

令和元年6月4日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01910

研究課題名(和文) DNAグアニン四重鎖構造体を分子認識素子として利用したプロテインチップの創製研究

研究課題名(英文) Development of a practical protein-chip using designed DNA-arrays

研究代表者

萩原 正規 (Hagihara, Masaki)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：40403000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究提案は、臨床現場で使用できるレベルの簡便性、迅速性、高い検査精度、再現性、低コスト化等を視野にいれた、優れたタンパク質発現解析ツール(タンパク質検出デバイス)の創製を目標とする。今回、既存のプロテインチップ創製法とは全く異なるグアニン塩基に富む「核酸構造体ライブラリー」をタンパク質認識素子として利用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、有機合成化学的手法と、遺伝子工学手法を融合することにより、核酸の安定な高次構造として知られるグアニン四重鎖構造を指向した多様なDNA型素子ライブラリーを構造や配列による偏りを極力排除した形で作製することに成功した。四重鎖構造体をライブラリー化する今回の研究成果は技術的新規性、優位性が保証されたと考えている。

研究成果の概要(英文)：This research proposal aims to create a superior protein analysis tool (protein detection device) with a viewpoint of convenience, quickness, high inspection accuracy, reproducibility, low cost etc. at a level that can be used in a clinical purpose. Here, we showed that "nucleic acid structure library", that is rich in guanine bases, can serve as a new class of protein recognition elements.

研究分野：生物有機化学

キーワード：グアニン四重鎖 分子センサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床現場で使用できるレベルの簡便性、迅速性、高い検査精度、再現性、低コスト化等を視野にいれた、優れたタンパク質発現解析ツール(タンパク質検出デバイス)は、疾患マーカーの検出によるガンをはじめとする疾病の診断、あるいは個人の薬剤の応答性の判定に利用できる。優れたタンパク質計測技術が開発できれば、遺伝子検査の普及に貢献し、さらに個別化医療の実現に寄与するとともに、早期診断、早期治療、最適な治療法の選択に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに開発されたタンパク質検出デバイスは、生体内でのタンパク質認識機構を模倣した二次構造形成ペプチドなど、人工ペプチドを分子認識素子として利用するものが一般的であった。しかしながら、合成ペプチドは配列により化学的特性が大きく異なるため、多種類の機能性ペプチドの合成、精製は潜在的な困難を伴う。本申請では、既存のプロテインチップ創製法とは全く異なる「核酸構造体ライブラリー」をタンパク質認識素子として利用した、タンパク質検出デバイス創製を目標とする。核酸ライブラリーをタンパク質認識素子として利用する本手法は学術的な先進性のみならず、高感度かつ安価なタンパク質検出チップ創製に繋がるものと期待できる。

3. 研究の方法

これまで、核酸配列の多様性を利用して多様な構造体ライブラリーを作製し、その中から目的の機能(標的分子に対する結合親和能、物質変換能)を有する核酸分子を探索する invitro セレクション法が報告されている。多くのタンパク質に対し選択的に結合する核酸分子が単離されており、核酸分子は、タンパク質と相互作用する有用な分子素子であると考えられる。そこで本研究では、核酸の安定構造体の中でグアニン四重鎖構造に注目し、「グアニン四重鎖構造ライブラリー」を作製し、その構造的特性を利用してタンパク質捕捉領域として利用することにした。グアニン四重鎖構造は、血液凝固因子のトロンピン、ヒト免疫不全ウイルスの逆転写酵素、など生物学的に重要なタンパク質に選択的に結合し、その機能を制御する機能性核酸分子(アプタマー)に多く認められる核酸の安定な三次構造モチーフである。核酸-タンパク質間相互作用を利用してタンパク質を認識することが可能な分子認識素子として、グアニン四重鎖構造体は有力な構造体であると考えた。

4. 研究成果

(1) グアニン塩基の比率を高めた核酸配列ライブラリー創製法の検討

DNA 化学合成時にアデニン、シトシン、チミン、グアニン塩基混合比率を変化させることにより、塩基混合比を自在に変化させた DNA 配列ライブラリーを合成することが出来る。今回グアニン塩基に富む領域をタンパク質捕捉領域として設計した核酸ライブラリーを作製した。

グアニン塩基の組成比を高めた二重鎖 DNA 核酸ライブラリーを作製するためには、化学合成した一本鎖 DNA を二重鎖 DNA ライブラリーへと変換する過程が必要となる。安定な高次構造を形成する領域では、相補鎖形成において DNA ポリメラーゼ反応は強く阻害されることから、グアニン塩基に富む配列を鋳型とした二重鎖 DNA 作製法では、タンパク質捕捉素子として設計した安定なグアニン四重鎖構造を形成する配列が排除されてしまう可能性が考えられる。一方、シトシン塩基に富む配列は、常温かつ DNA ポリメラーゼの反応条件下では DNA ポリメラーゼを阻害する安定な二次構造を形成しないことから、グアニン塩基の相補鎖となるシトシン塩基に富む塩基配列を鋳型とする作製法を採用した。

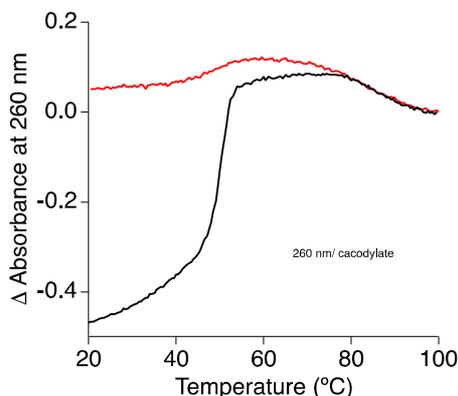
DNA の化学合成段階で、塩基(グアニン、シトシン、チミン、アデニン)ごとにカップリング効率に若干差が存在することが報告されているが、全ての塩基が同程度のカップリング効率で合成が進行するという仮定のもと、シトシン塩基混合比率が全体配列の 2/3、及び、他の 3 種類の塩基の比率はそれぞれ 1/9 となるように各塩基を混合して核酸の化学合成を行った(シトシン: アデニン: チミン: グアニン=6:1:1:1)。

合成したシトシン塩基に富む核酸ライブラリーを鋳型として用い、DNA ポリメラーゼを利用して二重鎖 DNA へと変換した後、クローニングを行った。得られた大量のコロニーの中から選択した 32 種類のクローンの塩基配列を決定したところ、グアニン塩基の存在比は 66.8% であり、DNA 化学合成時の相補配列中のシトシン塩基 66.7% の混合比をよく反映していた。すなわち、DNA ポリメラーゼ反応中にグアニン塩基に富む配列が排除されることはなかった。

(2) グアニン塩基に富むタンパク質補足領域のグアニン四重鎖構造安定性評価

(1)の配列解析により得られたグアニン塩基に富む領域を DNA 化学合成により作製し、その高次構造形成を UV 融解曲線解析により検討した。UV 融解曲線解析においては、核酸の UV スペクトル変化(295 nm の UV 吸収変化)を追跡することにより、グアニン四重鎖構造形成、及び、そのグアニン四重鎖構造の安定性を評価することが出来る。配列解析により同定した 32 種類のグアニン塩基に富む DNA について、グアニン四重鎖構造を安定化させるナトリウム、カリウム塩存在条件、及び、グアニン四重鎖構造を不安定化させるリチウム塩存在条件下で UV 融解曲線測定を行った。特に、ナトリウム、リチウム塩に比べて、グアニン四重鎖構造を特異的に

安定化することが知られるカリウム塩存在条件の方がシグモイド曲線の変極点が高温側にシフトしていることから、今回合成した大部分の DNA はグアニン四重鎖構造を形成することが明らかになった。すなわち、本手法で作製したグアニン塩基に富むライブラリーはグアニン四重鎖構造形成能を有することが明らかになった。



(図) グアニン塩基に富む配列を有する二重鎖 DNA の UV 融解曲線、黒は加熱過程の UV 吸収変化を、赤は冷却過程での UV 吸収変化を示す。

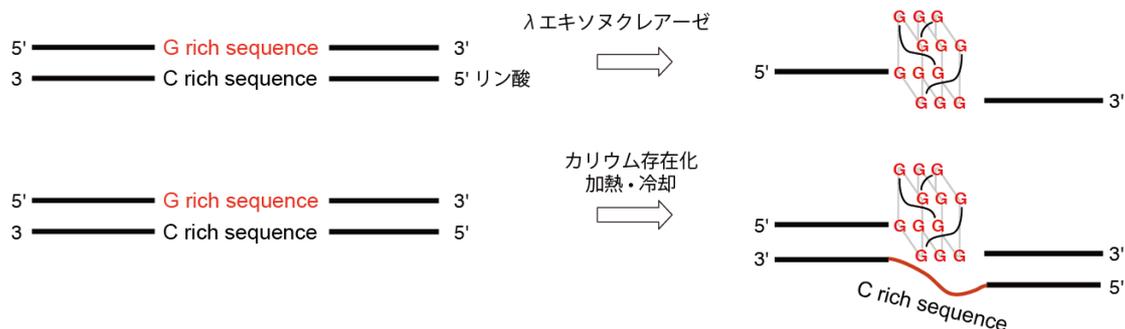
(3) グアニン四重鎖型一本鎖 DNA 素子への変換手法の検討

本項目では、大腸菌クローンライブラリーから、二本鎖 DNA ライブラリーの作製方法、チップ上に高密度で集積を行うための、一本鎖グアニン四重鎖構造体への効率のよい変換手法の確立を目指した。グアニン塩基に富む DNA ライブラリーのクローニングで作製した大腸菌コロニーライブラリーから、コロニーダイレクト PCR 法により、大腸菌から直接 PCR により DNA を増幅して二重鎖 DNA を調整した。本手法は、96 ウェルフォーマットの PCR プレート、市販の核酸精製キット、及び分注機械を利用することでハイスループット化にも対応できる。

コロニーダイレクト PCR において、一方のプライマーをリン酸化することにより、一方の鎖の 5' がリン酸化された二重鎖 DNA が調製できる。一方の鎖がリン酸化された二重鎖 DNA は エキソヌクレアーゼの優れた基質となることから、コロニーダイレクト PCR により調製した二本鎖 DNA のシトシン塩基に富む鎖から エキソヌクレアーゼを利用し、グアニン塩基に富む一本鎖 DNA へと分解できた。

さらに簡便で再現性の高い、酵素を用いない一本鎖 DNA 調整方法についても検討した。高いカリウム塩が存在するときに四重鎖形成領域の融解温度は、対応する二重鎖形成時の融解温度よりもかなり高温側に移動することを見いだした。そこでコロニーダイレクト PCR により調製した二重鎖 DNA を高いカリウム塩存在条件下で、加熱・冷却することにより優先的に四重鎖構造が形成されるのではないかと仮説のもと検討を行った。

UV 融解曲線解析により、シトシン塩基に富む相補鎖が存在しても、グアニン塩基に富む鎖は安定なグアニン四重鎖構造形成が優先的に進行し、可逆的に二重鎖構造を形成しないことが分かった。本件等により、大腸菌コロニーから PCR により増幅した DNA 二重鎖素子ライブラリーを、カリウム塩存在条件下で加熱・冷却すると言った単純な操作により四重鎖構造が作製できることが示唆された。



(図) グアニン塩基に富む配列を含む二重鎖 DNA から、グアニン四重鎖構造を生成させる手法

(4) グアニン四重鎖構造によるタンパク質認識能の評価

続いて、本条件で作成した四重鎖構造を指向した RNA ライブラリーを用いて、血液凝固因子

のトロンピンタンパク質に対して、結合活性評価を行った。グアニン塩基に富む RNA ライブラリーでは、それ自身でトロンピンに対して若干の結合能を示した。また、その RNA ライブラリーを用いて、in vitro セレクションを行ったところ、in vitro セレクションサイクルの増加に伴いタンパク質結合能が上昇したことから、グアニン四重鎖構造体をタンパク質認識素子として利用する本研究の有用性が実証された。

今回開発した手法は、膨大な配列多様性、構造的多様性を有する素子の調製も容易に拡張できると考えられ、チップ上への素子の高密度集積化も本手法で対応できる。今回、有機合成化学的手法と、遺伝子工学手法を融合することにより、グアニン四重鎖構造を指向した多様な DNA 型素子ライブラリーを構造・配列による偏りを極力排除した形で作製することに成功した。四重鎖構造体をライブラリー化する今回の研究成果は技術的新規性、優位性が保証され则认为ている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Yasuhiko Yamamoto, Haruka Araki, Ryosuke Shinomiya, Kosuke Hayasaka, Yusaku Nakayama, Kentaro Ochi, Tomokazu Shibata, Atsuya Momotake, Takako Ohyama, Masaki Hagihara, and Hikaru Hemmi

Structures and Catalytic Activities of Complexes between Heme and All Parallel-Stranded Monomeric G Quadruplex DNAs

Biochemistry 57, 5938-5948(2018)

DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00792 (査読あり)

(2) Yousuke Katsuda, Shin-ichi Sato*, Lisa Asano, Yoshitaka Morimura, Tomoyuki Furuta, Hiroshi Sugiyama, Masaki Hagihara* and Motonari Uesugi*

A Small Molecule That Represses Translation of G Quadruplex-Containing mRNA

J. Am. Chem. Soc., 138, 9037-9040 (2016)

DOI: 10.1021/jacs.6b04506 (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 齋藤薫・堂野主税・中谷和彦・萩原正規

有機小分子による DNA 繰り返し配列短縮効果

第 12 回バイオ関連化学シンポジウム 2018、大阪大学、2018 年 9 月 9 日～11 日

(2) 萩原正規

人工分子による核酸構造の制御 - キャピラリー電気泳動法を利用した核酸構造のマッピング

第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム(弘前) 2018 年 6 月 13 日～15 日 弘前大学 依頼講演

(3) 萩原正規

第 7 回エネルギー理工学研究所国際シンポジウム ゼロエミッションエネルギー研究拠点

国際シンポジウム The 7th International Symposium of Advanced Energy Science - Frontiers of

Zero Emission Energy - 2016 年 9 月 5 日-9 月 7 日、京都大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。