

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12903

研究課題名(和文) シンプル且つ高機能なDNA/RNAキメラ型核酸アプタマーの技術基盤の構築

研究課題名(英文) Development of simple and high-performance DNA/RNA chimeric nucleic acid aptamer

研究代表者

宮岸 真 (MIYAGISHI, Makoto)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：30323538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では、この手法を用いた DNA/RNAキメラ型核酸アプタマーの基盤技術の開発研究を提案した。核酸ライブラリーとして、6種類の17塩基の領域をDNA/RNAキメラ配列を持つランダム化ライブラリーを構築した。ストレプトアビジンに対して、One Step Selection法によりセレクションを行い濃縮した配列を調べた。複数の濃縮していると考えられた配列を化学合成し、そのストレプトアビジンに対する結合能を調べたが、DNAアプタマーに比べて、親和性は高くなく、DNA/RNAキメラ型核酸アプタマーのコンセプトを証明するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed to establish fundamental technologies of DNA/RNA chimera-type nucleic acid aptamer using the One Step Selection method. As nucleic acid libraries, we synthesized six randomized library having DNA/RNA chimeric sequences in 17-bases region. Selection was performed on streptavidin by One Step Selection method and enriched sequences were examined. Aptamer sequences thought to be enriched were chemically synthesized and their binding abilities to streptavidin were examined. As a result, although we could obtain clearly enriched sequences, their affinities to streptavidine were not so high compared to streptavidine DNA aptamer. In conclusion, we could not prove the concept of DNA/RNA chimeric nucleic acid aptamer.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：核酸アプタマー

### 1. 研究開始当初の背景

核酸アプタマーは抗体のようにターゲット分子を認識する核酸であり、抗体を作成することが難しい化合物、毒物、糖に対しても分子進化法によって取得が可能であることから、様々なアプリケーションが期待されている。一方で、核酸アプタマーの取得法や高機能化については、技術的な開発の余地があると考えられている。

### 2. 研究の目的

申請者は、核酸アプタマーの新規取得法として、次世代シーケンサーを用いた One Step Selection 法の開発を行っている。本申請では、この手法を用いた DNA/RNA キメラ型核酸アプタマーの基盤技術の開発研究を提案する。核酸アプタマーは大別して DNA アプタマーと RNA アプタマーがあるが、DNA アプタマーは安定であるが、認識能が乏しいこと、RNA アプタマーは認識能が高いが、ヌクレアーゼ等により壊れやすいことが大きな課題となっている。この問題を解決するために、本研究課題では、両者の長所を併せ持つ、認識能が高く生体内で安定な DNA/RNA キメラ型核酸アプタマーの技術基盤開発を行う。さらにこの技術による、検出分野および、核酸医薬分野への応用の道筋を明確にする。

### 3. 研究の方法

#### RNA/DNA キメラ核酸ライブラリーのデザインと合成

以下の DNA ライブラリーを北海道システムサイエンス社に合成依頼した。(ランダム化領域のみを記載、5', 3'側にプライマー領域)

N17-D:NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
N17-D/R3-1: nNNNnNNNnNNNnNNNn  
N17-D/R2-1: nNNnNNnNNnNNnNNnN  
N17-D/R1-1: nNnNnNnNnNnNnNnNn  
[N=G,A,T,C (DNA mix), n=g,a,t,c (RNA mix)]  
N17-r(GA)d(CT):XXXXXXXXXXXXXXXXXX  
N17-rG: YYYYYYYYYYYYYYYYYY  
N17-rA: ZZZZZZZZZZZZZZZZZZZ  
[X= g,a:RNA, C, T:DNA, Y= g:RNA, A,C,T:DNA, Z= a: RNA, G,C,T: DNA]  
SA-st20-1D:nNnNnGTGTnNnNnNnACAC  
SA-st20-2r: nnnnnGCGTnnnnnnnACGC  
[N=G,A,T,C (DNA mix), n=g,a,t,c (RNA mix)]

#### SELEX 法によるアプタマーの単離

ターゲットタンパク質を結合した磁気ビーズと、DNA/RNA キメラライブラリーを結合させ、1時間静置後、バッファで3回洗浄し、結合する核酸 RNA のセレクションを行った。結合した DNA/RNA を回収液で加熱することにより溶出し、フェノールクロロホルム抽出および、エタノール沈殿により精製を行った。

その後、逆転写酵素により、DNA/RNA 可変領域を DNA に変換し、さらに、プライマー領域に対するプライマーセットで PCR 反応を行った。増幅した配列をさらにバーコード配列を含むプライマーセットにより、再増幅し、次世代シーケンサーにより、大規模配列解析を行った。

#### Binding アッセイ

セレクションで得られた候補アプタマーのターゲットに対する親和性を確認は、当初は以下の磁気ビーズを用いた結合アッセイにより行った。ターゲットタンパク質を結合した磁気ビーズと核酸アプタマーを溶液中で1時間インキュベーションした後、3回洗浄し、加熱により回収し、OliGreen により蛍光染色し、蛍光を測定することにより結合量を定量した。

#### FACS による候補アプタマーの結合解析

DNA/RNA キメラアプタマー候補の Binding アッセイを行ったが、結果が不安定であったため、FACS を用いた結合解析法を行うこととした。

候補アプタマーを FITC でラベルし、アニール後、ターゲットタンパク質を有する磁気ビーズと1時間静置、3回洗浄し、結合をフローサイトメーター (BD Accuri) で解析した。

### 4. 研究成果

DNA/RNA キメラ型アプタマーのコンセプトを示すために、これまで DNA アプタマーの網羅的な取得法として開発を行ってきた One Step selection 法を用いた。この方法では、1ラウンドのみでのセレクション、及び PCR 増幅を行い、通常のセレクトス法のように何度もセレクション、PCR 増幅を行わないため、DNA/RNA キメラ型ライブラリーでも適用が可能となる。

最初のモデル系でのターゲット分子としては、ストレプトアビジンタンパク質を用いることとした。我々の開発した One Step selection 法では、N17 の DNA ライブラリーでの SELEX により、常に安定して、ストレプトアビジンに対する DNA アプタマーの取得ができていた。また、ストレプトアビジンに対しては、DNA アプタマーだけでなく、RNA アプタマー取得の報告があり、薬物でのドラッグアビリティのように、アプタマーを取得できる性質があると考えられる。

最初に用いた DNA/RNA キメラ型ライブラリーは、N17-D/R1-1, N17-D/R2-1, N17-D/R3-1 である。それぞれ、17塩基のランダム化領域を持ち、1塩基、2塩基、3塩基ごとに RNA のミクスチャーが挿入してある。N17-D の DNA ライブラリーをポジティブコントロールとして、N17-D/R1-1, N17-D/R2-1, N17-D/R3-1 をそれぞれ、ストレプトアビジンと結合させ、洗浄後、逆転写を行い、DNA を回収した後、バーコード配



トレプトアビジンに対する DNA アプタマーはピークが右にシフトし、結合が観察されたが、候補アプタマーはネガティブコントロールのアプタマーと同様のシフトしか、見られず、有意な結合能がないことがわかった。(図 2)

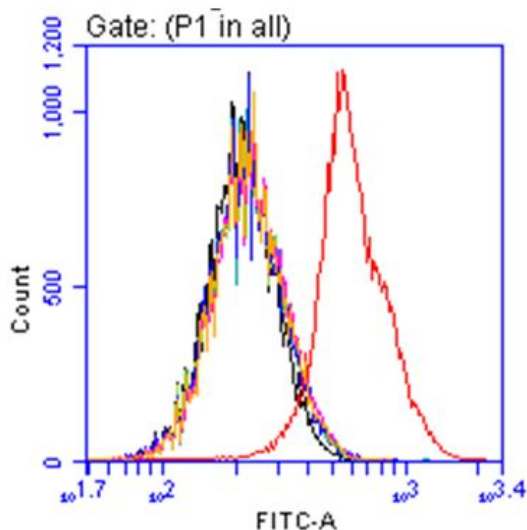


図 2 FACS によるアプタマーの結合解析  
 ポジティブコントロールであるストレプトアビジン DNA アプタマー (赤) の結合は観測されたが、候補 DNA/RNA アプタマーはどれも結合が見られなかった。(緑、黄、ピンク)

本研究課題では、DNA/RNA キメラ型アプタマーのコンセプトを証明するために、いくつかのライブラリーを設計し、複数のターゲットに対し、セレクションを行い、DNA/RNA キメラ型アプタマーの取得を試みた。しかし、結合能を有するアプタマーの取得ができず、コンセプトを証明するには至らなかった。我々の SELEX 法では、セレクションを 1 ステップで行い、大量に配列を解析し、濃縮配列をインフォマティクスを用いて解析するため、ほぼ網羅的に濃縮されるアプタマーを取得することができる。今回、この方法で DNA/RNA キメラ型アプタマーが取得できなかったということは、DNA と RNA が混合するような核酸は、アプタマーとして構造的に不利に働いてしまったのではないかとこの可能性が考えられる。

今後は、適用可能な DNA の修飾核酸を用いたアプタマー取得の方法の開発を行っていききたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮岸 真 (MIYAGISHI, Makoto)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・分子複合医薬研究グループ・研究グループ長

研究者番号：30323538

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )