

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350962

研究課題名(和文)キセノ核酸スイッチ分子の創製

研究課題名(英文)Creation of xenonucleic acid switch molecules

研究代表者

桑原 正靖 (Kawahara, Masayasu)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：40334130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：外部刺激や環境に応じて、結合活性が変化する核酸アプタマーをベースとしたスイッチ分子は、薬物送達システムやバイオセンサーなどへの応用が期待される。本研究では、外部刺激や環境による架橋型ヌクレオチドの化学変換をトリガーとするキセノ核酸スイッチ分子の創製を検討した。その結果、5末端から数えて9番目と15番目のシトシンを塩基とする架橋型ヌクレオチドを天然型の2'-デオキシシチジンに置き換えたアプタマーは全く結合活性を示さないものの、それらを2'-デオキシ-5-メチルシチジンに置換したものは高い結合活性が見出されたことから、開発したスイッチ分子をシトシンのメチル化の検出系に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Switch molecules based on nucleic acid aptamers which can vary their binding activities depending on external stimuli and surroundings are expected to be applicable to drug delivery systems and biosensors. In this study, we attempted to create xenonucleic acid switch molecules, which are triggered by chemical conversions of bridged nucleotides owing to external stimuli and surroundings. Consequently, we found that replacements of bridged nucleotides bearing cytosine base with natural 2'-deoxycytidine at 9th and 15th positions could inactivate the avidity of the aptamer, whereas those with 2'-deoxy-5-methylcytidine retained the binding activity, indicating that the obtained switch molecule will potentially be applicable to detection systems for cytosine methylations.

研究分野：核酸化学

キーワード：キセノ核酸 核酸アプタマー スwitch分子 刺激応答性 環境応答性

1. 研究開始当初の背景

今世紀初頭に米国の R. Breaker らによってリボスイッチが細菌で発見された。リボスイッチは RNA 分子であり、ピロリン酸チアミンやフラビンモノヌクレオチドなどの代謝物がそのアプタマー部位に結合・解離することによって、遺伝子発現の ON/OFF 制御を行う機能を有している(図 1)。近年、核酸アプタマーを利用することで、この生物機能を模倣した人工リボスイッチの開発が国内外で精力的に行われている。しかし、その多くは天然型の DNA および RNA アプタマーをベースとしたものであり、ヌクレアーゼ(核酸分解酵素)耐性に優れたキセノ核酸をベースとしたスイッチ分子の開発例は、これまでに殆どない。ヌクレアーゼ耐性は、核酸スイッチ分子を生体中および生体由来サンプル中で実用する場合、要求される最も重要なパフォーマンスのひとつである。

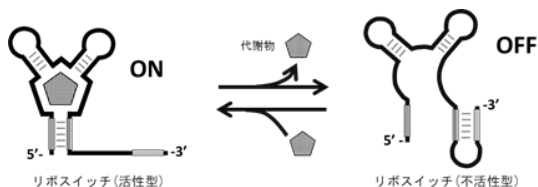


図 1 遺伝子発現を ON/OFF 制御するリボスイッチ

本研究の特色としては、独自開発した化学修飾ヌクレオチドや人工核酸アプタマーのスクリーニング技術を用いる点などが挙げられる。また、機能拡張性や生体内安定性などにおいて、キセノ核酸は天然型の核酸に比べ遥かに高いポテンシャルを有する。従って、キセノ核酸をベースとしたスイッチ分子は、インテリジェント分子として医薬品開発やナノテク・材料開発など幅広い用途への応用が期待される。

2. 研究の目的

外部刺激や環境に応じて、結合活性が変化する核酸アプタマーをベースとしたスイッチ分子は、薬物送達システム(DDS: drug delivery system)やバイオセンサー、分子デバイスなどへの応用が期待される。これまでの研究で、キセノ核酸である架橋型ヌクレオチド(BNA/LNA)を含むトロンビン結合性人工核酸アプタマーの創製に成功した。そこで本研究では、得られた人工核酸アプタマーを改変設計することによって、外部刺激や環境による架橋型ヌクレオチドの化学変換をトリガーとするキセノ核酸スイッチ分子の創製を検討する。

3. 研究の方法

これまでの研究で、天然型 DNA ライブラリおよび架橋型ヌクレオチドを含むライブラリなど 4 種類のライブラリ(A~D)を利用したセレクション系を独自に構築し、キャピラリー電気泳動を用いた方法(CE-SELEX:

capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment)によってトロンビン結合性核酸アプタマーの取得を検討した。その結果、ライブラリ D から人工核酸アプタマー(D#6)を得た。興味深いことに、D#6 は非常に高い結合親和性($K_d=0.26$ nM)やヌクレアーゼ耐性(血清中半減期: 10.5 時間)を示すだけでなく、「プライマー領域の架橋型ヌクレオチド(Ab, Gb, Cb, Tb)を天然型デオキシリボヌクレオチド(A, G, C, T)に置換すると結合活性を完全に失う」というユニークな結合特性をもつことを見出した(図 2)。このような BNA/LNA 依存的結合活性をもつアプタマーは、他のライブラリ A, B, C からは得られなかった。

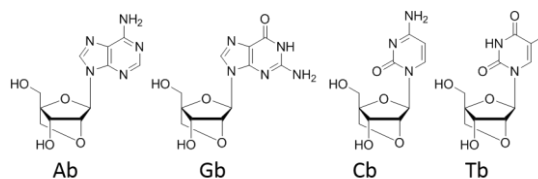


図 2 架橋型ヌクレオチドの化学構造

そこで本研究では、導入した塩基および糖修飾が共同的に作用することによって絶妙に構造安定性が保たれている D#6 のヘアピン・ループ(前駆体)に着眼し、この部位を活性制御モジュールに造り替え、CE-SELEX に応用することでキセノ核酸スイッチ分子を創製することを検討した。

4. 研究成果

キセノ核酸である架橋型ヌクレオチド(BNA/LNA)を含むトロンビン結合性人工核酸アプタマーを改変設計することによって、外部刺激や環境による架橋型ヌクレオチドの化学変換をトリガーとするキセノ核酸スイッチ分子の創製を検討した。まず、ヘアピン・ループの改変設計: 天然型ヌクレオチドへの置換を行った。既知の機能ドメインにおいて 5'末端から 3, 6, 9, 12, 15, 18 番目に位置する 6 つの架橋型ヌクレオチドを、ひとつずつ天然型ヌクレオチドに置換したプライマーを化学合成した。合成したそれらのプライマーおよび修飾チミジン三リン酸($T^{md}TP$), dGTP, dCTP, dATP を用いたポリメラーゼ反応により、D#6 の改変体群を酵素的に合成し、それらの結合活性を非平衡キャピラリー電気泳動(NECEEM: nonequilibrium capillary electro-phoresis of equilibrium mixtures)法によって測定した(図 3)。その結果、6 位もしくは 15 位を架橋型から天然型に置換すると著し

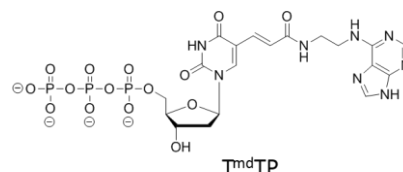


図 3 架橋型ヌクレオチドの化学構造

く結合活性が損なわれることが分かった。架橋型ヌクレオチドは糖のリボース環のバックリングによる構造的揺らぎを抑えることで二重鎖核酸を著しく安定化することが知られている。故に、6位もしくは15位、もしくはその両方を反応性架橋型ヌクレオチドに置換したモジュールを設計し、活性制御モジュールのライブラリを構築した。

続いて、非平衡キャピラリー電気泳動(NECEEM)法を用いたキャピラリー電気泳動法セレクション(CE-SELEX)法により、血管内皮細胞成長因子(VEGF)を標的として、3つの異なるライブラリ(1種類の天然型DNA, 2種類の修飾チミジンを含む人工核酸ライブラリ)から、それぞれVEGF結合性アプタマーを得た。NECEEM法を用いた結合活性評価では、 K_d 値がサブナノモラーの強い結合親和性を示すものが、人工核酸ライブラリから選択されたアプタマーに複数見出された。これら結果は、結合親和性に対する修飾基導入の優位性を示唆している。さらに、ライブラリの鎖長についても新たに検証した。CE-SELEXでは、キャピラリー電気泳動による分離能(鎖長が長くなればなるほど、NECEEMによる活性種と不活性種のピークは近接し分離が困難になる)のために、70mer程度のオリゴDNAが用いられてきたが、条件を最適化することにより、100merのアプタマーを同法にて取得することに成功した(図4)。

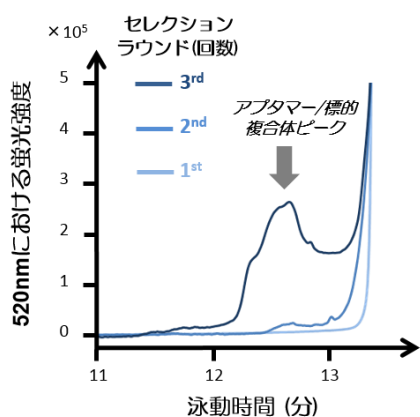


図4 CE-SELEX法によるアプタマーの取得

さらに、構築し最適化した人工核酸ライブラリや長鎖DNAライブラリ(100mer)を用いた非平衡キャピラリー電気泳動(NECEEM)法を用いたキャピラリー電気泳動法セレクション(CE-SELEX)法を基に、活性モジュールを装備したスイッチアプタマー分子を作製しそれらの特性を検討した。3残基の(E)-5-(2-カルボキシビニル)-2'-デオキシウリジン(図3)を含む11種類の改変体をポリメラーゼ反応によりそれぞれ酵素的に合成し、それらの標的トロンビンに対する結合親和性をNECEEM法により検討したところ、標的結合活性を保持しているものについては、解離定数(K_d)は概ね0.2から5ナノモラーであった。プロト型の配列にはLNAヌクレオチド

が、6箇所(3, 6, 9, 12, 15および18位)含まれるが、それらを全て天然型ヌクレオチドに置換したものは標的結合活性を示さない。興味深いことに、9位と15位のシトシンを塩基とするLNAヌクレオチドを天然型の2'-デオキシチジンに置き換えたものは全く結合活性を示さないものの、それら2残基を2'-デオキシ-5-メチルチジンに置換したものは、4ナノモラーを示すことを新たに見出すことに成功した。これにより、当該スイッチアプタマーによるシトシンのメチル化の検出系の構築可能性が示唆された(図5)。

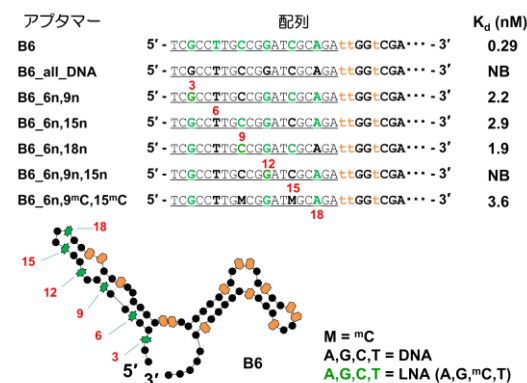


図5 スwitchアプタマー分子の結合特性

5. 主な発表論文等

(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8件)

- Hagiwara K, Fujita H, Kasahara Y, Irisawa Y, Obika S, Kuwahara M*. In vitro selection of DNA-based aptamers that exhibit RNA-like conformations using a chimeric oligonucleotide library that contains two different xeno-nucleic acids. *Mol. Biosyst.* 11: 71-76 (2015). 査読有
- Fujita H, Nakajima K, Kasahara Y, Ozaki H, Kuwahara M*. Polymerase-mediated high-density incorporation of amphiphilic functionalities into DNA: enhancement of nuclease resistance and stability in human serum. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25: 333-336 (2015). 査読有
- 栗原正靖, 萩原健太, 入澤祐太, 笠原勇矢, キャピラリー電気泳動法を用いた修飾核酸アプタマーのセレクション, *電気泳動* (日本電気泳動学会), 59, 88-90 (2015). 査読有
- Kataoka Y, Fujita H, Kasahara Y, Yoshihara T, Tobita S, Kuwahara M*. Minimal thioflavin T modifications improve visual discrimination of guanine-quadruplex topologies and alter compound-induced topological structures. *Anal. Chem.* 86: 12078-12084 (2014). 査読有

- ⑤ Kasahara Y, Irisawa Y, Fujita H, Yahara A, Ozaki H, Obika S, Kuwahara M*. Capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment selection of base- and sugar-modified DNA aptamers: target binding dominated by 2'-O,4'-C-methylene-bridged/locked nucleic acid primer. *Anal. Chem.* 85: 4961–4967 (2013). 査読有
- ⑥ Imaizumi Y, Kasahara Y, Fujita H, Kitadume S, Ozaki H, Endoh T, Kuwahara M*, Sugimoto N. Efficacy of base-modification on target binding of small molecule DNA aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 9412–9419 (2013). 査読有
- ⑦ Kuwahara M*, Obika S. In vitro selection of BNA (LNA) aptamers. *Artif DNA PNA XNA*, 4: 39–48 (2013). 査読有
- ⑧ Fujita H, Imaizumi Y, Kasahara Y, Kitadume S, Ozaki H, Kuwahara M*, Sugimoto N. Structural and affinity analyses of G-quadruplex DNA aptamers for camptothecin derivatives. *Pharmaceuticals* 6: 1082–1093 (2013). 査読有

[学会発表] (計 33 件)

- ① Kuwahara M, “Application of unnatural nucleic acids and non-canonical nucleic acid structures towards drug discovery and bioanalysis”, Pacificchem 2015/ Functional Nucleic Acids: Chemistry, Biology, and Materials Applications (#10) (Hawaii, USA), ACS/CSC/CSJ/NZIC etc., 19 December 2015.
- ② Fujita H, Kataoka Y, Kuwahara M, Isothermal and visual RNA detection system using enzymatic signal amplification and specific emission of thioflavin-T analog, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Hawaii, USA, 18 December (2015).
- ③ Kataoka Y, Fujita H, Kuwahara M, Thioflavin T analogs as G-quadruplex indicators and their applications to bioanalysis, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Hawaii, USA, 17 December (2015).
- ④ Kuwahara M, “Capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment selection using modified nucleic acid libraries”, Pacificchem 2015/ New Tools and Methodologies for the Characterization of Biomolecular Interactions (#15) (Hawaii, USA), ACS/CSC/CSJ/NZIC etc., 15 December 2015.
- ⑤ Kuwahara M, “Xeno-nucleic acid aptamers” (keynote lecture), The 1st International Symposium on Functional Nucleic Acids: From Laboratory to Targeted Molecular Therapy (Perth, Australia), The Organizing Committee of FNA 2015, 27 November 2015.
- ⑥ Kuwahara M, Fujita H, Kataoka Y, Tobita S, RNA detection method using a thioflavin T analog, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2015 (ISNAC2015), Hyogo, Japan, 25 September (2015).
- ⑦ Kuwahara M, “Syntheses and properties of novel thioflavin T analog”, Asia 3 Roundtable on Nucleic Acids 2015 (Suwon, Korea), The Organizing Committee of A3RONA 2015, 20 September 2015.
- ⑧ Kataoka Y, Fujita H, Kasahara Y, Yoshihara T, Tobita S, Kuwahara M, Synthesis and binding analysis of thioflavin T analogs targeting G-quadruplex, 3rd Asian Chemical Biology Conference (ACBC3), Singapore, 16 December (2014).
- ⑨ Honda N, Hagiwara K, Kasahara Y, Kuwahara M, Modified DNA aptamers that bind to vascular endothelial growth factors, 3rd Asian Chemical Biology Conference (ACBC3), Singapore, 16 December (2014).
- ⑩ Kasahara Y, Honda N, Hagiwara K, Kuwahara M, Selection of DNA aptamers with base modifications using a capillary electrophoresis-based method, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2014 (ISNAC2014), Fukuoka, Japan, 5 November (2014).
- ⑪ Hagiwara K, Kasahara Y, Irisawa Y, Kuwahara M, DNA aptamers containing 2'-deoxy-2'-fluoroguanosine, XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRT2014), Poznań, Poland, 25-26 August (2014).
- ⑫ Kasahara Y, Watanabe Y, Kuwahara M, Modified DNA aptamer-based separation of small molecules by capillary electrophoresis, XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRT2014), Poznań, Poland, 25-26 August (2014).
- ⑬ Kasahara Y, Irisawa Y, Honda N, Morihiro K, Obika S, Kuwahara M, Switch molecules designed from 2',4'-BNA aptamers, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2013 (ISNAC2013), Yokohama, Japan, 14 November (2013).
- ⑭ Fujita H, Imaizumi Y, Kasahara Y, Ozaki H, Kuwahara M, Effects of tail strands on the binding activity of G-quadruplex DNA aptamers for small molecules, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2013 (ISNAC2013), Yokohama, Japan, 13 November (2013).
- ⑮ Kasahara Y, Irisawa Y, Honda N, Obika S, Kuwahara M, CE-SELEX of chimeric DNA-based aptamers, Frontiers of Single Cell Analysis Conference, California, USA, 6 September (2013).
- ⑯ Fujita H, Imaizumi Y, Kasahara Y, Ozaki H, Kuwahara M, Nucleic acid aptamers for small

molecules, Frontiers of Single Cell Analysis Conference, California, USA, 6 September (2013).
他 17 件

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kuwahara M. Progress in chemically modified nucleic acid aptamers. In: Volker A. Erdmann, Wojciech T. Markiewicz, Jan Barciszewski, editors. Chemical biology of nucleic acids: RNA technologies. Springer, Heidelberg: 243–270 (2014).

〔その他〕

ホームページ等

<http://clab.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 正靖 (KUWAHARA, Masayasu)
群馬大学大学院理工学府・准教授
研究者番号：40334130

(2) 連携研究者

小比賀 聡 (OBIKA, Satoshi)
大阪大学大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80243252