

実施課題名:F化修飾した核酸アプタマーと標的タンパク質との相互作用解析における ^{19}F -NMRシグナルの利用

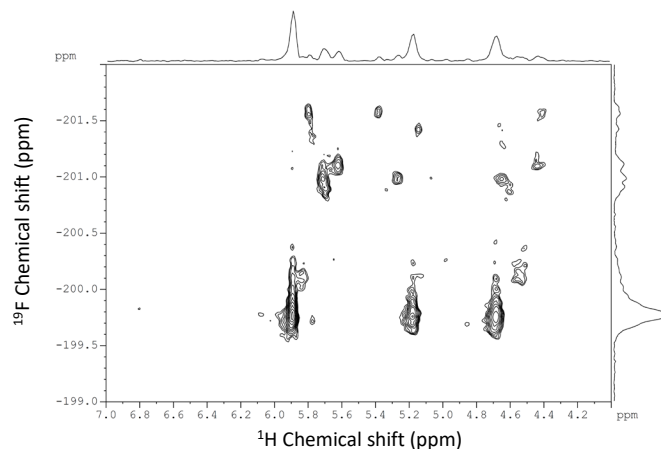
【背景】

核酸アプタマーを医薬品として開発する際には、リボースの2'位にフッ素(F)を導入することにより、ヌクレアーゼ耐性を向上させる必要がある。開発中のアプタマーには、ピリミジン残基にFが導入されているので、 ^{19}F -NMRシグナルの変化を用いて標的タンパク質との相互作用を解析できることが期待される。そこで本研究では、 ^{19}F -NMRシグナルをプローブとして、アプタマーと標的タンパク質の相互作用の解析手法を確立することを目的とした。

【実施内容】

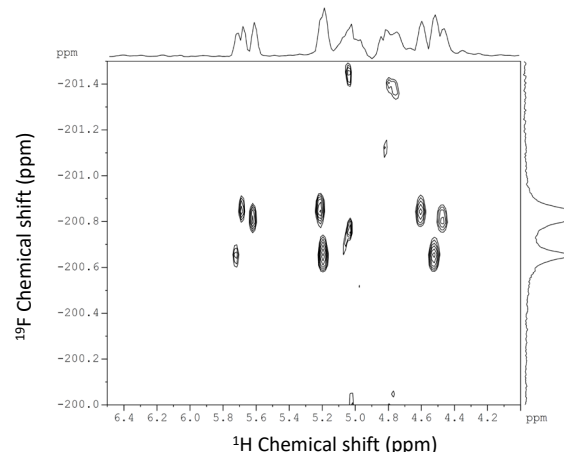
はじめに2' F修飾した高濃度のUTPを用いてNMR測定パラメータの最適化を試みた。 ^1H - ^{19}F HMQCスペクトル、 ^1H - ^{19}F HSQCスペクトルのどちらにおいても2' FとH2', 2' FとH1' および2' FとH3' との間にシャープな相関シグナルが観測された。次に、29残基のRNAアプタマーについて、 ^1H - ^{19}F HMQCスペクトルおよび ^1H - ^{19}F HSQCスペクトルを測定したところ、複数の相関シグナルが観測された。このアプタマーには、6か所2' F修飾が施されているので、6個のFに由来するシグナルの観測が期待された。一方で、シグナル強度が均一ではなく、シグナルの帰属が困難であったため、4か所に2' F修飾を導入した14残基のRNAを解析対象とした。14残基のRNAは、29残基のアプタマーの標的タンパク質の結合部位を含む部分構造である。 ^1H - ^{19}F HSQCスペクトルおよび ^1H - ^{19}F HOESYスペクトルを測定し、14残基のRNAのH1' の帰属データから4か所の ^{19}F のシグナルを帰属することができた。

Fig. 1



6か所を2' F修飾した29残基のRNAアプタマーの ^1H - ^{19}F HSQCスペクトル

Fig. 2



4か所を2' F修飾したRNAアプタマー断片(14残基)の ^1H - ^{19}F HSQCスペクトル

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF24-01-080			
利用課題名	F 化修飾した核酸アプタマーと標的タンパク質との相互作用解析における ^{19}F -NMR シグナルの利用			
所属機関	千葉工業大学			
所属部署	先進工学部・生命科学科			
役職・氏名	役職	教授	氏名	坂本泰一
利用実施時期、及び期間	2024 年 12 月 26 日～2026 年 3 月 31 日 総利用日数： 39 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

核酸アプタマーと標的タンパク質の相互作用解析において、 ^1H -NMR シグナルの変化を解析することを試みたが、NMR シグナルがブロード化してしまうため、有用な情報が得ることができなかった。一方、核酸アプタマーを医薬品として開発する際には、リボースの 2' 位にフッ素(F)を導入することにより、ヌクレアーゼ耐性を向上させる必要がある。私の研究室で開発したアプタマーには、ピリミジン残基に F が導入されているので、 ^{19}F -NMR シグナルの変化を用いて標的タンパク質との相互作用を解析できることが期待される。そこで本研究では、 ^{19}F -NMR シグナルをプローブとして、アプタマーと標的タンパク質の相互作用を解析する手法を確立することを目的とした。また、本研究で解析するアプタマーについては、変異体を用いて解析によって、標的タンパク質との相互作用に重要なヌクレオチド残基をすでに同定している。 ^{19}F -NMR シグナルを利用した相互作用解析の結果と変異体の解析結果を比較することによって、本研究で確立する相互作用の解析法の妥当性を検証できると考えている。

2. 成果の概要

実施内容

はじめに 2' F 修飾した高濃度の UTP を用いて NMR 測定パラメータの最適化を試みた。 ^1H - ^{19}F HMQC スペクトル、 ^1H - ^{19}F HSQC スペクトルのどちらにおいても 2' F と H2'、2' F と H1' および 2' F と H3' との間にシャープな相関シグナルが観測された。次に、29 残基の RNA アプタマーについて、 ^1H - ^{19}F HMQC スペクトルおよび ^1H - ^{19}F HSQC スペクトルを測定したところ、複数の相関シグナルが観測された。このアプタマーには、6 か所 2' F 修飾が施されているので、6 個の F に由来するシグナルの観測が期待された。一方で、シグナル強度が均一ではなく、シグナルの帰属が困難であったため、4 か所に 2' F 修飾を導入した 14 残基の RNA を解析対象とした。14 残基の RNA は、29 残基のアプタマーの標的タンパク質の結合部位を含む部分構造である。 ^1H - ^{19}F HSQC スペクトルおよび ^1H - ^{19}F HOESY スペクトルを測定し、14 残基の RNA の H1' の帰属データから 4 か所の ^{19}F のシグナルを帰属することができた。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

本研究では、 ^{19}F -NMR シグナルをプローブとして、アプタマーと標的タンパク質の相互作用を解析する手法を確立することを目的としていたが、標的タンパク質との相互作用を解析するまでには至らなかった。一方で、 ^1H - ^{19}F HSQC スペクトルおよび ^1H - ^{19}F HOESY スペクトルから 14 残基の RNA の H1' の帰属データから 4 か所の ^{19}F のシグナルを帰属することができた。また、 ^{19}F の化学シフトは、RNA のヘアピンやステムのような構造によって異なることも明らかとなったことから、標的タンパク質との相互作用によるシグナルの変化を解析できる可能性があることが明らかとなった。

また、今回の測定によって、14 残基の NMR シグナルの帰属が進み、多くの立体構造の情報が得られた。この RNA はテトラループ構造を形成しているが、通常は観測されにくいループ部分のイミノプロトンシグナルが観測されていることから、特徴的なループ構造を形成していることが示唆された。

成果発表

栃尾 尚哉, 坂本 泰一, 木川 隆則, 超高磁場 NMR による RNA 構造解析, 第 64 回 NMR 討論会, 2025 年 11 月

今後の展開

今回の測定によって、14 残基の NMR シグナルの帰属が進み、多くの立体構造の情報が得られた。この RNA はテトラループ構造を形成しているが、通常は観測されにくいループ部分のイミノプロトンシグナルが観測されていることから、特徴的なループ構造を形成していることが示唆された。さらに、 ^1H - ^{19}F HSQC スペクトルおよび ^1H - ^{19}F HOESY スペクトルから 14 残基の RNA の H1' の帰属データから 4 か所の ^{19}F のシグナルを帰属することができた。今後は、 ^{19}F -NMR シグナルをプローブとして、アプタマーと標的タンパク質の相互作用を解析することによって、アプタマーのループ部分がどのように相互作用に関わっているか明らかにしたいと考えている。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

医療分野において、アプタマーが分子標的薬として 2 品目が上市しており、それらは F 化修飾されているので、本研究成果を応用することができれば、アプタマーが標的タンパク質に作用する機序が明らかになり、アプタマーの開発の効率が向上すると期待される。また、アプタマーに薬を結合させることによって、ドラッグデリバリーシステムに利用するなどの医療シーズとしての展開も期待されている。さらにアプタマーは、ホルモンや疾患マーカーなど、体内で時間的に変動する分子を高感度かつリアルタイムで検出できるバイオセンサの材料としても期待されているので、個別化医療や在宅医療の高度化に貢献すると考えられる。熱安定性や化学的安定性に優れるアプタマーの特性を活かすことで、過酷な環境下でも使用可能な診断デバイスの開発など、社会的ニーズの高い応用も期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

年末の忙しい期間など、多くの条件検討をして、様々な測定をしてくださり、大変感謝しております。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

6. 成果公開延期の希望の有無

() あり : (○) なし

「あり」の場合理由:

7. その他

8. 利用施設

理化学研究所

溶液 600MHz

利用期間 1 : 2024 年 12 月 26 日 11 時 ～ 2024 年 12 月 27 日 11 時

利用期間 2 : 2024 年 12 月 27 日 13 時 ～ 2025 年 01 月 06 日 9 時

利用期間 3 : 2025 年 01 月 10 日 16 時 ～ 2025 年 01 月 14 日 9 時

利用期間 4 : 2025 年 02 月 17 日 13 時 ～ 2025 年 02 月 19 日 13 時

利用期間 5 : 2025 年 02 月 26 日 13 時 ～ 2025 年 02 月 28 日 13 時

利用期間 6 : 2025 年 4 月 30 日 13 時 ～ 2025 年 5 月 1 日 13 時

利用期間 7 : 2025 年 5 月 1 日 13 時 ～ 2025 年 5 月 7 日 14 時

利用期間 8 : 2025 年 6 月 12 日 10 時 ～ 2025 年 6 月 13 日 10 時

利用期間 9 : 2025 年 6 月 13 日 10 時 ～ 2025 年 6 月 16 日 10 時

利用期間 10 : 2025 年 6 月 16 日 13 時 ～ 2025 年 6 月 19 日 13 時

利用期間 11 : 2025 年 6 月 27 日 13 時 ～ 2025 年 6 月 30 日 13 時

溶液 700MHz

利用期間 1 : 2025 年 4 月 16 日 13 時 ～ 2025 年 4 月 17 日 13 時

溶液 800MHz

利用期間 1 : 2025 年 4 月 14 日 13 時 ～ 2025 年 4 月 15 日 13 時

利用期間 2 : 2025 年 5 月 9 日 11 時 ～ 2025 年 5 月 12 日 11 時

9. その他の利用施設

無し