

2020年5月19日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2019年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）
所属：早稲田大学 理工学術院
（先進理工学部・化学・生命化学科）
職名：教授
氏名：小出隆規

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：コラーゲン上のアミノ酸配列特異的な RNA アプタマーの取得と再生医学研究への利用
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：平芳一法
3. 研究期間：2019年4月1日～2020年3月31日

4. 研究経過及び研究成果：

先行研究において、コラーゲンに結合する RNA アプタマーのスクリーニングを Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)法によって実施した結果、約 40 種類のクローンを得ることができた。しかし、得られたいくつかのクローンについてコラーゲン結合能を評価したところ、それらの親和性は弱かった。

本研究では、RNA アプタマーの標的として天然コラーゲンを使用する代わりに、コラーゲンの 3 重らせん構造を模倣し、タンパク質と相互作用するアミノ酸配列を有する化学合成ペプチド（=3 重らせんペプチド、分子量約 9,000）をもちいた。ここでは、コラーゲン結合タンパク質であるインテグリン $\alpha 2\beta 1$ あるいは色素上皮由来因子への結合配列である Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg あるいは Lys-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu を含む 3 重らせんペプチドを標的としてそれぞれ選択した。SELEX 法によって、80 ヌクレオチドのランダム領域を含む RNA ライブラリから本ペプチドに結合する RNA アプタマーのスクリーニングを行った。各ペプチドに対するスクリーニングで得られた大腸菌のコロニーから約 20 個を選択し、それらのランダム領域の配列を DNA シークエンサーによって同定した。その結果、それぞれのスクリーニングにおいて特定の核酸配列が濃縮される結果を得た。Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg 配列を有するペプチドに対するスクリーニングでは、24 個の配列の内 5 個が同一であった。Lys-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-

Gly-Leu 配列を有するペプチドに対するスクリーニングでは、23 個の配列の内 7 個、6 個、5 個がそれぞれ同じものであった。この結果は、それぞれの 3 重らせんペプチドに対して結合する RNA が SELEX 法によって濃縮されたことを示唆している。

今後は、濃縮された配列を有する RNA を調製し、それらの 3 重らせんペプチドおよびコラーゲンに対する結合をゲルシフトアッセイおよび表面プラズモン共鳴法によって評価する。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

法邑賢一、富永裕貴、小出隆規、平芳一法

コラーゲンの PEDF 結合配列およびインテグリン結合配列に対する RNA アプタマーの選別
第 42 回日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 6 日（マリンメッセ福岡）