2025 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	**ユビキチンアプタマーの特性評価** **－多様なユビキチン修飾機能の解明に向けて－**
キーワード	①ユビキチン、②アプタマー、③G-quadruplex 構造

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏　名	オカダ　マイコ 岡田　麻衣子
配付時の所属先・職位等 （令和７年４月１日現在）	東京工科大学応用生物学部・講師
現在の所属先・職位等	東京工科大学応用生物学部・講師
プロフィール	東京大学大学院農学生命科学研究科において農学博士の学位を取得後、同大学および聖マリアンナ医科大学の助教を経て、現職に着任。核酸テクノロジーの医薬品および香粧品への応用に従事。

1. 研究の概要

私たちの体をつくる細胞の中では、たくさんのタンパク質が働いている。タンパク質は、古くなったり傷ついたりすると、細胞に悪影響を及ぼすことがある。そのため細胞には、不要になったタンパク質に「処分」や「働きの切り替え」を知らせる目印を付ける仕組みが備わっている。この目印の一つが、ユビキチンと呼ばれる小さなタンパク質である（図 1）。ユビキチンがどのようにつながるかによって、細胞内で伝わる指令は変化する。つまり、ユビキチン修飾は細胞の中で使われる「分子のタグ」のような役割を果たしている。

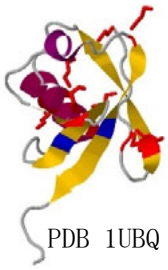

PDB 1UBQ

図 1

ユビキチン修飾の仕組みに異常が生じると、不要なタンパク質が細胞内にたまり、神経変性疾患をはじめとする様々な疾患につながる可能性がある。そのため、どの種類のユビキチン修飾がどこで起きているのかを正確に見分ける技術は、生命現象の理解や疾患の原因解明に重要である。しかし、ユビキチン修飾には多くの種類があり、それらを高精度かつ簡便に識別する技術はまだ十分に確立されていない。

本研究では、ユビキチンを見分ける新しい分子ツールとして、DNAアプタマーに着目した。アプタマーは、特定の分子に結合する短い核酸であり、いわば「分子を見分ける小さなセンサー」として利用できる。本研究では、これまでに取得したユビキチン認識DNAアプタマーについて、どのような構造でユビキチンを認識しているのかを解析した。その結果、このアプタマーは4分子のグアニン（G）からなる平面構造のG-quartet構造が積み重なった、G-quadruplex（G4）と呼ばれる特殊な立体構造を形成し、さらにユビキチンと結合する際にその構造を変化させる可能性が示された（図 2）。

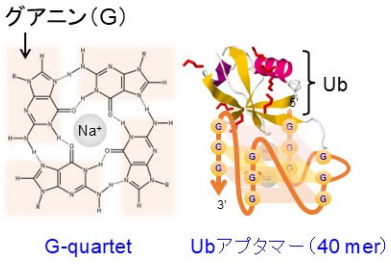


図 2

この成果は、アプタマーが単にユビキチンに強く結合するだけでなく、相手に応じて自らの形を変えることで、ユビキチン修飾を識別できる可能性を示している。今後、この性質を利用することで、多様なユビキチン修飾を見分ける検出技術や、神経変性疾患などに関連する異常タンパク質の解析・検出技術への応用が期待される。

2. 研究の動機、目的

細胞の中では、タンパク質が必要な場所で正しく働き、不要になったものは適切に処理されることで、生命活動が保たれている。ユビキチンは、そのタンパク質に付けられる目印の一つであり、付けられ方の違いによって、タンパク質を分解へ導いたり、細胞内の情報伝達に関わったりする。このため、ユビキチン修飾は細胞の正常な働きを支える重要な仕組みである。近年、このユビキチン修飾には多様な種類が存在し、それぞれが異なる役割を持つことが明らかになってきた。これは、同じ「タグ」でも付け方が違えば意味が変わることに似ている。したがって、生命現象や疾患の仕組みを理解するためには、ユビキチン修飾をまとめて見るのではなく、種類ごとに正確に見分ける技術が必要である。

これまで、特定の分子を検出するためには抗体が広く用いられてきた。しかし、抗体は作製に時間や費用がかかることがあり、新しく見つかる多様なユビキチン修飾すべてに迅速に対応することは容易ではない。そこで本研究では、抗体に代わる分子認識素子としてアプタマーに注目した。アプタマーは、試験管内で取得・改変できる短い核酸であり、安定性が高く、設計の自由度が高いという利点を持つ。

本研究課題では、これまでに取得した単量体ユビキチンを認識するDNAアプタマーを対象として、その結合機構を明らかにすることを目的とした。特に、アプタマーがどのような立体構造をとり、ユビキチンと結合する際にどのように構造を変化させるのかを解析することで、多様なユビキチン修飾を識別可能なアプタマー開発へ展開することを目指した。

3. 研究の結果

ユビキチン結合領域の同定

本研究では、取得済みの81 merユビキチンアプタマー（WT）および各種変異体を用いて、単量体ユビキチン（Ub）への結合能と高次構造の関係を解析した。

まず、*in vitro* pull-down assayにより、WTおよび末端欠損変異体のUb結合能を評価した。本アッセイでは、アミンカップリング法により単量体Ubを磁気ビーズに架橋したユビキチンビーズを用い、Ubを用いずに同様の処理を行ったコントロールビーズを比較対象とした（図3)。各ビーズにWTまたは各種変異体を相互作用させた後、ビーズに結合したDNA量をリアルタイムPCRにより定量した。その結果、5′ 末端側21 mer欠損変異体はWTと同程度の結合能を示した。一方、3′ 末端側20 mer欠損変異体では、非特異的結合が低下し、Ubへの結合能が増加した。これらの結果から、Ub認識には中央40 mer領域が主要な役割を担い、3′ 末端領域は非特異的結合に関与する可能性が示された。

しかし、中央40 mer配列のみの結合能は、リアルタイムPCRでは評価が困難であったため、バイオレイヤー干渉法（BLI）による評価を試みた。ビオチン標識アプタマーをセンサーチップ上に固定化してUbとの相互作用を測定したところ、Ub添加時に負の結合シグナルが観察された。この結果は、Ub結合に伴うアプタマーの高次構造変化を示唆しており、今後はUbを固定化した測定系での再評価が必要である。

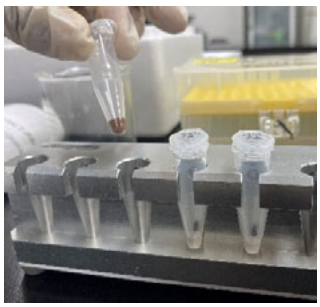


図 3

次に、1塩基置換変異体を用いてUb結合特異性を解析した。T28G変異体ではコントロールビーズへの非特異的結合が増加し、Ub特異性が低下した。一方、T44G変異体ではUbに対する結合特異性が向上した。これらの結果から、アプタマーの認識特異性は、単純な結合量ではなく、塩基置換に伴う高次構造の違いにより制御される可能性が示された。

G4 構造形成と Ub 依存的構造変化の解析

CDスペクトル解析により、WTおよび各種変異体の高次構造を解析した。Ub結合に重要な中央40 mer領域はグアニンに富む配列であり、G4構造の形成が予想された。解析の結果、81 merのWTおよび中央40 mer配列はいずれも、G-quartetから構成されるパラレル型G4構造を形成することが明らかとなった。さらに、Na^+およびK^+の存在を考慮し、AlphaFold3を用いて構造予測を行った。その結果、Na^+存在下では中央40 mer領域の3′ 末端側16 mer配列が3層のパラレル型

G4構造の形成に重要であり、1層目 の G-quartetがUbとの相互作用面を形成する可能性が示唆された(図 4)。

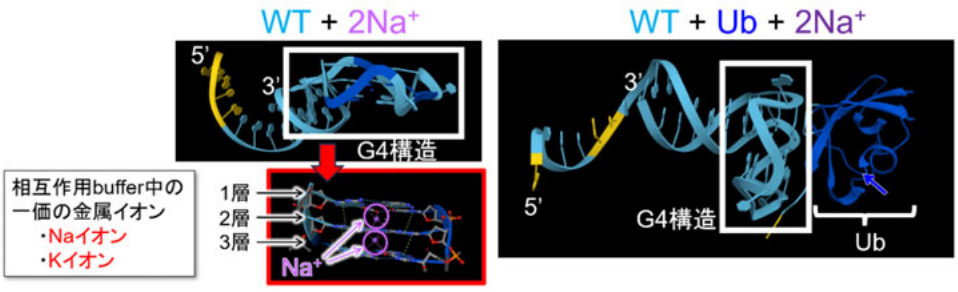


図 4

さらに、Ub存在下および非存在下のCD差分スペクトル解析により、Ub結合に伴ってG4構造が変化することが示された。この結果はBLIの結果とも整合性があり、本アプタマーは安定化したG4構造でUbを認識するのではなく、Ubとの相互作用に応じてG4構造を再編成することで特異性を発揮する可能性が考えらえた。

一方、G4形成に重要と予測された16 mer配列のみではCDスペクトルピークが低下し、構造の不安定化が示唆された。したがって、安定なG4構造の維持には、G4コア配列だけでなく周辺塩基配列も寄与することが考えられた。

G4 構造の安定性と Ub 特異性の関係

T28G変異体では安定なパラレル型G4構造が形成されたが、構造予測ではWTとは異なるG4構造をとる可能性が示された。この構造変化により、Ub認識に必要な結合面または構造変換能が失われ、Ub特異性が低下したと考えられた。一方、T44G変異体では、Ub非存在下でG4構造の一部が不安定化するものの、Ub存在下ではWT以上に安定したパラレル型G4構造へ変換されることが予測された。したがって、T44G変異体におけるUb特異性の向上は、G4構造の静的な安定性ではなく、Ub依存的な構造変換能に起因する可能性が高いことが示唆された。

ポリユビキチン鎖認識への展開

81 merのWTは、DNA修復シグナルなどを担うK63Ubに対して、単量体Ubよりも強く結合する傾向が認められた。この結果から、本アプタマーが単量体Ubだけでなく、ユビキチン鎖の立体配置や結合様式を識別できる可能性が示唆された。

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究を通じて、ユビキチンアプタマーの構造と機能の関係を解析し、標的分子を認識する仕組みを分子レベルで考える力を深めることができた。特に、アプタマーが単に標的に結合するだけでなく、標的に応答して自らの構造を変化させる可能性を見出したことは、今後の研究を展開するうえで大きな手がかりとなった。今後は、この経験を基盤として、生命現象を支える小さな分子の働きを丁寧に解き明かし、その成果を社会に役立つ技術へとつなげられる研究者を目指したい。具体的には、ユビキチン修飾を識別するアプタマーの開発をさらに進め、将来的には神経変性疾患などで見られる異常なタンパク質の蓄積を簡便に検出できる技術へと発展させたいと考えている。基礎研究で得られた発見を、疾患の理解や診断支援、創薬研究に役立つ形へ育てていくことが今後の目標である。

また、本研究で扱った G4 構造は、アプタマーだけでなく、細胞内のゲノム DNA にも存在し、遺伝子の働きの調節にも関わることが知られている。ユビキチン認識アプタマーの研究を出発点として、分子認識、タンパク質品質管理、疾患解析、さらにはゲノム機能制御へと研究を広げ、生命を支える分子構造の働きを多角的に理解していきたい。

さらに、研究成果を論文や学会発表として発信するだけでなく、学生や若手研究者の育成にも力を入れたい。研究の面白さは、目に見えない分子の働きを一つひとつ明らかにし、その発見が将来の社会を支える技術につながる点にある。その魅力を後輩や学生に伝え、共に考え、挑戦できる研究環境をつくることも、研究者としての重要な役割だと考えている。基礎研究と社会応用、人材育成の三つを大切にしながら、長く社会に貢献できる研究者として成長していきたい。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は、本研究課題に女性研究者奨励金を授与いただき、誠にありがとうございました。皆様からのご支援により、ユビキチンアプタマーという新しい分子ツールの性質を詳しく調べることができました。特に、ユビキチンを認識する際にアプタマー自身の形が変化する可能性を見出し、今後の研究を発展させるための重要な手がかりを得ることができました。

ユビキチンは、細胞の中で不要になったタンパク質や異常なタンパク質に付けられる「目印」のような分子です。この目印が正しく働かないと、細胞の中に異常なタンパク質がたまり、神経変性疾患などの病気に関わることがあります。本研究で得られた成果は、このような細胞内の異常をより詳しく調べるための新しい検出技術につながる可能性があります。

今回のご支援は、研究を進めるための大きな後押しとなっただけでなく、研究者として新しい研究の方向性を切り拓く貴重な機会となりました。本奨励金を通じて得られた成果を基盤に、今後は多様なユビキチン修飾を見分ける技術や、疾患に関わる分子を簡便に検出する技術の開発へと研究を発展させていきたいと考えています。

基礎研究の成果は、すぐに社会で使える技術になるとは限りません。しかし、小さな分子の働きを正しく理解することは、将来の診断法や治療法、創薬研究を支える重要な土台になります。皆様からのご支援を、社会に役立つ科学技術へとつなげられるよう、今後も研究に真摯に取り組んでまいります。また、研究成果を社会にわかりやすく伝えるとともに、次世代の学生や若手研究者の育成にも力を注ぎ、科学の発展に貢献してまいります。