

令和 3 年 4 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19196

研究課題名(和文) ウイロイド - 病原性環状1本鎖RNA - の天然高次構造を認識する核酸アプタマーの開発

研究課題名(英文) Development of aptamer recognizing native higher molecular structures of viroid &#8211; circular single-stranded RNA pathogen

研究代表者

佐野 輝男 (Sano, Teruo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30142699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイロイドは約250～430ヌクレオチドの環状1本鎖RNA病原体である。試験管内核酸選抜法であるSELEX法により、ウイロイドと結合するアプタマー候補配列を選抜した。30塩基のランダムな一本鎖DNA集団から、15ラウンドのSELEXで、ジャガイモやせいもウイロイド(PSTVd)と結合する核酸アプタマーを濃縮し、5ラウンド毎のアンプリコン解析結果に基づき、PSTVdと結合する可能性のある18種類のアプタマー候補配列を選抜した。PSTVd環状分子との結合性をアフィニティカラム吸着法で分析した結果、1種類が強く、5種類が弱く結合し、PSTVd環状分子と特異的に結合するアプタマーの選抜に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイロイドは約250～430ヌクレオチドの環状1本鎖RNA病原体で、作物の矮化、葉巻、果実障害などの原因になる。近年、野菜・花卉類を中心に、特定重要病害指定のポスピウロイドが世界中に流行し、国際植物検疫上の重大な懸念材料となっている。国内外の育苗・採種現場ではPCR法などの高感度遺伝子検出法が診断に利用されるが、簡便により効率よく検出する新技術の開発が求められている。本研究で開発したアプタマーはウイロイドの診断・防除薬に利用できるだけでなく、その検出・診断技術を一般化して体系化して公表することは、現在世界中の採種・育苗現場及び植物検疫の最前線で課題となっている問題の解決に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Viroids are circular single-strand RNA pathogens of about 250-430 nucleotides. SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment, was carried out with the aim of selecting aptamers that can specifically bind to viroids. A variety of DNA sequences that bound to full-length potato spindle tuber viroid (PSTVd) RNA were enriched by 15 rounds of SELEX from a random pool of single-stranded 30-nucleotide DNAs. Then based on amplicon analysis of every 5 rounds, 18 species of aptamer candidate sequences that have a potential to bind PSTVd were selected. One of them strongly bound and five weakly bound to the circular form of PSTVd RNA in the binding assay, indicated that DNA aptamers specifically bind to PSTVd were successfully selected.

研究分野：植物保護科学関連

キーワード：アプタマー ウイロイド 診断薬 防除薬 SELEX アンプリコン解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸アプタマーとは、標的となる生体分子の立体構造を特異的に認識して結合する核酸(DNAあるいはRNA)オリゴマーで、ちょうど抗体が抗原のエピトープを認識して結合するように、核酸オリゴマーが配列依存的に折りたたまれ特異な立体構造を形成することで標的分子と結合する(Ellington & Szostak, 1990, 1992)。すなわち核酸アプタマーは、抗原-抗体複合体の親和性を決定するのと同じタイプの結合力である水素結合、疎水性作用、立体構造妨害(障害)、静電的相補性などの分子間相互作用で標的生体分子と結合する(Stoltenburg et al, 2007)。今まで報告されている核酸アプタマーは15~45ヌクレオチドの長さで、ナノモル~ピコモル程度の低濃度で標的生体分子を特異的に認識して結合することができる。核酸アプタマーは、試験管内選択法(SELEX法: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)と呼ばれる方法で、ランダムで多様な配列を有するオリゴヌクレオチド集団の中から、標的生体物質との「混合-結合-洗浄-PCR増幅(あるいはRT-PCR)」を10~20回繰り返すことで、標的生体物質と特異的に結合する至適結合配列(立体構造)を有するオリゴヌクレオチドとして濃縮・選抜される。

ウイルスは、約250~400ヌクレオチドの高い分子内相補性を示す環状1本鎖RNAからなる植物の伝染性の病原体で、感受性の野菜・果樹・花卉類に矮化・葉巻・果実や花・塊茎の着色・肥大障害など深刻な被害をもたらす。現在まで暫定種を含め約40種類が知られ、特にナス科の野菜・花卉類を中心に特定重要病害指定のジャガイモやせいもウイルス(PSTVd)をはじめとするポスピウイルス(トマト退縮萎縮ウイルス、トマトapical stuntウイルス、ペッパーchat fruitウイルス、トマトplanta machoウイルス、キク矮化ウイルス、ホップ矮化ウイルス(HSVd)など)が世界的に流行し、国際植物検疫上の重大な懸案事項となっている。これらウイルス病の問題点は、特定の感受性宿主作物には重大な被害を与えるにもかかわらず、それ以外の作物、例えばPSTVdはダリアやナス科観葉植物、HSVdはブドウやカンキツ類に不顕性(無病徴)感染することである。病原体の侵入・拡大を阻止する上で障害となるのはこのような不顕性の感染宿主植物(キャリアー)の流通であり、育苗・採種等の種苗産業や植物検疫の最前線ではこれらの不顕性感染個体を簡便に効率よく検出する技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

従来、ウイルス病の診断には、PCR法に代表される病原体のゲノム一次配列の相補性に基づく高感度遺伝子診断法が用いられ、様々の優れた手法が開発・応用されてきた(Owens et al, 2012)。しかし、一方で、ウイルスはRNAのみから構成される病原体で、ウイルスのような外被タンパク質を持たないばかりでなく独自のタンパク質情報もコードしないことから、血清(免疫学的診断法が適用できず、診断方法の多様化・簡便化という観点から大きな障害があり、抗体に代わる新しい素材(試薬)の開発が求められていた。また、PCR法は高感度な反面、病原体遺伝子の一次配列のみを標的とするため、検体に付着した分解され感染力のない微量の遺伝子断片さえ陽性と誤判定してしまう可能性があり、リスクを過大評価する難点が種苗検査や植物検疫の現場で問題となっていた。

高次の分子構造を有し自己複製する環状1本鎖RNAという興味深いウイルス分子の生体機能を解明するうえでも、その特異な立体構造を認識し結合できる核酸アプタマー開発技術の確立は極めて高い意義を有するものであるが、今まで世界中で誰も成功してこなかった技術である。RNAはタンパク質と異なり生体内での形態に多様性があり、条件によりさまざまに形を変えて機能を発揮すると考えられている。ウイルスと特異的に結合する核酸アプタマーを選抜・作出し、それがウイルスの生物学的活性にどのような影響を及ぼすかを分析できるようになれば、ウイルスの自己複製能と病原性を制御する立体構造や宿主転写因子と相互作用する

ための分子構造を解析することが可能になる。近年ヒトやマウスの脳内からウイルスと類似の分子構造を有する小環状 1 本鎖 RNA が多数検出され、特定の疾患との関連性に興味もたれている。本研究で開発する技術は、ウイルスにとどまらず、様々な RNA の機能性研究を大きく変革する可能性を秘めている。さらに、天然のウイルス分子にのみ特異的に結合する核酸アプタマーを選抜できれば、感染性を有している完全分子のみを特異的に検出することが可能になり、より実用的なウイルス診断技術を開発することが可能になる。また、ウイルスの複製増殖を特異的に阻害する機能を有する核酸アプタマーを選抜できれば、今までは困難と考えられてきた核酸治療薬を開発することが可能になる。以上、核酸アプタマーの開発により、現状の技術だけでは解決できない様々な革新的な新技術の開発が可能になる。

3. 研究の方法

人工合成ランダムライブラリーの作成：20、30、40 ヌクレオチドのランダム ssDNA 配列の両側に PCR 増幅用プライマー配列を付加した人工合成ランダムライブラリーを作成する。

標的ウイルス配列の人工合成：PSTVd の全長 359 ヌクレオチドの配列を人工合成し、T7 プロモータの下流に連結し、試験管内転写でピオチン化 PSTVd RNA を調製する。

SELEX：

- i) ピオチン化 PSTVd RNA をストレプトアビジン磁気ビーズに吸着させる。
- ii) ランダム ssDNA を加え、室温でインキュベートして結合させ、洗浄後、標的 PSTVd 分子に結合した ssDNA を回収する。
- iii) PCR で増幅後、加熱変性し、アプタマー鎖をゲル電気泳動で分離・回収する。
- iv) 以上の操作を繰返し(10~15 ラウンド)、PSTVd RNA に結合する ssDNA を濃縮する。PCR、電気泳動、ライゲーション、クローニング、塩基配列決定：最終ラウンドで標的 PSTVd 分子に結合した ssDNA 分子を PCR で増幅し、ゲル電気泳動で精製後、プラスミド DNA ベクターにクローニングし、塩基配列を分析する。また、次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を行う。

4. 研究成果

研究の初年度は、これまで諸条件の最適化を行ってきたウイルスを標的とする核酸アプタマーの選抜方法、すなわち、SELEX 法の基本的プロトコールにより、人工合成したランダムな 20 塩基、30 塩基、及び 40 塩基の ssDNA ライブラリーから、ジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) を標的とする核酸アプタマー候補 ssDNA 集団を選抜・濃縮し、次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を実施した。その結果、まず、ランダムな 20 塩基の ssDNA ライブラリーからは特定の配列が濃縮されなかったが、ランダムな 30 塩基及び 40 塩基の ssDNA ライブラリーからはそれぞれ 3 種類と 1 種類の特定の配列が濃縮されたことが明らかになった。最も高頻度に検出された配列はランダムな 30 塩基の ssDNA ライブラリーから選抜・濃縮されたもので、次世代シーケンス解析で得られた全リード数(約 1000 万リード)の約 0.33%を占めていた。同様に、30 塩基の ssDNA ライブラリーから選抜・濃縮された 2 番目に多い配列は約 0.28%、3 番目は約 0.04%、40 塩基の ssDNA ライブラリーから選抜・濃縮されたものは約 0.03%であった。4 種類いずれの配列も標的とした PSTVd と塩基配列の高い相同性は見られなかった。以上の結果から、報告者らが諸条件の最適化を検討してきたウイルスを標的とする核酸アプタマー選抜方法で、ランダムな 30 ~ 40 塩基の ssDNA ライブラリーから特定の配列の選抜・濃縮が可能で、また、SELEX 法で選抜した ssDNA 集団の次世代シーケンサーによるアンプリコン解析により、選抜・濃縮された特定の配列を効率的に判定できることが明らかになった。

2 年目は、初年度に選抜・濃縮されてきたアプタマー候補配列を人工合成し、純化精製した PSTVd 環状分子との結合性の有無及び強度を、RNA ゲルシフトアッセイ、ELONA 法、アフィ

ニティカラム吸着法など、複数の方法で分析した。その結果、アプタマーの選抜時に用いた条件に最も近いストレプトアビジン磁気ビーズを用いる吸着法を利用することにより、純化した PSTVd 環状分子をトラップするのが妥当と判断された。

最終年度の 3 年目は、これまでに得られた成果を基に、新たなランダムな 30 塩基の ssDNA ライブラリーを人工合成し、*in vitro* 転写により作成したピオチン化 - 完全長 PSTVd RNA を標的として、15 ラウンド、3 反復の SELEX を行った。この際、プロトコールの一部を改良し、すなわち、ピオチン化 - 完全長 PSTVd RNA に結合したランダム 30 塩基 ssDNA をポリメラーゼチェーン反応 (PCR) で増幅する際に DNA-RNA キメラプライマーを使用することで、アプタマー鎖の分離と回収率を向上させることに成功した。また、結合反応の時間、PCR 増幅のサイクルパラメーター、アプタマー鎖をポリアクリルアミドゲルから回収する条件等をさらに改良し、一日で 1 ラウンドの SELEX が完了するプロトコールを作成した。また、5 ラウンド目から 5 ラウンド毎 (すなわち 5, 10, 15 ラウンド) に、サンプルの一部を回収して次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を実施し、SELEX による選抜にどの程度の再現性が見られるのかを分析した。

その結果、各ラウンド 3 反復の試料毎の総リード数は、300 万から 500 万リードであった。各試料の 100 万リード当たりの配列の種類は、5 ラウンドで 26,955 ~ 35,303 種、10 ラウンドで 3,101 ~ 3,928 種、15 ラウンドで 2,826 ~ 2,839 種であった。すなわち、5 ラウンドから 10 ラウンドの間で多様性は 10 倍程度減少し、つまり、10 倍以上に濃縮されていた (表 1)。また、興味深いことに、5 ラウンド目で既に全体の集団の数%以上を占める配列が複数種類出現していた。これらの優占配列は、10 ラウンド、15 ラウンドとラウンドが進むにつれ、さらに優占率が高くなるもの、次第に低下するもの、安定して高いものなど様々であったが、優占率の高いものは 3 反復間で共通していた。すなわち、PSTVd RNA と結合して選抜されてくる配列には共通性が見られることが明らかになった。

次に、各ラウンドで共通して優占率の高かった配列を中心に 18 種類の配列 (R5-A、R5-B、R5-1、R5-2、R5-3、R5-4、R5-5、R5-6、R5-12、R5-13、R5-18、R5-20、R15-1、R15-5、R15-8、R15-10、R15-11、R15-12) を選抜し、ピオチン化 DNA を人工合成した。ピオチン化した各 DNA アプタマー候補配列をストレプトアビジン磁気ビーズに吸着させ、*in vitro* 転写した完全長 PSTVd RNA を混合・洗浄した後、吸着された画分を回収した。これを、アガロースゲル電気泳動で分画し、プラスチャージナイロンメンブレンにトランスファーした後、ジゴキシゲニン (DIG) 標識した PSTVd cRNA プローブと一晩ハイブリダイゼーション反応を行った。その結果、1 つ (R5-A) が強く、1 つ (R15-1) がやや強く、4 つ (R5-3、R5-6、R5-18、R15-8) が弱く PSTVd RNA と結合することが明らかになった。

さらに、*in vitro* 転写完全長 PSTVd RNA と結合が確認された 6 種類と結合が確認されなかった 1 種類を含む 7 種類のピオチン化アプタマー候補配列を選抜し、天然の PSTVd-環状分子 (ゲル精製; PSc)、カンキツエクソコーティスウィロイド (CEVd)-環状分子 (ゲル精製; CEc)、及び PSTVd 感染トマト抽出全核酸試料 (PSt) を結合させ、溶出後、DIG 標識 PSTVd-cRNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションで PSTVd を検出した。その結果、R5-A と PSt 及び PSc の結合が確認された。R5-3、R5-18、R15-8 も PSt と弱く反応することが認められた。

以上、15 ラウンドの SELEX と次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を用いることで、ウイロイドに特異的に結合する 30 塩基の配列を複数選抜することに成功した。各配列は *in vitro* で転写した完全長 PSTVd RNA 及び天然の PSTVd と異なる強さで結合した。一方、精製した CEVd (PSTVd と約 70% の塩基配列同一性を有する) とは結合しなかった。また、精製した天然 PSTVd だけでなく、未精製の全 RNA 抽出試料中の PSTVd とも結合した。すなわち、天然の PSTVd と特異的に結合する 30 塩基の配列、DNA アプタマー、を選抜することに成功した。今後この配列をウイロイドの診断薬として、或は防除薬として活用してゆきたい。

また、本研究の結果、簡易な SELEX のプロトコールを作成することができたので、引き続き SELEX を繰り返すことで、PSTVd 以外のウイロイド或はウイルス RNA に対する多様で結合性の異なるアプタマーの選抜が可能になった。

表1 . SELEX : 5、10、15 ラウンドの各3反復のアンプリコン解析結果

	R5-1	R5-2	R5-3	R10-1	R10-2	R10-3	R15-1	R15-2	R15-3
総リード数	4,077,596	2,750,557	5,684,716	3,707,834	3,561,737	4,229,752	4,110,004	3,771,753	3,946,811
総配列数	122,941	74,141	200,688	11,989	11,046	16,616	11,617	10,658	11,198
配列数 /100万リード	30,150	26,955	35,303	3,233	3,101	3,928	2,827	2,826	2,837

* R5, R10, R15 は、それぞれ 5、10、15 ラウンドを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	カボニ マリア (Kaponi Maria)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ギリシャ	クレテ大学			