

令和元年6月14日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05808

研究課題名(和文) 高い細胞認識能を有するDNAアプタマーの高速な電気泳動選抜法の開発

研究課題名(英文) Rapid selection of DNA aptamers recognizing cell surface using 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分子内結合により様々な立体構造を形成し様々な生体高分子を認識するDNAアプタマーは生体認識分子として医療診断、創薬など生物学での利用が期待されている。細胞を認識するDNAアプタマー獲得の既存法(Cell-SELEX)は非常に複雑な操作が必要でアプタマー選抜には1～数ヶ月かかる。そこで本研究ではキャピラリー電気泳動法を基盤として、細胞(粒子系)とDNA(分子系)の高度な濃縮-分離-分取法を構築することで、動物および細菌細胞に対して高いアフィニティーを有するDNAアプタマーを一週間以内で獲得できる新規選抜法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により細胞を認識するDNAアプタマーが既存法よりも簡便・高速に得られるようになった。特に本方法は、解離反応速度の小さい高親和性アプタマーの獲得を指向した珍しい選抜法であり、既存法とは異なる種類のアプタマーの獲得が期待でき、この様に簡便に細胞を認識可能な分子を得ることによりDNAアプタマー創薬、臨床診断の分野だけでなく(細胞表面での)分子認識化学や細胞操作の学問分野を加速するためのキーテクノロジーとなりうると考えている。

研究成果の概要(英文)：A novel single-round DNA aptamer selection method for mammalian and microbial cells was successfully developed by means of a capillary electrophoresis (CE)-based methodology, called polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis (PectI). The PectI separation yielded a single peak for the cells (particles) complexed with DNA aptamer candidates, which was effectively separated from a free randomized DNA library (molecules) peak. The cell peak including DNA aptamer sequences was fractionated by two-point detection CE system, then the fraction collected was served for next generation sequencing analysis. The sequences obtained by the PectI selection were subjected to binding assays, to prove those are cell-binding DNA aptamers.

研究分野：分析化学

キーワード：DNAアプタマー 選抜 キャピラリー電気泳動 細胞認識

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一本鎖 DNA は分子内結合により様々な立体構造を形成することでタンパク質や糖鎖などの様々な生体高分子を認識する。これを DNA アプタマーと呼ぶ。近年、DNA アプタマーは、抗体に代わる生体認識分子として医療診断、創薬など生物工学での利用が期待されている。DNA アプタマーは進化工学的な手法 (SELEX 法: Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) で得られる。細胞をターゲットとした場合には Cell-SELEX 法と呼ばれ、現時点では細胞表面を認識する DNA アプタマーを得るための唯一の手段である。Cell-SELEX 法は、以下の工程を繰り返すことで、細胞認識能を持つ DNA を濃縮 (選抜) する手法である。PCR 増幅に必要なプライマー領域に挟まれたランダムな配列を有する DNA の集合体 (ランダム DNA ライブラリー: 市販で入手可能) をターゲット細胞試料と混合する。このとき A, G, C, T の 4 種の核酸が N 個配列したランダム領域は理論上 4^N パターン存在する。通常は $N = 30 \sim 50$ 、すなわち 10^{27} パターン以上もの巨大なライブラリー (プール) となる。このプールの中で特異な立体構造を取る DNA 分子のうち、全体の 0.01% にも満たない極微量な DNA がターゲット細胞と結合する。この混合物から細胞に結合した DNA を含むターゲット細胞を遠心分離やフィルタリングなどで分離・回収する ()。回収した DNA を前述のプライマー領域を用いて PCR 増幅する。この時点では DNA アプタマーは極微量だが、これを新たなプールとして ~ の工程を繰り返すこと (ラウンド) で、アプタマーを徐々に濃縮する。最終的に得られた DNA 群の配列決定を行い、それぞれの配列の細胞に対する結合能を評価する。

この Cell-SELEX の問題点は、非常に複雑な操作で 10~30 回以上ものラウンドを必要とし、選抜には 1~数ヶ月かかることである。さらに、得られた DNA 配列のターゲット細胞に対するアフィニティーは低いことも多く、確率論的要素を排除できない。これら欠点は、細胞に結合した DNA の分離・回収工程における効率の低さとラウンドの多さに起因している。分離効率が低い従来法では、分取溶液への非結合型 DNA の多量の混入が避けられず、回収物中では超微量なアプタマーに対し、非結合型 DNA の割合がほぼ 100% となる。そこで、多数回のラウンドによる濃縮が必要となるが、4 回以上の PCR 増幅を繰り返すと、得られる配列に偏りが生じることが近年判明している。つまり、ラウンドを繰り返すと高アフィニティーのアプタマーが得られなくなる場合がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、キャピラリー電気泳動法を基盤として、細胞 (粒子系) と DNA (分子系) の高度な濃縮-分離-分取を達成することで、動物細胞・細菌・ウイルスに対して高いアフィニティーを有する DNA アプタマーを数日~一週間以内で確実に獲得できる新規方法論を確立することである。すなわち、細菌-DNA 複合体 (粒子系) および非結合型 DNA (分子系) をそれぞれの単一ピークとして CE で濃縮-高分離し、アプタマーの含まれる細菌-DNA 複合体ピークだけを精密に分取する技術を確立する。この時、DNA プールのピークから 6.5σ 以上離れた分離を達成できれば、理論上一分子の DNA プールからの混入もない (DNA ピークをガウス分布と仮定した時の標準偏差を σ 、DNA プールの分子数 10^{12} 個とした場合)。よって、従来法の問題点であった非結合型 DNA の混入を極限まで抑制でき、一度の選抜工程でアプタマーが獲得できると考えた。さらに、電気泳動のタイムスケールで細胞に結合し続けた DNA だけを回収するため、泳動中に解離する低アフィニティーの DNA は排除し、解離反応不活性な高アフィニティーのアプタマーだけを回収することが出来ると考えた。

3. 研究の方法

従来、CE 法における細菌細胞類の分離はピーク再現性が非常に低かったが、Saito らは近年、高い再現性で細菌種毎に単一ピークを得る濃縮-分離法の開発に成功している (Polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis (PectI 法), S. Saito et al., *Anal. Chem.*, 84, 2454 (2012))。さらに、この PectI 法を用いて大腸菌 (グラム陰性細菌) に対する DNA アプタマーの選抜を行い、実際に大腸菌と DNA プールをそれぞれ単一の鋭いピークに濃縮-分離し、複合体分画を回収-PCR 増幅して、一桁 nM の解離定数の高アフィニティーな DNA アプタマーを 1 ラウンドの選抜操作で高速に獲得することに成功している (S. Saito et al., *Chem. Commun.* 52, 461-464 (2016); 特願 2015-51714 号)。この選抜は数時間で終了し、配列決定・結合実験も含め一週間程度で済む。

本研究では CE を用いる細胞に対する DNA アプタマー選抜法を以下の三点へと展開し、新規選抜法としての確立を試みた。すなわち、1. がん細胞などの動物細胞に対する PectI 選抜法の確立、2. 細胞膜上のターゲット分子に特異的なアプタマーが選抜可能かの検証、3. 配列情報からアプタマーの判別法の開発である。

4. 研究成果

ヒト非小細胞肺癌細胞株 PC-9 をモデル細胞として、電気泳動条件を探索した。試行錯誤の結果、細胞が浸透圧で変形、破碎せず、生細胞率の高い条件として 20 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 290 mM グルコース, 0.0125 wt% PEO600000 を設定した。ただし、泳動時には 400 Vcm⁻¹ の高電場を印加するため、泳動初期で細胞は死滅してしまうことが分か

った。一方、アプタマー選抜という意味では細胞表面に結合した DNA と非結合型 DNA が高分離できれば生細胞率は問題ではないため、上記の泳動条件で分離することとした。

本研究では上記 PectI 法を動物細胞に使用するにあたり、2 種類の由来の異なる細胞間で高選択性を有する DNA アプタマーを選抜するために、簡易なカウンター選抜法を PectI 選抜法の前段に組み込むこととした。カウンター選抜とは、ターゲット細胞とは異なる細胞（コントロール細胞）を用い、これに結合しない DNA を回収する選抜法である。従来は、選択性を有する DNA アプタマーを獲得するためにはカウンター選抜を SELEX 法に複数回組み込んでいたが、これが選抜操作を煩雑にしていた。そこで、カウンター選抜に用いる DNA および細胞濃度を細胞の DNA 結合サイト数から見積もることでカウンター選抜を一度で完了し、かつ PCR 増幅工程を挟まず PectI 選抜法に接続することを着想した。

ヒト非小細胞肺癌細胞株 PC-9 をターゲット動物細胞、白血病細胞株 HL-60 をコントロール細胞として DNA アプタマーの PectI 選抜に適用し、選抜した DNA プールに関して次世代シーケンサーによる配列決定・多重整列プログラム MAFFT での解析を行ったところ、全配列のうち 10% が類似配列群（ファミリー）の形成に参与しており、選抜操作によりアプタマー配列の濃縮が行われたことが示された。ファミリーを形成した配列群に対して結合実験を行い、PC-9 細胞に特異的な DNA アプタマー（解離平衡定数：70 ~ 630 nM）が選抜できることを実証した。以上の結果から、カウンター選抜-PectI 選抜法によって細胞間の表面構造の差異を認識する DNA アプタマーの高速かつ簡易な選抜法の開発に成功した。

ここで、次世代シーケンシングによって得られる配列情報からアプタマー配列を識別する手法を考案した。ランダム領域を 25 塩基と比較的短いものをライブラリーとした時のある配列の類似配列（ファミリー）に着目をした。ファミリー配列の性能は類似していれば、選抜後の配列データの中でアプタマー配列だけファミリーを構成するため、その配列の数の大小でアプタマー配列を判別可能と考えた。この手法であれば、従来法と比べてアプタマー配列の取り逃しがなく、網羅的なアプタマー獲得可能となると考えた。実際には PC-9 細胞に対してカウンター選抜を行わず一回の PectI 選抜を行った DNA プールの NGS 解析を行い、得られた配列データ（67720 配列）について、ペアワイズ分類アライメントを実行した。グローバルアライメント解析により、一致率 84 % 以上のものをファミリーとしてクラスタリングを行ったところ、ファミリー形成が観測され、配列数 3~7 で構成されるファミリー 118 種類を得ることに成功した。これらのファミリーから配列数 7 で構成されるファミリー配列 Apt1 をアプタマー候補配列とし結合実験を行ったところ、 $K_d = 161 \pm 29$ nM のアプタマーであることが判明した。また、単独で存在していた配列は結合能を示さなかったことから、今後より詳細な解析を必要とするものの、ファミリー形成を判断基準として細胞結合型アプタマーを判別が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tomoko Haraga, Shingo Saito et al., "Safe and rapid development of capillary electrophoresis for ultratrace uranyl ions in radioactive samples from nuclear power facilities by way of fluorescent probe selection for actinide ions from a chemical library," *Anal. Chim. Acta*, 1032, 188-196 (2018). 査読有り。

Kazuki Hirose, Shingo Saito et al., "A single-round selection of selective DNA aptamers for mammalian cells by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis," *Analyst*, 142(21), 4030-4038 (2017). 査読有り。

齋藤伸吾, "キャピラリー電気泳動法を用いる細菌細胞を認識する DNA アプタマーの高速選抜システム", 化学工業, Vol. 67, No. 7, 29-36 (2016). 査読無し。

〔学会発表〕(計 20 件)

2019 年 3 月 19 日, 日本化学会 第 99 春季年会 (甲南大 岡本キャンパス)

齋藤伸吾 「アプタマーペアの電気泳動選抜と高性能多価アプタマーの開発」

2018 年 12 月 5-7 日, キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2018) (I-site なんば)

坂本寿樹, 渋川雅美, 齋藤伸吾 「立体構造の異なるランダム DNA ライブラリーを用いる機能別アプタマー選抜」

2018 年 12 月 5-7 日, キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2018) (I-site なんば)

齋藤伸吾 「トロンピン結合型 DNA アプタマーの 1 ラウンド CE 選抜」

2018 年 11 月 17 日, 日本化学会中国四国支部大会 (愛媛大城北キャンパス, 松山市)

吉村健, 矢野湧暉, 矢野雄暉, 小川敦司, 前田瑞夫, 古性均, 齋藤伸吾, 吉本敬太郎, 座古保 「アプタマー修飾金ナノ粒子を用いたトロンピン検出におけるアプタマー配列の検討」

2018 年 11 月 2 日, 日本分析化学会中部支部岐阜地区講演会 (岐阜薬科大, 岐阜市)

齋藤伸吾 「キャピラリー電気泳動を用いる DNA アプタマー選抜と機能判別」

2018 年 9 月 13 日, 日本分析化学会第 67 年会 (東北大学川内北キャンパス)

齋藤伸吾, 吉本敬太郎 「DNA アプタマーペアの電気泳動的選抜と高機能多価アプタマーの合理的設計」

2018 年 9 月 13 日, 日本分析化学会第 67 年会 (東北大学川内北キャンパス)

吉本敬太郎, 齋藤伸吾「DNA アプタマー選抜における分離・洗浄工程の重要性: 微粒子導入型キャピラリー電気泳動の導入効果」

2018年8月31日, 25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2018) (京都大学桂キャンパス)

Shingo Saito, "Polymer-Enhanced Capillary Transient Isotachopheresis Selection for DNA Aptamers Targeting Cell Surface"

2018年3月21日, 日本化学会第98春季年会 (日本大学理工学部 船橋キャンパス)

Saori Miyauchi, Shingo Saito et al., "Selection of Aptamer Pairs for Development of High-Affinity Bivalent DNA Aptamers Using Capillary Electrophoresis"

2017年11月29日, 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2017) (東北大学青葉山キャンパス)

朝倉妃奈子, 齋藤伸吾 他「ヒト非小細胞肺癌株 PC-9 を認識するポロン酸を導入した DNA アプタマーの CE 選抜」

2017年11月28日, 第37回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2017) (東北大学青葉山キャンパス)

宮内さおり, 齋藤伸吾 他「CE を用いるトロンピン-DNA アプタマー三元錯体の平衡解析」

2017年11月18日, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2017) (東京理科大学葛飾キャンパス)

Hinako Asakura, Shingo Saito et al., "A single-round selection of DNA aptamers selective towards microbial and mammalian cells by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis"

2017年10月18日, 第7回CSJ化学フェスタ2017 (東京都タワーホール船堀)

上村拓也, 齋藤伸吾, 渋川雅美「キャピラリー過渡的等速電気泳動を用いるトロンピン結合型 DNA アプタマーの1ラウンド選抜」

2017年9月11日, 日本分析化学会第66年会 (東京理科大学葛飾キャンパス)

齋藤伸吾「新しい分子系の発見のための電気泳動的アプローチ」

2016年11月9日, 第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム (徳島大学)

土田真帆, 齋藤伸吾 他「高分子増強過渡的等速電気泳動法を用いるヒト非小細胞肺癌株 PC-9 結合型 DNA アプタマーの選抜」

2016年9月27-29日, 第43回国際核酸化学シンポジウム (The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, ISNAC 2016) (熊本大学)

Koji Wakui, Shingo Saito et al., "In vitro selection of DNA aptamer by beads based capillary electrophoresis"

2016年8月26日, 第67回日本電気泳動学会総会 (釧路市観光国際交流センター)

齋藤伸吾「キャピラリー電気泳動法を用いる細菌および動物細胞を認識する DNA アプタマーの新規獲得法」

2016年7月1日, 日本分析化学会東日本分析若手交流会 (軽井沢町, 日本大学軽井沢研修所)

土田真帆, 齋藤伸吾, 渋川雅美「高分子増強過渡的電気泳動法を用いた酵母結合性 DNA アプタマーの高速選抜と結合特性評価」

2016年5月29日, 第76回分析化学討論会 (岐阜大学)

齋藤伸吾「細胞のキャピラリー電気泳動と DNA アプタマー選抜」

2016年5月28日, 第76回分析化学討論会 (岐阜大学)

和久井幸二, 齋藤伸吾 他「微粒子を導入した CE-SELEX と次世代シーケンサーを併用する高効率かつ迅速な核酸アプタマー選抜法の開発」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計2件)

名称: 核酸アプタマー

発明者: 吉本敬太郎, 吉富徹, 和久井幸二, 山口茜, 古庄均, 齋藤伸吾, 宮内さおり

権利者: 日産化学工業, 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-10307

出願年: 2018

国内外の別: 国内

名称: タンパク質結合型核酸アプタマーの結合部位判別およびアプタマーペアの解離平衡定数とアロステリック効果測定法 (MEASUREMENT METHOD OF EQUILIBRIUM DISSOCIATION CONSTANT AND ALLOSTERIC EFFECT)

発明者: 齋藤伸吾, 宮内さおり, 吉本敬太郎

権利者: 東京大学

種類：特許
番号：米国仮出願 62/590422
出願年：2017 年
国内外の別：国外

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：菅沼雅美
ローマ字氏名：SUGANUMA, Masami

研究協力者氏名：吉本敬太郎
ローマ字氏名：YOSHIMOTO, Keitaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。