

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590690

研究課題名(和文) アプタマーによるペプチドホルモンオキシトシン高感度測定法の構築とその臨床応用

研究課題名(英文) Development of high sensitivity assay for oxytocin, peptide hormone, and its clinical application utilizing aptamer

研究代表者

佐野 佳弘 (SANO, Yoshihiro)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：40338538

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

研究成果の概要(和文)：アプタマーとは1本鎖DNAまたはRNAで構成され、特異的な立体構造の形成により特定の物質に親和性を示す。本研究では、自閉症スペクトラムに関連するペプチドホルモンであるオキシトシンの高感度測定法の開発をアプタマーにより検討した。オキシトシンに反応するアプタマーの創製をRNAとDNAにより検討した結果、数種のアプタマーを明らかにした。現在、アプタマーとオキシトシンの親和性評価を行っている。

研究成果の概要(英文)：Aptamers are single strand DNA and RNA oligonucleotides binding to their target with high affinity by three-dimensional conformation of aptamers. In this study, we report development of the high sensitivity assay utilizing the aptamer for oxytocin, is associated to autism spectrum. As a result, various aptamers for oxytocin were generated by using RNA and DNA on SELEX. Those aptamers for oxytocin have checked to evaluate the affinity with oxytocin.

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：アプタマー オキシトシン アスペルガー 臨床分析化学

1. 研究開始当初の背景

近年、“幸せホルモン”として一般に広く知られているオキシトシンは人と人の信頼関係に関わる分子として注目されている。オキシトシンは、9つのアミノ酸からなりC末端のアミド化、2つのCysによる内部環状構造の形成といった独特な構造を有するペプチドホルモンである(図1)。また、以前より子宮筋収縮や乳汁の分泌促進機能が知られている。しかし、最近では精神科医療領域において、自閉症スペクトルに、特にアスペルガー症候群との関連性が示唆されており勢

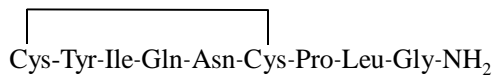


図1 オキシトシンの構造

力的に研究が行われている。当研究室においてもオキシトシンの血中濃度と子供の発育に関する研究のためにイムノアッセイの構築を検討している。しかし、ペプチドなどの低分子における競合イムノアッセイは、抗体の親和性や特異性が測定に大きく影響するため十分な特性を示す抗体を得ることが難しい。そこで、これらの問題点を解決するためにアプタマーに着目した。アプタマーは、1本鎖DNAまたはRNAで構成される核酸分子であり、独特な立体構造の形成により特定の物質に親和性を示す。また、その親和性や特異性は高く抗体に匹敵するといわれている。さらに、抗体にない特徴として幅広い温度や溶液下で安定であること、免疫動物を用いないのでin vitroでの合成が可能であること、免疫寛容がないことなどの利点が挙げられる。これらの抗体と異なる特性を有するアプタマーは、SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) によって創製することができる。(図2)このSELEX技術は、1990年にTuerkとGoldらのグループ、EllingtonとSzostakらのグループによりそれぞれ開発され報告された。以

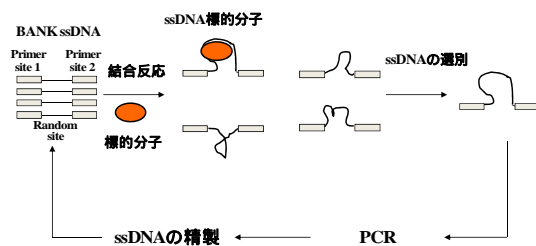


図2 SELEXの概要

後様々なアプタマーが発表されているが、その中でも特に有名なアプタマーとしてトロンピンアプタマーがある。このアプタマーはGとTのみの15塩基のDNAアプタマーであり、トロンピンに結合することで、その凝固作用を阻害する。また、2004年には加齢黄斑変性症治療薬として、世界初のRNAア

プタマー医薬「Macugen」もアメリカで承認されており、アプタマーが今後抗体に代わる診断や治療のためのツールとして期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、自閉症スペクトラムとの関連が示唆されているオキシトシンの高感度測定法の開発をアプタマーにより検討する。

3. 研究の方法

(1) オキシトシン反応性 RNA アプタマーの検討

5'末端に20塩基と3'末端に24塩基のプライマー領域を設定し、その間に30塩基のランダム配列からなるRNAライブラリー(BANK RNA)を用いてSELEXを行った。RNAを加温して立体構造を形成させた後オキシトシンと室温で反応させることでRNA-オキシトシン複合体とし、その複合体からRNAを遊離させて回収した。次に得られたRNAをRT-PCRにより増幅後、T7 RNAポリメラーゼによる転写反応を行った。この一連の操作を1ラウンド、ここで得られたRNAをGeneration 1 RNA (G1 RNA)とし、次のラウンドを開始するためのRNAとする。また同様に2ラウンド目、3ラウンド目に得られたRNAをそれぞれG2 RNA、G3 RNAとした。このラウンドを重ねる毎に反応条件を厳しくすることでオキシトシンに親和性を示すRNAを選別した。オキシトシンとの親和性が確認できたラウンドでSELEXは終了し、得られた最終ラウンドのPCR産物をTAクローニングした。次に、得られた単一クローン(プラスミド)を調製し塩基配列を決定した。続いて、決定した塩基配列の相同性や類似性を解析し親和性評価に用いるアプタマーを選択した。アプタマーのオキシトシンに対する親和性評価は、ゲルシフトアッセイにより検討した。

(2) オキシトシン反応性 DNA アプタマーの検討

(1) オキシトシン反応性 RNA アプタマーの検討で用いたRNAライブラリー(BANK RNA)をRT-PCRにより増幅し、ssDNA(sense鎖DNAのみ)を回収した。そして、このssDNAをDNA BANKとしてSELEXを行った。ssDNAを加温して立体構造を形成させた後オキシトシンと室温で反応させることでssDNA-オキシトシン複合体とし、その複合体からssDNAを遊離させて回収した。次に得られたssDNAを非対称PCR(Asymmetric PCR)により増幅後、ssDNA(sense鎖DNAのみ)を回収した。この一連の操作を1ラウンド、ここで得られたssDNAをGeneration 1 ssDNA (G1 DNA)とし、次のラウンドを開始するためのssDNAとする。

また同様に 2 ラウンド目、3 ラウンド目に得られた ssDNA をそれぞれ G2 DNA、G3 DNA とした。このラウンドを重ねる毎に反応条件を厳しくすることでオキシトシンに親和性を示す ssDNA を選別した。オキシトシンとの親和性が確認できたラウンドで SELEX は終了し、得られた最終ラウンドの PCR 産物を TA クローニングした。次に、得られた単一クローン（プラスミド）を調製し塩基配列を決定した。続いて、決定した塩基配列の相同性や類似性を解析し親和性評価に用いるアプタマーを選択した。アプタマーのオキシトシンに対する親和性評価は、Dot blot 解析により検討した。（図 3）

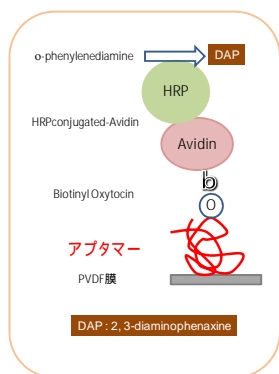


図 3 Dot blot法によるアプタマーの評価方法

(3) オキシトシン反応性 DNA アプタマー (FluMag-SELEX) の検討

5' 末端に 18 塩基と 3' 末端に 18 塩基のプライマー領域を設定し、その間に 61 塩基のランダム配列からなる ssDNA ライブラリー (BANK DNA) をスタートとした。加温して立体構造を形成させた ssDNA をオキシトシンと室温で反応させることで ssDNA -オキシトシン複合体とし、その複合体から ssDNA を遊離させて回収した。次に得られた ssDNA を PCR により増幅後 (Forward Primer の 5' 末端には Fluoresceine を付加している) 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により ssDNA (sense 鎖 DNA のみ) を切り出し、蛍光バンドをゲルから回収した。回収した ssDNA は、蛍光測定し各ラウンドの結果として評価した。この一連の操作を 1 ラウンド、ここで得られた ssDNA を R1 DNA とし、次のラウンドを開始するための ssDNA とする。また同様に 2 ラウンド目、3 ラウンド目に得られた ssDNA をそれぞれ R2 DNA、R3 DNA とした。このラウンドを重ねることでオキシトシンに親和性を示す ssDNA を選別した。オキシトシンとの親和性が確認できたラウンドで SELEX は終了し、得られた最終ラウンドの PCR 産物を TA クローニングした。次に、得られた単一クローン (プラスミド) を調製し塩基配列を決定した。続いて、決定した塩基配列の相同性や類似性を解析し親和性評価に用いるアプタマーを選択した。

4 . 研究成果

(1) オキシトシン反応性 RNA アプタマーの検討

SELEX を全 32 サイクル行い RNA の選別を行った結果、18 ラウンド目においてオキシトシンとの結合率が 37% と高値を示した。次に、オキシトシンに対する親和性評価をゲルシフトアッセイにより確認した結果、RNA がオキシトシンと結合することによりシフトしたと考えられるバンドが観察された。つまり、オキシトシン反応性 RNA が選別されていることが示唆された。そこで、18 ラウンド目の塩基配列を決定した結果、多種類の RNA 配列が観察された。しかし、SELEX の選別では、通常ある特定の (同一の) 塩基配列がいくつか観察されるのだが、そのような塩基配列の集約は確認できなかった。これらのことから、オキシトシン反応性 RNA アプタマーを得ることが困難だと考え以下の (2) オキシトシン反応性 DNA アプタマーの検討を行った。

(2) オキシトシン反応性 DNA アプタマーの検討

オキシトシン反応性 RNA アプタマーに用いた BANK RNA を逆転写 PCR することにより、BANK DNA を作製し 500 pmol (ssDNA) を得た。PCR 増幅においては、Forward Primer と Reverse Primer を均等に使用しない Asymmetric PCR の条件検討により最適条件を決定した。B/F 分離条件、非対称 PCR 増幅条件の検討により得られた最適条件下で SELEX を行った結果、18 種のアプタマーが明らかとなった。次にオキシトシンに対する親和性評価として、Dot blot 解析を行ったところ、オキシトシンと反応性を示すアプタマーが確認された。(図 4 : アプタマー-B3) しかし、親和性が低いため、オキシトシン測定法の構築には至ら

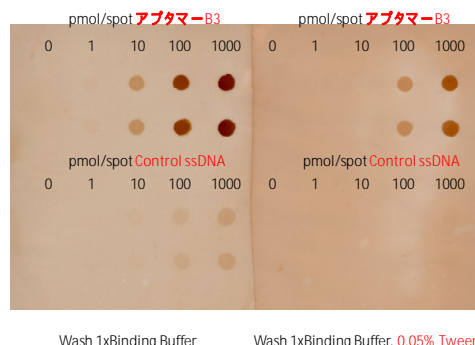


図 4 Dot blot法によるアプタマーの評価結果なかった。そこで、(3) オキシトシン反応性 DNA アプタマー (FluMag-SELEX) の検討を行った。

(3) オキシトシン反応性 DNA アプタマー (FluMag-SELEX) の検討

上記 (1) と (2) では、BANK DNA (RNA)

のランダム配列が 30 塩基であった。そこで、ランダム配列が 61 塩基の BANK に変更し、より多くの核酸配列を含む BANK を用いて SELEX を行った。さらに、SELEX ラウンド毎のオキシトシンとの親和性評価を簡便にする目的で SELEX の条件を FluMag-SELEX に変更した。その結果、各ラウンドでコントロール(ネガティブ)とオキシトシンとの親和性を評価することが可能となった。この FluMag-SELEX により検討した結果、塩基配列の集約が確認できた。この結果より、FluMag-SELEX でオキシトシン反応性アプタマーが得られていると考える。しかし、オキシトシンとの親和性評価は現在行っている状況である。

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 3 件)

K. Karasawa, Y. Sano, H. Arakawa
Development of novel telomerase assay using PPKK-luciferin-luciferase detection system (Luminescence, doi:10.1002/bio.2501, 2013 Apr 2)、査読有り

K. Ohno, C. Nakata, Y. Sano, F. Nishikawa, S. Nishikawa and H. Arakawa
Development of RNA aptamer and its ligand binding assay on microchip electrophoresis Current Chemical Genomics, 6, 1-5, 2012、査読有り

Y. Sano, M. Seki, S. Abe, S. Suzuki and H. Arakawa
Bioluminescent assay for nitric oxide utilizing the biological enzyme activity of soluble guanylate cyclase. Analytical Letters. 44(17): 2834 - 40. 2011、査読有り

[学会発表](計 8 件)

血中 Oxytocin 測定を目的とした EIA の確立
原谷汐美、佐野佳弘、大熊博、荒川秀俊
第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2013 年 8 月 2~3 日 東京

Development of novel telomerase assay by bioluminescent detection method
K. Karasawa, Y. Sano, H. Arakawa
17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2012)
2012 年 5 月 28 日~6 月 2 日, Guelph, Canada

Oxytocin 測定法の開発を目的としたアプ

タマーの創製

佐野佳弘、塚本啓貴、荒川秀俊
日本薬学会 132 年会 2012 年 3 月 28 日~31 日 札幌

人工核酸抗体を用いたアプタマーアッセイ

荒川秀俊
生物化学的測定研究会 第 17 回学術集会
2012 年 6 月 東京

SELEX 法によるオキシトシン反応性アプタマーの創製

佐野佳弘、伊與田佳介、塚本啓貴、荒川秀俊
第 25 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2012 年 8 月 2 日(金)~8 月 3 日 東京

Development of high sensitivity bioluminescent enzyme immunoassay for oxytocin as biomarkers for psychiatric disorder

Yoshihiro Sano, Shiomi Ohta, Hiroshi Ohkuma, Haruhumi Tsuge and Hidetoshi Arakawa.

2nd World Congress on Biomarkers & Clinical Research, 2011 年 9 月 12 日~14 日 Baltimore, USA

血中 Oxytocin 測定を目的とした 生物発光 Enzyme Immunoassay の確立

佐野佳弘、太田汐美、荒川秀俊
生物発光化学発光研究会第 28 回学術講演会
2011 年 10 月 8 日 長崎

生物発光法を用いた新規テロメラーゼ分析法の開発

唐沢浩二、佐野佳弘、荒川秀俊
生物発光化学発光研究会第 28 回学術講演会
2011 年 10 月 8 日 長崎

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 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 0 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
<http://www10.showa-u.ac.jp/~bachem/blankpage.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 佳弘 (SANO, Yoshihiro)
昭和大学・薬学部・講師
研究者番号：40338538

(2) 研究分担者

荒川 秀俊 (Arakawa, Hidetoshi)
昭和大学・薬学部・教授
研究者番号：70129807

(3) 連携研究者

()

研究者番号：