

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510264

研究課題名(和文) 3本鎖DNAを利用した新規コンビナトリアル合成レセプターライブラリーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel combinatorial synthetic receptor library using triple strand DNA

研究代表者

春木 満 (HARUKI, Mitsuru)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：30273593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、足場として3本鎖DNAを利用し、3本のランダム配列ペプチドを連結したコンビナトリアル合成レセプターライブラリーの開発を目的とした。方法としては、3本鎖を形成する各1本鎖DNAの一方の端にアミノ酸を付加し、もう一方の端にそのアミノ酸に対応したDNAタグを付加する。これにより、標的分子に対して複数個所で結合することにより高い選択性・親和性を有し、アミノ酸の同定が可能なライブラリーを構築する。3種類のアミノ酸を用いたジペプチドライブラリーの作成を試み、ssDNAへのアミノ酸とそれに対応するタグの付加、3本鎖形成を確認した。今後、作成したライブラリーを用いたセレクションを行う予定である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to construct a novel combinatorial synthetic receptor library in which three peptides with random sequence are linked to a triple strand DNA. To construct the library, amino acids and corresponding DNA tags are linked to the ends of each ssDNA of the triple strand DNA. This enables the construction of a library with high selectivity and affinity toward target molecules by multivalent binding. Moreover, the sequences of the peptides can be determined by DNA tags. I tried to construct a dipeptide library using three amino acids and succeeded in conjugation of the amino acids and corresponding DNA tags to ssDNA and formation of the triple strand DNA. Selection using this library is now under planning.

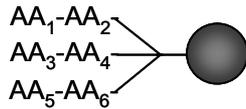
研究分野：複合新領域

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：コンビナトリアル化学 3本鎖DNA ペプチド 合成レセプター DNAタグ

1. 研究開始当初の背景

疾病関連蛋白質などの標的分子を特異的に認識する分子は、医薬品やバイオセンサーへの応用が期待される。このような化合物を得る一つの方法として、合成レセプターライブラリーが用いられている。合成レセプターは、足場となる構造の上に、ペプチド鎖などを複数連結したものであり、標的分子に対して複数箇所て結合することにより、選択性や親和性を高めている(図1)。このペプチド配列をコンビナトリアル化したライブラリー



AA₁, AA₂=Lys, Glu, Val, Phe, Gly, Ser
 AA₃, AA₄=His, Ala, Leu, Pro, Tyr, Asn
 AA₅, AA₆=Arg, Asp, Ile, Trp, Thr, Gln

図1 合成レセプターライブラリーの例

を用いたセレクションが試みられている。しかしながら、足場に連結したそれぞれのペプチド配列は区別できない。そのため、異なった配列のペプチドを連結したライブラリーを作成した場合、セレクションされた分子のペプチド配列を個別に同定することは困難である。配列の異なる3本のジペプチドを連結したライブラリーを用いた例はあるが、この場合3本のペプチドには、それぞれ6種類ずつ互いに異なった種類のアミノ酸が用いられているため、区別が可能となっている(図1)。このライブラリーを用いて、バンコマイシンのターゲットであるD-Ala-D-Alaに選択的に結合する分子が見出されている。この場合の多様性は、 $6^6=46656$ 通りにとどまる。これに対し、20種類のアミノ酸を全部用いることができれば、多様性が $20^6=6.4 \times 10^7$ 通りとなり、その中から目的分子が得られる可能性が、より高くなると期待される。そこで、合成レセプターライブラリーのそれぞれのペプチド鎖にタグを付加し、配列同定を可能にすることを考えた。タグとしては、ファージディスプレイ法同様に配列決定容易なDNAが適していると判断した。さらに、DNAをタグとしてだけでなく、その3本鎖形成機能を利用して、ペプチド連結の足場としても用いるという着想に至った(図2)

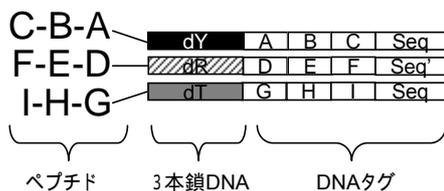


図2 本研究で開発する合成レセプターライブラリー

2. 研究の目的

当該研究では、(1)3本鎖DNAを足場として利用した合成レセプターライブラリーの作成を行う。その作成において、3本鎖を形成する各1本鎖DNAの一方の端にアミノ酸を付加し、もう一方の端にそのアミノ酸に対応したDNAタグを付加することにより、付加したアミノ酸の同定を可能にする。(2)作成したライブラリーの有用性の検証を行う。合成レセプターは、標的分子に対して複数箇所て結合するため、標的分子が低分子でも高分子でも、強力に結合する分子が得られると期待される。そこで、細胞表面糖鎖などの低分子の標的分子、高分子の標的分子としてNF- κ Bなどの蛋白質に結合する分子の取得を試みる。(3)得られた分子を特異的検出法などへ応用する。細胞表面糖鎖結合分子については、様々な細胞表面の糖鎖の検出を行い、細胞のプロファイリングを試みる。蛋白質結合分子については、バイオセンサーの作成、ウェスタンブロットングへの応用を試み、抗体の代わりに用いることを検討する。

3. 研究の方法

(1)3本鎖DNAを形成することが報告されている下記の配列(dY/dR/dT)を委託合成した。dR/dYは2本鎖を形成し、そのmajor grooveにdTが結合する。dR, dTの5'末端, dYの3'末端にはアミノ基を導入した(委託合成)



(2)それぞれの鎖に, Trp, Phe, Valの3種類のFmocアミノ酸succinimide ester (Fmoc-AA-OSu)とDNAに導入したアミノ基をカップリングさせた(図3)。反応液(50 μ L)の組成は, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1 mM EDTA, 60 μ M DNA, 1.28 mM Fmoc-AA-OSuで, 37 一晩反応を行った。

(3)ゲルろ過カートリッジにより未反応のFmoc-AA-OSuを除去した後, ピペリジンを20%となるように加えて10分間室温でFmoc基の脱保護を行った。反応後, エタノール沈殿により精製を行った。

(4) dY/dR/dTにそれぞれの相補鎖をアニール

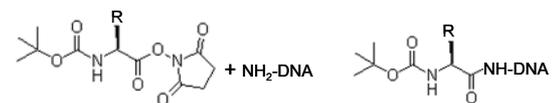


図3 アミノ化DNAとFmoc-AA-OSuとの反応

し, それぞれのアミノ酸に対応する21 bpのDNAタグを, T4 DNA Ligaseにより16 一晩反応して連結した(図4)。タグにはBanIIの制限酵素切断部位を導入しており, 末端を

dR 5' NH₂-AAAGGAGGAGAAGAAGAAAAA
 3' -TTTCCTCTCTTCTTCTTTTTT-CCCCp

pGGGGTGGGGGCTCAGTCACTGGACT
 ACCCCCGAGTCACTGACCTGA-biotin 5'
 BanII

図4 (上) 相補鎖の例(dR)
 (下) タグの例(Trp)
 BanII 切断部位を下線で, Trp のラベル配列(TGG)を斜線で示す。

ビオチン化している。

(5) 連結産物を Streptavidin Magnetic Beads (Takara Bio) に結合させ洗浄した後, BanII 処理してアミノ酸に対するラベル配列を付加した DNA を得た。

(6) それぞれのアミノ酸について作成したアミノ酸-DNA 連結物を混合した後, 3分割し, (2)~(4)の操作を再度行った(図5)。

(7) 連結産物を Streptavidin Magnetic Beads に結合させ洗浄した後, 37℃, 5分間 0.15 M NaOH 処理により処理して ssDNA を得た。

(8) dY, dR, dT について作成したアミノ酸-ssDNA 連結物を, neomycin 存在下で混合し, 3重鎖を形成させた。

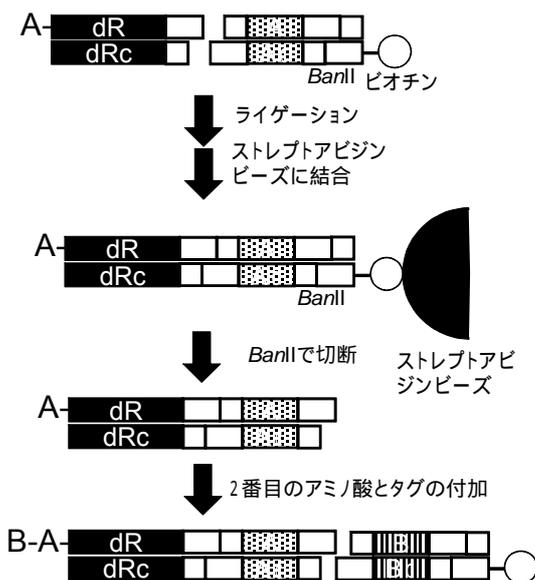


図5 DNA タグの付加方法

(9) 12残基のランダムなペプチド配列をディスプレイしているファージライブラリーである Ph.D. 12(New England Biolabs)を用いて, NF-κB および p38 MAPK に結合するペプチドの取得を行った。streptavidin をコートしたビーズに, biotin 化した NF-κB DNA 結合ドメイ

ン蛋白質および p38 MAPK を固定化し, ファージライブラリーを加え結合させた。結合しなかったファージを洗浄により除去し, ファージを溶出した。溶出したファージを増幅し同様に操作を繰り返した。

4. 研究成果

Trp, Phe, Val の3種類のアミノ酸を用いたジペプチドライブラリーの作成を行った。また, ライブラリーの有効性を示すための比較対象として, 通常のペプチドライブラリーを用いたセレクションも行った。

(1) DNA への Fmoc-AA-OSu の付加

アミノ化 DNA と Fmoc-AA-OSu との反応産物を 20% PAGE により解析した。その結果, 未反応の DNA に比べて反応産物ではバンドが上方にシフトしていることから, Fmoc-AA-OSu の付加が確認された(図6)。

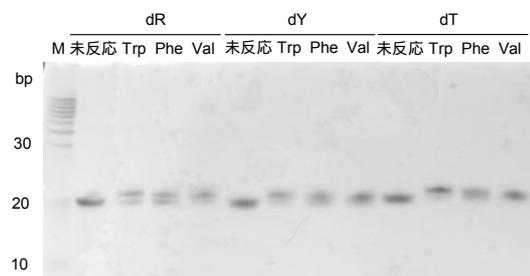


図6 20% PAGE による Fmoc-AA-OSu の DNA への付加の確認

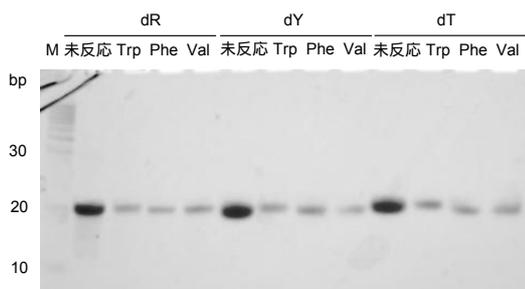


図7 20% PAGE による Fmoc 基の脱保護の確認

(2) Fmoc 基による脱保護

ピペリジンによる脱保護反応産物を 20% PAGE により解析した。その結果, 図6と比べて下の位置にバンドが見られたことから, Fmoc 基の脱保護が確認された(図7)。

(3) DNA タグの連結

脱保護した DNA にそれぞれの相補鎖をアニールし, それぞれのアミノ酸に対応する 21 bp の DNA タグを連結した反応産物を, 20% PAGE により解析した。その結果予想される 50 bp 付近に連結産物と判断されるバンドが見られたことから, DNA タグの連結が確認された(図8)。

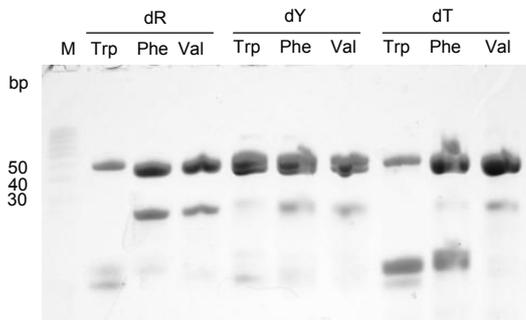


図8 20% PAGEによるDNAタグ連結の確認

(4) 連結産物の制限酵素による切断

連結産物を Streptavidin Magnetic Beads に結合させ洗浄した後、*Ban*II 処理した反応産物を 15% PAGE により解析した。その結果予想される 30 bp 付近に切断産物と判断されるバンドが見られたことから、DNA 断片の Beads からの遊離が確認された (図9)

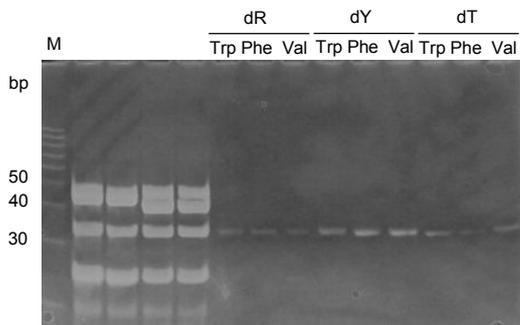


図9 制限酵素処理によるDNA断片のBeadsからの遊離の確認

(5) 2番目のアミノ酸の付加とDNAタグの連結

それぞれのアミノ酸について作成したアミノ酸-DNA 連結物を混合した後、3分割し Fmoc-AA-OSu の付加および対応する DNA タグの連結を行った。反応産物を、15% PAGE により解析した。その結果予想される 60 bp 付近に連結産物と判断されるバンドが見られたことから、DNA タグの連結が確認された(図10)。

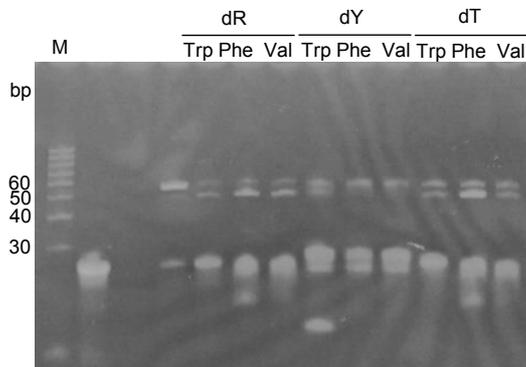


図10 2番目のDNAタグの連結の確認

(6) ssDNA の調製と3本鎖 DNA の形成

連結産物を Streptavidin Magnetic Beads に結合させ洗浄した後、0.15 M NaOH により1本鎖 DNA を解離させた。それぞれのアミノ酸についての ssDNA を混合した後、90 から室温に徐冷することによりアニーリングし、2本鎖 (dR/dY) および3本鎖 (dR/dY+dT)を形成させた。3本鎖形成には、ネオマイシンを 16 μ M となるように加えた。アニーリング後、50 mM Hepes (pH 7.2)を含む 10 % native PAGE を行ったところ、dR/dY と比較して dT を加えた場合にはバンドが上方へシフトしたことから (図 11)、3本鎖が形成されたと考えられる。

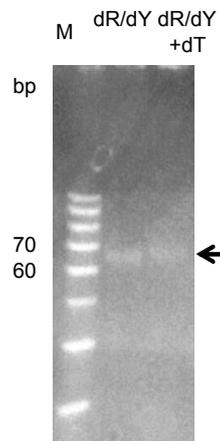


図11 3本鎖DNA形成の確認

(7) 比較対象としての通常のペプチドライブラリーを用いたセレクション

まずペプチドライブラリーを用いて NF- κ B に結合するペプチドの探索を行った。その結果、共通性の高い配列が得られ、このペプチド配列をディスプレイしたファージが NF- κ B に特異的に結合することを確認した。そこで、ファージにディスプレイされた配列のペプチドを合成し、NF- κ B と DNA の結合の阻害活性を解析した。その結果、ペプチドの濃度を増加させると結合率の減少がみられ、0.2 mM で 50% の結合が阻害された。したがって、このペプチドは弱いながらも NF- κ B と DNA の結合を阻害することが示された。ついで、p38 MAPK のリン酸化部分に結合するペプチドの探索を行った。その結果、共通性の高い配列が得られ、このペプチド配列をディスプレイしたファージが p38 MAPK に特異的に結合することを確認した。得られたファージが p38 MAPK のリン酸化部位に特異的に結合するかを調べるために、p38 MAPK のリン酸化部分に対する抗体を加えて ELISA を行った。その結果、ファージのみの場合に比べて抗体を加えた場合にはファージの結合が阻害されることが示された。したがって、得られたファージは p38 MAPK のリン酸化部位に特異的に結合すると考えられる。

(8) まとめと今後の展望

本研究により、アミノ酸に対する DNA タグ付加を簡便に行う方法を確立し、3本鎖 DNA を利用することにより3本のペプチドを束ねたコンビナトリアルレセプターライブラリーの作成を達成できた。本研究で作成したライブラリーはアミノ酸の種類が Trp, Phe, Val の3種類で、連結するアミノ酸も2個にとどまり、ライブラリーとしては多様性に乏しいものである。しかしながら、同様な方法でさらに多くの種類のアミノ酸を使用し、ペプチド鎖も長いライブラリーを作成可能であり、作成法を確立できたという点で有意義な成果が得られたと考えている。また、作成したライブラリーを用いたセレクションにまでは至らなかったが、今後実施する予定であり、有用性を検証したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

春木 満, 緑川尚人, 岡部諭典, 平野展孝
3本鎖DNAを利用したコンビナトリアル合成レセプターライブラリーの作成
平成26年度化学系学協会東北大会, 山形大学米沢キャンパス, 2014年9月20-21日(発表予定)

春木 満, 木原慶彦, 堀籠和人, 安達優太, 平野展孝
ペプチドライブラリーを用いたNF- κ Bおよびp38 MAPK結合ペプチドの探索
第66回日本生物工学会大会, 札幌, 2014年9月9-11日(発表予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春木 満 (HARUKI, Mitsuru)

日本大学・工学部・教授

研究者番号: 30273593