HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification of a Nucleoporin358 specific RNA aptamer using the Protein-SELEX method to achieve a nuclear targeting delivery system using a MEND [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	SHRIVASTAVA, Garima
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11415号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55803
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Garima_Shrivastava_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（生命科学）　　氏　名　　Garima Shrivastava

審査担当者	主　査	教　授	原　島　秀　吉
	副　査	教　授	鈴　木　利　治
	副　査	准教授	秋　田　英　万
	副　査	講　師	多　留　偉　功

学 位 論 文 題 名

Identification of a Nucleoporin358 specific RNA aptamer using the Protein-SELEX method to achieve a nuclear targeting delivery system using a MEND
（核への選択的薬物送達システム確立のための protein SELEX 法に基づくヌクレオポリン 358 標的 RNA アプタマーの探索）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

異常な遺伝子をもっているために、機能不全になっている細胞の核へ治療用の人工遺伝子を送達して、遺伝子治療を達成することは次世代医療に直結する大きな課題である。Gelsinger 事件の後、ウイルスベクターはその危険性が問題視されており、非ウイルスベクターにかかる期待は日々大きくなって来ている。しかし、非ウイルスベクター自身には、単独では核に到達する能力を持っていないため、ベクター単体では遺伝子送達は難しく、核を標的するとされるリガンドに関しても必ずしも成功しているとは言えない。そのため、新規の核に強く結合するリガンドと、それによる新たな方法論の創出が課題となっている。

本論文は、このような現況にある核のリガンド開発において、核の細胞質側表面に存在するヌクレオポリン 358（Nup358）に対するアプタマーの取得とその機能評価、さらにそのアプタマーをリポソームに導入して機能を発揮するかどうかについて述べられている。これまで核を標的するアプタマーは存在せず、新規な研究であると言える。

著者は Nup358 タンパク質を標的に、2'-フルオロ化学修飾 RNA をライブラリーとして SELEX を行った。Nup358 は細胞質側に存在するヌクレオポリンタンパク質で、生体内で核酸、タンパク質を核へ輸送する際に始めに結合するタンパク質であるので、核を標的するリガンドを得るという観点から良好な標的分子であると考えられる。358 kD と非常に大きなタンパク質で組み替えタンパク質の作成は容易ではないが、京都大学の吉村准教授から御供与頂くことにより実験を遂行することができた。また、得られたアプタマーはリガンドとして細胞質で使用するため、酵素耐性は必須であるので、化学修飾 RNA を選択するのは理にかなっていると言える。7 サイクルのセレクションの末、Nup358 に結合する RNA 配列を得た。回収されたライブラリーの量が増えていることから標的タンパク質に結合する RNA 量が増大した、換言すれば、RNA ライブラリーの濃縮が行われていることが観察された。そのライブラリーをシークエンシングし、50 個の RNA 配列を得、これらの配列を網羅的に解析し、Nup358 にタンパク質に強く結合する RNA アプタマー NupApt01 および NupApt02 を同定した。EMSA により NupApt02 の解離定数は 1.6 μM であり、また非標的タンパク質である、BSA に対しては結合しないことを確認した。このことから得られたアプタマーが Nup358 に対して選択的に結合することが示された。

続いて、著者は NupApt01 および 02 アプタマーを PEG-脂質と化学結合させ、アプタマー-PEG-脂質コンジュゲートとした後、リガンドとしてリポソームへ導入した。分光学的なデータから合成が成功裡に行われたことが示された。続いて、このコンジュゲートをリポソームへ導入した。各種、物理化学的なパラメーターから、リガンドが導入されていたことが示されていた。HeLa 細胞から単離された核に対してこのアプタマー担持リポソームが結合するかどうかを調べた結果、リガンドの無い PEG 修飾リポソームに対して 6-7 倍多くのリポソームが結合する、すなわちリガンド修飾により結合力が向上していることが示された。続いてこの核を共焦点レーザー走査型顕微鏡で調べたところ、核膜表面に結合していることが示された。これに対して CRO-26 と呼ばれるヌクレオリンに結合しないことが知られている C-rich oligonucleotide 修飾リポソームは核には結合しなかった。ここから、NupApt 修飾リポソームは核に対す

るリガンド能をもち、核酸の配列特異的に核に結合していることが示された。さらに蛍光非標識リポソームを用いて競合阻害実験を行ったところ、10 当量過剰の非標識リポソーム処理により蛍光標識 NupApt リポソームの結合が阻害された。つまり、NupApt リポソームは標的特異的に結合していることが示された。

これを要するに，著者は，核表面に存在するタンパク質 Nup358 を標的するアプタマーを SELEX 法により創出した。さらに、ここで得られたアプタマーが実際に Nup358 に結合することを確認した。さらにこのアプタマーをリポソームへ導入し、HeLa 細胞から得られた単離核へ、核酸の配列選択的に、さらにレセプター選択的に結合することを示した。この発見はこれまで存在しなかった人工の核標的リガンドの創出であり、リポソーム上でも機能することから DDS のリガンドとして有望であると考えられ、今後の発展が期待される大きな一里塚であると言える。

よって著者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。