

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658034

研究課題名（和文） 微生物識別用RNAアプタマーの創製

研究課題名（英文） Creation of RNA aptamers for identification of microorganisms

研究代表者

菊池 洋 (KIKUCHI YO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40273320

研究成果の概要（和文）：

アプタマー選択のための新たな二つの方法、「分子間相互作用の速度論的解析（シミュレーション）を基にした新たなアプタマー選択法」、および「迅速な蛍光ラベル法」を開発した。この方法を細菌芽胞を標的とするRNAアプタマー選択に用いた。得られたどのRNA分子種も芽胞への結合能を示した。これら新規RNAアプタマーは栄養細胞には全く結合せず、芽胞のみに結合した。得られたどの分子種も調べた限りすべての菌の芽胞に結合し、菌種を超えた共通の芽胞成分に特異的なRNAアプタマーが得られたものと結論された。

研究成果の概要（英文）：

We have newly developed two methods for RNA aptamer selection: one is a kinetically designed RNA aptamer selection method. The second is a rapid fluorescent labeling method for RNA. Using these methods, we have selected RNA aptamers to bacterial spores from random RNA population. The RNA aptamers were isolated from selected RNA population by cloning and characterized. All RNA aptamers bind to bacterial spores specifically, but do not bind to vegetative bacterial cells at all. The aptamers bind to bacterial spores from any species tested. It has been concluded that the RNA aptamers recognize some structures commonly present in bacterial spores.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	570,000	3,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：生物学、核酸、RNA、細菌、芽胞、プローブ

1. 研究開始当初の背景

核酸（主に RNA）の新しい機能、特に触媒機能や RNA 干渉 (RNAi) [発見の論文: *Nature* 391, 806 (1998)、2006 年度ノーベル医学生理学賞] に関する基礎的研究が大いに発展し、遺伝子発現制御の技術として注目されてきていた。我々は、それと並ぶもう一つの核酸の機能であるアプタマー [最近の総説として: J.F. Lee *et al.* *Curr. Opinion in Chem. Biol.* 10, 282 (2006)] に注目し、これの微生物学関連分野での利用を試みようと考えた。それまでのアプタマーは、精製した分子を標的として創製されてきたが、本研究では、微生物細胞（栄養細胞や孢子）まるごとを標的とし、それらに特異的に結合する核酸の創製を試みることを計画した。この試みは当時国内外を通じて初めてのもので、また微生物識別へのアプタマーの応用は、世界的に見てもユニークなものとして位置付けられた。

当時すでに我々は、核酸と全く相互作用をもたないと考えられていたプロテアーゼに対するアプタマーの創製に成功していた [*J. Biochem.* 125, 1115-1119 (1999)]。これは世界で初めての RNA からなる微生物プロテアーゼ阻害剤であった。一方、微生物学分野において、微生物の同定は、選択培地を使った培養や表面抗原に対する抗血清などを用いて行われているが、この場合もアプタマーの使用が可能ではないかと思われた。アプタマーは、抗体と比べて特異性や結合能において遜色ないものと考えられており、作成法やコスト面では、抗体を凌駕する。アプタマーチップによる自動化も可能で、特に食品の安全安心の分野でも細菌のプローブとして応用できるのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、各種細菌や芽胞全体（精製した分子ではなく）を標的として RNA アプタマーの創製を試み、各種孢子に結合するアプタマーを多種類取得し、それらの標的に対する作用、特異性、およびアプタマーの構造を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ランダム配列 RNA の調製

アプタマーには RNA および DNA があるが、当研究室でシステムがうまく走っている RNA アプタマーについて試みた。DNA 合成機により合成されたランダムな配列の DNA（全長 100 塩基でランダム部分は 50 塩基ほど）を試験管内転写のための鋳型とした。両末端には、後にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅可能とするため既知の配列 (PBS=Primer binding site) をつけ、またその 5' 末端側に T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列をつけておく。これを T7 RNA ポリメラーゼをもちいる試験管内転写系にて RNA に変換し、ランダム RNA の集団を作成した。これまでのタンパク質や低分子物質を標的とした例から考えると 10 の 14 乗ほどの分子数を必要とすることがわかっているため、具体的には 20 μ g ほどの DNA からスタートし RNA を調製した。

(2) アプタマーの取得

アプタマーの取得方法としては、フィルターを使う方法が一般的であるが [総説として: L. Gold *et al.* *Annu. Rev. Biochem.* 64, 763 (1995)]、標的が細胞や孢子の場合は、高価なフィルターを使わずとも選択操作を行える可能性があったのでまずランダムの RNA 集団と芽胞を混ぜた後、遠心分離により芽胞を沈殿させ、上澄みを捨てた。芽胞を徹底的に洗浄用のバッファーで洗

浄し、この操作の後でも芽胞に結合している RNA があることを期待し、その芽胞まるごとをフェノール抽出した。ここで得られた核酸成分中の RNA を試験管内で逆転写 (RT=Reverse Transcription) し、PCR で増幅、その DNA 産物を鋳型として次の世代の RNA を調製し、上記と同様の選択操作を繰り返した。これを 10 回ほど繰り返す。最後に得られた DNA をクローン化により精製した。また、この選択法について本研究では、まったく新しい方法を開発した。それについては、研究成果に述べる。

(3) 単一アプタマーの取得

クローン化後、それぞれのクローンから一本鎖 RNA を調製し、蛍光ラベルを行い、芽胞自体に対する結合能が確実なものであるか蛍光顕微鏡により確認した。さらに各クローンの結合能の特異性も調べた。また、RNA の蛍光ラベルについて、その迅速なラベル法を開発した。それについては、研究成果に述べる。

4. 研究成果

(1) 分子間相互作用速度論からデザインしたアプタマー選択法の開発

本研究の中で、RNAアプタマー選択についてのまったく新しい方法の開発を試み、成果を上げた。これまで、RNAアプタマーの選択は、一般に次のステップで行われている。i) ランダム配列を含むRNAの調製、ii) このRNA 集団と標的との接触、iii) 結合能の無いまたは弱いRNA種の洗浄による除去、iv) 結合能のあるRNAの回収、v) RT-PCRによる回収RNAのcDNAへの変換と増幅、vi) cDNAを転写することによる第二世代のRNA集団の調製、そして上記ii) 以下を繰り返す。これらii) ~vi) のステップを数サイクル行うことにより、標的との親和性の大きなRNAを得るのが一般的である。文献的には成功例が述べられるため、こ

のアプタマー選択法は一般に完成した方法と理解されているが、実際には、多くの失敗例がある。結合能評価は多くの場合数サイクル後に得られたRNAの標的への結合アッセイにより行われるため、RNAアプタマーが得られない場合、不成功の原因追求は簡単ではなく、操作自体も手間、時間、コストのかかる方法である。本研究では、分子間相互作用の速度論的解析 (シミュレーション) を基に、静的な結合定数 K_d ではなく、結合速度定数 k_{ON} と遊離速度定数 k_{OFF} を考慮に入れた方法を開発した。具体的には、結合反応の時間の考慮、洗浄液の量や時間などを従来法と大きく変えた方法である (大量の洗浄液を用い洗浄時間を大きくする)。数種類の標的を用いたモデル実験において、手間、コスト、また時間のかからない、RNAアプタマー選択法ができ、標的によっては1ラウンドで有意に結合するRNA集団が得られた。

芽胞を標的に、この方法を実行し、従来法 (洗浄液量数ml、洗浄時間数分のSELEX) との比較も行った。従来法については、9ラウンドを行った時点で、結合能の確認を行ったところ、明らかな結合を確認できず、さらなるラウンドを重ね、13ラウンドで、ようやく結合能の確認ができた。新しい方法では、9ラウンドで芽胞に確実に結合していることが確認できた。ただし、より少ないラウンドで結合能アッセイをしていないので、結合能を得るための最小ラウンド数が9であるという意味ではない。

(2) RNAの迅速蛍光ラベル法の開発

アプタマーが芽胞に結合していることの確認は、5' 末端を蛍光ラベルした RNA アプタマーを用い、蛍光顕微鏡観察により行った。このための迅速な RNA の蛍光ラベリング法を開発した (図 1)。従来の方法は、転写合成された RNA アプタマーの 5' 末端を脱リン酸

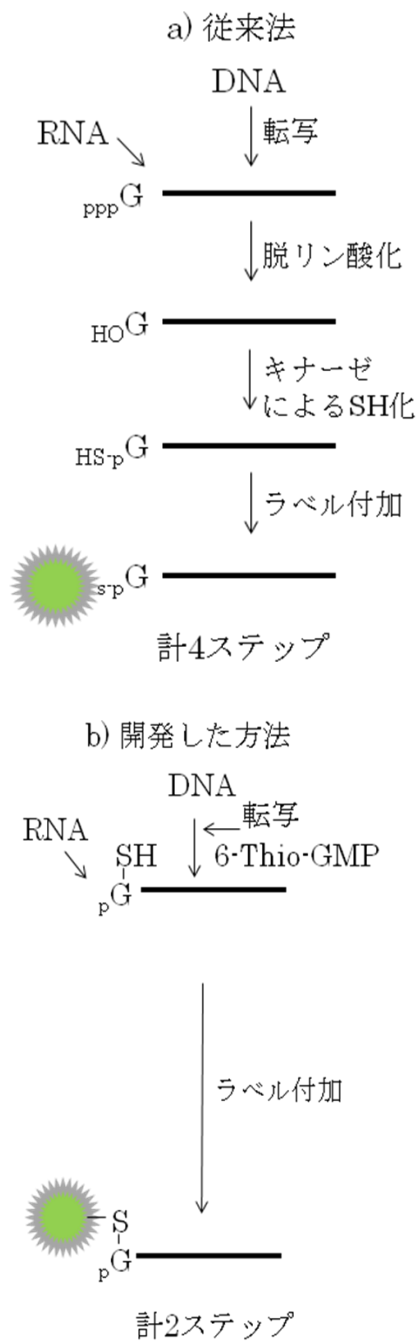
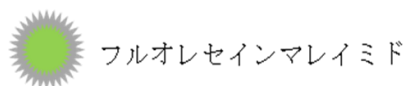


図 1. 開発した迅速蛍光ラベル化手法

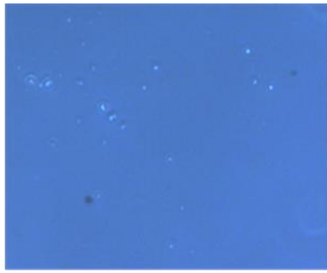


化し、ATP γ S を用いてチオール基を導入し、このチオール基にフルオレセインマレイミドをマイケル付加によって導入する (図 1 a)。DNA からの転写合成を含めて 4 段階 (転写、脱リン酸、キナーゼによるチオール化、マイケル付加) を要する。これに対し、本研究で

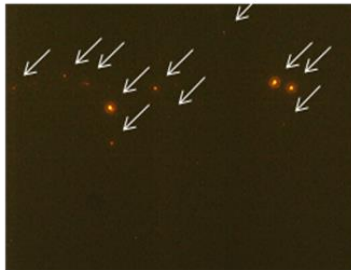
新たに考案した方法は、RNA の転写反応時に 6-Thio-GMP を混合して転写反応を行なう方法である。RNA の転写は G から開始されるが、この 6-Thio-GMP は転写開始の G にのみ導入される。転写されてきた RNA の先頭の G にはチオール基がすでに導入されているので、このチオール基にフルオレセインマレイミドを導入することができる。この方法を用いると 2 段階で標識化が可能となる (図 1 b)。

(3)細菌芽胞に特異的に結合する RNA アプタマーの取得

分子間相互作用速度論からデザインしたアプタマー選択法および従来法によって複数回のアプタマー選択を行った。先に述べたように新しい方法では、9ラウンドで、従来法では13ラウンドで得られたRNA集団が芽胞に確実に結合していることが確認できた。それら集団をクローニングし、共通配列をもとにいくつかのグループに分けることができた。それらクローンから得られた各RNAアプタマーについて結合能の確認を行った。確認の方法は、調製したRNAを精製し、5'末端を前項の方法で蛍光ラベルした。その精製ラベル化RNAを芽胞標品と混ぜ、結合反応を行った後、蛍光顕微鏡で観察する方法を用いた (図 2)。対象として、0ラウンド集団、すなわち、選択をまったく行っていないランダム配列RNAを用いた。この0ラウンドRNA集団では、蛍光ラベルRNAが結合した芽胞は、まったく観察されなかった (図は省略)。得られたクローニングによって精製したどのRNA種も芽胞への結合を観察することができた。これら新規RNAアプタマーは栄養細胞には全く結合せず、芽胞のみに結合した。異なった数種の菌の芽胞を用いて特異性を調べたところ、どのクローンも調べた限りどの菌の芽胞にも結合し、種特異性



位相差観察



蛍光観察

図2. 芽胞（上）および芽胞に結合している蛍光ラベルされたRNAアプタマー（下）

を示さなかった。芽胞共通に特異的なRNAアプタマーが得られたものと結論された。

当初は、細菌種の識別を目指したが、結果的には、芽胞を識別できるRNAアプタマーの取得に成功した。このアプタマーは、食品中で確実な除去が難しい細菌芽胞を検出したり、さらには除去したりする新手法の中心的プロープとして使われることが期待される。また、本研究で得られたいくつかの知見や新しい実験方法は、今後、新規アプタマーの効率的な取得に大いに役立つことは確実で、今後につながる研究成果が得られたと言える。

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)
査読有のみを掲載

1. Hwang, S. D., Midorikawa, N., Punnarak, P., Kikuchi, Y., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T.: Inhibition of hirame rhabdovirus (HIRRV) growth

by RNA aptamers. *J. Fish Diseases* **35(12)**, 927-934 (2012)

2. Punnarak, P., Santos, M. D., Hwang, S. D., Kondo, H., Hirono, I., Kikuchi, Y., and Aoki, T.: RNA aptamer(s) inhibit the growth of the fish pathogen viral hemorrhagic septicemia virus (VSHV). *Marine Biotechnology* **14(6)**, 752-761 (2012)
3. Orito, N., Umekage, S., Sato, K., Kawauchi, H., Tanaka, H., Sakai, E., Tanaka, T., and Kikuchi, Y.: High-affinity RNA aptamers to C-reactive protein (CRP): newly developed pre-elution methods for aptamer selection. *J. Physics Conf. Ser.* **352**, 012042 (2012), doi:10.1088/1742-6596/352/1/012042
4. Suzuki, H., Umekage, S., Tanaka, T., and Kikuchi, Y.: Artificial RNA aptamer production by the marine bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*: Improvement of the aptamer yield using a mutated transcriptional promoter. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **112(5)**, 458-461 (2011)
5. Umekage, S., Enami, Y., and Kikuchi, Y.: Kinetically designed RNA aptamer selection. *ISNAC 2010*, pp. 104-105 (2010)
6. Suzuki, H., Ando, T., Umekage, S., Tanaka, T., and Kikuchi, Y.: Extracellular production of an RNA aptamer by ribonuclease-free marine bacteria harboring engineered plasmids: a proposal for industrial RNA drug production. *Appl. Environ. Microbiol.* **76(3)**, 786-793 (2010)

[学会発表] (計 31 件)

発表者に○

- 1) ○長尾信義、鈴木宏道、沼野利佳、梅影創、菊池 洋：海洋性光合成細菌による人工 short hairpin RNA の生産 (口頭発表)：日本農芸化学会 2013 年度大会：2013 年 3 月 25 日：仙台
- 2) Hiromichi Suzuki, So Umekage, Terumichi Tanaka, and ○Yo Kikuchi：Artificial RNA production using an engineered bacterium (口頭発表)：Annual Meeting of the RNA Society (in conjunction with 13th Annual Meeting of the RNA Society of Japan)：2011 年 6 月 18 日：京都

ページ数の関係で以下省略

[図書] (計 6 件)

1. Umekage, S., Uehara, T., Fujita, Y., Suzuki, H., and Kikuchi, Y.: *In vivo* circular RNA expression by the permuted intron-exon (PIE) method, in *Innovations in Biotechnology* (Ed. E. C. Agbo, ISBN 978-953-51-0096-6, Intech Open) Chapter 4 (pp. 75-90) (2012)
2. 菊池 洋：生体エネルギーと代謝、「理工系学生のための生命科学・環境科学」榊佳之・平石 明編、pp. 19-33、東京化学同人 (2011)
3. 菊池 洋：生命の基本構造、「理工系学生のための生命科学・環境科学」榊 佳之・平石 明編、pp. 5-18、東京化学同人 (2011)
4. Kikuchi, Y.: Extracellular nucleic acids of the marine phototrophic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* and related bacteria: Physiology and biotechnology. In “Extracellular nucleic acids”, eds. Kikuchi, Y. and Rykova, E. A series of “Nucleic Acids and Molecular Biology”, ed. Gross, H. J., Vol. 25, pp. 55-67, Springer-Verlag, Heidelberg (2010)
5. Kikuchi, Y. and Rykova, E. eds.:

“Extracellular nucleic acids”. A series of “Nucleic Acids and Molecular Biology”, ed. Gross, H. J., Vol. 25, total 232 pages, Springer-Verlag, Heidelberg (2010)

6. Kikuchi, Y., Suzuki, H., und Umekage, S: Produktion definierter RNAs im Kulturüberstand von Bakterien (in German). *LABORWELT*, 11 (Nr. 1), 6-7 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：改良されたオリゴヌクレオチドおよびそのオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物
発明者：梅影創、越智明德、菊池洋
権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学
種類：特許出願
番号：2011-120806
(PCT 番号:PCT/JP2012/0644491)
出願年月日：平成 24 年 5 月 30 日
国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.tut.ac.jp/teach/main.php?mode=detail&article=362>

6. 研究組織
組織としては代表者 1 名のみであるが、研究協力者を (2) として記す。

(1) 研究代表者

菊池 洋 (Kikuchi, Yo)

所属・職：国立大学法人 豊橋技術科学大学大学院 工学研究科・教授

研究者番号：40273320

(2) 研究協力者

梅影 創 (Umekage, So)

所属・職：国立大学法人 豊橋技術科学大学大学院 工学研究科・専任講師

研究者番号：30419436