

(様式第9 別紙2:公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 西川 富美子
2. 養成カリキュラム名: 無細胞系ならびに細胞系における新機能性核酸の応用研究
3. 養成カリキュラムの達成状況

C型肝炎(HCV)RNAウイルスは、非A非B型肝炎の病原体で、数100万人以上(米国 約400万人、日本 約200万人推定)が感染しており、その治療法としては、インターフェロンの長期投与、リバルビンの併用が現状であり、他のより有効な抗ウイルス剤が望まれている。HCV RNAから翻訳される蛋白の内、非構造蛋白質の一つ、NS3は、protease domain(N末端から全体の1/3)、helicase domain(C末端から2/3)から構成され、これらの二つの機能活性より、ウイルスの増殖過程におけるprotein processing, RNA replicationに重要な役割をしており、有用な抗HCV剤の標的と考えられた。我々は、既に*in vitro* selectionの手法を用い、特異的にNS3 protease domainに結合し、*in vitro*でプロテース活性を阻害するRNAアプタマー(G9-I,II,III)を獲得、報告しており、今回その活性構造の解析(G9-I)、応用として培養細胞でのアッセイ系の確立、ならびにRNAアプタマー(G9-I,II,III)の発現系を工夫し、論文として報告した。

更に二つの機能(プロテース活性、ヘリケース活性)を阻害するRNAアプタマーを構築する目的で、HCV RNAの複製に大きくかかわっているhelicase domainを標的としたRNAアプタマーを、*in vitro* selectionの手法により取得し、それらの構造、活性について解析した。

4. 成果(A4版3枚程度)

HDVリボザイムの位置特異的変異体の化学合成

ヒトデルタ型肝炎ウイルス(HDV)リボザイムの活性構造を明らかにするため、本年度修得したNAIM法を発展させ、位置特異的に修飾ヌクレオチドを導入したHDVリボザイムの化学合成し、官能基レベルでの機能解析を行い、論文にまとめた(論文)

NS3アプタマーG9-Iの活性構造の解析

NS3 protease domainに特異的に結合するRNAアプタマーG9-I, II, IIIは共通保存loop領域をもち、そこはNS3との結合に必須であり、その部位でのNS3 protease domainとの結合が考えられる。更に全体の構造、活性構造に関与している各核酸の官能基を検出するために、NAIM(nucleotide analog interference mapping)

の手法を用いて、G9-1における、蛋白とのコンプレックスを形成する上での重要な官能基を明らかにした。その結果、保存 loop 領域内の多くの ribose 2 OH の関与が明らかとなり、中でも adenosine (+8) に特徴的なパターン (2 OH の関与、2-aminopurine による阻害) がみられ、同時に検出された隣接する stem I 内の cytosine (+24) (2 OH の関与) との interaction が示唆された。この予測を明らかにするために、相当する C(+24)-G(-36) basepair の mutant を合成し、NS3 protease domain に対するプロテアーゼ活性の阻害を比較し、保存 loop 領域の adenosine (+8) が隣接する stem I の C(+24)-G(-36) basepair と interaction (A minor docking) し、活性化三次元構造を形成することを、解明し論文にまとめた (論文,)。

NS3 アプタマー G9-11 の培養細胞への導入系の構築

In vitro selection 法により取得した抗 NS3 プロテアーゼ RNA アプタマーを、直接 HeLa 細胞に導入し、プロテアーゼ活性の阻害が確認されたので、ベクターによるアプタマー発現系を検討した。より細胞内でのアプタマーのコピー数を増すために、シス型 HDV リボザイムの自己切断活性を利用したタンデム型アプタマーを構築、各プロモーターでの検討から、Pol III 系の CAG プロモーターの下流に接続した。培養細胞に導入、同時に NS3, 基質発現ベクターも導入し、プロテアーゼ活性の阻害を調べた。その結果、タンデム型アプタマーがより有効に働くことを明らかにし、論文としてまとめた (論文,)。

NS3 ヘリケース domain を標的とするアプタマーの in vitro selection

NS3 のヘリケース活性を、阻害する機能性 RNA を得る目的で、NS3 helicase domain (NS3 の C 末端から 2/3 部分) を標的とし、プライマーの異なる 2 種類の N30K, N30V RNA pool (RNA の random 領域が 30mer) を用い、competitor として poly(U) を使用、in vitro selection を行った。

N30K pool から得られたアプタマーは、概ね 5 側に突出した一本鎖構造と GGA(UC)GGAGCC からなるステムループ構造を持っていた。ほとんどのアプタマーが in vitro のヘリカーゼ assay 系において、アプタマー 10 当量存在下で fullsize の NS3 に対して 50% 以上の阻害効果を示し、なかでもアプタマー #5 は 1 当量で 50% 以上の強いヘリカーゼ活性阻害効果をした。そこで、アプタマー #5 に関して、computer model (Mfold) による予測される二次構造の RNase 部分分解による確認、その構造とヘリカーゼ阻害活性との相関性に関して、詳細に検討した。欠損 mutant を作成し、NS3 との親和性、ヘリカーゼ活性への影響を比較したところ、ATP 非存在下での NS3 との親和性には大きな違いはなく (一本鎖部分のみでも NS3 との結合性は非常に高い)、ヘリカーゼ活性の阻害に関しては、#5 の全体の構造が必要であることが明らかとなった。5 側一本鎖部分の塩基配列に関してその配列特異性はないが、他の塩基に比べ、NS3 との親和性が高いと報告されている U-rich の配列を含む mutant の方がアプタマー #5 より良い阻害活性を示した。stem loop を形成する保存領域に関しては、その stem 部分の mutant, loop 部分の mutant を作成、比較することにより、その領域がヘリカーゼ活性の阻害に関して有用であることを確認した。NS3 helicase domain は、一本鎖 DNA/RNA と親和性が高く、ATP 存在下、NS3 は 3→5 の方向性でその鎖上を移動、二本鎖をほどいていく。一本鎖 RNA 部分のみの場合は、ATP の有無により Kd 値が 2桁異なるが、アプタマー #5 の場合大きな Kd の変化は見られない。すなわち、アプ

タマー#5はNS3と二ヶ所 [(1)5側一本鎖部分は、NS3の基質認識 domain と結合 (2) 3側保存領域を含む構造部分は、NS3の他の部分と結合]で結合することにより、ATP存在下NS3が一本鎖上を移動するのを阻害していると考えられる。

N30K poolから得られたアプタマーが、概ね5側に突出していたので、次に3側に9nts突出した一本鎖構造をとるN30V poolを用いて同様の条件で *in vitro* selection を行った。得られたアプタマーは、ランダム領域でのUの頻度が高く、3側一本鎖部分の延長、数個のインターナルループを含むことによる一本鎖領域の増加が見られ、5側に安定な幾つかのステムループ構造を含む特徴を有していた。NS3 helicase domain とは competitor 存在下、強い親和性を有するが、full size のNS3に対しては competitor 存在下での親和性はみられなかった。N30V poolから得られたアプタマーは、その3側一本鎖部分が、NS3の基質認識 domain に結合している。N30K poolのアプタマー同様、*in vitro* のヘリカーゼ assay 系で阻害効果を調べた結果、ほとんどのアプタマーが、アプタマー10当量存在下で full size のNS3に対して50%以上の阻害効果を示した。その阻害効果は、5側 stem loop 部分の個数、3側NS3部分の長さにも関連が見られる。3側一本鎖部分でのNS3の3→5への移動に関しては、3側にNS3との結合部分をもたないこのRNAアプタマーの構造上、支障がないが、unwinding を阻害するこの傾向は、既にPyke等が報告している、NS3のDNAに比べ低いRNA基質の processivity とよくあてはまる。すなわち、3側一本鎖部分を有するRNAの場合、5側の stem loop 部分はNS3との結合性に関係なく、ATP存在下NS3による unwinding を制御すると示唆される。

3(+)-UTR はゲノム RNA の複製開始点として重要であり、NS3との結合能が高いことが知られている。その特徴ある構造 variable region-poly U stretch-3X と今回得られたアプタマーを比較すると配列の相同性は見られないが、二次構造には類似性があり興味深い。そこで、3(+)-UTR の構造欠損 mutant を作成し、アプタマー#5も含め、ヘリカーゼ活性の阻害、構造との活性機能の相関を調べた。3(+)-UTR の variable region は、配列非特異性の stem loop 構造を有し、その領域の欠損によりNS3との親和性は低下し、*in vitro* のヘリカーゼ assay 系でのヘリカーゼ活性の阻害能は低下する。このことは、N30V RNA aptamer から得られた知見と一致する。一本鎖領域 poly U stretch はその鎖長(20-200nts)が幅広く、NS3の結合領域として適している。NS3が一本鎖のRNAと結合に必要な最小鎖長は8ntsであるが、アプタマー#5と同様の鎖長(16nts)に保存領域 3X が連結している場合、NS3との親和性はアプタマー#5と比べ2桁以上低下した。3(+)-UTR はNS3との親和性が高いが、本来の親和性を保持するにはある程度以上の一本鎖領域 poly U stretch の鎖長が必要である。これらのヘリカーゼ活性から検討した結果は、既報で報告されている replicon を用いた細胞系での、これらの領域の複製における影響とよく対応する。variable region は、HCV genome の複製を司るNS3, NS5 その他の蛋白から構成される replicase の形成において、その場を提供する一本鎖領域 poly U stretch の5側に位置し、regulator として機能していることが示唆された。以上の内容を、現在、論文としてまとめ投稿中(一部、論文に速報として発表)

二つの機能(プロテアーゼ活性、ヘリカーゼ活性)を阻害するRNAの構築

NS3 helicase domain を標的とした *in vitro* selection から得られたアプタマー#5と、既に報告しているプロテアーゼ活性を阻害するアプタマーを一本鎖RNAを介

して連結し、二つの機能（プロテース活性、ヘリケース活性）を阻害する RNA を構築した。一本鎖領域の部分は NS3 との親和性の高い oligo U とし、最適鎖長を検討するため、15-50nts の鎖長範囲の RNA を合成した。現在それらの構築した RNA に関して、プロテース活性、ヘリケース活性それぞれの阻害を、調べている。

二つの機能（プロテース活性、ヘリケース活性）を阻害する RNA-protein の検討

NS3 helicase domain は、oligo U と親和性の高いことが報告されている。NS3 helicase domain を標的とした in vitro selection から得られたアプタマー#5 から、U16 GG が U16 よりも、NS3 に対して親和性が高くヘリケース活性を阻害することが明らかになった。酵素耐性機能を持つ U の 2'OH の modification を検討した結果、2F-U の導入した場合 [(2F-U)16GG] がより良い活性を示した。プロテース活性を阻害するペプチドと連結することにより、二つの機能（プロテース活性、ヘリケース活性）を阻害する RNA-protein を現在検討している。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表（論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。）

Site-specific modification of functional groups in genomic hepatitis delta virus (HDV) ribozyme

Fumiko Nishikawa, Mino Shirai and Satoshi Nishikawa

European Journal of Biochemistry, 269, 5792-5803 (2002).

Aptamers (nucleic acid ligands) for trypsin-like serine proteases: finding the enzyme's Achilles heel

Satoshi Nishikawa, Joonsung Hwang, Hamid Fauzi, Kotaro Fukuda, Fumiko Nishikawa, and Nobuko Kakiuchi

Current Topics in Analytical Chemistry, 3, 69-81 (2002).

Inhibition of hepatitis C virus serine protease in living cells by RNA aptamers detected using fluorescent protein substrates

Nobuko Kakiuchi, Kotaro Fukuda, Fumiko Nishikawa, Satoshi Nishikawa and Kunitada Shimotohno

Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, 6, 155-160 (2003).

Structure/function analysis of an RNA aptamer for hepatitis C virus NS3 protease

Satoru Sekiya, Fumiko Nishikawa, Kotaro Fukuda and Satoshi Nishikawa

Journal of Biochemistry, 133, 351-359 (2003).

Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells

Fumiko Nishikawa, Nobuko Kakiuchi, Kohei Funaji, Kotaro Fukuda, Satoru Sekiya and Satoshi Nishikawa

Nucleic Acids Research, 31, 1935-1943 (2003).

In vitro selection of RNA aptamers against HCV-NS3 helicase and their structural similarity with 3' (+)UTR of HCV

Satoshi Nishikawa, Fumiko Nishikawa, Kotaro Fukuda, Kohei Funaji

Nucleic Acids Research Supplement, 3, 241-242 (2003).

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

RNA meeting 2001 (バンフ; 6月)

The RNA aptamer binds at an exosite of HCV NS3 protease

Satoshi Nishikawa, Joonsung Hwang, Hamid Fauzi, Kotaro Fukuda, Satoru Sekiya, Nobuko Kakiuchi and Fumiko Nishikawa

RNA meeting 2001 (バンフ; 6月)

Construction of dual functional RNA ligands against hepatitis C virus RNA and NS3

Kotaro Fukuda, Fumiko Nishikawa, Kohei Funajima, Nobuko Kakiuchi, Satoru Sekiya and Satoshi Nishikawa

RNA meeting 2001 (バンフ; 6月)

Effect of RNA aptamers on HCV NS3 protease expressed in cultured cells

Nobuko Kakiuchi, Fumiko Nishikawa, Kotaro Fukuda, Kunitada Shimotohno and Satoshi Nishikawa

第4回日本RNA学会年会 (つくば; 7月 2002)

HCV NS3 ヘリカーゼアプタマーの *in vitro* selection

西川 富美子、船路 浩平、福田 宏太郎、西川 諭

第25回日本分子生物学会年会 (横浜; 12月 2002)

HCV NS3 ヘリカーゼに対する RNA アプタマーの構造的特徴

西川 富美子、船路 浩平、福田 宏太郎、西川 諭

第25回日本分子生物学会年会 (横浜; 12月 2002)

C型肝炎ウイルス (HCV) の NS3 プロテアーゼドメイン (NS3) に対する RNA アプタマーの機能/構造解析

関矢 聡、西川 富美子、福田 宏太郎、西川 諭

平成14年度 ライフサイエンス分野融合会議 生命工学部会 バイオテクノロジー研究会 合同発表会 (つくば; 2月 2003)

HCV NS3 ヘリカーゼに対する RNA アプタマーからみえてくる 3' (+)UTR の機能

西川 富美子、船路 浩平、福田 宏太郎、西川 諭

第8回 RNA meeting 2003 (ウィーン; 7月 2003)

RNA aptamers against HCV-NS3 helicase have similar structural configuration with 3' (+)UTR of HCV

Satoshi Nishikawa, Fumiko Nishikawa, Kotaro Fukuda, Kohei Funajima

第3回 国際核酸化学シンポジウム (北海道; 9月 2003)

In vitro selection of RNA aptamers against HCV-NS3 helicase and their structural similarity with 3' (+)UTR of HCV

Satoshi Nishikawa, Fumiko Nishikawa, Kotaro Fukuda, Kohei Funajima

西川 諭、西川 富美子、福田 宏太郎、船路 浩平

(アブストラクトは Nucleic Acids Research Supplement に同じ)

第13回アンチセンス学会 (大阪; 12月 2003)

HCV-NS3 プロテアーゼに対するヘテロ二量体化した RNA アプタマーの機能評価

関矢 聡、西川 富美子、P.K.R. Kumar, 西川 諭

第26回日本分子生物学会年会(神戸; 12月 2003)

HCV-NS3 タンパク質のプロテアーゼ/ヘリカーゼ活性を阻害する多機能型アプタマーのデザインと解析

榎原 琢哉、福田 宏太郎、西川 富美子、関矢 聡、長谷川 典巳、西川 諭

平成15年度 ライフサイエンス分野融合会議 生命工学部会 バイオテクノロジー研究会 合同発表会(つくば; 2月 2004)

HCV NS3 ヘリカーゼに対する RNA アプタマーからみえてくる 3' (+)UTR の機能

榎原 琢哉、関矢 聡、福田 宏太郎、西川 富美子、長谷川 典巳、西川 諭

(3) 特許等(出願番号を記載)

なし