

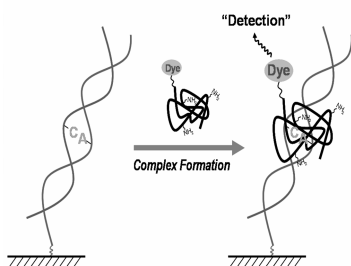
一塩基多型(SNPs)検出のための修飾DNAアプタマーの創製

●桑原 正靖

群馬大学工学部

＜研究の目的と進め方＞

ミスマッチ、バルジ、インターナルループなど二重鎖核酸中の非ワトソン・クリック塩基対部位に特異的に結合する分子は、一塩基多型(SNPs)など遺伝子型の違いを検出するのに利用できる。例えば、患者のあるmRNAのcDNAとそれに対応する健常者のDNAをハイブリダイズ(結合)させると、塩基配列中に一塩基多型部位が存在するなら、その部位でシングルミスマッチ構造が生じる。これに蛍光物質などで標識化した「非ワトソン・クリック塩基対結合分子」を加えることでSNPsの存在を知ることができる。本研究ではこのような非ワトソン・クリック塩基対に特異的に結合する分子として修飾DNAアプタマーを創製し、それが実際に二重鎖DNA中のSNPsを検出できるかどうかを明らかにする。さらに、DNAに導入した修飾基の効果を検討するために、修飾基が異なる修飾DNAアプタマーを調製し、ターゲット分子に対する結合特性を比較する。修飾DNAアプタマーは、インビトロ・セレクション法によって修飾DNAライブラリー(混合物)から、目的の活性をもつ修飾DNAアプタマーを得るというコンビナトリアル的手法を用いて創製する。



＜研究開始時の研究計画＞

DNAは遺伝情報の本体として知られてきたが、その配列によっては抗体や酵素のような活性を示すものがあるということが90年代に報告された。抗体のように特異的結合能を有するものはDNAアプタマー、酵素のように触媒として作用するものはDNAzymeと呼ばれている。このような特定の機能をもつDNAは、1012-14通りの配列の異なるDNA分子のプール(DNAライブラリー)から目的の活性をもつDNA分子をスクリーニングする方法(インビトロ・セレクション法)によって人為的に創製することが可能である。タンパク質に比べDNAは取り扱いが簡便で安価に調製できることから、抗体や酵素の代替材料として研究開発が進められている。しかしながら、抗体や酵素に比較してDNAアプタマーやDNAzymeは、機能の多様性に乏しく活性が低いという欠点がある。そこで研究を進めるにあたり、DNA分子への新たな機能付与や活性の向上を指向して、DNAライブラリーの代わりに天然のDNAにはないアミノ基やグアニジノ基、アミノアシル基などの官能基を導入した修飾DNAライブラリーの酵素的調製および修飾DNAライブラリーを用いたインビトロ・セレクション法による目的の修飾DNAアプタマー分子の創出を試みる。

(1) 種々の修飾ヌクレオシド三リン酸の合成と修飾DNA

のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)による酵素的合成

インビトロ・セレクション法は選別された分子をポリメラーゼ反応によって忠実にコピーして増やすことができるという核酸分子の固有の特性をうまく利用している。故に、DNA分子やRNA分子と同様に修飾DNA分子をインビトロ・セレクション法に適用するには、選別した活性分子がポリメラーゼ反応によって増幅されなければならない。そこで修飾基の異なる種々の2'-デオキシヌクレオシド三リン酸アナログを合成しPCRに於ける基質特性を様々な耐熱性DNAポリメラーゼを用いて検討し、ライブラリーの潜在能力の向上を図ると共に、収率よく修飾DNAを与える酵素-基質の組み合わせを探索する。

(2) 修飾DNAライブラリーを用いたインビトロ・セレクション(セレクション系の構築と最適化)

ミスマッチ構造(CA)を含む二重鎖DNAをアビジンレジンに固定化したものをポジティブセレクションに、フルマッチ構造の二重鎖DNAを固定化したものをネガティブセレクションに使用して、修飾DNAライブラリーからミスマッチ構造に特異的に結合する修飾DNAアプタマーのスクリーニングを行う。標的配列はヒトステロイド5- α レダクターゼ(SRD5A1)遺伝子の一塩基多型領域とした。インキュベーションの際に用いるバッファーの塩濃度やpH、修飾DNA分子の濃度、セレクション系の規模、さらに溶出条件(温度・変性剤・塩濃度・pH)などの最適化を行う。

(3) シングルミスマッチ部位に結合する修飾DNAアプタマーの選別と機能評価

濃縮された修飾DNAライブラリーからクローニング法によって修飾DNAアプタマーの単離を行う。次に、単離精製した修飾DNAの配列解析およびアフィニティアッセイによるターゲット分子に対する親和性および結合特異性の評価を行う。さらに、配列解析の結果から、得られた修飾DNAアプタマーとターゲット分子がワトソン・クリック塩基対を介することなく相互作用しているかどうかを検証する。さらに、活性や特異性が高かったものについて、表面プラズモン共鳴測定装置(SPR)を用いて結合解離定数を求め、DNAに導入した修飾基の効果などを検討する。

＜研究期間の成果＞

(1) 種々の修飾ヌクレオシド三リン酸の合成と修飾DNAのPCRによる酵素的合成

修飾DNAライブラリーの多様化を図るためにC5位に種々のアミノ酸を修飾したdUTPアナログを合成し、ポリメラーゼ連鎖反応に於ける基質特性を検討した1,8,13)。導入した修飾基は、タンパク質構成アミノ酸であるアルギニン、リジン、スレオニン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン、グルタミン酸など20種類である。これらの内、脂肪族アミノ酸および中性親水性アミノ酸を修飾したdUTPアナログが最もPCRの良い基質として作用し収率良く対応する修飾DNAを与えた。次いで、芳香族アミノ酸を修飾したもの、塩基性アミノ酸を修飾したものの順

に対応するPCR産物の収率は低下したが、ライブラリを調製するには十分利用可能である。一方、酸性アミノ酸を修飾したものやシステインを修飾したものは、PCRに於ける基質特性が乏しいことが分かった。しかし、反応条件を最適化したり、還元剤を添加したりすることにより収率は低いながらも対応するPCR産物が得られることが分かった。さらに、PCR産物である修飾DNAを天然型のdNTPを用いた酵素反応によりDNAに戻し配列解析を行ったところ、いずれの修飾DNAも元の配列を保持しており、ミス-インコーポレーションによる変異は認められなかった。また、その他にもフェナンスリル基やピリジル基などを導入した修飾dUTPを合成し、それらがPCRの基質となることを確認した2)。

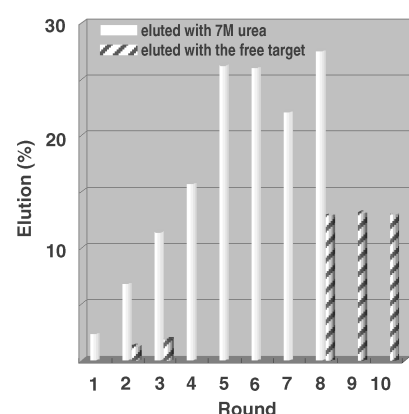
次に、修飾dUと修飾dCを含む二重修飾DNAライブラリを構築するために、まず種々のC5修飾2'-デオキシウリジン誘導体および2'-デオキシシチジン誘導体を合成し6,7)、それらのPCRに於ける基質特性を系統的に精査した。PCRアッセイには、触媒としてTaq, Tth, Vent(exo-), KOD Dash, KOD(exo-)など5種類の耐熱性DNAポリメラーゼを、鋳型としてpUC18プラスミドDNAを使用した。これらのアッセイはpUC18上の2つの異なる増幅領域でそれぞれ行った。その内のひとつは、GC含量やTあるいはCの連続配列の数から推測して、DNA鎖への修飾dCの取込みに於ける障壁が比較的高いと考えられる配列であり、もうひとつは修飾dUの取込みに於ける障壁が比較的高いと考えられる配列である。合計260アッセイ(修飾ヌクレオチド三リン酸26種類×DNAポリメラーゼ5種類×増幅領域2箇所)を行ったところ、完全長のPCR産物の生成は、概して修飾基の化学構造やDNAポリメラーゼの性質だけでなく、置換基がdU上にあるかdC上にあるかにも依存することが示唆された。また、鋳型の塩基配列はDNAポリメラーゼと修飾基質の組み合わせによってはPCR産物の生成に大きく影響を及ぼすことが分かった4,9)。次にPCR産物の収量の多寡を決定づけている要因を解き明かすために、修飾チミジンを含むプライマーあるいは鋳型を用いてプライマー伸長反応の速度論的解析をそれぞれ行った。その結果、伸長末端(反応点)に於けるプライマー鎖の化学構造が鋳型鎖の化学構造よりも遥かに大きくポリメラーゼ反応に影響していることが分かった。これら一連の結果を踏まえてポリメラーゼ反応による多重修飾DNAの調製を検討したところ、プロピニルリンカーをもつ修飾dUTPとメチルアミドリリンカーをもつ修飾dCTPを同時に用いた酵素反応系11)が最も収率よく二重修飾DNAを与えることが分かった。また、修飾DNAの酵素的合成に適したポリメラーゼの探索を行ったところ、遺伝子進化ファミリーBに属するKOD Dash DNAポリメラーゼとVent(exo-) DNAポリメラーゼが有用であることが分かった。これらの酵素-修飾基質反応系を用いたPCRにより、ヒドロキシル基やニトリル基、アミノ基、グアニジノ基などを有する二重修飾DNAを簡便に調製できる方法を確認した。さらに、アミノ基あるいはグアニジノ基を修飾したdATPアナログを合成し、これらがKOD Dash DNAポリメラーゼが触媒するPCRの良い基質となることを確認した。さらに、PCRに於いて優れた基質特性を示すアミノ基あるいはグアニジノ基を修飾したdUTPアナログおよびdCTPアナログとdATPアナログとを同時に用いたポリメラーゼ反応によって、アミノ基あるいはグアニジノ基が高密度に導入された修飾DNAライブラリを調製する方法を確認した5)。

(2) 修飾DNAライブラリを用いたインビトロ・セレクション

天然型のTTP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-5'-三リン酸を用いたポリメラーゼ反応によって、約 2×10^{13} 通りの配列を含むアミノ基修飾DNAライブラリを調製した3)。このライブラリからフルマッチ二重鎖をネガティブ・ターゲットとし、シングルミスマッチ二重鎖DNAをポジティブ・ターゲットとしたインビトロ・セレクションにより、CAミスマッチを認識するものを選別する操作を繰り返した。尚、修飾DNA分子のアフィニティレジンからの溶出には7Mウレア溶液を使用した。その結果、ターゲット分子に結合する修飾DNAの割合は、1ラウンド目では全体の2.4%に過ぎなかったが、選択操作を繰り返すことによって増加し、6-8ラウンドで飽和(約26-28%)に達した。しかしながら、ターゲット分子を担持させているレジンに結合するものの割合も増加していたことが分かった。そこで2ラウンド選択後のプールと8ラウンド選択後のプールを用いて、それぞれ選択操作を行い、最後に遊離のポジティブ・ターゲットで溶出させたところ、ポジティブ・ターゲットに結合する修飾DNAが約7倍に濃縮されていることが分かった。続いて、遊離のポジティブ・ターゲットを含む溶出液を用いて9, 10ラウンドの選択を行った。10ラウンド終了後の溶出液を用いてクローニング法による修飾DNAアプタマーの単離を行った。一方、アミノ基修飾DNAライブラリ以外のライブラリでも同様のセレクションを行った。天然型のTTPの代わりに5-(3-ヒドロキシプロピ-1-ニル)-2'-デオキシウリジン-三リン酸を、天然型dCTPの代わりに5-(2-(6-グアニジノヘキシルアミノ)-2-オキソエチル)-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸を用いたポリメラーゼ反応によって、ヒドロキシプロピニル基とグアニジノ基が導入された二重修飾DNAライブラリ12)を用いたセレクションも同様に行った。ターゲット分子を固定化したアフィニティレジンからの溶出される修飾DNAは1ラウンド目で既に9%程度あった。6ラウンドまでセレクションを進めたが、ターゲット分子に結合する修飾DNAの割合は11%程度に留まり有意な濃縮を確認できなかった。6ラウンド後のプールを用いて、ポジティブ・ターゲットを固定化したレジンおよび何も担持していないレジンに対する結合親和性を比較検討したところほぼ同等であった。これは結合親和性に於いてライブラリのポテンシャルがターゲット分子よりもレジンに対して著しく高いためであると考えられる。ネガティブ・セレクションや溶出条件の改良および使用するレジンの変更などを行う必要がある。

(3) シングルミスマッチ部位に結合する修飾DNAアプタマーの選別と機能評価

クローニングによって10ラウンド終了後の溶出液から単離したアミノ基修飾DNAについてアフィニティアッセイを行った。ポジティブ・ターゲットを担持したレジンを用いて、26種類のクローン由来の修飾DNAの親和性を



Progression of the selection for aptamers using the modified DNA library with amino groups

検討したところ、クローン#6, #7, #9, #13, #14, #16が比較的高い活性を示した。さらに、これら6つの修飾DNAについて、ポジティブ・ターゲットを担持したレジンとネガティブ・ターゲットを担持したレジンの両方を用いて結合特異性を評価した。その結果、クローン#7由来の修飾DNAが最も高い結合特異性を示し、次いでクローン#6, #13, #9, #16の順であった。クローン#14由来の修飾DNAは特異性を示さなかった。これらの内、クローン#6, #7, #9, #13の修飾DNAについて配列を解析したところ、ランダム配列(38塩基)中に修飾チミジンが、クローン#6では5塩基、クローン#7では7塩基、クローン#9と#13では8塩基含まれていることが分かった。さらに、鎖置換による相互作用の可能性を考え、これらの修飾DNAアプタマーの塩基配列中において、ポジティブ・ターゲットに対して最も相補的な配列を解析ソフトで探索したところ、クローン#6, #9, #13由来の修飾DNAでは、8塩基の連続した相補配列を含む配列が見られたのに対し、クローン#7由来の修飾DNAでは連続した相補配列はわずか4塩基であり、さらに、この配列はネガティブ・ターゲットにも存在する配列なので、クローン#7由来の修飾DNAアプタマーは、ターゲット分子に対して非ワトソン・クリック型の相互作用で結合していると考えられる¹⁰⁾。次に、クローン#7由来の修飾DNAアプタマーのターゲット分子に対する結合解離定数を求めるために表面プラズモン共鳴測定装置(SPR)により解析した。5'末端をビオチン標識化した修飾DNAアプタマーをアビジンが担持されたSPRセンサチップに固定化し、そのセンサ表面に遊離のポジティブ・ターゲットあるいはネガティブ・ターゲットを含む溶液を用いてSPRをそれぞれ測定した。その結果、ネガティブ・ターゲットを流した場合、アナライト濃度を変化させてもセンサグラムに変化は見られなかったが、ポジティブ・ターゲットを流した場合、アナライトの濃度に依存してシグナル強度の増大が確認された。結合解離定数(Kd)はおおよそ10 μ Mとなった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

PCRによって修飾DNAを高収率で与える種々の修飾ヌクレオシド三リン酸を開発した。これらを用いて様々な置換基を導入した修飾DNAライブラリを調製し、インビトロ・セレクション法によって、二重鎖DNA中のミスマッチ構造を認識する修飾DNAアプタマーの創製を試みた。海外ではWilliamsら、Famulokら、Bennerら、Perrinらのグループが、それぞれ修飾ヌクレオシド三リン酸を用いたPCRによる修飾DNAの合成およびインビトロ・セレクション法への応用に関する研究を精力的に行っているが、修飾基の導入による優位性について未だ明確な議論はほとんどなされていない。本研究に於けるこれまでの結果より、得られた修飾DNAアプタマーは非ワトソン・クリック型の結合様式で二重鎖DNAの構造を認識していると考えられる。このことは導入した修飾基が水溶液中の分子間相互作用(分子認識)に於いて重要な役割を果たしていることを示唆している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

前述したようにスクリーニング後の濃縮されたライブラリをクローニング法により単離しターゲット分子に対する親和性を検討したところ、アプタマー活性を示すものがある一方で、アプタマー活性が著しく低いもの或いは全く無いものも多く見られた。これはネガティブ・セレクションを行っているものの、ターゲット分子に対してではなく、固相のレジンに対して親和性をもつものも同

時に濃縮されたことを示唆している。故に、濃縮されたライブラリの中からさらにアプタマー活性をもつものを見出す操作に予想外の時間を要してしまった。原因としては、セレクションの初期段階で7Mウレア溶液を溶出液に使用したために、目的としない種の修飾DNAも濃縮されてしまったということが考えられる。8ラウンド以降はターゲット分子による溶出を行ったので目的の活性を示すものが得られたが、ターゲット分子が高価であるためアプタマーの開発に要するコスト高は否めない。本研究では経済的に実験を行うために、ターゲット分子の使用量を増やすのではなく、セレクション系全体のスケールの最小化に取り組んだが、有効な方法としてはターゲット分子の固定化やアフィニティレジンの溶出を必要としないキャピラリー電気泳動などが挙げられる。

〈今後の課題〉

創出した修飾DNAアプタマーによって長鎖の二重鎖DNA中のミスマッチを実際に検出できるかどうかを検討したかったが、期間内に行うことはできなかった。しかしながら、結合親和性の測定や配列解析の結果よりセレクションで得られた修飾DNAアプタマーは、非ワトソン・クリック型の結合様式によってシングルミスマッチ構造を含む二重鎖DNAとフルマッチ構造の二重鎖DNAを区別していると考えられるため大変興味深い。アプタマー活性を有する最小構造単位を特定した上で分子間の相互作用を精査することにより分子設計に関する知見を得ることが望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1. Kuwahara, M., Hanawa, K., Ohsawa, K., Kitagata, R., Ozaki, H., and Sawai, H., 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2005), in press.
2. 0509301613
Obayashi, T., Kuwahara, M., Hasegawa, M., Kasamatsu, T., Tamura, T., and Sawai H., Expansion of repertoire of modified DNAs prepared by PCR using KOD Dash DNA polymerase. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 2463-2468 (2005)
3. 0509301633
Mohammad, M.M., Kuwahara, M., Ozaki, H., and Sawai, H., Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(5), 1111-1120 (2004)
4. 0310071545
Kuwahara, M., Takahata, Y., Shoji, A., Ozaki, A., Ozaki, H., and Sawai, H., Substrate properties of C5-substituted pyrimidine 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates for thermostable DNA polymerases during PCR, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(21), 3735-3738 (2003)
- 2) 特許など
5. 0509301739
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, 特許出願, 2005年7月27日
6. 0309011347
C5位置換ピリミジン又はN6位置換プリン-2'-デオキシヌクレオチド誘導体、及びそれを用いた核酸の合成方法, 特許出願, 2003年8月18日

7. 0303312100
5位置換ピリミジンヌクレオシド誘導体、及びそれを用いた核酸の合成方法,特許出願, 2003年2月7日
- 3) その他
8. 0509301649
Kuwahara, M., Ohsawa, K., Kasamatsu, T., Shoji, A., Sawai, H., and Ozaki, H., Screening of a glutamic acid-binding aptamer from arginine-modified DNA library. *Nucleic Acids Res. Sym.Ser.*, 49, 81-82 (2005)
9. 0509301704
Kuwahara, M., Tamura, T., Kitagata, R., Sawai, H., and Ozaki, H., Comparison study on PCR amplification of modified DNA by using various kinds of polymerase and modified nucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res. Sym.Ser.*, 49, 275-276 (2005)
10. 0509301704
Kuwahara, M., Kasamatsu, T., Hasegawa, M., Shoji, A., Ozaki, H., and Sawai, H., Screening of modified DNA aptamers that recognize DNA secondary structure. *Nucleic Acids Res. Sym.Ser.* 48, 265-266 (2004)
11. 0309031534
Kuwahara, M., Hososhima, S., Takahata, Y., Kitagata, R., Shoji, A., Hanawa, K., Ozaki, A., Ozaki, H., and Sawai, H., Simultaneous incorporation of three different modified nucleotides during PCR. *Nucleic Acids Research Supplement*, 3, 37-38 (2003)
12. 0404060938
Kuwahara, M., and Sawai, H., Creation of functionally modified nucleic acid derivatives by in vitro selection method. *Expected Materials for the Future*, 3(9), 51-57 (2003).
13. 0303312146
Kuwahara, M., Ohbayashi, T., Hanawa, K., Shoji, A., Ozaki, A., Ozaki, H., and Sawai, H., Enzymatic incorporation of chemically-modified nucleosides into DNAs. *Nucleic Acids Research Supplement*, 2, 83-84 (2002).