

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19201046

研究課題名(和文)人工塩基対システムによる高機能核酸の創製

研究課題名(英文) Creation of new functional DNA and RNA molecules by unnatural base pair systems

研究代表者

平尾 一郎 (Hirao Ichiro)

独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：50173216

研究代表者の専門分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体分子・バイオテクノロジー・核酸・人工塩基対・アプタマー

### 1. 研究計画の概要

申請者らが独自に開発した人工塩基対による遺伝情報の拡張システムを、進化学的手法である *in vitro* セレクション法に組み込むことにより、従来法では作り出すことができなかった高機能化した核酸を創製する新たな基盤技術を開発する。従来の天然型の4種類の塩基のランダム配列をライブラリーとして用いる *in vitro* セレクション法では、全ての標的分子に対応する核酸アプタマー(標的分子に結合する核酸分子)を得ることができず、またアプタマーが得られたとしても標的分子との結合能が低い場合も多い。この問題を解決するために、申請者が開発研究を進めている人工塩基対技術を用いて、ライブラリーに人工塩基を介して種々の機能性の置換基を組み込むことにより、核酸ライブラリーの充実を図る。そしてこれを用いた新たな *in vitro* セレクション法を開発し、種々のターゲット分子に対応した新規高機能核酸アプタマーを作り出すための基盤を確立する。そのために、(1) *in vitro* セレクションに利用可能な人工塩基対システムを開発し、(2) これを用いてライブラリーを作成し、(3) *in vitro* セレクションを実施する。

### 2. 研究の進捗状況

本申請の新規 *in vitro* セレクション法を達成するためには、導入する人工塩基対が PCR、転写、ならびに逆転写のそれぞれにおいて、天然型の A-T と G-C の塩基対と同等の選択性と効率で機能しなければならない。これまでに申請者らが開発した人工塩基対の改良をさらに進め、その結果、人工塩基対を組込んだ DNA を 40 サイクル以上の PCR で増幅することができ、増幅された DNA 中には人工塩基対が 97% 以上保持させることができ

るようになった。さらに人工塩基に種々の機能性置換基を結合した複製用の基質も PCR で DNA 中に導入させることが出来るようになった。この人工塩基対を用いて *in vitro* セレクション用の DNA ライブラリーの作製を進めている。

### 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。本課題では、*in vitro* セレクション法に耐えうる人工塩基対を開発することが出来るかどうかマイルストーンの一つであるが、これを達成することが出来た、現在、ほぼ(2)までを終了し、(3)の課題に移りつつある。

### 4. 今後の研究の推進方策

現在、作成している DNA ライブラリーを用いてモデルタンパク質をターゲットにしてこれに結合する DNA アプタマーを作成し、本手法の評価を行う((3)を実施する)。この評価に基づき、人工塩基に結合させる機能性置換基を改良することにより、本手法を確立する。

### 5. 代表的な研究成果

(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5件)

1) Y. Hikida, M. Kimoto, S. Yokoyama, I. Hirao, Site-specific fluorescent probing of RNA molecules by unnatural base-pair transcription for local structural conformation analysis. *Nature Protocols*, in press. (査読有り)

2) M. Kimoto, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, A unique fluorescent base analogue for the expansion of the genetic alphabet. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 4988-4989 (2010). (査読有り)

- 3) M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, An unnatural base pair system for efficient PCR amplification and functionalization of DNA molecules. *Nucleic Acids Res.*, 37, e14 (2009). (査読有り)
- 4) 平尾一郎、アプタマーの可能性を広げる合成生物学. *Cytometry Research*, 19(2), 9-17 (2009). (査読無し)
- 5) 平尾一郎、新規アプタマー創製へのチャレンジ・人工塩基対技術. 遺伝子医学MOOK15、167-173 (2009). (査読無し)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) M. Kimoto, Site-specific incorporation of functional components into RNA by transcription using unnatural base pair systems. 第 6 回国際核酸化学シンポジウム、2009 年 10 月 1 日 (岐阜)
- 2) 木本路子、PCR と転写で機能する人工塩基対による機能性コンポーネントの RNA 中への位置選択的取り込み. 第 11 回 RNA ミーティング、2009 年 7 月 29 日 (新潟)
- 3) Ichiro Hirao, Development of unnatural base pair systems toward new biotechnology. ACS 237th National Meeting、2009 年 3 月 23 日 (米国ユタ)
- 4) 平尾一郎, Unnatural base pair systems toward nucleic acid technologies. 第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 13 日 (名古屋)
- 5) Ichiro Hirao, Development of unnatural base pair systems toward new biotechnology. ASIA TIDE、2009 年 2 月 23 日 (東京)
- 6) Ichiro Hirao, Unnatural base pair systems for expansion of the genetic alphabet. ACS 236th National Meeting 2008 年 8 月 22 日 (米国フィラデルフィア)
- 7) 平尾一郎、アプタマーの可能性を広げる合成生物学. 第 18 回日本サイトメトリー学会、2008 年 6 月 29 日 (東京)
- 8) Ichiro Hirao, Unnatural base pair systems for DNA/RNA-based biotechnology. TIDE、2008 年 5 月 21 日 (米国ラスベガス)

[図書] (計 1 件)

I. Hirao, T. Kanamori, T. Ueda, Springer, Berlin, Heidelberg, Cell-free synthesis of proteins with unnatural amino acids. The PURE system and expansion of the genetic code. In Protein Engineering. (eds C. Köhler, U. L. RajBhandary) (2009) 271-290.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1)

名称：新規蛍光性人工塩基対  
発明者：平尾一郎、平尾路子、横山茂之、三井雅雄  
権利者：理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社  
種類：特許権  
番号：特願 2009-232776  
出願年月日：2009 年 10 月 6 日  
国内外の別：国内

2)

名称：特異な塩基対を形成する人工塩基対  
発明者：平尾一郎、平尾路子、横山茂之  
権利者：理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社  
種類：特許権  
番号：特願 2009-232851  
出願年月日：2009 年 10 月 6 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

サイエンスチャンネル：The Brand-new Science NEWS、遺伝子の新しい文字「人工塩基対」の開発に成功  
[http://sc-smn.jst.go.jp/8/bangumi.asp?i\\_series\\_code=J070622&i\\_renban\\_code=005](http://sc-smn.jst.go.jp/8/bangumi.asp?i_series_code=J070622&i_renban_code=005)

インタビュー：Genetic alphabets、RSC Publishing、2009 年 8 月 10 日  
[http://www.rsc.org/Publishing/Journals/cb/Volume/2009/9/genetic\\_alphabets.asp](http://www.rsc.org/Publishing/Journals/cb/Volume/2009/9/genetic_alphabets.asp)

研究室ホームページ

<http://protein.gsc.riken.go.jp/hirao/index.html>