◆トピックス◆

活性化プロテインC 阻害活性を持つ RNA (アプタマー)

西 川 諭*

Selection of a RNA Aptamer That Binds to Human Activated Protein C and Inhibits Its Protease Function

Satoshi NISHIKAWA*

Key words: aptamer, activated protein C, trypsin-like serine protease, thrombin, RNA

はじめに

アプタマー (aptamer) の apt とは英語の adapted とか suited にあたり、直訳すると「適合したもの」になる。実際にはインビトロ選択法で作られる、ある特定のタンパク質や化合物に結合する核酸分子のことを表わしている¹⁾。このアプタマー創製の概略は図1に示すように、先ずランダムな配列の核酸のプール (~ 10^{15} ~種類) の分子を含む) を用意しておき、これと標的タンパク質を混ぜ、メンブランフィルターなどでタンパク質をトラップする。大部分の核酸はフィルターを素通りするが、たまたまタンパク質に結合するような核酸分子があるとタンパク質と共にメンブランフィルターに残る。非常にわずかな量でも回収して逆転写で DNA に変えた後、PCR で増幅することができ、そこから RNA を作り、また結合、選択の操作を行う。このサイクルを繰り返すことで、次第に任意のタンパク質に結合する特定の核酸分子を選択濃縮することができる。何回かサイクルを繰り返した後、PCR の際に変異を導入すれば

図1 核酸のインビトロ選択法の概略

* 生命工学工業技術研究所 [〒 305-8566 つくば市東 1-1]
National Institute of Bioscience and Human Technology, [1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaragi 305-8566, Japan.]

(mutagenic PCR), 濃縮されたプールのバラエティーを広げることできる。最終的にクローン化し単一の分子にし塩基配列を決め同定する。この選択・増幅の方法がダーウィンの進化論(自然淘汰と適者生存)と似ていることから、ファージディスプレイ法とともに、「進化分子工学」の重要な手法となっている。

この方法はタンパク質と核酸の相互作用を調べるのに非常に有効であると同時に、おもしろいのは核酸とは縁もゆかりもないタンパク質についても、結合する核酸が得られる可能性のあることである。それらはある場合にはタンパク質の阻害剤のリード化合物として、またタンパク質・核酸間の新しい分子認識を探る上で貴重な材料となる。有名な例としてトロンビンのアプタマーがこの方法で得られ、高い血液凝固阻害活性が示された²⁾。トロンビンは血液凝固に不可欠な酵素であるが、場合によっては血栓形成を引き起こす両刃の剣である。従って、時と場合に応じてその作用をコントロールできる化合物は貴重な薬剤となる。天然にはヒルジンがあるが、トロンピンアプタマーは全く新しい概念にもとづく薬剤として期待されている。

活性化プロテイン C 阻害活性を持つ RNA アプタマー³⁾

aPC は血液凝固制御系において重要な働きをするタンパク質で、そのプロテアーゼドメインはトロンビンと同じくトリプシン様セリンプロテアーゼで、よく似た構造(6本の逆平行の β 鎖が作るバレルが2つからなる)をとっている⁴⁾⁻⁶⁾。同じトリプシンファミリーの酵素でどのようなアプタマーが得られるのか、また本当にプロテアーゼ阻害効果を持つのかに興味を持たれたので、われわれは活性化プロテイン C (aPC) に対するアプタマーの創製を試みた。120 N のランダム RNA プール(鎖長 120 ヌクレオチドのランダムな配列)から出発し、選択・増幅のサイクルを 9 回繰り返した(図 1 参照)。最

初の RNA プールは、まず鋳型 DNA を自動合成機で作し、それを試験管内転写法で RNA にする。サイクルを追うごとにタンパク質の比率を減らし、またコンペティター RNA を増やし、選択の条件を厳しくして結合の強いアプタマーのみが得られるようにした。クローン化後、シーケンスの結果、APC-167 を同定した。APC-167 は類縁のタンパク質であるトロンビンやファクター Xa には全く結合せず、aPC のみに高い結合能を持つことがわかった。APC-167 から PCR 増幅に必要なプライマー結合領域を除いた APC-99 (図 2) も APC-167 と同様の高い結合能 ($K_d = 120$ nM) を示し、テトラペプチドを基質とした aPC のプロテアーゼ活性の阻害を調べると阻害定数 (K_i) は 140 nM と非常に強く阻害することがわかった。aPC のプロテアーゼ活性の阻害を反応速度論的に調べると非拮抗阻害の様式であった。このことは、aPC アプタマーは aPC の基質結合部位や触媒部位に結合しているのではなく、どこかほかの部分に結合して阻害することを示唆している。

トロンビンの DNA アプタマーはユニークな G の 4 本鎖構造をとるが(図 3A)⁷⁾、aPC アプタマーは 3 つのステム構造 (R1, R2, R3, 図 2 左) をとると推測された。この二次構造はリボヌクレアーゼによる限定分解や、5' や 3' 末端からの部分欠失によりほぼ正しいことが確認された。結合する最小分子は APC (15-64) で K_d 値は一桁大きくなる。aPC との結合には R1 や R2 のループが必要なことは欠失すると全く aPC に結合しなくなることからわかった(図 2 右)。この構造で一つ気がつくのは、各ステムに見られる連続した GU wobble 塩基対である。この GU wobble 塩基対を GC 塩基対に変えると、全く aPC に結合しなくなる。最近、連続した GU wobble 塩基対は G 同士が強固にスタックした特異なヘリックス構造であることが報告された。リン酸部分の化学修飾からも、R1 や R2 のループ領域が結合に関与していることがうかがわれた。

図2 aPCのプロテアーゼ活性を阻害するアプタマー、APC-99の二次構造モデルとその各種変異体。左側の変異体、APC(9G-70)、APC(15-64)はaPCと結合するが、右側の変異体はいずれも結合しない。白ぬき字体は変異箇所を表す。

トリプシン様セリンプロテアーゼに結合するアプタマー

図3に今までに得られたトリプシン様セリンプロテアーゼ類に結合するアプタマーの二次構造をまとめた。トロンビンのDNAアプタマー(図3A)、好中球エラスターゼのDNAアプタマー(図3C)⁸⁾、RNAアプタマー(図3D)⁹⁾にはいずれもGの4本鎖構造が見られるが、全てに共通した構造はなくアプタマーは各タンパク質に特徴的な分子といえる。アプタマーとタンパク質はどのような相互作用をしているのだろうか?トロンビンのDNAアプタマーは正電荷を持ったアミノ酸が集まっているExositeに結合し、基質であるフィブリンノーゲンの結合を阻害することが、生化学的¹⁰⁾、構造化学的⁷⁰⁾に明らかになっている。好中球エラスターゼやaPC、さらにはC型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼにも表面に正電荷を持ったアミノ酸が

集まっている箇所があるので、それらが結合部位あるいはその一部分である可能性は高い。好中球エラスターゼのアプタマーのように強く結合するが、プロテアーゼ阻害作用は全く認められないものもある。この場合、アプタマーに非特異的なプロテアーゼインヒビターを結合し、コンジュゲート体としてインヒビターとする試みもなされている⁸⁾。アプタマーがタンパク質のどこに結合してプロテアーゼ活性を阻害しているのかは興味深い点である。われわれはC型肝炎ウイルスが増殖する際に必要な、NS3というトリプシン様セリンプロテアーゼアプタマーの創製にも成功し、試験管内ではあるが、そのアプタマーがプロテアーゼ活性を強く阻害することを見い出した¹¹⁾。この場合も阻害様式は非拮抗的であった。NS3プロテアーゼの特異的阻害剤はまだなく、全く新しい阻害作用点が見つかるかもしれない。

図 3 種々のトリプシン様セリンプロテアーゼに結合するアプタマーの二次構造と結合定数 (A) トロンプシンの DNA アプタマー²⁾ (B) トロンプシンの RNA アプタマー¹²⁾ (C) 好中球エラスターゼの DNA アプタマー⁸⁾ (D) 好中球エラスターゼの RNA アプタマー⁹⁾ (E) C 型肝炎ウイルスの NS3 プロテアーゼのアプタマー¹¹⁾

おわりに

インビトロ選択法により作り出されたアプタマーは、核酸でできた抗体である。簡便な操作で特異性の高い分子が得られ、うまくすれば、タンパク質の機能を抑える阻害剤あるいはそのリド化合物や特定のタンパク質を検出する診断薬となる。核酸自体を医薬とするには安定性、ドラッグデリバリー、コスト等クリアしなければならない課題が多いが、副作用の心配ない点、遺伝子として導入し細胞内での発現が可能なことなどを考えると、将来、遺伝子の発現を人為

的にコントロールする方法として、非常に重要になると考えられる。インビトロ選択法によりアプタマーだけでなく、種々の核酸酵素（リボザイム、DNA ザイム）が創製され、それらの構造と機能との関係を解析することで天然に見られる核酸・タンパク質の分子レベルでの相互作用を明らかにしてゆくことができるであろう。

謝 辞:最後に本校執筆の機会を与えてくださいました国立循環器病センター研究所、宮田敏行先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Osborn SE, Ellington AD: Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chem Rev* **97**: 349-370, 1997.
- 2) Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ: Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**: 564-566, 1992.
- 3) Gal SW, Amontov S, Urvil PT, Vishnuvardhan D, Nishikawa F, Kumar PKR, Nishikawa S: Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function. *Eur J Biochem* **252**: 553-562, 1998.
- 4) Greengard JS, Fisher CL, Villoutreix B, Griffin JH: Structural basis for type I and type II deficiencies of antithrombotic plasma protein C: patterns revealed by three-dimensional molecular modelling of mutations of protease domain. *Proteins* **18**: 367-380, 1994.
- 5) Miyata T, Sakata T, Zheng Y-Z, Tsukamoto H, Umeyama H, Uchiyama S, Ikusaka M, Yoshioka A, Imanaka Y, Fujimura H, Kambayashi J, Kato H: Genetic characterization of protein C deficiency in Japanese subjects using a rapid and nonradioactive method for single-strand conformational polymorphism analysis and a model building. *Thromb Haemost* **76**: 302-311, 1996.
- 6) Mather T, Oganessyan V, Hof P, Huber R, Foundling S, Esmon C, Bode W: The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *EMBO J* **15**: 6822-6831, 1996.
- 7) a) Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J: Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3745-3749, 1993.
b) Wang KY, McCurdy S, Shea RG, Swaminathan S, Bolton PH: A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA. *Biochemistry* **32**: 1899-1904, 1993.
c) Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A: The structure of α -thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem* **268**: 17651-17654, 1993.
- 8) Lin Y, Padmapriya A, Morden KM, Jayasena SD: Peptide conjugation to an *in vitro*-selected DNA ligand improves enzyme inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11044-11048, 1995.
- 9) Lin Y, Qiu Q, Gill SC, Jayasena SD: Modified RNA sequence pools for *in vitro* selection. *Nucleic Acids Res* **22**: 5229-5234, 1994.
- 10) Paborsky LR, McCurdy SN, Griffin LC, Toole JJ, Leung LLK: The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J Biol Chem* **268**: 20808-20811, 1993.
- 11) a) Urvil PT, Kakiuchi N, Zhou D-M, Shimotohno K, Kumar PKR, Nishikawa S: Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem* **248**: 130-138, 1997.
b) Kumar PKR, Machida K, Urvil PT, Kakiuchi N, Vishnuvardhan D, Shimotohno K, Taira K, Nishikawa S: Isolation of specific RNA aptamers to NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* **237**: 270-282, 1997.
c) Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kumar PKR, Nishikawa S: Specific RNA aptamers to NS3 protease domain of hepatitis C virus. *Nucleic Acids Symp Ser* **37**: 237-238, 1997.
- 12) Kubik MF, Stephens AW, Schneider D, Marlar RA, Tasset D: High-affinity RNA ligands to human α -thrombin. *Nucleic Acids Res* **22**: 2619-2626, 1994.