

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02740

研究課題名(和文)機能発現・判別を指向するDNAアプタマーの電気泳動選抜

研究課題名(英文)Functional DNA aptamer selection by capillary electrophoresis

研究代表者

齋藤 伸吾 (Saito, Shingo)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60343018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、DNAアプタマー(分子認識する一本鎖DNA)の認識能が様々な分野で注目されている。アプタマー獲得の既存法であるSELEX法は、ランダムDNAライブラリーから選抜操作を繰り返すことでアプタマー配列を得るが、その性能の判別や機能の選抜はできない。また、高性能なアプタマーを取り逃がしている可能性が高い。本研究では、キャピラリー電気泳動法と次世代シーケンサーの配列決定能を組み合わせ、わずか1回の選抜操作で高速なアプタマー選抜を達成した。また、得られた大規模な配列情報から選択則に基づいてアプタマー配列を判別する半網羅的でデータベース化できる新手法(SR-CE選抜法)を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では本網羅的な選抜、および選抜プールの配列データからアプタマー配列を見分ける方法論の確立に成功した。この方法では、高親和性のもの、結合することによって構造を変化させシグナルを発生するものなどを意図的に獲得できる。すなわち、アプタマーの機能を選抜することができた。よって、今後は分析法のための分子認識素子や創薬のベースとなるアプタマー配列の獲得が迅速、容易になると考える。さらに、得られた配列データは今後も他の標的に対する選抜プールとの比較用データベースとして活用でき、学問としてのアプタオミクスとしても期待できる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, high-affinity DNA aptamers (single-stranded DNA that recognizes molecules) have attracted attention in various fields. Using an existing method for obtaining aptamers (called SELEX), aptamer sequences have been obtained by repeating the selection process from a randomized DNA library. However, it is impossible to rationally select their affinity or other functions. In addition, there is a possibility that high-affinity aptamers may be missed by SELEX. In this study, we combined the use of capillary electrophoresis and next-generation sequencing to develop a rapid aptamer selection method with single-round selection (called SR-CE selection method). In addition, we established a new semi-exhaustive methodology to obtain an aptamer database and to discriminate aptamer sequences from non-binding sequences based on a selection rule.

研究分野：分析化学

キーワード：DNAアプタマー キャピラリー電気泳動 in vitro選抜 機械学習 クラスタリング

1. 研究開始当初の背景

分子認識化学において「高機能(親和性, 選択性, 立体構造変化など)を有する分子認識素子を選択的かつ簡便, 高速に選抜・獲得することは重要である。古典的には, 結合部位とその配置を最適化するような分子設計をし, 有機合成で認識分子を獲得することがセオリーであった。その後, コンビナトリアルケミストリーの発展とともに多様な化学ライブラリーから結合能や活性を有するものを発見する手法が発展してきた。しかし, 化学ライブラリーからの分子機能の簡便な判別や選抜が可能な手法は報告されていない。

例えば, 多様な化学ライブラリーの例としてはランダムな核酸配列(ランダムライブラリー)から獲得される核酸アプタマーがある。核酸アプタマー(標的分子に結合する一本鎖の 15~40 塩基の核酸)が発見されて以来, 診断薬, アプタマー製剤, ドラッグデリバリーシステムの標的認識部位などに応用され, その有用性は様々な分野で期待されている。しかし, DNA アプタマーの獲得法である SELEX 法は, 標的分子に結合する配列が選抜できる一方で, 得られたアプタマーの結合特性は選抜後に結合試験をして初めて分かり, 機能の意図的な選抜は不可能である。

SELEX の一般的な手順は, ビーズ等に結合したターゲット物質とランダム DNA ライブラリー(配列をランダム化した多様な DNA 集合体; N 塩基であれば 4^N パターンの配列が存在)とを混合し, 標的に結合した DNA を分離回収した後, PCR 増幅し一本鎖化する。この工程(ラウンド)を繰り返すことで結合性 DNA 配列(アプタマー)を徐々に濃縮していく方法である(タンパク質: 5~10 ラウンド, 細胞: ~30 ラウンド程度が必要)。最終的に配列解析し, 結合試験をする。SELEX では, ランダム DNA ライブラリー中の配列パターン数は膨大($4^N = 10^{16} \sim 10^{21}$ パターン)である一方で, 実験的には $10^{11} \sim 10^{13}$ 分子数しか選抜に導入できないため, 実際には全配列パターンの 0.1% 以下しか選抜に導入できない。また, 第二ラウンド以降でも配列を淘汰していくため, 再現性がなく高性能 DNA アプタマーを選抜時に取り逃がしている可能性が高い。よって, 煩雑な選抜操作を何度も試行し, 得られた何十もの配列の結合能を一つずつ実験的に調べられるといった「賭け」や「人海戦術」で高性能アプタマーを獲得していた。加えて, PCR 法は増幅しやすい配列などのバイアスがかかるため, 多数回の PCR を必要とする SELEX 法では多くのアプタマーが取り逃がされているとの報告もある。

2. 研究の目的

そこで本研究では, 再現性および選抜則のあるアプタマー選抜方法の開発を世界で初めて試みた。具体的には, 高分離能を有するキャピラリー電気泳動(CE)で分離した標的物質(タンパク質や細胞)-DNA 複合体分画を精密に分取できる手法を開発し, これに次世代シーケンサー(NGS)による大規模解析を組み合わせた。これにより, 1 ラウンドで高速かつ再現性のある DNA アプタマー選抜ができ, さらに配列解析から結合能すらも予測できると着想した(SR-CE 選抜)。この SR-CE 選抜では半網羅的に選抜が可能で, アウトプットされる配列データから結合能を予測できる(後述)。よって, アプタマー配列の判別とデータベース化が可能のため, データベース比較によって複数の標的間での選択性も予測できると考えた。さらに, インプットする初期 DNA ライブラリーを変えることで異なる機能のアプタマーを得ることに挑戦した。

3. 研究の方法

例えば, ランダムライブラリー中のある任意の配列に注目すると, この配列の類似配列(ランダム領域 20~30 塩基中の 2~4 塩基が異なる配列)は初期ライブラリー中に多数存在する(選抜への導入量が 0.1% 以下でも, 数千~数百万分子程度存在)。25~40 塩基の DNA アプタマーでは, 分子認識に関わらない数塩基が異なっても, 結合能には大きく影響しないことが証明されていることから, この類似配列群(ファミリー)は一定濃度(サブ pM レベル)を持った同じ性質の配列群として扱える。ここで SR-CE 選抜によってファミリーを構成する配列数がどのように変化するかを考える。初期ライブラリー(ある配列の類似配列数を N_0 とする)と標的の初期混合溶液では, 標的-アプタマー複合体は解離平衡定数 K_d に従った割合で錯形成する。また, CE 分離では泳動中に解離反応が進行し, 解離速度定数 k_{off} に従った割合で配列数が減少する。つまり, SR-CE 選抜では K_d と k_{off} の選抜則 $[N = N_0 \times [\text{Target}]_0 / \{[\text{Target}]_0 + K_d\} \times \exp(-k_{off} t)]$ に従い, K_d, k_{off} が小さいほどファミリー配列数 N が多くなる。

従って, SR-CE 選抜後の NGS 解析後の数十万の大規模配列データ中のファミリー配列の数 N を解析することで, DNA アプタマー配列だけをファミリーとして抽出可能と考えた。すなわち, 配列数 N から結合実験無しでの親和性の判別ができる。加えて, ある任意の配列の類似配列が初期ライブラリー中に必ず数千分子以上含む実験条件が設定可能であるため, 近似的に全ての配列パターンを試行し, 半網羅的に選抜できることになる。すなわち, 取り逃がしなく再現性の

ある選抜方法になり得る。よって、既存法の様に選抜を繰り返す必要がなくなるだけでなく、選抜後のファミリーデータはアプタマーデータベースとして扱え、配列比較だけで複数の標的に選択的なアプタマーを実験無しに抽出可能となると考えた。

4. 研究成果

CEは高分離能な分離法であるが、配列解析の際にファミリー配列を見つけ出すためには、選抜時に出来るだけ遊離のDNAを混入させずに分取可能な方法の開発が必要であった。そこで、市販CE装置を改造し、キャピラリーチューブの出口に近い2点間で検出する装置を作成した。これにより、精密な分画分取が可能になった。特に本研究では分離を改善するためにオンライン濃縮法(過渡的等速電気泳動法; uTP)を濃縮-分離モードとして用いるが、濃縮モードと分離モードで各ゾーンの泳動速度が変化する。よって、一定速度になった後のゾーン移動速度を上記の2点間検出法で観測し、キャピラリー出口からの溶出時間を正確に計測することで精密な分取を可能とした。これはランダムDNAライブラリーの分子形状による分割(後述)にも使用した。

血液凝固因子トロンピンをモデル標的タンパク質として、SR-CE選抜の検証実験を行った。その結果、想定通りに1回の選抜操作でトロンピンと結合する選抜プールを得ることができた。そこで、2回の別個の選抜実験とその選抜プールのNGS解析を行い、プール中の配列を決定した。そのプール中の配列群(各約10万配列)に対し、クラスタリング(ペアワイズ分類アライメント)を行った。結果として、両プールの中にはファミリーを形成する配列群が見つかった。また、両プールからは同じファミリーに分類できる配列が見つかり、その時の各ファミリーのN数は両プール間で相関があった(図1)。これは、再現性良く同じファミリーが選抜できていることを示している。また、ランダムに選んだ13ファミリーの中から別個の配列を取り出し、結合実験により K_d と k_{off} を測定したところ、それらはトロンピンと結合する、すなわちアプタマーであることが判明した。さらに、Nの実測値と選択測に K_d と k_{off} を代入して計算したNを比較したところ相関があることも分かった。このことから選択測通りに選抜が行われていることが明らかとなり、SR-CE選抜法を確立することに成功した。

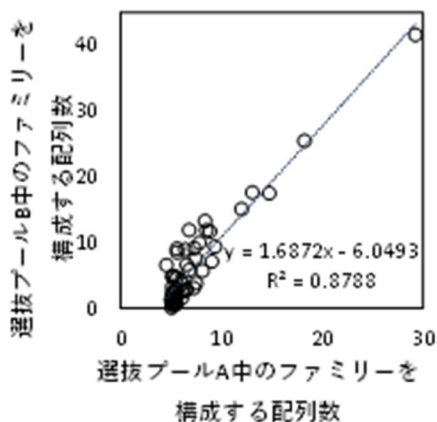


図1 2つのプール中のファミリーのNの比較

さらに、深層学習(ディープラーニング)により、ランダムライブラリーと2つのプールの識別ができるかを検証した。その結果、2つの選抜プールは分類できなかったが、ランダムライブラリーとは高精度で分類できた。このことは2回の独立した選抜実験において、同様な特徴量を持った配列群が獲得でき、さらにそれらは初期ライブラリーとは識別できることを示している。

ここで、初期ライブラリーのDNAを分子ふるいCEによって分子形状に基づく分割を行った。一つは高次構造を形成しているランダムDNA群であり、もう一つは高次構造を形成していないDNA群である。これら高次構造の異なるサブライブラリーを用いてトロンピンタンパク質に対するSR-CE選抜を行い、クラスタリングによる比較からそれぞれのプールに固有な配列の抽出を行った。その結果、構造形成型DNAライブラリーからは比較的高結合能を有するアプタマーが獲得された。一方、構造非形成型DNAでは標的と結合した際に、標的のエピトプの形状に合う様に立体構造を誘起する可能性がある。すなわち構造誘起型アプタマーを選択的に獲得できる可能性がある。そこで獲得したアプタマー配列の両端に蛍光色素を結合させ、立体構造(色素間距離)が変化すると蛍光効率が変化する蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)型のアプタマーとなるかを検証した。結果として、数配列のFRET型アプタマーの獲得に成功した(図2)。これは、SR-CE選抜にインプットする初期ランダムライブラリーを変化させることで機能性アプタマーを意図的に獲得できることを示している。

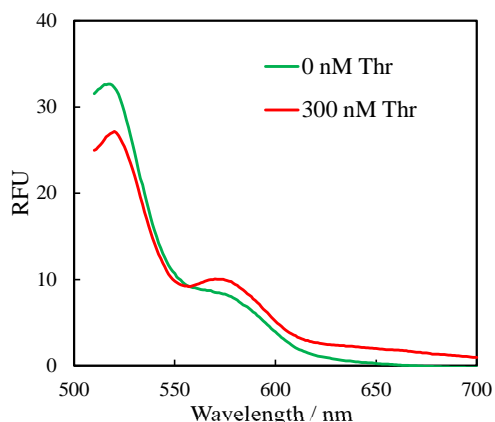


図2 構造誘起型アプタマーの蛍光スペクトル

さらに、標的物質が浮遊細胞やエクソソームである場合においてもSR-CE選抜を行い、アプタマーが獲得できることまで確認できた。この様に、目的とする機能(親和性や構造変化)を有

する DNA アプタマー配列を簡便・迅速かつ選択的に得る手法の構築に成功した。このアプタマー配列を半網羅的に選抜し、大規模な配列データ群の機械学習による比較から性能をも選抜可能な方法論を「アプタオミクス」と呼称することを学術論文誌に提唱した。将来的には、種々の標的に対するアプタマー配列をデータベース(ビッグデータ)化し、クラスタリングやディープラーニングなどの手法を高度化することで、データマイニング的に機能性分子モチーフを獲得することに挑戦し、アプタオミクスを発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Saito Shingo, Sakamoto Toshiaki, Tanaka Naoki, Watanabe Ryo, Kamimura Takuya, Ota Kazuki, Riley Kathryn R., Yoshimoto Keitaro, Tasaki Handa Yuiko, Shibukawa Masami | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Single Round DNA Aptamer Selection by Combined Use of Capillary Electrophoresis and Next Generation Sequencing: An Aptamomics Approach for Identifying Unique Functional Protein Binding DNA Aptamers | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal | 6. 最初と最後の頁 10058 ~ 10067 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202100177 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Shingo Saito | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 SELEX-based DNA Aptamer Selection: A Perspective from the Advancement of Separation Techniques | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Sciences | 6. 最初と最後の頁 17 ~ 26 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SAR18 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Haraga Tomoko, Tsujimura Hiroto, Miyauchi Saori, Kamimura Takuya, Shibukawa Masami, Saito Shingo | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Purification of anionic fluorescent probes through precise fraction collection with a two-point detection system using multiple-stacking preparative capillary transient isotachopheresis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ELECTROPHORESIS | 6. 最初と最後の頁 1152-1159 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elps.201900399 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 CE分離と機械学習によるDNAアプタマー選抜 |
| 3. 学会等名 第28回クロマトグラフィーシンポジウム (CS28) (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 キャピラリー電気泳動法によるDNAアプタマー-トロンピン三元複合体の結合サイト、平衡および速度パラメーターの測定 |
| 3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shingo Saito |
| 2. 発表標題 Single-round DNA aptamer selection by means of capillary electrophoresis combined with next generation sequencing: could unique functional aptamers be acquired by sequence data mining? |
| 3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem2021) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuki Ota, Ryo Watanabe, Yuiko Tasaki-Handa, Shingo Saito |
| 2. 発表標題 Single round capillary electrophoretic selection to develop novel DNA aptamers functionalized by artificial functional groups for proteins |
| 3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem2021) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 CEによる機能性DNAアダプターの1ラウンド選抜 |
| 3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 太田和希, 渡辺峻, 半田友衣子, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 シングルラウンドCE選抜を用いる巨大官能基修飾型新奇DNAアダプターの創製 |
| 3. 学会等名 第69回日本分析化学年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 CEによる生体分子錯体の結合サイト、平衡および速度パラメーターの測定 |
| 3. 学会等名 40周年記念キャピラリー電気泳動シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 稲垣高遠, 田中直輝, 太田和希, 半田友衣子, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 機械学習によって最適化したトロンピン結合型DNAアダプター配列の電気泳動法による結合評価 |
| 3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂本寿樹, 吉本敬太郎, 渋川雅美, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 立体構造の異なるランダムDNAライブラリーを用いるトロンピン結合型アプタマー選抜 |
| 3. 学会等名 第79回分析化学討論会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 新規分子と出会うための特異な電気泳動分離 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会関東支部若手交流会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 1ラウンド電気泳動選抜と大規模配列解析に基づくタンパク質結合型DNAアプタマーの獲得 |
| 3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡辺峻, 半田友衣子, 渋川雅美, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 フルオロベンゼン導入型ランダムDNAライブラリーを用いるトロンピン結合型アプタマーの選抜 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中直樹, 半田友衣子, 渋川雅美, 菅沼雅美, 吉本敬太郎, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 キャピラリー電気泳動と大規模配列解析に基づくPC-9細胞結合型アプタマーの1ラウンド選抜 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂本寿樹, 半田友衣子, 吉本敬太郎, 渋川雅美, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 立体構造変化に基づいた分子認識機能を有するトロンピン結合型DNAアプタマーの電気泳動選抜 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 坂本寿樹, 半田友衣子, 吉本敬太郎, 渋川雅美, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 構造誘起に基づく分子認識機能を有するトロンピン結合型DNAアプタマーのCE選抜 |
| 3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡辺峻, 半田友衣子, 渋川雅美, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 二重鎖形成によるフルオロベンゼン導入型ランダムDNAライブラリーの構築とトロンピン結合型アプタマーのCE選抜 |
| 3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中直輝, 半田友衣子, 渋川雅美, 吉本敬太郎, 菅沼雅美, 齋藤伸吾 |
| 2. 発表標題 1ラウンドCE選抜と大規模配列解析に基づく細胞結合型DNAアプタマー獲得法の開発 |
| 3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 日本分析化学会（共著） | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 丸善出版 | 5. 総ページ数 260 |
| 3. 書名 改訂6版 分析化学データブック | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 齋藤研究室HP https://www.apc.saitama-u.ac.jp/bunseki/index.html |
|--|

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 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 半田 友衣子 (Handa Yuiko) (20586599) | 埼玉大学・理工学研究科・助教 (12401) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 吉本 敬太郎 (Yoshimoto Keitaro) (60392172) | 東京大学・大学院総合文化研究科・准教授 (12601) | |

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 |
|---------|---------|
| | |