

“細胞内遺伝子検出システム”を利用した薬剤高速スクリーニング系の構築

●山東信介

京都大学大学院工学研究科

＜研究の目的と進め方＞

高速ゲノムシーケンス技術の発展に伴い、様々な遺伝子関連情報が得られている。個人相違・疾病原因を決定する遺伝子、ゲノム多型 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) に関係する情報が急速に蓄積されるに伴い、遺伝子情報に基づいたオーダーメイド・テーラーメイド医療に幅広い期待が寄せられている。遺伝子レベルでの配列検出に基づく診断はもとより、長期的には、表現系（フェノタイプレベル）でなく遺伝子配列レベルで細胞の情報を認識し、遺伝子の転写・翻訳レベルでの活性をコントロールする薬剤を探索することも数多くある目標の1つになると考えられる。しかし、ゲノム情報に基づいて得られた標的遺伝子発現に影響を与える薬剤（ペプチドや核酸などの薬剤も含む）の設計ならびに評価は未だ容易ではない。これには薬剤候補化合物のコンビナトリアル合成の困難さ等も大きく影響していると考えられるが、小分子を含むこれらの薬剤が細胞内で及ぼす影響を定量的かつ高速に検出する手法が確立されていないことも大きな1つの障壁であると考えられる。

その解決の方法として、薬剤と遺伝子発現・抑制の関係を直接的に結びつける可能性を持つ解析手法、高速スクリーニング手法の開発に向けた基礎技術の確立を目的とした。ゲノム計画により同定された原因遺伝子の発現を抑制、あるいは誘導する活性小分子・薬剤探索系の構築を究極的な目標とした。具体的には、細胞内に導入された小分子、または発現誘導された薬剤候補ペプチド/核酸アプタマー、及び非天然含有類縁体の同定を将来的な目標と見据え、細胞間に存在する多様性の主要因である細胞膜を破壊しない遺伝子発現検出法の開発を初期目標の一つとした。つまり、従来細胞外で行ってきた遺伝子検出を細胞膜内で行う“細胞膜内遺伝子検出”技術の確立を行い、この細胞膜内遺伝子検出技術を用いて特定遺伝子の発現をコントロールする薬剤の高速スクリーニングを可能とする系の確立を目指す。細胞膜内での遺伝子検出技術が可能となれば、従来の破壊型遺伝子検出と異なり、細胞膜によって隔てられた細胞の独自性を維持したまま検出・解析、または単離できるという利点をもっており、プラスミドライブラリーを用いた場合コンビナトリアル的に発現誘導された（天然・非天然）ペプチド・核酸薬剤のin vivoセレクションへの応用も視野に入る。

上記、薬剤スクリーニング系構築という本研究課題に向けてもっとも重要な第一のポイントは、細胞膜内における遺伝子発現を感知し、解析する技術にある。我々はTASC (Totally Auto Sequence deCoding) システムの応用と改変を第一目標とした。TASCシステムは文字通り自立型の遺伝子診断プローブのことであり、等温生体条件下において自発的に遺伝子配列をdecoding（解読）することを目的とするシステムである。具体的には、細胞膜内のようなホモニアス条件化における高配列選択的遺伝子検出を目指し、特に、一塩基レベルでの遺伝子検出を目的とする。（代表例としてモレキュラービーコン

が挙げられる）

＜研究開始時の研究計画＞

本助成研究開始前に、TASC (Totally Auto Sequence deCoding) システムの第一世代として、標的核酸配列に依存する自発的核酸自己連結化学反応を利用した遺伝子診断系第一世代TASC (Target Assisted Self Conjugation) システムの構築を行い、これに成功している。本TASCプローブは、2種の核酸プローブペアーより形成される。5末端に脱離能を有する消光分子ダブルシル基と近傍に蛍光分子であるフルオレセインを持つダブルシルプローブと3末端に求核性のホスホロチオエートをもつホスホロチオエートプローブである。これらのプローブペアーは通常条件化ではほとんど反応しないが、標的核酸が存在する場合にのみ近接効果に由来する自発的な自己核酸連結反応を引き起こす。引き起こされた自己核酸連結反応に伴って消光分子が脱離し、近傍消光分子を失ったフルオレセインの蛍光が回復する仕組みである。実際、本第一世代TASCプローブの配列選択性は非常に高く、溶液系での実験においては一塩基の精度で標的核酸を見分けることが可能であった。また、自発的なTASCアプローチであるため、固相デバイス上での遺伝子検出・一塩基精度でのマルチカラー遺伝子診断も実現した。実際に、細胞内での遺伝子検出・診断実験を実施したところ、本プローブは、固定化大腸菌ではあるが、リボソームRNA上の一塩基の違いを見分け、マルチカラー検出することが可能であることが示された。（また、その後の研究により、パラホルムアルデヒド固定化されていない大腸菌とサルモネラ菌の区別などにも応用が可能であることが示されている）また、本プローブは主に核酸より形成されているため、本プローブペアーを0.05%のSDSとともにインキュベートすることによって、固定化処理なく、容易に大腸菌内に浸透させ、そのリボソームRNA配列を検出することが可能であることを示した（0.05%程度のSDS処理では大腸菌は存在できることを示すデータもあるが、純粋な“生”細胞であるかどうかの議論は難しいためここではあえて言及しない）。モレキュラービーコンをはじめとする従来のホモニアス核酸検出プローブでは一塩基の違いを見分けることに困難さを有する部分があり、その点において、本プローブは非常に有用であった。しかし、この第一世代TASCシステムではRNA・DNA 1分子から蛍光シグナル1つしか提供できないという大きな欠点があった。つまり、数の多いリボソームRNA等を標的にした場合は、上述の通り、遺伝子の検出、更には、一塩基レベルでの診断が可能であるが、数の圧倒的に少ないメッセンジャーRNAを標的とした場合にはうまく働かないのではないかという点である。

すなわち、何らかの方法で標的核酸から発生される蛍光などのレポーターシグナルを増幅させる必要があった。そこで、本申請研究において、自己核酸連結反応を利用した第一世代（プロトタイプ）TASCに続き、標的遺伝

子配列をトリガーとする自己核酸切断反応を利用した第二世代TASC (Target Assisted Self Cleavage; 別名 AutoTaqMan Probe) をデザインし、本目的のためのツールとして設計・開発することを計画した。本システムではFRETペアーを有する核酸を用いているが、標的遺伝子配列への結合により、①核酸構造の変化が起こり、②自己切断に伴う蛍光消光の解消、すなわち発光が起こる。③自己切断されたフラグメントは自発的に標的核酸から解離し、④触媒サイクルが稼動する仕組みである。理論的には、等温条件化において触媒サイクルが回り、シグナルが増幅されると考えた。また、このような蛍光シグナル増幅を可能にする例として、Catalytic Molecular Beaconが知られているが、本システムでは自己切断がCis (シス) に作用することを前提に計画している。目標である細胞膜内のようなホモニアス条件化においても有利に働き、薬剤高速スクリーニングを可能にするプローブのプロトタイプに鳴り得るのではないかと考え計画した。

＜研究期間の成果＞

1. 標的核酸存在下においてのみ自己切断反応をおこす第二世代TASCプローブコンセプト実証に向けたプロトタイプの作成を行った。まず、Sen D.らによって設計された3-way junctionを経由する核酸アロステリック型 Trans-acting DNAzyme構造を利用した。合成手法における様々なtry and errorを繰り返した後、実際に、幾つかの核酸(人工DNAレベル)を標的にしたTASCプローブを作成し、その標的核酸存在下(kon) 及び非存在下(koff)における自己切断反応を測定し、評価した。また、そのkon/koffが最適化されるように自己3-way junctionやヘアピン部の配列を変化させたプローブを合成し、配列設計に必要なパラメータの取得を順次実施した。その過程において、遺伝子配列と同様の配列を持つ人工核酸配列を標的にした第二世代TASCシステムの設計・合成を行った。実際に、蛍光分子であるフルオレセインと消光分子であるダブルシル基を切断リボヌクレオチドサイト両側に存在するチミンに接合させたFRET-プローブを作成したところ、標的遺伝子配列と同様の配列を持つ人工核酸配列が存在する場合においてのみ、蛍光強度の上昇が確認された。また、その効率はまだまだ改善の余地が多く残されているものの、触媒的な自己切断も示唆されており、コンセプトレベルでの実証には成功した。
2. また、標的核酸非存在下における自己切断反応 (ノイズ) が問題となってきたが、配列設計における一般性を保ちながらこのノイズを効率よく減少させるための配列最適化に向けたアプローチにも着手した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

本助成研究事業では薬剤高速スクリーニングを目標に設定した。本研究達成のためには、細胞膜内で遺伝子の検出を行おうとする非破壊型の“細胞膜内遺伝子検出技術”の開発が新しいポイントになっている。TASC (Totally Auto Sequence deCoding) システムは、細胞内で発現する特定の遺伝子を同定することを目指している。後述の通り、プローブの性能と設計には、未だ改善すべき点は多々ある。実際、モレキュラービーコンだけでなく、海外のその他のグループから提案されている触媒的シグナル増幅しゅほうプローブでは、非常に高いシ

グナル増幅能を示すものも報告されている。非破壊的な細胞膜内遺伝子検出技術の構築が成功すれば、本助成で標的とする薬剤スクリーニング系の構築にとどまらず、様々な分野で有用な手法と成り得ると期待している。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

細胞内遺伝子診断の感度の改善を目指し、第二世代自己切断型プローブを設計し、ある程度の結果が得られたが、本プロトタイプ第二世代TASCプローブにおいては幾つかの問題があった。特に“自己切断速度の低下”という大きな問題が残った。現実的には非修飾型のDNAzymeに比べて103 (min⁻¹) 程度の自己切断速度の低下が確認されている。逆に考えれば、配列をうまく選択すれば、現状より1,000倍優れた速度を有するプローブを設計できるという可能性を有しているともいえる。

また、触媒的シグナル増幅能という点から考えると、現時点での性能は満足できるものではない。ハイブリダイズ領域の最適化等、今後に残された大きな課題である。さらに、FRETペアーを取り付けたときにおこる消光効率の悪さ (数倍) も大きな問題である。応用に向けて、さらなる配列の最適化が必要であると考えられる。

＜今後の課題＞

上記にも述べたが、長期目標の実現に向け、その基本となる細胞膜内における遺伝子検出を可能にするプローブの設計、最適化に全力を注ぐ必要があると考えられる。目標であるごく微量のmRNAを標的にした場合には、シグナル増幅もしくは検出感度の大幅な上昇が必須であり、触媒活性の向上に向け、第3世代をはじめ、プローブ設計の大幅な改善も考慮に入れる必要があると考えられる。また、一方では触媒能にこだわらず、計測機器の感度、もしくは、蛍光・発光などシグナル強度及びS/N比を改善させることも考慮する必要があると考えられる。いずれにせよ、本助成研究においてコンセプトの実現とともに、改善すべき多くの点が明らかになっており、最終的な目標に向けた大きなステップになったと考えられる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1. 0312192143

Sando, S., Sasaki, T., Kanatani, K., and Aoyama, Y.

Amplified Nucleic Acid Sensing Using Programmed Self-Cleaving DNAzyme,

J. Am. Chem. Soc., 125(51), 15720-15721 (2003).