

研究課題別評価書

1. 研究課題名

修飾 DNA をセンサ素材とする新しいバイオセンサの開発

2. 氏名

栗原 正靖

3. 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。

4. 研究成果

DNAアプタマーやアプタマーなどの機能性核酸は、インビトロ・セレクション法と呼ばれるコンビナトリアル的手法によって、人為的に創出することができる。修飾DNAを用いてインビトロ・セレクション法を行うには、修飾ヌクレオシド三リン酸がポリマーゼ反応の良い基質として作用する必要がある。即ち、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たポリマーゼ反応がうまく進行し、修飾DNAが生成しなければならない。しかし、修飾ヌクレオシド三リン酸の化学構造やDNAポリマ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ポリマ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ポリマーゼに対する基質特性を、PCR(ポリメ

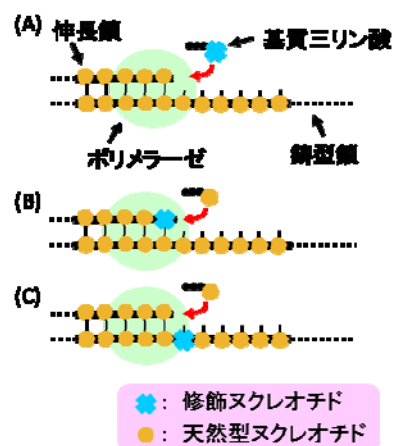


図1 修飾がポリマーゼ反応に及ぼす影響

一ゼ連鎖反応)アッセイなどによって精査した。その結果、修飾基の嵩高さや電荷の有無、リンカーの長さや柔軟性など化学構造の違いによって、生成物である修飾 DNA の収量が大きく変わることが分かった。特に、負電荷をもつ修飾基の導入は、修飾 DNA の生成を著しく減少させた。また、DNA ポリメラーゼの種類は、遺伝子進化ファミリー A および D に属するものよりも、ファミリー B に属するものの方が、塩基部位の修飾に対して寛容であることが分かった。ファミリー B に属する *Vent(exo-)* DNA ポリメラーゼや *KOD Dash* DNA ポリメラーゼは種々のタイプの修飾に幅広く寛容であり、対応する修飾 DNA を比較的収率良く生成したが、クローニング法を用いた生成物の配列解析を行ったところ、後者の方がヌクレオチド取り込みのフィデリティ(忠実度)が高く、インビトロ・セレクション法への利用に適していることが分かった。次に、PCR のどのステップが生成物の多寡を決定付けているのかを特定するために、DNA 伸長末端に修飾チミジンを含むプライマーおよび伸長末端近傍に修飾チミジンを含む鋳型 DNA を用いて、*Vent(exo-)* DNA ポリメラーゼが触媒する修飾 DNA 生成反応の速度論的解析を行った。その結果、ピリミジン環 C5 位の修飾基がポリメラーゼ反応に及ぼす負の効果は、その修飾基が、基質三リン酸上(A)、プライマー鎖上(B)、鋳型鎖上(C)のうち、プライマー鎖上(B)にある場合に最も大きいということが示唆された(図 1)。これらの傾向は、種類の異なる *KOD(exo-)* DNA ポリメラーゼでも同様に見られた。

PCR アッセイで得られた実験結果に基づいて、天然型のチミジンの代わりに 5-(2-(6-アミノヘキシルアミノ)-2-オキソエチル)-2'-デオキシウリジンを含む修飾 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。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図 2 に示した。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)や蛍光偏光法等により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 つのパートに断片化した。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 3)。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。

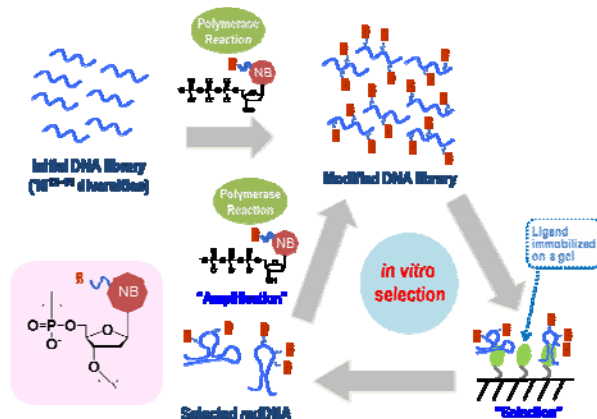


図 2 修飾 DNA ライブラリを用いたインビトロ・セレクション法

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い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や診断薬など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。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、群馬大学大学院工学研究科教授・澤井宏明先生および准教授・尾崎広明先生、庄司敦士氏、永島潤一氏より多大なるご尽力を賜りました。また、*KOD(exo-)* DNA ポリメラーゼを提供して下さいました東洋紡株式会社に厚く御礼申し上げます。

5. 自己評価

本研究期間中に当初の目標であった修飾 DNA アプタマーと修飾 DNA ザイムを組み合わせた修飾 DNA アプタザイムの創製には至らなかった。セレクションの過程における修飾 DNA の調製に予想以上に手間取ったことが一因として挙げられる。しかし、それでもサリドマイド誘導体に結合する修飾 DNA アプタマーをはじめとする幾つかのユニークな修飾 DNA アプタマーの取得に成功したことは、核酸ライブラリを用いるインビトロ・セレクション法の応用と今後の発展に大きく寄与するものと考えている。さらに、種々の修飾ヌクレオシドを含むオリゴマーや修飾基質三リン酸を用いた独創的な研究によって、*KOD Dash* および *KOD(exo-)* DNA ポリメラーゼが、「高いフィデリティ（忠実度）」と「修飾に対する幅広い寛容性」という一見して相反する特性を併せ持つことを明らかにし、修飾 DNA の酵素的合成における有用性を示した。その機構の解明については現在研究中であるが、これらの知見は修飾 DNA の酵素的合成法を用いる機能性修飾核酸の創製に大いに役立てられると考えている。

6. 研究総括の見解

低分子化合物に対して抗体様機能をもつ DNA (アプタマー) を得るために、合成化学的手法を用いて修飾 DNA ライブラリを調製し、その中からインビトロ・セレクション法により特定の化合物に

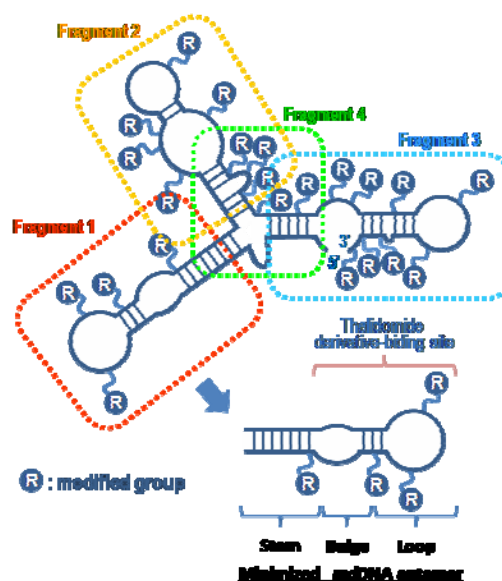


図3 取得したサリドマイド結合修飾 DNA アプタマーとサリドマイド結合部位の同定

優れた識別能を持つアプタマーを創出するための方法論を展開した。主たる成果は次の2点である。

①各種修飾ヌクレオシド三リン酸を合成し、その PCR を可能とする幅広い寛容性と反応忠実性を両立させる2種の DNA ポリメラーゼの選択に成功した。

②修飾 DNA ライブラリを用いて R-サリドマイド誘導体などの低分子化合物に特異的に結合するアプタマーの取得に成功した。

これらの成果は、幅広い種類の修飾ヌクレオシド三リン酸を合成し、各種 DNA ポリメラーゼを用いた修飾 DNA ライブラリの調製、インビトロ・セレクションを着実に実行することにより得られている。中でも、光学活性サリドマイド誘導体を高選択的に認識できるアプタマー取得に成功したことは高く評価される。

研究成果は 7 篇の原著論文、2 件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許 1 件を出願している。また、平成 18 年に「日本化学会第 86 春季年会優秀講演賞」を受賞している。

アプタマー開発は医薬や検査薬への応用が期待できる重要な研究課題である。本研究成果は実用的に有用なアプタマーを効率よく創製する方法論として生命科学におけるユニークな計測・分析技術に発展すると考えられる。アプタマーと特異的に結合する分子との相互作用機構を調べ、有用なアプタマー設計への指針を得ることも期待したい。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ 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.”、Organic & Biomolecular Chemistry, 3,(13), 2463–2468 (2005)
- ・ Masayasu Kuwahara, Kazuo Hanawa, Kazuomi Ohsawa, Rina Kitagata, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai, “Direct PCR amplification of various modified DNAs having amino acids: convenient preparation of DNA libraries with high-potential activities for in vitro selection”、Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, (8), 2518–26 (2006)
- ・ 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 Research, 34, (19), 5383–5394 (2006)
- ・ Atsushi Shoji, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Ozaki and Hiroaki Sawai, “A modified DNA

aptamer that binds the (R)-isomer of a thalidomide derivative with high enantioselectivity.”、*Journal of the American Chemical Society*, 129, (5), 1456–1464 (2007)

・ 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”、*Analytical Sciences*, 24, (1), 167–172 (2008)

(2)特許出願

発 明 者: 栗原正靖、澤井宏明

発明の名称: 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

出 願 人: 群馬大学

出 願 日: 2006.3.15.

出 願 番 号: 特願 2005-217479

(3)受賞

・ 平成 18 年 5 月 日本化学会第 86 春季年会優秀講演賞

(4)学会発表

口頭発表(国際)

・ Masayasu Kuwahara, Kazuomi Ohsawa, Toshiyuki Kasamatsu, Atsushi Shoji, Hiroaki Sawai and Hiroaki Ozaki, “Screening of a glutamic acid-binding aptamer from arginine-modified DNA library”、*Nucleic Acids Symposium Series*, 49, 81–82 (2005) (The 4th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry)、2005

・ Atsushi Shoji, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Sawai, Masayasu Kuwahara, Masatoshi Hasegawa, Jun-ichi Nagashima, Hiroaki Sawai, Hiroaki Ozaki 、 “Enzymatic synthesis of modified DNA and its application: Selection of thalidomide-binding modified DNA aptamer”、*PACIFICHEM 2005* (International chemical congress of pacific basin societies)、2005

・ Jun-ichi Nagashima, Satoshi Minezaki, Satoshi Obika, Takeshi Imanishi, Masayasu Kuwahara and Hiroaki Sawai, “Polymerisation of a DNA strand using oligo-DNA template with modified bases, sugars and phosphates”、*Nucleic Acids Symposium Series*, 51, 55–56 (2007) (The 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry)、2007

口頭発表(国内)

・ 栗原正靖, 長谷川雅俊, 田村壮広, 須藤佳之, 澤井宏明, “種々の修飾ヌクレオチドの酵素的取り込みによる DNA ライブラリの多様化”、*日本化学会 第 86 回春季年会*、2006

・ Masayasu Kuwahara, Yoshiyuki Suto, Satoshi Minezaki, Rina Kitagata, Jun-ichi Nagashima and Hiroaki Sawai, “Substrate property and incorporation accuracy of various dATP analogs during enzymatic polymerization using thermostable DNA polymerases.”、*Nucleic Acids*

Symposium Series, 50, 31–32 (2006) (Thirty-third Symposium on Nucleic Acids Chemistry),
2007

(5) 招待講演

招待講演(国内)

- ・ 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”、日本薬学会・第 127 年会、2007
- ・ 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」、2007

.

(B) その他の主な成果

- (1) 論文(原著論文)発表 なし
- (2) 特許出願 なし
- (3) 著書

- ・ Hiroaki Ozaki, Masayasu Kuwahara and Hiroaki Sawai、“Oligonucleotides Bearing a 5-substituted Pyrimidine Nucleoside: Their Synthesis, Properties, and Application”、(pp63–78), *Frontiers in Organic Chemistry*, 1, (1), Edited by Yoshihiro Hayakawa, Bentham Science Publishers (2005)