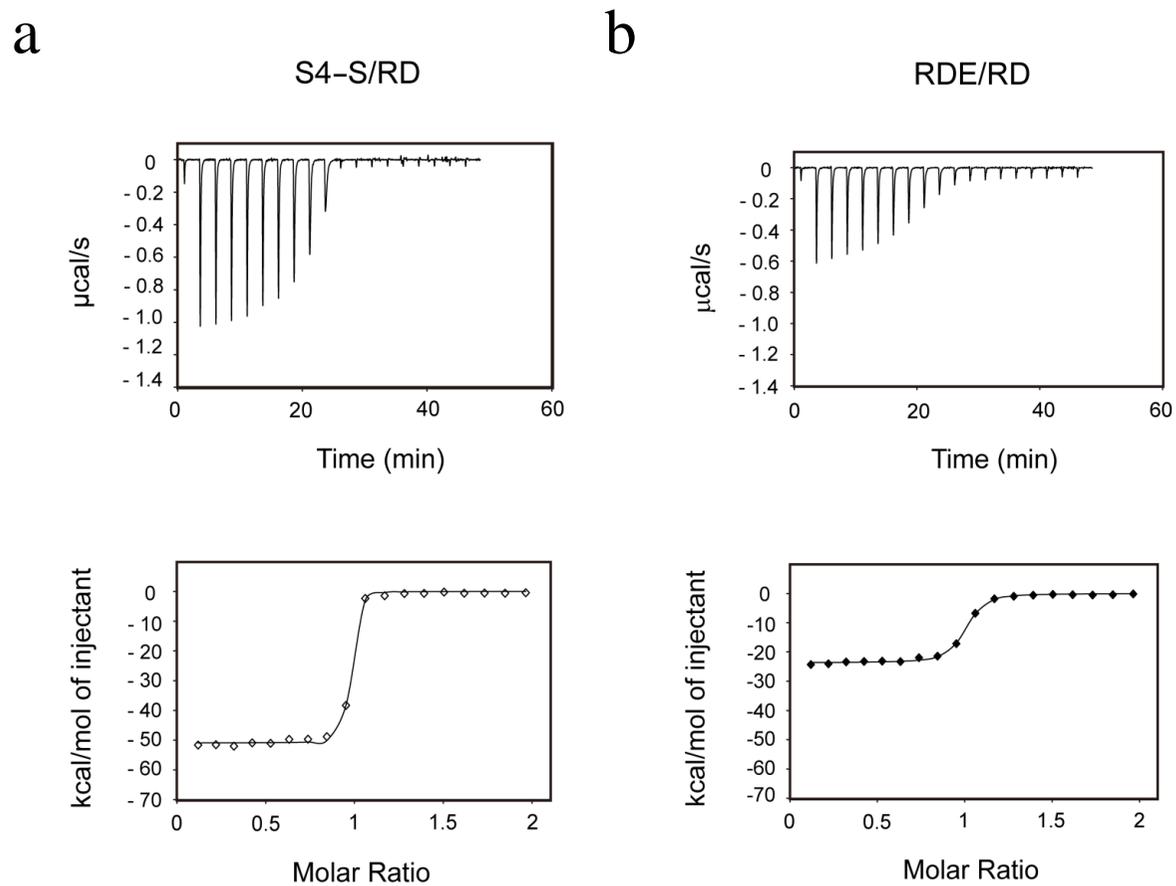


Fig. 4-7 293 K での S4-S および RDE と RD の結合における ITC データ

(a) S4-S, (b) RDE. 上の図は測定データ, 下の図は解析データを示す.

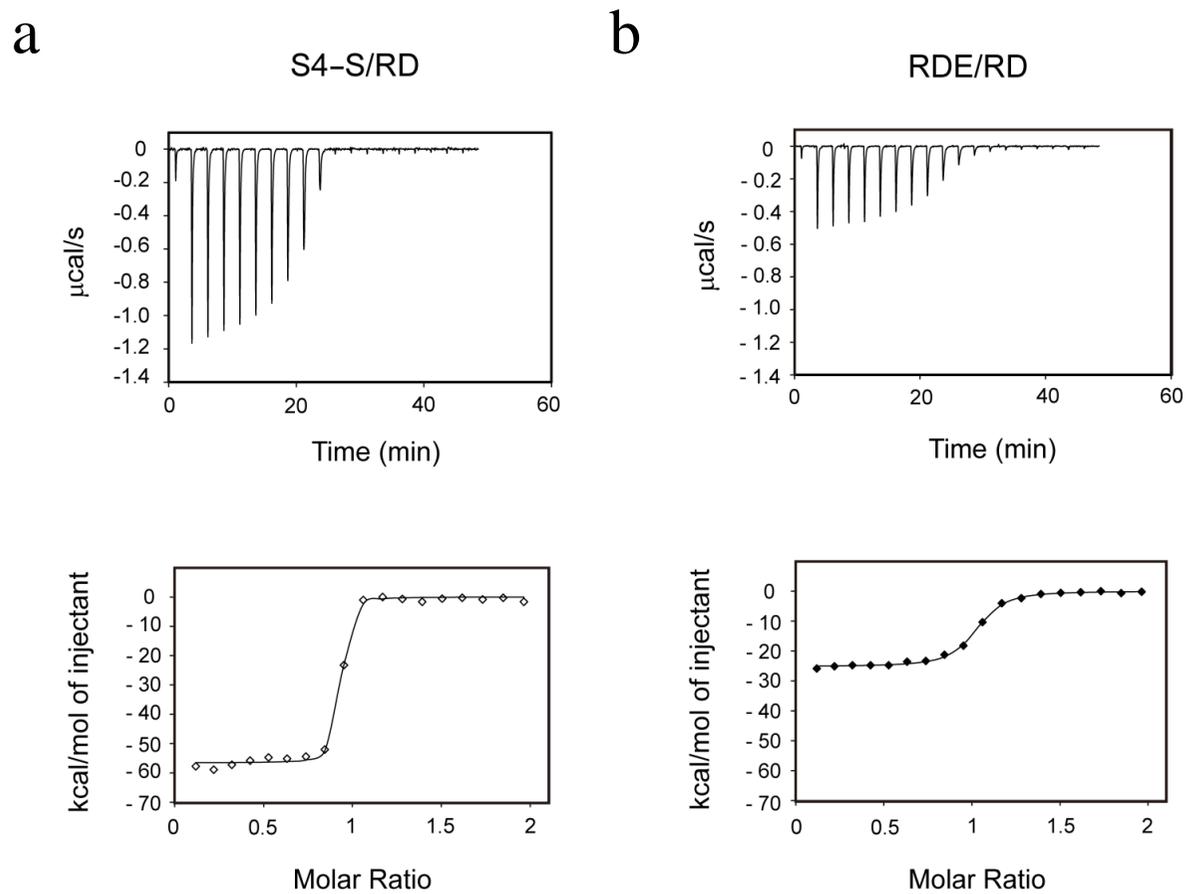


Fig. 4-8 298 K での S4-S および RDE と RD の結合における ITC データ

(a) S4-S, (b) RDE. 上の図は測定データ, 下の図は解析データを示す.

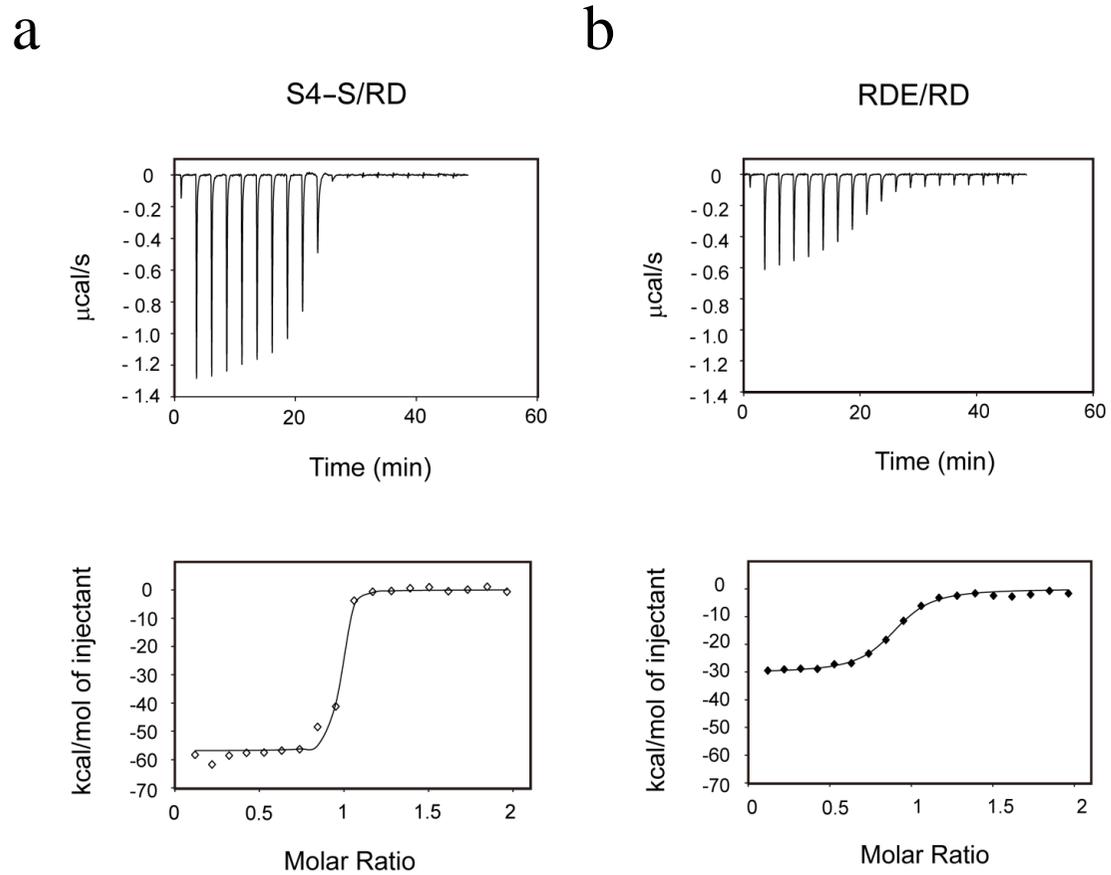


Fig. 4-9 303 K での S4-S および RDE と RD の結合における ITC データ

(a) S4-S, (b) RDE. 上の図は測定データ, 下の図は解析データを示す.

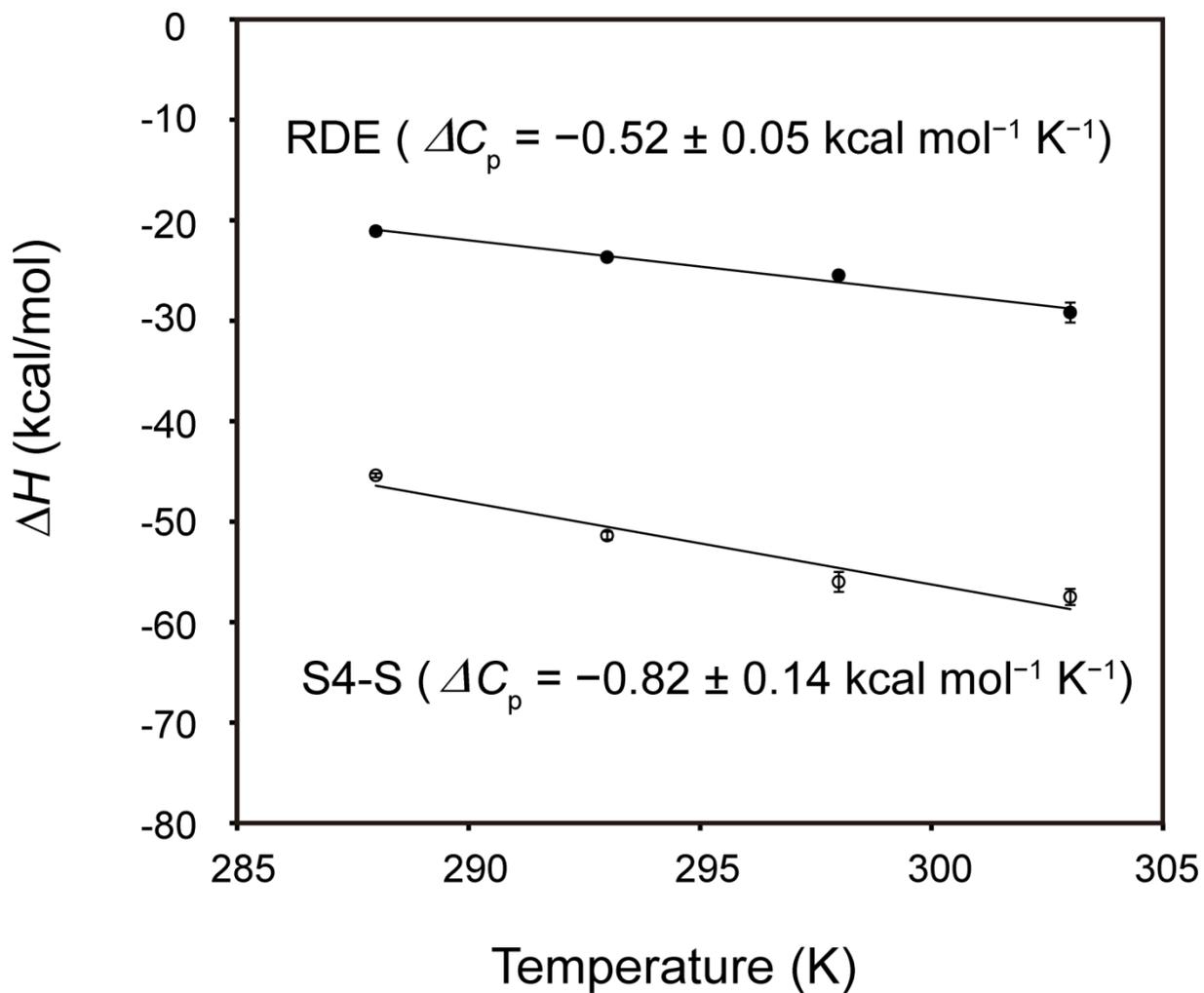


Fig. 4-10 S4-S および RDE と RD との結合における ΔH の温度依存性

○ : S4-S, ● : RDE. Error bar は標準誤差を示す.

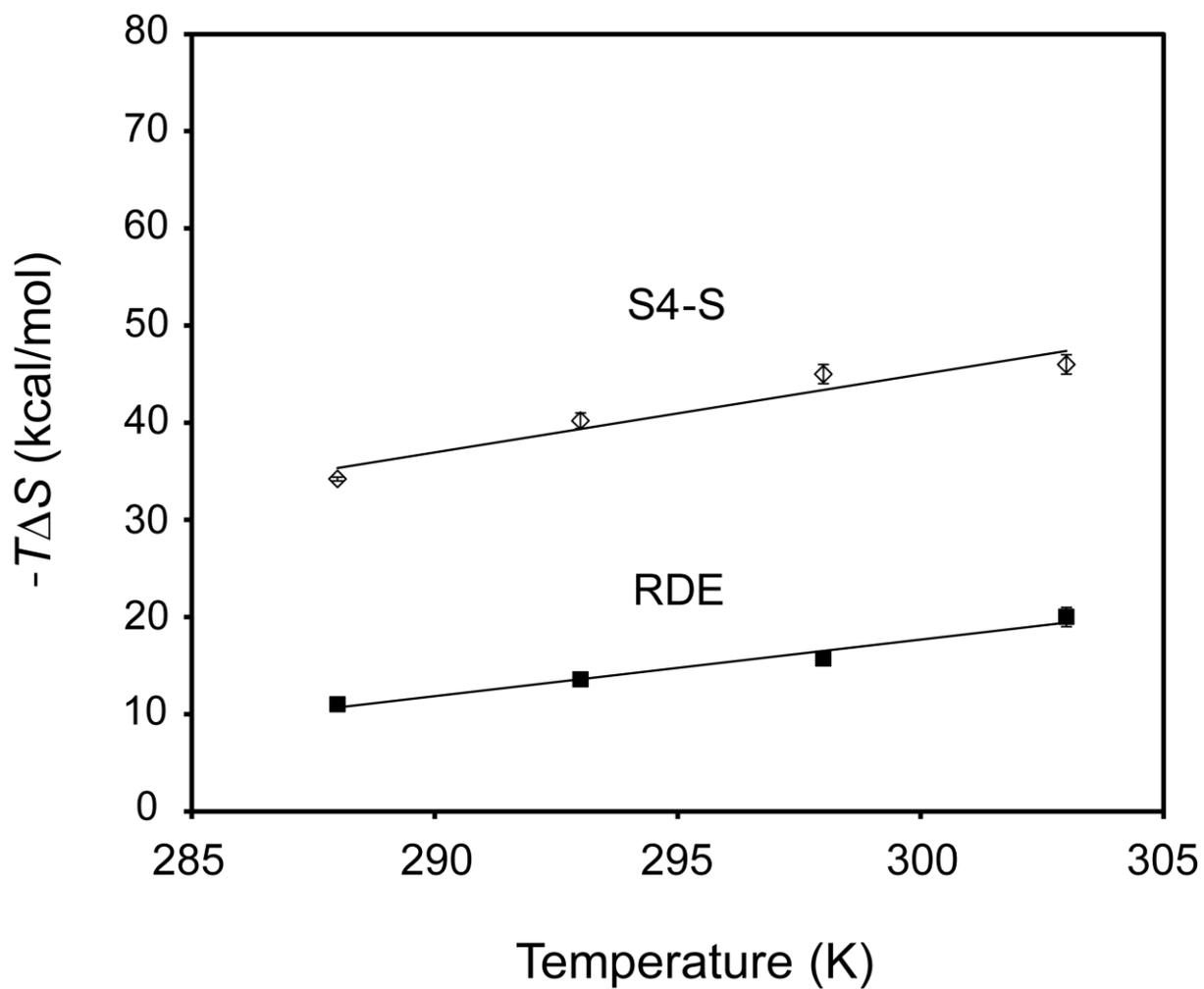


Fig. 4-11 S4-S および RDE と RD との結合における $-T\Delta S$ の温度依存性

□ : S4-S, ■ : RDE. Error bar は標準誤差を示す

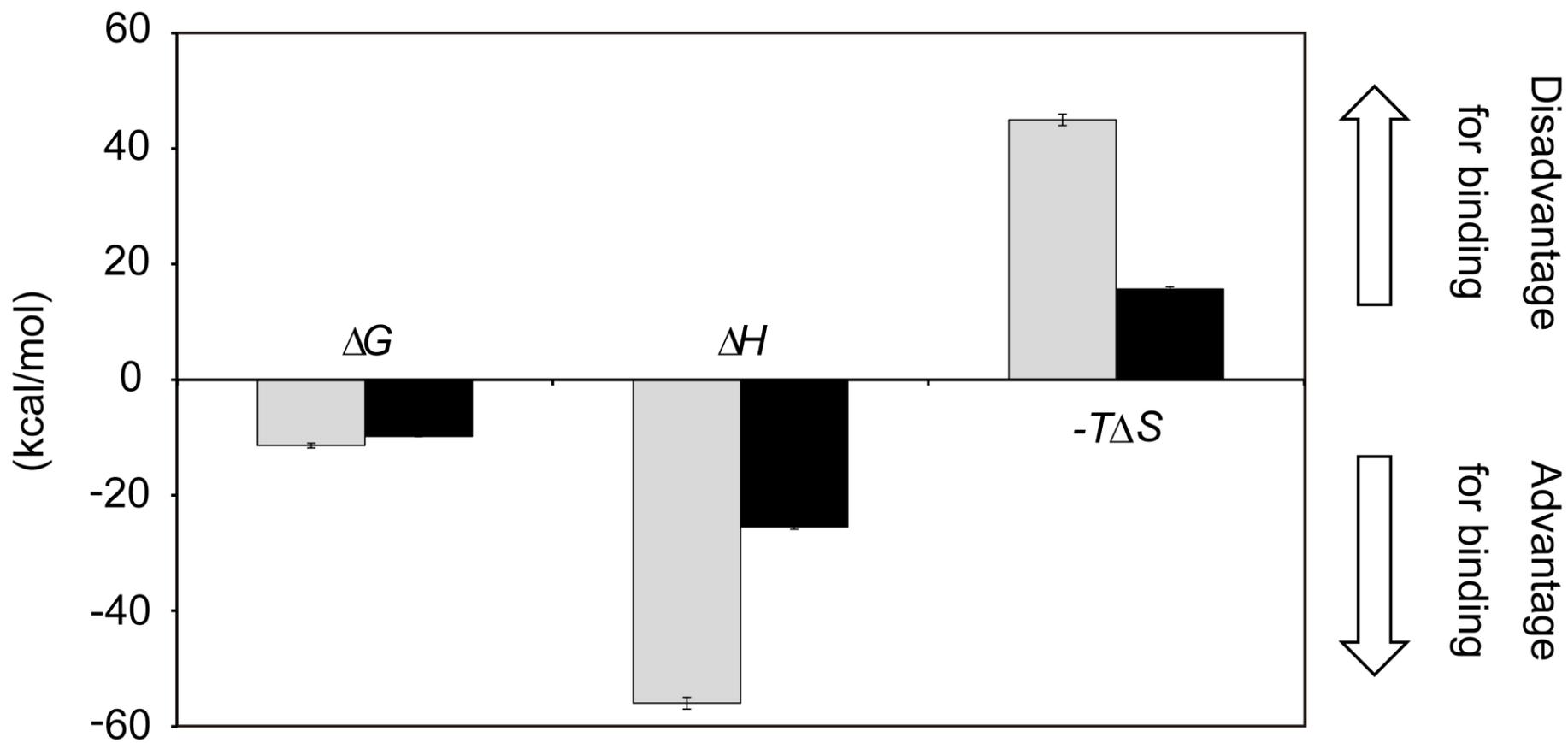
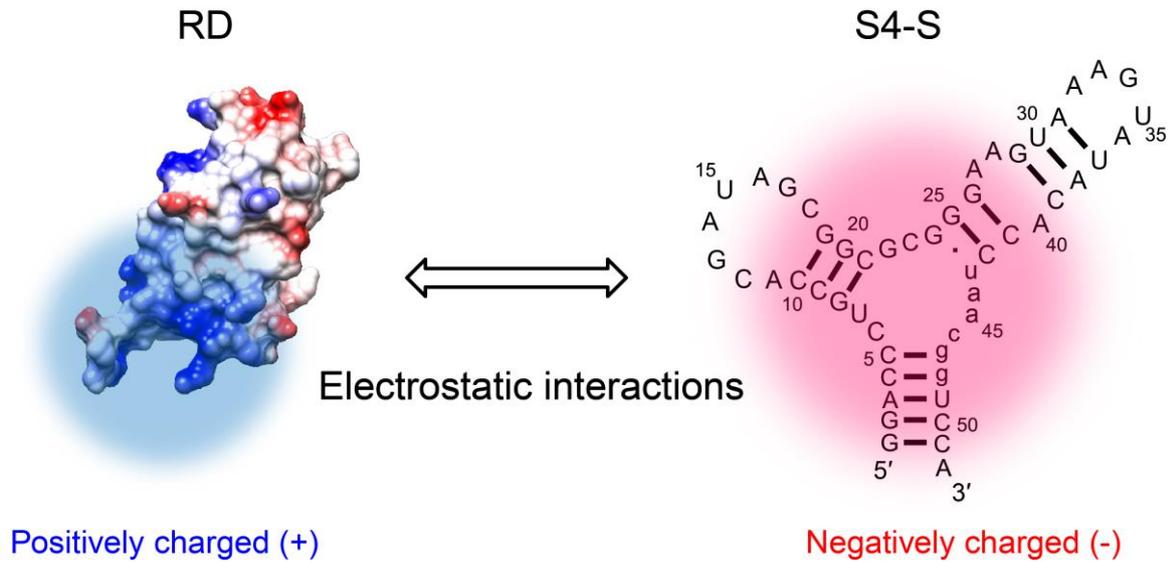


Fig. 4-12 S4-S および RDE と RD との結合における熱力学的パラメータの比較

灰色：S4-S，黒：RDE。Error bar は標準誤差を示す。

First step



Second step

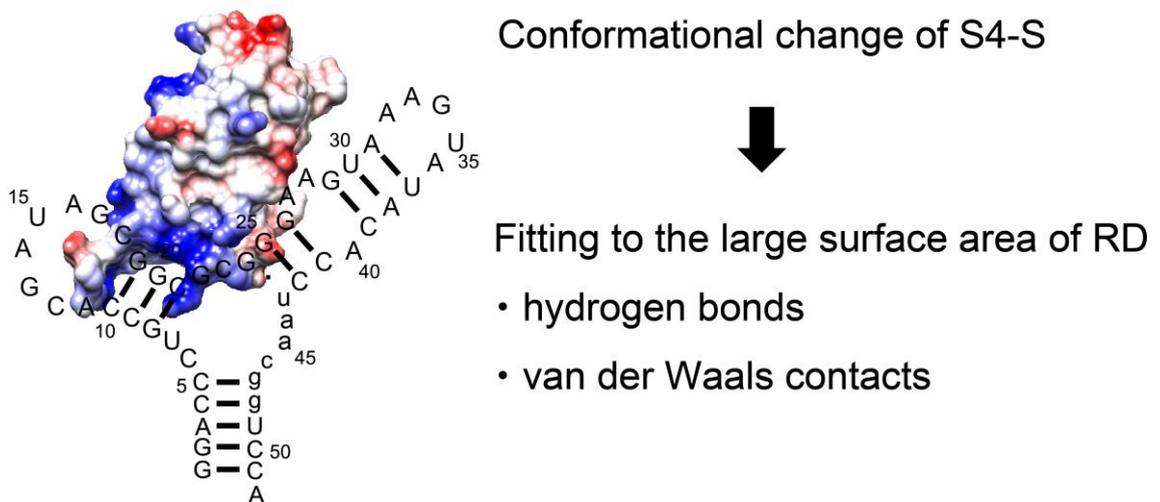


Fig. 4-13 S4-S と RD との相互作用機序の考察

第5章 総括

5-1 本研究により得られた知見

RNA aptamer は様々な標的分子に対して高い親和性と特異性を示す。そのため、現在では、抗体に次ぐバイオ医薬品として期待されている。しかしながら、RNA aptamer を取得するための SELEX 法は、研究者の経験と実験の試行錯誤に頼るところが大きく、時間と労力がかかる。さらに、低分子化合物とは異なり、標的分子との相互作用の解析例が少なく、相互作用情報の不足しているため、現時点での aptamer の合理的な高機能化は非常に難しい。これらのことが RNA aptamer を医薬品とする上で、大きな足枷となっている。そこで、本研究では、生物物理学的な解析技術を新しく導入することで、SELEX 過程をモニタリングするための新規手法の開発と RNA aptamer と標的分子の相互作用の機序の解明を目指した。

本学位論文では、はじめに、RD に対する新規の高親和性 RNA aptamer の取得を試みた（第2章）。その際、高塩濃度条件下で RD に対して SELEX 実験を行った。その結果、11 個の新規の高親和性 RNA aptamer (S1-S11) を得ることができた。これら S1-S11 は、RD の内在性標的である RDE および現在までに報告されているどの aptamer よりも RD に対する非常に高い結合親和性を示した (Fig. 1-5 および 1-8)。それぞれの SELEX 実験の条件の比較から、選別工程の塩濃度を上げたことが結合親和性の高い aptamer の取得成功に繋がったことが示唆された。

次に、NMR を用いることで、SELEX 過程の各 Round の RNA pool における RNA aptamer の濃縮の新規モニタリング手法を開発した（第3章）。この手法では、既存のモニタリング法において必要であった 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も必要とせず、SELEX 実験中に調製した RNA pool を用いるこ

とができる。また、モニタリングのための操作自体、簡便な NMR スペクトルを測定するだけなので、1-2 時間程度でモニタリングが可能である。加えて、モニタリングした試料を NMR チューブから回収し、直接、次の Round に用いることができる。さらに、NMR チューブ中の RNA pool に標的分子を加えることで、結合をスペクトルの変化として検出できるため、濃縮された aptamer の結合性を同時に判別できる。以上の特徴から、この NMR モニタリングを使用することで、SELEX 実験の効率化を図れることが期待できる。実際に、第 2 章で得られた RNA pool を用いてモニタリングしたところ、SPR 法を用いた結合親和性の評価や次世代シーケンサーを用いた HTS 解析と同じ Round において、RNA aptamer の濃縮を検出できたことから、NMR を用いた本手法が SELEX 過程のモニタリングに有効な方法であることが判明した。

最後に、SPR 法および ITC 法という生物物理学的な解析手法を用いることで、第 2 章で得られた S1-S11 の中で最も結合親和性の高かった S4 と RD との相互作用の機序の解明を試みた（第 4 章）。はじめに、二次構造の予測結果に基づいて、S4 の余分な領域の配列を切り取り、S4-S を作製した。次に、この S4-S と RD との結合を SPR 法および ITC 法を用いて速度論的および熱力学的に解析した。その結果、結合初期（会合時）には、負に帯電した S4-S と RD の塩基性アミノ酸残基の間の比較的長距離の静電的相互作用を用いて結合することが示唆された。さらに、会合後は、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 の表面と構造相補的に結合するという相互作用機序が示唆された。このように、SPR 法や ITC 法といった解析手法を用いることで、RNA aptamer と標的タンパク質の相互作用機序を明らかにすることができた。NMR や X 線結晶構造解析による立体構造決定が難しい RNA aptamer および標的分子との複合体においては、詳細な相互作用情報を得る上で、本研究で用いた解析手法は非常に有効であると考えられる。

5-2 今後の展望

本学位論文では、NMR、SPR 法および ITC 法といった生物物理学的な解析技術を新しく導入することで、SELEX 法や RNA aptamer の研究における課題を解決することができた。具体的には、NMR モニタリングを用いることで、RNA aptamer の濃縮過程を簡便かつ迅速にモニタリングすることができるため、余分な Round を行わずに済み、SELEX 実験に費やす多くの時間と労力を軽減できた。さらに、SPR 法および ITC 法を用いることで、分子間相互作用の機序について有用な情報を得ることに成功した。今後、このような相互作用情報を蓄積していくことで、将来、RNA aptamer の合理的な最適化という課題を達成できると自負している。

本研究で新しく開発した NMR モニタリングは、SELEX 過程における各 Round の RNA pool 中の aptamer の濃縮を検出するために非常に有効な手法である。しかしながら、本研究では 1 例の SELEX 実験でしか試せていない。今後は、既往および新規問わず、さらに標的分子の違いだけではなく、Cell-SELEX、capillary electrophoresis (CE)-SELEX あるいは Tailored-SELEX (primerless-SELEX) など異なる手法からなる SELEX 実験に対しても、この NMR モニタリング手法を積極的に活用していく。異なる SELEX 実験では、初期の RNA pool の NMR スペクトルやその後のシグナル変化のパターンは異なるものの、RNA aptamer が濃縮されていけば、RNA aptamer 由来の新しいイミノプロトンシグナルが出現すると予想される。さらに、標的分子の結合におけるイミノプロトンスペクトルの変化は、RNA aptamer が濃縮されている RNA pool と濃縮されていない RNA pool では明確に区別できる。モニタリング例を増やし、様々な SELEX 条件における NMR スペクトルの形状や変化パターンを蓄積していくことで、簡便さや迅速性を損なうことなく、より詳細なモニタリングが可能になると期待される。さらに、様々な RNA の構造モチーフのイミノプロトンスペクトルを網羅的に測定し、それらのスペクトルと SELEX 過程の RNA pool のスペクトルを比較することで、RNA

pool にどのような構造モチーフをもつ RNA が濃縮されてきているかを判別することが可能となる。また、近年では、RNA aptamer よりも安定性が高く扱いやすい DNA aptamer の研究も盛んに行われている。NMR モニタリングは、理論上、DNA aptamer に対しても RNA aptamer と同様に有効であり、構造を形成した DNA の濃縮をイミノプロトンスペクトルの変化としてモニタリングすることが可能である。さらに、近年開発された In NMR tube transcription (INTT) 法と組み合わせることも有効である[72]。INTT 法では、NMR チューブの中で RNA を転写し、その後、RNA の精製を行わずに NMR 測定を行うため、NMR モニタリングにかかる RNA pool の精製に費やす時間を除くことができ、さらに簡便性および迅速性の向上を図ることができると期待される。

RNA aptamer と標的分子との相互作用の解析に、SPR 法や ITC 法といった解析技術を導入することは非常に有効であり、それによって得られた知見は、aptamer の修飾や最適化にとって価値のある情報になる。そのため、今後、様々な研究者がこれらの解析技術を導入することが期待される。一方、現状、相互作用情報の蓄積がほとんどないため、本研究の情報だけで合理的な修飾や最適化を行うことは難しい。したがって、具体的に S4-S の RD に対する結合親和性を向上させる修飾や最適化を行うためには、NMR や X 線結晶構造解析を用いて、S4-S の単体および S4-S と RD の複合体の立体構造を決定しなければならない。ただし幸いなことに、本研究対象である RD は、X 線結晶構造解析によって DNA との複合体の立体構造がすでに明らかにされている。したがって、RNA aptamer との複合体においても、結晶構造を決定できる可能性が高いと考えている。今後、S4-S の単体および S4-S と RD の複合体の立体構造を決定し、その構造情報と本研究で得られた相互作用情報に基づいて、様々な修飾塩基を導入していき、結合親和性を向上できた最初の RNA aptamer 例としたい。

参考文献

1. Ellington, A. D. & Szostak, J. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822 (1990).
2. Robertson, D. L. & Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded-DNA. *Nature* **344**, 467-468 (1990).
3. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment-RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase. *Science* **249**, 505-510 (1990).
4. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* **24**, 381-403 (2007).
5. Szeitner, Z., András, J., Gyurcsányi, R. E. & Mészáros, T. Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *J Pharm Biomed Anal.* **101**, 58-65 (2014).
6. Ozer, A., Pagano, J. M. & Lis, J. T. New Technologies Provide Quantum Changes in the Scale, Speed, and Success of SELEX Methods and Aptamer Characterization. *Mol Ther Nucleic Acids.* **3**, e183 (2014).
7. Kato, K. *et al.* Structural basis for specific inhibition of Autotaxin by a DNA aptamer. *Nat Struct Mol Biol.* **23**, 395-401 (2016).
8. Jin, L., Nonaka, Y., Miyakawa, S., Fujiwara, M. & Nakamura, Y. Dual Therapeutic Action of a Neutralizing Anti-FGF2 Aptamer in Bone Disease and Bone Cancer Pain. *Mol Ther.* 10.1038/mt.2016.158 (2016).
9. Mondragón, E. & Maher, L. J. 3rd. Anti-Transcription Factor RNA Aptamers as Potential Therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* **26**, 29-43 (2016).

10. Que-Gewirth, N. S. & Sullenger, B. A. Gene therapy progress and prospects: RNA aptamer. *Gene Therapy* **14**, 283-291 (2007).
11. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. D. Aptamers as therapeutics. *Drug discovery* **9**, 537-548 (2010).
12. Zhou, J. & Rossi, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* **16**, 181-202 (2017).
13. Ng, E. W. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* **5**, 123-132 (2006).
14. Nimjee, M. S., Rusconi, C. P., Sullenger, B. A. The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications, S. Klussmann, Ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2006), chap. 6, pp. 131-166.
15. Gold, L. *et al* Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One.* **5**, e15004.
16. Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K., Yokoyama, S. & Hirao, I. Generation of highaffinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat Biotechnol.* **31**, 453-457 (2013).
17. Healy, J M. *et al* Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res.* **21**, 2234-2246 (2004).
18. Zimmermann, B., Gesell, T., Chen, D., Lorenz, C. & Schroeder, R. Monitoring genomic sequences during SELEX using high-throughput sequencing: neutral SELEX. *PLoS One.* **5**, e9169 (2010).

19. Spiga, F. M., Maietta, P. & Guiducci, C. More DNA-Aptamers for Small Drugs: A Capture-SELEX Coupled with Surface Plasmon Resonance and High-Throughput Sequencing. *ACS Comb Sci.* **17**, 326-333 (2015).
20. Gu, G., Wang, T., Yang, Y., Xu, X. & Wang, J. An improved SELEX-Seq strategy for characterizing DNA-binding specificity of transcription factor: NF- κ B as an example. *PLoS One.* **8**, e76109 (2013).
21. Dupont, D. M., Larsen, N., Jensen, J.K., Andreasen, P.A. & Kjems, J. Characterisation of aptamer-target interactions by branched selection and high-throughput sequencing of SELEX pools. *Nucleic Acids Res.* **43**, e139 (2015).
22. Takahashi, M. *et al.* High throughput sequencing analysis of RNA libraries reveals the influences of initial library and PCR methods on SELEX efficiency. *Sci Rep.* **6**, 33697; 10.1038/srep33697 (2016).
23. Ditzler, M. A. *et al.* High-throughput sequence analysis reveals structural diversity and improved potency among RNA inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1873-1884 (2013).
24. Vanbrabant, J., Leirs, K., Vanschoenbeek, K., Lammertyn, J. & Michiels, L. reMelting curve analysis as a tool for enrichment monitoring in the SELEX process. *Analyst.* **139**, 589-595 (2014).
25. Müller, J., El-Maarri, O., Oldenburg, J., Pötzsch, B. & Mayer, G. Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* **390**, 1033-1037 (2008).

26. Misono, T. S. & Kumar, P. K. Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal Biochem.* **342**, 312-317 (2005).
27. Horii, K., Omi, K., Yoshida, Y., Imai, Y., Sakai, N., Oka, A., Masuda, H., Furuichi, M., Tanimoto, T. & Waga, I. Development of a sphingosylphosphorylcholine detection system using RNA aptamers. *Molecules.* **15**, 5742-5755 (2010).
28. Yoshida, W. *et al.* Selection of DNA aptamers against insulin and construction of an aptameric enzyme subunit for insulin sensing. *Biosens Bioelectron.* **24**, 1116-1120 (2009).
29. Wang, C., Yang, G., Luo, Z. & Ding, H. In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin. *Acta Biochim Biophys Sin.* **41**, 335-340 (2009).
30. Cao, X. *et al.* Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4621-4628 (2009).
31. Dausse, E. *et al.* HAPIScreen, a method for high-throughput aptamer identification. *J Nanobiotechnology.* **9**; 10.1186/1477-3155-9-25 (2011).
32. Mencin, N. *et al.* Optimization of SELEX: comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers. *J Pharm Biomed Anal.* **91**, 151-159 (2014).
33. Yufa, R. *et al.* Emulsion PCR significantly improves nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures-based aptamer selection: allowing for efficient and rapid selection of aptamer to unmodified ABH2 protein. *Anal Chem.* **87**, 1411-1419 (2015).

34. Ohuchi, S. P., Shibuya, M. & Nakamura, Y. The RNA aptamer inhibiting human vesicular endothelial growth factor receptor 1 without affecting cytokine binding. *Biochemistry*. **53**, 2274-2279 (2013).
35. Wang, J. *et al.* Particle Display: A Quantitative Screening Method for Generating High-Affinity Aptamers, *Angew. Chem.* **126**, 4896-4901 (2014).
36. Qu, H. *et al.* Rapid and Label-Free Strategy to Isolate Aptamers for Metal Ions, *ACS Nano*. **10**, 7558-7565 (2016).
37. Gelinas, A. D., Davies, D. R. & Janjic, N. Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol.* **36**, 122-132 (2016).
38. Parker, L. J. *et al* Flexibility of the P-loop of Pim-1 kinase: observation of a novel conformation induced by interaction with an inhibitor. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **68**, 860-866 (2012).
39. Fukunaga, A. & Tsumoto, K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 773-780 (2013).
40. Freire, E. A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. *Chem Biol Drug Des.* **74**, 468-472 (2009).
41. Ennifar, E. *et al.* Structure-guided discovery of a novel aminoglycoside conjugate targeting HIV-1 RNA viral genome. *ACS Chem Biol.* **8**, 2509-2517 (2013).
42. Mikhail, F. M., Sinha, K. K., Sauntharajah, Y. & Nucifora, G. Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *J. Cell Physiol.* **207**, 582-593 (2006).
43. Speck, N. A. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 192-196 (2001).

44. de Bruijn, M. F. & Speck, N. A. Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene*. **23**, 4238-4248 (2004).
45. Collins, A., Littman, D. R. & Taniuchi, I. RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol*. **9**, 106-115 (2009).
46. Bravo, J., Li, Z., Speck, N. A. & Warren, A. J. The leukemia-associated AML1 (Runx1)-CBF beta complex functions as a DNA-induced molecular clamp. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 371-378 (2001).
47. Marcelo, J. B. *et al.* The Ig fold of the core binding factor a Runt domain is a member of a family of structurally and functionally related Ig-fold DNA-binding domains *Structure* **7**, 1247-1256 (1999).
48. Nagata, T. *et al.* Immunoglobulin motif DNA recognition and heterodimerization of the PEBP2/CBF Runt domain. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 615-619 (1999).
49. Tahirov, T.H. *et al.* Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell* **104**, 755-767 (2001).
50. Bäckström, S. *et al.* The RUNX1 Runt domain at 1.25Å resolution: a structural switch and specifically bound chloride ions modulate DNA binding. *J. Mol. Biol.* **322**, 259-272 (2002).
51. Gelmetti, V. *et al.* Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7185-7191 (1998).
52. Lutterbach, B. *et al.* ETO, a target of t (8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7176-7184 (1998).

53. Wang, J., Hoshino, T., Redner, R. L., Kajigaya, S. & Liu, J. M. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 10860-10865 (1998).
54. Westendorf, J. *et al.* The t (8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP- α , inhibits C/EBP- α -dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 322-333 (1998).
55. Mao, S. *et al.* Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t (8;21)-positive leukemias. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3635-3644 (1999).
56. Elagib, K. E. *et al.* RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation, *Blood* **101**. 4333-4341 (2003).
57. Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S., Chait, B. T. & Roeder, R. G. E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* **305**, 1286-1289 (2004).
58. Gardini, A. *et al.* AML1/ETO oncoprotein is directed to AML1 binding regions and co-localizes with AML1 and HEB on its targets. *PLoS Genet.* **4**, e1000275 (2008).
59. Guo, C., Hu, Q., Yan, C. & Zhang, J. Multivalent binding of the ETO corepressor to E proteins facilitates dual repression controls targeting chromatin and the basal transcription machinery. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2644-2657 (2009).
60. Martens, J. H. *et al.* ERG and FLI1 binding sites demarcate targets for aberrant epigenetic regulation by AML1-ETO in acute myeloid leukemia. *Blood* **120**, 4038-4048 (2012).
61. Wang, L. *et al.* The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. *Science* **333**, 765-769 (2011).

62. Shia, W. J. *et al.* PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* **119**, 4953-4962 (2012).
63. Sun, X. *et al.* A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis. *Nature* **500**, 93-97 (2013).
64. Fukunaga, J., Nomura, Y., Tanaka, Y., Amano, R. *et al.* The Runt domain of AML1 (RUNX1) binds a sequence-conserved RNA motif that mimics a DNA element. *RNA*, **19**, 927-936 (2013).
65. Nomura, Y. *et al.* Solution structure of a DNA mimicking motif of an RNA aptamer against transcription factor AML1 Runt domain. *J. Biochem.* **154**, 513-519 (2013).
66. 天野亮, 修士学位論文 (2014)
67. Barton, J. L. *et al.* Characterization of RNA aptamers that disrupt the RUNX1-CBFBeta/DNA complex. *Nucleic Acids Res.* **37**, 6818-6830 (2009).
68. Dawson, W., Fujiwara, K., Futamura, Y., Yamamoto, K. & Kawai, G. A method for finding optimal RNA secondary structures using a new entropy model (vsfold). *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids* **25**, 171-189 (2006).
69. Dawson, W., Takai, T., Ito, I., Shimizu, K. & Kawai, G. A new entropy model for RNA: part III, Is the folding free energy landscape of RNA funnel shaped? *Journal of Nucleic Acids Investigation* **5**, 2652 (2014).
70. Ruigrok, V. J. *et al.* Kinetic and stoichiometric characterisation of streptavidin-binding aptamers. *Chembiochem.* **13**, 829-836 (2012).
71. Tsuji, S. *et al.* Effective isolation of RNA aptamer through suppression of PCR bias. *Biochem Biophys Res Commun.* **386**, 223-226 (2009).

72. Okui, S. & Kawai, G. In NMR tube transcription for rapid screening of RNA conformation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **34**, 103-113 (2015).
73. Helmling, C. *et al.* Rapid NMR screening of RNA secondary structure and binding. *J Biomol NMR*. **63**, 67-76 (2015).
74. Varani, G., Aboul-ela, F. & H.-T. Allain, F. NMR investigation of RNA structure. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. **29**, 51-127 (1996).
75. Kearns, D. R., Patel, D. J. & Shulman, R. G. High resolution nuclear magnetic resonance studies of hydrogen bonded protons of tRNA in water. *Nature*. **229**, 338-339 (1971).
76. Schimmel, P. R. & Redfield, A. G. Transfer RNA in Solution: Selected Topics. *Annu Rev Biophys Bioeng*. **9**, 181-221 (1980).
77. Reid, B. R. NMR studies on RNA structure and dynamics. *Annu Rev Biochem*. **50**, 969–996 (1981).
78. Sklenar, V. & Bax, A. Spin-echo water suppression for the generation of pure-phase two-dimensional NMR spectra. *J Magn Reson* **74**, 469-479 (1987).
79. Vater, A., Jarosch, F., Buchner, K. & Klussmann, S. Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: Tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res*. **31**, e130 (2003).
80. Jarosch, F., Buchner, K. & Klussmann, S. In vitro selection using a dual RNA library that allows primerless selection. *Nucleic Acids Res*. **34**, e86 (2006).
81. McInerney, P., Adams, P. & Hadi, M. Z. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA polymerase. *Mol Biol Int*. 10.1155/2014/287430 (2014).

82. Mashima, T. *et al.* Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1355-1362 (2013).
83. Yamaoki, Y., Nagata, T., Mashima, T. & Katahira, M. K (+)-Responsive off-to-on switching of hammerhead ribozyme through dual G-quadruplex formation requiring no heating and cooling treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* **468**, 27-31(2015).
84. Fujii, T., Podbevšek, P., Plavec, J. & Sugimoto, N. Effects of metal ions and cosolutes on G-quadruplex topology. *J Inorg Biochem.* **166**, 190-198 (2017).
85. Battiste, J. L. *et al.* Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science* **273**, 1547-1551 (1996).
86. Jayaraman, B., Mavor, D., Gross, J. D. & Frankel, A. D. Thermodynamics of Rev-RNA Interactions in HIV-1 Rev-RRE Assembly. *Biochemistry* **54**, 6545-6554 (2015).
87. Kamatari, Y. O. *et al.* Identification and characterization of a multispecific monoclonal antibody G2 against chicken prion protein. *Protein Sci.* **23**, 1050-1059 (2014).
88. Potty, A. S. *et al.* Biophysical characterization of DNA aptamer interactions with vascular endothelial factor. *Biopolymers* **91**, 145-156 (2009).
89. Mounier, C. M. *et al.* Inhibition of prothrombinase by human secretory phospholipase A2 involves binding to factor Xa. *J Biol Chem.* **273**, 23764-23772 (1998).
90. Mouratou, B. *et al.* Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 17983-17988 (2007). Turnbull, W. B., Daranas, A. H., Krainer, G. & Keller, S. On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc.* **125**, 14859-14866 (2003).

91. Krainer, G. & Keller, S. Single-experiment displacement assay for quantifying high-affinity binding by isothermal titration calorimetry. *Methods* **76**, 116-123 (2015).
92. Tellinghuisen, J. Optimizing Experimental Parameters in Isothermal Titration Calorimetry. *J Phys Chem B*. **109**, 20027-20035 (2005).
93. Velázquez, C. A. & Freire, E. ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophys Chem*. **115**, 115-124 (2005). Oda, M. & Nakamura, H. Thermodynamic and kinetic analyses for understanding sequence-specific DNA recognition. *Genes to Cells* **5**, 319-326 (2000).
94. Tang, Q., Su, X. & Loh, K. P. Surface plasmon resonance spectroscopy study of interfacial binding of thrombin to antithrombin DNA aptamers. *J Colloid Interface Sci*. **315**, 99-106 (2007).
95. Su, X. *et al.* Combinational application of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance for studying nuclear hormone receptor-response element interactions. *Anal Chem*. **78**, 5552-5558 (2006).
96. Miyakawa, S. *et al.* Structural and molecular basis for hyperspecificity of RNA aptamer to human immunoglobulin G. *RNA* **14**, 1154-1163 (2008).
97. Nomura, Y. *et al.* Conformational plasticity of RNA for target recognition as revealed by the 2.15 Å crystal structure of a human IgG-aptamer complex. *Nucleic Acids Res*. **38**, 7791-7799 (2010).
98. Sokolosk, J. E., Dombrowski, S. E. & Bevilacqua, P. C. Thermodynamics of Ligand Binding to a Heterogeneous RNA Population in the Malachite Green Aptamer. *Biochemistry* **51**, 565-572 (2012).

99. Freisz, S. *et al.* Sequence and structure requirements for specific recognition of HIV-1 TAR and DIS RNA by the HIV-1 Vif protein. *RNA Biol.* **9**, 966-977 (2012).
100. Bec, G. *et al.* Thermodynamics of HIV-1 reverse transcriptase in action elucidates the mechanism of action of non-nucleoside inhibitors. *J Am Chem Soc.* **135**, 9743-9752 (2013).
101. Nagatoishi, S., Tanaka, Y., Kudou, M. & Tsumoto, K. The interaction of hyperthermophilic TATA-box binding protein with single-stranded DNA is entropically favorable and exhibits a large negative heat capacity change at high salt concentration. *Mol Biosyst.* **5**, 957-961 (2009).
102. Da Costa, J. B., Andreiev, A. I. & Dieckmann, T. Thermodynamics and kinetics of adaptive binding in the malachite green RNA aptamer. *Biochemistry* **52**, 6575-6583 (2013).
103. Lin, P. H. *et al.* Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **88**, 552-558 (2011).
104. Potty, A. S., Kourentzi, K., Fang, H., Schuck, P. & Willson, R. C. Biophysical characterization of DNA and RNA aptamer interactions with hen egg lysozyme. *Int J Biol Macromol.* **48**, 392-397 (2011).

研究業績

主論文

1. Ryo Amano, Kenta Takada, Yoichiro Tanaka, Yoshikazu Nakamura, Gota Kawai, Tomoko Kozu and Taiichi Sakamoto

Kinetic and Thermodynamic Analyses of Interaction between a High-Affinity RNA Aptamer and its Target Protein.

Biochemistry, **55**, 6221-6229, 2016

本論第 2 章および第 4 章全体に相当

2. Ryo Amano, Kazuteru Aoki, Shin Miyakawa, Yoshikazu Nakamura, Tomoko Kozu, Gota Kawai and Taiichi Sakamoto

NMR monitoring of the SELEX process to confirm enrichment of structured RNA.

Scientific Reports, **7**, 283, 2017

本論第 3 章全体に相当

学会発表

国際会議発表 (3 件)

1. Ryo Amano, Yusuke Nomura, Takashi Nagata, Naohiro Kobayashi, Yoko Mori, Junichi Fukunaga, Yoichiro Tanaka, Masato Katahira, Yoshikazu Nakamura, Tomoko Kozu and Taiichi Sakamoto.

NMR analyses of RNA-peptide complexes for the development of biomolecules which regulate gene expression.

The 6th International Symposium of Advanced Energy Science, Kyoto, JAPAN (2015.8)
[POSTER]

2. Ryo Amano, Kenta Takada, Yoichiro Tanaka, Takashi Nagata, Masato Katahira, Yoshikazu Nakamura, Tomoko Kozu and Taiichi Sakamoto.

Binding properties of RNA aptamer that binds to the transcription factor AML1 Runt Domain.

The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Osaka, JAPAN (2016.1) [POSTER]

3. Ryo Amano, Kenta Takada, Yoichiro Tanaka, Takashi Nagata, Masato Katahira, Yoshikazu Nakamura, Tomoko Kozu and Taiichi Sakamoto.

Binding properties of high-affinity RNA aptamers against AML1 Runt domain.

RNA 2016, Kyoto, JAPAN (2016.6) [POSTER]

国内学会発表（4件）

1. 天野亮, 高田健多, 武田有未, Smith, C. A., 坂本泰一
HIV-1 RRE RNA と Rev 変異体の相互作用の解析
第17回日本RNA学会年会, 北海道 (2015.7) [ポスター]
2. 天野亮, 高田健多, 青木一晃, 宮川伸, 中村義一, 神津知子, 坂本泰一
SELEX の各ラウンドの RNA プールの NMR 解析
第54回 NMR 討論会, 千葉 (2015.11) [ポスター]
3. 天野亮, 高田健多, 青木一晃, 宮川伸, 中村義一, 神津知子, 坂本泰一
SELEX の各ラウンドの RNA プールの NMR 解析
BMB2015, 兵庫 (2015.12) [ポスター]
4. 天野亮, 高田健多, 田中陽一郎, 永田崇, 片平正人, 中村義一, 神津知子,
坂本泰一
**転写因子 AML1 の DNA 結合部位を標的とする高親和性 RNA アプタマーの開発
と解析**
第5回日本生物物理学会関東支部会, 群馬 (2016.3) [口頭]

謝辞

本研究を行うにあたり，配属されてからの約7年間，恵まれた環境を与えてくださり，温かくご指導くださいました，本学教授の坂本泰一博士に心より深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり，様々なご指導，ご助言をくださいました本学教授の河合剛太博士には心より感謝いたします。

この研究において，東京大学医科学研究所名誉教授および株式会社リボミック代表取締役社長の中村義一博士，埼玉県立がんセンターの神津知子博士，宮川伸博士，横浜国立大学の田中陽一郎博士，株式会社リボミックの青木一晃博士には様々なご指導，ご助言を与くださり，大変お世話になりました。心より感謝いたします。

博士学位審査の折に，副査をしていただきました東京学芸大学教授の原田和雄博士，本学教授の村上和仁博士，本学准教授の寺本直純博士に深く感謝いたします。

また，貴重な助言やご指導をしてくださいました，京都大学教授の片平正人博士，京都大学准教授の永田崇博士，大阪大学特任准教授の小林直宏博士，本学客員研究員の竹中章郎博士に深く感謝いたします。

配属当初，右も左もわからないとき，貴重なご指導，ご助言をしてくださいました国立医薬品食品衛生研究所研究員の野村祐介博士に深く感謝いたします。

本研究を共に進め，様々な研究議論を交わした高田健多氏，また博士課程の学生生活を共にした仲間たちに深く感謝いたします。

最後に，千葉工業大学に入学してからの約10年間，経済面や健康を気遣ってくれ，温かい目で見守ってしてくれた家族，精神面で支えてくれた大切な友人たち，博士の学位取得までに出会った全ての方々に心より深く感謝いたします。

付録 zg0jr.g のパルスプログラムおよびパルスシーケンス

```
#include <Avance.incl>

"d9=50u"
"acqt0=-p0*2/3.1416"

1 ze
2 30m
  d1
  p0 ph1
  d9
  p1 ph2:r
  go=2 ph31
  30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=2 0 0 2 3 1 1 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p0 : 90 deg pulse (jump)
;p1 : 90 deg pulse (return)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : delay for jump and return [50 usec]
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
```

