

修飾 DNA をセンサ素材とする新しいバイオセンサの開発

楽原 正靖

群馬大学大学院工学研究科

1. 研究のねらい

核酸分子 (DNA, RNA) は遺伝情報の保持・伝達に主要な役割を果たす分子として知られているが、その配列によっては、抗体のように特定の物質を特異的に認識し結合する機能をもつもの (DNA アプタマー, アプタマー) がある。抗体は腫瘍マーカー検査やインフルエンザ検査、妊娠検査などの診断薬として既に実用化されており、最近ではガンや免疫疾患などの治療薬としての応用に大きな注目が集まっている。しかし、抗体は一般に生物を用いて作製・製造されるため、抗体作製 (開発) の効率化や抗体製造の低コスト化などが課題となっている。一方、核酸分子でできたアプタマーは抗体に代わる安価な機能分子として注目されているが、生体内のヌクレアーゼ (核酸分解酵素) によって容易に分解されるという欠点がある。さらに、核酸のモノマーユニットは 4 種類しかないため、約 20 種類のモノマーユニットから構成されるタンパク質に比べて、活性や機能の多様性が劣っている。そこで本研究では、活性の向上および機能の多様化、ヌクレアーゼ耐性などを指向して、修飾 DNA ライブラリを用いたインビトロ・セレクション法による修飾 DNA アプタマーの創出を試みた。

2. 研究成果

天然のヌクレオシド三リン酸の代わりに修飾ヌクレオシド三リン酸を基質としてポリメラーゼ反応を行うことによって、修飾 DNA を調製することができる。しかし、修飾ヌクレオシド三リン酸の化学構造や DNA ポリメラーゼの種類などを吟味しなければ、収率良く修飾 DNA が得られなかったり、高頻度に誤った取り込み (ミスインコーポレーション) を生じたりする。そこで、収率よく修飾 DNA を与える DNA ポリメラーゼと修飾ヌクレオシド三リン酸の組み合わせを見出すために、種々の修飾ヌクレオシド三リン酸を合成し、それらの DNA ポリメラーゼに対する基質特性を、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) アッセイなどによって精査した。

得られた実験結果に基づいて修飾 DNA ライブラリを構築し、サリドマイド誘導体に特異的に結合する修飾 DNA アプタマーの選別を行った。図 1 にインビトロ・セレクション法によって修飾 DNA ライブラリから修飾 DNA アプタマーを作製するスキームを示した。まず、化学合成したランダム配列を含むオリゴヌクレオチド (110mer) を鋳型として、ポリメラーゼ反応によって修飾 DNA ライブラリを調製した。次に、ターゲット分子を固定化したゲルを用いて、アプタマー活性をもつ修飾 DNA 分子を選別した。選別した修飾 DNA 分子を PCR によって増幅し、再び修飾 DNA ライブラリを調製した。これら一連の工程を 15 サイクル繰り返した後、クローニング法によって単離し、表面プラズモン共鳴法 (SPR) や蛍光偏光法をなどによって結合親和性や特異性を評価した。最も高い結合親和性を示した修飾 DNA アプタマーについて、その活性部位を調べるために、配列から予測される二次構造に基づいて全体を 4 つの部分に断片化した。それぞれのフラグメントの結合活性を調べたところ、ステム・バルジ・ループというシンプルな構造をとるフラグメント 1 (31mer) に結合活性があることが分かった (図 2)。そのフラグメント 1 の改変体をいくつか化学合成し、それらの結合活性を比較検討したところ、サリドマイド誘導体が結合する部位を同定することができた。同様の方法で、サリドマイド誘導体の他に、グルタミン酸や DNA 二重鎖中の

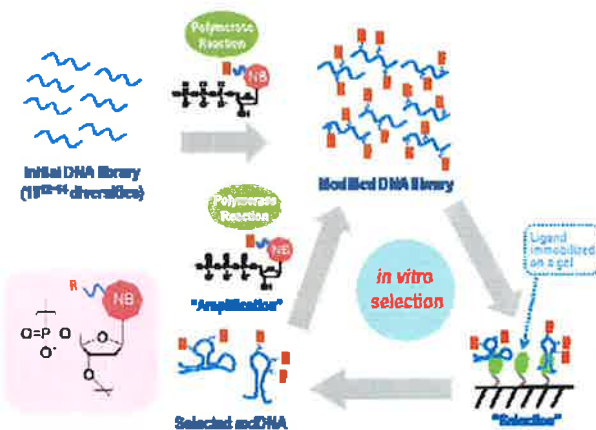


図 1 修飾 DNA ライブラリを用いたインビトロ・セレクション法

ミスマッチ構造に結合親和性を示す修飾 DNA アプタマーなどの取得にも成功した。

催眠、鎮痛剤として汎用されたサリドマイドは、妊婦が服用すると胎児に四肢欠損症などの異常を引き起すために市場から淘汰されたが、自己免疫疾患や癌、エイズなどの治療薬の候補として近年再び脚光を浴びている。また、グルタミン酸は、神経細胞のプログラム死に関与する重要物質であり、パーキンソン病などの神経変性疾患との関連が研究されている。このように、生体内には生体関連物質や薬剤が引き起こす興味深いイベントがたくさん存在し、未だ作用機序が明らかにされてないものも少なくない。特定の物質を特異的に認識するアプタマーは、基礎研究のための分子ツールとしてだけでなく医薬・診断薬への応用も検討されている。さらに、修飾基を導入したアプタマーは、生体内における安定性や機能の拡張性において、高いポテンシャルを有している。

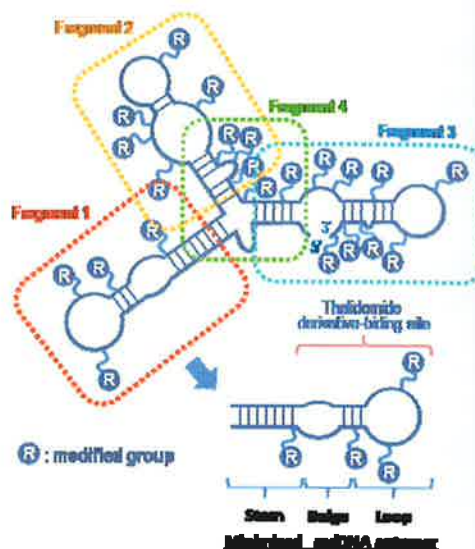


図2 取得したサリドマイド結合修飾 DNA アプタマーとサリドマイド結合部位の同定

3. 主な発表

論文

- Kazuomi Ohsawa, Toshiyuki Kasamatsu, Jun-ichi Nagashima, Kazuo Hanawa, Masayasu Kuwahara*, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai; Arginine-modified DNA aptamers that show enantioselective recognition of the dicarboxylic acid moiety of glutamic acid., *Anal. Sci.*, in press.
- Atsushi Shoji, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai*; Modified DNA Aptamer That Binds the (R)-Isomer of a Thalidomide Derivative with High Enantioselectivity., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, (5), 1456-1464 (2007).
- Masayasu Kuwahara*, Jun-ichi Nagashima, Masatoshi Hasegawa, Takehiro Tamura, Rina Kitagata, Kazuo Hanawa, Shin-ichi Hososhima, Toshiyuki Kasamatsu, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai; Systematic characterization of 2'-deoxynucleoside-5'- triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA., *Nucleic Acids Res.*, **34**, (19), 5383-5394 (2006).
- Masayasu Kuwahara, Kazuo Hanawa, Kazuomi Ohsawa, Rina Kitagata, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai*; Direct PCR amplification of various modified DNAs having amino acids found in proteins: convenient preparation of DNA libraries with high-potential activities for *in vitro* selection., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, (8), 2518-2526 (2006).
- Tatsuo Ohmichi, Masayasu Kuwahara, Naoko Sasaki, Masatoshi Hasegawa, Takahito Nishikata, Hiroaki Sawai and Naoki Sugimoto*; Nucleic acid with guanidinium modification exhibits efficient cellular uptake., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, (41), 6682-6686 (2005).
- Tsutomu Ohbayashi, Masayasu Kuwahara, Masatoshi Hasegawa, Toshiyuki Kasamatsu, Takehiro Tamura and Hiroaki Sawai*; Expansion of repertoire of modified DNAs prepared by PCR using KOD Dash DNA polymerase., *Org. Biomol. Chem.*, **3**, (13), 2463-2468 (2005).

招待講演

- 栗原正靖, 人工核酸分子の可能性～核酸医薬・診断薬の創製をめざして～, 第22回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム(仙台), 日本化学会, 2007年9月.
- 栗原正靖, インビトロ・セレクション法による機能性修飾 DNA 分子の創製, 第127年会(富山), 日本薬学会, 2007年3月.

4. その他

特許

- 栗原正靖、澤井宏明、新規核酸誘導体及びそれを用いたポリヌクレオチドの製造方法、特願2005-217479、出願人：群馬大学

受賞

- 日本化学会第86春季年会優秀講演賞, 2006年5月