

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：RNA アプタマーを用いた標的タンパク質分解誘導法の開発

Development of targeted protein degradation system using RNA aptamers

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：福永 圭佑

Keisuke Fukunaga

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人宮崎大学 研究・産学地域連携推進機構 テニユアトラック推進室 准教授

Associate Professor, Institute for Tenure Track Promotion, Organization for Promotion of Research and Industry-Academic Regional Collaboration, University of Miyazaki

II 研究開発の概要

タンパク質分解誘導キメラ分子 (PROTAC) は、ユビキチンリガーゼ (E3) 結合リガンドと標的タンパク質結合リガンドをリンカーで連結したヘテロ化合物の総称であり、E3 と標的タンパク質を人工的に近接させることにより、標的タンパク質のポリユビキチン化およびプロテアソームによる分解を誘導する技術である。PROTAC は、従来の低分子薬では機能阻害が困難であった非酵素系タンパク質を創薬標的へと転換し得る点で、革新的な創薬モダリティとして注目されている。一方で、明確な結合ポケットを持たない、あるいは構造的に柔軟性の高いタンパク質に対しては、低分子リガンドに基づく従来型のアプローチでは対応が困難であるという課題がある。これらのアンドラッグブルターゲットに対する有効な分子設計基盤の確立は、創薬研究における重要な未解決課題の一つである。

本研究開発では RNA アプタマーが持つ高い分子認識能および配列設計自由度に着目し、標的タンパク質、およびユビキチンリガーゼ (E3) を認識可能な RNA アプタマーを融合した RNA アプタマー版 PROTAC (二重特異性 RNA アプタマー) を設計し、標的タンパク質分解誘導 (TPD) を行った。細胞内の主要なタンパク質分解機構であるユビキチン-プロテアソーム系を活用し、新規分子モダリティとしての RNA アプタマーにより標的タンパク質を分解へと導く技術基盤を確立することを目的としている。

具体的には、申請者が SELEX により取得した E3 リガーゼ X に結合する RNA アプタマーと、がん治療に関連する複数の標的タンパク質 (A～D) に結合する既知の RNA アプタマーを融合した二重特異性 RNA アプタマーを作製し、活性評価を行った。また、蛍光タンパク質を指標とした TPD 活性評価系を構築し、分子設計および発現条件の最適化、さらに E3 リガーゼ結合アプタマーの改良および新規取得を通じて分解誘導効率の向上を図った。本研究開発を通じて、RNA アプタマーを用いた分解誘導技術の実現可能性、および設計指針に関する基礎的知見が得られた。各研究項目における主な成果は以下の通りである。

1) RNA 版 PROTAC の構造最適化

TPD 活性を定量的に評価するため、培養細胞を用いた評価系を構築しその妥当性を検証した。具体的には、デュアルレポーター（EGFP-RBP-FLAG/mKate2）を搭載したオールインワンプラスミド DNA を構築した。EGFP-RBP-FLAG 遺伝子、および mKate2 遺伝子は P2A リンカーにより連結し、単一プロモーター下で共発現させる設計とした。本系により、細胞間のばらつきを補正しながら分解誘導活性を定量的に評価することが可能となった。HEK293T 細胞に当該プラスミドを導入し、フローサイトメトリー、ウェスタンブロットおよび共焦点レーザー顕微鏡観察により解析を行い、EGFP-RBP-FLAG および mKate2 の明瞭な共発現が確認された。mKate2 は細胞質および核に分布する一方、EGFP-RBP-FLAG（TPD レポーター）は主に細胞質に局在していることを確認した。

さらに、本評価系の機能検証として、タンパク質型 PROTAC（bioPROTAC）を設計し、TPD レポーターの分解誘導を試みた。GFP に結合する一本鎖抗体の C 末端にデグロン配列を融合した分子を用いたところ、共発現条件下において時間依存的な TPD レポーターの減少が観察された。また、ユビキチン・プロテアソーム経路阻害剤処理により分解が部分的に抑制されたことから、ユビキチン-プロテアソーム経路依存的な分解であることを確認した。

次に、蛍光 RNA アプタマー Pepper をモデル系として RNA の環状化、および細胞内挙動の検討を行った。なお、Pepper はスキャフォールド RNA 内に導入した。環状化 RNA、または直鎖状 RNA を U6 プロモーターで転写し、HBC620 染色の後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。環状化 RNA は直鎖状 RNA と比較して高い蛍光シグナルを示し、リボヌクレアーゼ耐性の向上が示唆された。さらに、細胞内局在にも差異が認められ、分子構造が細胞内挙動に影響を与えることが明らかとなった。HEK293T、HeLa を用いて試験を行ったが両細胞株で挙動は同じであった。他方、Pol II 系である CMV プロモーターで蛍光 RNA アプタマーを発現させた場合、細胞質内に顆粒様の構造として局在しており、RNA アプタマー発現に CMV プロモーターは適していないと結論づけた。

さらに、二重特異性 RNA アプタマーのアプタマー間を隔てるリンカー長の検討を行った。U6 プロモーター下で TPD 検出用の RBP とユビキチンリガーゼ X の双方に結合できる二重特異性 RNA アプタマーを発現させ、フローサイトメトリーによる TPD 活性の評価を行った。アプタマーのトポロジーの違い、リンカー長、アプタマーの種類、RNA 環化の有無により組み合わせ的に検討を行い、二重特異性 RNA アプタマーの分子設計に有用な情報が得られた。

2) 創薬標的タンパク質の分解誘導

複数の創薬関連タンパク質（A～D）を対象として、既知の RNA アプタマーと E3 リガーゼ X 結合 RNA アプタマーを融合した二重特異性 RNA アプタマーを設計した。これらの配列はスキャフォールド RNA 内に組み込み、環状化 RNA として細胞内発現させた。HEK293T 細胞に遺伝子導入し一定時間後にタンパク質発現量を評価した結果、初期条件では有意な分解誘導は確認されなかった。しかしながら、三者複合体形成に特有の濃度依存性（フック効果）の影響を考慮し、プラスミド DNA 導入量の最適化を行ったところ、最終的に全ての標的タンパク質発現量の減少が確認された。従来の PROTAC 技術と同様に、二重特異性 RNA アプタマーを用いた分解誘導システムにおいても、TPD 活性の発現にはアプタマー濃度の検討が重要な要素であることが示された。

3) 新規 RNA アプタマーの取得による分解誘導活性向上の検討

E3 リガーゼ X に対する結合親和性向上を目的としてアプタマーの変異体ライブラリーを構築し、再度 SELEX を実施した。その結果、特定配列の濃縮が確認され、候補分子の選抜に成功した。取得した RNA 配列の結合実験を行い、X に対する特異的結合を確認した。

さらに、別種の E3 リガーゼ複数に対する RNA アプタマーの取得も試みた。その結果、一部の E3 に対しては明確な配列濃縮および候補配列の出現が認められた一方で、条件依存的に十分な濃縮が得られないケースも確認された。得られた候補配列を用いて TPD 活性の評価を行った結果、配列ごとに活性差が認められた。

Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) are a class of heterobifunctional molecules composed of a ligand for an E3 ubiquitin ligase and a ligand for a target protein, connected by a linker. By artificially inducing proximity between the E3 ligase and the target protein, PROTACs promote polyubiquitination of the target protein and its subsequent degradation by the proteasome. PROTACs have attracted attention as an innovative drug discovery modality, because they enable the conversion of non-enzymatic proteins, which are difficult to inhibit using conventional small-molecule drugs, into tractable drug targets. On the other hand, for proteins that lack well-defined binding pockets or exhibit high structural flexibility, conventional approaches based on small-molecule ligands remain challenging. Establishing an effective molecular design platform for such undruggable targets therefore represents an important unresolved issue in drug discovery research.

In this study, as a novel approach to address this challenge, we focused on the high molecular recognition ability and sequence design flexibility of RNA aptamers. We designed RNA aptamer-based PROTACs (i.e., bispecific RNA aptamers) by fusing aptamers capable of recognizing a target protein and an E3 ubiquitin ligase and evaluated their ability to induce targeted protein degradation (TPD). The objective of this study is to establish a technological platform that utilizes RNA aptamers as a new molecular modality to induce degradation of target proteins through the ubiquitin-proteasome system. Specifically, we constructed bispecific RNA aptamers by combining an RNA aptamer that binds to E3 ligase X, obtained by SELEX, with RNA aptamers that bind cancer-related target proteins (A–D, tentative names), and evaluated their TPD activity. In addition, we established a TPD activity evaluation system using fluorescent proteins as a reporter and sought to improve degradation efficiency through optimization of sequence design and expression conditions, as well as through refinement and identification of novel E3 ligase-binding aptamers. Through this study, we accumulated fundamental knowledge regarding the feasibility and design principles of RNA aptamer-based protein degradation technologies. The main results of each section are as follows.

1) Structural optimization of RNA-based PROTACs

To quantitatively evaluate TPD activity, we constructed a degradation evaluation system using cultured cells and validated its performance. Specifically, we developed an all-in-one plasmid for mammalian cells encoding a dual-reporter system consisting of EGFP-RBP-FLAG (RBP: RNA-binding protein) and mKate2. EGFP-RBP-FLAG and mKate2 were fused via a 2A sequence and designed to be co-expressed under a same promoter. This system enabled quantitative evaluation of degradation activity while correcting for cell-to-cell variability. The plasmid was introduced into HEK293T cells, and the system was analyzed by flow cytometry, Western blotting, and confocal laser scanning microscopy. While mKate2 was distributed in both the cytoplasm and nucleus, the EGFP-RBP-FLAG (TPD reporter) was predominantly localized in the cytoplasm.

To validate the functionality of this evaluation system, we next designed a protein-based PROTAC (bioPROTAC) and attempted to induce degradation of the TPD reporter. We used a GFP-binding single-chain antibody fused to a degron sequence. Under co-expression conditions, a time-dependent decrease in the TPD reporter was observed. Moreover, degradation was partially suppressed by treatment with ubiquitin–proteasome pathway inhibitors.

Next, using the fluorescent RNA aptamer Pepper as a model system, we evaluated RNA circularization and intracellular behavior. Linear and circular RNAs were transcribed under the U6 promoter and analyzed by confocal microscopy. Tandem repeats of Pepper (4x Pepper) were incorporated into a scaffold RNA. The circular RNA aptamer exhibited higher fluorescence intensity than the linear form, suggesting improved cellular stability. Interestingly, differences in subcellular localization were also observed, indicating that RNA structure influences intracellular behavior. Similar results were obtained in both HEK293T and HeLa cells. On the other hand, expression of the fluorescent RNA aptamer under the CMV promoter resulted in punctate cytoplasmic localization, suggesting that the Pol II system is not suitable for aptamer expression.

In addition, we tested the linker length between the two aptamer domains in bispecific RNA aptamers. Under the control of the U6 promoter, bispecific RNA aptamers capable of binding both the RBP domain in the TPD reporter and E3 ligase X were expressed, and TPD activity was evaluated by flow cytometry. Combinatorial analyses varying topology, linker length, aptamer type, and RNA circularization provided useful insights into the molecular design of bispecific RNA aptamers

2) Degradation of intracellular targets

We designed and constructed bispecific RNA aptamers targeting multiple disease-related proteins (A–D) by fusing corresponding RNA aptamers with an E3 ligase X-binding aptamer. These sequences were incorporated into a scaffold RNA and expressed as circular RNA aptamers. Following transfection into HEK293T cells and Western blotting analysis of protein expression levels, no significant degradation was initially observed. Finally, optimization of plasmid DNA amount led to detectable reductions in all target proteins. Similar to conventional PROTAC systems, these results suggest that PROTAC dosage is an important factor influencing the TPD activity.

3) Identification of novel RNA aptamers

To improve the binding affinity of a previously identified RNA aptamer against E3 ligase X, we constructed a doped RNA library and performed reselection of the aptamer. As a result, enrichment of specific sequences was observed, leading to successful identification of candidate sequences. Interaction analyses confirmed specific binding to the target. Additionally, we attempted to obtain RNA aptamers against other E3 ligases. While clear sequence enrichment and emergence of candidate sequences were observed for some targets, insufficient enrichment was noted for others under certain conditions. Functional evaluation of these candidates revealed differences in TPD activity.