

2P-234 ゲノム中の G-quadruplex 形成配列に着目したアプタマー探索法

○齊藤 大希, 吉田 亘, 横山 智美, 池袋 一典
(農工大・工・生命工)
ikebu@cc.tuat.ac.jp

【目的】本研究ではゲノム中の核酸高次構造である G-quadruplex (G4) に着目し、ゲノム情報からアプタマーを取得する手法を開発し、G4 promoter-derived aptamer selection (G4PAS) と命名した。G4 構造を形成するプロモーターを持つ遺伝子である VEGFA, PDGFA, RB1, c-Kit において、それぞれのプロモーター領域中の G4 構造形成配列 (G4 DNA) が、各遺伝子産物のタンパク質に結合するか検討した。また、得られたアプタマーの結合能を解析した。また、VEGFA, PDGFA から転写された RNA 配列に関して、G4 構造形成可能な RNA (G4 RNA) がそれぞれ VEGFA, PDGFA タンパク質と結合するか解析した。

【方法】各標的遺伝子のプロモーター領域中の G4 構造形成配列をそれぞれ選択し、化学合成して作製した。その後、合成した G4 DNA と標的タンパク質との結合をゲルシフトアッセイ及び表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析により評価した。また、G4 RNA と標的タンパク質の結合を SPR 解析により行った。

【結果】ゲルシフトアッセイの結果、c-Kit 以外の G4 DNA とタンパク質の組み合わせについて、結合を示すバンドのシフトが観察された。SPR 解析によって各 G4 DNA の解離定数を算出したところ、VEGFA G4 DNA は $K_d=180$ nM で VEGFA に、PDGFA G4 DNA は $K_d=6$ nM で PDGFA に、RB1 G4 DNA は $K_d=420$ nM で RB1 にそれぞれ結合した。よって、遺伝子プロモーター領域中の G4 DNA が標的タンパク質に対するアプタマーとなり得ることが示された。更に、G4 RNA の評価を行った結果、評価したすべての配列に関して標的タンパク質との結合が観察されたため、G4PAS により DNA, RNA アプタマー探索が可能であることが示された。

Aptamer selection focusing on G-quadruplex forming sequence in genome

○Taiki Saito, Wataru Yoshida, Tomomi Yokoyama, Kazunori Ikebukuro
(Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words Aptamer, G-quadruplex, genome, promoter

2P-236 細胞内環状 RNA 発現技術

○梅影 創, 菊池 洋
(豊橋技科大院・工・環境・生命)
umekage@ens.tut.ac.jp

近年、細胞の中で巨大な環状 RNA が合成され、これが miRNA を吸着することで RNA 干渉が制御されることが報告された。この巨大環状 RNA の発見は、新たな RNA の機能を示すものとして注目されている。また、この発見を契機として環状 RNA を用いた RNA 干渉制御技術への応用が画策され始めており、安価かつ簡便な環状 RNA の試験管内調製方法および細胞内環状 RNA 発現技術の開発が求められている。本年会では、これまで我々の研究グループが開発を進めてきた環状 RNA の細胞内発現技術について発表する。環状 RNA の作成方法は、RNA 連結酵素を用いる方法と、グループ I イントロンのセルフスプライシングを利用した方法 (Permuted Intron-Exon method, PIE method) が知られている。前者の方法では試験管内で RNA を環状化する手法にしか用いることはできないが、後者の方法では RNA 配列の転写とカップルして RNA の自発的な環状化が起こるため、試験管内、細胞内を問わず環状 RNA の作成が原理的に可能である。我々は PIE 法を用いて環状ストレプトアビジン RNA アプタマーの大腸菌内発現および海洋性光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* を用いた培地中生産に成功した。また、恒常的な高発現プロモーターである *lpp* プロモーター、環状 RNA 発現配列、*rrnC* ターミネーターからなる環状 RNA 発現ユニットを 1 ユニットとしてベクター上にユニット単位でタンデムに集積するシステムを考案し、大腸菌 1 L 培養あたり約 0.19 mg (従来の約 2.7 倍) の環状 RNA 発現に成功した。発表者の知るところ、細胞内環状 RNA 発現の世界最高収量である。細胞内環状 RNA 発現技術の今後の展開についても併せて発表したい。

In vivo circular RNA production

○Umekage So, Kikuchi Yo
(Dept. Environ. Life Sci. Grad. Sch. Eng., Toyohashi Univ. Technol.)

Key words circular RNA, permuted Intron-Exon, *in vivo* expression

2P-235 一本鎖 DNA 領域の付加による RNA サイレンシング効果の向上

○伊田 寛之, 立花 亮, 田辺 利住
(阪市大・院工・化生)
ida@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

Small interfering RNA (siRNA) は二本の RNA 鎖から成る機能性 RNA であり、標的 mRNA を分解しタンパク質への翻訳を阻害する働きをもつ。細胞内のあらゆる mRNA に対して siRNA の作製が可能であり、様々な疾患に対する治療薬として期待されている。我々は siRNA 二本鎖の片側を全て DNA で置換した hetero siRNA を開発し研究してきた。hetero siRNA は合成コストの削減・副作用の低減という側面において大きなメリットを持つが、阻害活性が大きく低下してしまうというデメリットも同時に有していた。この問題を解決するため様々な構造を持つ hetero siRNA を作製し、構造と活性変化との相関関係を調べた。その結果得られたものが long hetero siRNA である。これは従来の二本鎖 siRNA と遜色ないほどの高い活性を示した。long hetero siRNA は DNA 鎖の 5' 末端に十数塩基の一本鎖領域を有しており、この領域が阻害活性の向上に大きく寄与していることが明らかになった。

一方で、我々は long hetero siRNA で得られた知見を microRNA(miRNA) に応用した。miRNA は siRNA と類似の構造を持つ内在性の機能性 RNA であり、同様の翻訳阻害効果を有する。一部の miRNA は腫瘍抑制効果を持つことが明らかにされており、siRNA と共に次世代の医薬品として期待されている。miRNA 二本鎖は miRNA 鎖および miRNA* 鎖から成っている。我々は miRNA* 鎖の 5' 末端に long hetero siRNA と同様の一本鎖領域を付加し、これを long miRNA と名付けた。活性測定の結果、long miRNA は天然型の miRNA よりも遥かに高い阻害効果を示すことが明らかになった。

Enhancement of RNA silencing by adding 5' flanking regions

○Hiroyuki Ida, Akira Tachibana, Toshizumi Tanabe
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words RNA interference, siRNA, miRNA, DNA

2P-237 米由来 Hsp ペプチドの病原微生物に対する抗菌活性とその作用機構の解明

○中道 俊一, 池田 篤夫, 落合 秋人, 田中 孝明, 谷口 正之
(新潟大・自然研)
mtanig@eng.niigata-u.ac.jp

【目的】当研究室では、米由来 Heat Shock Protein 70 (Hsp70) の部分配列である Hsp70 ペプチドが、菌周病菌と日和見感染真菌に対して抗菌活性を示すことを見出している。そこで本研究では、Hsp70 ペプチドの特性を明らかにするために、抗菌スペクトルを解析し、また 50% 増殖阻害濃度 (IC_{50}) を決定した。さらに、抗菌作用機構を解明するために、細胞膜への作用を中心に検討した。

【実験方法】本研究では、Hsp70 ペプチドのグラム陰性菌、グラム陽性菌、および真菌に対する抗菌活性を、生菌に由来する ATP を測定することによって評価した。また、Hsp70 ペプチドの細胞膜への作用を、日和見感染真菌 *Candida albicans* の場合には Calcein-AM を用いた細胞膜透過性アッセイによって、菌周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の場合には diSC₃₋₅ を用いた細胞膜脱分極アッセイによって、それぞれ検討した。

【結果】Hsp70 ペプチドの *C. albicans* と *P. gingivalis* に対する IC_{50} 値は、それぞれ 70 μ M と 63 μ M であった。細胞膜透過性アッセイにおいて、*C. albicans* にいったん取り込まれた Calcein-AM は細胞内で加水分解され、Calcein となり、Hsp70 ペプチドを添加することによって、細胞外へ放出された。また、細胞膜脱分極アッセイにおいて、*P. gingivalis* 細胞からの diSC₃₋₅ の放出量は、添加した Hsp70 ペプチドの濃度に依存して増加した。これらの結果から、Hsp70 ペプチドは、細胞膜に作用して抗菌活性を発揮することが示唆された。

Antimicrobial activity of Hsp peptide derived from rice against pathogenic microorganisms and elucidation of its mechanism of action.

○Shunichi Nakamichi, Atsuo Ikeda, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi
(Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ.)

Key words antimicrobial peptide, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, membrane depolarization