

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目

次世代型核酸医薬を志向した短鎖核酸によるタンパク質間相互作用の可逆的制御法および遺伝子発現制御技術の開発

熊本大学大学院自然科学教育部 工学専攻 物質生命化学教育プログラム
(主任指導 井原 敏博 教授)

論文提出者 嘉村 匠人

主論文要旨

西洋医学と言われる分野が発達して以降現在に至るまで、患者を治療する薬の大半は小分子化合物であった。しかし 2020 年以降上市される新規小分子医薬品は、毎年全世界で数個にとどまる事態となってしまう。この原因は①小分子化合物の標的が枯渇状態にある、②小分子化合物の多様性が限界に達している、という点に集約できる。このような背景から、創薬領域の研究において「モダリティ」という分野に大きな注目が集まっており、本研究においては核酸医薬に区分される「RNA アプタマー」と「Staple 核酸」に焦点を当てて開発に取り組んだ。

本論文は全 5 章から構成されており、第 1 章では関連分野の研究動向及び本研究の着想に至った背景を述べた。

第 2 章においてはタンパク質-タンパク質相互作用 (Protein-Protein Interaction : PPI) に作用を及ぼす RNA アプタマーの開発に関する結果を報告した。

近年、生体内に存在するタンパク質は単体で機能を発揮するのみではなく、複数のタンパク質が結合・解離して高度な生体機能を制御しているという事実が明らかになってきている。この PPI は約 65 万種類を超えるということが予想されている一方で、PPI 制御分子の開発は非常に困難を極めている。PPI と疾病との関連性が次々と明らかにされている現状を鑑みると、狙った PPI を制御することが可能な分子を見出す汎用性の高い手法を開発することで医薬品開発分野の大きな可能性になることは間違いない。

PPI 制御分子の開発が難しい最大の理由は、PPI が「浅くて広い」相互作用面で構成されることにある。現在のタンパク質制御分子の代表格は小分子化合物だが、高選択的に標的タンパク質に結合するためには固有の「深くて狭い」溝にはまり込む必要がある。これに反する PPI 作用面は小分子化合物との相性が悪く、化合物ライブラリースクリーニングなどを展開しても、高選択的標的 PPI 制御分子を見出すことは難しい。

そこで本報告においては PPI 形成に重要なペプチドに対する RNA アプタマーを取得し、

PPI 制御を可能とする分子を見出す手法の開発に取り組んだ。具体的には splitGFP11 に結合する RNA アプタマーを取得し、splitGFP11 と splitGFP1-10 の結合・解離を制御した。splitGFP1-10 と splitGFP11 が複合体形成時には緑色蛍光を発生し、解離時には蛍光発光を失う。つまり RNA アプタマーが結合した splitGFP11 は splitGFP1-10 と再構成することができず、蛍光発光が回復しない。さらに取得した RNA アプタマーは配列がわかっているので、その相補鎖を添加し速やかに splitGFP11 と splitGFP1-10 再構成阻害効果を打ち消すことができる。実際に取得した RNA アプタマーに対する相補鎖を導入することで splitGFP の大きな蛍光回復を確認することに成功している。これら結果に関する詳細を同章にて報告した。

第 3 章では小分子化合物の「新しい標的」となり得る構造体として着目されている RNA G-quadruplex (RGq) に関する報告を行なった。

mRNA は複雑な高次構造を形成することで種々の機能を発揮していることが報告されている。その中でもグアニン繰り返し配列が多数存在することで構築される RGq は、試験管レベルの検討においてリボソームのアミノ酸伸長反応を阻害することが知られており、非常に大きな注目を集めている。その一方で細胞内 mRNA において「どの遺伝子のどの位置で RGq が構築されているか」という疑問に対して明確に答えを提示できる論文は少ない。本論文ではこの点に着目し、先行研究で開発された RGq 選択的結合分子 RGB-1 を利用して細胞内 RGq の網羅的探索法の開発に取り組むことにした。

具体的には RGB-1 を細胞に加え、タンパク質発現量をプロテオーム解析により網羅的に評価した。その結果、いくつかの遺伝子発現量が RGB-1 の存在により低下していることが明らかになった。遺伝子発現量が低下した遺伝子に対してさらに詳細な検討を行なったところ、がん関連遺伝子である CAPG や NECTIN-4 遺伝子において今まで存在が知られていなかった RGq の存在を見出すことに成功した。これら結果に関する詳細を同章にて報告した。第 4 章では第 3 章で見出した知見を利用して「Staple 核酸」の開発に取り組んだ結果に関する報告を行なった。

RGq の同定に関しては計算科学に基づいて見出す手法が一般的である。その中でも RGq 形成ルールとして最も広く知られている法則が「グアニン塩基が 3 塩基以上連続するものが 4 箇所存在し、そのグアニン繰り返し配列を繋ぐループ領域の塩基数は 7 塩基未満である」というものである。しかし第 3 章において報告した CAPG 遺伝子や NECTIN-4 遺伝子の RGq は 7 塩基以上のループ領域を有していた。これらの結果は mRNA が複雑な高次構造を形成した結果、ループ領域の塩基数に関わらずグアニン繰り返し配列が近接していたことに起因しているものと考えている。この事実を踏まえると、離れた位置に存在するグアニン繰り返し配列を何らかの方法で強制的に近接させることで人工的に RGq の形成を誘導し、結果、タンパク質翻訳反応の抑制が可能になるのではないかと考えた。このように、狙った遺伝子の高次構造を変化させることで薬効を発揮する核酸医薬（我々はこの短鎖核酸を Staple 核酸と命名）は皆無であったことから、我々は新規核酸医薬へと発展させることを目標として研究開発を進めることにした。

本章においては肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子として知られている TRPC6 を標的遺

伝子として **Proof of Concept** を行なった結果を報告している。試験管レベルの検討において標的遺伝子上で **Staple** 核酸が **RGq** の形成を誘導していることを確認し、動物レベルの検討においても既存の核酸医薬の効果を圧倒的に凌駕するほど良好な結果を得ることに成功した。

また、**Staple** 核酸が既存の核酸医薬と比較して優位に立つ可能性がある点は標的遺伝子に対する選択性である。既存の核酸医薬は標的遺伝子に結合し酵素反応と連動することで機能を発揮する。従って、標的外の遺伝子に結合してしまうと「オフ・ターゲット効果」と呼ばれる副作用を発現してしまう。一方で **Staple** 核酸が機能を発揮するためには i)標的遺伝子に結合する、ii)近傍に存在する 4 箇所のグアニン繰り返し配列を近接化する、という 2 つの要素を満たす必要がある。標的外に結合してしまっても 4 箇所のグアニン繰り返し配列が存在することはほぼ皆無であり、極めてオフ・ターゲット効果が小さいことが期待できる。この点を評価するためにタンパク質発現網羅的解析やマイクロアレイ解析を行なったが、顕著なオフ・ターゲット効果は確認されなかった。これら結果に関する詳細を同章にて報告した。

第 5 章ではこれらの成果を総括するとともに、今後の展開について記述した。