

平成24年2月29日現在

機関番号： 82401  
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 highly-functional nucleic acids 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

## 研究成果の概要（和文）：

本課題では、申請者らの人工塩基対の基盤技術を確立することにより、従来の核酸アプタマー（核酸抗体）などの機能性核酸をさらに高機能化する技術を創出した。その中で、第三の塩基対として DNA 複製に利用できる人工的な Ds-Px 塩基対を作り出し、これを核酸の進化学的手法である *in vitro* セレクション法（SELEX 法）に応用して、従来よりも特異的かつ高い親和力で標的タンパク質に結合する人工塩基を含む DNA アプタマーを作成する技術を確立することが出来た。

## 研究成果の概要（英文）：

By using our unnatural base pair systems for expanding the genetic alphabet of DNA, we developed a new method to generate artificial nucleic acid molecules with increased functionality. Here, we succeeded in an evolutionary engineering method (*in vitro* selection, SELEX) generating new DNA aptamers, which comprise one unnatural and four natural bases. The aptamers obtained here exhibited higher affinity to target proteins than those of conventional ones.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
平成20年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
平成21年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
平成22年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
年度			
総計	36,100,000	10,830,000	46,930,000

研究分野：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：人工塩基対、核酸アプタマー、PCR、*in vitro* セレクション、SELEX

## 1. 研究開始当初の背景

種々の新たな機能性核酸の発見に伴い、これらの新規核酸の医薬への応用が盛んに試みられるようになった。しかしながら、4種類の塩基に基づく構成ユニット（ヌクレオチ

ド）から成る核酸分子は、20種類のアミノ酸から成るタンパク質と比較して、その機能や実用化は限定的である。例えば、核酸抗体として機能する核酸アプタマーは、種々の塩基配列からなる核酸断片のライブラリーを用いて、標的分子に特異的

に結合する核酸アプタマーを試験管内で作成することが出来る。しかし、核酸アプタマーの標的分子に対する親和性は、タンパク質抗体と比べると一般的に低い場合が多い。そこでこの問題を解決するために、種々の核酸分子の修飾や類似体の研究が盛んに行われている。その中で、人工的に新たな塩基（人工塩基）を作りだし、これを核酸分子に導入する方法が2000年以降急速に進展している。この方法は、核酸の遺伝情報を本質的に拡張することが出来るので、欧米では本研究に注目が集まっている。しかし、現在までに医薬品開発に応用されている例はほとんどない。これは、人工塩基を導入した人工核酸の増幅が難しかったためである。例えば、核酸アプタマーの作成では、核酸断片のライブラリーの増幅と選択の操作を繰り返す手法を用いるので、人工塩基を組み込んだ核酸分子が複製や転写で機能することが必須の条件となる。

## 2. 研究の目的

本申請課題は、申請者が開発している人工塩基対の基盤技術を確立し、これをアプタマーの作成技術に応用することにより、従来の核酸アプタマーよりも高機能の新規核酸アプタマーを作り出す技術を開発することを目的としている。

核酸の複製や転写では、AとT(U)、ならびにGとCが、それぞれ選択的に塩基対を形成することによる相補性が基本法則である。したがって、人工塩基を核酸分子に導入するためには、2種類の人工塩基を第三の塩基対（人工塩基対）として作り出し、これが複製や転写で機能しなければならない。申請者らは、これまでに、複製や転写、あるいは転写や翻訳で機能する種々の人工塩基対を開発してきた。しかし、核酸アプタマーの作成に応用するためには、人工塩基対を組み込んだDNAが100サイクルのPCR増幅でも保持され、その間に、天然型塩基対と人工塩基対が置き換わらないレベルの高精度の人工塩基対を作り出す必要がある。そこで、本申請では、これまでに申請者が開発した人工塩基対をさらに高精度化し、この人工塩基対を組み込んだ核酸ライブラリーを作成して新機能アプタマーを作り出す技術を創出する。

## 3. 研究の方法

核酸アプタマーの作成に利用できる人工塩基対技術の確立を目指し、これまでに申請者が開発した人工塩基対とPCR技術の改良ならびに核酸アプタマーの高機能化を目指した人工塩基への機能性置換基の導入とそのPCRにおける選択性の検証等を行った。申請者らは既に、PCRで機能する人工塩基対

(Ds-Pa, *Nature Methods*, 3, 729 (2006)、やDs-Pn, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 15549 (2007))を開発しているので、これを改良してさらに高精度のPCR増幅を実現する6塩基システムを確立する。

次いで、改良型人工塩基対を導入した種々の塩基配列から成るDNAのライブラリーを作成し、これを用いて特定のタンパク質に結合するDNAアプタマーの作成を行い、その手法を開発する(図1)。人工塩基に依存して得られるDNAアプタマーの標的タンパク質に対する親和性を測定することにより、本手法と従来法を比較して、本手法を改良・確立する。

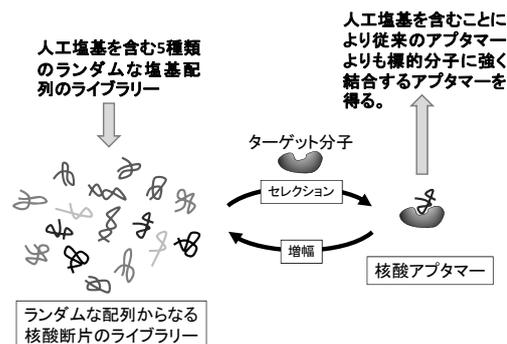


図1. 核酸アプタマーのin vitroセレクション法(SELEX法)

## 4. 研究成果

### 1) Ds-Px 塩基対の開発とその改良

これまでに申請者が開発していたDs-PaやDs-Pn塩基対をPCRで使用するには、特定の塩基でリン酸部分を修飾したPCR用基質が必要であり、また、PCRの増幅効率もそれほど高くは無かった。そこで、これらの塩基対をさらに改良し、新たに、Ds-Px塩基対(図2)(7-(2-thienyl)-imidazo[4,5-b]pyridine(Ds)と2-nitro-4-propynylpyrrole(Px))を開発した(*Nucleic Acids Res.*, 37, e14 (2009).)。このDs-Px塩基対を導入したDNA断片は、30サイクルのPCRで10の8乗倍程度に増幅され、増幅されたDNA中には、人工塩基対が97%以上保持された。

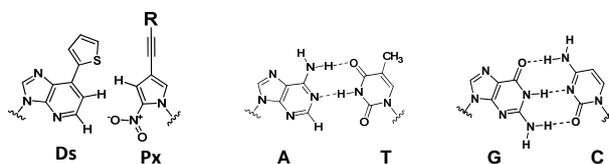


図2. 本課題のin vitroセレクションに用いた人工塩基対(Ds-Px)(PxのRの部分に種々の置換基を導入)

さらに、人工塩基の修飾によるPCRにおける人工塩基対の精度を調べるためと、種々の機能性置換基を導入した人工塩基を含むアプタマーを作成するために、数種類の置換基をそれぞれ結合した修飾Px塩基(Px塩基のRの部分に置換基を導入)のヌクレオチド誘導体を化学合成した(図3)。

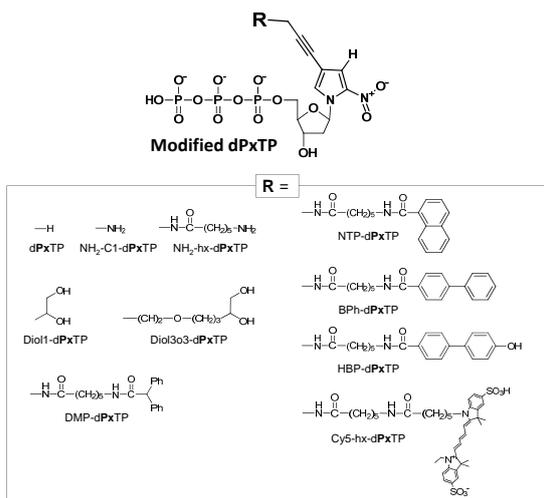


図3. 複製用の種々の修飾Px三リン酸基質

これらの修飾 Px 塩基と Ds 塩基の複製用基質、ならびに、Ds 塩基を組み込んだ DNA 断片を用いて、PCR における人工塩基対の選択性を調べた。そして、人工塩基対の選択性、ならびに人工塩基基質が、鋳型中の天然型塩基に相補して、どの程度取り込まれてしまうかを、調べる手法を確立し、それぞれの修飾 Px 塩基基質を用いて、人工塩基対の性能を調べた。さらに、ポリメラーゼの種類、PCR の条件を詳細に検討し、人工塩基対を含む DNA の PCR 増幅の最適化を行った。その結果、100 サイクルの PCR も可能とする人工塩基対システムを構築することが出来た (*Nucleic Acids Res.*, *in press.* doi:10.1093/nar/gkr1068)。図 3 に示したほとんどの修飾 Px 塩基基質が高い性能を示したが、なかでも、NH<sub>2</sub>-hx-dPxTP や Diol1-dPxTP は、最適化した PCR の条件では、天然型塩基対の選択性に近い性能を示した。例えば、dDsTP と Diol1-dPxTP を用いた PCR では、人工塩基を含む DNA は、100 サイクル (実際には 10 サイクルの PCR を行い、増幅 DNA の溶液を希釈し、次の 10 サイクルの PCR を行い、これを 10 サイクル繰り返した。)の PCR 後も増幅された DNA 中には 97% 以上人工塩基対が取り込まれていた。さらに、100 サイクルの PCR も行ったところ、DNA は 10<sup>28</sup> 倍に増幅され、増幅された DNA 中には 97% 以上、人工塩基対が保持されていた。さらに、人工塩基基質が鋳型 DNA 中の天然型塩基に相補して間違っ て取り込まれる割合は、1 回の複製で 1 塩基当たり 0.003~0.005% であった。この割合は、本 PCR 条件での天然型塩基対の精度に匹敵するものであった。

Px 塩基の修飾に加えて、Ds 塩基の修飾も行い、Ds 塩基のチオフェン部位にもう一つのチオフェンを結合させた塩基 (Dss) が強い蛍光特性を有し、この Dss-Px 塩基対も複製や転写で機能することも分かった (*J. Am. Chem. Soc.*, 132, 4988 (2010).)。さらに、この研究の過程で、Px 塩基のニトロピロール部位

が消光性を有していることを見つけ、結果的に、蛍光性の塩基と消光性の塩基から成る人工塩基対の開発に成功した (図 4, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 15418 (2010).)。この Dss-Px 塩基対を用いて、モлекуラービーコンやリアルタイム PCR などの新たな診断技術を開発した。

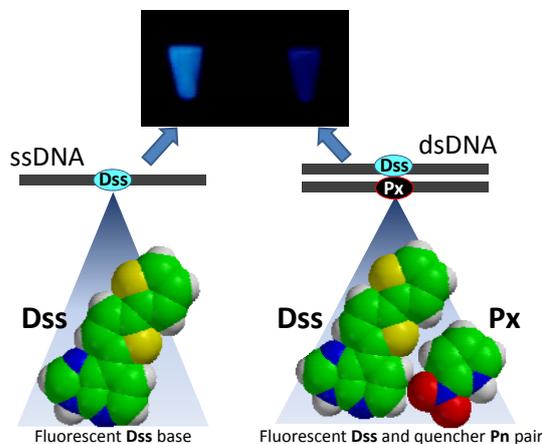


図4. 蛍光性と消光性の人工塩基から成るDss-Px塩基対

## 2) 人工塩基対技術を利用した DNA アプタマーの作成

精度の高い人工塩基対の開発とその PCR 技術を確立することが出来たので、これを用いて DNA アプタマーを作成する手法の開発を進めた。人工塩基 (Ds) と 4 種類の天然型塩基からなるランダム配列の DNA ライブラリーを化学合成し、このライブラリーを用いて 2 種類のタンパク質をモデルターゲットとして、DNA アプタマーの作成を行った。通常のアプタマー作成技術 (in vitro セレクション法、SELEX 法) では、数ラウンドの PCR 増幅とセレクションの操作を繰り返した後、最終的なライブラリーのクローニングと DNA シーケンシングの操作を経て、特定のアプタマー配列を決定する。しかし、現状では、人工塩基を含む DNA のクローニング法が確立していないため、申請者らは、これを回避する 2 種類の新たな手法を考案した (特許出願中、論文作成中)。

この手法による 8 ラウンドのセレクションを実施し、得られたアプタマーの配列を決定して、標的タンパク質との親和性を表面プラズモン共鳴 (SPR) の測定により調べた (図 5)。その結果、得られた DNA アプタマーは、天然型塩基のみから成る従来の DNA アプタマーと比較して、その親和性は数十倍に向上した。また、DNA アプタマー中の人工塩基部位を天然型塩基に置き換えると、

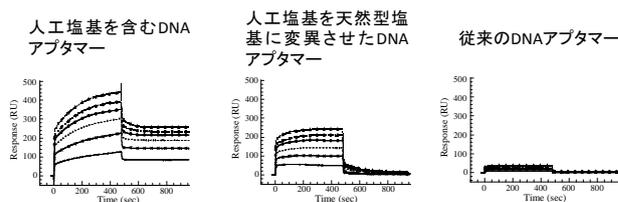


図5. 得られたDNAアプタマーと従来のDNAアプタマーの標的タンパク質に対するセンサグラム

親和性は低下し、人工塩基がアプタマーの性能に寄与していることが分かった。

以上の結果、本課題により、アプタマーの作成に利用できるレベルの高性能の人工塩基対技術を開発し、世界で初めて、5種類の塩基から成る DNA ライブラリーを用いた *in vitro* セレクション法を世界で初めて開発し、本法により、従来法よりも高機能の DNA アプタマーが得られることが分かった。

また、本研究課題を通して、人工塩基対技術を用いた新規研究手法の創出 (*Nature Protocols*, 5, 1312 (2010).) や天然型塩基対の起源に示唆を与える知見 (*Acc. Chem. Res.*, *in press.*) を得ることも出来た。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① I. Hirao, M. Kimoto, R. Yamashige, Natural vs artificial creation of base pairs in DNA: origin of nucleobases from the perspectives of unnatural base pair studies. *Acc. Chem. Res.*, *in press.* 査読有
- ② R. Yamashige, M. Kimoto, Y. Takezawa, A. Sato, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, Highly specific unnatural base pair systems as a third base pair for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.*, *in press.* 査読有
- ③ R. Yamashige, M. Kimoto, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, Monitoring the site-specific incorporation of dual fluorophore-quencher base analogues for target DNA detection by an unnatural base pair system. *Org. Biomol. Chem.*, 412, 325-339 (2011). 査読有
- ④ M. Kimoto, R. S. Cox 3rd, I. Hirao, Unnatural base pair systems for sensing and diagnostic applications. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 11, 321-331 (2011). 査読有
- ⑤ M. Kimoto, T. Mitsui, R. Yamashige, A. Sato, S. Yokoyama, I. Hirao, A new unnatural base pair system between fluorophore and quencher base analogues for nucleic acid-based imaging technology. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 15418-15426 (2010). 査読有
- ⑥ M. Kimoto, I. Hirao, Site-specific incorporation of extra components into RNA by transcription using unnatural base pair systems. *Methods, Mol. Biol.*, 634, 355-369 (2010). 査読有
- ⑦ 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*, 5, 1312-1323 (2010). 査読有
- ⑧ 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

- ⑨ 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
- ⑩ I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto, S. Yokoyama, An efficient unnatural base pair for PCR amplification. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 15549-15555 (2007). 査読有
- ⑪ M. Kimoto, T. Mitsui, Y. Harada, A. Sato, S. Yokoyama, I. Hirao, Fluorescent probing for RNA molecules by an unnatural base-pair system. *Nucleic Acids Res.*, 35, 5360-5369 (2007). 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① I. Hirao, New biotechnology by the expansion of the genetic alphabet using unnatural base pairs. European Genomics-2011 Meeting, 2011/10/11, Rome/Italy
- ② I. Hirao, Fluorescently unique unnatural base pairs for the expansion of the genetic alphabet. XVth symposium on chemistry of nucleic acid components, 2011/6/5, Cesky Krumlov/Czech
- ③ I. Hirao, Unnatural base pair systems for DNA/RNA biotechnology. Pachifichem 2010, 2010/12/18, Hawaii/USA
- ④ I. Hirao, Unnatural Base Pair Systems for the Expansion of the Genetic Alphabet. IRT2010:International Roundtable on NNN, 2010/8/30, Lyon/France
- ⑤ I. Hirao, Development of unnatural base pairs for the expansion of the genetic alphabet. Evolving DNA Polymerases: Chemistry Meets Biology, 2010/5/11, Monte Verita/Switzerland
- ⑥ I. Hirao, Unnatural Base Pair Systems for Diagnostic Applications. TIDES: 2010, 2010/4/28, Boston/USA
- ⑦ I. Hirao, Development of unnatural base pair systems toward new biotechnology. ACS 237th National Meeting, 2009/3/23, Utah/USA
- ⑧ I. Hirao, Development of unnatural base pair systems toward new biotechnology. ACS 237th National Meeting, 2008/8/21, Philadelphia/USA
- ⑨ I. Hirao, The development of unnatural base pair systems for expansion of the genetic alphabet. XIVth symposium on chemistry of nucleic acid components, 2008/6/11, Cesky Krumlov/Czech
- ⑩ I. Hirao, Unnatural base pair systems for DNA/RNA-based biotechnology. TIDES:2008, IBC's 4th International Nucleic Acids Technologies for Diagnostics, 2008/5/21, Las Vegas/USA

[図書] (計 6 件)

- ① 平尾一郎・胡桃坂仁志編著、羊土社、核酸実験の原理とプロトコール、(2011) 264 ページ。

- ② 平尾一郎、化学同人、核酸化学のニュートレンド' (2011) 101-107.
- ③ 平尾一郎、医歯薬出版、医学のあゆみ、(2011) 566-572.
- ④ I. Hirao, M. Kimoto, Wiley-VCH, *The Chemical Biology of Nucleic Acids*. (2010) 36-62.
- ⑤ I. Hirao, T. Kanamori, T. Ueda, Springer, *Protein Engineering* (2009) 271-290.
- ⑥ 平尾一郎、メディカルドゥ、遺伝子医学MOOK、最新 RNA と疾患研究、(2009) 167-173.

[産業財産権]

○出願状況 (計 7 件)

名称：高選択・高効率で PCR 増幅が可能な新規 DNA  
 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  
 番号：特願 2008-094255  
 出願年月日：2008 年 3 月 31 日  
 国内外の別：各国移行済み

名称：新規蛍光性人工塩基対  
 発明者：平尾一郎、平尾路子、三井雅雄、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  
 番号：特願 2009-232776  
 出願年月日：2009 年 10 月 6 日  
 国内外の別：各国移行手続き中

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  
 番号：特願 2009-232851  
 出願年月日：2009 年 10 月 6 日  
 国内外の別：各国移行手続き中

名称：消光性ならびに蛍光性の塩基類似体とその利用  
 発明者：平尾一郎、平尾路子、横山茂之、三井雅雄、山重りえ  
 権利者：理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社  
 番号：特願 2010-098319  
 出願年月日：2010 年 4 月 19 日  
 国内外の別：日本を含む全指定

名称：機能性核酸の安定化法  
 発明者：平尾一郎、平尾路子、劉爽、野澤巖  
 権利者：理化学研究所、タグシクス・バイオ株式会社  
 番号：特願 2010-096520  
 出願年月日：2010 年 4 月 19 日

国内外の別：日本を含む全指定

名称：核酸アプタマーの作成方法  
 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  
 番号：特願 2011-117122  
 出願年月日：2011 年 8 月 12 日  
 国内外の別：各国移行を予定

名称：人工塩基を含むライブラリーを用いた機能性核酸の製造方法  
 発明者：平尾一郎、平尾路子、山重りえ、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  
 番号：特願 2011-253357  
 出願年月日：2011 年 11 月 18 日  
 国内外の別：各国移行を予定

[その他]

ホームページ

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

## 6. 研究組織

### (1) 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  
 50173216

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

木本 路子 (KIMOTO MICHIKO)  
 独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学研究チーム・研究員  
 20415144

三井 雅雄 (MITSUI TSUNEO)  
 独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学研究チーム・客員研究員  
 60345155

河合 利恵 (KAWAI RIE)  
 独立行政法人理化学研究所・核酸合成生物学研究チーム・リサーチアソシエイト  
 10415135