

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19590571
研究課題名（和文）進化分子工学技術を用いたアプタマーの作製とその臨床検査法への応用

研究課題名（英文）Production of aptamer by SELEX technique and its application to diagnosis

研究代表者

荒川 秀俊 (Arakawa Hidetoshi)

昭和大学・薬学部・薬品分析化学・教授

研究者番号：70129807

研究成果の概要（和文）：アプタマーとは、SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法により得られる RNA 又は 1 本鎖 DNA で、抗体のように特定の物質に結合することができる核酸分子からできた人工核酸抗体である。アプタマーの特徴は、*in vitro* での作製が可能である、免疫寛容などの必要がない、また、アプタマーの塩基配列を一度確定できれば化学合成や酵素核酸増幅法で多量に作製することができる点にある。本研究では、(1) アプタマーを用いた新規分析法の開発、(2) 新規アプタマーの創製、(3) アプタマーを用いた臨床診断法の確立を行い、アプタマーを用いた新たな診断試薬の開発を行った。最初に、トロンビンの高感度アッセイを検出にマイクロチップ電気泳動を用いて開発した。この実験では、トロンビン 1 pmol が検出できた。次に、临床上重要なホルモンである HMG に対するアプタマーを SELEX 法により調製し、そして得られたアプタマーを用いて HMG の分析法を開発した。同様に amyloid- β peptide と oxytocin についても検討した。

研究成果の概要（英文）：Aptamers are nucleic acid ligands that recognize a wide range of target molecules with high affinity and specificity. They are generated by *in vitro* selection of a randomized oligonucleotide pool in a technique known as systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). The development of *in vitro* selection and amplification technology has allowed the identification of specific aptamers that bind target molecules with high affinity and even discriminate between closely related targets. Their binding affinities are comparable to those of antibodies and antigens. In comparison to antibodies, aptamers have the advantages of (i) simple preparation by chemical or enzymatic synthesis, (ii) thermal stability, (iii) discrimination of structural differences, (iv) ease of surface attachment for analysis, (v) ease of binding property modification through minor changes in sequence, (vi) minimization of experimental animal usage, and (viii) preparation for targets that are toxic or not inherently immunogenic. Aptamers are

suitable as analytical, diagnostic, and therapeutic tools in applications requiring molecular recognition and are consequently gaining increased attention for their potential uses.

In this study, to develop new diagnosis method, we developed sensitive and high performance aptamer binding assay using microchip electrophoresis, and prepared new aptamers for HMG (human menopausal gonadotropin), amyloid- β peptide and oxytocin. At first, an assay for Thrombin was developed using thrombin aptamer and microchip electrophoresis method, the result showed detection limit of 1 pmol. Next we prepared aptamer for HMG by SELEX, and HMG was detected by using the aptamer in a similar manner. In addition, amyloid- β peptide and oxytocin aptamers were prepared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,300,000	390,000	1,690,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では高齢化の進展と食生活の欧米化などにより生活習慣病をはじめとする疾病構造に大きな変化が生じている。また内分泌攪乱物質などの環境問題やプリオンに代表される新興感染症、さらには食品への遺伝子技術の導入などが健康に及ぼす問題として懸念されている。これらを背景として、医療や環境への関心が社会的に高まりつつあり、その結果、予防医学としての診断技術、環境汚染物質の測定、さらには遺伝子組み換え農産物や狂牛病などのスクリーニング検査等、迅速でより正確な検査が求められている。

診断や検査に用いられる方法の一つに、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイが繁用

されている。1958年、BersonとYalowらは放射性同位元素を標識物質とするラジオイムノアッセイ (RIA) を報告した。RIAは放射性核種と高い親和力の抗体を用いるため、極めて高感度な分析法である。この方法は内分泌疾患の研究をはじめ広く利用されてきたが、放射性物質に伴う被爆や廃棄の制約、使用における特別な設備の必要性など問題点があった。1977年、我々はRIAの改良法として標識物質に酵素を用い、また検出法に発光法を取り入れた化学発光酵素イムノアッセイ (Enzyme immunoassay, EIA) を開発し、現在まで多くの方法を確立してきた。化学発光EIAはRIAと同等な高い特異性と感度を有し、またドライケミストリーとしても利用できるなど多くの利点をも

つ。しかし測定に抗体を用いるため、もともと動物の体内にある物質や極めて毒性の高い物質では抗体の作製が困難で、それらを測定できないという問題点がある。このような標的物質の制限は急速に変化する病気や環境物質への対応には限界があり、現在新たな診断又は検査のための早急な分析試薬の開発が待たれている。この問題点を解決するため、本研究では新たな分析試薬の開発を目的として、高い分子認識能を示す核酸分子、アプタマーに着目した。

2. 研究の目的

アプタマーとは、SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法により得られる RNA 又は 1 本鎖 DNA で、抗体のように特定の物質に結合することができる核酸分子で、その作製は 10^{15} の分子からなるライブラリーからアフィニティ選別、ついで PCR 増幅という工程を *in vitro* で行う。この方法は生物の進化の変異、淘汰、増殖に似ていることから試験管内進化法または進化分子工学技術と呼ばれている。

SELEX 法は 1990 年 Tuerk と Gold らにより考案され、現在までに多くのアプタマーが開発されている。その中で最も有名なアプタマーの例として、トロンビン DNA アプタマーが挙げられる。これは G と T からなるわずか 15 塩基の一本鎖 DNA であり、トロンビンに対して結合定数 (Kd) 200 nM を示す。このアプタマーはトロンビンの正電荷の部分に結合すると同時に、その凝固作用を阻害する。このため、現在は冠動脈バイパス術 (CABG) に用いるトロンビン阻害剤として研究が進められ、既に臨床段階へと進んでいる。このように、アプタマーは高い特異性を示し、かつ阻害作用などの生物活性も有することから、現在医薬品としての使用が注目されている。一方、先にも述

べたように、アプタマーには抗体にはない幾つかの特徴がある。つまり *in vitro* での作製が可能なことや、免疫寛容などの必要がないこと、また、アプタマーの塩基配列を一度確定できれば化学合成や酵素核酸増幅法で多量に作製することも可能である。このことは、アプタマーが核酸でできた“抗体”を意味し、今までのように抗体を用いるイムノアッセイでは困難であった病気の診断や毒性の強い薬物等の分析を可能にするものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究で提案しているアプタマーの作製法について検討する。その作製原理は両端にプライマー結合配列と、その間にランダムな配列を含むように設計した 1 本鎖 DNA (ssDNA) を用いて PCR 増幅と RNA ポリメラーゼによる転写反応により、RNA ライブラリーを構築する。ここに標的分子を添加して、標的分子と複合体を形成した RNA のみを回収する。RT-PCR と RNA ポリメラーゼにより新たな RNA ライブラリーを第 1 世代とし、次のサイクルに用いる。これら一連の操作について反応条件を制御しながら繰り返し行い、高い特異性と親和性を備えたアプタマーを得る方法である。

本研究ではアプタマーを用いて、マイクロチップ電気泳動や ELISA による迅速かつ高感度なバインディングアッセイの開発、臨床的適用を目的とした性腺刺激ホルモンの一種である HMG (Human menopausal gonadotropin) をモデル標的分子とした RNA アプタマーの作製、さらにアルツハイマーの診断と予防薬としての効果を目的とした β アミロイドタンパクを標的としたアプタマーの作

製を試みた。

4. 研究成果

(1)19 年度は、アプタマーを用いて、マイクロチップ電気泳動や ELISA による迅速かつ高感度なバインディングアッセイの開発を行い、抗体を用いるイムノアッセイに代わる新しい診断技術としての評価を検討した。

方法：トロンビンバインディングアッセイ；
5' -FITC 標識トロンビンアプタマーとトロンビンを混合し、マイクロチップ電気泳動 (HITACHI, Fig. 1) により分離検出した。分離条件は 0.6% ヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む TBE 緩衝液 (pH 8.4) を泳動液として導入泳動電圧 300 V, 分離泳動電圧 750 V, 戻り泳動電圧 130 V で電気泳動した。また青色 LED を光源として、ex = 470 nm, em = 580 nm で蛍光検出した。

結果；バインディングと分離条件を検討した結果、トロンビンアプタマー (50 pmol) は約 60 秒で検出された。一方、トロンビンとの複合体は検出されなかった。そこで非結合型のアプタマーを指標としてトロンビンの検量線を作成したところ、1-100 pmol/assay の範囲で良好な検量線が得られた (Fig. 2)。本法は簡便、迅速、高感度な測定法であり、アプタマーが抗体に代わり得る有用な分析化学的方法であることが明らかとなった。

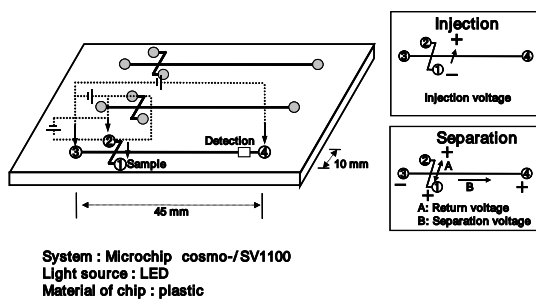


Fig. 1 Microchip electrophoresis

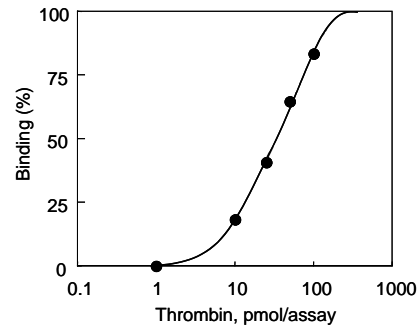


Fig. 2 Standard curve for thrombin

(2)20 年度はヒト下垂体性腺刺激ホルモン, HMG (human menopausal gonadotropin) を用いて、その RNA アプタマーの作製を検討した。その方法は、目的とする RNA と同様の塩基配列で、両端に PCR 用プライマー結合配列 (15 塩基×2) とその間にランダムな 30 塩基の配列を含む 60 塩基の 1 本鎖 DNA を設計した。その DNA から PCR と T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応により、RNA ライブラリーを作製した。得られた RNA ライブラリーから HMG に親和性を示すアプタマーを SELEX 法により選別した。即ち、HMG との複合体形成→複合体の分離→複合体から回収された RNA を RT-PCR により DNA 増幅した。この DNA を鋳型として構築した新たな RNA ライブラリーを第 1 世代として、一連の操作の繰り返しにより目的とする RNA アプタマーの作製を行った。

その方法としては、SELEX 操作を世代毎に複合体形成時の HMG 量や反応時間を制限して 12 世代まで行った。得られた各世代の RNA をマイクロチップ電気泳動により分析したところ、それらの RNA は非加熱条件においてエレクトロフェログラム上に 1 本のピークで検出されたが、加熱処理により高次構造を形成させるとその高次構造の違いから 2 本のピークが検出された。HMG の添加条件では後続のピークがより減少し、親和性が

高いことが判明した。12 世代までの RNA で検討したところ、第 11 世代の RNA が最も高い親和性を示し、HMG の検量線を作成することができた。その感度は HMG10 ピコモルが精度よく検出することができた。本法は、ゴナドトロピン製剤中の HMG 分析に応用した。

(3) 21 年度は、本研究で提案しているアプタマーの作製法を引き続き検討した。その作製原理は両端にプライマー結合配列と、その間にランダムな配列を含むように設計した 1 本鎖 DNA (ssDNA) を用いて PCR 増幅と RNA ポリメラーゼによる転写反応により、RNA ライブラリーを構築した。ここに標的分子を添加して、標的分子と複合体を形成した RNA のみを回収した。RT-PCR と RNA ポリメラーゼにより新たな RNA ライブラリーを第 1 世代とし、次のサイクルに用いた。これら一連の操作について反応条件を制御しながら繰り返し行い、高い特異性と親和性を備えたアプタマーを作製した。本年度はアルツハイマーの原因物質と考えられる β -アミロイドタンパク質のアプタマーの作製を行った。またアプタマーの回収では、新たにキャピラリー電気泳動法による分離法についても検討した。最終的には、ゲルシフトアッセイにより β -アミロイドタンパク質に結合するアプタマーの創製を確認することができた。21 年度は、さらなるアプタマーの開発を進展させる目的で、より低分子 (分子量 1000) であるオキシトシンのアプタマーについても検討した。

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 3 件)

(1) Application of microchip electrophoresis in the analysis of RNA aptamer-protein interactions

F. Nishikawa, H. Arakawa, and S. Nishikawa, *Nucleic Acids Research*, 369-382, **25**, 2006

(2) 荒川秀俊 : アプタマーを活用した分析化学 (特集) , 臨床化学, **36**(4):2007.108-115.

(3) Development of novel RNA aptamer and its ligand binding assay on microchip electrophoresis

K. Ohno, T. Nakata, F. Nishikawa, S. Nishikawa, H. Arakawa, *Nucleic Acids Research*, in submit.

[学会発表] (計 5 件)

1. 生物発光検出アプタマーバインディングアッセイによるトロンビン測定法の開発 (日本薬学会 127 年会)
2. アプタマーを活用した分析化学 (第 47 回日本臨床化学会年次学術集会)
3. 核酸アプタマーを用いた生体成分の高感度分析法 (第 16 回日本臨床化学会関東支部会)
4. Amyloid- β peptide に対する RNA アプタマーの開発とそのマイクロチップバインディングアッセイへの応用 (日本薬学会 129 年会)
5. Oxytocin 反応性 RNA アプタマーの作製 (PPF2010)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 荒川秀俊
(Arakawa Hidetoshi)

研究者番号：70129807

(2) 研究分担者 大野賢一
(Ohno Ken-ichi)

研究者番号：20347272

(3) 連携研究者
()

研究者番号：