

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710221

研究課題名（和文）インテリジェント核酸の段階的被覆法による環境応答型薬物ナノキャリアの設計と創製

研究課題名（英文）Design and creation of condition-responsive nano-drug-carriers involving by the step-wise construction method using intelligent nucleic acids

## 研究代表者

桑原 正靖 (KUWAHARA MASAYASU)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40334130

研究成果の概要（和文）：薬物包摂人工核酸アプタマーを改変設計することによって、環境に応じて薬物を包摂・放出するインテリジェント核酸の作製を行った。さらに、酵素的ポストモディフィケーションにより、ポリメラーゼ反応による修飾ヌクレオチドの導入を行った。担持ヌクレオチドの末端配列や修飾ヌクレオチド三リン酸の化学構造によって導入効率が有意に変化した。用いるポリメラーゼを改変することにより、ある程度の改善が確認された。

研究成果の概要（英文）：Intelligent nucleic acids that can release/capture particular drug depending on the condition were created by designing and modifying drug-binding aptamers. Moreover, modified nucleotides were enzymatically incorporated to them by the post-modification method. The incorporation efficiencies were varied significantly depending on sequences around 3'-end of oligonucleotides tethered and chemical structures of modified nucleotides incorporated, which could be improved to some extent, by use of genetically modified polymerases.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：核酸科学，生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：核酸，有機化学，バイオテクノロジー，生体生命情報学

## 1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA などの核酸はその配列によって、抗体のように特定の物質を特異的に認識し結合する機能をもつもの（DNA アプタマー，アプタマー）や、酵素のように特定の反応を触媒する機能をもつもの（DNA ザイム，リボザイム）がある。また、核酸分子には、塩の種類

や僅かな pH の違いで、その立体構造（コンフォメーション）を大きく変えるものも知られている。これらの配列をうまく繋ぎ合わせたり、細胞表面に存在するレセプターに特異的に結合するリガンド分子を修飾したりすることにより、核酸分子の取り巻く環境に応じて活性制御ができる核酸分子を人為的に設

計し創出することが可能である。例えば、アプタマーとリボザイムを組み合わせたアプタザイムと呼ばれる核酸分子は、あるリガンドが結合すると触媒活性が誘起され、自己切断反応を生じるというスイッチ機能をもつ。このように機能の異なる複数の核酸分子を組み合わせることで、インテリジェント核酸を作製できるのは、塩基対形成などに基づく二次構造予測によって大まかな分子設計の指針を策定できるからである。これは他の分子にはない核酸ならではの長所である。現在、ナノバイオセンシングなどへの応用を指向したインテリジェント核酸の研究開発が国内外で精力的に進められており、新規機能性材料としての核酸分子の可能性が模索されている。本研究では、これまでの研究で創出した薬物包摂人工核酸アプタマーのインテリジェント化をベースとして、新しいタイプの薬物キャリアを設計・創製する方法を検討した。

## 2. 研究の目的

人工核酸分子の機能の拡張性と構造設計の簡素さに着目し、独自に開発した薬物包摂人工核酸アプタマーを改変設計することによって、薬物を環境に応じて包摂したり放出したりするようなインテリジェント核酸を作製する。さらに、それをナノ担体表面に、段階的に被覆することによって、環境応答型薬物ナノキャリアの創製を行う。センシング機能(環境応答性)と薬物の包摂・放出機能を併せもつインテリジェント核酸を分子パーツに用いた環境応答型薬物ナノキャリアは、薬物送達の時空間的精密制御システム構築への展開応用が期待される。

## 3. 研究の方法

薬物としてサリドマイド誘導体を修飾した種々の薬物担体と、最小化したサリドマイド包摂人工核酸アプタマーを直列に繋いだ連結アプタマーを作製した。それらの親和性を測定することによって、安定な複合体を形成する薬物担体を選び、さらに構造や作製法の最適化を行った。同様に抗がん剤であるカンプトテシン誘導体についても独自のセレクション系を用いて薬物包摂人工核酸の作製を行った。この工程では、市販のカンプトテシンを原料として7位置換誘導体を合成し、これを担持したゲルを用いてカンプトテシン包摂人工核酸アプタマーの選別を行った。またライブラリには、プライマー部位とランダム配列部位とを合わせて~70塩基程度の長さのものを用いた。薬物担体と作製したインテリジェント核酸との結合親和性は、表面プラズモン共鳴法および蛍光滴定法によ

て測定した。作製した薬物キャリアのポストモディフィケーションによる段階的的被覆工程では、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) や遺伝子工学的に改変した耐熱性DNAポリメラーゼなどの酵素と、糖部位および塩基部位に修飾基をもつヌクレオシド三リン酸アナログとを用いて行った。

## 4. 研究成果

薬物担体に用いるアプタマーとして、サリドマイド誘導体を包摂するもの他に、カンプトテシン誘導体を包摂するものを作製した。サリドマイド誘導体およびカンプトテシン誘導体は、市販のヒドロキシフタル酸無水物およびカンプトテシンから、それぞれ5~6段階の反応で得ることができた。カンプトテシン結合アプタマーは、アフィニティゲルを用いた試験管内選択法(ランダムスクリーニング法)によって、天然型のDNAライブラリおよび修飾型の人工核酸ライブラリからそれぞれ得られた(図1)。

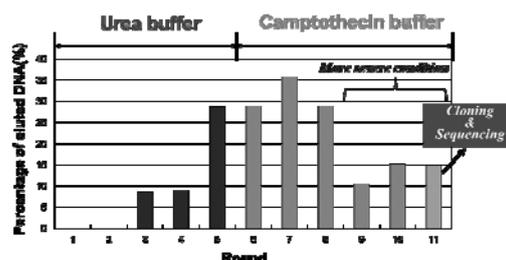


図1 カンプトテシン誘導体包摂アプタマーのスクリーニング

配列解析により、得られた核酸アプタマーの多くがグアニン塩基を多く含むものであることが分かった(図2)。また、表面プラズモン共鳴法等による測定より、それらのアプタマーの標的分子に対する結合親和性( $K_d$ )は、概ね $1\mu\text{M}$ であった。得られた薬物包摂アプタマー(サリドマイド誘導体、カンプトテシン誘導体)について、二次構造予測に基づく配列の組換えによって与えられたいくつかの連結アプタマーの候補の中から、連結で結合活性が損なわれずに保持され、且つ、酸性条件下において有意に結合活性が低下するものを選び出した。さらに、それらをキャリア担体に担持させた後、薬物キャリアのヌクレアーゼ耐性等の向上や機能拡張を狙って、酵素的ポストモディフィケーションにより、ポリメラーゼ反応による修飾ヌクレオチドの導入を行った。担持ヌクレオチドの末端配列や修飾ヌクレオシド三リン酸の化学構造によって導入効率が有意に変化することが

判ったが、用いるポリメラーゼを改変することにより、ある程度改善されることが確認された。

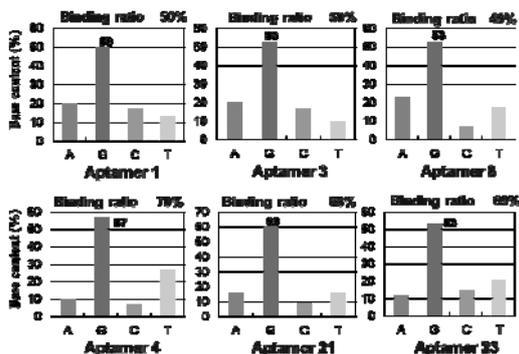


図2 カンプトテンシ誘導体包摂アプタマーの配列解析

## 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6件)

- ① Masayasu Kuwahara, Yuki Takano, Yuya Kasahara, Hiroki Nara, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai, Akio Sugiyama, Satoshi Obika. Study on suitability of KOD DNA polymerase for enzymatic production of artificial nucleic acids using base/sugar modified nucleoside triphosphates. *Molecules*, 査読有, **15**, 8229-8240 (2010).
- ② Masayasu Kuwahara, Naoki Sugimoto. Molecular evolution of functional nucleic acids with chemical modifications. *Molecules*, 査読有, **15**, 5423-5444 (2010).
- ③ Yuya Kasahara, Syunsuke Kitadume, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai, Kunihiro Morihiro, Takashi Imanishi, Satoshi Obika. Effect of 3'-end capping of aptamer with various 2',4'-bridged nucleotides: enzymatic post-modification toward a practical use of polyclonal aptamers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, **20**, 1626-1629 (2010)
- ④ Masayasu Kuwahara, Hidetoshi Takeshima, Junichi Nagashima, Satoshi Minezaki, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai. Transcription and reverse transcription of artificial nucleic acids

involving backbone modification by template-directed DNA polymerase reactions. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, **17**, 3782-3788 (2009)

- ⑤ Masayasu Kuwahara, Satoshi Obika, Hidetoshi Takeshima, Yoshihiko Hagiwara, Junichi Nagashima, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai, Takeshi Imanishi. Smart conferring of nuclease resistance to DNA by 3'-end protection using 2',4'-bridged nucleoside-5'-triphosphates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, **19**, 2941-2943 (2009)
- ⑥ Masayasu Kuwahara, Atsushi Kobayashi, Masayoshi Tajima, Shunsuke Kitazume, Keisuke Anahara, Hiroaki Ozaki, Seiji Tobita. Fluorescent properties of acridonyl group in DNA duplex. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxford University Press)*, 査読無, **53**, 137-138 (2009)

[学会発表] (計11件)

- ① 笠原勇矢, 入澤祐太, 桑原正靖, スクリーニング条件が核酸アプタマーの結合特性に及ぼす影響, 日本化学会第91春季年会(2011), 2011.3.26, 神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県)
- ② Yuya Kasahara, Yuta Irisawa, Hidetaka Okonogi, Masayoshi Tajima, Atsushi Kobayashi, Masayasu Kuwahara, Hiroaki Ozaki, Seiji Tobita. Syntheses and properties of acridone-labeled oligonucleotide analogs with two different backbone structures. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.19, ホノルル(米国)
- ③ Masayasu Kuwahara, Yuki Takano, Yuya Kasahara, Akio Sugiyama, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai. Enzymatic synthesis of artificial nucleic acids by various mutants of KOD DNA polymerase. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 2010.12.19, ホノルル(米国)
- ④ Yuya Kasahara, Masayasu Kuwahara. Measurement of the binding affinity of selected DNA aptamer by nonequilibrium capillary electrophoresis. The 37th International symposium on Nucleic

Acid Chemistry (ISNAC2010), 2010. 11. 1,  
はまぎんホール (神奈川県)

- ⑤ 高野優貴, 笠原勇矢, 桑原正靖, 杉山明生, 尾崎広明, 澤井宏明, 酵素的人工核酸合成における塩基部位/糖部位修飾ヌクレオシド三リン酸の基質特性評価, 第4回 バイオ関連化学シンポジウム, 2010. 9. 26, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府)
- ⑥ Masayasu Kuwahara, Yuya Kasahara, Keisuke Anahara, Yuta Irisawa, Masayoshi Tajima, Hiroaki Ozaki, Hiroaki Sawai, Akio Sugiyama. Synthesis of acridonyl nucleoside analog and its fluorescent properties and substrate properties on polymerase reaction. IRT 2010 - XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2010. 8. 30, リヨン (フランス)
- ⑦ 笠原勇矢, 北爪峻輔, 桑原正靖, 尾崎広明, 澤井宏明, 森廣邦彦, 小比賀聡, 今西武, 架橋型ヌクレオチドの3'末キャッピングによるDNA アプタマーのヒト血清中における安定性の評価, 日本化学会第90春季年会(2010), 2010. 3. 28, 近畿大学本部キャンパス (大阪府)
- ⑧ 高野優貴, 笠原勇矢, 桑原正靖, 杉山明生, 尾崎広明, 澤井宏明, 種々のKOD DNA ポリメラーゼ変異体による酵素的人工核酸合成の比較検討, 日本化学会第90春季年会(2010), 2010. 3. 28, 近畿大学本部キャンパス (大阪府)
- ⑨ Masayasu Kuwahara, Atsushi Kobayashi, Masayoshi Tajima, Shunsuke Kitazume, Keisuke Anahara, Hiroaki Ozaki, Seiji Tobita. Fluorescent properties of acridonyl group in DNA duplex, The 6th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2009. 9. 29, 高山文化会館 (岐阜)
- ⑩ 笠原勇矢, 高野優貴, 奈良紘希, 桑原正靖, 尾崎広明, C5位修飾アラビノヌクレオチドのDNA鎖への酵素的導入, 第24回生体機能関連化学シンポジウム, 第12回バイオテクノロジー部会シンポジウム, 2009. 9. 14, 九州大学医系キャンパス(百年記念講堂) (福岡県)
- ⑪ 北爪峻輔, 桑原正靖, 尾崎広明, 小比賀聡, 種々の2', 4' 架橋型ヌクレオチド

を用いた酵素的DNA修飾およびヒト血清中における安定性の比較検討, 日本化学会第3回関東支部大会(2009), 2009. 9. 4, 早稲田大学理工キャンパス (東京都)

〔図書〕(計2件)

- ① 桑原正靖, 人工核酸を用いたポリメラーゼ反応と人工核酸アプタマーの創製, 生化学, 82巻4号, 日本生化学会, 2010, 318-323.
- ② 桑原正靖, 杉本直己, 核酸アプタマーのケミカル・ルネサンス, 月刊化学 四月号, 化学同人, 2009, 44-49.

〔その他〕

ホームページ等

<http://dna.dept.eng.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・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 40334130