

氏名(本籍)	やまもと りか 山本利香(静岡県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2283号		
学位授与年月日	平成12年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	A Novel RNA Aptamer that Binds to the Tat Protein of HIV with Extremely High Efficiency and Specificity (HIVのTatタンパク質にきわめて高い効率で特異的に結合する新規RNAアプタマー)		
主査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学教授	工学博士	松村 正利
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲 可昌
副査	筑波大学教授(併)	Ph. D. (理学)	多比良 和誠

論文の内容の要旨

HIVの転写活性化因子Tatタンパク質は、ウイルスの初期転写産物(mRNA)上に存在するTARという領域に結合し、その転写を促進する。Tatタンパク質による転写活性化は100倍から1000倍にもなるといわれており、Tat存在下でウイルスは爆発的に増幅する。また、Tatは逆転写などにも関わっておりウイルスの増幅に必須のタンパク質である。従って、TatはHIV増幅を抑制するための標的として適したタンパク質の一つであり、これまでに報告されている様々な抗HIV剤に加えて、さらに有効に働く薬剤が得られると期待されている。

現在までにTatタンパク質を標的とした抗HIV剤開発の研究の一つにデコイとしてTAR RNAを用いた方法がいくつか報告されている。デコイを用いた方法というのは、デコイとなる核酸によりTatタンパク質を捕らえてTatがmRNA上のTAR領域に結合するのを阻害する方法である。HIVの増幅抑制で問題となっているのはウイルスの変異による薬剤耐性株の出現である。しかしデコイを用いた方法は、たとえTatが変異してTAR(デコイ)に結合できないようになったとしても、変異TatとmRNA上のTARとの相互作用もなく転写活性化が起こらなくなるということなので、耐性株の出現する可能性が低くHIV増幅抑制に非常に有効な手段である。デコイは有効な道具ではあるが、デコイとしてTAR RNAを用いるのにはいくつか問題点がある。そのうち一つは、TARにはTatのみではなくRNAポリメラーゼIIやTRP-185, Cyclin T1といった宿主細胞のタンパク質も結合することがわかっており、薬剤として投与したときに副作用を示す可能性があることである。TAR RNAの存在下、in vitroでHIVのLTRではないプロモーターからの転写を行ったところ、TAR濃度依存的に転写を抑制する結果も得られた。この転写阻害が、TARが宿主細胞のタンパク質に結合したためであることを確認するために、これまでに同定されているTARの細胞タンパク質結合部位に変異を入れて同様の実験を行ったところ、転写阻害は起こらなくなった。これらのことから、デコイとして新規のRNAを創製することが必要であると考えた。

新規の機能性核酸を探索する方法として、in vitroselection法がある。この方法でTatタンパク質に大変高い親和性と特異的に結合することのできるRNAアプタマーを創出することに成功した。得たRNAアプタマーとHIV-1およびHIV-2のTat由来のペプチドとのKd値を決定したところ、Tatタンパク質が天然に結合する配列、TAR-1、TAR-2RNAのそれぞれに対し我々のアプタマーの結合能が大変高いことが示された、さらに、過剰のTAR RNAの存在下でアプタマーが競争的にTatと結合しうるかどうかをテストしたところ、アプタマーは100倍量のTAR-1RNA、

40倍量の TAR-2RNA と同等の結合活性を示した。次に、このアプタマーは HIV-1LTR プロモーターからの転写を阻害するかどうかを *in vitro* で調べた結果、アプタマーは TAR RNA と同等の転写阻害を示した。先に述べたように、TAR RNA は HIV LTR 以外のプロモーターからの転写を阻害してしまう欠点があったのに対し、新規のアプタマーは HIV-1LTR プロモーターからの転写のみを特異的に阻害した。また、ゲノムに HIV-1LTR・ルシフェラーゼ遺伝子を導入した HeLa 細胞を用いて、細胞内で発現アッセイを行った。その結果、U6 プロモーターから発現させたアプタマーは核内に局在し、有意に HIV-1LTR プロモーターからの発現を抑制することがわかった。以上のように新規に創出したアプタマーは結合能が大変高く、毒性を示す可能性が低く、また HIV-1 のみではなく HIV-2 にも応用できることから、HIV 感染に対する遺伝子治療の一つのツールとして有用である可能性が示された。

新規のアプタマーは Tat との結合能が非常に高いため、遺伝子診断にも応用できるのではないかと考え、新規の Tat タンパク質検出法を開発した。この方法は、Tat のみではなく様々なタンパク質に応用できる可能性があり、迅速かつ簡便に行えるため、遺伝子診断法の一つとしても高い可能性を持っている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

AIDS 患者は年々増加の傾向にあり、HIV 感染に対する完全な治療薬は依然として未開発のままである。その原因の一つが薬剤耐性ウイルスの出現の早さであるが、本研究ではこれを解決できると考えられているデコイ法により、ウイルスの発現を制御することに成功している。本研究で得られた新規 RNA アプタマーは、HIV の Tat タンパク質に対して非常に高い親和性と特異性を有しており、これは今までに知られている RNA・タンパク質の相互作用のなかでもトップレベルのものである。また、*in vitro* の転写アッセイ系で、天然に Tat タンパク質と結合する TAR RNA は HIV の LTR プロモーター以外からの転写をも抑制することを明確にしている。さらに、新規 RNA アプタマーは HIV の LTR プロモーターからの転写のみを特異的に抑制したことから、アプタマーを用いたデコイ法では細胞毒性はないと考えることができる。この RNA アプタマーは HIV 1 型のみではなく、HIV 2 型の Tat タンパク質にも強く結合できることから、どちらの感染患者にも有効である可能性も示唆している。

本研究では、新規 RNA アプタマーが Tat タンパク質に対して非常に高い結合力を示すことを利用して、新規の Tat タンパク質検出アッセイ法も開発している。この方法は、簡便に行うことが可能で、且つコストがかからないことから、さらに改良を加えることで Tat タンパク質の検出方法の一つとして有効である。さらに、この方法は、他のアプタマー・タンパク質にも応用可能であり、その点で一般的なアプタマーの応用の可能性を広げるものであるといえる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有する者と認める。