

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07031

研究課題名(和文) 光化学的新技術を利用した核酸アプタマーの効率的分離法の開発と応用

研究課題名(英文) Efficient separation method for nucleic acid aptamers using photochemical technique

研究代表者

定金 豊 (Sadakane, Yutaka)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60293304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：次世代の抗体医薬品分子として注目されている核酸アプタマーの生産効率を高める基礎的技術を構築しました。研究成果である複数同時結合解析法は、光化学的技術を応用した高分解能かつ迅速・簡便な分析手段です。本研究ではこの解析法を確立するために、核酸アプタマーへの光反応基の導入法の確立、変性条件下での結合解析法の構築、モデルタンパク質を用いた複数同時解析法の評価を実施しました。トロンビンに対する二種のアプタマーの結合特異性を1回の電気泳動で複数個同時に解析することに成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果である光反応基を用いた新技術は、1回の電気泳動で複数個の核酸アプタマーについて同時に多対象の結合特異性を解析できるという利点があります。核酸アプタマーのスクリーニングで得られる膨大な数の候補について、その結合特異性を調べることはとても骨の折れる大変な作業ですが、本研究の複数同時結合解析法を用いることで大幅に作業負担が軽減されと考えられます。核酸アプタマーの生産効率を高めることに役立つ基礎的な技術を開発できたことが本研究の意義と考えます。

研究成果の概要(英文)：We developed a basic technology to enhance the production efficiency of nucleic acid aptamers, which are attracting attention as next generation antibody drug molecules. Our research achievement, the multi-analytical method, is a high resolution, rapid and simple analysis approach utilizing photochemical technology. In this study, we conducted the following steps to realize the analytical method: 1) establishment of a method for introducing photoreactive group into nucleic acid aptamers, 2) construction of a binding analysis method under denaturing conditions, and 3) evaluation of the multi-analytical method using model proteins. We successfully achieved simultaneous analysis of the binding specificity of two aptamers against thrombin in a single electrophoresis.

研究分野：分析化学

キーワード：電気泳動 光反応基 ジアジリン S化DNA トロンビン

## 1. 研究開始当初の背景

世界で最も売れた医薬品（2021年）トップ20の中で、抗体を用いた医薬品（抗体医薬品）は9種類を占め、売上の44%に匹敵するという調査結果があります。抗体医薬品なしでは、医療は成り立たないのが現状であると言われていています。しかしながら、抗体は高分子のタンパク質であり、製造コストも高くなり、管理も難しいとされています。また、抗体医薬品を大量かつ迅速に作ることに難しいために、パンデミックなどで大量の医薬品を早急に準備する状況に対応が困難であると言われていています。

核酸アプタマーは、タンパク質や糖鎖だけでなく低分子化合物や金属イオンに対しても高い特異性と結合力を示します。抗体が標的にできない分子種も創薬ターゲットとできるので、抗体に次ぐ新しい医薬分子として期待されています。DNAやRNA分子であるので、配列さえ決めれば、同一の分子種を極めて安価かつ大量に化学合成できます。そのため、パンデミックの状況下でも早急に対応できる特色があります。核酸アプタマーは、これまでに血液疾患や加齢黄斑変性症の治療薬として開発が勢力的に進められており、上市されている医薬品もあります。

核酸アプタマーは、 $10^{15}$ 以上という膨大な数のランダムなDNAもしくはRNA配列の中から選択されます。効率的に目的のアプタマーを選び出すために、試験管内で人工進化プロセスを進めるSELEX法が開発されており、広く利用されています。SELEX法はとても優れた方法ですが、選択と増幅を繰り返す作業を繰り返すため、意図せぬ配列のアプタマーが優先的に増幅され、目的のアプタマーの選択性を著しく悪くする欠点も指摘されています。また、SELEX法で選別しても、膨大な数の候補アプタマーが得られるため、候補を絞っていく作業も時間のかかる大変な作業となります。

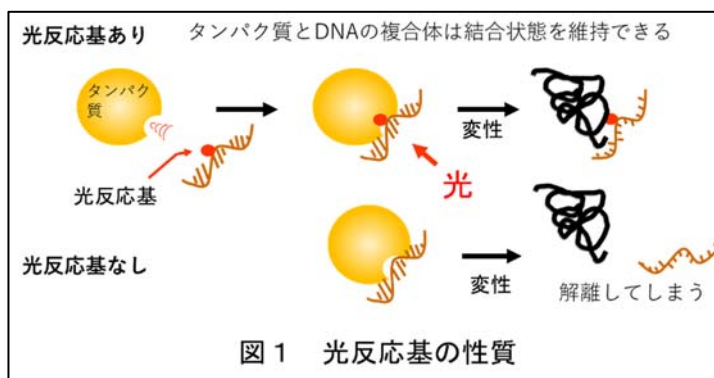
次世代の抗体医薬品分子として注目されている核酸アプタマーをさらに効率的に得る方法が求められています。そのためには、SELEX法の選択効率を高める工夫と、複数の核酸アプタマーを同時に多数個解析できる方法論の開発が求められています。核酸アプタマーが狙った通りの結合活性を持つかを調べるためには、表面プラズモン共鳴を利用した高価な装置がよく使われますが、1検体あたりの単価が高価であり、1つずつしか解析できない点で限界があります。効率のかつ簡便で迅速、さらに安価な核酸アプタマーの結合解析法が求められています。

## 2. 研究の目的

核酸アプタマーは標的タンパク質の形を認識し、その場で構築される弱い結合（水素結合や静電的結合など）の総和によって成り立っています。これらの結合が崩れると両者は離れてしまいますので、核酸アプタマーの結合を解析するためには、これらの相互作用を保ったまま解析する必要があります。そのため、解析の分解能や再現性が犠牲になるだけでなく、簡便に解析することが困難となります。

変性条件下で解析を行うと、分解能が向上し、分析の再現性が良くなります。核酸アプタマーと標的タンパク質との結合を保ったまま、変性条件下で解析を行うことができれば、効率的で簡便・迅速な核酸アプタマーの結合解析法が実現できます。

光反応基は、光を照射すると最寄りの分子と共有結合する性質をもつ官能基です（図1）。タンパク質と核酸アプタマーはお互いの親和性により結合し複合体を形成します。光反応基を核酸アプタマー（DNA）に導入しておくことで、この複合体の状態を固定化することができます。具体的には、光の照射により光反応基が活性化し、最寄りの分子、この場合は結合したタンパク質



と共有結合を形成します。この共有結合の形成により、たとえタンパク質が変性してその構造が壊れてしまっても、核酸アプタマーはタンパク質との結合を維持していることとなります。通常では、タンパク質が変性してしまうと結合状態を維持することができません。光反応基は、核酸アプタマーの結合解析を迅速・簡便化する鍵となる化合物です。

我々は、比較的短い一本鎖 DNA の任意な位置に光反応基を導入する方法を見出しています(文献1)。この方法は DNA のリン酸基をチオリン酸に変えた S 化 DNA を用いるもので、チオール基の求核性の違いを利用して、ブロモ基をもつ光反応基 ([3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]benzyl bromide) を選択的に導入することができます(図2)。両者を混合して、37°Cで静置するだけで、光反応基が導入された光反応性 DNA を生成することができます。チオール基を入れる位置は任意に設定できますので、好きな場所に光反応基を導入できることがこの方法の利点となります。

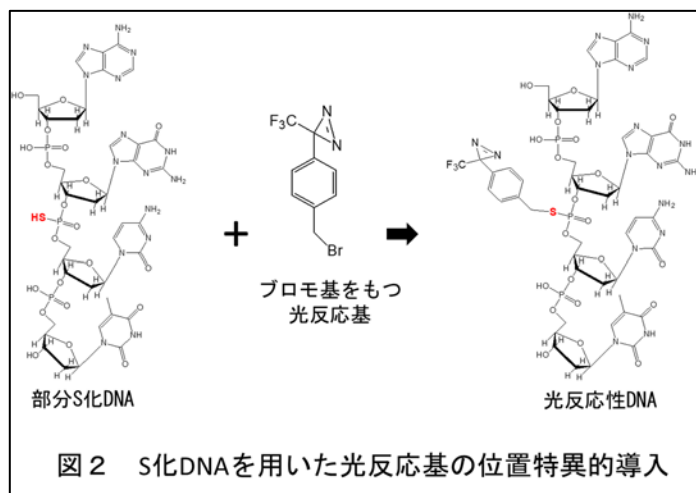


図2 S化DNAを用いた光反応基の位置特異的導入

本研究では、核酸アプタマーの開発を推進する基礎的な技術開発として、光反応基を導入した核酸アプタマーを用いて、複数の核酸アプタマーを同時に多数個解析できる方法論の開発を目的としました。

### 3. 研究の方法

光反応基を用いた核酸アプタマーの結合解析の開発には、核酸アプタマーに光反応基を導入する方法が必須です。比較的短い一本鎖 DNA への導入法は確立できていますが、水が反応を阻害するため有機溶媒中で反応を行っていました。核酸アプタマーのような 30 塩基程度の長さになると溶解させるために水が必要となり、水を含む溶液中での光反応基の導入法を確立する必要があります。そのため、4 塩基の S 化 DNA で光反応基との反応条件を再検討しました。さらにリゾチームに対する既報の核酸アプタマー (ATCAGGGCTAAAGAGTGCAGAGTTACTTAG、文献2) 配列を用いて、反応条件を決定しました。使用する光反応基についても、従来のフェニル型ジアジリンの他に、さらにサイズの小さいアルキル型のジアジリンも合成し、光反応基の核酸アプタマーへの導入条件を検討しました(図3)。

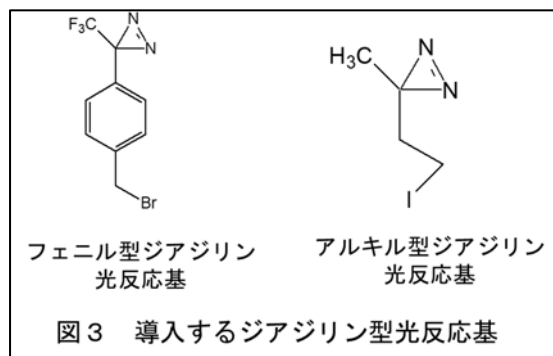


図3 導入するジアジリン型光反応基

リゾチームに対する核酸アプタマーの 28 塩基目のリン酸をチオリン酸に変え、末端に検出用タグであるビオチンを導入した一本鎖 DNA (biotin-ATCAGGGCTAAAGAGTGCAGAGTTACTTsAG) を合成しました。確立した方法でフェニル型ジアジリン光反応基を導入し、光反応性核酸アプタマーを合成しました。次に、光反応性核酸アプタマーとリゾチームの複合体を形成させたのち、紫外線 (360 nm 程度) を 10 分程度照射し、複合体を固定化しました(図4)。その後、SDS サンプルバッファー中で 95°C 2 分間加熱し、タンパク質を変性させました。これらのサンプルを、変性条件下での電気泳動手法である SDS-PAGE で、タンパク質-核酸アプタマーの複合体と結合しなかった核酸アプタマーとを分離しました。分離した複合体は、メンブレンに転写したのち、ビオチンと特異的に結合するストレプトアビジン-HRP 酵素によって、複合体を可視化しました。

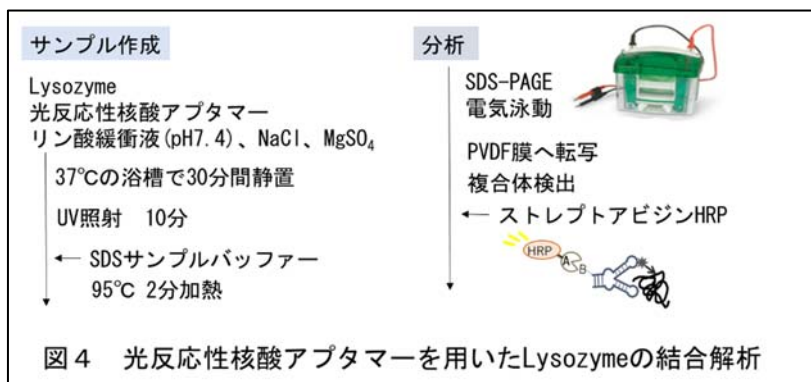


図4 光反応性核酸アプタマーを用いたLysozymeの結合解析

2種類のトロンビンに対する既報の核酸アプタマー配列を用いて、トロンビンに対する光反応性核酸アプタマーを、先に確立した方法で合成しました。15塩基の核酸アプタマー（文献3）については、チオリン酸基の位置が異なる末端にビオチンを持つ2種類を、29塩基の核酸アプタマー（文献4）については、位置の異なる3種類の核酸アプタマーを合成しました（図5）。これら5種の核酸アプタマーにフェニル型ジアジリン光反応基を導入して、光反応性核酸アプタマーを合成しました。

15B-5S	Biotin-GGTTsGGTGTGGTTGG
15B-9S	Biotin-GGTTGGTGsTGGTTGG
29B-7s	Biotin-AGTCCGsTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
29B-16S	Biotin-AGTCCGTGGTAGGGCsAGGTTGGGGTGACT
29B-28S	Biotin-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGAsCT

図5 S化位置の異なるトロンビンに対する核酸アプタマー

生体内ではトロンビンは、プロトロンビンというタンパク質からファクターXaという酵素によって切り出されて生成します。ファクターXaはプロトロンビンを2か所切断して、活性化型トロンビンを生成しますが、試験管内では1か所ずつ切断されたトロンビンを生じます（図6）。トロンビンに対する核酸アプタマー結合解析を行う対象として、生体内で起こる活性化機構を試験管で再現して得られるサイズの異なるトロンビンを対象としました。プロトロンビンを含めた3種のタンパク質を解析対象とすることで、長さの異なる2種の核酸アプタマーの結合特異性を評価しました。また、光反応基を導入した位置により、核酸アプタマーの結合特異性に变化があるかも評価しました。

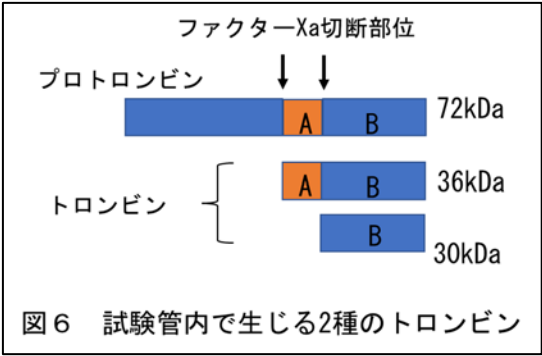


図6 試験管内で生じる2種のトロンビン

#### 4. 研究成果

アルキル型ジアジリンはフェニル型ジアジリンに比べてサイズが小さいため、修飾の影響を少なくできる利点があります。一般的な方法でヨウ素をもつアルキル型ジアジリンを合成しました。AGsCTの4塩基のDNAを用いて、フェニル型ジアジリンとアルキル型ジアジリンの光反応基の導入効率と溶液の水分%との関連を調べました（図7）。DNAと光反応基を混合し、37°Cで30分間処理した試料を、HPLCで未反応物と反応物の量を測定しました。両者とも水分%が増えると反応物が激減します。フェニル型ジアジリンでは20%程度水分があっても反応効率は変わりませんが、アルキル型ジアジリンでは反応効率は大幅に減少していました。フェニル型ジアジリンを用いて光反応性核酸アプタマーを合成することにしました。

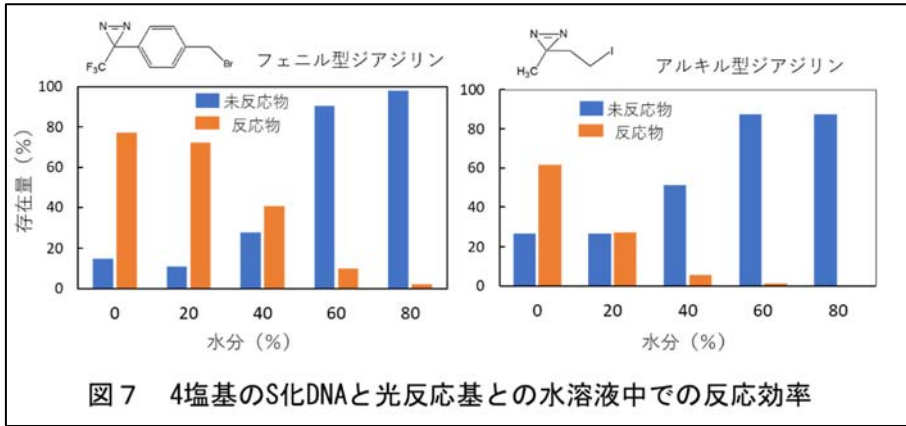


図7 4塩基のS化DNAと光反応基との水溶液中での反応効率

30塩基のリゾチームに対する核酸アプタマーに光反応基を導入するため、末端にビオチンをもつS化DNAを合成しました。DNAを水で溶解し、20%以下になるように有機溶媒であるDMSOを加えました。そこに、フェニル型ジアジリンを混合し、37°Cで1時間静置したのち、反応物をHPLCで分取しました。エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して、リゾチームに対する光反応性核酸アプタマーを得

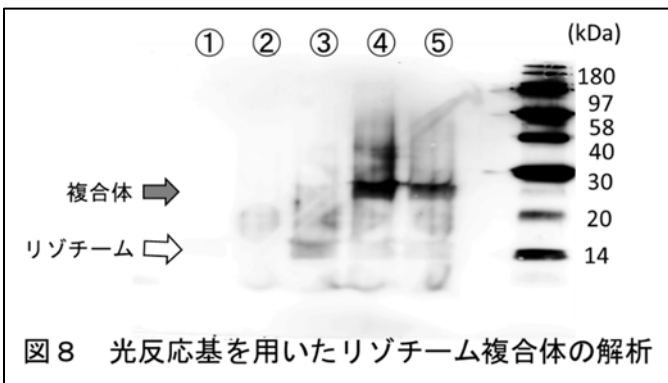


図8 光反応基を用いたリゾチーム複合体の解析

ることに成功しました。光反応性核酸アプタマーとリゾチームとを混合し、複合体を形成させた後、紫外線を照射したサンプルを、SDS-PAGE で分離しました。それらをメンブレンに転写し、ストレプトアビジン-HRP で処理した後、化学発光試薬で複合体を可視化しました (図 8)。①はリゾチームのみ、②は光反応性核酸アプタマーのみ、③は両者を混合したもの、④は混合した後に紫外線を 10 分照射したもの、⑤は紫外線を 30 分照射したものです。複合体はリゾチームと核酸アプタマーの分子量の和の位置に、紫外線を照射した試料 (④と⑤) のみで検出されています。核酸アプタマーの結合をウエスタンブロットのように可視化することに成功しました。また SDS-PAGE で分離することで複合体の分子量を知ることができました。しかしながら、リゾチームが卵白由来であるため、それ自体にストレプトアビジンに結合性があること、等電点が塩基性であるためメンブレンへの転写が困難であることから、別の核酸アプタマーで研究を続けることとしました。

血液凝固に関わるトロンビンに対する 15 塩基の核酸アプタマーは、世界で初めて単離された一本鎖 DNA アプタマーです。5 番目を S 化したアプタマーを用いて、末端にビオチンを持つ光反応性核酸アプタマーを合成しました。先に確立した SDS-PAGE と化学発光を用いた結合解析法を用いて、複合体形成における紫外線照射時間との関係を解析しました (図 9)。その結果、10 分程度で複合体の形成は最大となることが明らかになりました。29 塩基の核酸アプタマーについても同様の結果を得ることができました。

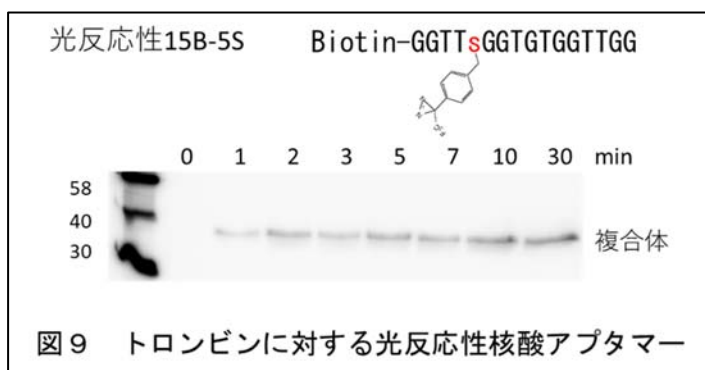


図 9 トロンビンに対する光反応性核酸アプタマー

プロトロンビンをファクターXa で切断した様子を CBB 染色で観察しました。37°C でプロトロンビンはすぐさま切断され、10 分後には A+B に相当するトロンビンが、30 分後には B のみのトロンビンが生成されました (図 10 上)。(B よりも下に出ているバンドはファクターXa 由来のものと考えられます。) これら処理時間の異なるサンプルと光反応性核酸アプタマーを混合し、氷温で紫外線を照射しました。SDS-PAGE で分離後、化学発光により、プロトロンビン、A+B、B の 3 種類のタンパク質との複合体を可視化しました (図 10 下)。15 塩基の光反応性核酸アプタマーを用いた場合、3 種類のタンパク質で複合体形成が観察できました。29 塩基の光反応性アプタマーでは、15 塩基に比べて、B をより強く認識することが明らかになりました。また、光反応基を導入する位置により、結合特異性が変化する場合があることがわかりました。

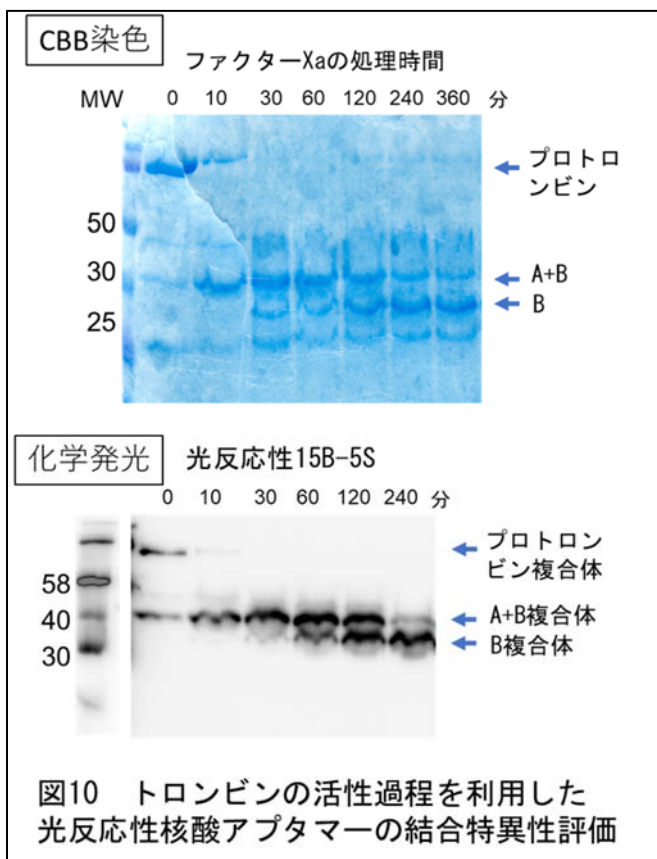


図10 トロンビンの活性過程を利用した光反応性核酸アプタマーの結合特異性評価

光化学的技術と変性条件下での電気泳動法とを組合せることにより、核酸アプタマーの結合特異性を一括して評価できるようになりました。本研究の成果である複数同時結合解析法の開発により、核酸アプタマーの開発を推進する基礎的技術が構築できたとと言えます。

#### 文献

- 1 Sadakane, Y; Hatanaka, Y *Anal. Biochem.* **2016**, 506, 1-7.
- 2 Cox, J. C.; Ellington, A. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2525-2531.
- 3 Bock, L. C. et al *Nature* **1992**, 355, 564-566.
- 4 Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. *J. Mol. Biol.* **1997**, 272, 688-698.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠井美月、伊藤優花、平井千尋、森本正大、定金 豊
2. 発表標題 トロンピン結合性核酸アプタマーの光化学的手法を用いた結合特異性評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（北海道）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 定金 豊、伊藤優花、平井千尋、森本正大
2. 発表標題 光反応性核酸アプタマーの作製と結合特異性評価法の構築
3. 学会等名 バイオメディカル分析科学シンポジウム2022（千葉）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定金 豊、笠井美月、伊藤優花、平井千尋、森本正大
2. 発表標題 トロンピン結合性核酸アプタマーの光化学的結合性評価
3. 学会等名 第45回日本光医学光生物学会（島根）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 定金 豊、坪倉朱里、笠井美月、伊藤優花、平井千尋、森本正大
2. 発表標題 光反応基を導入したDNAアプタマーの分析面での評価
3. 学会等名 バイオメディカル分析科学シンポジウム2023（北海道）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笠井美月、伊藤優花、平井千尋、森本正大、定金 豊
2. 発表標題 トロンピン結合性核酸アプタマーの光化学的手法を用いた結合特異性評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本 正大、杉野 奈央、山口 愛未、定金 豊
2. 発表標題 生体内異性化アミノ酸残基を同定する新規ラベル化法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定金 豊、伊藤優花、平井千尋、森本正大
2. 発表標題 光反応性核酸アプタマーの作製と結合特異性評価法の構築
3. 学会等名 バイオメディカル分析科学シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定金 豊、伊藤優花、平井千尋、森本正大
2. 発表標題 光反応性核酸アプタマーによるアプタマー結合特異性の評価
3. 学会等名 第44回日本光医学光生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤優花、平井千尋、森本正大、定金 豊
2. 発表標題 光反応性核酸アプタマーの作製とその分析化学的応用
3. 学会等名 第142年会 日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定金 豊、伊藤優花、平井千尋、森本正大
2. 発表標題 光反応性核酸アプタマーによるアプタマー結合特異性の評価
3. 学会等名 第44回 光医学光生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平井 千尋、森本 正大、定金 豊
2. 発表標題 変性条件下での結合解析を可能とする光反応性核酸アプタマーの作製法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	森本 正大  (Morimoto Shoto)  (90824772)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教   (34104)	

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
---------	---------